



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fakultät für Medizin
Klinikum rechts der Isar
Abteilung und Poliklinik für Sportorthopädie

**Biomechanische Analyse nach Achillessehnenheilung
durch bFGF-transduzierte Stammzellen
im Langzeitversuch an der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Doktors der Medizin (Dr. med.)
der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München

vorgelegt von
Alexander Hofmann
aus Erlabrunn

2015



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fakultät für Medizin
Klinikum rechts der Isar
Abteilung und Poliklinik für Sportorthopädie

**Biomechanische Analyse nach Achillessehnenheilung
durch bFGF-transduzierte Stammzellen
im Langzeitversuch an der Ratte**

Alexander Hofmann

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Stephan W. Vogt
2. Univ.-Prof. Dr. Andreas B. Imhoff

Die Dissertation wurde am 09.09.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	III
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Anatomie und Biomechanik der Achillessehne	3
2.1.1 Anatomie der Achillessehne des Menschen	3
2.1.2 Anatomie der Achillessehne der Ratte und Unterschiede zum Mensch	7
2.1.3 Mechanische Eigenschaften der Achillessehne des Menschen	8
2.2 Ruptur der Achillessehne beim Menschen	11
2.2.1 Epidemiologie	11
2.2.2 Ätiologie und Pathogenese	12
2.2.3 Therapie	15
2.3 Physiologie der Sehnenheilung	18
2.4 Stand der Wissenschaft	21
2.4.1 Tiermodell	21
2.4.2 Biomechanische Untersuchungen der Achillessehnenheilung	22
2.4.3 Therapieansätze mit Stammzellen und Wachstumsfaktoren	24
2.4.4 Basic fibroblast growth factor (bFGF)	27
3 Fragestellung und Studienziel	30
4 Material und Methodik	32
4.1 Studienaufbau	32
4.2 Gewinnung der Präparate	33
4.3 Biomechanische Testung der Sehnenpräparate im Zugversuch	36
4.3.1 Messgrößen und berechnete Parameter	36
4.3.2 Versuchsaufbau	36
4.3.3 Einspanntechnik	38
4.3.4 Erfassung der Messparameter	43
4.3.5 Versuchsablauf	43
4.4 Statistische Auswertung der Messdaten	45
4.4.1 Vergleich mit der Gegenseite – Bildung von Wertepaaren	45

4.4.2	Berechnung der Steifigkeit	45
4.4.3	Statistik	47
5	Ergebnisse	49
5.1	Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung	49
5.2	Ergebnisse der biomechanischen Testung	49
5.2.1	Maximale Kraft	49
5.2.2	Steifigkeit	51
5.3	Ergebnisse der statistischen Auswertung	53
5.3.1	Vergleich von behandelter Seite und Gegenseite	53
5.3.2	Vergleich der Versuchsgruppen	55
5.3.3	Korrelation von maximaler Kraft und Steifigkeit	57
5.3.4	Vergleich mit vorangegangenen Untersuchungen	59
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	63
6	Diskussion	65
6.1	Diskussion der Methodik	65
6.2	Interpretation der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur	69
6.2.1	Heilung der Sehnen im Langzeitversuch	69
6.2.2	Unterschiede zwischen den Gruppen nach 84 Tagen	70
6.2.3	Einfluss der Behandlung mit Stammzellen und bFGF	70
6.2.4	Vergleich mit der vorhergegangenen Untersuchung	72
6.2.5	Ossifikationen	73
6.3	Limitationen	75
6.4	Schlussfolgerungen und klinische Relevanz	79
7	Zusammenfassung	81
	Abbildungsverzeichnis	83
	Tabellenverzeichnis	85
	Literaturverzeichnis	86
	Anhang	94
	Danksagung	96

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ASK	Arthroskopie
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMC	<i>bone marrow cell</i>
ebd.	ebenda
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
IBM	<i>International Business Machines</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
M.	Musculus
Mac OS	<i>Macintosh operating system</i>
Max	Maximum
Min	Minimum
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i>
MW	Mittelwert
N.	Nervus
N ₂	Stickstoff
OP	Operation
OSG	Oberes Sprunggelenk
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>platelet concentrate</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PRP	<i>platelet rich plasma</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
TGF-β1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
USG	Unteres Sprunggelenk
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1 Einleitung

Achilleus (lateinisch Achilles, deutsch Achill), Sohn des Peleus, König von Thessalien, und der Meeresnymphe Thetis, ist in der griechischen Mythologie ein legendärer und nahezu unverwundbarer Kämpfer und Held [**Shampo und Kyle**, 1992, **Maffulli**, 1999, **Döderlein et al.**, 2004]. Er ist der Hauptheld in Homers *Ilias* und der Namensgeber der Achillessehne und des Achillessehnenreflexes [ebd.]. Durch seinen menschlichen Vater war Achilleus sterblich, daher tauchte ihn seine Mutter Thetis in den Fluss Styx, um ihn unverwundbar zu machen [ebd.]. Da sie ihn an der Ferse hielt und diese nicht mit dem Wasser in Berührung kam, blieb die Ferse die einzig verwundbare Stelle seines Körpers [ebd.]. Über Achilleus' Tod berichtete Homer selbst nichts [ebd.]. Nach den *Fabeln des Hygin* und der *Aeneis* kam Achilleus im Krieg um Troja durch einen von Apollon gelenkten Pfeil des Paris zu Tode [**Shampo und Kyle**, 1992, **Maffulli**, 1999, **Döderlein et al.**, 2004].

Die Achillessehne ist die dickste und stärkste Sehne des menschlichen Körpers [**O'Brien**, 2005, **Schuh et al.**, 2009]. Sehnen erfüllen eine bedeutende Funktion: Sie bilden den Übergang zwischen Muskel und Knochen. Die in der Muskulatur erzeugte Kraft wird durch Sehnen auf die Knochen übertragen und ermöglicht damit die Bewegung der Gelenke.

Viele extrinsische und intrinsische Faktoren machen die Achillessehne besonders anfällig für Verletzungen [**Järvinen et al.**, 2005]. Sie unterliegt bei alltäglichen Beschäftigungen von morgens bis abends, besonders aber beim Sport ständiger Belastung [ebd.]. Eine steigende Inzidenz von Achillessehnenverletzungen in den Industrieländern wird auf zunehmende sportliche Betätigung zurückgeführt [ebd.]. Die Sehne ist durch ihre exponierte Lage unmittelbar unter der Haut besonders anfällig für mechanische Einwirkungen wie Druck, Biegungen und Schläge [**Wechselberger und Gruber**, 2005]. Zudem lässt die ohnehin spärliche Blutversorgung der Sehne im Alter noch weiter nach [ebd.]. Daraus resultiert, dass die Ruptur der Achillessehne die häufigste Sehnenruptur des Körpers ist [ebd.].

Sehnenverletzungen bedeuten daher fast immer wesentliche Einschränkungen im Alltag. Der Erstbeschreiber der Achillessehnenruptur, Hippokrates von Kos, sah als Folge einer Quetschung oder Verletzung dieser Sehne schlimmstes Fieber sowie die Verwirrung der Sinne und auf lange Sicht den Tod [**Carden et al.**, 1987,

Thermann, 1996, **Maffulli**, 1999]. Derart dramatische Verläufe sind in der Gegenwart sicher selten; die hohe epidemiologische Relevanz der Achillessehnenruptur macht jedoch eine tiefgreifende Beschäftigung mit den Prozessen der Sehnenheilung unabdingbar. Die Abläufe sind vielfach untersucht, aber noch nicht bis ins Detail geklärt. In der Literatur werden verschiedene vielversprechende Ansätze diskutiert. Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Fragestellungen sind Untersuchungen mit Stammzellen und Wachstumsfaktoren.

Der Einfluss des *Basic fibroblast growth factors* (bFGF) auf die Sehnenheilung war bereits Gegenstand einiger Arbeiten. Bisherige Untersuchungen beschäftigten sich jedoch mit dem Einfluss von bFGF auf die frühen Stadien der Sehnenheilung. Im Rahmen dieser Arbeit sollen nun in einem biomechanischen Langzeitversuch die Einflüsse von bFGF auf die späteren Stadien der Sehnenheilung untersucht werden.

2 Grundlagen

2.1 Anatomie und Biomechanik der Achillessehne

2.1.1 Anatomie der Achillessehne des Menschen

Die Achillessehne bildet die Ansatzsehne der oberflächlichen Beugemuskulatur des Unterschenkels mit Ausnahme des Musculus (M.) plantaris [Maffulli, 1999]. Sie vereint die Sehnen „der drei Anteile des M. triceps surae (M. soleus, M. gastrocnemius medialis, M. gastrocnemius lateralis)“ [Petersen, 2007].

Der zweiköpfige M. gastrocnemius ist ein klassisches Beispiel für einen mehrgelenkigen Muskel. Er hat seine Ursprünge oberhalb des Epikondylus medialis bzw. lateralis des Femurs [Wurzinger, 2007]. Der Muskel hat keine direkte Beziehung zum Unterschenkel, sondern überquert diesen lediglich [Döderlein et al., 2004]. Somit beeinflusst er drei Gelenke: das Kniegelenk sowie das obere (OSG) und untere Sprunggelenk (USG). Der M. soleus hat seinen Ursprung an der Hinterfläche der Tibia und der Fibula sowie am Caput fibulae [Weineck, 2008]. Diese drei Anteile des M. triceps surae setzen mittels der Achillessehne am Tuber calcanei an. Im OSG gilt der M. triceps surae als stärkster Beugemuskel, im USG als „stärkster Supinator“ [Wurzinger, 2007].

Die Innervation des M. triceps surae und der Achillessehne erfolgt durch den N. tibialis [Thermann, 1996, Weineck, 2008]. Der „M. triceps surae gilt als Kennmuskel [für das] Segment S1“ [Wurzinger, 2007]. Die klinische Überprüfung erfolgt durch den Achillessehnenreflex [ebd.].

Medial der Achillessehne liegt die „sehr dünne und nicht palpable Sehne des M. plantaris“ [Winkel et al., 2004]. Diese fehlt in 6-8% der Fälle [O'Brien, 2005]. Selbst bei einer Totalruptur der Achillessehne bleibt die Plantarissehne meist unversehrt [Winkel et al., 2004].

Sehnen sind zugfeste Strukturen und wirken als Überträger der in der Muskulatur erzeugten Kraft auf das Erfolgsorgan, die Knochen [Weineck, 2008]. Das Resultat ist eine Bewegung der Gelenke [ebd.]. Mikroskopisch bestehen Sehnen aus Flügelnzellen (Tenozyten), die in eine Extrazellulärmatrix eingebettet sind [ebd.].

Die Tenozyten „sind flache Fibroblasten“, „enthalten Aktin und Myosin“ [Welsch, 2009] und synthetisieren eine Vielzahl von Substanzen. Wichtige Syntheseprodukte (siehe Tabelle 1) sind Kollagene, elastische Fasern, Proteoglykane, Bindungsproteine und Wachstumsfaktoren [Zschäbitz, 2005]. Die Syntheseprodukte werden in den Extrazellulärraum abgegeben [ebd.].

Die Extrazellulärmatrix besteht zu großen Anteilen aus Kollagen sowie aus elastischen Fasern, Proteoglykanen, Wasser und anderen Glykoproteinen [Kader et al., 2002, Weineck, 2008]. Ursächlich für den hohen Wassergehalt (55% bis 70%) der Sehnen ist die negative Ladung der Proteoglykane, die osmotisch wirksam sind [Zschäbitz, 2005, James et al., 2008, Hügler et al., 2012].

Substanzgruppe	Anteil in der Trockenmasse der Extrazellulärsubstanz
Kollagene (Typ I, II, III)	80-90 %
Elastische Fasern	1-2 %
Proteoglykane	0,2-3,5 %
Bindungsproteine	1-4 %
Wachstumsfaktoren	
Sonstiges (Prostaglandine, Stickstoffmonoxid)	

Tabelle 1: „Syntheseprodukte der Tenozyten“ und deren Anteil an der Extrazellulärmatrix [Modifizierte Darstellung nach Zschäbitz [2005]]

Kollagenfasern bilden den größten Anteil der Extrazellulärmatrix [Zschäbitz, 2005]. Die gesunde Achillessehne besteht nahezu vollständig (95%) aus Kollagen Typ I [Maffulli, 1999]. Typ I Kollagen wird für die mechanische Stabilität der Sehne verantwortlich gemacht [Okamoto et al., 2010]. Eine rupturierte Achillessehne hingegen enthält zu nicht unerheblichen Teilen Kollagen Typ III, dem eine wichtige Funktion bei der Sehnenheilung zugesprochen wird [Eriksen et al., 2002, Okamoto et al., 2010].

Kollagenmoleküle vom Typ I bestehen aus drei identischen Polypeptidketten (Tropokollagen) [Welsch, 2009]. Durch Polymerisation entstehen daraus Kollagenfibrillen [ebd.]. Kollagenfibrillen sind zu Kollagenfasern (Faszikeln) gebündelt und von Endotenon umgeben [Maffulli, 1999, James et al., 2008, Omeroglu et al., 2009]. Zwischen den parallel angeordneten Kollagenfibrillen liegen Fibroblasten [ebd.]. In den Faszikeln verlaufen Nerven, Lymph- und Blutgefäße [ebd.]. Die Faszikel werden zu Sekundär- und Tertiärbündeln zusammengefasst [Zschäbitz,

2005]. Mehrere Tertiärbündel sind von einem kräftigen Kollagenfasernetz, dem Epitenon, umgeben und bilden eine Sehne [ebd.]. Die Struktur und der Aufbau einer Sehne ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

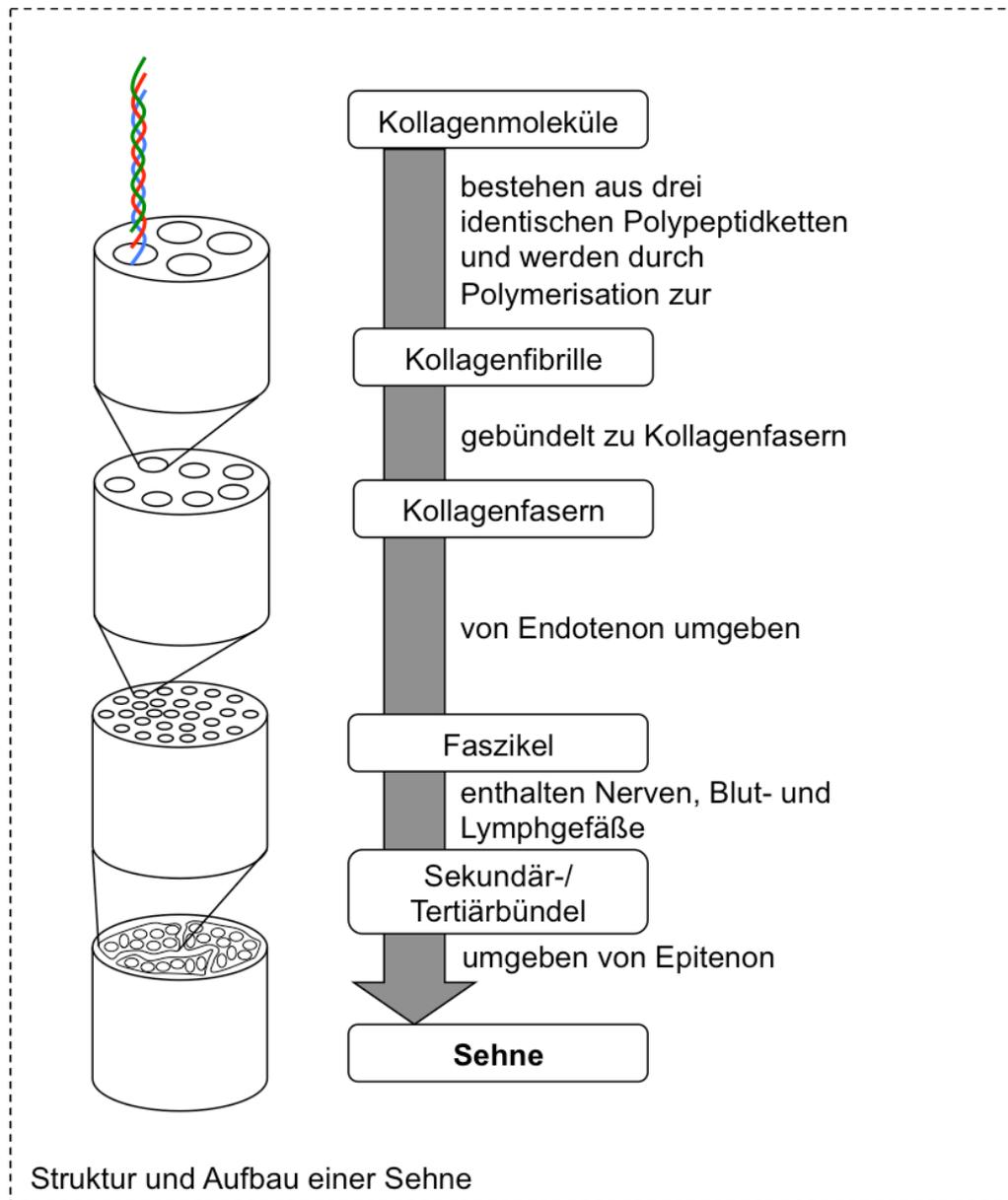


Abbildung 1: Struktur und Aufbau einer Sehne [eigene Darstellung nach Fenwick et al. [2002] und James et al. [2008]]

Die Achillessehne verläuft nicht in einer Sehnenscheide [Thermann, 1996, Kader et al., 2002, Weineck, 2008]. Umgeben wird die Sehne vom sogenannten Paratenon, einer dünnen Membran, die aus der Fascia cruris hervorgeht [Kader et al., 2002]. Zur Gewährleistung einer guten Verschieblichkeit der Sehne liegt das Paratenon dem Epitenon nicht direkt auf, sondern ist durch eine Flüssigkeitsschicht von diesem getrennt [Maffulli, 1999].

Die in der Achillessehne vereinten Ansatzsehnen verlaufen nicht parallel, sondern sind spiralförmig um 90° gedreht [Kader et al., 2002, Petersen, 2007]. Medial liegende Sehnenfasern im proximalen Anteil liegen posterior im distalen Anteil der Achillessehne [Maffulli, 1999]. Dies verleiht der Sehne eine höhere Elastizität und ermöglicht die Freisetzung von gespeicherter kinetischer Energie während der Fortbewegung [Maffulli, 1999, Kader et al., 2002, Döderlein et al., 2004]. Die Speicherkapazität der Sehne „soll dabei um den Faktor 400-1800 höher liegen als bei Muskelgewebe“ [Zschäbitz, 2005].

Sehnen gelten allgemein als schlecht durchblutetes Gewebe und sind auf die Ernährung in Form von Diffusion durch die Gelenkflüssigkeit angewiesen [Fenwick et al., 2002]. Die Blutversorgung von Sehnen erfolgt am Muskel-Sehnen-Übergang, am Sehnen-Knochen-Übergang und durch das umgebende Gewebe [Maffulli, 1999, Fenwick et al., 2002, Sharma und Maffulli, 2005]. Die Durchblutung der Achillessehne ist altersabhängig und in jungen Jahren stärker ausgeprägt [ebd.]. Bei starker Muskelaktivität kann die Durchblutung der Sehne um das Siebenfache gesteigert werden [Zschäbitz, 2005]. Das typische weiße Erscheinungsbild von Sehnen ist in der weitgehenden Avaskularität begründet [O'Brien, 2005].

Etwa 3 bis 6 cm proximal des Calcaneus befindet sich die Sehnentaille, der empfindlichste Punkt der Achillessehne [Thermann, 1998, Petersen et al., 2005]. Verschiedene Studien zeigten, dass die Blutversorgung in diesem Bereich deutlich reduziert ist [Petersen et al., 2005, Petersen, 2007]. Über die Auswirkungen der verringerten Durchblutung ist man in der Literatur verschiedener Meinung. Nach Thermann [1998] traten Spontanrupturen der Achillessehne überwiegend in diesem Bereich auf. Die Durchblutungsverminderung führe pathophysiologisch zu einer „Verminderung der mechanischen Eigenschaften der Sehne“ [Thermann,

1996]. **Fenwick et al.** [2002] hingegen stellten fest, dass es keine direkte Evidenz für die Minderdurchblutung als primäre Ursache für Sehnenrupturen gab. **Theobald et al.** [2005] sahen als Folge der Minderdurchblutung in diesem Bereich zumindest eine erhöhte Anfälligkeit der Sehne für Rupturen.

Der langsame Heilungsverlauf von Sehnenverletzungen wird auf den im Vergleich zu anderen anatomischen Strukturen deutlich geringeren metabolischen Umsatz und eine geringere Durchblutung von Sehngewebe zurückgeführt [**Hügler et al.**, 2012].

2.1.2 Anatomie der Achillessehne der Ratte und Unterschiede zum Mensch

Das Rattenmodell ist ein gängiges Modell zur histologischen und biomechanischen Evaluation der Sehnenheilung (siehe Kapitel 2.4.1). Dennoch sind die in den Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse nicht uneingeschränkt auf die humane Sehnenheilung übertragbar. In der Literatur werden anatomische Unterschiede der Achillessehne zwischen Mensch und Ratte aufgezeigt.

Barfred [1973] beschäftigte sich mit der Achillessehnenruptur und schrieb ausführlich über die Eignung der Ratte als Versuchstier. Wie beim Menschen auch entspringt der *M. triceps surae* den Rückseiten der Femurkondylen, der *M. soleus* geht aus der Rückseite der Tibia mit einer flachen Sehne hervor [ebd.]. Die Sehnen der Muskeln vereinigen sich in der Achillessehne und inserieren etwa 60° gedreht an der Rückfläche des Calcaneus [ebd.]. Im Unterschied zur menschlichen Achillessehne sind die Sehnen des *M. triceps surae* selbst nah am Calcaneus äußerst gering verzahnt und lassen sich gut dem zugehörigen Muskel zuordnen [ebd.]. Ein weiterer deutlicher Unterschied besteht im – bei Menschen eher spärlich ausgeprägten – *M. plantaris* und dessen Sehne [ebd.]. Bei der Ratte wird ein starker *M. plantaris* mit einer ausgeprägten Sehne beschrieben [**Barfred**, 1973].

Die gut entwickelte Plantarissehne wirkt möglicherweise in Untersuchungen zur Achillessehnenheilung am Rattenmodell wie eine interne Schienung [**Murrell et al.**, 1994]. Um einen derartigen Einfluss auszuschließen, wird die Sehne in vielen Studien im Rahmen des operativen Eingriffes entfernt [**Murrell et al.**, 1994, **Aspenberg und Forslund**, 1999, **Forslund et al.**, 2003, **Zhang et al.**, 2003,

Aspenberg und Virchenko, 2004, Rickert et al., 2005, Pietschmann et al., 2013].

2.1.3 Mechanische Eigenschaften der Achillessehne des Menschen

Die Achillessehne bildet gemeinsam mit dem Calcaneus und der Wadenmuskulatur eine funktionelle Einheit, die entscheidend für das Stehen, Laufen und Springen verantwortlich ist [**Weineck, 2008**]. Sie zeichnet sich durch „große Reißfestigkeit, Elastizität und Plastizität bei geringer Dehnbarkeit aus“ [**Thermann, 1999**].

Thermann [1996] untersuchte die Reißfestigkeit der menschlichen Achillessehne an Präparaten von 20 Verstorbenen aus zwei Alterskollektiven (24 bis 35 und 36 bis 59 Jahre). Bei der biomechanischen Testung der Sehnen wurden für die maximale Reißkraft Mittelwerte von etwa 5000 N mit Maximalwerten von 6900 N gemessen [ebd.]. Signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen wurden jedoch nur für die Steifigkeit festgestellt [ebd.]. In der Altersgruppe unter 35 Jahren war die Steifigkeit signifikant höher ($p=0,0233$) [**Thermann, 1996**].

Franke [1986] beschrieb die Rissfestigkeit der Achillessehne unter statischer und dynamischer Belastung. Diese lag unter statischer Belastung bei etwa 6700 N, unter dynamischer Belastung bei etwa 9100 N [ebd.]. Kurzzeitiger, dynamischer Krafteinwirkung widerstand die Achillessehne somit besser als einer länger einwirkenden, statischen Krafteinwirkung [**Franke, 1986**].

Die Achillessehne ist im Sport für Sekundenbruchteile erheblichen biomechanischen Belastungen ausgesetzt: **Fukashiro et al. [1995]** untersuchten die maximale Kraft, die bei Sprüngen auf die menschliche Achillessehne wirkt. Beim wiederholten Springen auf der Stelle (Sprunghöhe 7 cm) wurde eine maximale Kraft von etwa 3800 N gemessen [**Fukashiro et al., 1995**]. Eine besondere Beanspruchung der Achillessehne erfolgt zudem beim Gehen (2400 N), Laufen (5900 N), Sprinten (8800 N), Weitsprung (15000 N) und Hochsprung (11800 N) [**Weineck, 2008**].

Die in Ruhe leicht gewellten Kollagenfasern gleichen die mechanische Belastung durch Dehnung aus [**Kader et al., 2002**]. Ab einer Dehnung von mehr als 2% liegen die Kollagenfasern nicht mehr gewellt vor [ebd.]. Bleibt die Dehnung unter

4% der Sehnenlänge, so nehmen die Fasern bei Nachlassen der Belastung wieder ihre ursprüngliche Konfiguration ein [Maffulli, 1999]. Bei einer Dehnung zwischen 4% und 8% kommt es bereits zum Versagen der Quervernetzungen und die Kollagenfasern beginnen zu gleiten [ebd.]. Belastungen, die zu einer Dehnung größer 8% führen, haben ein Versagen der Fasern und damit eine Ruptur der Sehne zur Folge [ebd.].

Die biomechanischen Versuche dienen der Gewinnung von Daten, um weitere Aussagen über die Reißfestigkeit von Sehnen treffen zu können. Die erhobenen Messwerte können in einem Kraft-Weg-Diagramm dargestellt werden und veranschaulichen die biomechanischen Eigenschaften einer Sehne.

James et al. [2008] beschrieben schematisch das Kraft-Weg-Diagramm eines Sehnenreißversuches und verknüpften die Beobachtungen mit der Anatomie der Sehne. Das typische Kraft-Weg-Diagramm (Abbildung 2) lässt sich in drei Bereiche aufteilen: Sohle, linearer Anstieg und Versagen der Sehne [ebd.].

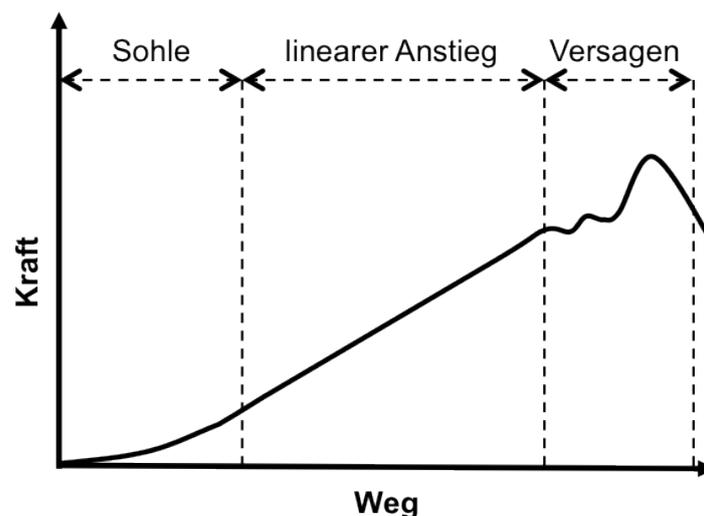


Abbildung 2: Schema eines Kraft-Weg-Diagramms [eigene Darstellung nach James et al. [2008]]

Zu Beginn des Zugversuches werden die im Ruhezustand leicht gewellten, in Zugrichtung angeordneten Kollagenfasern gedehnt [James et al., 2008]. Die Dehnung der Kollagenfasern gleicht anfangs die applizierte Kraft aus [ebd.]. Diese physiologische Dehnbarkeit führt zu einer „weichen, gedämpften Kraftübertragung zwischen Sehne und Muskel“ [Welsch, 2009]. Die Kraft steigt anschließend linear an, wenn die Kollagenfasern nicht mehr gewellt sind [James et al., 2008]. Der

Anstieg dieses Bereiches der Kurve entspricht der Steifigkeit der Sehne [ebd.]. (Zur Berechnung der Steifigkeit aus dem Kraft-Weg-Diagramm siehe Kapitel 4.4.2.) Wirkt weiterhin eine Kraft auf die Sehne, so kommt es im Anschluss an den linearen Anstieg zu einem Versagen der Kollagenfasern [ebd.]. Einzelne Fasern reißen, was schließlich eine Kompletttraktur der Sehne zur Folge hat [ebd.].

2.2 Ruptur der Achillessehne beim Menschen

2.2.1 Epidemiologie

War die Achillessehnenruptur am Anfang der 50er Jahre noch eine seltene Pathologie, so wird seit dieser Zeit eine steigende Inzidenz beobachtet [Barfred, 1973]. Christensen [1953] fand zwischen 1936 und 1953 unter 70.000 behandelten Patienten einer orthopädischen Abteilung nur 57 Achillessehnenrupturen. Jozsa et al. [1989] beobachteten einen deutlichen Anstieg der Inzidenz. Zwischen 1972 und 1985 wurden 292 Achillessehnenrupturen behandelt. Thermann [1996] fand zwischen 1987 und Mai 1992 insgesamt 202 Patienten mit einer Achillessehnenruptur. Bei 15 Patienten lag die Ruptur zeitlich etwas zurück. Leppilahti et al. [1996] berichteten von einem Anstieg der Inzidenz der Achillessehnenruptur von 2 auf 12/100.000 in Oulu, Finnland zwischen 1979 und 1994. In Deutschland werden pro Jahr etwa 16.000 Rupturen der Achillessehne beobachtet [Knobloch et al., 2007].

Die Angaben zur Altersverteilung der Achillessehnenruptur variieren und beschreiben einen Altersgipfel zwischen 30 und 50 Jahren. Frings [1969] beobachtete ein gehäuftes Auftreten bei Patienten zwischen 20 und 30 Jahren. Die Untersuchung des selektionierten Patientengutes des Krankenhauses für Sportverletzte Hellersen-Lüdenscheid lässt jedoch keine generelle Schlussfolgerung zu [ebd.]. Pillet und Albaret [1972] beobachteten zwei Altersgipfel, einen zwischen 30 und 35 sowie einen zwischen 45 und 50 Jahren. Leppilahti et al. [1996] fanden in der Altersverteilung einen Gipfel zwischen 30 und 39 Jahren, Thermann [1996] zwischen 32 und 43 Jahren mit einem Durchschnitt von 38 Jahren. Nach Barfred [1973] waren bisher nur einige wenige Patienten älter als 60 Jahre. Thermann [1996] rechnet jedoch aufgrund zunehmender sportlicher Aktivitäten mit einer steigenden Inzidenz der Achillessehnenruptur auch in der Altersgruppe ab 50 Jahren.

Männer sind 5,5 mal häufiger betroffen als Frauen [Leppilahti et al., 1996]. Von 292 Patienten mit einer Achillessehnenruptur waren 242 männlich und nur 50 weiblich (5:1) [Jozsa et al., 1989]. Die Achillessehnenruptur gilt allgemein als Verletzung des männlichen Geschlechts [Thermann, 1996].

Jozsa et al. [1989] beschrieben zudem einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Sehnenverletzungen und der AB0-Blutgruppe. Bei Patienten mit einer Sehnenruptur kam mit einer hohen Wahrscheinlichkeit Blutgruppe 0 vor, mit Blutgruppe A wurde eine negative Korrelation festgestellt [ebd.]. Von 292 Patienten mit einer Achillessehnenruptur wiesen 53,7% die Blutgruppe 0 auf [**Jozsa et al.**, 1989].

Die in vielen Studien ermittelte Dominanz der linkseitigen Ruptur der Achillessehne wurde mit einer höheren Prävalenz von Rechtshändigkeit in Verbindung gebracht [**Thermann**, 1996, **Maffulli**, 1999].

Jozsa et al. [1989] beschrieben auch einen Zusammenhang von Freizeitsport mit dem Auftreten der Achillessehnenruptur. 59,2% der Rupturen waren auf sportliche Aktivitäten zurückzuführen [**Jozsa et al.**, 1989]. **Leppilahti et al.** [1996] konnten sogar bei 81% der Achillessehnenrupturen Sport als Ursache ausmachen. Davon wiederum ließen sich 88% dieser Sehnenrupturen beim Sport auf Ballsportarten wie Volleyball, Badminton und Fußball zurückführen [**Leppilahti et al.**, 1996].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der typische Patient mit einer Achillessehnenruptur männlich und zwischen 30 und 50 Jahre alt ist. Die dominierende linksseitige Ruptur der Achillessehne trat im Rahmen von sportlichen Aktivitäten (Ball sport) in der Freizeit auf.

2.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Eine Sehnenruptur wird definiert als eine „komplette oder partielle Kontinuitätsunterbrechung einer Sehne am muskulotendinösen Übergang, intratendinös oder am knöchernen Ansatz“ [**Bühren et al.**, 2011]. Ein chronischer Schaden an der Sehne und somit eine Prädisposition für einen Überlastungsschaden kann sich manifestieren, wenn der „Schädigungsreiz die Reparationskapazität des Körpers“ überwiegt [**Petersen**, 2007]. **Petersen** [2007] hat den Prozess der Entstehung chronischer Sehnenschäden beschrieben: Dieser sogenannte „Teufelskreis“ (Abbildung 3) nimmt seinen Ursprung in einem durch einen „Schädigungsreiz“ generierten „Mikroschaden“, der verschiedene Reparationsprozesse auslöst [**Petersen**, 2007]. „Die einsetzende Heilungsreaktion selbst [kann] dazu führen, dass das Gewebe vorübergehend geschwächt wird“ [ebd.]. Besteht der Schädigungsreiz weiterhin

unverändert fort (hier wird das Beispiel eines Lauftrainings genannt), so „kommt es zu weiteren Schäden“ – es „entsteht ein Teufelskreis“ [ebd.]. Die Sehne beginnt, sich degenerativ zu verändern, der Sehnenschaden chronifiziert und führt letztlich zu einer Ruptur der Sehne [ebd.].

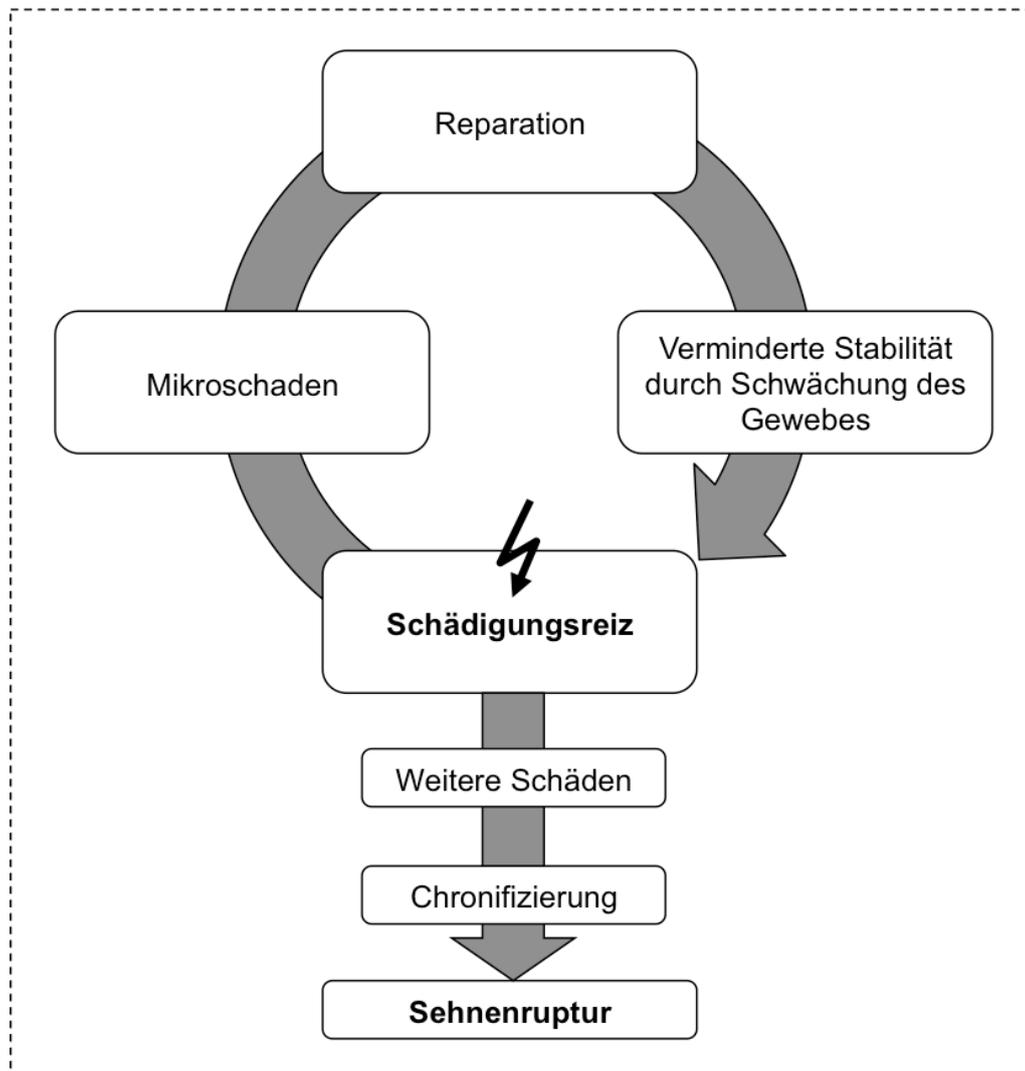


Abbildung 3: „'Teufelskreis' [...] der Entstehung von Überlastungsschäden“ [modifizierte Darstellung nach Petersen [2007]]

In der Literatur werden zur Pathogenese der Achillessehnenruptur zwei Theorien gegenübergestellt: die *mechanische Theorie* und die *degenerative Theorie* [Thermann, 1999]. **McMaster** [1933] postulierte, dass die Ruptur einer intakten Sehne nicht möglich sei. Die Ruptur komme vielmehr durch ein Versagen des Muskels, des myotendinealen Übergangs oder durch einen knöchernen Ausriss der Sehne zustande [McMaster, 1933]. Einer traumatischen Ruptur gingen somit

immer degenerative Prozesse voraus [ebd.]. **Barfred** [1973] zeigte hingegen im Tierversuch, dass eine intratendineale Ruptur der gesunden Achillessehne durchaus möglich ist und vermutete, dass diese auch in der menschlichen Achillessehne erfolgen kann.

Kannus und Jozsa [1991] untersuchten in ihrer Arbeit die Achillessehnen von Patienten mit Achillessehnenruptur und Patienten der Normalbevölkerung, die durch Unfälle ums Leben kamen, auf histopathologische Veränderungen. Nur 69% der Achillessehnen von Patienten ohne Ruptur (Normalbevölkerung) waren ohne pathologische Veränderungen [ebd.]. Anhand der Untersuchung von 397 Patienten mit frischen Achillessehnenrupturen zwischen 1968 bis 1989 unterschieden die Autoren vier Typen (allein oder in Kombination vorkommend) der degenerativen Veränderung: die hypoxisch-degenerative Tendopathie, die mukoide Degeneration, die Tendolipomatosis und die kalzifizierende Tendopathie [**Kannus und Jozsa**, 1991].

Die Zuordnung einer Ruptur zu einem traumatischen oder degenerativen Ereignis ist folglich nicht ohne weiteres möglich. Eine Sehne kann degenerativ vorgeschädigt sein und reagiert dann anfälliger auf traumatische Einwirkungen – bereits bei geringer Krafteinwirkung kann es dann zu einer traumatischen Ruptur kommen.

Verschiedene Medikamente stellen einen bedeutenden Faktor in der Pathogenese der Achillessehnenruptur dar [**Thermann**, 1999, **Petersen**, 2007]. Kortison, Fluorchinolone (wie Ciprofloxacin) und Anabolika zählen zu den Medikamenten, die eine Entstehung degenerativer Schäden an der Achillessehne begünstigen [ebd.]. Seit einer Häufung der spontanen Achillessehnenruptur nach Organtransplantation stehen Kortison und andere Immunsuppressiva unter dem Verdacht, eine Schlüsselrolle in der Pathogenese zu spielen [ebd.].

Auch das Alter scheint ein wichtiger Faktor bei der Achillessehnenruptur zu sein. Verschiedene Studien beobachteten einen Altersgipfel zwischen 30 und 50 Jahren (siehe Kapitel 2.2.1). **Thermann** [1996] kam zu der Schlussfolgerung, „dass sich die Wahrscheinlichkeit einer Achillessehnenruptur bei steigendem Alter und sinkendem körperlichen Aktivitätsniveau potenziert“. Die mit dem Alter häufig einhergehende körperliche Inaktivität habe einen bedeutend größeren Einfluss auf

die biomechanischen Eigenschaften der Sehne als das Alter selbst [Thermann, 1996].

Zu einer traumatischen Ruptur einer Sehne kommt es dann, wenn eine „in axialer [...] Richtung einwirkende Kraft die elastische Widerstandskraft“ der Sehne übersteigt [Bühren et al., 2011]. **Thermann** [1999] reduzierte die eigentlichen Rupturmechanismen der Achillessehne auf drei verschiedene Typen: Die weitaus meisten Rupturen geschehen durch „Abstoßen mit plantarflektiertem Fuß bei gleichzeitiger Extension des Knies“ [Thermann, 1999]. Dieser Mechanismus sei ursächlich für 50-60% der Rupturen [ebd.]. Andere Rupturmechanismen sind eine „plötzliche unerwartete Dorsalflexion im Sprunggelenk mit kräftiger Kontraktion der Wadenmuskulatur“ oder eine Landung nach einem Sprung (Fuß plantarflektiert, Wadenmuskulatur angespannt) [ebd.]. Ein „Schlag in querer Richtung auf die gespannte Sehne durch einen kantigen Gegenstand“ (z. B. Tritt in die Ferse beim Fußball) ist eine weitere mögliche Ursache für eine traumatische Ruptur der Achillessehne [Bühren et al., 2011].

2.2.3 Therapie

In der Literatur werden für die Achillessehnenruptur verschiedene Therapiekonzepte beschrieben. In diesem Kapitel soll lediglich ein kurzer Überblick gegeben werden. Die Therapieverfahren lassen sich hierzu übersichtlich in drei Kategorien einteilen:

- konservative Behandlung
- perkutane operative Versorgung
- offene operative Versorgung

Die konservative Behandlung kann mit Gipsimmobilisation nach *Lea und Smith* oder mit einer funktionellen Nachbehandlung nach *Thermann* erfolgen [Bauer und Eberhardt, 1999]. Für die offene operative Versorgung werden eine Vielzahl an Therapieverfahren beschrieben: verschiedene Nahttechniken, Sehnenplastiken, der Einsatz von Fibrinkleber, die Verwendung eines Gastrocnemius-Lappens oder ein M. peroneus brevis Transfer sind einige der zur Verfügung stehenden Möglichkeiten [ebd.]. Auch für die perkutane operative Versorgung werden verschie-

dene Nahttechniken und Nachbehandlungsschemata beschrieben [**Bauer und Eberhardt**, 1999].

Nistor [1981] sah klare Vorteile in der konservativen Behandlung der Achillessehnenruptur: geringere Beschwerden, ein kürzer andauernder Krankheitszustand und keine Notwendigkeit eines Krankenhausaufenthaltes. Die beobachtete Komplikationsrate lag in beiden Gruppen (konservative vs. operative Versorgung) in einer Auswertung von 105 Patienten mit einer Achillessehnenruptur auf etwa gleichem Niveau [**Nistor**, 1981]. In einem Editorial in „The Lancet“ wurde es in Anbetracht der exzellenten Ergebnisse bei konservativer Versorgung zwischenzeitlich sogar als zweifelhaft erachtet, wie eine operative Versorgung der geschlossenen Achillessehnenruptur überhaupt noch gerechtfertigt werden könne [**Editorial**, 1973].

Carden et al. [1987] werteten in einer klinischen Studie die Ergebnisse von 106 Patienten nach Behandlung einer spontanen Achillessehnenruptur aus. Basierend auf dieser Untersuchung wurde empfohlen, die akute Achillessehnenruptur (Diagnose innerhalb von 48 Stunden) konservativ unter Ruhigstellung im Gips (Spitzfußstellung) zu behandeln [ebd.]. Zu einer Operation wurde erst geraten, wenn die Diagnose mehr als eine Woche verzögert gestellt wurde [**Carden et al.**, 1987].

Die perkutane operative Versorgung der Achillessehnenruptur ist heute die Therapiemethode der Wahl [**Lynch**, 2004]. Erneute Rupturen treten nach der operativen Versorgung signifikant seltener auf ($p < 0,001$) [**Möller et al.**, 2001]. Allerdings hat die operative Versorgung gegenüber der konservativen Therapie den Nachteil des signifikant höheren Komplikationsrisikos (einschließlich Wundinfektionen; $p = 0,001$) [**Khan et al.**, 2004, **Khan et al.**, 2005]. Durch die perkutane operative Versorgung der Achillessehnenruptur kann jedoch ein deutlicher Rückgang der postoperativen Infektionen erreicht werden [**Jones et al.**, 2012]. In einem Vergleich der funktionellen und biomechanischen Ergebnisse liegt die perkutane operative Versorgung mit der offenen operativen Versorgung auf gleichem Niveau [**Goren et al.**, 2005]. Die perkutane Naht der rupturierten Achillessehne ist eine wenig aufwändige Operationsmethode mit geringem Risiko und erzielt in Kombination mit einer frühen funktionellen Nachbehandlung ein

gutes Ergebnis bei einer niedrigen Rerupturrate [**Majewski et al.**, 2000, **Riedl et al.**, 2002, **Movin et al.**, 2005].

Die konservative Behandlung ist eine gute Alternative zur operativen Versorgung und kann eine Therapieoption für Patienten sein, die eine Operation ablehnen oder die nicht operationsfähig sind [**Cetti et al.**, 1993, **Lynch**, 2004]. Eine konservative Behandlung kann erfolgen, wenn „75% der Sehnenstümpfe bei 20° Plantarflexion“ im OSG aneinanderliegen [**Knobloch et al.**, 2007]. Die „Entscheidung für eine frühfunktionell konservative Therapie [birgt] jedoch auch hohe Anforderungen an die Mitarbeit des Patienten“ [ebd.]. Die Therapieentscheidung „sollte [zudem] am vierten Tag [durch] eine erneute dynamische Sonografie“ kontrolliert werden [**Knobloch et al.**, 2007].

Ingvar et al. [2005] äußerten sich kontrovers zu den Behauptungen vieler aktueller Studien, welche die operative Behandlung als Methode der Wahl empfehlen. In einer eigenen Untersuchung an 196 konservativ versorgten Patienten beobachteten sie eine geringe Rerupturrate und empfahlen in Anbetracht der Risiken einer Operation die konservative Versorgung als gute Alternative in Betracht zu ziehen [**Ingvar et al.**, 2005].

Eine Besonderheit stellen chronische Rupturen der Achillessehne dar. Diese sollten immer operativ versorgt werden [**Maffulli und Ajis**, 2008]. Im Vergleich mit der operativen Versorgung der akuten Achillessehnenruptur zeigten sich häufigere postoperative Infektionen und eine längere Rehabilitationszeit [ebd.].

Entscheidend für das Ergebnis ist die Nachbehandlung [**Lynch**, 2004]. Eine frühe funktionelle Nachbehandlung scheint bessere funktionale Ergebnisse zu erzielen und sollte der Gipsimmobilisation vorgezogen werden [ebd.]. Die frühe funktionelle Nachbehandlung sollte unbedingt und unabhängig vom angewandten Therapieverfahren (konservativ/operativ) erfolgen [**Bauer und Eberhardt**, 1999]. Eine Gipsruhigstellung über sechs Wochen wird lediglich bei mangelnder Compliance empfohlen [ebd.]. Die besten Ergebnisse werden bei einer Behandlung innerhalb von sechs Monaten nach Auftreten der Ruptur erzielt [**Kader et al.**, 2002].

2.3 Physiologie der Sehnenheilung

Die Sehnenheilung ist ein vielfach untersuchter, äußerst komplexer und aufwändig regulierter Prozess im menschlichen Organismus. Unter Regeneration versteht man Prozesse, die zu „Erneuerung und Ersatz von Zellen und Geweben führen“ [Zatloukal et al., 2008]. Sehnen werden zu den bradytrophen Geweben des menschlichen Körpers gezählt, da die Durchblutung gering ist und Umbauprozesse langsam stattfinden [Hefti und Stoll, 1995]. Die Heilung von Sehnen und Bändern ist ein verhältnismäßig langsamer Prozess, ohne äußere Unterstützung bleibt der Heilungsprozess auch häufig unvollständig [ebd.]. Ziel der Sehnenheilung ist die Wiederherstellung der physiologischen Funktion der Sehne [James et al., 2008]. Dies meint nicht nur die mechanische Belastbarkeit, sondern auch die Gleitfähigkeit der Sehne gegenüber dem umgebenden Weichteilmantel [ebd.].

Für das Verständnis der Sehnenheilung ist eine Unterteilung in Sehnen mit Sehnenscheide und Sehnen ohne Sehnenscheide erforderlich [Hefti und Stoll, 1995]. Sehnen des menschlichen Körpers sind zumeist von Weichteilgewebe umgeben [ebd.]. Den umgebenden Weichteilen wird eine bedeutende Rolle bei der Sehnenheilung zugesprochen [ebd.]. Die Heilung der Achillessehne als Beispiel für eine Sehne ohne Sehnenscheide gilt als sehr gut untersucht [ebd.].

Bereits **Lundborg und Rank** [1978] beschäftigten sich mit der Regenerationsfähigkeit von Sehnen. Unterschieden wurde zwischen der *intrinsic* *Regeneration* und der *extrinsic* *Regeneration* [ebd.]. Die *intrinsic* *Regeneration* geht von den Tenozyten des Endotenons und Epitenons aus [Sharma und Maffulli, 2005, James et al., 2008]. Die Tenozyten selbst sind in der Lage, sich zu vermehren und Kollagen zu produzieren [Lundborg und Rank, 1978]. Eine entscheidende Rolle in der Versorgung der Tenozyten scheint die Gelenkflüssigkeit zu spielen [ebd.]. Die *extrinsic* *Regeneration* geht von Zellen, hauptsächlich Fibroblasten, der umgebenden Sehnenscheide und der Synovia aus [Sharma und Maffulli, 2005]. Die Blutversorgung ist zudem ein entscheidender Faktor bei der extrinsischen Sehnenheilung [Zhang et al., 2003]. Durch Gefäßneubildung erreichen Entzündungszellen und Blutplasma, aber auch Sauerstoff, Wachstumsfaktoren und Ausgangsstoffe für die Kollagensynthese den Regenerationsort

[ebd.]. Die Regenerationsmechanismen laufen nicht getrennt voneinander ab [Sharma und Maffulli, 2005, James et al., 2008]. Zumeist sind beide Mechanismen in Abhängigkeit von der Lokalisation der Sehne und der Größe der Verletzung an der Heilung beteiligt [ebd.].

Die Sehnenheilung verläuft in drei sich zeitlich überschneidenden Phasen [Chan et al., 2000, Sharma und Maffulli, 2005]. Bei einer Sehnenverletzung kommt es zunächst „zu einer lokalen Blutung“ [Hügler et al., 2012]. Durch den Gewebkontakt der sich anlagernden Thrombozyten „werden die Gerinnungskaskade ausgelöst und das Komplementsystem aktiviert“ [ebd.]. Nun beginnt die Entzündungsphase (inflammatorische Phase) mit der „Einwanderung von Entzündungszellen“ [ebd.]. Die Entzündungsreaktion führt zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie *platelet derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β), bFGF und *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) durch Blutplättchen, Leukozyten und Makrophagen sowie andere Entzündungszellen [Chang et al., 1998, Zhang et al., 2003, Sharma und Maffulli, 2005, Okamoto et al., 2010]. Nekrotisches Gewebe wird abgebaut [James et al., 2008]. Die freigesetzten Wachstumsfaktoren stimulieren Fibroblasten und die Synthese von Typ III Kollagen; es kommt zur Gefäßneubildung [ebd.]. Hefti und Stoll [1995] bezeichneten Fibroblasten als die „Stammzellen der Bindegeweberegeneration“.

In der darauf folgenden Proliferationsphase kommt es zu einer schnellen Vermehrung von Fibroblasten [James et al., 2008]. Diese produzieren Kollagen, Proteoglykane und andere Bestandteile der Extrazellulärmatrix, die Typ III Kollagensynthese erreicht den Höhepunkt [ebd.]. Nach sechs bis acht Wochen schließt sich die Remodellierungsphase an [Sharma und Maffulli, 2005, James et al., 2008]. Es wird weniger Kollagen Typ III und vermehrt Kollagen Typ I gebildet, Tenozyten und Kollagenfibrillen richten sich in der Belastungsrichtung aus [James et al., 2008]. Erst in der Remodellierungsphase gewinnt die Sehne wieder an mechanischer Stabilität [Chan et al., 2000]. Eng verknüpft mit der mechanischen Belastbarkeit sind die maximale Kraft, die Konzentration der Kollagenfibrillen und der Pyridinolingehalt der Kollagenquervernetzungen [Frank et al., 1992, Frank et al., 1995, Chan et al., 1998].

Eine frühe Belastung des sich noch im Heilungsprozess befindlichen Sehnenregenerates scheint sich positiv auf das Ergebnis auszuwirken [**Hefti und Stoll**, 1995]. Die funktionelle Belastung sehen **Hefti und Stoll** [1995] als entscheidend für die Sehnenheilung an. Ohne Beanspruchung des neu gebildeten Gewebes entsteht lediglich eine unstrukturierte Narbe [ebd.]. Eine kontrollierte Belastung in der Proliferationsphase und der Remodellierungsphase scheint sich positiv auf die Organisation der Kollagenfasern und somit auf die mechanische Stabilität der Sehne auszuwirken [**Sharma und Maffulli**, 2005]. Die Belastung ist zudem notwendig, um der Bildung von Adhäsionen vorzubeugen [**James et al.**, 2008, **Hügler et al.**, 2012]. Zugleich aber steigt das Risiko für eine erneute Ruptur der Sehne [**James et al.**, 2008].

Eine entscheidende Rolle in der Sehnenheilung wird dem Kollagen zugeschrieben. Die Achillessehne besteht zu großen Teilen aus Kollagen Typ I und zu geringen Teilen aus anderen Kollagenfasern, zum Beispiel Kollagen Typ III [**Okamoto et al.**, 2010, **Buchmann et al.**, 2013]. Für die mechanische Stabilität der Sehne ist hauptsächlich Kollagen Typ I verantwortlich [**Okamoto et al.**, 2010]. Kollagenfibrillen vom Typ III hingegen sind makroskopisch dünner und dehnbarer als Kollagenfibrillen vom Typ I [ebd.]. Dennoch nimmt Kollagen Typ III durch die Fähigkeit, schnell Quervernetzungen zu bilden und somit das empfindliche Sehnenregenerat zu stabilisieren, eine bedeutende Rolle in frühen Stadien der Sehnenheilung ein [**Chan et al.**, 1998, **Eriksen et al.**, 2002, **Okamoto et al.**, 2010].

2.4 Stand der Wissenschaft

Die Prozesse der Sehnenheilung sind vielfach und gut untersucht. Dieses Kapitel soll eine Übersicht zum aktuellen Stand der Wissenschaft geben. Zunächst wird auf die Notwendigkeit eines Tiermodells eingegangen. Im Anschluss wird ein Überblick über bisherige biomechanische Untersuchungen der Achillessehnenheilung gegeben. In Kapitel 2.4.3 werden Studien zur Anwendung von Stammzellen und Wachstumsfaktoren in der Sehnenheilung vorgestellt. Zuletzt soll die existente Literatur zum Wachstumsfaktor bFGF aufgearbeitet werden, dessen Auswirkungen auf die Sehnenheilung in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

2.4.1 Tiermodell

Stammzellen und Wachstumsfaktoren sind seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet und bei der Entwicklung von biologischen Implantaten werden zunächst durch *in vitro* Versuche überprüft. Bevor diese neuen Techniken in klinischen Studien zur Anwendung kommen können, ist die *in vivo* Überprüfung an einem geeigneten Tiermodell erforderlich [James et al., 2008].

In der Literatur finden sich zahlreiche biomechanische und histologische Untersuchungen an verschiedenen Versuchstieren. **Manske und Lesker** [1984] untersuchten das intrinsische Heilungsvermögen von (Beuge-) Sehnen an vier verschiedenen Versuchstiergruppen. Dabei wurde festgestellt, dass alle Beugesehnen der vier Gruppen (Hund, Kaninchen, Huhn und Affe) über ein intrinsisches Heilungsvermögen verfügen, ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand jedoch nicht [Manske und Lesker, 1984].

Es stellt sich nun die Frage, welche Anforderungen ein geeignetes Tiermodell erfüllen sollte. Im Hinblick auf die einfache technische Umsetzung der Versuche stellt die Größe der Präparate einen wichtigen Aspekt dar. Die Untersuchungen sollen zudem technisch reproduzierbar sein. Ein wichtiges Kriterium ist die Tierhaltung. Hier scheinen Kleintiere wie Mäuse oder Ratten gut geeignet. Eine vergleichbare Anatomie ist von Vorteil, wenn das Tiermodell Rückschlüsse auf die menschliche Sehnenheilung ermöglichen soll. Nicht zuletzt stellt die Vergleichbar-

keit der Ergebnisse mit der Literatur einen wichtigen Punkt bei der Wahl des Tiermodells dar.

Die anatomische Übereinstimmung des zu untersuchenden Merkmals mit der menschlichen Anatomie ist ein wichtiges Kriterium für die Auswahl eines geeigneten Versuchstieres. In diesem Kontext wird eine Eignung des Hundes als Versuchstier kontrovers diskutiert. **Hernandez-Martinez et al.** [2012] führten eine Studie zur Anwendung von thrombozytenreichem Blutplasma (platelet rich plasma, PRP) in Kombination mit der Naht einer akuten Achillessehnenruptur bei Hunden durch. **James et al.** [2008] hingegen sahen Hunde wie auch Hühner aufgrund zu geringer Übereinstimmung mit der menschlichen Anatomie als ungeeignete Versuchstiere an.

Geeignete Tiermodelle für die Untersuchung der Achillessehnenheilung sind Mäuse [**Chhabra et al.**, 2003] und Kaninchen [**Thermann**, 1996, **Ouyang et al.**, 2003, **Chong et al.**, 2007, **Hou et al.**, 2009a]. Besonders das Rattenmodell ist zur Untersuchung der Achillessehnenheilung in der orthopädischen Literatur sehr etabliert [**Aspenberg und Forslund**, 1999, **Zhang et al.**, 2003, **Aspenberg und Virchenko**, 2004, **Rickert et al.**, 2005, **Omeroglu et al.**, 2009, **Okamoto et al.**, 2010, **Cummings et al.**, 2012].

2.4.2 Biomechanische Untersuchungen der Achillessehnenheilung

Die Heilung der Achillessehne wurde in den vergangenen Jahrzehnten bereits durch zahlreiche Studien untersucht. Dem voraus gingen Untersuchungen zur Beschaffenheit der Achillessehne und zur Achillessehnenruptur. Erste Untersuchungen zu den Ursachen und der Lokalisation von Sehnenrupturen stammen von **McMaster** [1933].

Barfred [1973] setzte sich mit der tierexperimentellen, biomechanischen Untersuchung der Achillessehnenruptur auseinander. Unter der Annahme, das Alter und die Bedingungen während des Wachstums seien ausschlaggebende Faktoren in der Entwicklung von Sehnen, Knochen und Muskeln, führte Barfred biomechanische Versuche am Rattenmodell durch [ebd.]. Wilde Ratten unterschiedlichen Gewichts wurden mit zahmen Ratten verschiedener Aktivitätslevel im Hinblick auf die Lokalisation der Ruptur verglichen [ebd.]. Barfred zeigte, dass eine intra-

tendineale Ruptur der Achillessehne möglich ist [ebd.]. Er stellte die Vermutung an, dass diese intratendineale Ruptur auch in der menschlichen Achillessehne erfolgen kann [**Barfred**, 1973].

Thermann et al. [1995a] untersuchten die Reißfestigkeit der menschlichen Achillessehne am Leichenpräparat. Zur Verfügung standen die Achillessehnen von 20 Verstorbenen aus zwei Alterskollektiven (24 bis 35 und 36 bis 59 Jahre) [ebd.]. Bei sonographischer und makroskopischer Beurteilung wurden keine Pathologien festgestellt [ebd.]. Die biomechanische Testung der Sehnen ergab eine signifikant höhere Steifigkeit der Achillessehne in der Altersgruppe unter 35 Jahren im Vergleich mit „der Gruppe über 35 [36-59] Jahren“ ($p=0,0233$) [ebd.]. Erstmals wurde die Durchführung der Messung und die Erfassung der Daten mittels einer „computergesteuerten Materialprüfmaschine [...] beschrieben“ [ebd.]. Zudem konnte dank einer optimierten Einspanntechnik eine „intratendineale Ruptur“ erreicht werden [**Thermann et al.**, 1995a].

In der Literatur finden sich neben Untersuchungen zur Ruptur der Achillessehne auch zahlreiche Studien zur Achillessehnenheilung. **Murrell et al.** [1994] untersuchten den Einfluss der Immobilisation auf die Achillessehnenheilung am Rattenmodell. 32 Versuchstieren wurde ein definierter Sehndefekt gesetzt und anschließend mit einer Naht versorgt [ebd.]. Die Immobilisation wirkte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Immobilisation signifikant negativ auf die funktionale und mechanische Regeneration der Achillessehne aus ($p<0,001$) [**Murrell et al.**, 1994].

Thermann et al. [1995b] beschäftigten sich in einer experimentellen biomechanischen Untersuchung mit dem Einfluss verschiedener Behandlungsregimes (operativ-funktionell mit Naht, operativ-funktionell mit Fibrinkleber, konservativ) auf die Heilung der Achillessehne am Kaninchenmodell. Sehnenpräparate von 84 Versuchstieren wurden nach 14, 28, 56 und 84 Tagen biomechanisch getestet [ebd.]. Es zeigte sich ein Vorteil der funktionellen Nachbehandlung im Vergleich mit Literaturergebnissen zur Gipsimmobilisation [**Thermann et al.**, 1995b].

Palmes et al. [2002] zeigten in einer biomechanischen Untersuchung der Achillessehnenheilung am Mausmodell die Folgen einer postoperativen Immobilisierung auf. Bei 114 Versuchstieren wurde ein definierter Sehndefekt gesetzt und mit

einer Naht versorgt [ebd.]. Nach 4, 8, 12, 16, 35 und 112 Tagen wurden die Sehnenpräparate beider Gruppen gewonnen und biomechanisch sowie histologisch getestet [ebd.]. Die sofortige postoperative Aufbelastung führte im Vergleich zur Immobilisationsgruppe zu einem kontinuierlichen und signifikant schnelleren Anstieg der maximalen Kraft bis zum Versagen [**Palmes et al.**, 2002].

Weitere experimentelle biomechanische Untersuchungen zeigten, dass die Heilung durch die lokale Schockwellentherapie [**Orhan et al.**, 2004], die Anwendung von Ultraschall [**Ng et al.**, 2003], die systemische Gabe entzündungshemmender Medikamente [**Forslund et al.**, 2003] oder eine hochdosierte Vitamin-C Gabe [**Omeroglu et al.**, 2009] positiv beeinflusst werden kann. Der Einfluss von Anabolika hingegen wirkte sich im Rattenmodell negativ auf die biomechanischen Eigenschaften von Achillessehnen aus [**Miles et al.**, 1992]. So änderte sich durch eine Anabolikagabe zwar nicht die maximale Kraft bis zum Versagen der Sehne, die Steifigkeit der Sehne nahm jedoch zu; die Dehnbarkeit der Sehne und damit die Fähigkeit, Energie aufzunehmen und zu speichern, nahm ab [ebd.].

2.4.3 Therapieansätze mit Stammzellen und Wachstumsfaktoren

Stammzellen stehen durch ihre besonderen Eigenschaften in großem Interesse der medizinischen Forschung. Ihre Anwendung und die Kombination mit Wachstumsfaktoren zur Behandlung von Sehnenverletzungen lieferten erste vielversprechende Resultate und sind aktuell Gegenstand vieler Untersuchungen. Stammzellen sind nicht spezialisierte Zellen mit der Fähigkeit, sich funktional in verschiedene adulte Zelltypen zu differenzieren [**Welsch**, 2009]. Grundsätzlich muss unterschieden werden zwischen den multipotenten, mesenchymalen Stammzellen (MSC), die in diesem Versuch verwendet wurden, und pluripotenten, embryonalen Stammzellen [ebd.].

Die embryonale Stammzelle ist eine pluripotente Vorläuferzelle, die noch in alle Gewebezelltypen differenzieren kann [**Welsch**, 2009]. MSC hingegen sind Vorläuferzellen des Bindegewebes und werden zu den adulten Stammzellen gezählt [ebd.]. Sie gelten als multipotent, können also nur in bestimmte Gewebezelltypen differenzieren [ebd.].

Schmitt et al. [2012] stellen in ihrer Arbeit die Rolle von Stammzellen in der regenerativen Medizin übersichtlich dar. Stammzellen haben auf verschiedene Art und Weise einen bedeutenden Einfluss auf die Sehnenheilung [ebd.]. Einerseits ersetzen sie geschädigte oder zerstörte Zellen durch direkte Differenzierung in Zellen des betroffenen Bindegewebes [ebd.]. Andererseits beeinflussen MSC die Sehnenheilung indirekt durch die parakrine Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF-1, VEGF, IGF-2 und bFGF [ebd.]. Stammzellen beeinflussen zudem Immunreaktionen und modulieren so Entzündungsprozesse [**Schmitt et al.**, 2012].

Ein entscheidender Faktor bei der Anwendung von Stammzellen – auch mit Blick auf spätere Anwendungsgebiete am Menschen – ist das Immunsystem [**Schmitt et al.**, 2012]. Es gibt zunehmend Anhaltspunkte dafür, dass Stammzellen nicht immunogen sind, und zwischen Individuen transplantiert werden können, ohne eine Immunreaktion auszulösen [ebd.]. **Ouyang et al.** [2003] zeigten in ihrer Arbeit, dass allogene MSC keine sichtbare Immunreaktion, z.B. eine Infiltration mit Lymphozyten, hervorrufen. Eine immunmodulatorische Funktion von MSC wurde auch von **Bartholomew et al.** [2002] beschrieben. In einer *in vitro* Studie wurde gezeigt, dass MSC die Vermehrung von Lymphozyten und somit die Reaktion gegenüber allogenen Zellen und Geweben unterdrücken können [**Bartholomew et al.**, 2002].

Im Rahmen der Sehnenheilung üben Stammzellen auch einen Einfluss auf die Bildung und Organisation von Kollagen aus [**Ouyang et al.**, 2003]. MSC haben die Fähigkeit, die Organisation der Kollagenmatrix sowie die Wiederherstellung der physiologischen Struktur und Funktion des Kollagens zu beeinflussen [ebd.].

Chong et al. [2007] zeigten in einer Studie den Effekt von Stammzellen auf die Achillessehnenheilung. Ein zuvor gesetzter Sehnendefekt der Achillessehne von Kaninchen wurde nach der Injektion von Stammzellen mit einer Naht versorgt [ebd.]. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Achillessehnennaht ohne Injektion von Stammzellen) wurde eine signifikante Verbesserung histologischer ($p < 0,05$) und biomechanischer ($p < 0,05$) Eigenschaften in den frühen Stadien der Sehnenheilung festgestellt [ebd.]. Der genaue Wirkmechanismus der implantierten

Stammzellen auf die Sehnenheilung war jedoch noch nicht bekannt [**Chong et al.**, 2007].

Okamoto et al. [2010] verglichen in ihrer Studie den Einfluss von Stammzellen aus dem Knochenmark (*bone marrow cells*, BMC) mit dem von kultivierten MSC auf die Achillessehnenheilung. Die Therapie mit Stammzellen aus dem Knochenmark war den MSC nach 7 und 14 Tagen im Hinblick auf die maximale Kraft in der biomechanischen Testung überlegen [ebd.]. Stammzellen aus dem Knochenmark stehen zudem schneller zur Verfügung, da diese nicht aufwändig kultiviert werden müssen [ebd.]. Die Expression der Wachstumsfaktoren TGF- β und VEGF war in der BMC-Gruppe signifikant erhöht (TGF- β : $p < 0,01$; VEGF: $p < 0,01$) [**Okamoto et al.**, 2010].

Wachstumsfaktoren sind kleine Proteine, die biochemische Prozesse in Empfängerzellen beeinflussen und steuern können [**Zhang et al.**, 2003]. Wachstumsfaktoren zählen zu den wichtigsten Molekülen, die an den Prozessen der Sehnenheilung beteiligt sind [**Molloy et al.**, 2003]. Ihre Wirkung ist oft dosisabhängig, an bestimmte Rezeptoren gebunden und entfaltet sich in der Regel in Synergie mit anderen Signalmolekülen [ebd.]. Der vielfältige Einfluss von Wachstumsfaktoren wurde bereits durch zahlreiche Studien untersucht und soll in den folgenden Absätzen genauer dargelegt werden.

Molloy et al. [2003] stellten in ihrer Arbeit übersichtlich die wichtigsten Wachstumsfaktoren vor, die Einfluss auf die Prozesse der Sehnenheilung ausüben. Viele bisherige Studien konzentrierten sich auf fünf wichtige Wachstumsfaktoren: IGF-1, TGF- β , VEGF, PDGF und bFGF [ebd.]. Diese fünf werden in Folge einer Sehnenverletzung alle vermehrt produziert sowie sezerniert und beeinflussen verschiedene Stadien des Heilungsprozesses [**Molloy et al.**, 2003].

Kurtz et al. [1999] beobachteten eine beschleunigte Achillessehnenheilung unter dem Einfluss von IGF-1 am Rattenmodell. Die Gabe von IGF-1 reduzierte das funktionale Defizit signifikant, ohne sich negativ auf die biomechanischen Eigenschaften auszuwirken [ebd.]. Eine mögliche Hemmung der Entzündungsreaktion durch IGF-1 wurde dafür verantwortlich gemacht [**Kurtz et al.**, 1999].

Zhang et al. [2003] zeigten einen positiven Effekt von VEGF auf die Heilung der Achillessehne an der Ratte. Unter dem Einfluss von VEGF wurden eine signifi-

kante Verbesserung der mechanischen Belastbarkeit der Sehne nach 7 und 14 Tagen beobachtet und eine gesteigerte Expression von TGF- β in der frühen Phase der Sehnenheilung festgestellt [ebd.]. Ein signifikanter Einfluss auf die Expression von IGF-1, PDGF und bFGF wurde nicht beobachtet [Zhang et al., 2003].

Ein positiver Effekt von TGF- β auf die Achillessehnenheilung wurde von Hou et al. [2009b] in einer Untersuchung am Kaninchenmodell beobachtet. Unter dem Einfluss von TGF- β erreichte die Synthese von Kollagen Typ III bereits nach 2 Wochen ihren Höhepunkt [ebd.]. In der Kontrollgruppe wurde dieser erst nach 4 Wochen erreicht; auch nach 8 Wochen konnte immer noch Kollagen Typ III in erhöhter Menge nachgewiesen werden [ebd.]. Kollagen Typ I akkumulierte unter dem Einfluss von TGF- β zu jeder Zeit schneller [ebd.]. Der Einfluss von TGF- β auf die Kollagensynthese, die Bildung von Quervernetzungen und die Organisation der Extrazellulärmatrix führte zu einer Verbesserung der mechanischen Belastbarkeit [Hou et al., 2009b].

Die Expression von TGF- β 1 steht unter anderem unter dem Einfluss von PRP [Lyras et al., 2010]. Lyras et al. [2010] untersuchten den Einfluss von PRP auf die TGF- β 1-Expression am Kaninchenmodell. Von 48 Versuchstieren wurden 24 nach Durchtrennung der Achillessehne mit einer Injektion von PRP behandelt [ebd.]. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich nach zwei Wochen eine signifikante Steigerung, nach drei und vier Wochen eine signifikante Reduktion der TGF- β 1-Expression [Lyras et al., 2010].

Aspenberg und Virchenko [2004] untersuchten den Einfluss von Thrombozytenkonzentrat (*platelet concentrate*, PC) auf die Achillessehnenheilung am Rattenmodell. PDGF ist einer der Wachstumsfaktoren, der von aktivierten Thrombozyten sezerniert wird [ebd.]. Eine Einzelinjektion von PC schien sich positiv auf die mechanischen Eigenschaften des Sehnenregenerates auszuwirken [Aspenberg und Virchenko, 2004].

2.4.4 Basic fibroblast growth factor (bFGF)

Der *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) gehört zu den ersten beschriebenen Wachstumsfaktoren. bFGF ist ein saures Polypeptid mit einer Länge von 146

Aminosäuren und zählt zur Gruppe der Heparin-bindenden Faktoren [**Folkman und Klagsbrun**, 1987b, **Folkman und Klagsbrun**, 1987a]. Der Wachstumsfaktor gilt als potenter Stimulator der Zellproliferation und –migration sowie der Angiogenese [**Folkman und Klagsbrun**, 1987a].

Eine Stimulation der Zellproliferation und –migration durch bFGF wurde auch durch **Chan et al.** [1997] gezeigt. Für das Modell einer *in vitro* Wunde wurden Fibroblasten aus Patellarsehnen von Ratten kultiviert [ebd.]. Die Wunde wurde mechanisch in Form einer gleichmäßigen zellfreien Fläche auf dem Medium geschaffen [ebd.]. Anschließend wurde gruppenabhängig bFGF in einer Dosis von 0, 2, 10 oder 50 µg/L hinzugegeben [ebd.]. Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurde regelmäßig die Größe der zellfreien Fläche gemessen [ebd.]. Bereits bei einer Dosis von 2 µg/L wurde eine signifikant erhöhte Zellproliferation beobachtet [ebd.]. Bei einer Dosis von 10 µg/L kam es nach 24 Stunden zu einem nahezu kompletten Wundverschluss [ebd.]. Durch eine Erhöhung der Konzentration auf 50 µg/L konnte keine weitere Verbesserung erreicht werden [**Chan et al.**, 1997].

Chang et al. [1998] beschäftigten sich in einer späteren Studie mit der Lokalisation und der Quantifizierung von bFGF-mRNA an einem Kaninchenmodell. Mittels *in situ* Hybridisierung wurde gezeigt, dass sowohl normale Tenozyten als auch Zellen der umgebenden Sehnenscheide in der Lage sind, bFGF zu produzieren [ebd.]. In Zellen der unmittelbaren Wundumgebung, Tenozyten, Fibroblasten und Entzündungszellen, war die Expression von bFGF-mRNA gesteigert [ebd.]. Als Quelle für Wachstumsfaktoren spielen also sowohl extrinsische als auch intrinsische Zellen eine bedeutende Rolle bei der Sehnenheilung [**Molloy et al.**, 2003].

In einer weiteren Studie zeigten **Chan et al.** [2000] den Einfluss von bFGF auf die frühen Stadien der Sehnenheilung *in vivo* an einem Rattenmodell. Drei Tage nach der Setzung eines Defektes in der Patellarsehne wurde gruppenabhängig eine Dosis von 0, 1, 10 oder 100 µg/L bFGF injiziert [ebd.]. Die Sehnenpräparate wurden nach 7 bzw. 14 Tagen Heilungsdauer gewonnen [ebd.]. Nach 7 Tagen wurde eine dosisabhängige Zunahme der Zellproliferation und der Kollagen Typ III Expression beobachtet [ebd.]. Die Ergebnisse zeigen einen möglichen Einfluss von bFGF auf die frühen Stadien der Sehnenheilung [ebd.]. Ein Effekt auf den

Pyridinolingehalt der Sehnen und die maximale Kraft in der biomechanischen Testung wurde nicht beobachtet [**Chan et al.**, 2000].

Eine weitere *in vivo* Studie zum Einfluss von bFGF auf die Sehnenheilung führten **Fukui et al.** [1998] durch. Ein Defekt von 4 mm wurde am medialen Kollateralband von Kaninchen gesetzt [ebd.]. Fibringel, das humanen bFGF in einer gruppenabhängigen Dosierung von 0, 0,1, 1 oder 10 µg enthielt, wurde in die Defektzone eingebracht [ebd.]. Die Sehnenpräparate wurden nach 7, 14, 21 bzw. 42 Tagen Heilungsdauer gewonnen und untersucht [ebd.]. Unter dem Einfluss von bFGF wurde eine verbesserte Bildung und Reifung von Sehnengewebe beobachtet [ebd.]. Auch hier wurde eine Abhängigkeit von der Dosis gezeigt, wobei höhere Dosierungen in dieser Studie negative Effekte zur Folge hatten [ebd.]. Vor allem niedrige Dosen von bFGF scheinen sich also positiv auf die Sehnenheilung auszuwirken [**Fukui et al.**, 1998].

Kraus et al. [2014] untersuchten den Einfluss von Stammzellen und bFGF auf die Achillessehnenheilung *in vivo* an einem Rattenmodell. An insgesamt 84 Versuchstieren wurde in der linken Achillessehne ein Defekt von 2,4 mm gesetzt und entweder unbehandelt (Injektion von *phosphate buffered saline* (PBS)) belassen oder Stammzellen, die lentiviral *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) exprimieren bzw. Stammzellen, die lentiviral bFGF exprimieren, injiziert [ebd.]. Die gegenseitige Achillessehne wurde zur vergleichenden Kontrolle mit der operierten Seite unbehandelt belassen [ebd.]. Nach 14 bzw. 28 Tagen wurden die Sehnenpräparate gewonnen und biomechanisch sowie histologisch und immunhistochemisch untersucht [ebd.]. Histologisch zeigten sich in den beiden Stammzellgruppen keine signifikant besseren Ergebnisse als in der Kontrollgruppe [ebd.]. Biomechanisch konnte nur in der PBS-Gruppe eine signifikante Verbesserung nach 14 versus 28 Tagen gezeigt werden [ebd.]. Stammzellen scheinen zwar in frühen Stadien der Sehnenheilung teilweise positive Effekte zu haben, sich aber nach 28 Tagen tendenziell negativ auf die biomechanischen Ergebnisse auszuwirken [ebd.]. Die Expression von bFGF in Stammzellen hatte keine wesentlichen Effekte auf die Sehnenheilung [**Kraus et al.**, 2014].

3 Fragestellung und Studienziel

Die Tendinopathie der Achillessehne ist ein Beispiel für eine klassische Verletzung durch Überbeanspruchung [Kader et al., 2002]. Viele biologische und klinische Aspekte der Achillessehnenruptur sind noch nicht erforscht. Neue Erkenntnisse im Bereich der Molekularbiologie sind wichtige Schritte auf dem Weg zum Verständnis der physiologischen Prozesse der Sehnenheilung. Der Einsatz von Stammzellen und die Gabe von Wachstumsfaktoren scheinen die Heilung von Sehnenverletzungen positiv zu beeinflussen und stellen somit eine interessante Option für die Therapie der Achillessehnenruptur dar [Sharma und Maffulli, 2005]. Der Einfluss von Stammzellen und Wachstumsfaktoren auf die Sehnenheilung ist im Detail jedoch noch nicht ausreichend geklärt [ebd.]. Zahlreiche Studien befinden sich allesamt noch in frühen Stadien, was weitere Untersuchungen nötig macht [ebd.]. Dennoch gibt es bereits Evidenz dafür, dass die Gabe von bFGF die Sehnenheilung durch eine Steigerung der Zellproliferation und der Synthese von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix positiv beeinflusst [Chan et al., 1997].

Die Untersuchungen von Kraus et al. [2014] zeigten jedoch, dass Stammzellen an sich in frühen Stadien der Sehnenheilung zwar teilweise positive Effekte zu haben schienen, sich aber im Verlauf nach einer Heilungsdauer von 28 Tagen eher negativ auf die biomechanischen Eigenschaften der Sehnenregenerate auswirkten. Die zusätzliche Expression von bFGF durch MSC hatte keinen wesentlichen Effekt auf die Sehnenheilung [ebd.].

Ziel der vorliegenden Arbeit soll es daher sein, den Einfluss von Stammzellen und dem Wachstumsfaktor bFGF auf die Sehnenheilung im Hinblick auf die maximale mechanische Belastbarkeit und die Steifigkeit der Sehnenregenerate analog zu der vorangegangenen Untersuchung von Kraus et al. [2014] in einem Langzeitversuch über 84 Tage zu untersuchen.

Zur Beantwortung der Fragestellung soll zunächst untersucht werden, ob es im Langzeitversuch zur Ausheilung der Sehne kommt. Zu diesem Zweck erfolgt auch der Vergleich mit der unbehandelten Gegenseite und die Evaluation der Frage, ob nach 84 Tagen Heilungsdauer ein signifikanter Unterschied zur nicht operierten Gegenseite nachweisbar ist.

Anschließend wird geprüft, ob nach der Heilungsdauer von 84 Tagen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen im Hinblick auf die maximale mechanische Belastbarkeit und die Steifigkeit der Sehnenregenerate besteht und ob sich ein signifikanter Vorteil in der Behandlung mit Stammzellen und bFGF im Vergleich zur Kontrollgruppe im Hinblick auf die maximale mechanische Belastbarkeit und die Steifigkeit der Sehnenregenerate zeigt.

Abschließend erfolgt eine Einordnung der Ergebnisse im Vergleich mit der vorhergegangenen Untersuchung von **Kraus et al.** [2014].

4 Material und Methodik

4.1 Studienaufbau

Die Thematik der vorliegenden Arbeit ist Teil einer übergeordneten Studie, die den Effekt von bFGF-transduzierten Stammzellen auf die Sehnenheilung *in vivo* an einem Rattenmodell untersucht. Der Aufbau der Studie entspricht im Hinblick auf die Zellkulturen und die Gewinnung der Präparate für die biomechanische Untersuchung exakt dem Vorgehen von **Kraus et al.** [2014]. Es handelt sich bei der vorliegenden Arbeit um einen Folgeversuch in der gleichen Arbeitsgruppe.

Für den Versuch wurden insgesamt 60 männliche Lewis Ratten (Alter: 14 Wochen) zufällig auf drei Gruppen verteilt: die PBS-Gruppe (eine gepufferte Phosphatlösung; Kontrollgruppe), die eGFP-MS-Gruppe (MS, die eGFP exprimieren) und die bFGF-MS-Gruppe (MS, die bFGF exprimieren).

Die Methoden zur Gewinnung der Stammzellen und deren Vorbereitung für die Verwendung im Versuch waren in der Arbeitsgruppe bereits etabliert und wurden von **Kraus et al.** [2014] beschrieben.

Kapitel 4.2 befasst sich mit den operativen Eingriffen an den Versuchstieren, die für die Gewinnung der Sehnenpräparate notwendig waren. In einer ersten Operation wurde mit Hilfe eines standardisierten Verfahrens ein Defekt von definierter Größe in der linken Achillessehne der Versuchstiere gesetzt. Es erfolgte gemäß einer randomisierten Zuteilung die Injektion von PBS, eGFP-MS oder bFGF-MS proximal und distal vom Defekt in die Sehne. Die rechte Achillessehne blieb unbehandelt. Nach einer Heilungsdauer von 84 Tagen (zwölf Wochen) fand die Entnahme der 60 rechten und 60 linken Achillessehnen für die Analysen statt.

Für die biomechanische Analyse standen jeweils 30 rechte und 30 linke Achillessehnenpräparate zur Verfügung. Die verbliebenen 60 Sehnenpräparate wurden für die histologischen und immunhistochemischen Analysen der Studie benötigt. Der Ablauf des biomechanischen Versuchs wird in Kapitel 4.3 beschrieben.

4.2 Gewinnung der Präparate

Zur Gewinnung der Präparate für die geplanten Analysen waren zwei zeitversetzte Operationen notwendig. In einer ersten Operation wurde der Sehnendefekt gesetzt. Der zweite Eingriff nach Tötung des Versuchstieres diente der Gewinnung des Analysepräparates. Zwischen den Operationen lag der definierte Heilungszeitraum von 84 Tagen. Beide Eingriffe wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Vor dem ersten Eingriff wurde das Gewicht des Versuchstieres festgestellt. In einem randomisierten Verfahren wurde jedes Versuchstier einer Gruppe zugeordnet. Im Anschluss an eine tierärztlich durchgeführte Narkose erfolgte die Rasur des Operationsgebietes. Der Atemluft wurde 100%iger Sauerstoff beigemischt. Einem Auskühlen der Tiere wurde durch Heizmatten (37°C) vorgebeugt. Die Körpertemperatur wurde mit einer rektal platzierten Temperatursonde und die Vitalparameter mit einem Pulsoxymeter überwacht.

Nach erfolgter Desinfektion wurde mit einem medialen Schnitt von etwa 15 mm Länge die linke Achillessehne freigelegt. Es erfolgte die Darstellung des Tuberculi calcanei und die Präparation der Achillessehne sowie der Sehne des M. plantaris. Gruppenabhängig wurde proximal und distal der Stelle des geplanten Defektes eGFP-MSC, bFGF-MSC oder PBS (Kontrollgruppe) in die Sehne injiziert. Mit einem 2,4 mm breiten Arthroskopie-Punch erfolgte die Durchtrennung der Sehne. Distal verblieb ein Sehnenstumpf von etwa 2 mm Länge am Calcaneus. Der proximale Sehnenstumpf ging in den Muskel über. Eine Adaptation der Sehnenenden wurde nicht vorgenommen. Die Wunde wurde mit einer Hautnaht (Intrakutanannaht) verschlossen. Der postoperative Heilungsverlauf wurde tierärztlich überwacht und eine postoperative Schmerzprophylaxe wurde verabreicht. Für die gesamte Dauer der Heilung über 84 Tage erfolgte keine Immobilisierung. Es kam kein Teilbelastungsschema zur Anwendung.

Nach 84 Tagen erfolgte die Tötung der Versuchstiere mit einer Überdosis an Pentobarbital. Vor der Entnahme der Präparate erfolgte die makroskopische Beurteilung der Sehne. Für die Analysen wurden sowohl die linke, operierte Achillessehne, als auch die rechte, unbehandelte Achillessehne, zur Kontrolle entnommen. Nach Rasur des Operationsgebietes erfolgte die Freilegung der

Sehne und die Präparation der Muskelbäuche des ansetzenden M. triceps surae nach proximal. Distal wurde der Tuber calcanei freigelegt. Nach Resektion der Haut erfolgte die Absetzung des M. triceps surae so proximal wie möglich. Die im Versuch angewandte Einspanntechnik (siehe Kapitel 4.3.3) lässt sich umso besser anwenden, je größer der verbliebene Muskelanteil an der Sehne ist.

Die auf diese Weise gewonnenen Präparate wurden beschriftet, verpackt und bis zum Zeitpunkt der Durchführung des Zugversuches bei -17°C gelagert. Der gesamte Prozess zur Gewinnung der Sehnenpräparate ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

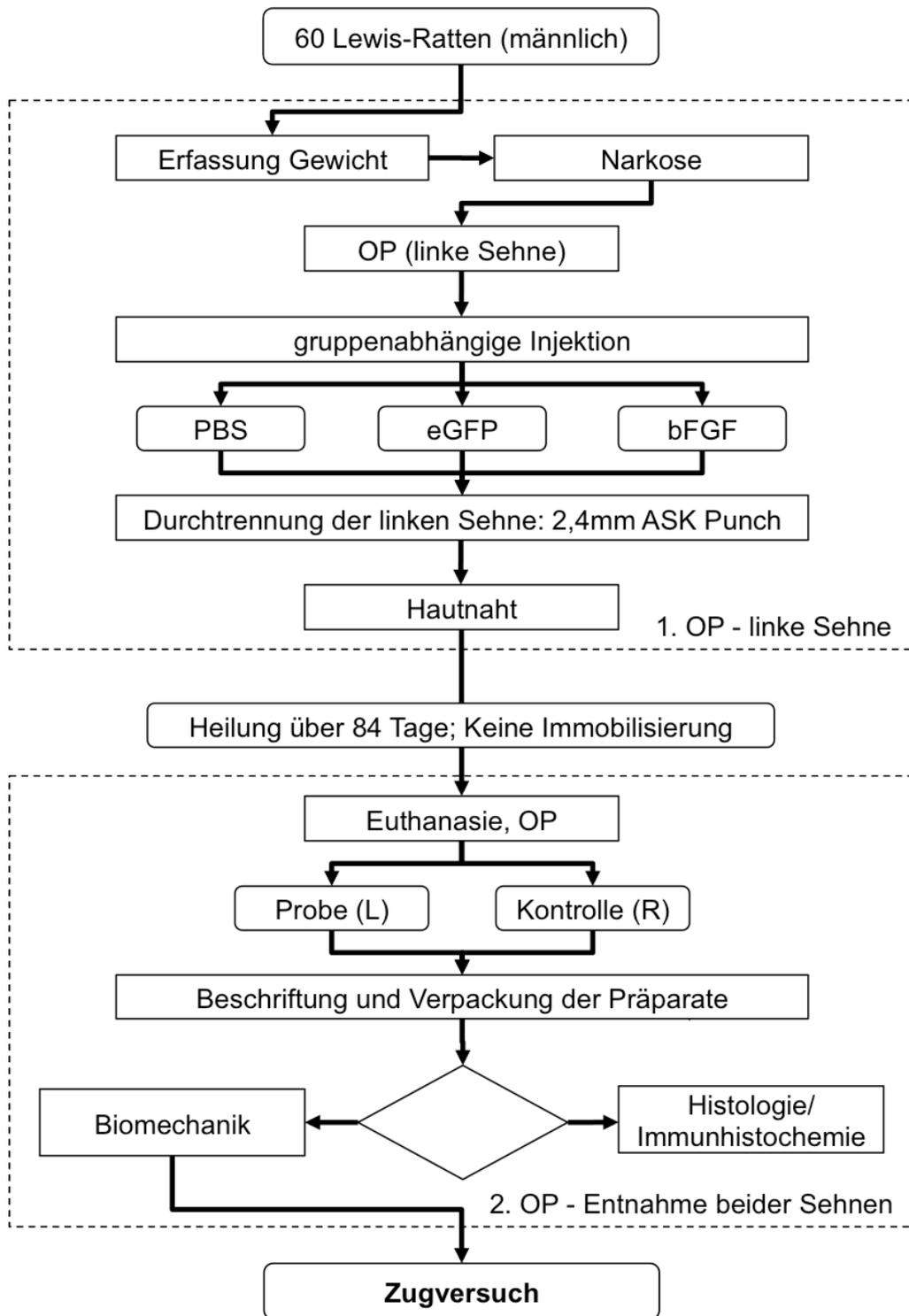


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vorbereitungen zur Gewinnung der Sehnenpräparate [eigene Darstellung]

Alle Versuche wurden unter Beachtung nationaler und internationaler Richtlinien zum Schutz von Versuchstieren (Richtlinie 86/609/EEC des Rates der Europäischen Gemeinschaften; TierSchG; FELASA Richtlinien) durchgeführt.

4.3 Biomechanische Testung der Sehnenpräparate im Zugversuch

Für die biomechanische Untersuchung standen insgesamt 60 Präparate, gewonnen aus 30 Versuchstieren, zur Verfügung (siehe Kapitel 4.1). Es handelte sich um 30 entsprechend der Randomisierung behandelte Achillessehnenpräparate der Untersuchungsseite (links) und 30 unbehandelte Achillessehnenpräparate der Kontrollseite (rechts). An drei Versuchstagen wurden 60 verwertbare Messungen durchgeführt. Die Reihenfolge der Testung war zufällig. Zum Zeitpunkt der Durchführung des Versuchs war lediglich bekannt, ob es sich um die operierte Seite (Probe) oder die unbehandelte Kontrollseite handelte. Die Behandlungsmodalität und damit die Gruppenzugehörigkeit zu den drei Versuchsgruppen konnte erst nach Abschluss der biomechanischen Testung in Erfahrung gebracht werden. Einer Einflussnahme des Versuchsleiters auf die Messergebnisse wurde auf diese Weise entgegengewirkt.

4.3.1 Messgrößen und berechnete Parameter

Bei der biomechanischen Testung der Sehnenpräparate wurden folgende Parameter erfasst bzw. berechnet und anschließend geprüft:

Maximale Kraft $F(max)$ [N] der Achillessehne: die maximale Kraft wurde am Punkt des ersten Maximums im Kraft-Weg-Diagramm abgelesen. In diesem Moment reißt ein Großteil der Sehnenfasern.

Strecke s [mm] der maximalen Dehnung der Achillessehne: Dehnbarkeit der Sehne zwischen Beginn des Zugversuches und dem Erreichen der maximalen Kraft.

Steifigkeit [N/mm] der Achillessehne: errechnete Größe, die dem Anstieg der Kurve im linearen Bereich des Kraft-Weg-Diagramms entspricht.

4.3.2 Versuchsaufbau

Der biomechanische Zugversuch erfolgte in einem, aus früheren Versuchen bereits vorhandenem, eigens zu diesem Zweck konzipiertem Prüfstand. Die verwendete Zugprüfmaschine Z 1120 (Firma Zwick, Ulm) ermöglichte eine Zugbelastung der sich im Prüfstand befindlichen Sehne (Abbildung 5). Der Einsatz

einer computergesteuerten Materialprüfmaschine für die biomechanische Testung der Achillessehne am Rattenmodell wurde erstmals von **Thermann et al.** [1995a] beschrieben.



Abbildung 5: Zugprüfmaschine Z 1120 (Firma Zwick, Ulm) und Einspannvorrichtung [eigene Abbildung]

Die im Zugversuch durch die Zugprüfmaschine applizierte Kraft wurde durch eine Kraftmessdose erfasst und von einem Computer und der Software *testXpert*[®] (siehe Kapitel 4.3.4) aufgezeichnet.

Abbildung 6 zeigt schematisch den Aufbau des Messplatzes zur Durchführung des biomechanischen Versuchs. Dargestellt sind der Computer mit Software (1) und die Zugprüfmaschine (2) mit Kraftmessdose (3) und Einspannvorrichtung für das Sehnenpräparat (4).

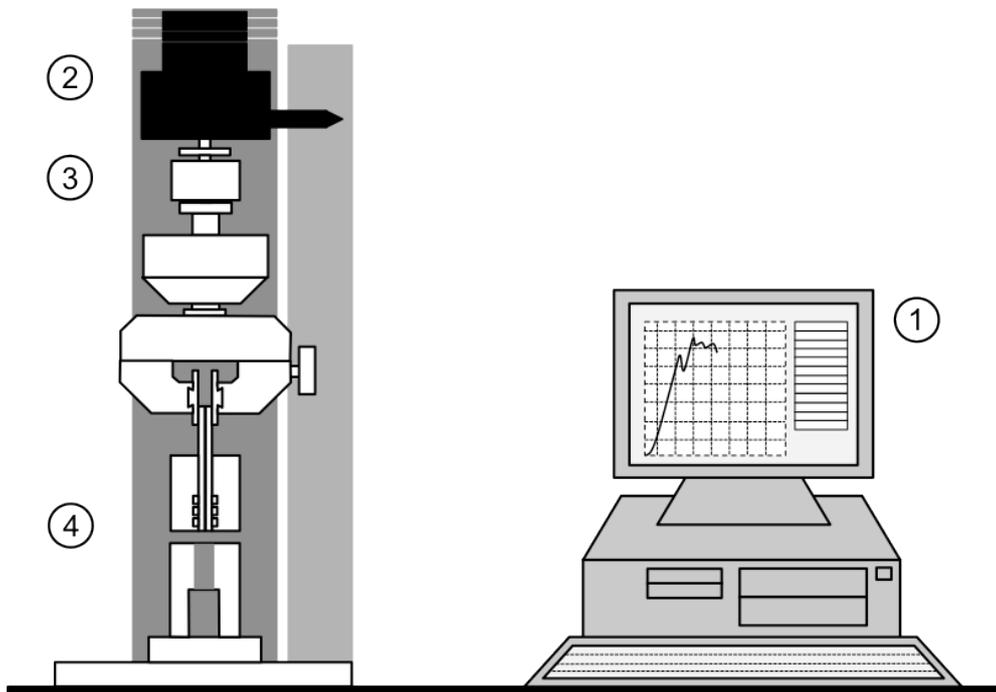


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Messplatzes zur Durchführung des Biomechanischen Versuchs [eigene Darstellung]

4.3.3 Einspanntechnik

Eine große Herausforderung bei der biomechanischen Testung von Achillessehnen war die adäquate Fixierung des Präparates im Prüfstand. Die Ruptur der Achillessehne im Zugversuch sollte intratendineal erfolgen. Ein knöcherner Ausriss aus dem Calcaneus oder eine Ruptur im Bereich der proximalen Fixierung am muskulotendinealen Übergang durften nicht erfolgen [Thermann, 1996]. Die vorhandenen Vorrichtungen zur Einspannung des Sehnenpräparats kamen bereits in der Untersuchung von Kraus et al. [2014] zum Einsatz. Diese konnten für den biomechanischen Zugversuch erneut verwendet werden und sollen im Folgenden beschrieben werden.

Die distale Fixierung des Sehnenpräparates erfolgte am Calcaneus. Dazu wurde dieser in eine dafür gefertigte Schlitzplatte eingelegt (Abbildung 7). Die Kanten des Schlitzes sollten möglichst stumpf sein, um keine Sollbruchstelle am Calcaneotendinealen Übergang zu schaffen oder einen knöchernen Ausriss zu provozieren.



Abbildung 7: Einspanntechnik: distale Fixierung mittels Schlitzplatte [eigene Abbildung]

Eine weitere Herausforderung war die proximale Fixierung des Sehnen spiegels. Eine Kompression des Gewebes allein würde womöglich in veränderten biomechanischen Eigenschaften resultieren [Wieloch et al., 2004]. Die Verwendung einer Kryoklemme für biomechanische Untersuchungen wurde erstmals von **Riemersa und Schamhardt** [1982] beschrieben. In einer Untersuchung an 14 Beugesehnen von Pferden konnte eine mittlere maximale Kraft von 10200 N gemessen werden, ohne dass es zum Ausriss des Sehnenpräparats aus der Befestigung kam [ebd.]. Die Kryoklemme ermöglichte eine exzellente Befestigung ohne grobe Beschädigung der Sehne [ebd.]. **Thermann et al.** [1995b] führten biomechanische Versuche zur Achillessehnenheilung am Kaninchenmodell durch. Die Fixation mittels einer Kryoklemme gewährleistete „eine [sichere] intratendineale Ruptur“ der Sehne [Thermann et al., 1995b]. **Rickert et al.** [1998] untersuchten 25 humane Supraspinatussehnen in einem biomechanischen Zugversuch in physiologischer Richtung bis zum Versagen. Auch hier erfolgte die Fixation mit Hilfe einer Kryoklemme [ebd.]. Der Mittelwert der maximalen Zugbelastung betrug 984 N [Rickert et al., 1998]. **Wieloch et al.** [2004] beschrieben die Verwendung einer Kryoklemme bei Versuchen zur Achillessehnenheilung am

Rattenmodell als eine einfache, sehr sichere und zuverlässige Technik zur proximalen Fixierung der Sehnenpräparate.

Dem Einspannen der Sehne ging eine saubere Präparation voraus. Zunächst wurde überschüssiges Muskelgewebe der verbliebenen Gastrocnemius-Anteile durch stumpfe Präparation entfernt. Im Anschluss wurde der Sehnenspiegel zwischen den beiden Platten der Kryoklemme (Abbildung 8) eingebracht und ausgerichtet. Es wurde darauf geachtet, nur den präparierten Sehnenspiegel und nicht die Sehne selbst zwischen den Platten zu fixieren, um keine Sollbruchstelle zu generieren. Nach dem Verschrauben der Platten wurde die Klemme in die Zugprüfmaschine eingespannt. Die endgültige Fixierung des Muskel-Sehnenübergangs in der Kryoklemme erfolgte durch Schockgefrieren. Dazu wurde eine definierte Menge an flüssigem Stickstoff in die vorgesehen Behältnisse der Kryoklemme gegeben. Durch das Schockgefrieren wurde eine stabile Verbindung zwischen dem Gewebe und der Kryoklemme hergestellt und somit eine verminderte Kompression des Gewebes ermöglicht [Wieloch et al., 2004]. Auf diese Weise konnte das Risiko für Gewebsschäden durch das Einspannen vermindert werden. Der flüssige Stickstoff verdampfte bis zum Beginn des Zugversuches vollständig. Die Gewichtskraft des Stickstoffes hatte demnach keinen Einfluss auf den Versuch.



Abbildung 8: Einspanntechnik: proximale Fixierung mittels Kryoklemme [eigene Abbildung]

Die Ausrichtung der Kryoklemme in der Zugprüfmaschine erfolgte mit einer Zentrierhilfe. Diese ermöglichte eine Freigabe der Freiheitsgrade, die Klemme wurde so spannungsfrei im Prüfstand zentriert. Die generierte Kraft wirkte nur in eine Richtung.

Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Dargestellt sind die Kraftmessdose (1), die Zentrierhilfe (2), die Schraubklemme (3) zur Aufnahme der Kryoklemme (4) und die auf dem Prüftisch fixierte Schlitzplatte (5). Im vergrößerten Ausschnitt ist die Einspanntechnik dargestellt. Das eingespannte Sehnenpräparat wurde rot hervorgehoben.

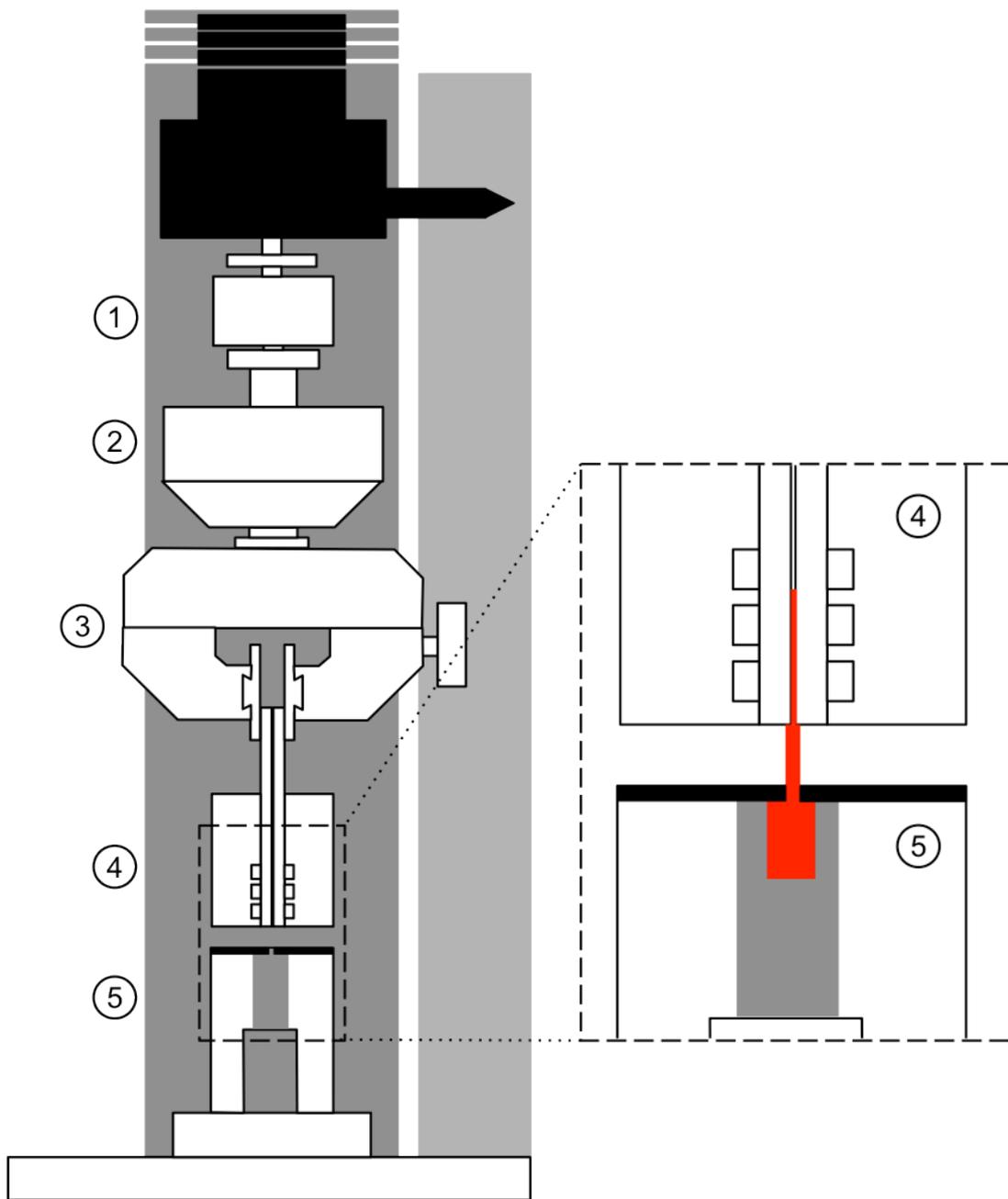


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Einspannvorrichtung [eigene Darstellung]

4.3.4 Erfassung der Messparameter

Für die Durchführung der Versuche gemäß dem Prüfprotokoll und die Erfassung der Messdaten kam die Software *Zwick testXpert® Version 12 für Windows XP* (testXpert® V12.0, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm) zur Anwendung. Die Software ermöglicht die Darstellung des Vorschubes und der gemessenen Kraft in einem Kraft-Weg-Diagramm.

4.3.5 Versuchsablauf

Der biomechanische Zugversuch begann mit der Vorbereitung der gewonnenen Präparate. Die bei -17 °C gelagerten Achillessehnen wurden im handwarmen Wasserbad über zwei Stunden aufgetaut. Anschließend erfolgte die Präparation der Sehnenpräparate für die spätere Fixierung in der Kryoklemme (siehe Kapitel 4.3.3 Einspanntechnik). Im Anschluss erfolgte die makroskopische Beurteilung der Sehnenpräparate. Alle operierten Achillessehnen (linke Seite) wurden für eine standardisierte Bilddokumentation fotografiert (Abbildung 10).



Abbildung 10: Standardisierte Bilddokumentation vor und nach dem Zugversuch
[eigene Abbildung]

Zur proximalen Fixierung wurde der präparierte Sehnen Spiegel zwischen den beiden Platten der Kryoklemme eingelegt und durch leichtes Verschrauben gesichert. Die Kryoklemme mit dem Präparat wurde im Anschluss mittels einer Schraubklemme in die Zugprüfmaschine eingespannt. Die distale Fixierung des Sehnenpräparates erfolgte durch Einlegen in die Schlitzplatte (siehe Kapitel 4.3.3). Die Schlitzplatte war auf dem Prüftisch fixiert und diente als Widerlager für den Calcaneus. Es wurde darauf geachtet, dass der Calcaneus nach dem Einlegen der Schlitzplatte direkt von unten anlag. Dies sollte ein späteres Nachrutschen und somit die Entstehung von Artefakten im Kraft-Weg-Diagramm vermeiden.

Gemäß der in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Methode wurde nun eine definierte Menge an flüssigem Stickstoff in die Kryoklemme gegeben. Vor dem Start der Messung wurde gewartet, bis der Stickstoff verdampft und der Ansatz der Sehne sichtbar etwa 2 mm unterhalb der Kryoklemme gefroren war. Um ein komplettes Einfrieren der Sehne zu vermeiden, wurde der Zugversuch nach höchstens einer Minute Wartezeit begonnen und gemäß dem Prüfprotokoll durchgeführt. Das Sehnenpräparat wurde mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min und einer Kraft von 2 N vorgespannt. Die Prüfgeschwindigkeit nach dem Erreichen der Vorspannung war konstant und betrug 10 mm/min. Der Versuch wurde bei erfolgter Komplettruptur des Sehnenpräparates als beendet angesehen. Nach Abschluss der Messung erfolgte die erneute Bilddokumentation der gerissenen Sehne.

Der gesamte Versuchsablauf ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt. Nach dem Auftauen des Präparates wurden der Versuch und die Bilddokumentation innerhalb von 20 Minuten abgeschlossen. Die Raumtemperatur war konstant.

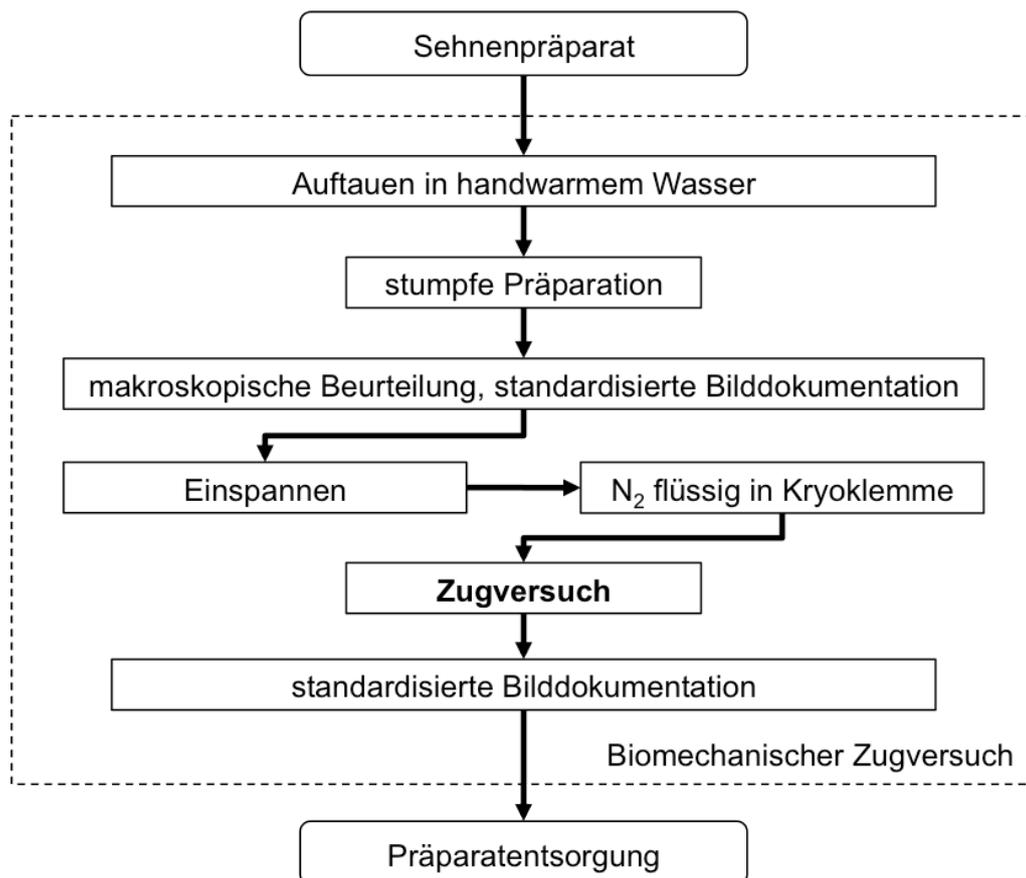


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs [eigene Darstellung]

4.4 Statistische Auswertung der Messdaten

Die statistische Auswertung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die im Versuch gewonnenen Daten mittels einer deskriptiven Statistik dargestellt und ausgewertet. Für die ermittelten Messwerte der Variable *maximale Kraft* und für die berechneten Werte der Variable *Steifigkeit* wurden Wertetabellen erstellt (Anhang 1 und Anhang 2). Dargestellt wurden zudem der Mittelwert und eine SD für jede Versuchsgruppe. Für alle Berechnungen musste die Einzigartigkeit des Versuchstieres als Individuum berücksichtigt werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Messwerte wurden die erfassten Parameter mit denen der gesunden Gegenseite verglichen (*matched pairs*, siehe Kapitel 4.4.1). Die Steifigkeit wurde mittels der in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Methode berechnet. In einem zweiten Schritt wurden die gewonnenen Messwerte dann gemäß der in Kapitel 4.4.3 beschriebenen Methode statistisch ausgewertet.

4.4.1 Vergleich mit der Gegenseite – Bildung von Wertepaaren

Die bei dem biomechanischen Versuch erhobenen Parameter (in den Tabellen bezeichnet als „Probe“) wurden mit der unbehandelten Gegenseite (bezeichnet als „Kontrolle“) verglichen (*matched pairs*). Aus dem Parameter *maximale Kraft*, ermittelt für die Probe und die Kontrolle, ergab sich so die Variable *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite*. Diese wurde in den Tabellen vereinfacht als *maximale Kraft im Vergleich* bezeichnet. Für die berechnete *Steifigkeit* kam das gleiche Prinzip zur Anwendung. Es ergab sich die Variable *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite*, vereinfacht *Steifigkeit im Vergleich*. So konnten ob der geringen Fallzahl pro Gruppe ($n=10$) und der natürlicherweise vorhandenen anatomischen Variationen der Versuchstiere objektive Vergleiche angestellt werden. Die Ergebnisse der Auswertung wurden in Prozent angegeben. Der Kontrolle wurde der Wert 1 bzw. 100% zugewiesen. Dargestellt wurden Mittelwerte und eine SD der Variablen *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* und *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* für die Versuchsgruppen.

4.4.2 Berechnung der Steifigkeit

Mit der Software *testXpert*[®] wurden die Messdaten der Versuche im Kraft-Weg-Diagramm (Abbildung 12) aufgezeichnet (Kapitel 4.3.4).

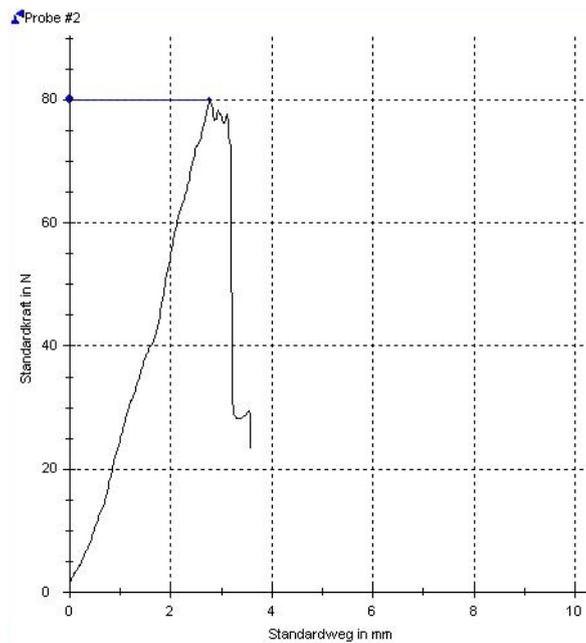


Abbildung 12: Beispiel für ein Kraft-Weg-Diagramm [Grafik erstellt durch die Software *testXpert*[®]]

Abbildung 12 zeigt ein Beispiel für ein Kraft-Weg-Diagramm der Software *testXpert*[®].

Die *Steifigkeit der Achillessehne* [N/mm] wurde aus den ermittelten Messwerten berechnet. Sie ist ein Maß für die Elastizität der Sehne und entspricht dem Anstieg der Kurve im Kraft-Weg-Diagramm (Abbildung 13).

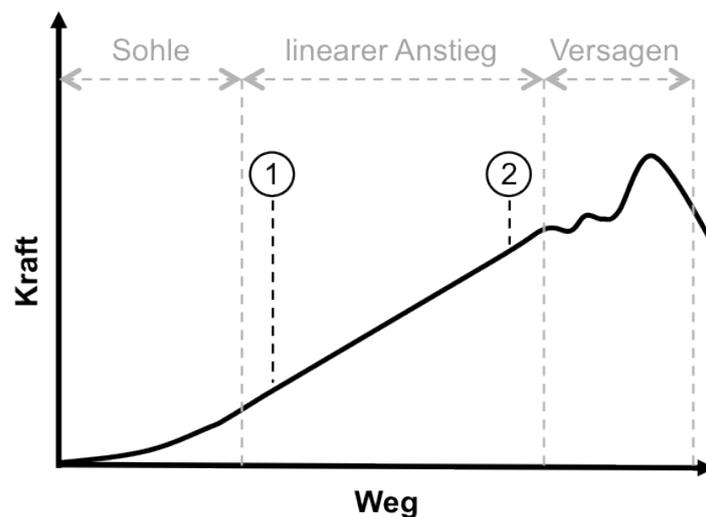


Abbildung 13: Ablesen der Punkte am Kraft-Weg-Diagramm [modifizierte Darstellung nach James et al. [2008]]

Abbildung 13 zeigt ein schematisches Beispiel für ein Kraft-Weg-Diagramm. Für die Berechnung der Steifigkeit wurde die Kraft $F(1)$ [N] und der Weg $s(1)$ [mm] am Punkt 1 sowie die Kraft $F(2)$ [N] und der Weg $s(2)$ [mm] am Punkt 2 benötigt.

Die Ablesepunkte wurden dabei im Bereich des linearen Anstiegs der Kurve gewählt. Punkt 2 wurde bereits abgelesen, bevor eine erste Teilruptur der Sehne und damit ein kurzer Kraftabfall zu beobachten war. Eine Verfälschung der berechneten Steifigkeit durch ein erstes Nachgeben einzelner Sehnenfasern wurde auf diese Weise vermieden. Die Steifigkeit wurde dann mit Hilfe der Formel 1 berechnet.

$$\text{Steifigkeit} = \frac{F(2) - F(1)}{s(2) - s(1)}$$

Formel 1: Berechnung der Steifigkeit

4.4.3 Statistik

Dieser Abschnitt beschreibt die für die biometrische Analyse der Ergebnisse der biomechanischen Untersuchung angewandten statistischen Testverfahren. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Kapitel 5.3 dargestellt.

Für die Auswahl der statistischen Tests wurden die Variablen mittels des *Shapiro-Wilk-Tests* auf Ihre Normalverteilung überprüft.

Zunächst wurde ein Vergleich der Ergebnisse der behandelten Seite mit denen der unbehandelten Gegenseite angestellt. Betrachtet wurden die Mittelwerte der Versuchsgruppen. Die Variablen *maximale Kraft* und *Steifigkeit* wurden auf signifikante Unterschiede zwischen der behandelten Seite und der unbehandelten Gegenseite untersucht. Zur Beantwortung der Fragestellung wurde der *t-Test für verbundene Stichproben* durchgeführt.

In einem zweiten Schritt wurden die Versuchsgruppen gegenübergestellt. Die Variablen *maximale Kraft im Vergleich* und *Steifigkeit im Vergleich* wurden mit einer *einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA)* auf signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen geprüft. Der Faktor Behandlung mit den Ausprägungen *PBS*, *eGFP* und *bFGF* definierte die miteinander zu vergleichenden Fallgruppen. Anschließend wurden in einem *Post-hoc-Test (Tukey)* je zwei

Versuchsgruppen gegenübergestellt und auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht.

Zur Beschreibung der Beziehung der Variablen *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* und *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* wurde eine *Korrelationsanalyse* durchgeführt. Die Darstellung der Messwerte in einem Streudiagramm ermöglichte eine Abschätzung der Korrelation. Der *Korrelationskoeffizient nach Pearson* wurde berechnet. Ein *zweiseitiger t-Test* wurde zur Ermittlung der statistischen Signifikanz der Korrelation durchgeführt. Die Kenntnis der Korrelation lässt jedoch keinen Rückschluss auf einen kausalen Zusammenhang der Variablen zu. Lediglich ein statistischer Zusammenhang kann so gezeigt werden.

Abschließend wurden die Ergebnisse des Langzeitversuches über 84 Tage mit denen vorangegangener Untersuchungen verglichen. Für den Vergleich lagen die Rohdaten der Untersuchung von **Kraus et al.** [2014] vor. Die Daten dieser Arbeit mit einer ähnlichen Fragestellung, jedoch einer mit 14 und 28 Tagen verschiedenen Heilungsdauer, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erneut statistisch ausgewertet und die Ergebnisse zum Vergleich herangezogen. Für die Variablen *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* und *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* wurde untersucht, ob innerhalb der Versuchsgruppen signifikante Unterschiede über verschiedene Heilungszeiträume bestanden. Für die Analyse wurde der *t-Test für unverbundene Stichproben* durchgeführt.

Das Konfidenzintervall wurde auf 95% festgelegt, eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang, so wurde von der Unabhängigkeit der getesteten Variablen ausgegangen - Rückschlüsse kausaler Art konnten jedoch nicht gezogen werden.

Die statistische Auswertung wurde mit der Software *IBM® SPSS® Statistics Version 22 für Mac OS* (SPSS® 22.0.0.0.0, SPSS® Inc., an IBM® Company) vorgenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung

Alle untersuchten Sehnenpräparate waren nach dem Heilungszeitraum von 84 Tagen makroskopisch durchgängig. Vereinzelt Verhärtungen im Bereich des im ersten Eingriff gesetzten Sehnendefektes wurden beobachtet.

5.2 Ergebnisse der biomechanischen Testung

Die bei der biomechanischen Testung im Langzeitversuch über 84 Tage ermittelten Messwerte für den Parameter *maximale Kraft* sind im Anhang 1 beigefügt. Mithilfe der in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Methode wurde aus dem Kraft-Weg-Diagramm die Steifigkeit der Sehnen ermittelt (siehe Anhang 2). Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der in Kapitel 4.4.3 beschriebenen Methoden. Es wurde eine quantitative Auswertung der Variablen *maximale Kraft* und *Steifigkeit* der Achillessehne vorgenommen.

5.2.1 Maximale Kraft

		MW [N]	SD [N]	Min [N]	Max [N]	Median [N]	<i>n</i>
Probe	PBS	88,033	11,734	68,900	104,616	92,929	10
	eGFP	87,632	13,465	68,722	105,360	87,224	10
	bFGF	78,135	18,165	52,159	108,518	75,167	10
Kontrolle	PBS	79,497	8,312	65,709	91,533	79,488	10
	eGFP	85,864	9,888	68,333	98,510	86,962	10
	bFGF	83,304	13,127	60,398	104,279	86,464	10

Tabelle 2: Mittelwerte der maximalen Kraft [N] je Gruppe für Probe- und Kontrollseite

Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte mit SD der im Zugversuch ermittelten maximalen Kraft der behandelten Sehnen (Probe) und der Kontrollsehnen (Kontrolle) in den drei Versuchsgruppen. Die operierten Sehnen der PBS-Gruppe versagten im Mittel bei 88,033 N (\pm 11,734 N), der Median lag bei 92,929 N (68,900 N bis 104,616 N). In der eGFP-MSC-Gruppe wurde ein Mittelwert von 87,632 N (\pm 13,465 N) beobachtet, der Median lag bei 87,224 N (68,722 N bis 105,360 N). Bei den behandelten Sehnen der bFGF-MSC-Gruppe wurde ein Versagen im Mittel bei 78,135 N (\pm 18,165 N) beobachtet, der Median lag bei 75,167 N (52,159 N bis 108,518 N). Die Sehnen der Kontrollseite in der mit PBS behandelten Gruppe

versagten im Mittel bei 79,497 N ($\pm 8,312$ N), der Median lag bei 79,488 N und die Spannweite reichte von 65,709 N bis 91,533 N. In der eGFP-MSC-Gruppe wurde auf der Kontrollseite im Mittel eine maximale Kraft von 85,864 N ($\pm 9,888$ N) beobachtet, der Median lag bei 86,962 N (68,333 N bis 98,510 N). Der Mittelwert der Kontrollseite in der bFGF-MSC-Gruppe lag bei 83,304 N ($\pm 13,127$ N), der Median bei 86,464 N und die Spannweite reichte von 60,398 N bis 104,279 N.

		MW [%]	SD [%]	Min [%]	Max [%]	Median [%]	<i>n</i>
maximale Kraft im Vergleich	PBS	1,123	0,206	0,753	1,398	1,169	10
	eGFP	1,031	0,185	0,754	1,294	1,044	10
	bFGF	0,968	0,286	0,500	1,321	1,015	10

Tabelle 3: Mittelwerte der maximalen Kraft [%] im Vergleich zur gesunden Seite je Gruppe

In Tabelle 3 werden die behandelten Sehnen einer Gruppe der unbehandelten Kontrollseite gegenübergestellt. Die behandelten Sehnen der PBS-Gruppe übertrafen die Sehnen der Gegenseite mit einer Kraft von 112,3% ($\pm 20,6\%$). In der eGFP-MSC-Gruppe wurden die Werte der Kontrollseite leicht übertroffen (103,1% $\pm 18,5\%$). Die mittlere Kraft in der bFGF-MSC-Gruppe verfehlte die maximale Kraft der unbehandelten Kontrollseite knapp (96,8% $\pm 28,6\%$).

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der *maximalen Kraft im Vergleich zur Gegenseite* für die drei Versuchsgruppen in Form von Mittelwert und Fehlerbalken (eine SD) grafisch dargestellt.

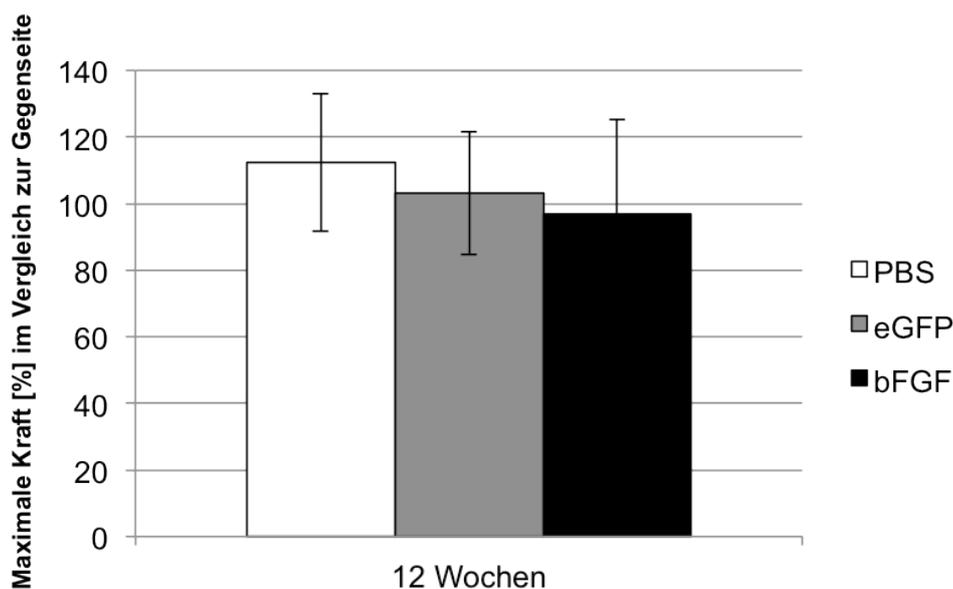


Abbildung 14: Mittelwerte der maximalen Kraft [%] im Vergleich zur gesunden Seite je Gruppe [eigene Darstellung]

5.2.2 Steifigkeit

		MW [N/mm]	SD [N/mm]	Min [N/mm]	Max [N/mm]	Median [N/mm]	<i>n</i>
Probe	PBS	33,9748	9,1525	16,9322	43,1823	34,7514	10
	eGFP	33,9814	7,2700	24,6125	47,2491	31,3093	10
	bFGF	30,1199	9,7157	21,4663	49,2455	26,5131	10
Kontrolle	PBS	46,8115	17,0435	18,1920	64,0091	50,9981	10
	eGFP	54,2456	12,2968	38,9605	76,8304	51,6189	10
	bFGF	51,7383	14,4472	25,1608	68,8687	52,5205	10

Tabelle 4: Mittelwert der Steifigkeit [N/mm] je Gruppe für Probe- und Kontrollseite

Tabelle 4 zeigt die mithilfe der in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Methode ermittelten Werte für die Steifigkeit der Sehnen in den drei Versuchsgruppen. In der PBS-Gruppe erreichten die operierten Sehnen im Mittel 33,97 N/mm ($\pm 9,15$ N/mm), die Sehnen der Kontrollseite hingegen 46,81 N/mm ($\pm 17,04$ N/mm). In der mit eGFP behandelten Gruppe erreichten die Sehnen im Mittel eine Steifigkeit von 33,98 N/mm ($\pm 7,27$ N/mm) auf der operierten Seite und 54,25 N/mm ($\pm 12,30$ N/mm) auf der unbehandelten Seite. Bei den behandelten Sehnen der bFGF-MSC-Gruppe wurde eine mittlere Steifigkeit von 30,12 N/mm ($\pm 9,72$ N/mm) ermittelt, die unbehandelte Kontrollseite erreichte eine mittlere Steifigkeit von 51,74 N/mm ($\pm 14,45$ N/mm).

		MW [%]	SD [%]	Min [%]	Max [%]	Median [%]	<i>n</i>
Steifigkeit im Vergleich	PBS	0,871	0,542	0,302	2,148	0,754	10
	eGFP	0,648	0,171	0,379	0,927	0,625	10
	bFGF	0,694	0,517	0,321	1,957	0,498	10

Tabelle 5: Mittelwerte der Steifigkeit [%] im Vergleich zur gesunden Seite je Gruppe

In Tabelle 5 werden die Mittelwerte der Steifigkeit der behandelten Sehnen einer Gruppe der unbehandelten Kontrollseite gegenübergestellt (siehe Abbildung 15). Die PBS-Gruppe erreichte eine Steifigkeit von 87,1% ($\pm 54,2\%$) im Vergleich zur Kontrollseite. In der eGFP-MSC-Gruppe wurden 64,8% ($\pm 17,1\%$), in der bFGF-MSC-Gruppe 69,4% ($\pm 51,7\%$) im Vergleich zur gesunden Seite erreicht. Hervorzuheben ist, dass auf der behandelten Seite in keiner der drei Versuchsgruppen die Steifigkeit der Gegenseite erreicht wurde.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* für die drei Versuchsgruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Fehlerbalken (eine SD).

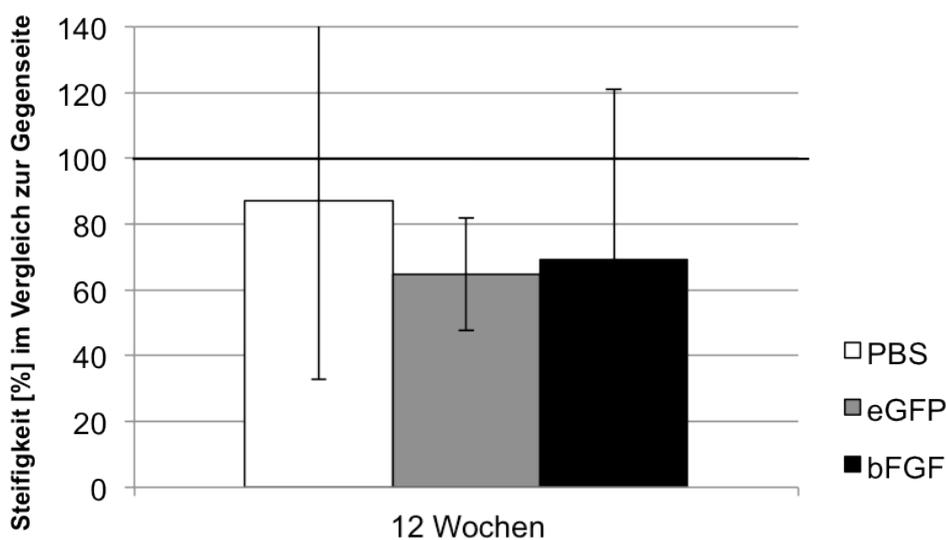


Abbildung 15: Mittelwerte der Steifigkeit [%] im Vergleich zur gesunden Seite je Gruppe [eigene Darstellung]

5.3 Ergebnisse der statistischen Auswertung

5.3.1 Vergleich von behandelter Seite und Gegenseite

Die Variablen *maximale Kraft* und *Steifigkeit* wurden mit der Fragestellung untersucht, ob ungeachtet der Gruppenzugehörigkeit und auch innerhalb der Versuchsgruppen ein Unterschied zwischen der behandelten, operierten Seite und der unbehandelten Gegenseite besteht. Zu diesem Zweck wurde der *t-Test für verbundene Stichproben* durchgeführt.

Gruppe	maximale Kraft	MW [N]	SD [N]	n	Signifikanz
Alle	behandelte Seite	84,600	14,934	30	0,643
	Gegenseite	82,888	10,599	30	
PBS	behandelte Seite	88,032	11,733	10	0,138
	Gegenseite	79,496	8,311	10	
eGFP	behandelte Seite	87,632	13,464	10	0,739
	Gegenseite	85,863	9,888	10	
bFGF	behandelte Seite	78,135	8,164	10	0,537
	Gegenseite	83,303	13,126	10	

Tabelle 6: Mittelwerte der maximalen Kraft [N] je Gruppe für Probe- und Kontrollseite (mit Angabe der statistischen Signifikanz)

In Tabelle 6 werden die Mittelwerte der maximalen Kraft je Gruppe für die behandelte Seite denen der unbehandelten Gegenseite gegenübergestellt. Zudem ist die statistische Signifikanz der Ergebnisse dargestellt.

Über alle Gruppen hinweg wurde eine mittlere Kraft von 84,600 N (\pm 14,934 N) bei der behandelten Seite und 82,888 N (\pm 10,599 N) bei der Gegenseite ermittelt. In der PBS-Gruppe übertraf die mittlere maximale Kraft auf der behandelten Seite mit 88,032 N (\pm 11,733 N) die der unbehandelten Seite mit 79,496 N (\pm 8,311 N) deutlich. In der eGFP-MS-Gruppe wurde nur ein geringer Unterschied zwischen behandelte Seite (87,632 N \pm 13,464 N) und Gegenseite (85,863 N \pm 9,888 N) festgestellt. Die mittlere maximale Kraft der behandelten Seite in der bFGF-MS-Gruppe (78,135 N \pm 8,164 N) erreichte die der Gegenseite (83,303 N \pm 13,126 N) nicht. In keiner Gruppe wurden statistisch signifikante Unterschiede für die maximale Kraft nachgewiesen.

Gruppe	Steifigkeit	MW [N/mm]	SD [N/mm]	n	Signifikanz
Alle	behandelte Seite	32,6920	8,6670	30	0,000
	Gegenseite	50,9318	14,5505	30	
PBS	behandelte Seite	33,9748	9,1525	10	0,070
	Gegenseite	46,8115	17,0435	10	
eGFP	behandelte Seite	33,9814	7,2700	10	0,001
	Gegenseite	54,2456	12,2968	10	
bFGF	behandelte Seite	30,1199	9,7157	10	0,014
	Gegenseite	51,7383	14,4472	10	

Tabelle 7: Mittelwerte der Steifigkeit [N/mm] je Gruppe für Probe- und Kontrollseite (mit Angabe der statistischen Signifikanz)

Tabelle 7 zeigt die Mittelwerte der Steifigkeit der Sehnenpräparate auf der behandelten Seite und der Gegenseite sowie die statistische Signifikanz der aufgezeigten Differenzen.

Zunächst wurde die Gruppenzugehörigkeit vernachlässigt. Alle behandelten Sehnen der drei Versuchsgruppen ($n=30$) erreichten eine mittlere Steifigkeit von 32,69 N/mm ($\pm 8,67$ N/mm). Für die Sehnen der unbehandelten Seite wurde eine mittlere Steifigkeit von 50,93 N/mm ($\pm 14,55$ N/mm) ermittelt. Die behandelten Sehnen wiesen eine statistisch signifikant geringere Steifigkeit als die Sehnen der unbehandelten Gegenseite auf ($p=0,000$). Diese Unterschiede zeigten sich auch unter Beachtung der Gruppenzugehörigkeit. In der PBS-Gruppe war die mittlere Steifigkeit auf der behandelten Seite (33,97 N/mm $\pm 9,15$ N/mm) deutlich geringer als auf der Gegenseite (46,81 N/mm $\pm 17,04$ N/mm); die Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant. Die mittlere Steifigkeit der behandelten Seite in der eGFP-MS-Gruppe (33,98 N/mm $\pm 7,27$ N/mm) war signifikant geringer ($p=0,001$) als die Steifigkeit der Gegenseite (54,25 N/mm $\pm 12,30$ N/mm). Auch in der bFGF-MS-Gruppe zeigte sich eine signifikant geringere ($p=0,014$) Steifigkeit der Sehnen der behandelten Seite (30,12 N/mm $\pm 9,72$ N/mm) im Vergleich zur Gegenseite (51,74 N/mm $\pm 14,45$ N/mm).

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* nach 84 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Fehlerbalken (eine SD) für die drei Versuchsgruppen unter Angabe der statistischen Signifikanz, sofern diese vorlag. Die Steifigkeit der unbehandelten Gegenseite entsprach 100%.

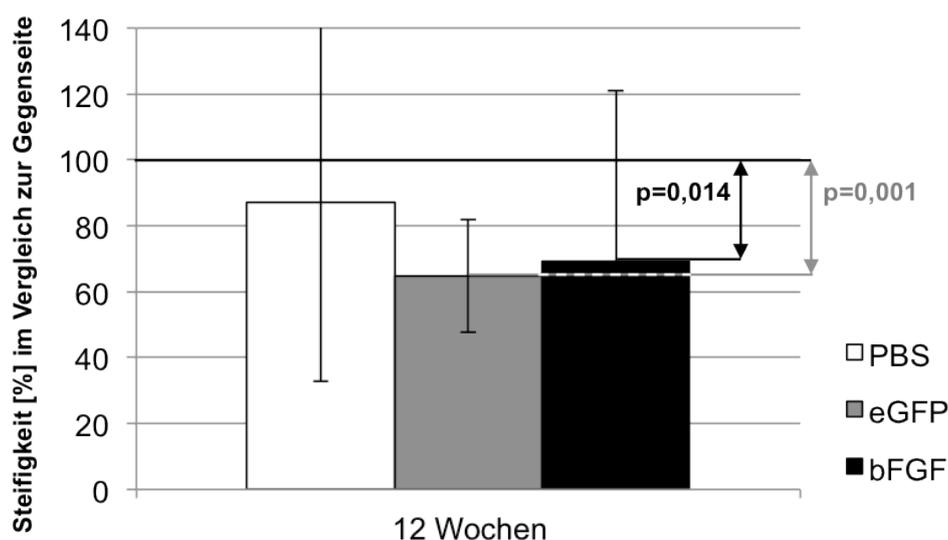


Abbildung 16: Mittelwerte der Steifigkeit [%] im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz) je Gruppe [eigene Darstellung]

5.3.2 Vergleich der Versuchsgruppen

Die Variablen *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* und *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* wurden zunächst mit einer *einfaktoriellen Varianzanalyse* (ANOVA, siehe Kapitel 4.4.3) auf signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen PBS, eGFP-MSC und bFGF-MSC geprüft.

	Signifikanz
Maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite	0,335
Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite	0,505

Tabelle 8: Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) dargestellt. Es konnte weder für die *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* ($p=0,335$) noch für die *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* ($p=0,505$) ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen festgestellt werden.

Anschließend wurden in einem *Post-hoc-Test (Tukey)* je zwei Versuchsgruppen gegenübergestellt und die Mittelwerte der Variablen *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* und *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht.

Kraft im Vergleich		MW	SD	n	Signifikanz
PBS vs. eGFP	PBS	1,1225	0,2060	10	0,652
	eGFP	1,0312	0,1845	10	
PBS vs. bFGF	PBS	1,1225	0,2060	10	0,306
	bFGF	0,9684	0,2857	10	
eGFP vs. bFGF	eGFP	1,0312	0,1845	10	0,815
	bFGF	0,9684	0,2857	10	

Tabelle 9: Vergleich der Versuchsgruppen – Kraft im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz)

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse in den Versuchsgruppen im Hinblick auf die erreichte *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* dargestellt. Die in den Versuchsgruppen ermittelten Werte wurden anschließend auf statistische Signifikanz untersucht. Im Vergleich der PBS-Gruppe ($112,3\% \pm 20,6\%$) mit der eGFP-MS-Gruppe ($103,1\% \pm 18,5\%$) konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden. Die Differenz zwischen der PBS-Gruppe ($112,3\% \pm 20,6\%$) und der bFGF-MS-Gruppe ($96,8\% \pm 28,6\%$) war wie auch die Differenz zwischen der eGFP-MS-Gruppe ($103,1\% \pm 18,5\%$) und der bFGF-MS-Gruppe ($96,8\% \pm 28,6\%$) statistisch nicht signifikant.

Wie in Kapitel 5.2.2 festgestellt wurde, auf der behandelten Seite in keiner der drei Versuchsgruppen die Steifigkeit der Gegenseite erreicht. In Kapitel 5.3.1 wurde gezeigt, dass dieser Unterschied in der eGFP-MS-Gruppe ($p=0,001$) und der bFGF-MS-Gruppe ($p=0,014$) statistisch signifikant ist. Verglichen wurden nun die Versuchsgruppen untereinander auf die erreichte *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite*. Auf diese Weise konnte ermittelt werden, ob die Gruppenzugehörigkeit einen signifikanten Einfluss auf die Steifigkeit hatte oder die Differenzen allgemein auftraten und die Ursache in der Methode oder im Heilungsverlauf zu suchen war.

Steifigkeit im Vergleich		MW	SD	n	Signifikanz
PBS vs. eGFP	PBS	0,8705	0,5417	10	0,510
	eGFP	0,6483	0,1706	10	
PBS vs. bFGF	PBS	0,8705	0,5417	10	0,650
	bFGF	0,6936	0,5174	10	
eGFP vs. bFGF	eGFP	0,6483	0,1706	10	0,972
	bFGF	0,6936	0,5174	10	

Tabelle 10: Vergleich der Versuchsgruppen – Steifigkeit im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz)

Tabelle 10 zeigt die ermittelte *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* und die Ergebnisse der Prüfung der Differenz zwischen den Versuchsgruppen auf statistische Signifikanz. Die in der PBS-Gruppe ($87,1\% \pm 54,2\%$) ermittelte *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* übertraf die der eGFP-MS-Gruppe ($64,8\% \pm 17,1\%$) und die der bFGF-MS-Gruppe ($69,4\% \pm 51,2\%$). Der Vergleich der eGFP-MS-Gruppe ($64,8\% \pm 17,1\%$) mit der bFGF-MS-Gruppe ($69,4\% \pm 51,2\%$) zeigte eine ähnliche *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite*. Eine statistische Signifikanz lag in keinem der drei Vergleiche vor.

5.3.3 Korrelation von maximaler Kraft und Steifigkeit

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob ein Zusammenhang zwischen den beiden Variablen *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* und *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* besteht, wurde eine *Korrelationsanalyse* durchgeführt. Zunächst wurden alle Wertepaare in einem zweidimensionalen Koordinatensystem als Streudiagramm dargestellt (Abbildung 17).

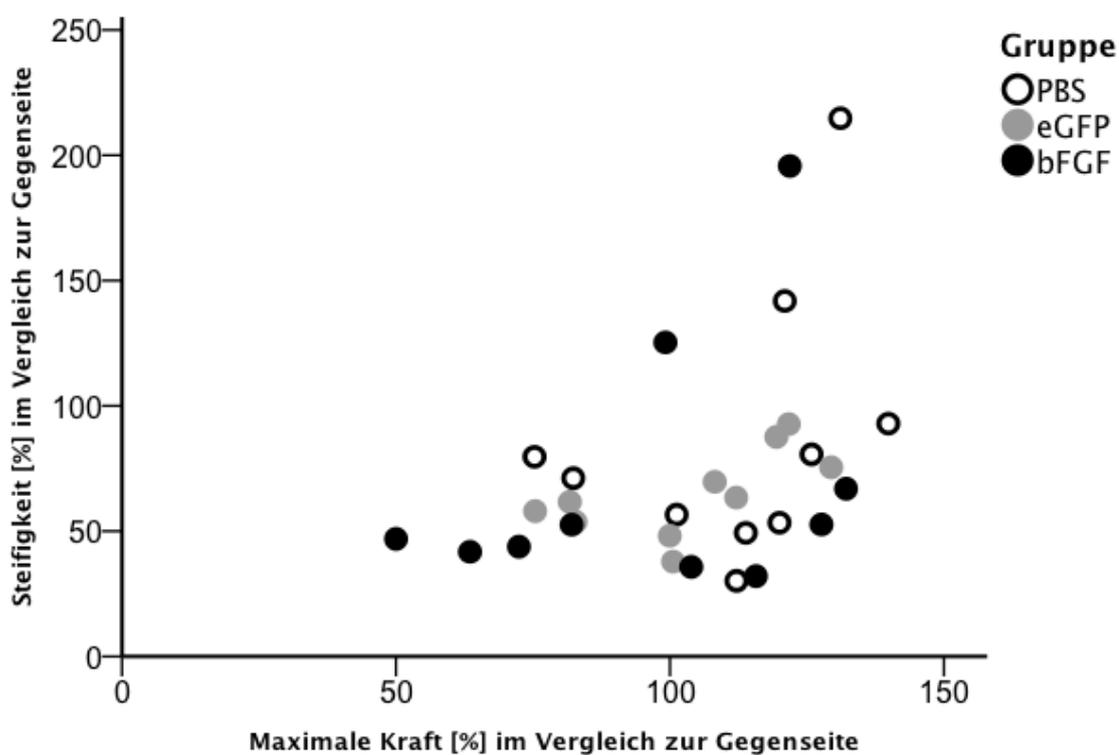


Abbildung 17: Korrelation von maximaler Kraft und Steifigkeit – Darstellung der Wertepaare in einem zweidimensionalen Koordinatensystem [eigene Darstellung]

Bereits im Streudiagramm konnte eine Tendenz zur positiven Korrelation beobachtet werden. Anschließend wurde der *Korrelationskoeffizient nach Pearson* (siehe Kapitel 4.4.3) berechnet. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Korrelation wurde ein *zweiseitiger t-Test* durchgeführt (Tabelle 11).

	Korrelation nach Pearson	Signifikanz
maximale Kraft im Vergleich	0,395	0,031
Steifigkeit im Vergleich		

Tabelle 11: Korrelation von maximaler Kraft und Steifigkeit (mit Angabe der statistischen Signifikanz)

Tabelle 11 zeigt, dass eine positive lineare Korrelation für die Variablen *maximale Kraft im Vergleich* und *Steifigkeit im Vergleich* vorlag ($r=0,395$). Die auf diese Weise ermittelte Korrelation war statistisch signifikant. Die Hypothese, die beiden Variablen hätten einen Korrelationskoeffizienten von $r=0$, konnte abgelehnt werden ($p=0,031$).

5.3.4 Vergleich mit vorangegangenen Untersuchungen

Für den Vergleich der Daten aus dem vorliegenden Versuch mit einer Heilungsdauer von 84 Tagen mit den Ergebnissen der vorausgegangenen Versuche (Heilungsdauer 14 bzw. 28 Tage) lagen die Daten von **Kraus et al.** [2014] zur statistischen Auswertung vor.

Für die Variablen *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* und *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* wurde untersucht, ob innerhalb der drei Versuchsgruppen statistisch signifikante Unterschiede bei verschiedenen langen Heilungszeiträumen vorlagen. Zu diesem Zweck wurde der *t-Test für unverbundene Stichproben* durchgeführt.

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse für die *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* dargestellt. Die Daten von **Kraus et al.** [2014] (Heilungsdauer 14 bzw. 28 Tage) wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

maximale Kraft im Vergleich		MW	SD	n	Signifikanz
PBS	14 d*	0,5418	0,0917	5	0,012
	28 d*	0,8805	0,2158	5	
	14 d*	0,5418	0,0917	5	0,000
	84 d	1,1225	0,2060	10	
	28 d*	0,8805	0,2158	5	0,055
	84 d	1,1225	0,2060	10	
eGFP	14 d*	0,7272	0,1690	7	0,971
	28 d*	0,7311	0,1709	4	
	14 d*	0,7272	0,1690	7	0,004
	84 d	1,0312	0,1845	10	
	28 d*	0,7311	0,1709	4	0,016
	84 d	1,0312	0,1845	10	
bFGF	14 d*	0,6987	0,1416	6	0,678
	28 d*	0,7418	0,2089	7	
	14 d*	0,6987	0,1416	6	0,051
	84 d	0,9684	0,2857	10	
	28 d*	0,7418	0,2089	7	0,095
	84 d	0,9684	0,2857	10	

Tabelle 12: Vergleich mit den Ergebnissen nach 14 und 28 Tagen – maximale Kraft [%] im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz; Kennzeichnung mit Stern (*): Daten von Kraus et al. [2014])

Die Untersuchung von **Kraus et al.** [2014] zeigte bereits, dass für die *maximale Kraft im Vergleich* in der PBS-Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen nach 14 und 28 Tagen bestand ($p=0,012$). Im Vergleich der Messungen nach 14 und 84 Tagen konnten signifikant bessere Resultate beobachtet werden ($p=0,000$). Auch der Vergleich der Messwerte nach 28 und 84 Tagen zeigte bessere, jedoch statistisch nicht signifikante Ergebnisse. In der eGFP-MSC-Gruppe konnte die Untersuchung von **Kraus et al.** [2014] noch keine signifikanten Verbesserungen feststellen. Beim Vergleich der Messung nach 14 und 84 Tagen ($p=0,004$) und nach 28 und 84 Tagen ($p=0,016$) wurden signifikant bessere Resultate beobachtet. In der bFGF-MSC-Gruppe wurden mit zunehmender Heilungsdauer bessere Ergebnisse beobachtet; eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht festgestellt.

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der *maximalen Kraft im Vergleich zur Gegenseite* für die drei Versuchsgruppen nach 14, 28 und 84 Tagen in Form von Mittelwert und Fehlerbalken (eine SD) dargestellt. Sofern eine statistische Signifikanz vorlag, ist diese in Form des p -Wertes angegeben.

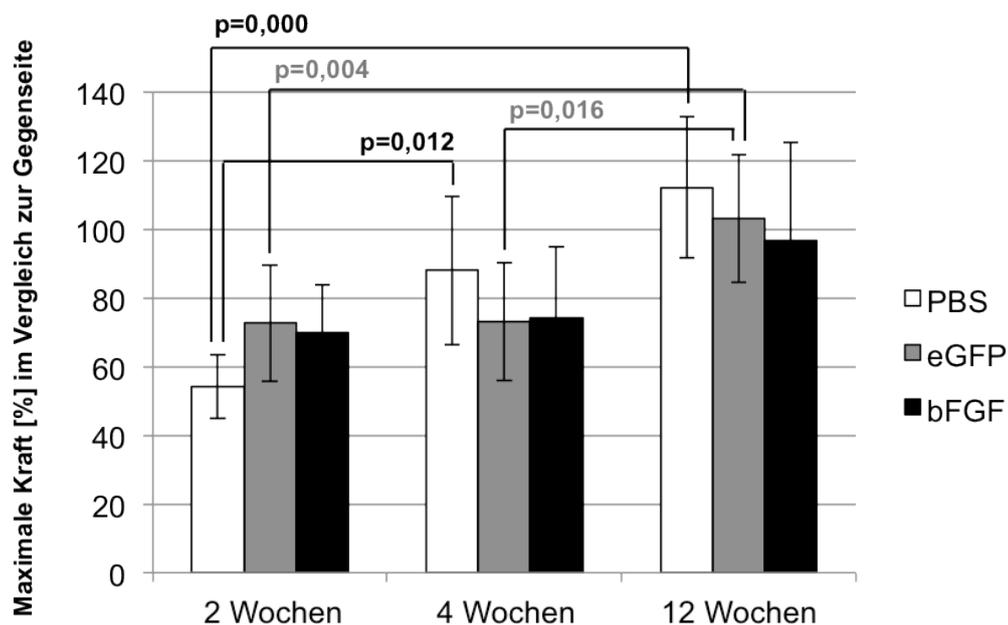


Abbildung 18: Vergleich mit den Ergebnissen nach 14 und 28 Tagen – maximale Kraft [%] im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz) [eigene Darstellung]

Die Ergebnisse des Vergleichs der Messwerte nach 14, 28 und 84 Tagen für die *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* zeigt Tabelle 13. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Daten entstammen den Versuchen von **Kraus et al.** [2014] (Heilungsdauer 14 bzw. 28 Tage).

Steifigkeit im Vergleich		MW	SD	n	Signifikanz
PBS	14 d*	0,2371	0,1149	5	0,006
	28 d*	0,5077	0,1170	5	
	14 d*	0,2371	0,1149	5	0,025
	84 d	0,8705	0,5417	10	
	28 d*	0,5077	0,1170	5	0,169
	84 d	0,8705	0,5417	10	
eGFP	14 d*	0,2927	0,1038	7	0,592
	28 d*	0,2526	0,1350	4	
	14 d*	0,2927	0,1038	7	0,000
	84 d	0,6483	0,1706	10	
	28 d*	0,2526	0,1350	4	0,001
	84 d	0,6483	0,1706	10	
bFGF	14 d*	0,3267	0,0815	6	0,523
	28 d*	0,4076	0,2889	7	
	14 d*	0,3267	0,0815	6	0,111
	84 d	0,6936	0,5174	10	
	28 d*	0,4076	0,2889	7	0,207
	84 d	0,6936	0,5174	10	

Tabelle 13: Vergleich mit den Ergebnissen nach 14 und 28 Tagen – Steifigkeit [%] im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz; Kennzeichnung mit Stern (*): Daten von Kraus et al. [2014])

In der PBS-Gruppe zeigte schon die Untersuchung von **Kraus et al.** [2014] signifikant höhere Werte im Vergleich der Messungen nach 14 und 28 Tagen ($p=0,006$). Auch im Vergleich der Ergebnisse nach 14 und 84 Tagen konnten signifikant höhere Messwerte beobachtet werden ($p=0,025$). Der Vergleich nach 28 und 84 Tagen zeigte eine deutliche, statistisch jedoch nicht signifikante Zunahme der *Steifigkeit im Vergleich*. Beim Vergleich der Messwerte in der eGFP-MS-Gruppe wurden nach 14 und 84 Tagen ($p=0,000$) und nach 28 und 84 Tagen ($p=0,001$) signifikant höhere Resultate beobachtet. In der bFGF-MS-Gruppe konnte bei zunehmender Heilungsdauer keine statistisch signifikante Erhöhung der *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* festgestellt werden.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse für die *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* nach 14, 28 und 84 Tagen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Fehlerbalken (eine SD) für die drei Versuchsgruppen. Sofern eine statistische Signifikanz vorlag, ist diese in Form des p -Wertes angegeben.

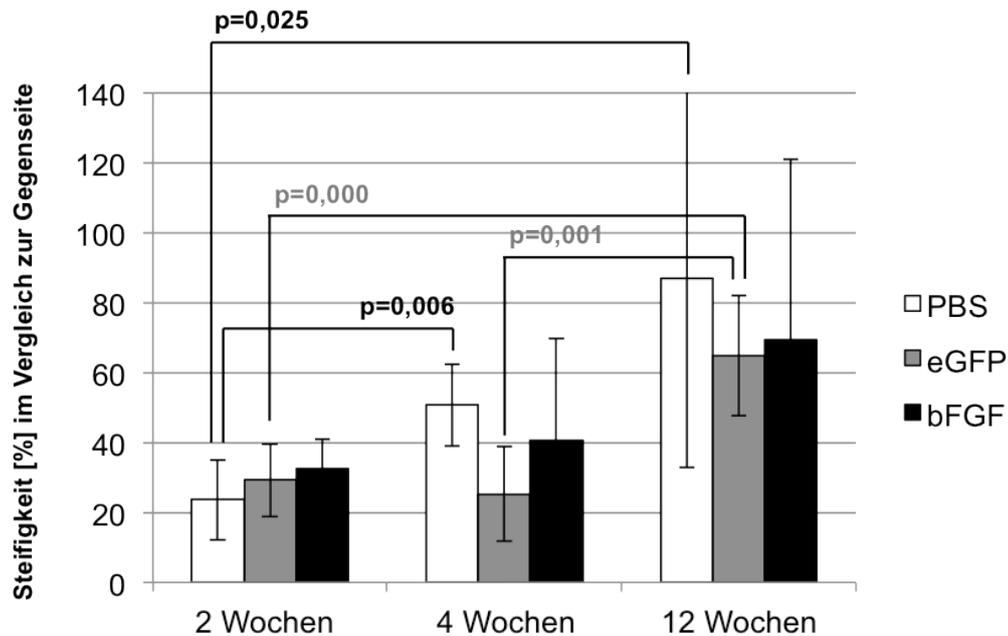


Abbildung 19: Vergleich mit den Ergebnissen nach 14 und 28 Tagen – Steifigkeit [%] im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz) [eigene Darstellung]

Zusammenfassend konnte bei der Steifigkeit eine positive Tendenz beobachtet werden. Jedoch wurde auch nach 84 Tagen in keiner der drei Versuchsgruppen die Steifigkeit der Gegenseite erreicht.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Alle Sehnenpräparate des Langzeitversuchs über 84 Tage waren makroskopisch durchgängig. Vereinzelt wurden im Bereich des vorangegangenen Sehnendefektes Verhärtungen beobachtet.

In der biomechanischen Untersuchung übertrafen die Mittelwerte der *maximalen Kraft* (Tabelle 3; Abbildung 14) der behandelten Sehnen der PBS-Gruppe die Sehnen der Gegenseite ($112,3\% \pm 20,6\%$). In der eGFP-MS-Gruppe wurden die Werte der Kontrollseite leicht übertroffen ($103,1\% \pm 18,5\%$). Die *maximale Kraft* in der bFGF-MS-Gruppe erreichte die Kraft der unbehandelten Kontrollseite nicht ($96,8\% \pm 28,6\%$). In der statistischen Auswertung wurden für die *maximale Kraft* im Vergleich der Mittelwerte der behandelten Seite mit der unbehandelten Gegenseite (Kapitel 5.3.1) in keiner Gruppe signifikante Unterschiede nachgewiesen.

Die PBS-Gruppe erreichte in der biomechanischen Untersuchung eine *Steifigkeit* von $87,1\% (\pm 54,2\%)$ im Vergleich zur Kontrollseite (Tabelle 5; Abbildung 15). In der eGFP-MS-Gruppe wurden $64,8\% (\pm 17,1\%)$, in der bFGF-MS-Gruppe $69,4\% (\pm 51,7\%)$ im Vergleich zur gesunden Seite erreicht. Hervorzuheben ist, dass auf der behandelten Seite in keiner der drei Versuchsgruppen die Steifigkeit der Gegenseite erreicht wurde. Bestätigt wurde dies in der statistischen Auswertung (zunächst ohne Beachtung der Gruppenzugehörigkeit ($n=30$)): Es zeigte sich eine signifikant geringere Steifigkeit der behandelten Sehnen im Vergleich mit der unbehandelten Gegenseite ($p=0,000$). Diese Unterschiede zeigten sich auch unter Beachtung der Gruppenzugehörigkeit. Die mittlere Steifigkeit der behandelten Seite war sowohl in der eGFP-MS-Gruppe ($p=0,001$) als auch in der bFGF-MS-Gruppe ($p=0,014$) signifikant geringer als die Steifigkeit der Gegenseite. Eine Tendenz zeigte sich auch in der PBS-Gruppe, die Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant.

Im Vergleich der Versuchsgruppen (Kapitel 5.3.2) ergab die statistische Prüfung sowohl für die *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* (Tabelle 9) als auch für die *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* (Tabelle 10) im Vergleich der PBS-Gruppe mit der eGFP-MS-Gruppe, der PBS-Gruppe mit der bFGF-MS-Gruppe und auch der eGFP-MS-Gruppe mit der bFGF-MS-Gruppe keine signifikanten Differenzen. Festzustellen war jedoch, dass die Mittelwerte der bFGF-MS-

Gruppe weder für die *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* noch für die *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* die Mittelwerte der PBS-Gruppe erreichten.

Die Berechnung des *Korrelationskoeffizienten nach Pearson* (siehe Kapitel 4.4.3) nach einer Darstellung der beiden Variablen *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* und *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* in einem zwei-dimensionalen Koordinatensystem als Streudiagramm (Abbildung 17) zeigte eine positive lineare Korrelation für die beiden Variablen (Tabelle 11; $r=0,395$; $p=0,031$).

Abschließend wurden die Daten aus dem vorliegenden Versuch (Heilungsdauer 84 Tage) mit den Daten der vorausgegangenen Versuche (Heilungsdauer 14 bzw. 28 Tage) von **Kraus et al.** [2014] vergleichend ausgewertet. Für die Variable *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* (Abbildung 18) zeigte die Untersuchung von **Kraus et al.** [2014] in der PBS-Gruppe bereits einen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen nach 14 und 28 Tagen ($p=0,012$). Auch der Vergleich der Messungen nach 14 und 84 Tagen zeigte signifikant bessere Resultate ($p=0,000$; Tabelle 12). In der eGFP-MS-Gruppe zeigte die Untersuchung von **Kraus et al.** [2014] noch keine signifikanten Verbesserungen. Beim Vergleich der Messung nach 14 und 84 Tagen ($p=0,004$) und nach 28 und 84 Tagen ($p=0,016$) wurden signifikant bessere Resultate beobachtet. In der bFGF-MS-Gruppe wurde mit zunehmender Heilungsdauer eine positive Tendenz, jedoch keine statistische Signifikanz festgestellt.

Die Daten von **Kraus et al.** [2014] zeigten schon in der Untersuchung der *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* (Abbildung 19) in der PBS-Gruppe nach 14 und 28 Tagen ($p=0,006$) signifikant höhere Messwerte. Auch im Vergleich der Ergebnisse nach 14 und 84 Tagen wurden signifikant höhere Werte beobachtet ($p=0,025$). Beim Vergleich der Ergebnisse in der eGFP-MS-Gruppe wurden nach 14 und 84 Tagen ($p=0,000$) und nach 28 und 84 Tagen ($p=0,001$) signifikant höhere Werte beobachtet. In der bFGF-MS-Gruppe konnte mit zunehmender Heilungsdauer keine statistisch signifikante Erhöhung der *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* festgestellt werden.

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methodik

In diesem Kapitel soll zuerst eine kritische Betrachtung der Methodik dieser Arbeit erfolgen. Nach der Interpretation der Ergebnisse und einem Vergleich mit der Literatur in Kapitel 6.2 sollen in Kapitel 6.3 schließlich Limitationen dieser Arbeit aufgezeigt werden, um in Kapitel 6.4 ein Fazit zu ziehen und die klinische Relevanz der Ergebnisse zu bewerten.

Ein relevanter Punkt in der Methodik war die Darstellung und Auswertung der Messwerte. Die natürlicherweise vorhandenen anatomischen Variationen bei den Versuchstieren würden unter normalen Umständen eine sehr große Fallzahl pro Gruppe nötig machen, um die Versuchsgruppen valide vergleichen zu können. Aus ökonomischen, vor allem aber ethischen Gründen war es jedoch nötig, die Anzahl der Versuchstiere und somit die Fallzahl pro Gruppe möglichst gering zu halten. Aus diesem Grund kam das bereits durch **Thermann** [1996] beschriebene Prinzip der vergleichenden Auswertung der Messergebnisse mit der gesunden Gegenseite zur Anwendung („matched pairs“, siehe Kapitel 4.4.1).

Die bei dem biomechanischen Versuch erhobenen Parameter für die operierte Seite wurden mit denen der unbehandelten Gegenseite verglichen. Aus dem Parameter *maximale Kraft*, ermittelt für die Probe und die Kontrolle, ergab sich so die Variable *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite*. Das gleiche Prinzip kam zur Berechnung der *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* zur Anwendung. So wurde ob der anatomischen Variationen der Versuchstiere und der geringen Fallzahl pro Gruppe ($n=10$) eine objektive Vergleichbarkeit erzielt. Die Ergebnisse der Auswertung wurden in Prozent angegeben. Der Kontrolle wurde der Wert 1 bzw. 100% zugewiesen. Dieses Vorgehen bot einen entscheidenden Vorteil in der Vergleichbarkeit der Daten gegenüber anders angelegten Studien, denen die gesunde Kontrollseite fehlte.

Zhang et al. [2003] untersuchten den Einfluss von VEGF auf die Heilung der Achillessehne an der Ratte. Dabei wurden 50 Versuchstiere in zwei Gruppen aufgeteilt [ebd.]. Die linke Achillessehne wurde durchtrennt und genäht, die M. plantaris Sehne blieb intakt [ebd.]. Auf der rechten Seite hingegen wurde nach

Durchtrennung und Naht der Achillessehne auch die Sehne des M. plantaris reseziert [ebd.]. In beiden Fällen wurde eine modifizierte Kessler-Naht durchgeführt. Gruppenabhängig wurde VEGF oder eine Pufferlösung injiziert [**Zhang et al.**, 2003]. Zwar konnte hier ein möglicher Effekt von VEGF evaluiert werden, aufgrund der fehlenden Kontrollseite war aber kein Urteil darüber möglich, ob die ursprüngliche Belastbarkeit der Sehne wieder erreicht wurde. Diese Vergleichbarkeit ist eine Stärke der Untersuchung der vorliegenden Arbeit.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung war die fragliche Übertragbarkeit des Tiermodells auf den menschlichen Körper vielleicht sogar einer der wichtigsten Punkte. Die Unterschiede in der Anatomie wurden bereits in Kapitel 2.1.2 beleuchtet. Einen der wesentlichen Unterschiede beschrieb **Barfred** [1973] mit dem bei der Ratte im Vergleich zum Menschen sehr stark ausgeprägten M. plantaris und dessen Sehne. **Aspenberg und Virchenko** [2004] beschrieben ebenfalls eine bei der Ratte stark ausgeprägte Plantarissehne, die möglicherweise während der Heilung wie eine interne Schienung wirkte. Um einen derartigen Einfluss auszuschließen, wurde die Sehne in vielen Studien im Rahmen des ersten operativen Eingriffes durchtrennt [**Murrell et al.**, 1994, **Aspenberg und Forslund**, 1999, **Forslund et al.**, 2003, **Zhang et al.**, 2003, **Aspenberg und Virchenko**, 2004, **Rickert et al.**, 2005, **Pietschmann et al.**, 2013]. Die eigene Untersuchung der vorliegenden Arbeit ergab jedoch keine Notwendigkeit einer Schienung zur Erzielung guter Heilungsergebnisse im Langzeitversuch. Alle Sehnen waren nach 84 Tagen ohnehin makroskopisch durchgängig, verheilt und funktionell voll belastbar.

Im Vorfeld des Versuches war es das Ziel, mögliche Ansatzpunkte für eine Einflussnahme durch den Versuchsleiter als Schwachpunkte der Methode zu identifizieren und Lösungen zu finden.

Im Versuchsablauf zeigte sich eine erste Fehlerquelle bereits bei der Vorbereitung der Präparate. Bedingt durch die natürliche anatomische Variation fiel der Sehnen Spiegel der Sehnen unterschiedlich groß aus. Auch die Präparation (siehe Kapitel 4.3.3) hatte einen Einfluss auf die Größe des zurückbleibenden Sehnen spiegels, dessen Fläche letztlich entscheidend für eine erfolgreiche Fixierung des Präparates in der Kryoklemme war. In Konsequenz wurde hier auf eine besonders

sorgfältige Präparation geachtet, auf anatomische Varianten konnte jedoch kein Einfluss genommen werden.

Ein weiterer Punkt im Versuchsablauf, der anfällig für Abweichungen sein konnte, war die Menge des in die Kryoklemme eingefüllten Stickstoffes. Der Grad der Einflussnahme dürfte hier gering sein, da zum einen eine Dosierhilfe zum Einfüllen verwendet wurde und zum anderen die Gewichtskraft des Stickstoffes durch dessen Verdampfen keinen Einfluss auf den Zugversuch hatte. Andernfalls wären jedoch durch unterschiedliche Mengen geringe Temperaturunterschiede und somit andere Härtegrade der zu untersuchenden Sehnen möglich gewesen. Eine Temperaturmessung unmittelbar vor Beginn des Zugversuches war jedoch nicht umsetzbar, da es hier zu einer zusätzlichen Zeitverzögerung gekommen wäre.

Das Ablesen der Werte aus dem Kraft-Weg-Diagramm (beschrieben in Kapitel 4.4.2) stellte eine weitere mögliche Fehlerquelle dar. Die Ablesepunkte für die Berechnung der Steigung und damit der Steifigkeit der Sehne nach Formel 1 wurden im Bereich des linearen Anstiegs der Kurve im Kraft-Weg-Diagramm von Hand ausgewählt (siehe Abbildung 13). Die Vergleichbarkeit der Werte war hier nur durch eine gewissenhafte Arbeit des Versuchsleiters gewährleistet. Bei der Auswahl der Punkte wurde immer nach dem gleichen Schema vorgegangen. In einigen Kraft-Weg-Diagrammen zeigte sich jedoch zu Beginn des Versuches (bei einer Kraft von etwa 10 N) ein kleines Plateau in der Kurve. An diesem Punkt kam es vermutlich zu einer Nachjustierung des Calcaneus in der Schlitzplatte. Dem konnte nur durch ein noch sorgfältigeres Einspannen durch den Versuchsleiter entgegengewirkt werden. Auf die Auswertung der Messung hatte die Plateaubildung jedoch keinen Einfluss, da die Strecke für die Berechnung der Steigung stets außerhalb dieses Bereiches gewählt wurde. Neben der beschriebenen Plateaubildung war festzustellen, dass die Sehnen in einigen Fällen im Bereich der distalen Fixierung in der Schlitzplatte rissen.

Eine weitere Herausforderung und gleichzeitige Limitation bei der Untersuchung der Achillessehnen war die adäquate Fixierung der Präparate im Prüfstand. Zudem war der Ort der Ruptur der Sehne von entscheidender Bedeutung für die Aussagekraft der Messwerte. Das Problem einer durch die Art der Fixierung generierten Sollbruchstelle beschrieb bereits **Thermann** [1996]. Ein „Einspannen

des Kalkaneus [!] mittels Klemmbacke führte zu einem Zusammenpressen des spongiösen Knochen[s], wodurch eine Sollbruchstelle entsteht, die in ca. 30% der gesunden Kaninchensehnen einen knöchernen Ausriss auslöste“ [Thermann, 1996].

Im Zugversuch der vorliegenden Arbeit kam die in Kapitel 4.3.3 beschriebene Schlitzplatte zur Anwendung. Diese war bereits aus der vorhergehenden Untersuchung von **Kraus et al.** [2014] vorhanden. Die Kanten waren stumpf geschliffen, um keine Sollbruchstelle zu schaffen. Durch die applizierte Vorspannung erfolgte keine ruckartige Belastung der Sehne im Bereich des Schlitzes. Eine Ruptur aufgrund einer Prädilektionsstelle im Bereich der distalen Fixierung konnte auf diese Weise zuverlässig vermieden werden. Im Idealfall erfolgte die Ruptur der Achillessehne im Zugversuch weder in Form eines knöchernen Ausrisses aus dem Calcaneus noch im Bereich des muskulotendinösen Übergangs, sondern intratendineal im mittleren Abschnitt der Sehne. Dennoch stellt die distale Fixierung der Sehne einen Ansatzpunkt für eine Verbesserung der Fixierung der Präparate bei zukünftigen Versuchen dar. Denkbar wäre beispielsweise eine knöcherne Fixierung des Calcaneus mittels Schrauben oder Kirschner-Drähten oder eine Einbettung des präparierten Knochens in Kunststoff (zum Beispiel Epoxidharz) [Thermann, 1996].

Eine kritische Betrachtung der Messwerte erfolgte nicht nur während der Durchführung des Versuches, sondern auch nach der Erstellung der deskriptiven Statistik (siehe Kapitel 4.4; deskriptive Statistik im Anhang 1 und Anhang 2). Die abgelesenen und berechneten Werte wurden auf mögliche Fehlmessungen überprüft. Dabei ausgemachte Wertepaare wurden wiederum ein zweites Mal analysiert. Die entsprechenden Kraft-Weg-Diagramme der Software *testXpert*[®] (siehe Kapitel 4.3.4) wurden erneut aufgerufen und Wertepaare durch eine zweite Ablesung kontrolliert, um Fehler auszuschließen. Für keinen der stark abweichenden Messwerte konnten dabei Ablese- oder Übertragungsfehler gefunden werden. Die Abweichung von Einzelwerten war daher mit anatomischen Variationen zu begründen. Einflüsse durch fehlerhaftes Ablesen konnten ausgeschlossen werden.

6.2 Interpretation der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur

Alle Ergebnisse des biomechanischen Zugversuches sind in Kapitel 5 dargestellt und in Kapitel 5.4 zusammengefasst. In diesem Kapitel werden die wichtigsten Ergebnisse hervorgehoben und im Kontext der Fragestellung der vorliegenden Arbeit interpretiert. Anschließend erfolgt eine Einordnung der Ergebnisse im Rahmen der bekannten Literatur.

6.2.1 Heilung der Sehnen im Langzeitversuch

Alle Sehnenpräparate des Langzeitversuches waren nach dem Heilungszeitraum von 84 Tagen makroskopisch gut verheilt und kontinuierlich ausgebildet. Auffallend war, dass die Sehnen der linken (operierten) Seite durchweg länger waren als die der unbehandelten Gegenseite. Bei einer biomechanischen Untersuchung an Kreuzbändern von Kaninchen haben **Hefti und Stoll** [1995] Ähnliches beschrieben: „Die Untersucher beobachteten anhand von Markierfäden auch eine deutliche Verlängerung der Sehnen, insbesondere der konservativ behandelten“ [**Hefti und Stoll**, 1995]. Um einen Einfluss auf die Messung auszuschließen, wurde im Versuch der vorliegenden Arbeit die veränderte Ausgangslänge vor Versuchsbeginn in die Einstellungen der Prüfmaschine übernommen.

Eine interessante Beobachtung wurde im Bereich der im ersten Eingriff gesetzten Sehndefekte gemacht. Nach 84 Tagen wurden in nahezu allen Sehnenregeneraten Verhärtungen beobachtet (siehe Kapitel 6.2.5).

Die biomechanische Untersuchung ergab für die Variable *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* in der PBS-Gruppe $112,3\% \pm 20,6\%$, in der eGFP-MSC-Gruppe $103,1\% \pm 18,5\%$ und in der bFGF-MSC-Gruppe $96,8\% \pm 28,6\%$. Alle behandelten Sehnen erreichen folglich eine ähnliche maximale Belastbarkeit wie die Sehnen der gesunden Gegenseite.

Für die Variable *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* wurden in der PBS-Gruppe $87,1\% \pm 54,2\%$, in der eGFP-MSC-Gruppe $64,8\% \pm 17,1\%$ und in der bFGF-MSC-Gruppe $69,4\% \pm 51,7\%$ erreicht. Es wurde deutlich, dass die Steifigkeit der Sehnen der operierten Seite in keiner der drei Versuchsgruppen die Steifigkeit der Gegenseite erreichte. Die Differenz war in der bFGF-MSC-Gruppe

($p=0,014$) und der eGFP-MS-C-Gruppe ($p=0,001$) statistisch signifikant sowie in der PBS-Gruppe deutlich, aber nicht signifikant ($p=0,070$).

Zusammenfassend konnte bei der Steifigkeit eine Tendenz zur Annäherung an die unbehandelte Gegenseite beobachtet werden. Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, dass die Sehnen nach 84 Tagen zwar funktionell verheilt waren (mechanische Belastbarkeit auf dem Niveau der gesunden Gegenseite), die Sehnenheilung nach 84 Tagen aber noch nicht vollständig abgeschlossen war (Steifigkeit nicht auf dem Niveau der Gegenseite). Im Idealfall erreicht die Sehne nach der Heilung die Steifigkeit der Gegenseite. Ein niedrigerer Wert würde für eine größere Elastizität sprechen und zu einem erhöhten Arbeitsaufwand der Muskulatur führen. Eine zu hohe Steifigkeit wäre ebenso wenig erwünscht, die Sehne wäre dann spröde und das Vermögen, Energie aufzunehmen, wäre verringert.

6.2.2 Unterschiede zwischen den Gruppen nach 84 Tagen

Im Vergleich der Versuchsgruppen (siehe Kapitel 5.3.2) war im Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit festzustellen, dass es sowohl für die *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* als auch für die *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* im Langzeitversuch über 84 Tage keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gab. Die bFGF-MS-C-Gruppe erreichte für die *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* relativ gesehen zwar nicht die Werte der PBS-Gruppe, absolut aber mit $96,8\% \pm 28,6\%$ im Mittel den Ausgangswert im Vergleich zur gesunden Gegenseite. Gerade wegen der nicht erreichten statistischen Signifikanz kann man für die *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* von sehr guten Ergebnissen der Sehnenheilung nach 84 Tagen sprechen, da alle Gruppen die Gegenseite erreichten oder diese übertrafen (PBS-Gruppe).

6.2.3 Einfluss der Behandlung mit Stammzellen und bFGF

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von MSC auf die Sehnenheilung zu untersuchen. Stammzellen beeinflussen die Sehnenheilung auf verschiedene Art: Ersatz von geschädigten Zellen durch direkte Differenzierung, parakrine Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und Modulation der Immunreaktion [Schmitt et al., 2012]. Zudem beeinflussen Stammzellen die Organisation

der Kollagenmatrix sowie die Wiederherstellung der physiologischen Struktur und Funktion des Kollagens [**Ouyang et al.**, 2003].

In der biomechanischen Untersuchung der vorliegenden Arbeit konnten nach einer Heilungsdauer von 84 Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Stammzellgruppe (eGFP-MSC), der bFGF-MSC-Gruppe und der Kontrollgruppe (PBS) gefunden werden. Diese Ergebnisse bestätigten und ergänzten die Resultate von **Kraus et al.** [2014], die nach 14 und 28 Tagen keinen signifikanten Effekt von Stammzellen und bFGF auf die biomechanischen Eigenschaften der Achillessehnen zeigen konnten. Im Kontrast dazu zeigten **Chong et al.** [2007] in einer Studie eine signifikante Verbesserung histologischer und biomechanischer Eigenschaften als Effekt von Stammzellen in den frühen Stadien der Achillessehnenheilung am Kaninchenmodell. Der genaue Wirkmechanismus war jedoch nicht bekannt [ebd.]. **Okamoto et al.** [2010] fanden in ihrer Studie ebenfalls einen positiven Einfluss von MSC auf die Achillessehnenheilung. Die Stammzelltherapie war der Kontrollgruppe nach 7 und 14 Tagen im Hinblick auf die maximale Kraft in der biomechanischen Testung überlegen [ebd.]. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit kam in der Untersuchung von **Okamoto et al.** [2010] jedoch eine postoperative Immobilisierung zum Einsatz, was eine potentielle Erklärung für die Unterschiede in den Ergebnissen darstellte.

Nicht nur der Einfluss von Stammzellen, sondern auch der von Wachstumsfaktoren auf die Sehnenheilung sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Viele bisherige Studien konzentrierten sich auf fünf wichtige Wachstumsfaktoren: IGF-1, TGF- β , VEGF, PDGF und bFGF. Diese fünf werden in Folge einer Sehnenverletzung alle vermehrt produziert sowie sezerniert und beeinflussen verschiedene Stadien des Heilungsprozesses [**Molloy et al.**, 2003]. Gegenstand der Untersuchung in der vorliegenden Arbeit war der Einfluss des Wachstumsfaktors bFGF.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte biomechanische Untersuchung konnte nach 84 Tagen weder für die *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* noch für die *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* signifikant bessere Resultate der bFGF-MSC-Gruppe im Vergleich mit der Stammzellgruppe (eGFP-MSC) und der Kontrollgruppe (PBS) zeigen. Ein positiver Einfluss von

bFGF konnte somit nicht belegt werden. Bei der statistischen Auswertung fiel bei den Mittelwerten der bFGF-Gruppe eine hohe SD auf. Statistisch zeigten sich zumindest keine negativen Auswirkungen der Stammzellen bzw. des bFGF. Dies bestätigte die Daten von **Kraus et al.** [2014], die nach 14 und 28 Tagen keine wesentlichen Effekte der Expression von bFGF in Stammzellen auf die Sehnenheilung zeigen konnten. Auch **Chan et al.** [2000] stellten in ihrer Untersuchung keinen signifikanten Effekt von bFGF auf die maximale Kraft in der biomechanischen Testung fest. Es wurde jedoch nach sieben Tagen eine dosisabhängige Zunahme der Zellproliferation und der Kollagen Typ III Expression beobachtet [ebd.]. Dosisabhängige Effekte wurden auch von **Fukui et al.** [1998] in einer *in vivo* Studie zum Einfluss von bFGF auf die Sehnenheilung beobachtet. Höhere Dosierungen von bFGF hatten jedoch negative Effekte zur Folge [ebd.]. Vor allem niedrige Dosen von bFGF schienen sich positiv auf die Sehnenheilung auszuwirken [ebd.]. Die dosisabhängige Wirkung von bFGF wurde auch von **Hankemeier et al.** [2005] festgestellt: höhere Dosen des Wachstumsfaktors resultierten in einer schlechteren Heilung des Gewebes und schienen damit sogar kontraproduktiv zu sein.

6.2.4 Vergleich mit der vorhergegangenen Untersuchung

Hervorzuheben war nach dem Vergleich mit den Ergebnissen von **Kraus et al.** [2014] nach einer Heilungsdauer von 14 bzw. 28 Tagen, dass alle Sehnen nach 84 Tagen makroskopisch durchgängig und funktionell belastbar waren und im Zugversuch eine vergleichbare Belastbarkeit wie die unbehandelte Gegenseite aufwiesen (*maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite*). In der Auswertung der Behandlungsdauer innerhalb der Gruppen zeigte sich in der PBS-Gruppe nach 84 Tagen eine signifikant höhere *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* (14 vs. 84 Tage: $p=0,000$) und *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* (14 vs. 84 Tage: $p=0,025$). In der eGFP-MS-Gruppe zeigte sich nach 84 Tagen eine signifikant höhere *maximale Kraft im Vergleich zur Gegenseite* (14 vs. 84 Tage: $p=0,004$; 28 vs. 84 Tage: $p=0,016$) und *Steifigkeit im Vergleich zur Gegenseite* (14 vs. 84 Tage: $p=0,000$; 28 vs. 84 Tage: $p=0,001$). Eine (nicht signifikante) Tendenz zu einer höheren *maximalen Kraft im Vergleich zur Gegenseite* und *Steifigkeit im*

Vergleich zur Gegenseite wurde nach 84 Tagen in der bFGF-MS-C-Gruppe beobachtet.

6.2.5 Ossifikationen

Im Bereich der im ersten Eingriff gesetzten Sehnendefekte wurden nach 84 Tagen Verhärtungen beobachtet. Vermutlich handelte es sich dabei um eine veränderte Differenzierung von Stammzellen unter Bildung von Knorpel oder Knochen [**Kraus et al.**, 2016]. Histologisch zeigte sich in nahezu allen Präparaten eine chondrale Ossifikation [**Kraus et al.**, 2016]. Ähnliches stellten **Pietschmann et al.** [2013] in einer Untersuchung des Einflusses von MSC auf die Achillessehnenheilung in einem Defektmodell an der Ratte fest. Nach einer Heilungsdauer von 16 Wochen wurden bei allen Sehnenregeneraten ektope Ossifikationen beobachtet. [**Pietschmann et al.**, 2013]. **Rickert et al.** [2005] konnten in einer Studie über die Achillessehnenheilung unter dem Einfluss von GDF-5 am Rattenmodell nach der vierten Heilungswoche im Bereich der Narbe Knorpelherde und Ossifikationen nachweisen. In der Untersuchung der Achillessehnenheilung nach 14 und 28 Tagen von **Kraus et al.** [2014] wurden hingegen keine Ossifikationen beschrieben.

In seiner Arbeit über den „Einfluss mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe“ stellte **Pauwels** [1960] fest: „Es steht außer Zweifel, dass das Blastem der Stützgewebe in Bezug auf die verschiedenen Stützgewebsarten pluripotent ist, d.h. sowohl zu Knorpelgewebe als auch zu Bindegewebe und Knorpelgewebe ausreifen kann.“ Nach der Theorie von Pauwels zur Gewebedifferenzierung wurde die „Gestaltsverzerrung (Dehnung) [...] als spezifischer Reiz für die Bildung kollagener Fibrillen, die allseitige Kompression ohne Gestaltsänderung (hydrostatischer Druck) als spezifischer Bildungsreiz für Knorpelgewebe angesehen“ [**Pauwels**, 1960].

In ihrer Arbeit über die Pathogenese der kalzifizierenden Tendinitis stellten **Uthoff et al.** [1976] fest, dass Teile der gesunden Sehne unter Sauerstoffmangel in Bindegewebsknorpel umgewandelt wurden. Durch Knorpelzellen vermittelt erfolgte eine multiple Einlagerung von Kalziumdepots [ebd.]. Die einsetzende Phagozytose und Gefäßneubildung führte schließlich über einen Anstieg der Sauerstoffverfügbarkeit zur Resorption und einer Reformation der Sehne [ebd.].

Möglicherweise sind die als Verhärtung beobachteten Prozesse in der vorliegenden Untersuchung also auch nur als Zwischenschritte im Heilungsprozess der Sehne zu werten.

Zhang et al. [2013] zeigten in einer Untersuchung am Rattenmodell den Einfluss von Celecoxib auf heterotope Ossifikationen nach Tenotomie der Achillessehne. In der Celecoxib-Interventionsgruppe kam es 10 Wochen postoperativ zu einer signifikanten Reduktion des Vorkommens heterotoper Ossifikationen [**Zhang et al.**, 2013].

6.3 Limitationen

Neben der generellen Problematik von *in vivo* Untersuchungen ergaben sich nach der kritischen Betrachtung der Methodik und einer Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weitere Limitationen. Derartige Beobachtungen sollen in diesem Kapitel ausgewertet und diskutiert werden, da sie sogleich Ansatzpunkte für künftige Verbesserungen darstellen.

Kritisch zu sehen war sicher die Aussagekraft der Ergebnisse aufgrund der kleinen Gruppengröße. Die geringe Anzahl von 10 Tieren je Versuchsgruppe machte ein sorgfältiges Arbeiten unabdingbar. Kleinste Abweichungen konnten leicht zu einer Verfälschung der Mittelwerte, großen SD und somit zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen. Alle Messwerte wurden daher, wie in Kapitel 6.1 beschrieben, mehrfach kontrolliert und bei Verdacht nochmals aus dem Kraft-Weg-Diagramm abgelesen. Einflüsse durch fehlerhaftes Ablesen konnten so ausgeschlossen werden. Abweichungen der Werte waren daher mit anatomischen Variationen oder individuell verschiedenen Heilungsverläufen zu begründen.

Beim Vergleich mit ähnlich angelegten biomechanischen Zugversuchen in der Literatur zeigten sich weitere Schwierigkeiten. **Thermann** [1996] stellte bereits fest, dass ein „Kritikpunkt in der Versuchsanordnung“ die „Technik der Tenotomie“ war. Die oft durchgeführte „einfache quere Tenotomie der Sehne“ sei „in keiner Weise vergleichbar mit der ausgefranzten Ruptur beim Menschen“ [Thermann, 1996]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Durchtrennung der Sehne mit einem 2,4 mm breiten Arthroskopie-Punch. Der so entstandene Defektrand war ähnlich scharf wie nach der Durchtrennung mit einem scharfen Messer, nachteilig konnte sich aber das fehlende Sehnenstück auswirken. Trotz fehlender Adaptation der Sehnenstümpfe verheilten aber alle Sehnen gut und waren funktionell belastbar. Der Unterschied zur typischen Ruptur bleibt jedoch sowohl bei einer einfachen queren Tenotomie als auch bei der Verwendung des Arthroskopie-Instrumentes bestehen.

Das Rattenmodell an sich und dessen Übertragbarkeit auf den humanen Organismus stellt eine weitere Limitation der vorliegenden Arbeit dar. Die Achillessehnenruptur beim Menschen unterscheidet sich deutlich von der Achillessehnen-

ruptur am Rattenmodell. Nicht zuletzt das höhere Selbstheilungspotential der Ratten war für die schnellere Regeneration verantwortlich [**Derwin et al.**, 2010].

Die Versuchsbedingungen ähnlich angelegter Versuche waren teils stark verschieden. So variierte die Dauer der Immobilisierung nach der Durchtrennung der Sehne zwischen 0 und 10 Wochen [**Thermann**, 1996]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte für die gesamte Dauer der Heilung über 84 Tage keine Immobilisierung. Ein Teilbelastungsschema kam nicht zur Anwendung.

Ein weiterer Schwachpunkt der vorliegenden Arbeit war die fehlende Einberechnung des Sehnenquerschnittes. Möglicherweise könnten mittels dieser Größe Abweichungen in der Steifigkeit der Sehnen erklärt werden. Außerdem ließen sich weitere biomechanische Größen wie zum Beispiel das Elastizitätsmodul berechnen. Dies würde mehr über die eigentliche Qualität des Sehnenregenerates aussagen. Die Umsetzung einer solchen Messung ist allerdings schwierig. **Thermann** [1996] beschrieb als Methode zur Ermittlung des Querschnitts die Verwendung eines Fadens. Mit dem auf diese Weise ermittelten Umfang konnte der Sehnenquerschnitt mathematisch berechnet werden [ebd.]. **Rickert et al.** [1998] haben Dicke und Breite der Supraspinatussehnen mittels Mikrometerschraube und Schiebelehre zur anschließenden Berechnung des Querschnittes gemessen. In der Untersuchung von **Forslund et al.** [2003] kam zur Ermittlung des Querschnittes ein digitaler Messschieber zum Einsatz. Schwachstelle aller vorgestellten Methoden und damit Ansatzpunkt für eine Einflussnahme durch den Versuchsleiter wäre eine mögliche Kompression der Sehne. Ein Messschieber war zum einen wegen der möglichen Kompression und zum anderen aufgrund hoher Ablesefehler (die Sehnendicke bewegt sich im Bereich zwischen 2 und 5 mm) keine ernstzunehmende Option. Neue Ansätze wie die Bestimmung des Querschnitts mittels Magnetresonanztomographie (MRT) bedeuten einen wesentlich höheren Aufwand bei der Durchführung der Versuche.

Kritisch betrachtet werden musste zudem die Applikationsart der Wachstumsfaktoren. Die Wirkung von bFGF ist dosisabhängig [**Fukui et al.**, 1998]. Zur Injektion der Wachstumsfaktoren an den Ort des Sehnendefektes nutzten **Chan et al.** [2000] eine einfache feine Injektionsnadel. Vorteil dieser Technik war die zuvor bekannte Konzentration der Wachstumsfaktoren, nachteilig hingegen konnte die

Tatsache der Einmalinjektion sein [ebd.]. Wachstumsfaktoren haben eine kurze biologische Halbwertszeit [Wang et al., 2005]. Besser als eine Einmalinjektion wäre daher und aufgrund der dosisabhängigen Wirkung eine kontinuierliche Freisetzung der Wachstumsfaktoren. Rickert et al. [2005] sahen eine mögliche Lösung dieses Problems in der Gentherapie. Durch die genetische Modifikation von körpereigenen Zellen mittels Gentransfer wäre es unter Umständen möglich, eine kontinuierliche Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu erreichen [ebd.]. Vorteil der Gentherapie wäre die lokale Produktion von Wachstumsfaktoren am Ort des Bedarfs, ohne Einfluss auf systemischer Ebene des Organismus zu nehmen [ebd.]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe der MSC, die lentiviral bFGF überexpressieren, versucht. Kritisch bei diesem Ansatz war jedoch, dass die Dosis der Expression weder bekannt noch steuerbar war. Eine kontinuierliche Gabe einer definierten Dosis von Wachstumsfaktoren zur Unterstützung der Sehnenheilung sei jedoch kaum in die Praxis umzusetzen [Wang et al., 2005].

Ob die Wachstumsfaktoren am Ort des Defektes verblieben, hing wesentlich von der Technik der Applikation ab. Wurden die Wachstumsfaktoren wie in der Untersuchung von Chan et al. [2000] mittels Einmalinjektion appliziert, so verschwanden diese mit hoher Wahrscheinlichkeit relativ schnell wieder vom Ort des Defektes. Zur Untersuchung späterer Stadien der Sehnenheilung sollten also Techniken zum Einsatz kommen, die Wachstumsfaktoren für längere Zeit am Ort der Wundheilung zur Verfügung stellen [Chan et al., 2000]. Diskutiert wurde dafür der Einsatz von Stammzellen, die in eine Matrix oder Kollagen-Gel eingebettet sind [Ouyang et al., 2003, Schmitt et al., 2012]. Mittels dieser Technik könnten auch große Sehnendefekte überbrückt werden [ebd.]. Die eingebetteten Stammzellen als Ort der Freisetzung von Wachstumsfaktoren blieben somit an Ort und Stelle [ebd.]. Ein interessanter und vielversprechender Ansatz war die Einbringung der MSC direkt in das Nahtmaterial [Adams et al., 2014]. In einer Untersuchung der Achillessehnenheilung am Rattenmodell wurden signifikant bessere Ergebnisse für die maximale Belastbarkeit ($p \leq 0,001$) und in der Histologie ($p \leq 0,001$) beobachtet [ebd.].

Limitierend für eine klinische Anwendung der Gentherapie als Methode für eine lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren am Ort des Bedarfs ist letztlich auch das erhöhte onkogene Risiko [Schambach et al., 2007]. Eine Insertionsmuta-

genese, ausgelöst durch die lentivirale Transduktion, könnte durch die Aktivierung von Protoonkogenen eine maligne Entartung begünstigen [ebd.]. Methoden zur Selbstlimitierung der lentiviral transduzierten Vektoren sind Gegenstand der aktuellen Forschung [**Wübbenhorst et al.**, 2010].

6.4 Schlussfolgerungen und klinische Relevanz

Die Translationale Medizin versteht sich als Schnittstelle zwischen präklinischer Forschung und der klinischen Anwendung am Menschen. Ziel ist es letztlich, die gewonnenen Erkenntnisse der *in vitro* und *in vivo* Studien in die klinische Medizin zu übertragen und zur Beantwortung klinischer Fragestellungen zu nutzen. Modellhafte Versuchsaufbauten von *in vitro* und *in vivo* Studien sind jedoch meist nur eingeschränkt übertragbar, da die Vielfalt der Einflussfaktoren bei erkrankten Patienten nicht im Modell abgebildet werden kann und somit auch relevante Interaktionen unberücksichtigt bleiben.

In der vorliegenden Arbeit wurden in der biomechanischen Analyse der Achillessehnenheilung im Langzeitversuch nach 84 Tagen gute Ergebnisse erzielt (siehe Kapitel 6.2). Zwischen den Gruppen (PBS Kontrollgruppe, eGFP-MSC und bFGF-MSC) gab es jedoch weder bei der erzielten maximalen Kraft noch bei der Steifigkeit der Sehnen signifikante Unterschiede. In der dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchung stellten **Kraus et al.** [2014] bereits fest, dass Stammzellen eher in den frühen Phasen der Sehnenheilung eine Rolle spielten. Nach 28 Tagen wurden hingegen sogar negative Einflüsse diskutiert [ebd.]. Die Langzeitbeobachtung der Sehnenheilung in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass Sehnenverletzungen ausreichend Zeit benötigten, um funktionell wieder gut zu verheilen. Die Behandlungsmodalität spielte in der vorliegenden Untersuchung dabei keine Rolle.

Bisherige Ansätze mit Stammzellen und Wachstumsfaktoren scheinen in der Langzeitbeobachtung der Sehnenheilung noch keinen Vorteil zu bringen. Denkbar ist auch, dass die Prozesse der Regulation von Wachstumsfaktoren und mögliche Einflüsse von Stammzellen so komplex und noch nicht ausreichend untersucht sind, sodass mit dem heutigen Wissensstand noch kein Vorteil in der Sehnenheilung erzielt werden konnte. Andere Untersuchungen zeigten jedoch bereits positive Einflüsse von Wachstumsfaktoren und Stammzellen auf die Sehnenheilung. Es handelte sich dabei allerdings um begrenzt verallgemeinerbare *in vivo* Modelle, bei denen viele weitere Einflussfaktoren außen vor blieben. Dass „Wachstumsfaktoren gezielt und zum richtigen Zeitpunkt eingesetzt werden sollten“, ist bereits bekannt [**Hügler et al.**, 2012]. Fraglich bleibt, ob sich ein Ansatz für die Therapie mit Stammzellen und Wachstumsfaktoren problemlos in die Klinik

übertragen lässt. Bisher gibt es keine klinischen Daten für die Anwendung von Stammzellen bei der Therapie von Sehnenverletzungen [**Schmitt et al.**, 2012]. Es gibt jedoch bereits Evidenz dafür, dass Stammzellen nicht immunogen wirken und eine Transplantation zum Zwecke der Sehnenheilung theoretisch möglich wäre [**Ouyang et al.**, 2003]. Eine „Zelltherapie [...] beim Menschen [ist jedoch] bezüglich Wirksamkeit und Sicherheit noch nicht eingehend untersucht worden“ [**Hügler et al.**, 2012]. Der hohe Aufwand, die nicht sichere Wirksamkeit und nicht zuletzt die exorbitant hohen Kosten haben zur Folge, dass die Zelltherapie in absehbarer Zeit „einzelnen Zentren vorbehalten“ bleiben wird [ebd.]. **Molloy et al.** [2003] sahen den zukünftig vielversprechendsten Ansatz in einer Anwendung mehrerer Wachstumsfaktoren im Rahmen eines Behandlungsprogrammes über den Verlauf der Sehnenheilung. Ein *Schlüsselmolekül* könnte zu Beginn jeder Phase der Sehnenheilung appliziert werden, um den Heilungsprozess zu verkürzen und gleichzeitig die Qualität des Ergebnisses zu steigern [ebd.].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Therapie der Achillessehnenruptur mit Stammzellen und Wachstumsfaktoren eine interessante Perspektive darstellt. Bevor über einen klinischen Einsatz nachgedacht werden kann, muss zuerst die Pathophysiologie der Sehnenheilung – vor allem in Bezug auf Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie deren Regulation – transparenter und nachvollziehbarer werden. Inwieweit sich dann in der klinischen Anwendung Vorteile in der Behandlung ergeben können, muss anschließend durch klinische Studien gezeigt werden.

7 Zusammenfassung

Die Inzidenz der Achillessehnenruptur ist in den letzten Jahren aufgrund zunehmender sportlicher Aktivitäten bis ins hohe Alter ansteigend. Neben den bekannten konservativen und operativen Therapieverfahren gelangen zunehmend neue Ansätze mit Stammzellen und Wachstumsfaktoren in den Fokus der Forschung. Vergangene Studien zeigten bereits positive Einflüsse von bFGF auf die Sehnenheilung, beschränkten sich jedoch auf die Beobachtung der frühen Stadien der Sehnenheilung. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Stammzellen und bFGF auf die Sehnenheilung in einem Langzeitversuch über 84 Tage am Rattenmodell untersucht.

Für die biomechanische Untersuchung wurden 30 männliche Lewis-Ratten auf drei Gruppen aufgeteilt: die PBS-Gruppe (Kontrollgruppe), die eGFP-MSC-Gruppe und die bFGF-MSC-Gruppe. In der linken Achillessehne wurde ein 2,4 mm großer Defekt gesetzt. In die Sehnenstümpfe wurde in zufälliger Verteilung PBS, eGFP-MSC oder bFGF-MSC injiziert. Die rechte Sehne verblieb zur Kontrolle unbehandelt. Nach einem Heilungszeitraum von 84 Tagen wurden die Sehnenpräparate für die biomechanische Untersuchung gewonnen.

Alle Sehnenpräparate waren nach 84 Tagen makroskopisch verheilt und funktionell belastbar. Vereinzelt wurden im Bereich der Sehnennarbe Verhärtungen beobachtet. Alle behandelten Sehnen erreichten unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit eine maximale Kraft auf dem Niveau der unbehandelten Gegenseite. Die Steifigkeit war im Vergleich zur Gegenseite in der PBS-Gruppe deutlich geringer sowie in der bFGF-MSC-Gruppe ($p=0,014$) und der eGFP-MSC-Gruppe ($p=0,001$) statistisch signifikant geringer. Zwischen den Gruppen (PBS Kontrollgruppe, eGFP-MSC und bFGF-MSC) konnten weder bei der erzielten maximalen Kraft noch bei der Steifigkeit der Sehnen signifikante Unterschiede festgestellt werden. Im Vergleich mit der vorangegangenen Untersuchung von **Kraus et al.** [2014] war die maximale Kraft in der PBS-Gruppe (14 vs. 84 Tage: $p=0,000$) und in der eGFP-MSC-Gruppe (14 vs. 84 Tage: $p=0,004$; 28 vs. 84 Tage: $p=0,016$) signifikant höher. Eine ähnliche Tendenz in der bFGF-MSC-Gruppe war statistisch nicht signifikant.

In der biomechanischen Analyse der Achillessehnenheilung im Langzeitversuch nach 84 Tagen konnte statistisch kein Einfluss von Stammzellen und bFGF gezeigt werden.

Die Therapie der Achillessehnenruptur mit Stammzellen und Wachstumsfaktoren ist eine interessante Perspektive. Stammzellen scheinen eher in den frühen Phasen der Sehnenheilung eine Rolle zu spielen. Die Langzeitbeobachtung zeigte, dass Sehnenverletzungen vor allem ausreichend Zeit benötigen, um funktionell wieder gut zu verheilen. Die Behandlungsmodalität spielte in der vorliegenden Untersuchung dabei keine Rolle. Die bisherigen Forschungsergebnisse sind nicht ausreichend, um eine klinische Anwendung empfehlen zu können. Bevor über den klinischen Einsatz nachgedacht werden kann, muss zuerst die Pathophysiologie der Sehnenheilung besser verstanden werden. Inwieweit sich dann in der klinischen Anwendung Vorteile in der Behandlung ergeben können, muss anschließend durch klinische Studien gezeigt werden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur und Aufbau einer Sehne [eigene Darstellung nach Fenwick et al. [2002] und James et al. [2008]]	5
Abbildung 2:	Schema eines Kraft-Weg-Diagramms [eigene Darstellung nach James et al. [2008]]	9
Abbildung 3:	„Teufelskreis‘ [...] der Entstehung von Überlastungsschäden“ [modifizierte Darstellung nach Petersen [2007]]	13
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Vorbereitungen zur Gewinnung der Sehnenpräparate [eigene Darstellung]	35
Abbildung 5:	Zugprüfmaschine Z 1120 (Firma Zwick, Ulm) und Einspannvorrichtung [eigene Abbildung]	37
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Messplatzes zur Durchführung des Biomechanischen Versuchs [eigene Darstellung]	38
Abbildung 7:	Einspanntechnik: distale Fixierung mittels Schlitzplatte [eigene Abbildung]	39
Abbildung 8:	Einspanntechnik: proximale Fixierung mittels Kryoklemme [eigene Abbildung]	41
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Einspannvorrichtung [eigene Darstellung]	42
Abbildung 10:	Standardisierte Bilddokumentation vor und nach dem Zugversuch [eigene Abbildung]	43
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs [eigene Darstellung]	44
Abbildung 12:	Beispiel für ein Kraft-Weg-Diagramm [Grafik erstellt durch die Software <i>testXpert</i> [®]]	46
Abbildung 13:	Ablezen der Punkte am Kraft-Weg-Diagramm [modifizierte Darstellung nach James et al. [2008]]	46
Abbildung 14:	Mittelwerte der maximalen Kraft [%] im Vergleich zur gesunden Seite je Gruppe [eigene Darstellung]	51
Abbildung 15:	Mittelwerte der Steifigkeit [%] im Vergleich zur gesunden Seite je Gruppe [eigene Darstellung]	52
Abbildung 16:	Mittelwerte der Steifigkeit [%] im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz) je Gruppe [eigene Darstellung]	55
Abbildung 17:	Korrelation von maximaler Kraft und Steifigkeit – Darstellung der Wertepaare in einem zweidimensionalen Koordinatensystem [eigene Darstellung]	58
Abbildung 18:	Vergleich mit den Ergebnissen nach 14 und 28 Tagen – maximale Kraft [%] im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz) [eigene Darstellung]	60

Abbildung 19: Vergleich mit den Ergebnissen nach 14 und 28 Tagen –
Steifigkeit [%] im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe
der statistischen Signifikanz) [eigene Darstellung]62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: „Syntheseprodukte der Tenozyten“ und deren Anteil an der Extrazellulärmatrix [Modifizierte Darstellung nach Zschäbitz [2005]].....	4
Tabelle 2: Mittelwerte der maximalen Kraft [N] je Gruppe für Probe- und Kontrollseite	49
Tabelle 3: Mittelwerte der maximalen Kraft [%] im Vergleich zur gesunden Seite je Gruppe.....	50
Tabelle 4: Mittelwert der Steifigkeit [N/mm] je Gruppe für Probe- und Kontrollseite	51
Tabelle 5: Mittelwerte der Steifigkeit [%] im Vergleich zur gesunden Seite je Gruppe.....	52
Tabelle 6: Mittelwerte der maximalen Kraft [N] je Gruppe für Probe- und Kontrollseite (mit Angabe der statistischen Signifikanz)	53
Tabelle 7: Mittelwerte der Steifigkeit [N/mm] je Gruppe für Probe- und Kontrollseite (mit Angabe der statistischen Signifikanz)	54
Tabelle 8: Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA.....	55
Tabelle 9: Vergleich der Versuchsgruppen – Kraft im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz).....	56
Tabelle 10: Vergleich der Versuchsgruppen – Steifigkeit im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz).....	57
Tabelle 11: Korrelation von maximaler Kraft und Steifigkeit (mit Angabe der statistischen Signifikanz)	58
Tabelle 12: Vergleich mit den Ergebnissen nach 14 und 28 Tagen – maximale Kraft [%] im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz; Kennzeichnung mit Stern (*): Daten von Kraus et al. [2014]).....	59
Tabelle 13: Vergleich mit den Ergebnissen nach 14 und 28 Tagen – Steifigkeit [%] im Vergleich zur gesunden Seite (mit Angabe der statistischen Signifikanz; Kennzeichnung mit Stern (*): Daten von Kraus et al. [2014]).....	61

Literaturverzeichnis

- Adams, S.B., Jr., Thorpe, M.A., Parks, B.G., Aghazarian, G., Allen, E., Schon, L.C.** *Stem cell-bearing suture improves Achilles tendon healing in a rat model.* Foot Ankle Int 35 (2014) 293-299
- Aspenberg, P., Forslund, C.** *Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6.* Acta Orthop Scand 70 (1999) 51-54
- Aspenberg, P., Virchenko, O.** *Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats.* Acta Orthop Scand 75 (2004) 93-99
- Barfred, T.** *Achilles tendon rupture. Aetiology and pathogenesis of subcutaneous rupture assessed on the basis of the literature and rupture experiments on rats.* Munksgaard, Copenhagen, 1973, 12-17, 74-86
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., Hoffman, R.** *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.* Exp Hematol 30 (2002) 42-48
- Bauer, G., Eberhardt, O.** *Die frische Achillessehnenruptur - Epidemiologie - Ätiologie - Diagnostik und aktuelle Therapiemöglichkeiten.* Sportverletz Sportschaden 13 (1999) 79-89
- Buchmann, S., Sandmann, G.H., Walz, L., Hoppe, H., Beitzel, K., Wexel, G., Tian, W., Winter, G., Imhoff, A.B.** *Refixation of the supraspinatus tendon in a rat model-influence of continuous growth factor application on tendon structure.* J Orthop Res 31 (2013) 300-305
- Bühren, V., Keel, M., Marzi, I.** *Checkliste Traumatologie.* Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2011, 7. Aufl., 285-286
- Carden, D.G., Noble, J., Chalmers, J., Lunn, P., Ellis, J.** *Rupture of the calcaneal tendon. The early and late management.* J Bone Joint Surg Br 69 (1987) 416-420
- Cetti, R., Christensen, S.E., Ejsted, R., Jensen, N.M., Jorgensen, U.** *Operative versus nonoperative treatment of Achilles tendon rupture. A prospective randomized study and review of the literature.* Am J Sports Med 21 (1993) 791-799
- Chan, B.P., Chan, K.M., Maffulli, N., Webb, S., Lee, K.K.** *Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing.* Clin Orthop Relat Res (1997) 239-247
- Chan, B.P., Fu, S., Qin, L., Lee, K., Rolf, C.G., Chan, K.** *Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model.* Acta Orthop Scand 71 (2000) 513-518
- Chan, B.P., Fu, S.C., Qin, L., Rolf, C., Chan, K.M.** *Pyridinoline in relation to ultimate stress of the patellar tendon during healing: an animal study.* J Orthop Res 16 (1998) 597-603

- Chang, J., Most, D., Thunder, R., Mehrara, B., Longaker, M.T., Lineaweaver, W.C.** *Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression.* J Hand Surg Am 23 (1998) 1052-1058
- Chhabra, A., Tsou, D., Clark, R.T., Gaschen, V., Hunziker, E.B., Mikic, B.** *GDF-5 deficiency in mice delays Achilles tendon healing.* J Orthop Res 21 (2003) 826-835
- Chong, A.K., Ang, A.D., Goh, J.C., Hui, J.H., Lim, A.Y., Lee, E.H., Lim, B.H.** *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model.* J Bone Joint Surg Am 89 (2007) 74-81
- Christensen, I.** *Rupture of the Achilles tendon; analysis of 57 cases.* Acta Chir Scand 106 (1953) 50-60
- Cummings, S.H., Grande, D.A., Hee, C.K., Kestler, H.K., Roden, C.M., Shah, N.V., Razzano, P., Dines, D.M., Chahine, N.O., Dines, J.S.** *Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB-coated sutures on Achilles tendon healing in a rat model: A histological and biomechanical study.* J Tissue Eng 3 (2012) 2041731412453577
- Derwin, K.A., Baker, A.R., Iannotti, J.P., McCarron, J.A.** *Preclinical models for translating regenerative medicine therapies for rotator cuff repair.* Tissue Eng Part B Rev 16 (2010) 21-30
- Döderlein, L., Wenz, W., Schneider, U., Häfner, R.** *Der Spitzfuss, der Hackenfuss: Erscheinungsformen und Behandlungsprinzipien jeden Alters.* Springer, Berlin [u.a.], 2004, 19-25
- Editorial Achilles tendon rupture.** Lancet 1 (1973) 189-190
- Eriksen, H.A., Pajala, A., Leppilahti, J., Risteli, J.** *Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon.* J Orthop Res 20 (2002) 1352-1357
- Fenwick, S.A., Hazleman, B.L., Riley, G.P.** *The vasculature and its role in the damaged and healing tendon.* Arthritis Res 4 (2002) 252-260
- Folkman, J., Klagsbrun, M.** *Angiogenic factors.* Science 235 (1987a) 442-447
- Folkman, J., Klagsbrun, M.** *Vascular physiology. A family of angiogenic peptides.* Nature 329 (1987b) 671-672
- Forslund, C., Bylander, B., Aspenberg, P.** *Indomethacin and celecoxib improve tendon healing in rats.* Acta Orthop Scand 74 (2003) 465-469
- Frank, C., McDonald, D., Bray, D., Bray, R., Rangayyan, R., Chimich, D., Shrive, N.** *Collagen fibril diameters in the healing adult rabbit medial collateral ligament.* Connect Tissue Res 27 (1992) 251-263
- Frank, C., McDonald, D., Wilson, J., Eyre, D., Shrive, N.** *Rabbit medial collateral ligament scar weakness is associated with decreased collagen pyridinoline crosslink density.* J Orthop Res 13 (1995) 157-165
- Franke, K.** *Sportverletzungen und Fehlbelastungsfolgen an den unteren Extremitäten.* In: "Traumatologie des Sports", Franke, K. (Hrsg.), Thieme, Stuttgart [u.a.], 1986, 3. Auflage, 368-376

- Frings, H.** *Über 317 Fälle von operierten subcutanen Achillessehnenrupturen bei Sportlern and Sportlerinnen.* Arch Orthop Unfallchir 67 (1969) 64-72
- Fukashiro, S., Komi, P.V., Järvinen, M., Miyashita, M.** *In vivo Achilles tendon loading during jumping in humans.* Eur J Appl Physiol Occup Physiol 71 (1995) 453-458
- Fukui, N., Katsuragawa, Y., Sakai, H., Oda, H., Nakamura, K.** *Effect of local application of basic fibroblast growth factor on ligament healing in rabbits.* Rev Rhum Engl Ed 65 (1998) 406-414
- Goren, D., Ayalon, M., Nyska, M.** *Isokinetic strength and endurance after percutaneous and open surgical repair of Achilles tendon ruptures.* Foot Ankle Int 26 (2005) 286-290
- Hankemeier, S., Keus, M., Zeichen, J., Jagodzinski, M., Barkhausen, T., Bosch, U., Krettek, C., Van Griensven, M.** *Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments.* Tissue Eng 11 (2005) 41-49
- Hefti, F., Stoll, T.M.** *Heilung von Ligamenten und Sehnen.* Orthopäde 24 (1995) 237-245
- Hernandez-Martinez, J.C., Vasquez, C.R., Ceja, C.B., Fuentes, C.C., Sesma, J.F., Benitez, A.G.** *[Comparative study on animal model of acute Achilles tendon rupture with surgical treatment using platelet-rich plasma].* Acta Ortop Mex 26 (2012) 170-173
- Hou, Y., Mao, Z., Wei, X., Lin, L., Chen, L., Wang, H., Fu, X., Zhang, J., Yu, C.** *Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing.* Matrix Biol 28 (2009a) 324-335
- Hou, Y., Mao, Z., Wei, X., Lin, L., Chen, L., Wang, H., Fu, X., Zhang, J., Yu, C.** *The roles of TGF-beta1 gene transfer on collagen formation during Achilles tendon healing.* Biochem Biophys Res Commun 383 (2009b) 235-239
- Hügler, T., Majewski, M., Valderrabano, V.** *Zell- und molekularbiologische Abläufe bei der Heilung von Sehnenverletzungen.* Schweizerische Zeitschrift für Sportmedizin und Sporttraumatologie 60 (2012) 49-51
- Ingvar, J., Tagil, M., Eneroth, M.** *Nonoperative treatment of Achilles tendon rupture: 196 consecutive patients with a 7% re-rupture rate.* Acta Orthop 76 (2005) 597-601
- James, R., Kesturu, G., Balian, G., Chhabra, A.B.** *Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options.* J Hand Surg Am 33 (2008) 102-112
- Järvinen, T.A., Kannus, P., Maffulli, N., Khan, K.M.** *Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology.* Foot Ankle Clin 10 (2005) 255-266
- Jones, M.P., Khan, R.J., Carey Smith, R.L.** *Surgical interventions for treating acute achilles tendon rupture: key findings from a recent cochrane review.* J Bone Joint Surg Am 94 (2012) e88

- Jozsa, L., Kvist, M., Balint, B.J., Reffy, A., Järvinen, M., Lehto, M., Barzo, M.** *The role of recreational sport activity in Achilles tendon rupture. A clinical, pathoanatomical, and sociological study of 292 cases.* Am J Sports Med 17 (1989) 338-343
- Kader, D., Saxena, A., Movin, T., Maffulli, N.** *Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management.* Br J Sports Med 36 (2002) 239-249
- Kannus, P., Jozsa, L.** *Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients.* J Bone Joint Surg Am 73 (1991) 1507-1525
- Khan, R.J., Fick, D., Brammar, T.J., Crawford, J., Parker, M.J.** *Interventions for treating acute Achilles tendon ruptures.* Cochrane Database Syst Rev (2004) CD003674
- Khan, R.J., Fick, D., Keogh, A., Crawford, J., Brammar, T., Parker, M.** *Treatment of acute achilles tendon ruptures. A meta-analysis of randomized, controlled trials.* J Bone Joint Surg Am 87 (2005) 2202-2210
- Knobloch, K., Thermann, H., Hufner, T.** *Frühfunktionell konservative und operative Behandlungsmöglichkeiten sowie Rehabilitationsoptionen bei der Achillessehnenruptur.* Sportverletz Sportschaden 21 (2007) 34-40
- Kraus, T.M., Imhoff, F.B., Reinert, J., Wexel, G., Wolf, A., Hirsch, D., Hofmann, A., Stöckle, U., Buchmann, S., Tischer, T., Imhoff, A.B., Milz, S., Anton, M., Vogt, S.** *Stem cells and bFGF in tendon healing: Effects of lentiviral gene transfer and long-term follow-up in a rat Achilles tendon defect model.* BMC Musculoskelet Disord 17:148 (2016)
- Kraus, T.M., Imhoff, F.B., Wexel, G., Wolf, A., Hirsch, D., Lenz, L., Stöckle, U., Buchmann, S., Tischer, T., Imhoff, A.B., Milz, S., Anton, M., Vogt, S.** *Stem cells and basic fibroblast growth factor failed to improve tendon healing: an in vivo study using lentiviral gene transfer in a rat model.* J Bone Joint Surg Am 96 (2014) 761-769
- Kurtz, C.A., Loebig, T.G., Anderson, D.D., DeMeo, P.J., Campbell, P.G.** *Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model.* Am J Sports Med 27 (1999) 363-369
- Leppilahti, J., Puranen, J., Orava, S.** *Incidence of Achilles tendon rupture.* Acta Orthop Scand 67 (1996) 277-279
- Lundborg, G., Rank, F.** *Experimental intrinsic healing of flexor tendons based upon synovial fluid nutrition.* J Hand Surg Am 3 (1978) 21-31
- Lynch, R.M.** *Achilles tendon rupture: surgical versus non-surgical treatment.* Accid Emerg Nurs 12 (2004) 149-158
- Lyras, D.N., Kazakos, K., Tryfonidis, M., Agrogiannis, G., Botaitis, S., Kokka, A., Drosos, G., Tilkeridis, K., Verettas, D.** *Temporal and spatial expression of TGF-beta1 in an Achilles tendon section model after application of platelet-rich plasma.* Foot Ankle Surg 16 (2010) 137-141
- Maffulli, N.** *Rupture of the Achilles tendon.* J Bone Joint Surg Am 81 (1999) 1019-1036

- Maffulli, N., Ajis, A.** *Management of chronic ruptures of the Achilles tendon.* J Bone Joint Surg Am 90 (2008) 1348-1360
- Majewski, M., Rickert, M., Steinbruck, K.** *Die frische Achillessehnenruptur. Eine prospektive Untersuchung zur Beurteilung verschiedener Therapiemöglichkeiten.* Orthopäde 29 (2000) 670-676
- Manske, P.R., Lesker, P.A.** *Biochemical evidence of flexor tendon participation in the repair process--an in vitro study.* J Hand Surg Br 9 (1984) 117-120
- McMaster, P.E.** *TENDON AND MUSCLE RUPTURES Clinical and Experimental Studies on the causes and Location of Subcutaneous Ruptures.* J Bone Joint Surg 15 (1933) 705-722
- Miles, J.W., Grana, W.A., Egle, D., Min, K.W., Chitwood, J.** *The effect of anabolic steroids on the biomechanical and histological properties of rat tendon.* J Bone Joint Surg Am 74 (1992) 411-422
- Möller, M., Movin, T., Granhed, H., Lind, K., Faxen, E., Karlsson, J.** *Acute rupture of tendon Achilles. A prospective randomised study of comparison between surgical and non-surgical treatment.* J Bone Joint Surg Br 83 (2001) 843-848
- Molloy, T., Wang, Y., Murrell, G.** *The roles of growth factors in tendon and ligament healing.* Sports Med 33 (2003) 381-394
- Movin, T., Ryberg, A., McBride, D.J., Maffulli, N.** *Acute rupture of the Achilles tendon.* Foot Ankle Clin 10 (2005) 331-356
- Murrell, G.A., Lilly, E.G., 3rd, Goldner, R.D., Seaber, A.V., Best, T.M.** *Effects of immobilization on Achilles tendon healing in a rat model.* J Orthop Res 12 (1994) 582-591
- Ng, C.O., Ng, G.Y., See, E.K., Leung, M.C.** *Therapeutic ultrasound improves strength of achilles tendon repair in rats.* Ultrasound Med Biol 29 (2003) 1501-1506
- Nistor, L.** *Surgical and non-surgical treatment of Achilles Tendon rupture. A prospective randomized study.* J Bone Joint Surg Am 63 (1981) 394-399
- O'Brien, M.** *The anatomy of the Achilles tendon.* Foot Ankle Clin 10 (2005) 225-238
- Okamoto, N., Kushida, T., Oe, K., Umeda, M., Ikehara, S., Iida, H.** *Treating Achilles tendon rupture in rats with bone-marrow-cell transplantation therapy.* J Bone Joint Surg Am 92 (2010) 2776-2784
- Omeroglu, S., Peker, T., Turkozkan, N., Omeroglu, H.** *High-dose vitamin C supplementation accelerates the Achilles tendon healing in healthy rats.* Arch Orthop Trauma Surg 129 (2009) 281-286
- Orhan, Z., Ozturan, K., Guven, A., Cam, K.** *The effect of extracorporeal shock waves on a rat model of injury to tendo Achilles. A histological and biomechanical study.* J Bone Joint Surg Br 86 (2004) 613-618
- Ouyang, H.W., Goh, J.C., Thambyah, A., Teoh, S.H., Lee, E.H.** *Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon.* Tissue Eng 9 (2003) 431-439

- Palmes, D., Spiegel, H.U., Schneider, T.O., Langer, M., Stratmann, U., Budny, T., Probst, A.** *Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model.* J Orthop Res 20 (2002) 939-946
- Pauwels, F.** *Eine neue Theorie über den Einfluss mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe.* Z Anat Entwicklungsgesch 121 (1960) 478-515
- Petersen, W.** *Sehnenschäden; Unterschenkel und Achillessehne.* In: "Handbuch Sportorthopädie, -traumatologie", Hassenpflug, J., Becker, R. (Hrsg.), Hofmann, Schorndorf, 2007, 133-144, 359-373
- Petersen, W., Pufe, T., Pfrommer, S., Tillmann, B.** *Überlastungsschaden der Achillessehne: Die Bedeutung von Blutgefäßversorgung und Angiogenese.* Orthopäde 34 (2005) 533-542
- Pietschmann, M.F., Frankewycz, B., Schmitz, P., Docheva, D., Sievers, B., Jansson, V., Schieker, M., Muller, P.E.** *Comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds in a full-size tendon defect model.* J Mater Sci Mater Med 24 (2013) 211-220
- Pillet, J., Albaret, P.** *La rupture du tendon d'Achille.* Méd Sport 46 (1972) 15-22
- Rickert, M., Georgousis, H., Witzel, U.** *The native tensile strength of the supraspinatus tendon. A biomechanical study.* Unfallchirurg 101 (1998) 265-270
- Rickert, M., Wang, H., Wieloch, P., Lorenz, H., Steck, E., Sabo, D., Richter, W.** *Adenovirus-mediated gene transfer of growth and differentiation factor-5 into tenocytes and the healing rat Achilles tendon.* Connect Tissue Res 46 (2005) 175-183
- Riedl, S., Sandberger, L., Nitschmann, K., Meeder, P.J.** *Die Naht der frischen Achillessehnenruptur - Vergleich der offenen mit einer perkutanen Nahttechnik.* Chirurg 73 (2002) 607-614
- Riemersa, D.J., Schamhardt, H.C.** *The cryo-jaw, a clamp designed for in vitro rheology studies of horse digital flexor tendons.* J Biomech 15 (1982) 619-620
- Schambach, A., Galla, M., Maetzig, T., Loew, R., Baum, C.** *Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors.* Mol Ther 15 (2007) 1167-1173
- Schmitt, A., van Griensven, M., Imhoff, A.B., Buchmann, S.** *Application of stem cells in orthopedics.* Stem Cells Int 2012 (2012) 394962
- Schuh, R., Etzlstorfer, B., Trnka, H.-J., Kristen, K.-H.** *Überlastungsprobleme am Fuß des Sportlers.* In: "Fuß & Sprunggelenk und Sport: Empfehlungen von Sportarten aus orthopädischer und sportmedizinischer Sicht", Valderrabano, V., Brandenburg, L. (Hrsg.), Dt. Ärzte-Verlag, Köln, 2009, 77-80
- Shampo, M.A., Kyle, R.A.** *Medical mythology: Achilles.* Mayo Clin Proc 67 (1992) 651
- Sharma, P., Maffulli, N.** *Tendon injury and tendinopathy: healing and repair.* J Bone Joint Surg Am 87 (2005) 187-202
- Theobald, P., Benjamin, M., Nokes, L., Pugh, N.** *Review of the vascularisation of the human Achilles tendon.* Injury 36 (2005) 1267-1272

- Thermann, H.** *Die funktionelle Behandlung der frischen Achillessehnenruptur.* Springer, Berlin, 1996, 1-24, 48-53, 74-78, 86-120
- Thermann, H.** *Die Behandlung der Achillessehnenruptur.* Unfallchirurg 101 (1998) 299-314
- Thermann, H.** *Die Behandlung der Achillessehnenruptur.* Orthopäde 28 (1999) 82-97
- Thermann, H., Frerichs, O., Biewener, A., Krettek, C., Schandelmaier, P.** *Biomechanische Untersuchungen zur menschlichen Achillessehnenruptur.* Unfallchirurg 98 (1995a) 570-575
- Thermann, H., Frerichs, O., Biewener, A., Krettek, C., Schandelmeier, P.** *Die funktionelle Behandlung der frischen Achillessehnenruptur. Eine experimentelle biomechanische Untersuchung.* Unfallchirurg 98 (1995b) 507-513
- Uhthoff, H.K., Sarkar, K., Maynard, J.A.** *Calcifying tendinitis: a new concept of its pathogenesis.* Clin Orthop Relat Res (1976) 164-168
- Wang, X.T., Liu, P.Y., Tang, J.B.** *Tendon healing in vitro: modification of tenocytes with exogenous vascular endothelial growth factor gene increases expression of transforming growth factor beta but minimally affects expression of collagen genes.* J Hand Surg Am 30 (2005) 222-229
- Wechselberger, A., Gruber, K.** *Sportverletzungen: vorbeugen - erkennen - behandeln.* Verl.-Haus der Ärzte, Wien, 2005, 1. Auflage, 74-76
- Weineck, J.** *Sportanatomie.* Spitta-Verlag, Balingen, 2008, 18. Auflage, 26-33, 88-91, 268-291
- Welsch, U.** *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie.* Elsevier, München [u.a.], 2009, 2. Auflage, 77-78, 118-121, 295-299
- Wieloch, P., Buchmann, G., Roth, W., Rickert, M.** *A cryo-jaw designed for in vitro tensile testing of the healing Achilles tendons in rats.* J Biomech 37 (2004) 1719-1722
- Winkel, D., Vleeming, A., Meijer, O.** *Anatomie in vivo für den Bewegungsapparat.* Urban & Fischer, München, 2004, 3. Auflage, 237
- Wübbenhorst, D., Dumler, K., Wagner, B., Wexel, G., Imhoff, A., Gänsbacher, B., Vogt, S., Anton, M.** *Tetracycline-regulated bone morphogenetic protein 2 gene expression in lentivirally transduced primary rabbit chondrocytes for treatment of cartilage defects.* Arthritis Rheum 62 (2010) 2037-2046
- Wurzinger, L.J.** *Unterschenkel und Fuß.* In: "Duale Reihe Anatomie", Bob, A., Bob, K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007, 1. Auflage, 398-400
- Zatloukal, K., Roth, J., Denk, H.** *Zell- und Gewebereaktionen.* In: "Pathologie", Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Moch, H. (Hrsg.), Elsevier, München [u.a.], 2008, 4. Auflage, 51
- Zhang, F., Liu, H., Stile, F., Lei, M.P., Pang, Y., Oswald, T.M., Beck, J., Dorsett-Martin, W., Lineaweaver, W.C.** *Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing.* Plast Reconstr Surg 112 (2003) 1613-1619

Zhang, K., Wang, L., Zhang, S., Yu, B., Liu, F., Cui, Z., Jin, D., Bai, X. *Celecoxib inhibits the heterotopic ossification in the rat model with Achilles tenotomy.* Eur J Orthop Surg Traumatol 23 (2013) 145-148

Zschäbitz, A. *Anatomie und Verhalten von Sehnen und Bändern.* Orthopäde 34 (2005) 516-525

Anhang

Gruppe	Tier	Maximale Kraft Probe [N]	Maximale Kraft Kontrolle [N]	Maximale Kraft im Vergleich
PBS	1	91,155	72,443	1,258
	3	96,833	80,063	1,209
	5	104,616	74,807	1,398
	9	78,837	65,709	1,200
	10	74,019	89,873	0,824
	11	94,825	84,560	1,121
	15	79,875	78,912	1,012
	17	96,565	84,828	1,138
	21	68,900	91,533	0,753
	24	94,702	72,241	1,311
	MW		88,033	79,497
SD		11,734	8,312	0,206
eGFP	12	80,215	74,153	1,082
	18	100,010	89,219	1,121
	19	92,916	92,954	1,000
	22	79,253	96,964	0,817
	27	105,360	81,407	1,294
	28	81,531	98,510	0,828
	29	101,161	84,704	1,194
	30	97,724	80,305	1,217
	31	69,429	92,089	0,754
	32	68,722	68,333	1,006
	MW		87,632	85,864
SD		13,465	9,888	0,185
bFGF	2	52,159	104,279	0,500
	4	108,518	89,043	1,219
	6	100,795	76,285	1,321
	7	77,231	77,874	0,992
	8	85,767	67,191	1,276
	13	88,943	85,612	1,039
	14	69,872	60,398	1,157
	16	55,455	87,315	0,635
	20	69,509	95,956	0,724
	23	73,103	89,083	0,821
	MW		78,135	83,304
SD		18,165	13,127	0,286

Anhang 1: Wertetabelle der Variable „maximale Kraft Probe“ für die operierte Seite und „maximale Kraft Kontrolle“ für die unbehandelte Kontrollseite (im Zugversuch ermittelte Messwerte) sowie die errechnete Variable „maximale Kraft im Vergleich“

Gruppe		Tier	Steifigkeit Probe [N/mm]	Steifigkeit Kontrolle [N/mm]	Steifigkeit im Vergleich
PBS		1	20,4260	25,3266	0,807
		3	43,0447	30,3415	1,419
		5	42,6465	45,8967	0,929
		9	34,1661	64,0091	0,534
		10	43,1823	60,6701	0,712
		11	16,9322	56,0995	0,302
		15	35,1074	62,0153	0,566
		17	30,7781	62,4003	0,493
		21	34,3954	43,1636	0,797
		24	39,0692	18,1920	2,148
		MW		33,9748	46,8115
	SD		9,1525	17,0435	0,542
eGFP		12	29,5568	42,4079	0,697
		18	47,2491	74,5396	0,634
		19	24,6125	51,0806	0,482
		22	32,4930	52,6914	0,617
		27	36,2636	48,0314	0,755
		28	29,3592	54,6766	0,537
		29	44,9400	51,3019	0,876
		30	36,1264	38,9605	0,927
		31	30,1256	51,9359	0,580
		32	29,0874	76,8304	0,379
		MW		33,9814	54,2456
	SD		7,2700	12,2968	0,171
bFGF		2	21,4869	45,7944	0,469
		4	49,2455	25,1608	1,957
		6	33,2836	49,7176	0,669
		7	44,3333	35,3744	1,253
		8	31,1435	59,1060	0,527
		13	23,8100	66,6194	0,357
		14	21,4663	66,9207	0,321
		16	28,7872	68,8687	0,418
		20	24,2390	55,3235	0,438
		23	23,4034	44,4980	0,526
		MW		30,1199	51,7383
	SD		9,7157	14,4472	0,517

Anhang 2: Wertetabelle für die errechneten Variablen „Steifigkeit Probe“ für die operierte Seite und „Steifigkeit Kontrolle“ für die unbehandelte Kontrollseite sowie die errechnete Variable „Steifigkeit im Vergleich“

Danksagung

An dieser Stelle soll Allen gedankt werden, die mich in der Vorbereitung, Durchführung und Auswertung unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stephan Vogt, Chefarzt der Klinik für Sportorthopädie und arthroskopische Chirurgie der Orthopädischen Fachkliniken der Hessing Stiftung Augsburg, und Leiter des Bereichs Forschung (Tissue engineering) der Abteilung und Poliklinik für Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar der TU München für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und die Unterstützung bei der Umsetzung.

Mein besonderer Dank gilt Florian Imhoff (Abteilung und Poliklinik für Sportorthopädie) für die exzellente Betreuung dieser Arbeit, die Bereitstellung der Präparate und die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Bei Herrn Dr. Stefan Buchmann (Abteilung und Poliklinik für Sportorthopädie) bedanke ich mich für konstruktive Anregungen in jedem Stadium der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe, Direktor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar der TU München sowie Herrn Prof. Dr. Andreas B. Imhoff, Leiter der Abteilung und Poliklinik für Sportorthopädie, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrer Klinik durchzuführen.

Für die Bereitstellung der Räumlichkeiten zur Versuchsdurchführung bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Rainer Burgkart vom Labor für Biomechanik der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie. Für die stets freundliche Beratung und Unterstützung bei der Versuchsdurchführung danke ich Herrn Dipl.-Ing. Peter Föhr.

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Institutes für Medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE) der TU München in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Dipl.-Stat. Bernhard Haller herzlich bedanken.