

Aus der Abteilung Prothetik
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. Hüls)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Bedeutung des Kollagens für die Regeneration der Rotatorenmanschette:
Histologische und immunhistologische Untersuchung der Verteilung der Kollagene Typ I,
Typ II und Typ III nach single- und double-row-Naht-Anker-Rekonstruktion

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Andrea Posmyk
aus Heilbad Heiligenstadt

Göttingen 2010

Dekan: **Prof. Dr. med. C. Frömmel**

I. Berichterstatter: **Prof. Dr. med. N. Miosge**

II. Berichterstatter/in: **Prof. Dr. med. K. Dresing**

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: **15.03.2011**

1. Einleitung	1
1.1 Anatomie und Funktion der Rotatorenmanschette	1
1.2 Die Rotatorenmanschettenruptur	3
1.2.1 Definition	3
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese	3
1.3 Die Rekonstruktion der Rotatorenmanschette	5
1.3.1 Ursachen für den Misserfolg nach Rotatorenmanschettenrekonstruktionen	5
1.3.2 Operationstechniken	6
1.3.3 Die Refixation der Sehne	7
1.4 Die Kollagene	8
1.4.1 Fibrilläre Kollagene	9
1.4.2 Biosynthese der fibrillären Kollagene am Beispiel von Kollagen Typ I	10
1.4.3 Der Einfluss der Kollagentypen auf die Sehnen-Knochen-Verbindungsfläche	13
1.5 Aufgabenstellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Allgemein vorbereitende Maßnahmen	15
2.1.1 Tiere	15
2.1.2 Chirurgisches Vorgehen	15
2.1.3 Gewebeprobengewinnung	17
2.1.4 Gewebepräparation	17
2.1.5 Gewebevorbereitung, Einbetten und Schneiden	17
2.1.6 Histologische Färbungen für Lichtmikroskopie	20
2.2 Immunhistologische Färbung	23
2.2.1 Allgemein zur Methode	23
2.2.2 Antigendemaskierung	24
2.2.3 Die immunhistologische Färbung mit Hilfe des DAKO REAL™ Detection Systems	24
2.2.4 Protokoll der immunhistologischen Darstellung von Kollagen I, II und III	26

3.	Ergebnisse	28
3.1	Lichtmikroskopische Histologie des unbehandelten Knochen-Sehnen-Komplexes	28
3.2	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Histologie des mittels single- und double-row-Technik behandelten Knochen-Sehnen-Komplexes	29
3.3	Proteoglycangehalt	29
3.4	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Immunhistologie für Kollagen I	33
3.5	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Immunhistologie für Kollagen II	37
3.6	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Immunhistologie für Kollagen III	42
3.7	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der lichtmikroskopischen Immunhistologie	47
4.	Diskussion	48
5.	Zusammenfassung	61
6.	Literaturverzeichnis	63
7.	Abbildungsverzeichnis	76
8.	Tabellenverzeichnis	79

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aq. dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
ggf.	gegeben falls
h	Stunde
HE	Hämalaun-Eosin
kg	Kilogramm
l	Liter
Lsg.	Lösung
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M	Molarität
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Newton
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
RER	raues endoplasmatisches Retikulum
RT	Raumtemperatur
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
°	Grad
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1. Einleitung

Eine der häufigsten Ursachen für Schulterschmerz ist die Ruptur der Rotatorenmanschette (Mantone et al. 2000). Ab dem 50. Lebensjahr steigt ihre Prävalenz markant an. Bei über 70-Jährigen tritt sie bis zu 50% und bei über 80-Jährigen mit bis zu 80% auf (Milgrom et al. 1995). Es werden gute klinische Resultate bei der Rotatorenmanschettenrekonstruktion erreicht (Lichtenberg et al. 2006). Insbesondere bei großen chronischen Rupturen zeigen dennoch aktuelle operative Therapien eine hohe Rerupturrate mit 25 bis 94% (Galatz et al. 2004, Franceschi et al. 2007, Lichtenberg et al. 2006). Aus diesem Grund versucht man, bestehende Therapien zu verbessern und neue Entwicklungen zu initiieren.

1.1 Anatomie und Funktion der Rotatorenmanschette

Damit der Humeruskopf bei der Bewegung der Schulter in der Gelenkpfanne bleibt, ist die Schulter von wichtigen Muskeln umgeben. Sie zentrieren den Humeruskopf gegenüber dem Glenoid, sorgen für Bewegung und Kraft.

Der wichtigste Muskel – Musculus supraspinatus - entspringt in der Fossa supraspinata und zieht unter dem Schulterdach zu der oberen Facette des Tuberculum majus und zur Gelenkkapsel. Er ist ein Außenrotator und startet die Abduktion des Oberarmes.

Der Musculus infraspinatus ist der stärkste Außenrotator des Oberarmes, abduziert bei erhobenem, adduziert bei gesenktem Arm und verhindert eine Gelenkkapseleinklemmung. Er hat seinen Ursprung in der Fossa infraspinata und inseriert in der mittleren Facette des Tuberculum majus und in der Gelenkkapsel.

Der Musculus subscapularis ist der stärkste Innenrotator. Er entspringt in der Fossa subscapularis und setzt am Tuberculum minus und der Gelenkkapsel an.

Der Musculus teres minor ist funktionell ein schwacher Außenrotator des Oberarmes und wirkt bei der Adduktion mit. Er entspringt in der mittleren Partie des Margo lateralis scapulae und setzt an der unteren Facette des Tuberculum majus und der Gelenkkapsel an.

Alle vier Muskeln – der Musculus supraspinatus, Musculus infraspinatus, Musculus subscapularis und Musculus teres minor – agieren als dynamische Stabilisatoren des glenohumeralen Gelenks (Morrey und An 1990). Die Sehnen dieser Muskeln vereinigen sich vor der Insertion am Tuber des Humerus zur Rotatorenmanschette. Der kräftige Deltamuskel bedeckt die Rotatorenmanschette, wodurch diese von außen nicht sichtbar ist.

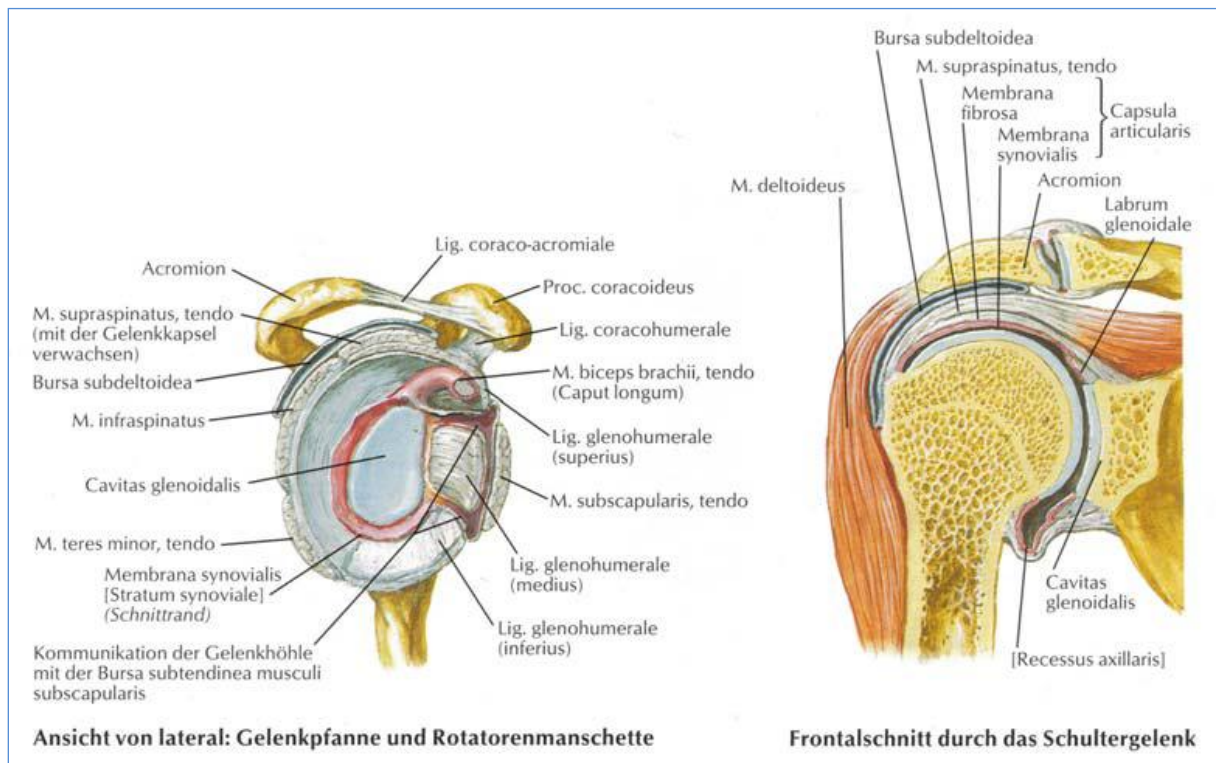


Abb.1.1: Articulatio glenohumeralis des Menschen mit umgebenden Strukturen, aus Netter (2006)

S. 406

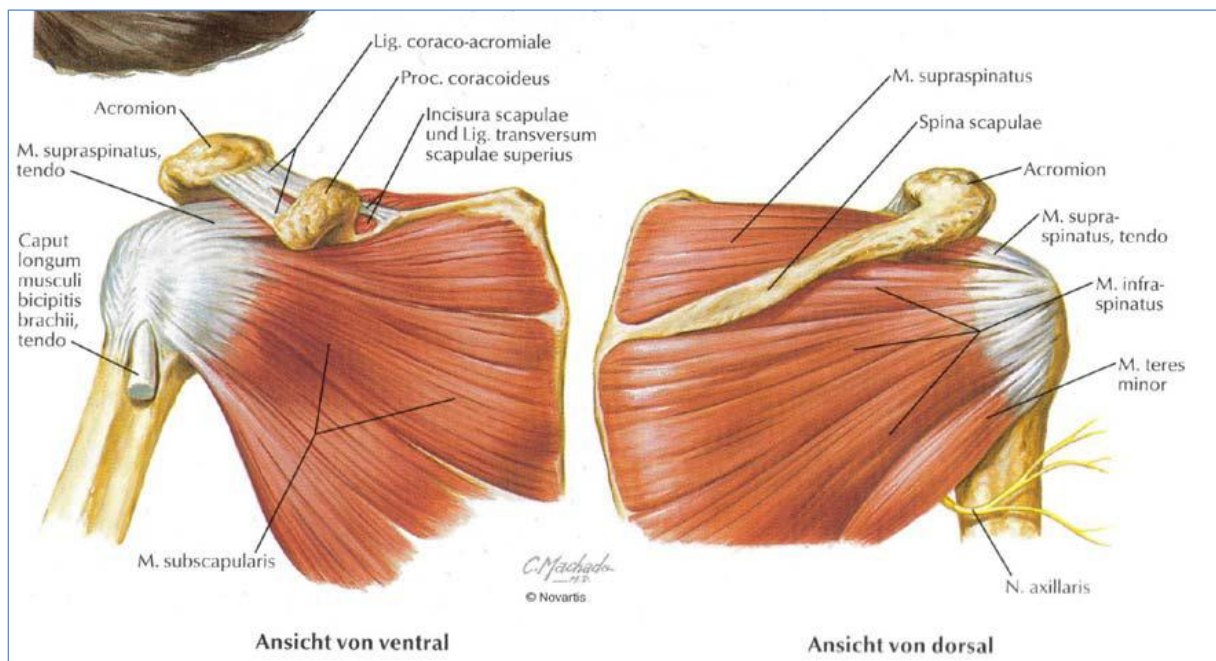


Abb 1.2: Menschliche Rotatorenmanschette; aus Netter (2006) S. 408

1.2 Die Rotatorenmanschettenruptur

1.2.1 Definition:

Die Rotatorenmanschettenruptur beschreibt die Kontinuitätsunterbrechung des Sehnenspiegels, welcher durch die Vereinigung der vier Ansatzsehnen der Rotatorenmanschette am Tuberculum majus und minus gebildet wird.

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Aufgrund der anatomisch bedingten räumlichen Enge unter dem Schulterdach und der vaskulären Ernährungssituation sind diese Sehnen anfälliger, Läsionen zu entwickeln (Fan et al. 1997, Hedtmann und Fett 2002). Die Supraspinatussehne ist am häufigsten betroffen, gewöhnlich an der „kritischen Zone“, einen Zentimeter vor der Knocheninsertion. Die „kritische Zone“ ist eine Region mit Blutgefäßanastomosen (Rothman und Parke 1965) und einer reduzierten Blutperfusion, in der alters- und verletzungsbedingte Degenerationen entstehen können (MacNab 1973).

Bei fortschreitender Sehnendegeneration kann es zu Defekten der Rotatorenmanschette kommen, die intratendinös, bursaseitig oder gelenkseitig beginnen können. Durch Ausbreitung dieser inkompletten oder Partialdefekte auf die gesamte Dicke der Rotatorenmanschette, entstehen dann die kompletten oder Totaldefekte (Hedtmann und Fett 2002). Makroskopisch entsteht der Rotatorenmanschettendefekt am häufigsten gelenkseitig oder intratendinös an der ventralen Kante der Supraspinatussehne. Gering oder nicht degenerierte Sehnen reißen erst bei höheren Lasten ansatznah, während stärker degenerierte Sehnen bei geringen Lasten ansatzfern reißen (Sano et al. 1998).

Neer (1983) sieht den pathologischen Kontakt zwischen der Rotatorenmanschette und der Fornix humeri – dem osteofibrösen Schulterdach aus Akromion, Ligamentum coracoacromiale und dem Processus coracoideus - als Hauptursache für Rotatorenmanschettenrisse. Er bezeichnete diesen pathologischen Kontakt als degeneratives „Subacromiales Impingementsyndrom“ und nahm an, dass 95% der Rotatorenmanschettenrupturen durch dieses Impingement entstehen.

Tab.1.1: Stadien des Impingementsyndroms nach Neer (1983)			
Stadium	Stadium I	Stadium II	Stadium III
	Ödem und Blutungen	Fibrose und Tendinitis	Knochensporne und Sehnenruptur
Ursache	exzessive Überkopfbewegung in Sport und Arbeit	wiederholende Episoden mechanischer Entzündungen	weiterer Impingementverschleiß
typisches Patientenalter	< 25	25-40	> 40
Differentialdiagnose	Subluxation	frozen shoulder	zervikale Radikulitis
Klinischer Verlauf	reversibel	rezidivierende Schmerzen	fortschreitende Behinderung
Behandlung	konservativ	Schleimbeutelentfernung Ligament-Division	anteriore Akromionplastik, Rotatorenmanschetten-Reparatur

Der Rotatorenmanschettendefekt entspricht dem Stadium III des Impingementsyndroms nach Neer.

Da die Rupturen oft gelenkseitig und nicht bursseitig auftreten (Patte et al. 1981, Samilson und Binder 1975), besteht Zweifel an der Impingementtheorie.

Nach Uthoff et al. (1986) werden die Ursachen für die Rotatorenmanschettenrupturen in intrinsische (intra-tendinöse) und extrinsische (extra-tendinöse) Ursachen eingeteilt. Intrinsische Ursachen entwickeln sich im Inneren der Sehne. Bei extrinsischen Ursachen wirkt das Problem von außen auf die Sehne ein (Bigliani und Levine 1997). Extrinsische Reizungen können durch folgende Faktoren hervorgerufen werden: Morphologie und Neigung des Akromions (Neer 1972), degenerative subakromiale Knochenspornbildung (Nicholson et al 1996), Degeneration der Articulatio acromioclaviculare (Kessel und Watson 1977), glenohumerale Instabilität und Korakoid (Dines et al. 1990). Zu den intrinsischen Faktoren zählen: Schwäche der Rotatorenmuskulatur, Überbeanspruchung der Schulter mit Mikrotraumen der Rotatorenmanschette (Bigliani und Levine 1997) und die Tendinosis calcarea.

1.3 Die Rekonstruktion der Rotatorenmanschette

1.3.1 Ursachen für den Misserfolg nach Rotatorenmanschettenrekonstruktionen

Die Rekonstruktion der Rotatorenmanschette bleibt eine Herausforderung, da strukturelle Schäden und wiederkehrende Risse häufige postoperative Probleme darstellen.

In der Literatur wurde mehrfach von einer Misserfolgsrate zwischen 38% und 65% nach primären Rotatorenmanschettenrekonstruktionen berichtet (De Orio und Cofield 1984, Galatz et al. 2004, Gartsman 1997, Gazielly et al. 1994, Gerber et al. 1999, Harryman et al. 1991, Hatstrup 1995, Rokito et al. 1996, Romeo et al. 1999).

Für den Misserfolg von Rotatorenmanschettenrekonstruktionen können folgende Faktoren ursächlich sein. Erstens, eine Hypovaskularisation der Rotatorenmanschette führt zu einer Limitation der Gewebsheilung (Dejardin et al. 2001, Gartsman 1997, Gazielly et al. 1994, Rokito et al. 1996, Romeo et al. 1999). Diese Limitation erzeugt eine degenerative Sehne mit gestörter Gewebsqualität und schafft Schwierigkeiten bei der Verwirklichung einer sicheren Fixierung (Dejardin et al. 2001, De Orio und Cofield 1984, Gerber et al. 1994).

Zweitens, können während der frühen Rehabilitation Kräfte auf die Sehne wirken, die die Festigkeit der Reparatur überschreiten. Reilly et al. (2003) berechnete eine Kraft von 300 N, die der Supraspinatusmuskel bei einer Abduktion des Armes von 0° auf 30° entwickelt. Dieses Ergebnis ist beunruhigend, da mehrere grundlegende wissenschaftliche Studien an Schafsmodellen gezeigt haben, dass die Ausreißfestigkeit der Reparaturkonstruktion nach zwölf Wochen signifikant niedriger ist, als dieser Wert (Gerber et al. 1994, Reilly et al. 2003). Weiterhin können Versagen des Knotens oder der Naht, bzw. Nahtausreißen aus der Sehne Ursachen für den Misserfolg der Rotatorenmanschettenrekonstruktion sein (Gerber et al. 1994, Goradia et al. 2001, Cummins und Murell 2003).

1.3.2 Operationstechniken

Der Zugang erfolgt bei der **offenen Rekonstruktion** von vorne und oben durch den Deltamuskel („Standardzugang“ nach Kölbl (1990)) - 4-5 cm vom Akromion entfernt - um Verletzungen von Ästen des Nervus axillaris zu vermeiden. Die Manschette wird mittels Haltefäden mobilisiert. Die Ränder werden bei der klassischen Technik mit vertikalen Matratzennähten quer zur Faserrichtung am Humerus verankert. Mittels sog. Schnürsenkelnähte, deren Enden transossär verankert werden, lassen sich längs verlaufende Öffnungen verschließen (Kölbl und Hedtmann 2002). Untersuchungen von Gerber et al. (1994) ergaben, dass die beste Verankerung in der Sehne Nähte geben, die schlingenartig mehrfach durch die Sehne gestochen werden (Mason-Allen-Technik).

Bei der **Arthroskopischen Rotatorenmanschettennaht** wird durch einen paraakromialen Zugang ein Fadenanker eingebracht. Die Fäden werden mit einer sog. Lassoschlinge gefasst und einzeln perforierend durch die Rotatorenmanschette geführt. Nach dem Setzen eines oder mehrere Anker wird der Knoten mit einem Knotenschieber, ggf. unter reponierendem Zug an einem zusätzlichen Manipulierfaden angelegt (Kölbl und Hedtmann 2002).

Die in der englischen Literatur als *mini-open-repair* bezeichnete arthroskopisch-assistierte Technik stellt einen Mittelweg zwischen der technisch oft sehr anspruchsvollen arthroskopischen Methode und der offenen Technik dar (Kölbl und Hedtmann 2002). Dabei unterscheidet Yamaguchi (2001) zwischen der arthroskopisch-assistierten offenen Rekonstruktion und der minimal-offen-assistierten arthroskopischen Rekonstruktion. Während bei der arthroskopisch-assistierten offene Rekonstruktion nach Arthroskopie und endoskopisch-subakromialer Dekompression eine offene Rekonstruktion über einen minimierten, lateralen, transdeltoidalen Zugang durchgeführt wird, erfolgen bei der minimal-offen-assistierten arthroskopischen Rekonstruktion von der subakromialen Dekompression bis zur transossären Nahtfixierung (z.B. mit Knochenankern) die meisten Schritte arthroskopisch. Der Verzicht auf die Ablösung des Deltamuskels ist der große Vorteil gegenüber der offenen Technik. Nachteilig ist die mangelnde Übersicht und mögliche Quetschung des Muskels bei der Retraktion mit Wundhaken. Dennoch sehen Fearly et al. (2002) und Warner et al. (2005) mit dem *mini-open-repair* ähnlich gute funktionelle Ergebnisse verglichen zur offenen und rein arthroskopischen Technik.

1.3.3 Die Refixation der Sehne

Das Hauptziel der chirurgischen Wiederherstellung einer gerissenen Sehne ist eine ausreichende Anfangsfestigkeit der Fixation, um entsprechende Rehabilitation während des reparativen Prozesses zu erlauben (Klinger et al. 2007).

Eine möglichst spannungsarme Refixation der Sehne mit einer breiten Kontaktfläche an der Insertionsstelle am Tuberculum majus („Footprint Adaptation“) ist anzustreben (Hedtmann und Fett 2002).

Folgende Refixationstechniken der Sehne sind möglich (Gohlke et al. 2007):

- transossäre Ausleitung der in modifizierter Mason-Allen-Technik hinterstochenen Ausziehnäht mit zusätzlicher Fixierung durch transossär vorgelegte resorbierbare Nähte, die die Sehne flächig an die Insertionsstelle („Footprint-Adaption“) adaptieren
- Einreihige Fixation mittels Fadenanker, versehen mit einzelnen oder doppelten Nähten (single-row-Technik)
- Doppelreihige Fixation mit Fadenankern (double-row-Technik) bewies bei in-vitro Untersuchungen eine breitere Insertionszone und erhöhte Festigkeit (Kim et al. 2006)

Scheibel und Habermeyer (2003) entwickelten eine sogenannte arthroskopische Mason-Allen-Naht für Naht-Anker-Reparaturen, nämlich eine Kombination aus einer horizontalen Matratzennaht und einem Einzelstich durch den gleichen doppel-geladenen Knochenanker. Gerber et al. (1994) demonstrierten, dass modifizierte Mason-Allen-Stiche im Vergleich zu einfachen und horizontalen Matratzennähten überlegene Stärken in der offenen Rotatorenmanschettenreparatur aufweisen.

Apreleva et al. (2002), Craft et al. (1996) und Rossouw et al. (1997) berichteten unabhängig voneinander, dass Nahtanker-Reparaturen vergleichbar oder schwächer als traditionelle transossäre Rekonstruktionen sind, während andere Autoren fanden, dass Nahtanker die transossäre Rekonstruktion übertreffen (Burkhart et al. 1997 b, Reed et al. 1996).

1.4 Die Kollagene

Kollagene sind ein wichtiger Bestandteil der meisten Binde- und Stützgewebe (Knorpel, Sehnen, Knochen). Ein Strukturmerkmal aller Kollagene ist die Tripelhelixstruktur, die durch monoton wiederholte Triplet-Sequenzen aus Gly-X-Y bedingt ist. An den Positionen X und Y tritt häufig Prolin und Hydroxylysin auf. Die einzelnen Kollagentypen unterscheiden sich strukturell in der Länge der tripelhelikalen Abschnitte, kurzen Unterbrechungen in der Tripelhelix und in der Anwesenheit zusätzlicher globulärer Domänen. Ihre spezifischen biologischen Eigenschaften erhalten die Kollagene durch die Verknüpfung dieser Besonderheiten. Die Familie der Kollagene wird unterteilt in fibrilläre (I, II, III, V, XI) und nicht-fibrilläre Kollagene (Basalmembrankollagen IV, Multiplexine XV und XVIII, Fibrillen-assoziierte Kollagene IX, XII und XIV, Netzwerk-bildende Kollagene VIII und X, Transmembrankollagene XIII und XVII, sonstige VI, VII) (Deutzmann et al. 2007).

Tab.1.2: Kollagentypen (Welsch 2006)			
Kollagentyp	Aufbau Tripelhelix	Fibrillendurchmesser	Vorkommen/Besonderheiten
Kollagen I	Heterotrimer aus zwei identischen $\alpha_1(\text{I})$ -Ketten und einer $\alpha_2(\text{I})$ -Kette	50-90 nm, Bildung von Faserbündeln	häufigstes Kollagen, Haut, Sehnen, Knochen, Faszien, Organkapseln, Organstroma der meisten Organe, Dentin, Dura mater, Narbengewebe
Kollagen II	Homotrimer aus drei identischen $\alpha_1(\text{II})$ -Ketten	meist sehr dünne Fibrillen, keine Bildung von Faserbündeln, 10-200 nm	Strukturprotein des hyalinen Knorpels, auch im fibrösen und elastischen Knorpel vorhanden, Sklera, Glaskörper
Kollagen III	Homotrimer aus drei identischen $\alpha_1(\text{III})$ -Ketten	20-40 nm	Hauptkomponente Retikulinfasern, Bildung von Netzen, Narbengewebe, Oberfläche von Fett- und Muskelzellen, lymphatische Organe, Gefäßwände, embryonales Bindegewebe

1.4.1 Fibrilläre Kollagene

Die fibrillären Kollagene besitzen charakteristische Faserstrukturen und sind die Hauptkollagene des Bindegewebes von Haut, Knochen, Knorpel, Sehnen und Bändern. Die Bildung von festen Fasern, die Druck- oder Zugbelastung aushalten, ist die Hauptaufgabe der fibrillären Kollagene. Den Anforderungen entsprechend sind die dreidimensionalen Formationen optimiert. In Sehnen z.B., in denen überwiegend Kollagen Typ I vorkommt, sind alle Kollagenfibrillen parallel angeordnet. Dadurch wird maximale Stabilität bei Zugbelastung gewährleistet. Andererseits liegen sie in der Haut (vor allem Kollagen Typ I und Typ III) kreuz und quer, um eine Dehnung in alle Richtungen zu ermöglichen. Im Knorpel bilden dünne Fasern (überwiegend Kollagen Typ II) ein dreidimensionales Netzwerk aus, das auf Druckbelastung ausgelegt ist. Diese strukturellen Besonderheiten gehen aus unterschiedlichen Eigenschaften der Polypeptidketten hervor.

Die Polypeptidketten der fibrillären Kollagene weisen homologe Aminosäuresequenzen auf. Die Domänen-Strukturen sind nahezu identisch, wobei eine große zentrale Domäne das charakteristische Strukturmerkmal ist. Diese zentrale Domäne besteht aus einem tripelhelikalen Abschnitt von 340 Gly-X-Y-Wiederholungen in ununterbrochener Reihenfolge. Zwei nichttripelhelikale Telopeptide, etwa 20 Aminosäuren lang, flankieren die Domäne. Sie sind für die Ausbildung von Quervernetzungen von Bedeutung. An den Enden von neu synthetisierten Kollagenmolekülen sind zusätzliche Domänen, wie das N-Propeptid bzw. C-Propeptid, vorhanden, die je nach Kollagentyp im reifen Molekül nicht mehr oder nur teilweise vorkommen. Außerdem besitzt die Kette noch eine Prä-Sequenz zur Translokation ins endoplasmatische Retikulum (Deutzmann et al. 2007).

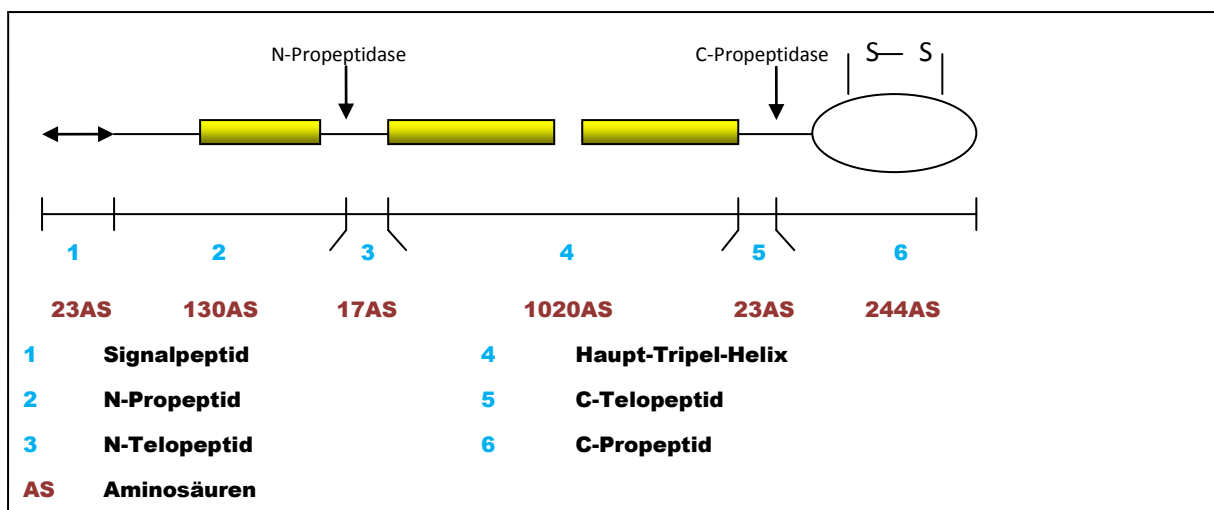


Abb.1.3: Struktur der Polypeptidkette von fibrillären Kollagenen am Beispiel der α_1 (III)-Kette

1.4.2 Biosynthese der fibrillären Kollagene am Beispiel von Kollagen Typ I

Die Synthese von Kollagenen erfolgt an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) in spezialisierten Bindegewebszellen, meist Fibroblasten aber auch Chondro- und Osteoblasten. Bei der Kollagensynthese unterscheidet man eine intrazelluläre und eine extrazelluläre Phase.

Intrazelluläre Biosynthese

Die Synthese der Kollagenketten erfolgt in das Lumen des RER, wobei die Signalsequenz (Präsequenz) abgespalten wird. Es erfolgt die Hydroxylierung von Prolin und Lysin in der Y-Position des Gly-X-Y-Triplets. Diese Reaktion ist Vitamin-C-abhängig (Bornstein 1974). Bei einem Mangel an Vitamin C kommt es zu einer Beeinträchtigung der Hydroxylierung. Infolgedessen kann die Kollagen-Tripelhelix nicht korrekt zusammengesetzt werden. Häufig werden noch O-glycosidisch verknüpfte Disaccharide aus Galactose und Glucose (-O-Gal-Glc) an die hydroxylierten Lysine angehängt. Die beiden Propeptidketten bilden intramolekulare Disulfidbrücken und das C-Propeptid wird mit einem N-glycosidisch gebundenen Zuckerrest derivatisiert.

Anschließend lagern sich drei Polypeptidketten, eingeleitet durch die Aneinanderlagerung der C-terminalen Pro-Domänen, zum Pro-Kollagen-Molekül zusammen. Die Faltung der Tripelhelix erfolgt anschließend vom C-terminalen zum N-terminalen Ende. Zwischen den benachbarten Polypeptidketten bilden die Hydroxylgruppen der Hydroxyproline Wasserstoffbrückenbindungen, wodurch die Tripelhelix bei physiologischen Temperaturen stabil bleibt. Das Endprodukt der intrazellulären Biosynthese ist das Pro-Kollagen (Bornstein 1974). Das Pro-Kollagen gelangt in sekretorischen Bläschen entlang von Mikrotubuli über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche und wird mittels Exozytose in die extrazelluläre Matrix abgegeben.

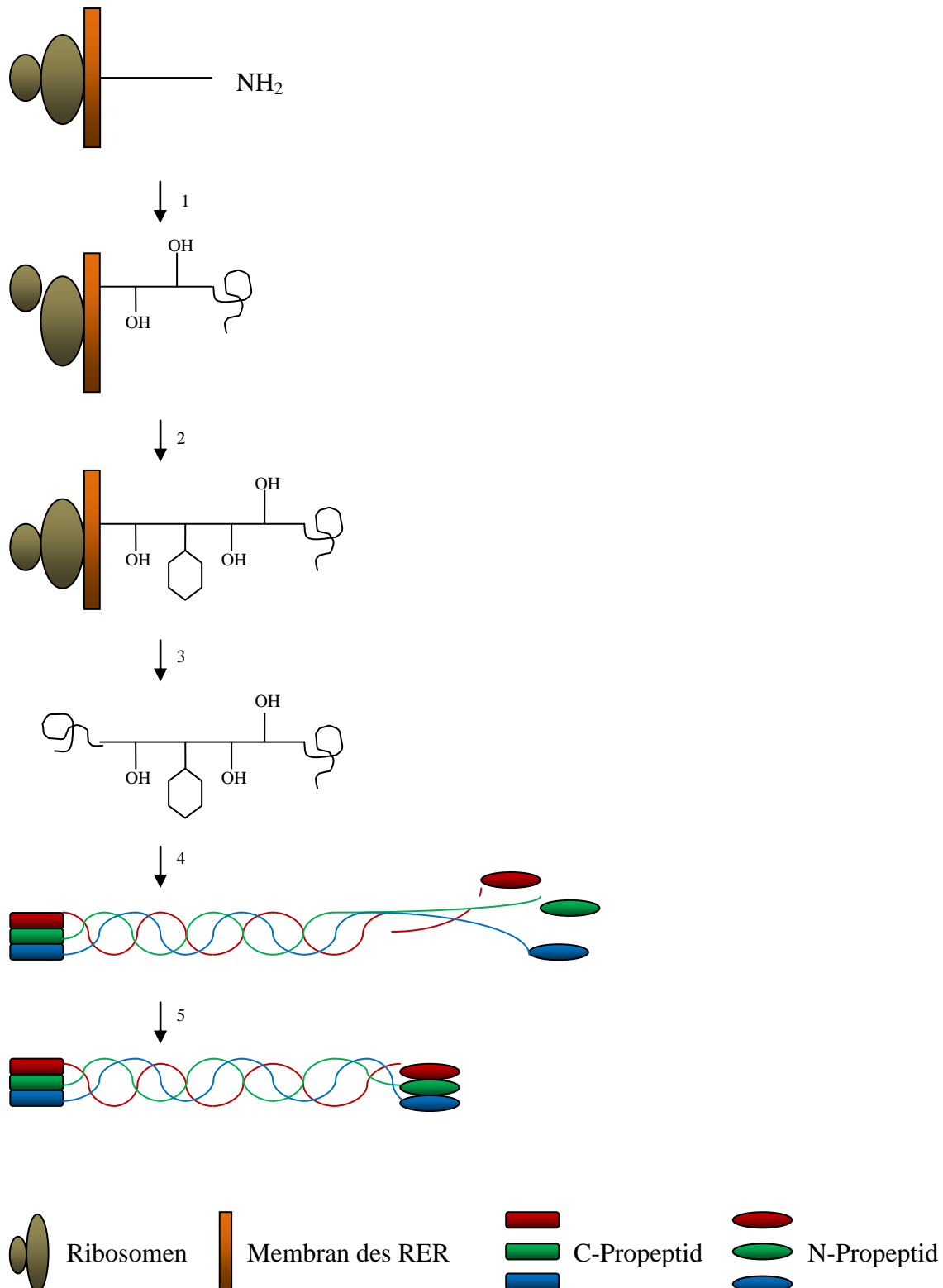


Abb. 1.4: Intrazelluläre Biosynthese: **1** Hydroxylierung von Prolin- und Lysin-Resten; **2** Glycosylierung einzelner Hydroxyl-Lysin-Reste; **3** Polypeptidkette mit N-glycosylierten Propeptiden und Disulfidbrücken; **4** Beginn Tripelhelix-Bildung durch Zusammenlagerung dreier Polypeptidketten; **5** Fertigstellung des tripelhelikalen Pro-Kollagens

Extrazelluläre Biosynthese

In der extrazellulären Matrix werden durch die Aminopropeptidase und die Carboxypropeptidase die N- und C-Propeptide abgespalten, wodurch das Tropokollagen-Molekül gebildet wird. Die einzelnen Tropokollagen-Moleküle lagern sich, jeweils um ein Viertel ihrer Länge verschoben, einander seitlich an und bilden Quervernetzungen aus. Die noch nicht quergestreiften Filamente vergrößern sich durch weitere Anlagerung von Tropokollagen-Molekülen zu den periodisch quergestreiften Kollagenfibrillen. Durch Aggregation vieler Kollagenfibrillen und deren Quervernetzung durch Proteoglycane entstehen schließlich die Kollagenfasern (Bornstein 1974).

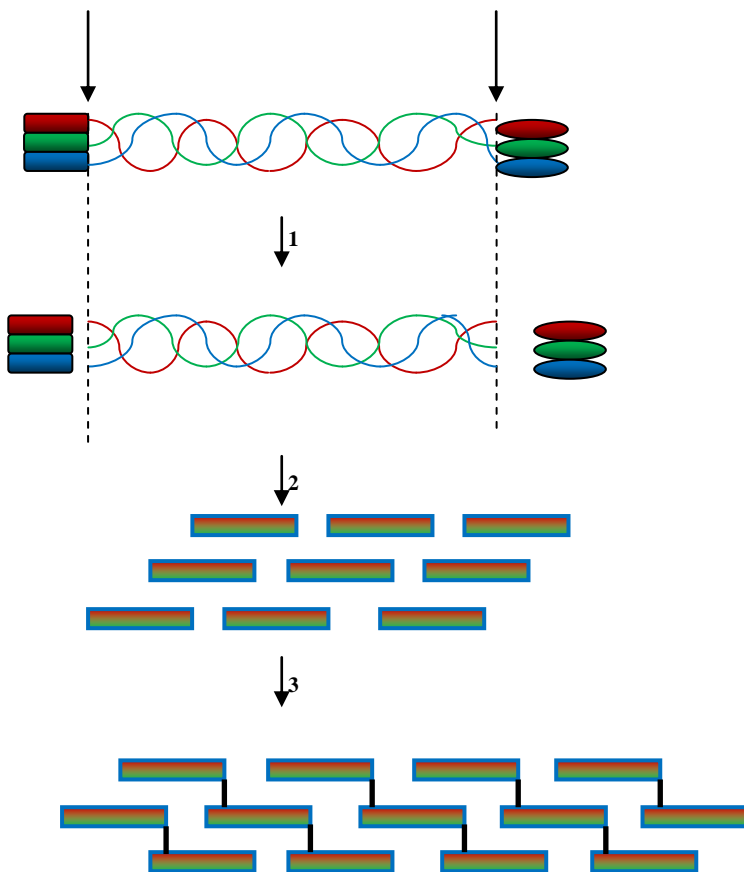


Abb. 1.5: Extrazelluläre Biosynthese: **1** Abspaltung der N- und C-Propeptide; **2** Seitliche Aneinanderlagerung der Tropokollagen-Moleküle; **3** kovalente Quervernetzungen

Kollagenfasern sind zugfest und kaum dehnbar. Deshalb sind sie ideales Material für Sehnen, Bänder, Faszien, Organkapseln und für die Lederhaut. Kollagenfasern verlaufen im lichtmikroskopischen Präparat leicht gewellt und sind 1-10 μm (selten bis 20 μm) dick (Welsch 2006).

Die Kollagenfasern lassen sich durch verschiedene Färbemethoden unterschiedlich anfärben:

- H.E \rightarrow rot
- van Gieson \rightarrow rot
- Azan \rightarrow blau
- Masson-Trichrom \rightarrow blau
- Goldener \rightarrow türkisgrün
- Versilberung \rightarrow braun.

1.4.3 Der Einfluss der Kollagentypen auf die Sehnen-Knochen-Verbindungsfläche

Nach Gillard et al. (1979) existiert eine Korrelation zwischen mechanischer Kraft in einer Sehne und ihrer Matrixorganisation und –zusammensetzung. Die biomechanischen Eigenschaften der Sehnen-Knochen-Verbindungsfläche hängt größtenteils von der Struktur der extrazellulären Matrix und insbesondere von der molekularen Organisation des Kollagenetzwerkes ab (Liu et al. 1997). Die Synthese, Zusammensetzung und Remodulation des Kollagens sind für die korrekte Funktion der Insertionsseite verantwortlich (Cooper und Misol 1970). Die Menge an Kollagen und die Kollagentypen beeinflussen die Fähigkeit der Sehne, Belastungen stand zu halten (Liu et al. 1997). Die Funktion des Kollagens an der Insertionsseite ist Belastung zu tragen und die Kollagenfasern wirken wie eine physikalische Brücke, die die Zonen zusammen hält (Cooper und Misol 1970). Deshalb werden die biomechanischen Eigenschaften und die Stabilität der Sehnen-Knochen-Insertion durch Kollageneigenschaften, wie dem Typ, der Menge und der Vernetzung beeinflusst (Cooper und Misol 1970).

Kollagen ist die Hauptmatrixkomponente und das bedeutende Strukturprotein von allen Bindegeweben (Riley et al. 1994). Es stellt ca. 75% des Trockengewichts der Sehne dar (Canoso 1981). Die Kollagenzusammensetzung variiert mit Alter und Pathophysiologie. Kollagen Typ I beherrscht primär die gesunde Sehne (Von der Mark 1981). Eine Untersuchung von Riley et al. (1994) an biopsierten menschlichen Proben zeigt, dass

Kollagen Typ I mehr als 60% der Supraspinatussehnenrockenmasse ausmacht, während Kollagen Typ III lediglich 1-2% umfasst.

Nach einer Verletzung wird während der frühen Phase der Wundheilung ein erhöhter Anteil Kollagen Typ III produziert (Williams et al. 1984). Dieses wird allmählich durch Kollagen Typ I ersetzt, bis das Narbengewebe reift und die normale mechanische Festigkeit der Wunde zurückkehrt (Williams et al. 1984). Trotz allem ist noch viele Monate nach Verletzung eine abnorme Kollagenzusammensetzung zu beobachten (Williams et al. 1984). Das Fortbestehen von Kollagen Typ III in heilenden Sehnenläsionen könnte nachteilig für die biomechanischen Eigenschaften und für die Stabilität der Sehne sein (Williams et al. 1984).

1.5 Aufgabenstellung

Der Zweck dieser in-vivo-Studie ist die zeitabhängige histologische und immunhistologische Untersuchung der Kollagen-Typ-I-, -Typ-II- und -Typ-III-Verteilung in der Infraspinatussehne der Schafsschulter nach single-row- und double-row-Naht-Anker-Rekonstruktion.

Vorherige experimentelle Untersuchungen haben unter der Ratte, dem Hund, der Ziege und dem Schaf (St. Pierre et al. 1995, Oguma et al. 2001, Galatz et al. 2006) die Schafsschulter als bestes Tiermodell für die Untersuchung der menschlichen Rotatorenmanschettenreparatur ermittelt (Gerber et al. 1994, Gerber et al. 1999, Lewis et al. 1999, Lewis et al. 2001, Schlegel et al. 2006, Schlegel et al. 2007, Turner 2008). Die Anatomie der Infraspinatussehne eines Schafes ist der einer menschlichen Supraspinatussehne sehr ähnlich. Aufgrund dieser Ähnlichkeit und der bisherigen Erfahrungen (Klinger et al. 2007) wurde wieder dieses Schafmodell gewählt. In dieser Studie wurde das Verfahren der offenen Rekonstruktion durchgeführt, da durch die anatomisch bedingte räumliche Enge der Schafsschulter eine allarthroskopische Reparatur technisch fast unmöglich ist.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemein vorbereitende Maßnahmen

2.1.1. Tiere

Die Studie wurde an 22 skelettal reifen weiblichen Merino-Schafen mit einem durchschnittlichen Gewicht von $57,1 \pm 8,5$ kg (Klinger et al. 2009) durchgeführt. Alle Tiere wurden von einem Tierarzt auf einen guten physiologischen Zustand, Knochenreife, ähnliches Gewicht, normalen Gang und natürliche Schulterbewegung untersucht. Die Studie wurde mit der Zustimmung der lokalen staatlichen Behörde für den Schutz der Tierrechte im Einklang mit dem Tierschutzgesetz für den Einsatz von Labortieren durchgeführt. Als unbehandelte Kontrolle wurden Kadaver-Schultergelenke von weiblichen Merino-Schafen identischer Alters- und Knochenreife sowie identischen Gewichts genutzt.

2.1.2. Chirurgisches Vorgehen

Vor der Operation fasteten die Tiere für 24 Stunden. Die Tiere wurden mit 2% Xylazin-Hydrochlorid und Atropin intramuskulär vorbehandelt. Die Anästhesie wurde mit Natrium-Thiopental intravenös induziert. Nach Intubation wurde die Narkose mit Isofluran und Lachgas nach Standardverfahren eingeleitet. Während der Operation wurde prophylaktisch ein Breitspektrumantibiotikum verabreicht. Die Schafe wurden in einer seitlichen Dekubitus-Position platziert und die zufällig ausgewählte Vordergliedmaße steril vorbereitet. Über dem Schultergelenk wurde eine 12 cm gebogene Inzision angelegt. Wie in früheren Untersuchungen (Baums et al. 2008, Klinger et al. 2007) wurde die Infraspinatussehne scharf von ihrem Ansatz abgetrennt, um einen Totaldefekt nachzustellen. (Gerber et al. 1999, Lewis et al. 1999, Lewis et al. 2001). Vor der Wiederbefestigung der Sehne wurde mit einer Kürette eine blutende Oberfläche geschaffen und der gesamte fibröse Knorpel entfernt. Der kortikale Knochen an der Insertionsseite wurde intakt belassen. Es wurden doppelt-geladene Nahtanker (Duet Nahtanker; Conmed Linvatec, Largo, Florida, USA) in Verbindung mit geflochtenem nichtresorbierbarem Nahtmaterial – Nr. 2 Ethibond® (Ethicon, Sommerville, New Jersey, USA) genutzt.

Die beiden Gruppen wurden wie folgt behandelt:

- Gruppe 1: single-row-Technik: eine Reihe mit zwei doppelt-geladenen Nahtankern und arthroskopischer Mason-Allen-Naht – einer Kombination aus horizontaler Matratze und einem Einzelstich (Abb. 2.1)
- Gruppe 2: double-row-Technik: vier doppelt-geladene Nahtanker in zwei Reihen und arthroskopische Mason-Allen-Naht (Abb. 2.2)

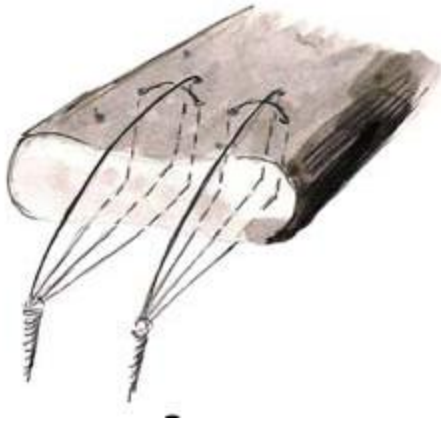


Abb. 2.1: single-row-Technik
(Baums et al. 2009, S. 1467)



Abb. 2.2: double-row-Technik
(Baums et al. 2009, S. 1467)

Jeder Anker wurde in einem Winkel von 45° zu der Diaphyse des Humerus in den Knochen inseriert, wie von Burkhart (1995) empfohlen. Im Laufe des Verfahrens wurde zu keinem Zeitpunkt eine Vorspannung auf die Sehne angewandt. Alle Operationen wurden in einem offenen Milieu, jedoch mit Instrumenten für arthroskopische Reparatur (Spectrum Tissue Repair System, ConMed Linvatec) durchgeführt.

Postoperativ wurden für drei Tage die Analgetika Tramadol (50 mg) und Mazol (1,2 g) intramuskulär injiziert. Am Huf der operativ behandelten Gliedmaße wurde ein weicher Ball im Durchmesser 10 cm angebracht, um das tragende Gewicht zu reduzieren (Gerber et al. 1999). Die ersten sechs Wochen wurden die Tiere in einem schmalen Gehege gehalten, um ihre Aktivität zu limitieren. Nach sechs Wochen wurde der Ball entfernt und unbeschränkte Aktivität war erlaubt.

2.1.3. Gewebeprobengewinnung

Nach 1, 2, 3, 6, 12 und 26 Wochen postoperativ wurde bei den Schafen eine tiefe allgemeine Anästhesie mit einer Überdosis an Kalium-Chlorid und Natrium-Thiopental eingeleitet. Jeder Infraspinatussehnen-Muskel-Komplex und dessen korrespondierender Humerus der operierten Seite wurden entnommen und makroskopisch auf Gewebeintegrität untersucht. Darüber hinaus wurden Infraspinatussehnen direkt post mortem von frischen Schaf-Kadavern entnommen, um die Histologie der unbehandelten Sehnen-Knochen-Insertion zu untersuchen.

2.1.4 Gewebepräparation

Zu den 6 Zeitpunkten wurden 2×2×1 cm³ Gewebeproben von der Insertionsseite des Infraspinatusmuskels aus den experimentellen Gruppen, sowie aus zwei gesunden unbehandelten Schafen entnommen

2.1.5 Gewebevorbereitung, Einbetten und Schneiden

Für lichtmikroskopische Untersuchungen werden die Gewebeproben über Nacht in gepufferter 4% Formaldehydlösung bei 4°C fixiert.

Gepuffertes Formalin nach Lillie, pH 7,4

1. 100 ml 37 % Formalin (Merck)
2. 333 ml 0,3M Sörensen-Puffer
3. 566 ml aq. dest.

0,3 M Sörensen, pH 7,4Lösung A (Kaliumdihydrogenphosphat): bei 4°C lagern

41,37 g KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)

1 l aq. dest

Lösung B (Di-Natriumhydrogenphosphat): bei RT lagern

42,37 g Na_2HPO_4 (Di-Natriumhydrogenphosphat)

1 l aq. dest

→ für 0,3 M Sörensen Puffer 18,2 ml Lsg. A + 81,8 ml Lsg. B mischen

Da es sich bei den verwendeten Proben um Knochen-Knorpel-Sehnen-Präparate handelt, mussten diese schonend entkalkt werden, um einerseits eine gute Schnittqualität am Mikrotom zu gewährleisten, andererseits um die Struktur unverändert studieren zu können. Für die schonende Entkalkung wurde die EDTA-Methode gewählt. Diese wiederum war mit einem nicht unerheblichen Zeitaufwand verbunden, da stark knöchern durchbaute Präparate bis zu 6 Monate zur Dekalzifizierung benötigten. Die Herstellung einer 20%-EDTA-Lösung erfolgte folgendermaßen:

1 Liter Ansatz 20% EDTA, pH 7,4:

1. 895 ml aq. dest.
2. 105 ml Natronlauge (NaOH)
3. 200 g Ethylendiamintetraacetic acid disodium salt dihydrat (E5134-1KG, Sigma-Aldrich)

In brauner Flasche auf Magnetrührer bei 50-70°C für 1 Stunde rühren, pH kontrollieren und bei RT lagern.

Nach erfolgter Entkalkung wurden die Proben gewässert, über Nacht in 70 % Ethanol gelagert und anschließend im Einbettautomaten (Duplex Processor, Shandon Elliot, Cheshire, England) wie folgt dehydriert.

Tabelle 2.1: Abfolge im Einbettautomaten		
Pos.1	70% Ethanol	3h
Pos. 2	80% Ethanol	1h
Pos. 3	90% Ethanol	1h
Pos. 4	96% Ethanol	1h
Pos. 5	absoluter Alkohol	2h
Pos. 6	Isopropylalkohol	2h
Pos. 7	Isopropylalkohol	1,5h
Pos. 8	Xylol	30min
Pos. 9	Xylol	45min
Pos. 10	Xylol	45min
Pos. 11	Paraplast 52°C	6h
Pos. 12	Paraplast 56°C	4,5h

Anschließend wurden die dehydrierten Gewebeproben in speziellen Formen platziert und mit Hilfe einer Ausgießstation in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke härteten über Nacht aus. Für die histologische Untersuchung wurden Serienschnitte (5-7 µm) mit einem Jung Biocut 2035-Mikrotom (Leica, Nussloch, Deutschland) angefertigt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf Objektträger (Superfrost®Plus, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) überführt und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

2.1.6 Histologische Färbungen für Lichtmikroskopie

Die Präparate müssen für eine bessere Kontrastierung der einzelnen Zell- und Gewebsbestandteile gefärbt werden. Dem Schnitt muss zunächst durch ein geeignetes Lösungsmittel (Xylol) das Paraffin vollständig entzogen und anschließend das Lösungsmittel entfernt werden (durch Alkohol), und schließlich muss dieses wieder durch Wasser vollständig ersetzt werden. Die Farbstoffe werden von den Zell- und Gewebs-elementen in unterschiedlichen Mengen aufgenommen. Dabei spielt u.a. auch der pH- Wert eine wichtige Rolle.

Für die topographische Orientierung wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll mit Trichrom gefärbt.

Tabelle 2.2: Färbeprotokoll Trichrom	
1. Xylol	10min
2. absoluter Alkohol	2min
3. 96% Alkohol	2min
4. 80% Alkohol	2min
5. 60% Alkohol	2min
6. aq. dest.	2min
7. Eisenhämatoxylin nach Weigert¹	2min
8. fließendes Leitungswasser	3min
9. Azophloxin²	9min
10. 1% Eisessig³	5min
11. Phosphorwolframsäure + Orange G⁴	1min
12. 1% Eisessig	1min
13. Lichtgrün⁵	1min
14. 1% Eisessig	5min
15. 60% Alkohol	2min
16. 80% Alkohol	2min
17. 96% Alkohol	2min
18. absoluter Alkohol	4min
19. Xylol	5min

¹Eisenhämatoxylin nach Weigert:

Lösung A: 5,0 g Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland) in
500 ml 96%ig Alkohol lösen

Lösung B: 5,8 g Eisen-III-chlorid in (Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe,
Deutschland)
490 ml aq. dest.
5 ml 25%ige HCl (Salzsäure)

Unmittelbar vor Gebrauch Lösung A und B im Verhältnis 1:1 mischen. Haltbarkeit höchstens
8 Tage, getrennt jahrelang.

²Azophloxin:

4,5 g Azophloxin (Waldeck GmbH und CoKG, Münster, Deutschland) in
900 ml aq. dest. lösen und
1,8 ml Eisessig zugeben

³1 % Eisessig:

1 ml Essigsäure auf 100 ml aq. dest.

⁴Phosphorwolframsäure + Orange G:

36 g Phosphorwolframsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
18 g Orange G (Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland)
900 ml aq. dest.

⁵Lichtgrün:

1,35 g Lichtgrün (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
900 ml aq. dest.
1,8 ml Eisessig

Durch Trichromfärbungen lassen sich Gewebearten färberisch gut voneinander unterscheiden. Kollagenfaserreiches Bindegewebe hebt sich durch eine grüne Färbung deutlich ab. Differenzierungsschritte zwischen den Farbreaktionen verstärken das kontrastreiche Färbeergebnis. Bei der Trichromfärbung nach Goldner werden zunächst die Zellkerne mit Eisenhämatoxylin blau-schwarz gefärbt, das Zytoplasma mit Säurefuchsin-Ponceau rötlich

braun, anschließend die Kollagenfasern und mineralisierte Hartgewebmatrix mit Lichtgrün türkisgrün dargestellt.

Toluidin Blue O, gehört zu den Thiazinfarbstoffen. Die Toluidin-Blue-O-Färbung bietet Differenzierungsmöglichkeiten durch metachromatische Farbeffekte. Metachromatische Färbungen beobachtet man an Mukopolysacchariden (z.B. in Knorpelsubstanz).

Mineralisierte Hartgewebe bleiben ungefärbt bis blassblau, Zellen, Zellkerne, Osteoidsäume, Kittlinien, Kollagenfasern sind blau, Mastzellengranula, Knorpelmatrix, frühe Wundheilungsareale metachromatisch rotviolett gefärbt.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 2.3: Färbeprotokoll Toluidin-Blue-O-Färbung	
1. Xylol	10min
2. absoluter Alkohol	2min
3. 96% Alkohol	2min
4. 80% Alkohol	2min
5. 60% Alkohol	2min
6. aq. dest.	2min
7. 0,04% Toluidin Blue O¹	10min
8. aq. dest.	2min
9. fließendes Leitungswasser	30s
10. 0,1% Fast Green²	2min
11. fließendes Leitungswasser	30s
12. aq. dest.	2min
13. 60% Alkohol	1min
14. 80% Alkohol	1min
15. 96% Alkohol	1min
16. absoluter Alkohol	4min
17. Xylol	5min

¹0,04 % Toluidin Blue O:

0,2 g Toluidin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

0,41 g Natriumacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

500 ml aq. dest.

²Fast Green:

0,1 g Fast Green (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

100 ml aq. dest.

Die Objektträger wurden nach den Färbungen mit Objektträger-Gläschen und einem Einbettmedium (Eukitt, Sigma-Aldrich) eingedeckt und anschließend kurzzeitig bei RT getrocknet.

2.2 Immunhistologische Färbung

2.2.1 Allgemein zur Methode

Die immunhistologische Färbung ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer chemischer Verbindungen, insbesondere Peptide und Proteine, mit Hilfe von Antigen-Antikörper-Reaktionen - ein spezifischer Antikörper (z.B. aus Serum immunisierter Tiere gewonnen) reagiert auf Gewebeschnitten mit dem passenden Antigen. Ein Gewebeschnitt, in dem eine bestimmte chemische Komponente – ein Antigen - nachgewiesen werden soll, wird mit einer Lösung inkubiert, in der ein spezifischer Antikörper gegen das gesuchte Antigen enthalten ist. Der Antikörper bindet an den Bereichen in Zellen oder im extrazellulären Raum, an denen das Antigen vorkommt und weist dieses somit nach. Die Sichtbarmachung der Reaktion kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Der Antikörper kann mit einer fluoreszierenden Substanz markiert sein, oder der Antikörper wird in einem zweiten Reaktionsschritt mit einem weiteren Antikörper, der mit einem Enzym markiert ist (oft Peroxidase), nachgewiesen.

2.2.2 Antigendemaskierung

Die Fixation des Gewebes mit Formalin verursacht Aldehydvernetzungen der Proteine, welche die zu detektierenden Antigene maskieren können. Durch einen Kochvorgang im Citratpuffer (pH 6,0) werden im Präparat durch Entfernung von Kalzium-Ionen, bestehende Quervernetzungen aufgebrochen, wodurch die Ursprungskonformation des betreffenden Epitops wieder hergestellt wird. Antikörper können die Epitope nun wiedererkennen.

Die Herstellung des Citratpuffers erfolgt folgendermaßen:

Lösung A: 4,2 g Zitronensäuremonohydrat ($C_6H_8O_7$) (Merck, Darmstadt, Deutschland) werden in 200 ml aq. dest. Gelöst

Lösung B: 26,4 g Trinatriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$) (Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland) werden in 1 Liter aq. dest. gelöst.

18 ml von Lösung A und 82 ml von Lösung B mit 900 ml aq. dest. auf 1 l auffüllen.

Der pH- Wert ist auf 6,0 einzustellen (wenn zu niedrig mit Lösung B)

2.2.3 Die immunhistologische Färbung mit Hilfe des DAKO REAL™ Detection Systems

Das DAKO REAL™ Detection System wird in einem Drei-Schritt-Verfahren (Abb. 2.3) eingesetzt. Das Gewebe wird zuerst mit einem optimal verdünnten primären Kaninchen- oder Mausantikörper, anschließend mit DAKO REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) und zuletzt mit DAKO REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP) inkubiert. Die Reaktion wird mit RED Chromogen sichtbar gemacht.

DAKO REAL™ Detection System beruht auf einem indirekten Streptavidin-Biotin-Verfahren. Der biotinylierte sekundäre Antikörper reagiert gleich gut mit den Immunglobulinen von Kaninchen und Maus. Mit Hilfe eines Spacerarms aus 7 Atomen wurde der sekundäre Antikörper optimal mit Biotin markiert. Jedes biotinylierte Antikörper-Molekül kann mit mehreren mit alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidin-Molekülen reagieren, wodurch die Empfindlichkeit des Detektionssystems erhöht wird. Die Konjugation von Streptavidin, das aus *Streptomyces avidinii* isoliert wurde und alkalischer Phosphatase, aus der Schleimhaut des Kalbsdarms gewonnen, erfolgte nach einem vereinfachtem Zweischnitt-Glutaraldehydverfahren. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Farbreaktion.

Bei dem Substratchromogen handelt es sich um ein Fast RED-Chromogen, das aus vier Komponenten besteht: Chromogen Red 1, Chromogen Red 2, Chromogen Red 3 und AP Substrat Buffer. Das Substratchromogen führt zu einer kontrastreichen roten Färbung am Ort des Zielantigens.

Abb. 2.3 zeigt das Reaktionsprodukt schematisch.

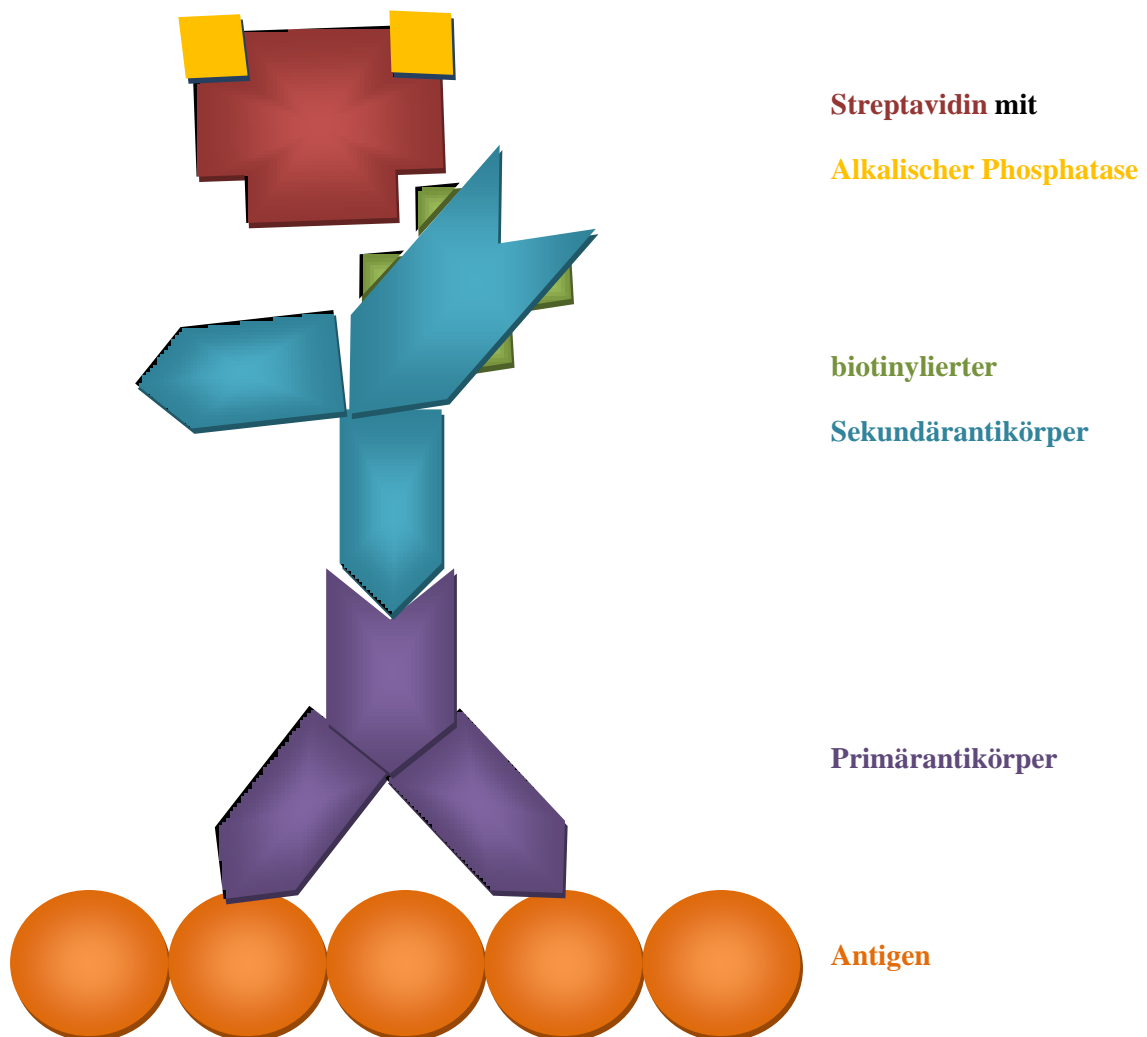


Abb. 2.3: Schemazeichnung der Drei-Schritt-Technik

2.2.4 Protokoll der immunhistologischen Darstellung von Kollagen I, II und III

Um das zu bestimmende Kollagen lichtmikroskopisch sichtbar zu machen, wurden die Gewebeschnitte mit dem DAKO REAL™ Detection System nach folgendem Färbeprotokoll angefärbt.

1. 10 min entparaffiniert (Xylol), rehydriert in 3 min Schritten (absteigende Alkoholreihe: 100%, 96%, 80%, 60%, 50%)
2. 10 min in Küvette mit 1×PBS (pH 7,4) gewaschen
10 min Citratpuffer auf 95°C vorheizen
3. Einbringen der Objektträger in vorgeheizten, aber nicht kochenden **Citratpuffer (0,1M)** für 25 min
4. Abkühlung in kaltem Leitungswasser
5. 10 min in Küvette mit 1×PBS (pH 7,4) gewaschen
6. Inkubation mit 150-200 µl (je nach Schnittgröße) Primärantikörper über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Folgende Primärantikörper wurden bei dieser Studie verwendet:

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Primärantikörper. Die Immunhistologie wurde an Paraffinschnitten mit der LSAB-Methode durchgeführt.

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Quelle
Kollagen I	Anti-human-Typ-I-Kollagen monoklonal (Maus)	1:250 in 1×PBS	MP Biomedicals, LLC., Ohio
Kollagen II	Anti-human-Typ-II-Kollagen monoklonal (Maus)	1:250 in 1×PBS	MP Biomedicals, LLC., Ohio
Kollagen III	Anti-human-Typ-III-Kollagen monoklonal (Maus)	1:250 in 1×PBS	MP Biomedicals, LLC., Ohio

Die Negativkontrolle wurde ohne Primärantikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu erkennen.

7. 10 min in Küvette mit 1×PBS (pH 7,4) gewaschen
8. 15 min Inkubation mit **Sekundärantikörper: LINK, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)** (DAKO REAL™) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

9. 5 min in Küvette mit 1×PBS (pH 7,4) gewaschen
10. 15 min Inkubation mit **Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)** (DAKO REAL™) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
11. 5 min in Küvette mit 1×PBS (pH 7,4) gewaschen
12. 4 min **Chromogenlösung**: 750µl AP-Buffer, 30µl Chomogen Red 1, 30µl Chomogen Red 2, 30µl Chromogen Red 3 bei Raumtemperatur
13. 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült
14. 1 min gegengefärbt mit **Hämalaun nach Meyer`s** 1:4 verdünnt mit aq. dest.
15. 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült
16. Dehydriert in 3 min Schritten (aufsteigende Alkoholreihe 50%, 60%, 80%, 96%, 100%, Xylol 5 min)
17. Eingedeckt mit Objektträgergläschen und Einbettmedium (Eukitt, Sigma-Aldrich)

10×PBS

81,8 g NaCl (Natriumchlorid)

2 g KCl (Kaliumchlorid)

16 g Na₂HPO₄ (Di-Natriumhydrogenphosphat)

2 g KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)

1 l aq. dest

pH überprüfen, ggf. Einstellung mit HCl oder NaOH

1×PBS: 10×PBS 1:10 mit aq. dest verdünnen

0,1M Citratpuffer

Lösung A: 4,2 g Zitronensäuremonohydrat (Merck) (C₆H₈O₇) in 200 ml aq. dest gelöst

Lösung B: 26,4 g Trinatriumcitrat (Roth) (C₆H₅Na₃O₇×2H₂O) in 1 l aq. dest gelöst

18 ml von Lsg. A und 82 ml von Lsg. B werden mit 900 ml aq. dest auf 1 Liter aufgefüllt

3. Ergebnisse

3.1 Lichtmikroskopische Histologie des unbehandelten Knochen-Sehnen-Komplexes

Der Knochen-Sehnen-Komplex ist aus vier histologisch unterschiedlichen Zonen aufgebaut: dem Knochen, der in eine dünne Zone mineralisierten Faserknorpel übergeht, gefolgt von nicht-mineralisiertem Faserknorpel, an dem allmählich die Sehne anschließt (Abb. 3.1). In der Sehne kommen hauptsächlich dichte parallele Kollagenfaserbündel vor, zwischen denen Tendinozyten eingebettet sind.

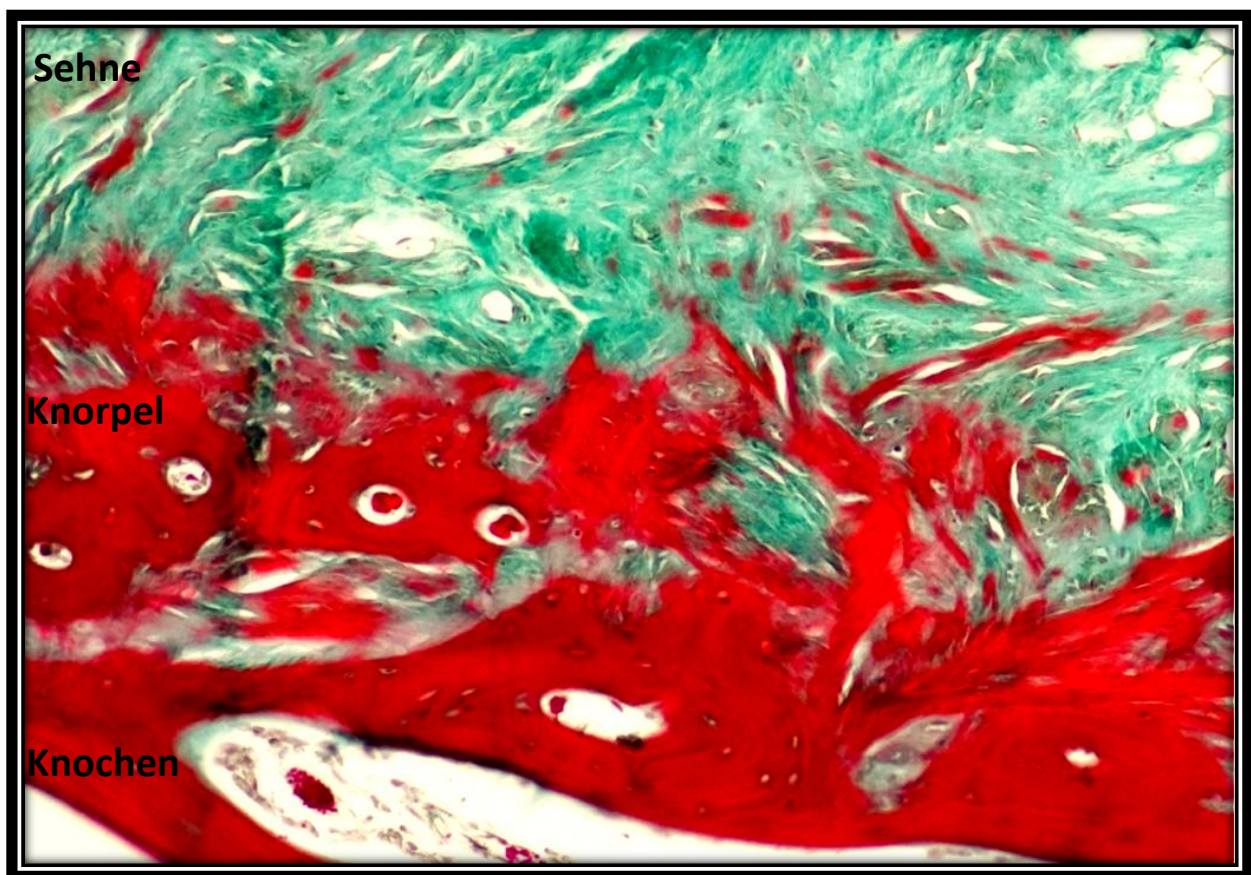


Abb. 3.1: lichtmikroskopische Histologie des Knochen-Sehnen-Komplexes unbehandelter Kontrolltiere. Die Trichrom-Färbung zeigt Knochengewebe, das mit der Sehne interagiert. Zwischen diesen beiden Geweben ist eine dünne Zone Faserknorpel.

3.2 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Histologie des mittels single- und double-row-Technik behandelten Knochen-Sehnen-Komplexes

Der Hauptunterschied zwischen behandelten Tieren und Kontrolltieren wurde in der Faserknorpelzone gefunden. Bereits in der ersten Woche kam es zu einer initialen Vermehrung des Faserknorpels, der sich ab der zwölften Woche wieder reduzierte. Drei Wochen nach double-row-Rekonstruktion kam es zu einer Zusammenlagerung von Chondrozyten zu Clustern, die in der 26. Woche nicht mehr vorhanden waren.

3.3 Proteoglycengehalt

Die Toluidinblau-Färbung dient dem Nachweis von Glycosaminoglycanen der im Faserknorpel vorhandenen Proteoglycane. Aus diesem Grund demonstriert die Toluidinblau-Färbung die Faserknorpelzone des Knochen-Sehnen-Komplexes. Geringe Mengen an Glycosaminoglycan wurden bei den Gewebeproben der Kontrolltiere durch eine schwache Blau-Färbung des Faserknorpels gekennzeichnet (Abb. 3.2).



Abb. 3.2: Toluidinblau-Färbung der unbehandelten Kontrolltiere

Eine Woche post operationem war in der single-row-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine intensivere Violett-Färbung der Knorpelzone zu erkennen (Abb. 3.5 a).

Auch eine Woche nach double-row-Rekonstruktion zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine intensivere Violett-Färbung der Knorpelzone (Abb. 3.5 b).

Zwei Wochen nach single-row-Rekonstruktion war eine starke Blau-Färbung der Knorpelzone erkennbar (Abb. 3.5 c).

Gleichermäßen zeigte sich eine Farbtintensität zwei Wochen nach double-row-Rekonstruktion (Abb. 3.5 d).

Drei Wochen nach single-row-Rekonstruktion zeigte sich eine intensivere Blau-Färbung als in der zweiten Woche (Abb. 3.5 e).

Drei Wochen nach double-row-Rekonstruktion lagerten sich die Chondrozyten zu Clustern zusammen (Abb. 3.3). Im Vergleich zur single-row-Gruppe zeigte sich drei Wochen nach double-row-Rekonstruktion eine starke Violett-Färbung der Knorpelzone (Abb. 3.5 f).

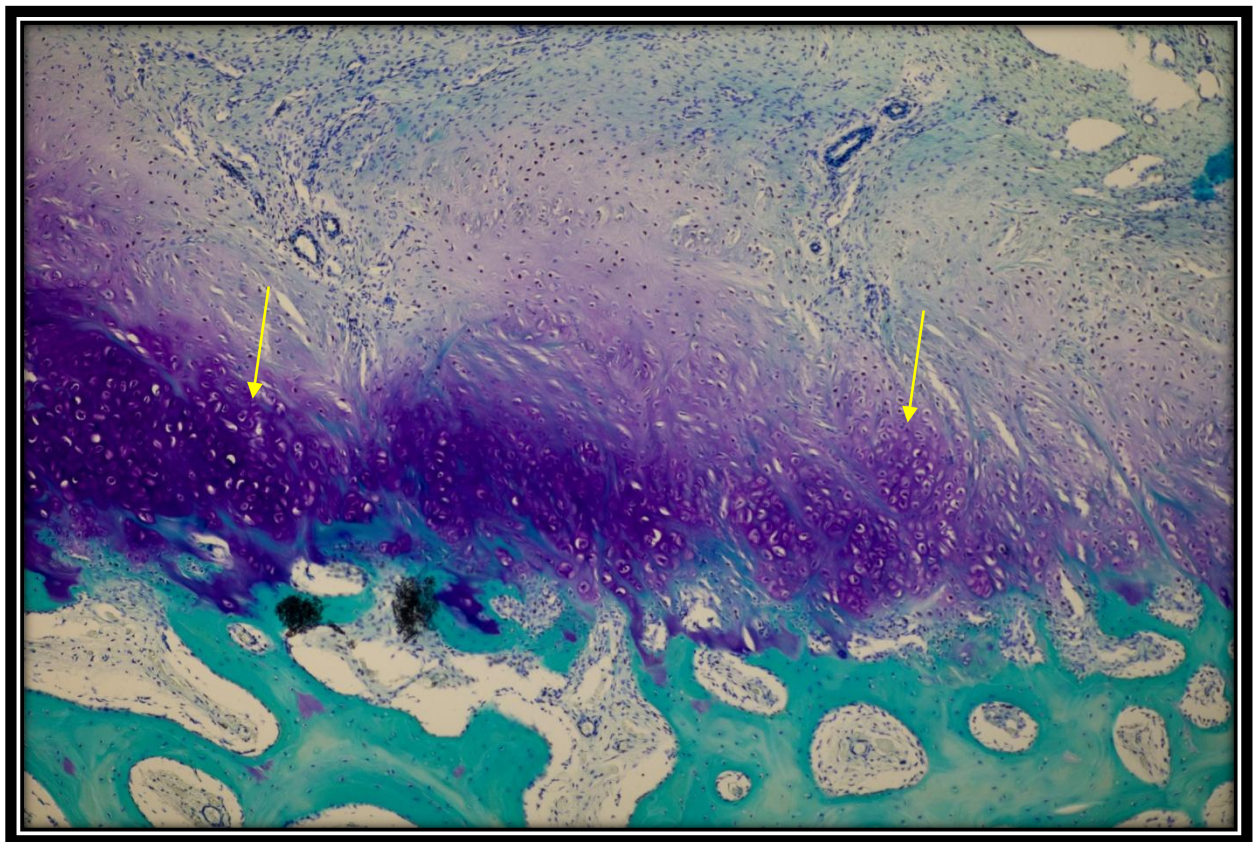


Abb. 3.3: Toluidinblau-Färbung drei Wochen nach double-row-Rekonstruktion, Zusammenlagerung der Chondrozyten zu Clustern (gelber Pfeil)

Auch sechs Wochen post operationem ließ sich eine intensivere Violett-Färbung und Chondrozyten-Cluster in der double-row-Gruppe erkennen (Abb. 3.4, Abb. 3.5 h).

Sechs Wochen nach single-row-Rekonstruktion zeigte sich, vergleichbar zur dritten Woche, eine starke Blau-Färbung der Knorpelzone. Eine Zusammenlagerung der Chondrozyten zu Clustern fand in der single-row-Gruppe nicht statt (Abb. 3.5 g).

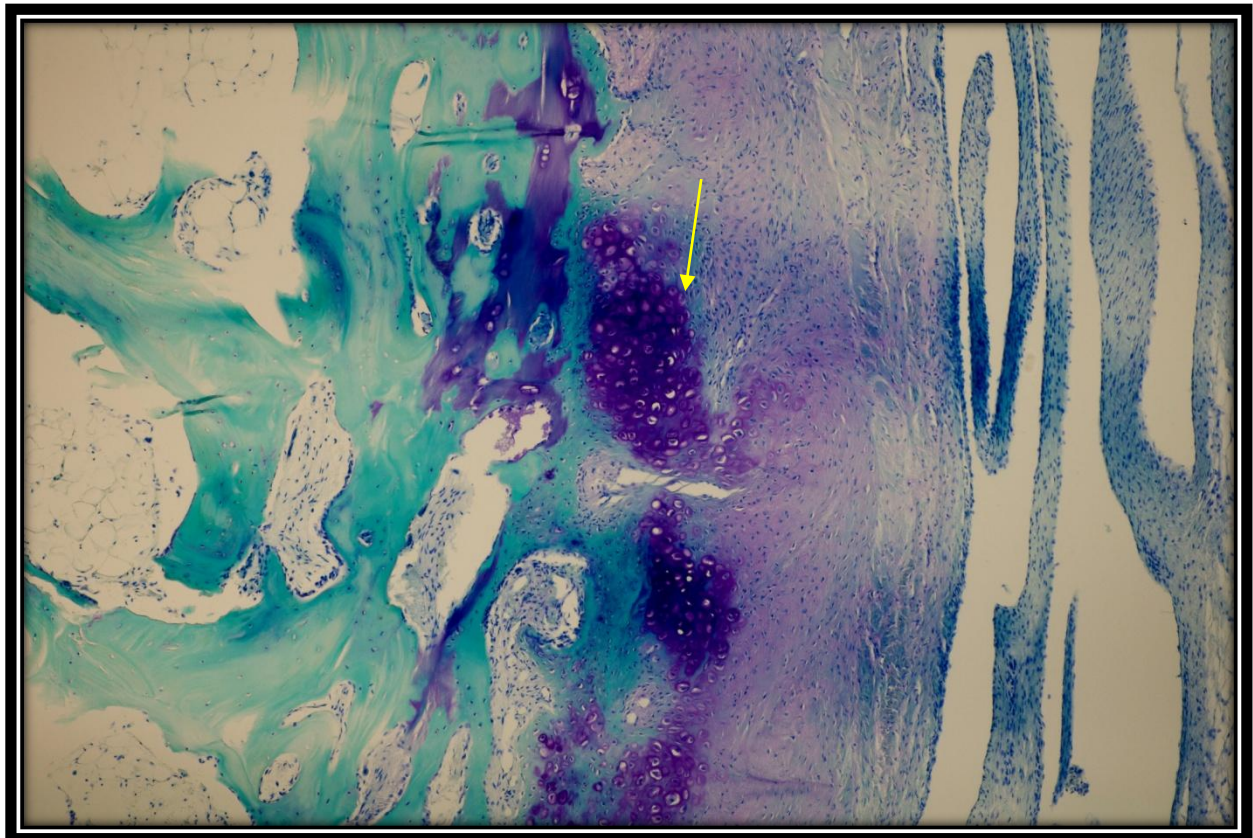


Abb. 3.4: Chondrozyten-Cluster (gelber Pfeil) sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion, Toluidinblau-Färbung

Zwölf Wochen post operationem kam es in der double-row-Gruppe im Vergleich zur single-row-Gruppe zu einer intensiveren Färbung der Knorpelzone (Abb. 3.5 i+j). Weiterhin war ein Fortbestehen der Chondrozyten-Cluster in der double-row-Gruppe erkennbar (Abb. 3.5 j).

26 Wochen post operationem zeigte sich in der single-row-Gruppe die gleiche Intensität der Blau-Färbung wie in der double-row-Gruppe (Abb. 3.5 k+l). Die Chondrozyten-Cluster waren 26 Wochen nach double-row-Rekonstruktion nicht mehr zu finden (Abb. 3.5 l).

single-row

double-row

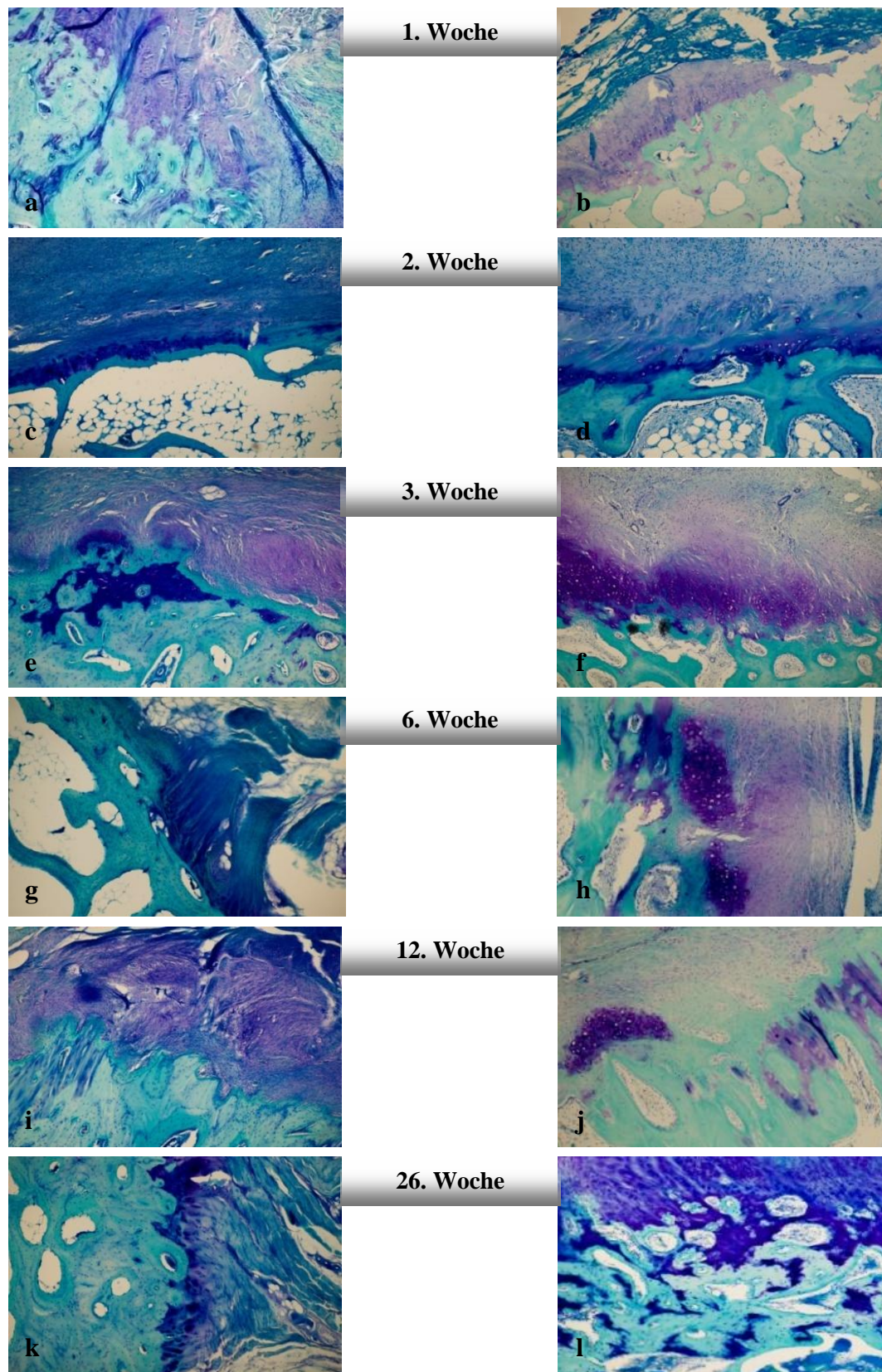


Abb. 3.5: Toluidinblau-Färbung der single-row- und double-row-Gruppe zu den 6 Untersuchungszeitpunkten

3.4 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Immunhistologie für Kollagen I

Die Gewebeproben der unbehandelten Kontrolltiere zeigten positive Kollagen-I-Reaktionen im Knochengewebe. Ebenfalls erfolgte ein positiver Nachweis von Kollagen-Typ-I im Sehngewebe. Im Knorpel konnte kein Kollagen Typ I nachgewiesen werden (Abb. 3.6).

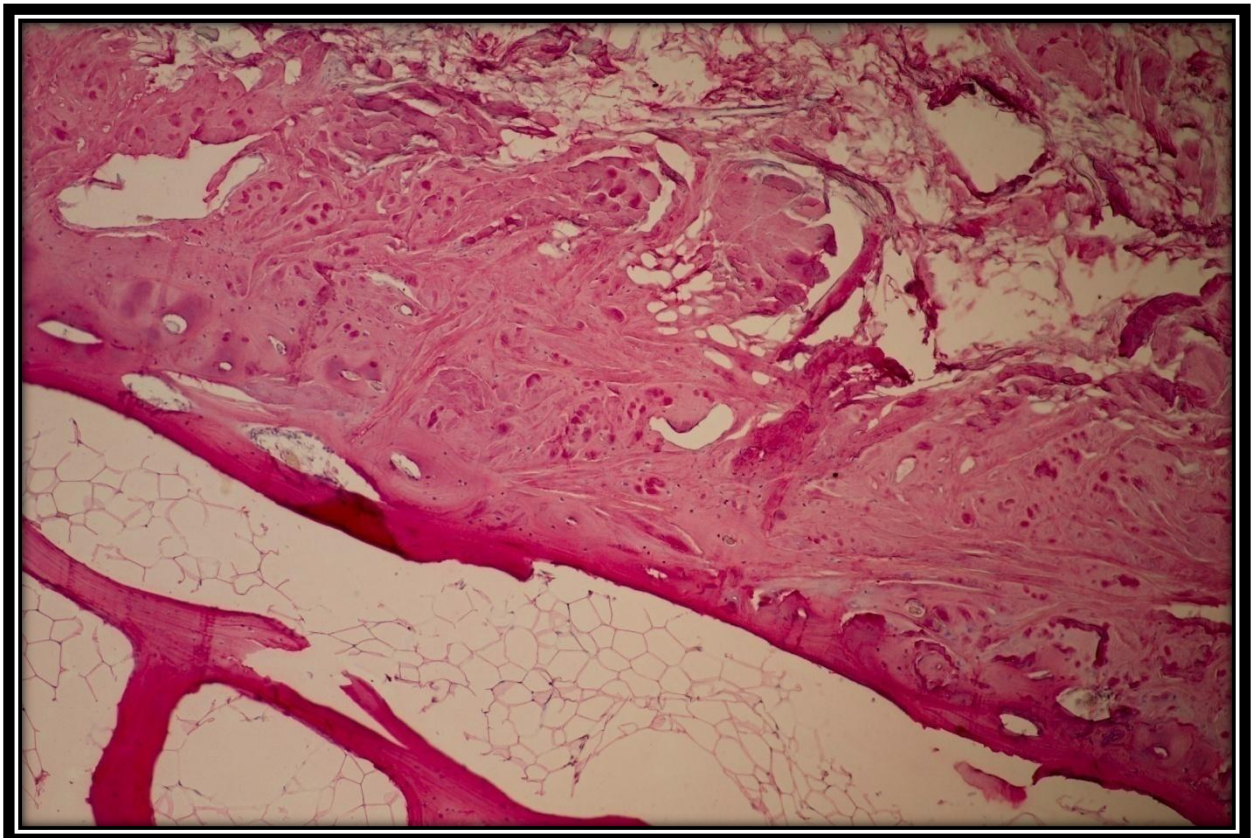


Abb. 3.6: immunhistologische Färbung von Kollagen Typ I, unbehandelte Kontrolle. Ein positiver Kollagen-I-Nachweis zeigte sich im Knochen- und Sehngewebe.

Eine Woche nach single-row-Rekonstruktion war Kollagen Typ I im Knochen nachweisbar. Ansonsten zeigte sich eine positive Kollagen-I-Reaktion im Sehngewebe. Im Knorpelgewebe konnte jedoch kein Kollagen Typ I nachgewiesen werden (Abb. 3.8 a).

Eine Woche nach double-row-Rekonstruktion zeigte sich ein positiver Kollagen-I-Nachweis im Knochen. Desgleichen erfolgte eine positive Reaktion in der Sehne. Im Knorpel konnte auch eine Woche nach double-row-Rekonstruktion kein Kollagen Typ I nachgewiesen werden (Abb. 3.7, Abb. 3.8 b). Die Intensität der Nachweisreaktion ist jedoch im Vergleich zu den Kontrolltieren nach beiden Operationstechniken geringer.

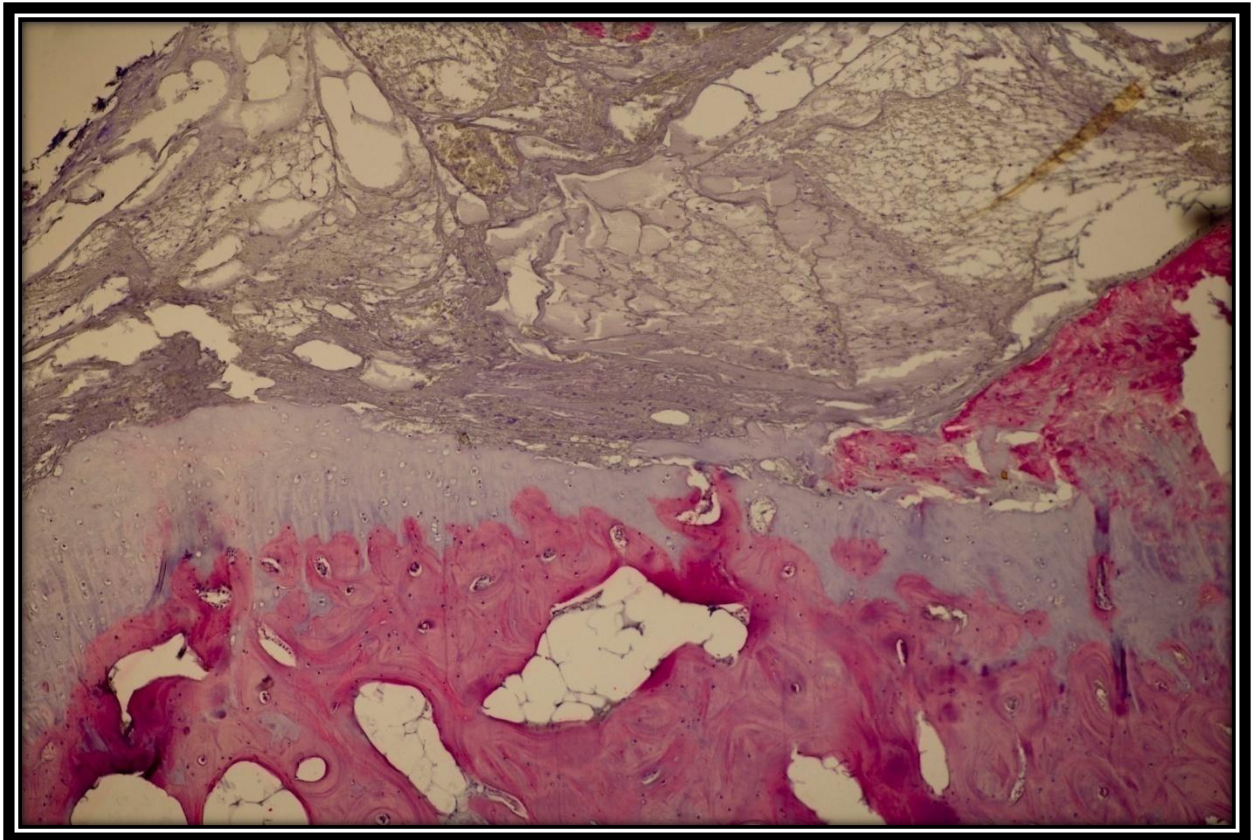


Abb. 3.7: immunhistologische Färbung von Kollagen Typ I eine Woche nach double-row-Rekonstruktion. Ein positiver Kollagen-I-Nachweis zeigte sich im Sehnen- und Knochengewebe. Im Knorpelgewebe konnte kein Kollagen Typ I nachgewiesen werden.

Zwei Wochen nach single-row-Rekonstruktion konnte Kollagen Typ I im Knochen nachgewiesen werden. Außerdem trat eine positive Kollagen-I-Reaktion im Sehngewebe auf. Im Knorpel konnte kein positiver Kollagen-I-Nachweis festgestellt werden (Abb. 3.8 c).

Zwei Wochen nach double-row-Rekonstruktion stellte sich eine positive Kollagen-I-Reaktion im Knochen dar. Ferner konnte Kollagen Typ I im Sehngewebe nachgewiesen werden. Im Knorpel konnte kein Kollagen Typ I dargestellt werden (Abb. 3.8 d). Auch zwei Wochen post operationem ist im Vergleich zu den Kontrolltieren die Intensität der Nachweisreaktion geringer.

Drei Wochen nach single-row-Rekonstruktion wurde eine positive Reaktion für Kollagen Typ I im Knochen sichtbar. Ansonsten trat eine positive Kollagen-I-Reaktion im Sehngewebe auf. Das Knorpelgewebe zeigte dagegen keinen positiven Nachweis von Kollagen Typ I auf (Abb. 3.8 e).

Drei Wochen nach double-row-Rekonstruktion wurde eine positive Kollagen-I-Reaktion im Knochen dokumentiert. Überdies stellte sich eine positive Reaktion im Sehngewebe dar.

Erneut zeigte das Knorpelgewebe keinen positiven Kollagen-I-Nachweis (Abb. 3.8 f). Der Nachweis stellte sich nach beiden Operationstechniken, verglichen mit der Kontrollgruppe, schwächer dar.

Eine positive Kollagen-I-Reaktion zeigte sich sechs Wochen nach single-row-Rekonstruktion im Knochen. Ebenso trat eine positive Reaktion in der Sehne auf. Im Knorpelgewebe konnte wie zuvor kein Kollagen Typ I nachgewiesen werden (Abb. 3.8 g).

In gleichem Maße stellte sich der Kollagen-I-Nachweis sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion dar. Der positive Nachweis konnte im Knochen- und Sehnenewebe dokumentiert werden. Im Knorpelgewebe konnte auch sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion kein Kollagen Typ I nachgewiesen werden (Abb. 3.8 h). Die Intensität der Nachweisreaktion ist auch sechs Wochen post operationem bei beiden Gruppen schwächer als bei der Kontrollgruppe.

Zwölf Wochen nach single-row-Rekonstruktion ließ sich eine positive Kollagen-I-Reaktion im Bereich des Knochens erkennen. Ebenso ließ sich eine positive Reaktion im Sehnenewebe belegen. Im Knorpel fand jedoch keine positive Reaktion statt (Abb. 3.8 i).

Im Knochen und Sehnenewebe wurde zwölf Wochen nach double-row-Rekonstruktion ein positiver Kollagen-I-Nachweis sichtbar. Dagegen konnte im Knorpelgewebe keine positive Nachweisreaktion erkannt werden. Im Vergleich zur single-row-Gruppe erfolgte in der double-row-Gruppe eine stärkere Nachweisreaktion (Abb. 3.8 j). In beiden Gruppen zeigte sich zwölf Wochen post operationem eine stärkere positive Reaktion als in den ersten sechs Wochen.

26 Wochen nach single-row-Rekonstruktion ließ sich in den Gewebeproben ein positiver Kollagen-I-Nachweis im Knochen- sowie im Sehnenewebe erkennen. Wiederum war im Knorpelgewebe kein Kollagen Typ I nachweisbar (Abb. 3.8 k).

26 Wochen nach double-row-Rekonstruktion erfolgte der Kollagen-I-Nachweis gleichermaßen wie 26 Wochen nach single-row-Rekonstruktion (Abb. 3.8 l).

Die Intensität des Nachweises war 26 Wochen post operationem in beiden Gruppen im Knochen schwächer und in der Sehne gleich stark, verglichen mit der Kontrollgruppe.

single-row

double-row

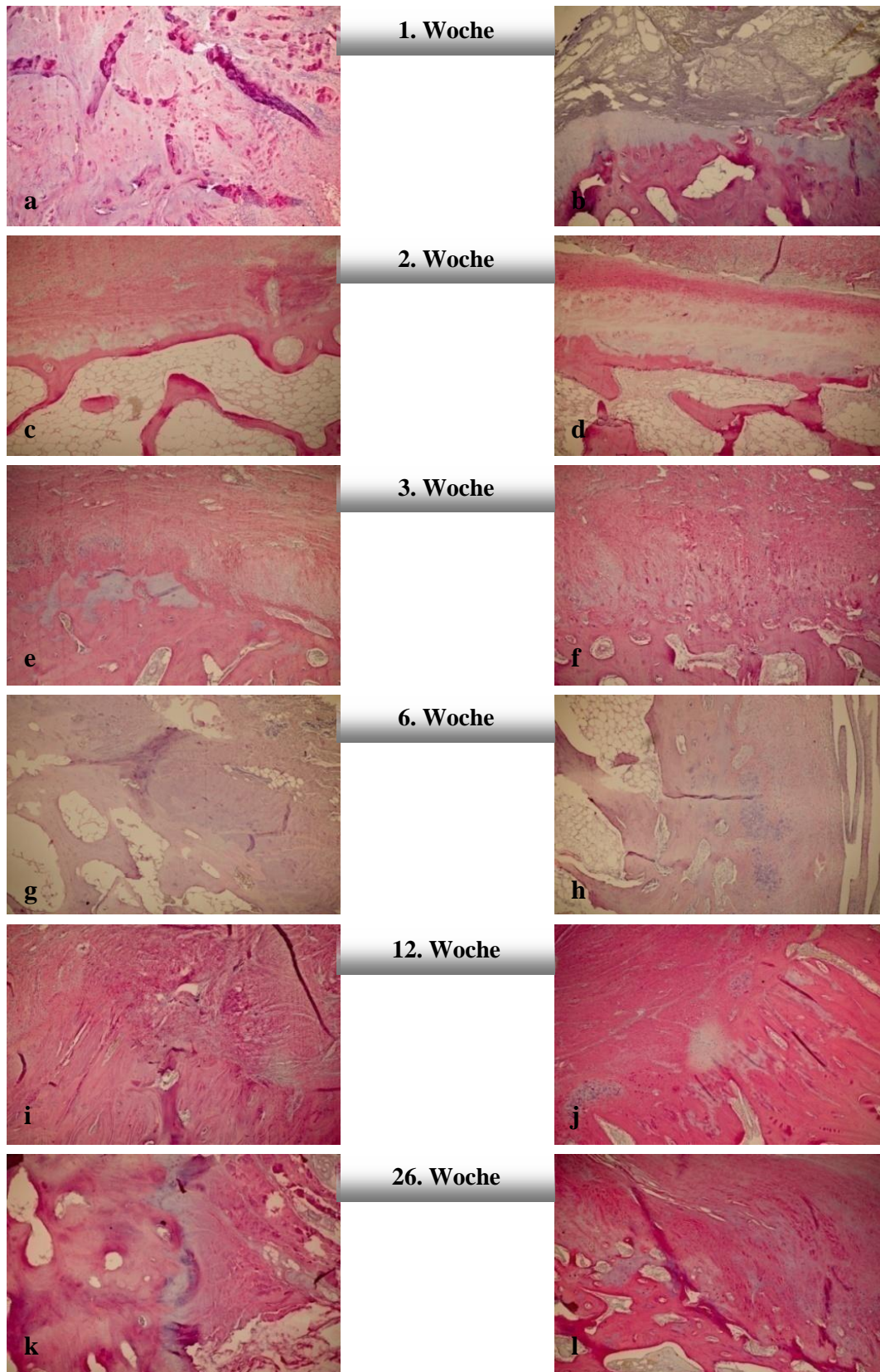


Abb. 3.8: behandelte Tiere, immunhistologische Färbung von Kollagen Typ I über einen Untersuchungszeitraum von 26 Wochen

3.5 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Immunhistologie für Kollagen II

Ein positiver Kollagen-II-Nachweis stellte sich bei den Kontrolltieren ausschließlich im Knorpelgewebe dar. Im Knochen- und Sehngewebe konnte kein Kollagen Typ II nachgewiesen werden (Abb. 3.9).

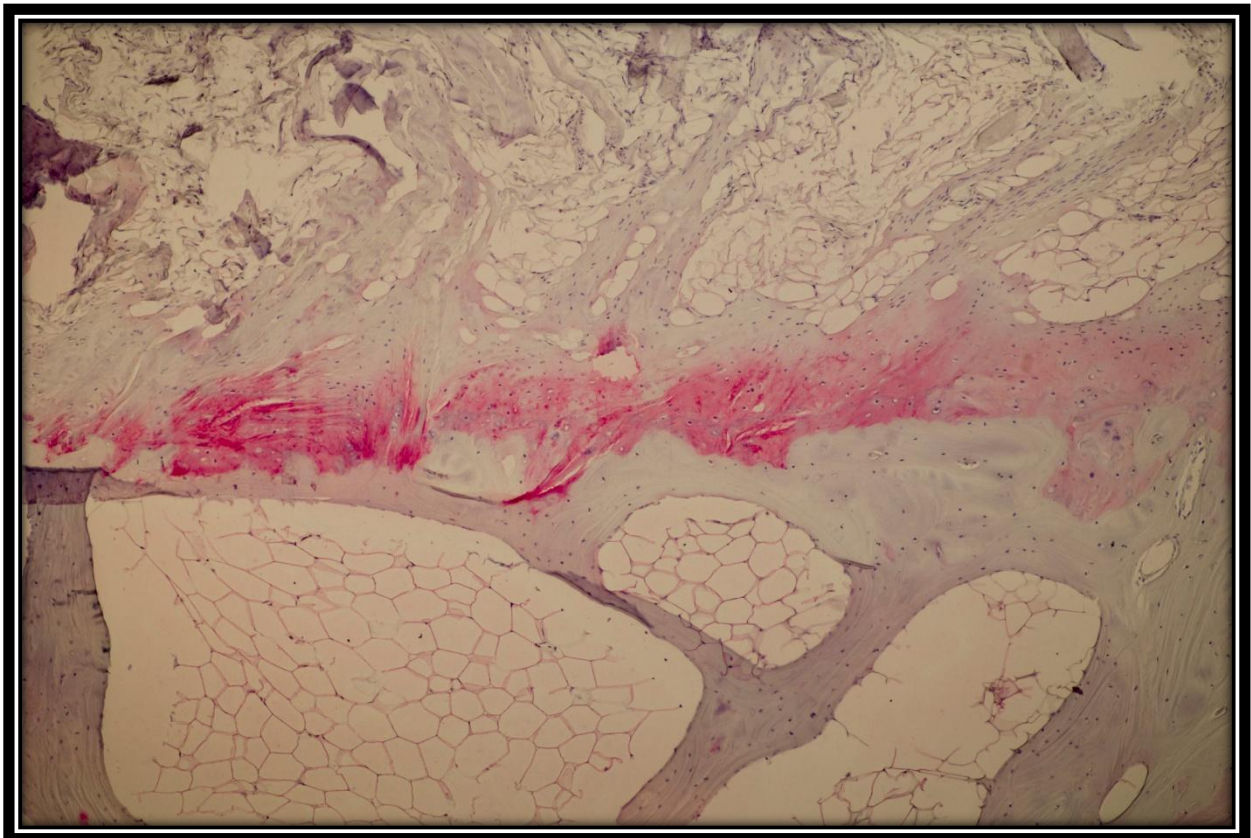


Abb. 3.9: immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II, unbehandelte Kontrollgruppe

Eine Woche nach single-row-Rekonstruktion konnte Kollagen Typ II ausschließlich im Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Im Knochengewebe erfolgte kein positiver Kollagen-II-Nachweis. Ebenso konnte im Sehngewebe kein Kollagen Typ II nachgewiesen werden (Abb. 3.13 a).

Eine Woche nach double-row-Rekonstruktion zeigten die Gewebeprobe eine positive Kollagen-II-Reaktion im Knorpel. Außerdem wurde Kollagen Typ II anteilig im Knochen sichtbar. Auch im Sehngewebe traten Spuren von Kollagen Typ II auf (Abb. 3.13 b). Die Nachweisreaktion erfolgte eine Woche nach single- sowie double-row-Rekonstruktion intensiver als in der Kontrollgruppe.

Zwei Wochen post operationem zeigte sich in der single-row-Gruppe eine positive Reaktion im Knorpelgewebe, die sich im Vergleich zur Kontrollgruppe schwächer darstellte. Erneut konnte im Knochen- und Sehngewebe kein Kollagen Typ II nachgewiesen werden (Abb. 3.10, Abb. 3.13 c).

Im Vergleich zur single-row-Gruppe und Kontrolle erfolgte der Kollagen-II-Nachweis im Knorpelgewebe zwei Wochen nach double-row-Rekonstruktion schwächer. Im Knochengewebe konnte kein positiver Kollagen-II-Nachweis dargestellt werden. Ebenso war im Sehngewebe kein Kollagen Typ II nachweisbar. (Abb. 3.13 d).



Abb. 3.10: immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II zwei Wochen nach single-row-Rekonstruktion

Drei Wochen nach single-row-Rekonstruktion erfolgte ein positiver Kollagen-II-Nachweis im Knorpelgewebe. Außerdem konnte Kollagen Typ II anteilig im Knochengewebe dargestellt werden. Jedoch trat im Sehngewebe keine positive Nachweisreaktion auf (Abb. 3.13 e).

Drei Wochen nach double-row-Rekonstruktion war Kollagen Typ II ausschließlich im Knorpelgewebe nachweisbar. Im Knochen- und Sehngewebe konnte kein positiver Kollagen-II-Nachweis belegt werden (Abb. 3.13 f). Der Nachweis erfolgte nach beiden Operationstechniken schwächer als in der Kontrollgruppe.

Sechs Wochen post operationem war in der single-row-Gruppe eine positive Kollagen-II-Reaktion im Knorpelgewebe zu erkennen. Im Knochen- und Sehngewebe konnte erneut kein Kollagen Typ II nachgewiesen werden (Abb. 3.11, Abb. 3.13 g).

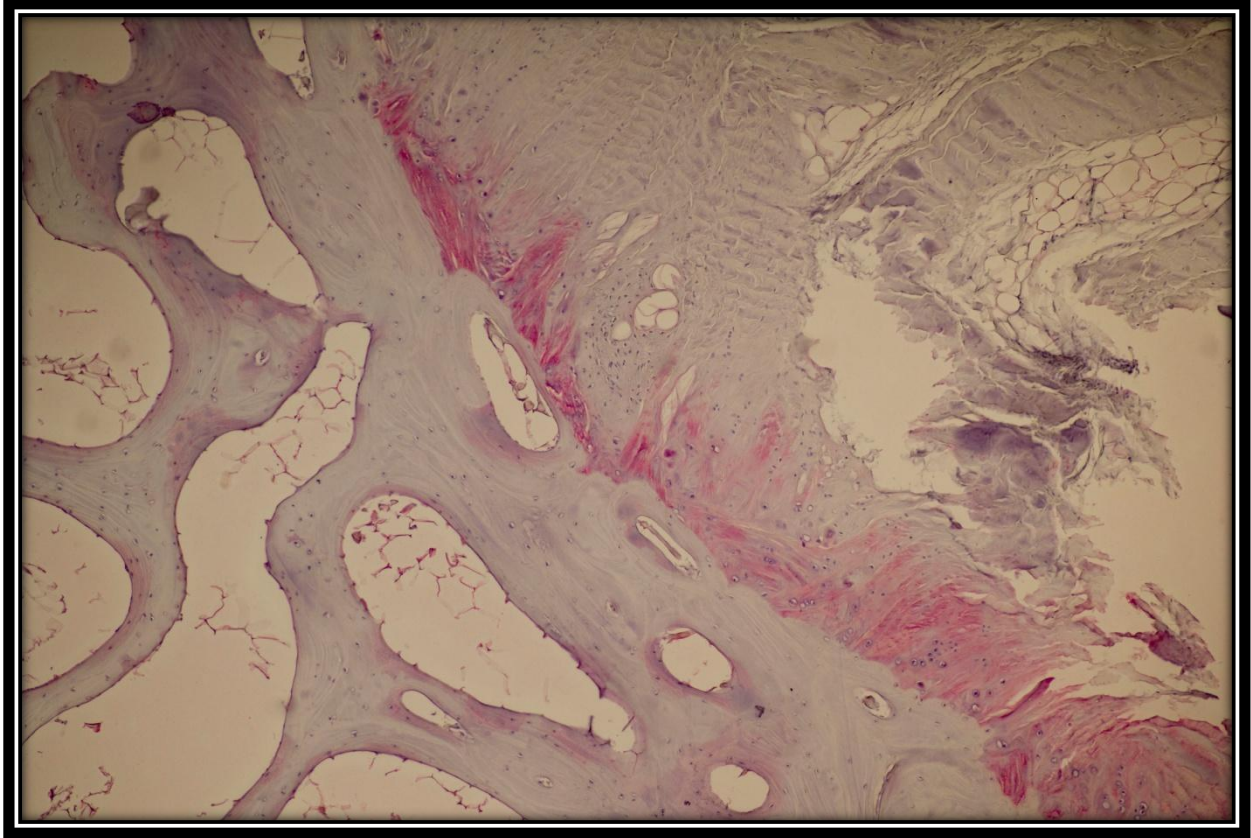


Abb. 3.11: immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II sechs Wochen nach single-row-Rekonstruktion. Ein positiver Kollagen-II-Nachweis erfolgte ausschließlich im Knorpelgewebe.

Sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion zeigte sich ein positiver Nachweis von Typ-II-Kollagen im Knorpelgewebe. Anteilig konnte Kollagen Typ II ebenfalls im Knochengewebe nachgewiesen werden. Dagegen war im Sehngewebe kein Kollagen Typ II nachweisbar (Abb. 3.12, Abb. 3.13 h). Die Reaktion erfolgte in der single-row-Gruppe intensiver als in der double-row-Gruppe, jedoch schwächer als in der Kontrollgruppe.

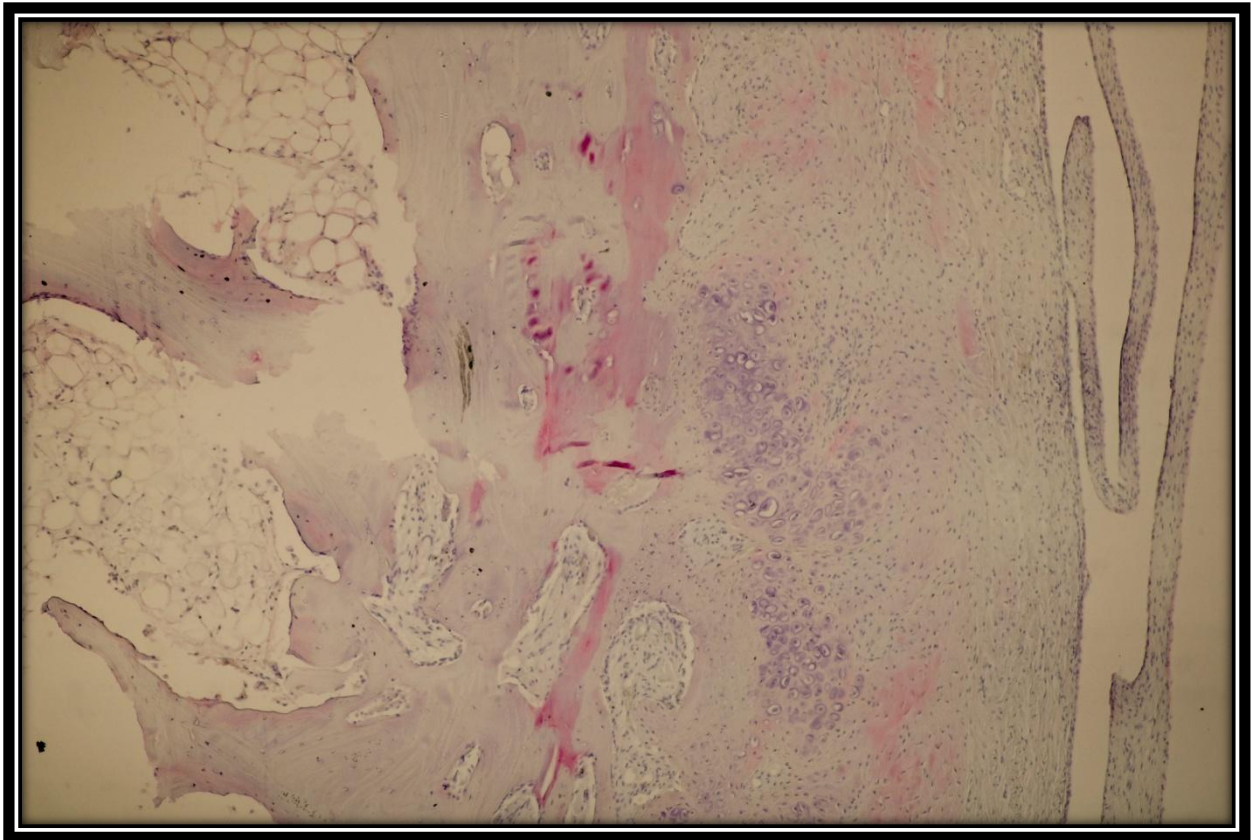


Abb. 3.12: immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion

Eine positive Kollagen-II-Reaktion stellte sich nach zwölf Wochen in der single-row-Gruppe im Bereich des Knorpels dar. Im Knochen- und Sehngewebe erfolgte kein positiver Kollagen-II-Nachweis (Abb. 3.13 i). Im Vergleich zur single-row-Gruppe zeigte sich zwölf Wochen nach double-row-Rekonstruktion eine stärkere Kollagen-II-Reaktion im Bereich des Knorpelgewebes. Dagegen war im Knochen- sowie Sehngewebe keine positive Nachweisreaktion erkennbar (Abb. 3.13 j).

26 Wochen post operationem stellte sich in der single-row-Gruppe ein positiver Kollagen-II-Nachweis im Knorpelgewebe dar. Im Knochen- und Sehngewebe konnte kein Kollagen Typ II nachgewiesen werden. Die positive Kollagen-II-Reaktion erfolgt, verglichen mit der Kontrollgruppe, schwächer (Abb. 3.13 k).

26 Wochen nach double-row-Rekonstruktion wurde eine positive Kollagen-II-Reaktion im Knorpelgewebe sichtbar. Weder im Knochen, noch im Sehngewebe konnte Kollagen Typ II nachgewiesen werden. Auch 26 Wochen nach double-row-Rekonstruktion erfolgte die Nachweisreaktion im Vergleich zur Kontroll-Gruppe schwächer (Abb. 3.13 l).

single-row

double-row

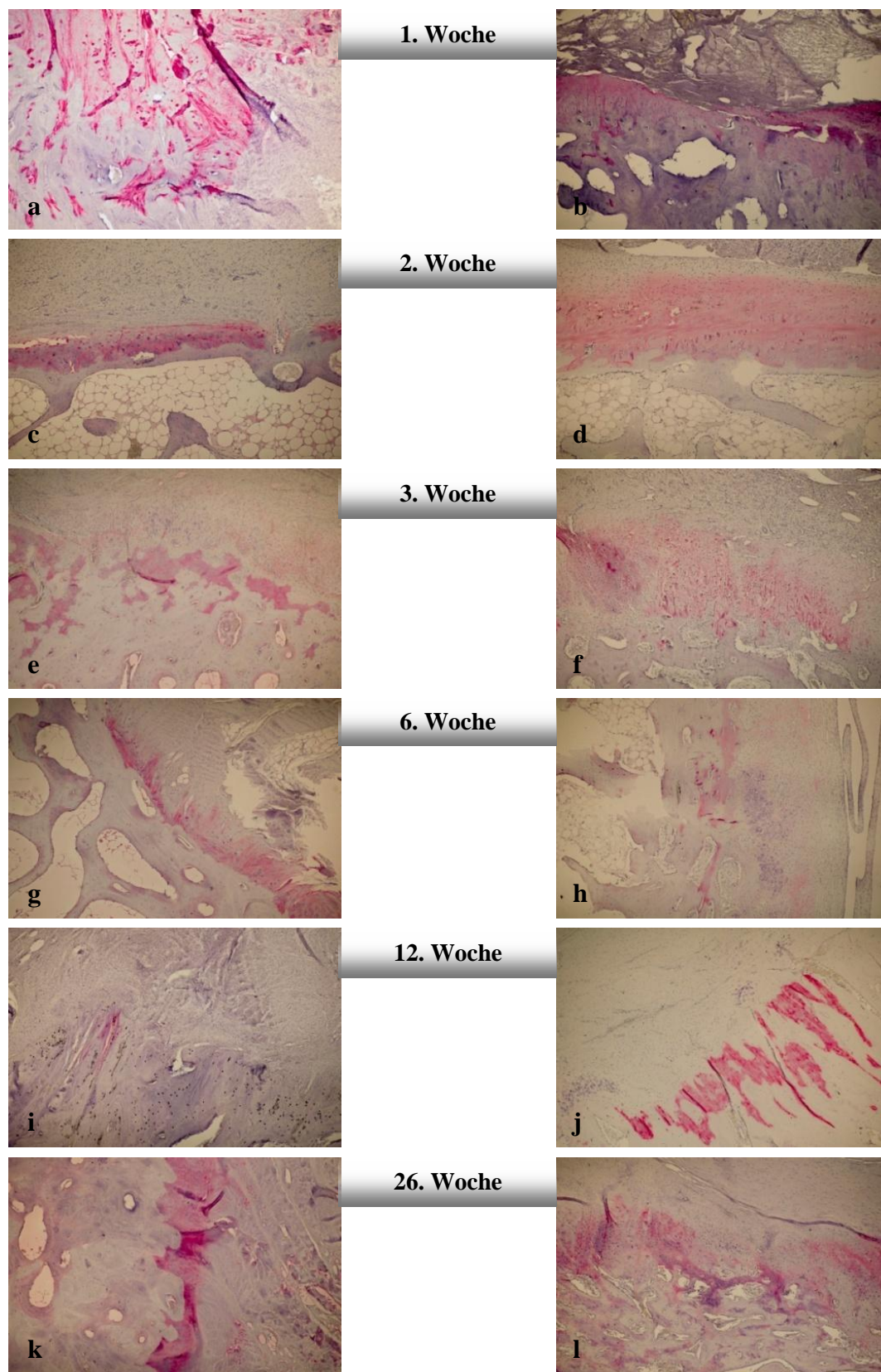


Abb. 3.13: behandelte Tiere, immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II über einen Untersuchungszeitraum von 26 Wochen

3.6 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Immunhistologie für Kollagen III

Ein positiver Kollagen-III-Nachweis konnte bei den Kontrolltieren ausschließlich im Knochen gezeigt werden. Im Knorpelgewebe konnte kein Kollagen Typ III nachgewiesen werden. Ebenso erfolgte kein positiver Kollagen-III-Nachweis im Sehngewebe (Abb. 3.14).

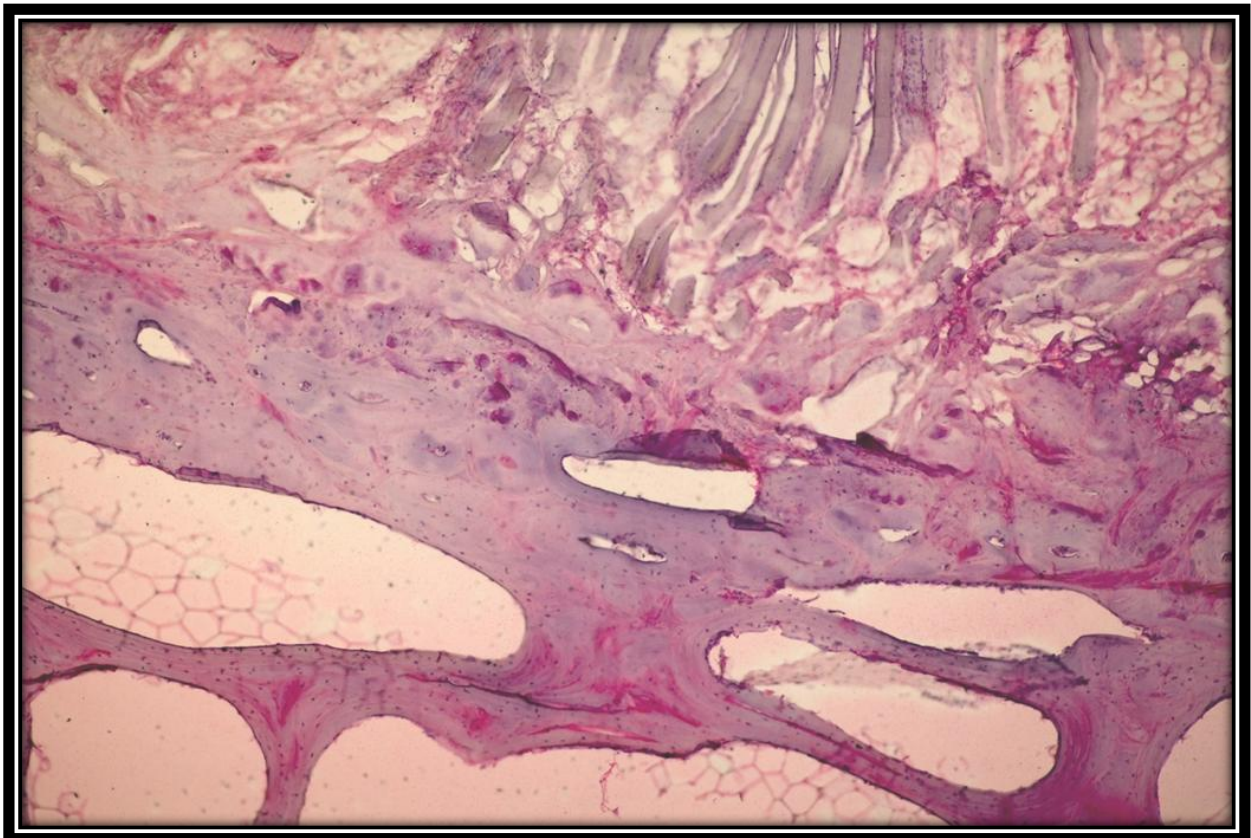


Abb. 3.14: immunhistologische Färbung von Kollagen Typ III, unbehandelte Kontrolle. Kollagen Typ III konnte ausschließlich im Knochen nachgewiesen werden.

Eine Woche nach single-row-Rekonstruktion zeigte das Knochengewebe keinen positiven Kollagen-III-Nachweis. Ebenso konnte kein Kollagen Typ III im Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Ein positiver Kollagen-III-Nachweis erfolgte ausschließlich im Sehngewebe (Abb. 3.17 a).

Eine Woche nach double-row-Rekonstruktion stellte sich keine positive Kollagen-III-Reaktion im Knochengewebe dar. Ebenso konnte kein Kollagen Typ III im Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Ausschließlich im Sehngewebe konnte ein positiver Kollagen-III-Nachweis belegt werden (Abb. 3.17 b).

Zwei Wochen nach single-row-Rekonstruktion stellte sich ein positiver Kollagen-III-Nachweis im Knochen dar. Ferner war im Knorpelgewebe eine positive Reaktion auf Kollagen Typ III erkennbar. Weiterhin zeigte sich ein positiver Kollagen-III-Nachweis im Sehngewebe (Abb. 3.17 c).

Eine positive Kollagen-III-Reaktion ließ sich zwei Wochen nach double-row-Rekonstruktion im Knochengewebe erkennen. Außerdem konnte Kollagen Typ III im Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Auch im Sehngewebe stellte sich ein positiver Kollagen-III-Nachweis dar (Abb. 3.17 d).

Drei Wochen nach single-row-Rekonstruktion zeigte das Knochengewebe eine positive Kollagen-III-Reaktion. Ansonsten wurde ein positiver Nachweis von Kollagen Typ III, im Knorpelgewebe sichtbar. Weiterhin ließ sich eine positive Reaktion im Sehngewebe erkennen (Abb. 3.17 e).

Ein positiver Kollagen-III-Nachweis erfolgte drei Wochen nach double-row-Rekonstruktion im Knochengewebe. Ebenfalls konnte Kollagen Typ III im Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Außerdem stellte sich eine positive Kollagen-III-Reaktion im Sehngewebe dar (Abb. 3.17 f). Im Vergleich zur double-row-Gruppe stellte sich die Reaktion in der single-row-Gruppe intensiver dar.

Sechs Wochen nach single-row-Rekonstruktion konnte Typ-III-Kollagen im Knochengewebe sichtbar gemacht werden. Ebenso zeigte sich ein positiver Kollagen-III-Nachweis im Knorpelgewebe. Gleichmaßen stellte sich eine positive Kollagen-III-Reaktion im Sehngewebe dar (Abb. 3.17 g).

Sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion ließ sich keine positive Kollagen-III-Reaktion im Knochengewebe erkennen. Desgleichen war kein Kollagen Typ III im Knorpelgewebe nachweisbar. Auch im Sehngewebe erfolgte kein positiver Kollagen-III-Nachweis. (Abb. 3.15, Abb. 3.17 h).

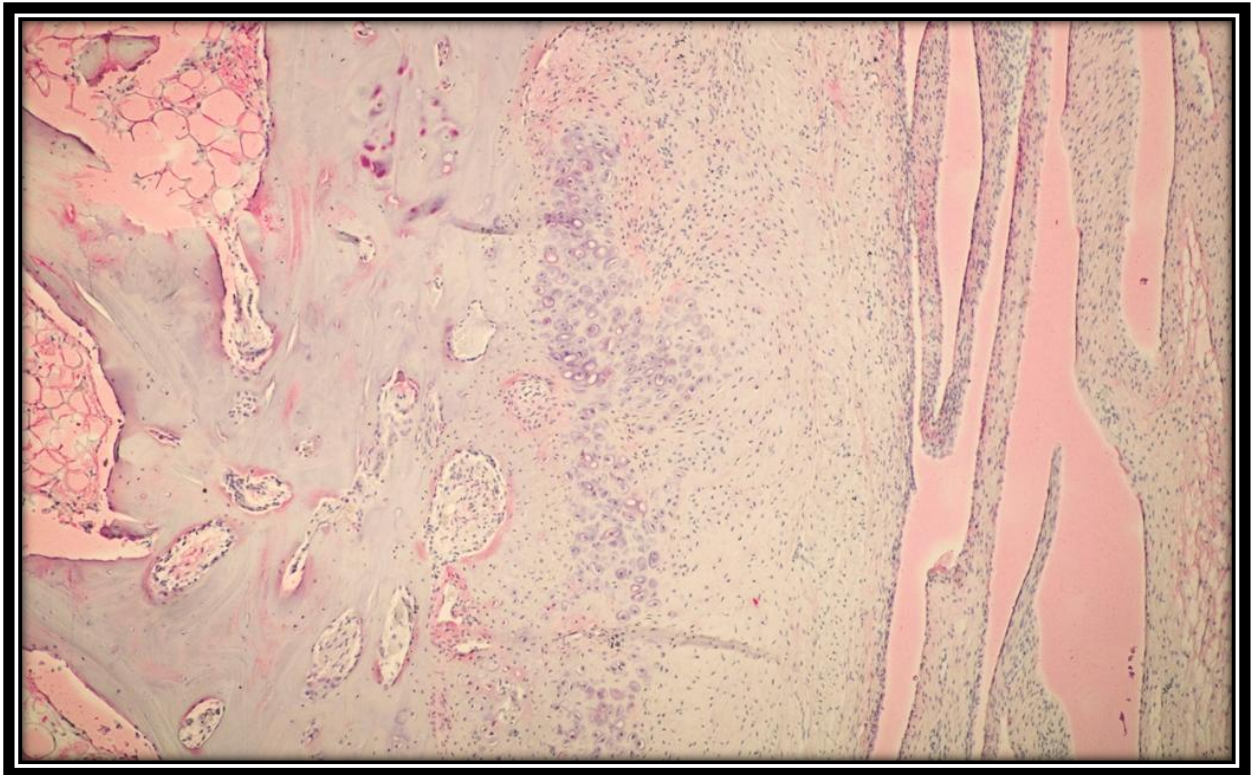


Abb. 3.15: immunhistologische Färbung von Kollagen Typ III sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion. Es ist keine positive Kollagen-III-Reaktion erkennbar.

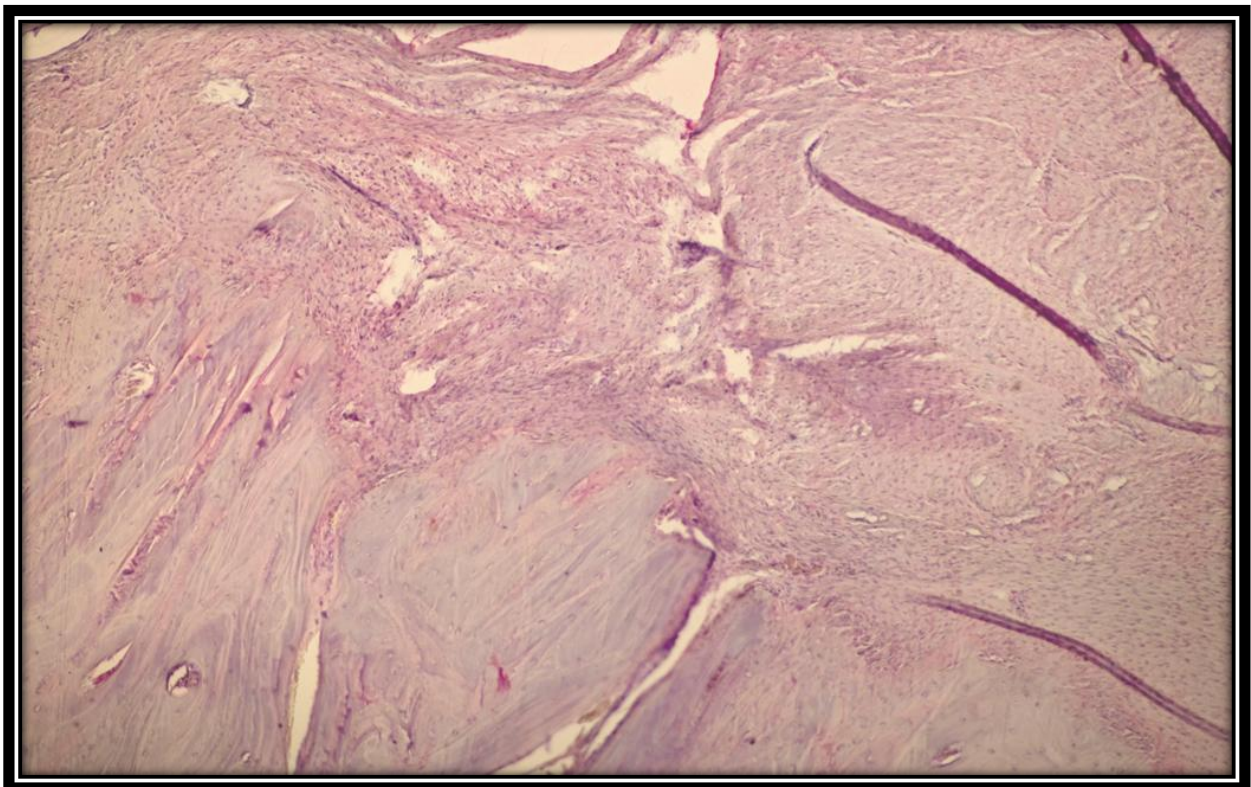


Abb. 3.16: immunhistologische Färbung zwölf Wochen nach single-row-Rekonstruktion. Es ist kein Kollagen Typ III nachweisbar.

Zwölf Wochen nach single-row-Rekonstruktion konnte kein Kollagen Typ III im Knochengewebe nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich auch im Knorpel- sowie Sehngewebe keine positive Kollagen-III-Reaktion (Abb. 3.17 i).

Zwölf Wochen post operationem konnte in der double-row-Gruppe kein positiver Kollagen-III-Nachweis im Knochengewebe dargestellt werden. Desgleichen trat kein positiver Kollagen-III-Nachweis im Knorpelgewebe auf. Auch im Sehngewebe war kein Kollagen Typ III nachweisbar (Abb. 3.16, Abb. 3.17 j).

26 Wochen post operationem konnte in der single-row-Gruppe kein Kollagen Typ III im Knochengewebe nachgewiesen werden. Desgleichen erfolgte keine positive Nachweisreaktion im Knorpel- und Sehngewebe (Abb. 3.17 k).

26 Wochen nach double-row-Rekonstruktion konnte keine positive Kollagen-III-Reaktion im Knochengewebe erkannt werden. Außerdem trat keine positive Nachweisreaktion im Knorpelgewebe auf. Auch im Sehngewebe konnte kein Kollagen Typ III nachgewiesen werden (Abb. 3.17 l).

single-row

double-row

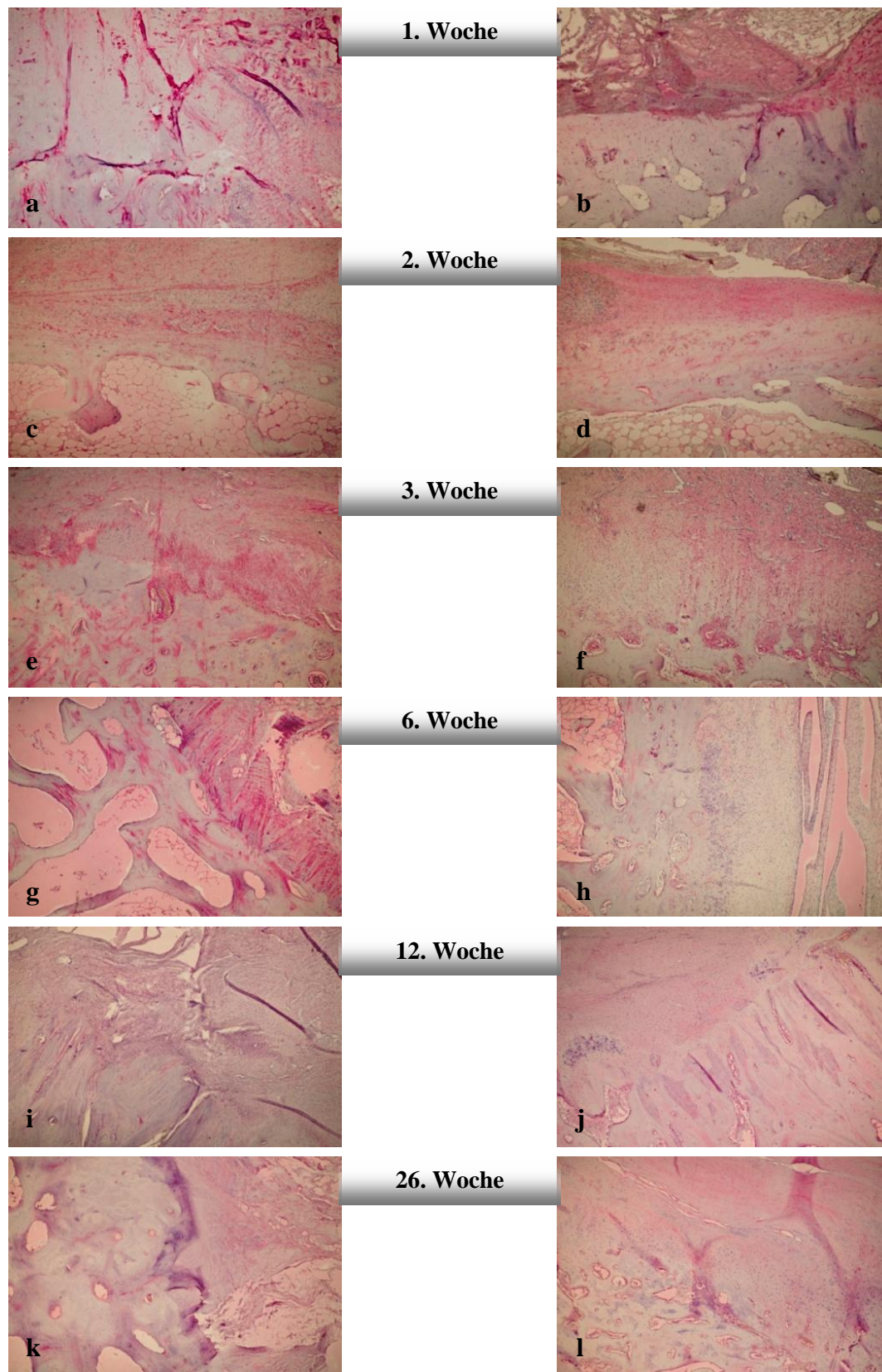


Abb. 3.17: behandelte Tiere, immunhistologische Färbung von Kollagen Typ III über einen Untersuchungszeitraum von 26 Wochen

3.7 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der lichtmikroskopischen Immunhistologie

Tab. 3.1: Kollagenverteilung							
		Kontrolle					
		Knochen	Knorpel	Sehne			
	Kollagen I	+	-	+			
	Kollagen II	-	+	-			
	Kollagen III	+	-	-			
Wochen		SR			DR		
		Knochen	Knorpel	Sehne	Knochen	Knorpel	Sehne
1.	Kollagen I	+	-	+	+	-	+
	Kollagen II	-	+	-	+	+	+
	Kollagen III	-	-	+	-	-	+
2.	Kollagen I	+	-	+	+	-	+
	Kollagen II	-	+	-	-	+	-
	Kollagen III	+	+	+	+	+	+
3.	Kollagen I	+	-	+	+	-	+
	Kollagen II	+	+	-	-	+	-
	Kollagen III	+	+	+	+	+	+
6.	Kollagen I	+	-	+	+	-	+
	Kollagen II	-	+	-	+	+	-
	Kollagen III	+	+	+	-	-	-
12.	Kollagen I	+	-	+	+	-	+
	Kollagen II	-	+	-	-	+	-
	Kollagen III	-	-	-	-	-	-
26.	Kollagen I	+	-	+	+	-	+
	Kollagen II	-	+	-	-	+	-
	Kollagen III	-	-	-	-	-	-

Legende:

- + positive Reaktion in diesem Bereich vorhanden
- der jeweilige Bereich zeigt eine negative Reaktion

4. Diskussion

Diese Studie wurde am Schafmodell durchgeführt, um den Heilungsprozess des Sehne-Knochen-Komplexes nach Rotatorenmanschetten-Rekonstruktion zu untersuchen. Die Infraspinatussehne des Schafs ist der menschlichen Supraspinatussehne in Größe, Form und Mikrostruktur sehr ähnlich (Gerber et al. 1994). Die Infraspinatussehne des Schafs misst durchschnittlich 21,5 mm in der Breite und 3,9 mm in der Dicke (Gerber et al. 1994). France et al. (1989) berichteten über eine durchschnittliche Dicke der menschlichen Supraspinatussehne von 3,93 mm. Gerber et al. (1994) führten histologische Untersuchungen an Infraspinatussehnen des Schafs und menschlichen Supraspinatussehnen durch. Die Schafssehnen beinhalteten etwas mehr dichte Kollagenfaserbündel pro Flächeneinheit. In allen anderen Aspekten waren die Infraspinatussehne des Schafs und die menschliche Supraspinatussehne fast nicht zu unterscheiden (Gerber et al. 1994).

Jedoch bleibt dieses Modell eine Angleichung zu den menschlichen Bedingungen. Darüber hinaus wurde ein akutes Rotatorenmanschetten-Reparationsmodell, welches nicht Sehnen mit chronischen Rissen repliziert, genutzt.

Dennoch wurde dieses Tiermodell umfassend für die Bewertung der Rotatorenmanschettenreparaturen in früheren Studien (Gerber et al. 1999; Lewis et al. 2001; Demirhan et al. 2003; Ma et al. 2004) verwendet, und ermöglicht daher Studienvergleiche.

Gerber et al. (1999) verglichen 2 transossäre Rotatorenmanschetten-Reparaturtechniken – einfache Stiche versus modifizierte Mason-Allen-Stiche - an 47 linken Schafsschultern.

Lewis et al. (2001) analysierten in einer biomechanischen Studie, an 16 erwachsenen weiblichen Schafen, den Effekt der Immobilisierung auf die Heilung der Rotatorenmanschette.

Demirhan et al. (2003) führte eine biomechanische Studie an 32 Schafsschultern durch. Sie verglichen die primäre Fixationsstärke von transossären Nähten, Naht-Ankern und hybriden Reparaturtechniken.

Ma et al. (2004) führten eine biomechanische Untersuchung über arthroskopische Rotatorenmanschetten-Stiche an 8 Schafs-Infraspinatus-Paaren durch.

Die Refixierung der gerissenen und oft zurückgezogenen Sehne im präparierte knöchernen Bett ist der wichtigste Schritt bei arthroskopischen und offenen Rotatorenmanschetten-Rekonstruktionen.

Die erfolgreiche Transplantation von Tierfaszien und Sehnenplantaten regte die klinische Anwendung ähnlicher Techniken beim Menschen an. Die Nutzung von Sehngewebe als „lebende Nahtmaterialien“ (Gallie 1913) wurde vorteilhaft in der rekonstruktiven Chirurgie angewandt.

In der Vergangenheit wurde die Schaffung spongiösen Knochengewebes empfohlen. In der orthopädischen Chirurgie wurde traditionell gelehrt, dass Weichgewebsheilung zum Knochen, durch das Anbringen des freien Gewebesendes (Sehne) in einer spongiösen Mulde oder durch ein Loch im Knochen, verstärkt wird (Crenshaw 1992, Poppen 1988). Obwohl die Studie von Burman und Umansky (1930), die Fähigkeit des Periosts knöchernen Zuwachs in der Sehne zu produzieren, demonstrierte, glaubte man, dass die Reparatur direkt am kortikalen Knochen unterlegen sei, aufgrund der Annahme, dass sich eine biomechanisch minderwertige Zwischenschicht von Bindegewebe entwickelt, die den Heilungsprozess beeinträchtigt. Die Refixierung einer gerissenen Sehne in einer spongiösen Mulde, wie 1944 von McLaughlin beschrieben, war eine Standardreparatur vor 60 Jahren.

Nachfolgende Studien von Whiston und Walmsley (1960), sowie von Forward und Cowan (1963), konzentrierten sich auf das Anwachsen der durch einen ossären Tunnel befestigten Sehne. Whiston und Walmsley (1960) untersuchten den Prozess der Sehnen-Knochen-Heilung im Kaninchen. Sie kamen zu dem Entschluss, dass die Verbindung der implantierten Sehne durch Inflammation von Zellen aus dem umgebenden Knochenmark in die degenerierte Sehne vollendet wird. Sie glauben ebenfalls, dass einige Umbauprozesse im Knochentunnel stattfinden.

Gallie und Lemesurier (1921) modifizierten die Technik durch Spaltung der Sehne und Anrauen der Sehnenenden, vor Einbettung dieser in der Knochenrinne. Knochenanteile, die sich mit den Sehnenenden vermischten, wurden ebenfalls in der Knochenrinne platziert.

Kernwein (1941) transplantierte in einer Reihe von Experimenten Sehnen des Extensor carpi radialis longus bei Hunden. Bei einigen Tieren wurde die Sehnenscheide entfernt. Die Sehnenenden wurden aufgespalten, mit Knochensand vermischt und anschließend in einem knöchernen Tunnel verankert. Kernwein (1941) stellte fest, dass die Aufspaltung des Sehnenansatzes eine größere Fläche für die Invasion der Fibroblasten hervorrief und damit dazu beitrug, die Zugfestigkeit der neuen Verankerung zu verbessern. Es wurde jedoch festgestellt, dass der Knochensand aseptische Nekrosen verursachte.

St. Pierre et al. (1995) untersuchten die Sehnenheilung zum kortikalen Knochen verglichen zu einer spongiösen Rinne. In dieser Studie wurden 20 erwachsene weibliche Ziegen mittels bilateraler Tenotomie der Infraspinatussehne mit anschließender Wiederbefestigung der Sehne behandelt. In der Spongiösen-Fixations-Gruppe wurde ein spongiöses Bett, mittels einer 20×5×5 mm Messschablone, präpariert. In der Kortikalen-Fixations-Gruppe wurde die Sehne direkt am kortikalen Knochen befestigt. Sechs und Zwölf Wochen postoperativ wurden biomechanische und histologische Untersuchungen durchgeführt. Die Sehnen-Knochen-Heilung erschien in beiden Gruppen nach sechs und zwölf Wochen ähnlich und die biomechanischen Eigenschaften waren annähernd gleich. Diese Studie von St. Pierre et al. (1995) zeigte keinen signifikanten Nutzen aus der Schaffung eines spongiösen Knochengewebes.

Darum wurde in unserem Experimentmodell vor der Sehnenwiederbefestigung der kortikale Knochen nicht vollständig entfernt.

Das Ziel der Rotatorenmanschetten-Chirurgie ist die Optimierung der Verbindung zwischen Knochen und Sehnenansatz am „Footprint“ (Kontaktfläche) (Nho et al. 2007). Durch möglichst dichte Annäherung wird ein sicheres, biologisches Anheilen der Sehne am „Footprint“ erreicht (McFarland et al. 2005). Die anatomische Rotatorenmanschetten-Konfiguration mit ihrer mechanischen Stabilität am Sehnen-Knochen-Übergang soll sich durch diesen Verschluss des Rotatorenmanschetten-Defektes wiederherstellen können (Smith et al. 2006).

Die Wiedererlangung einer schmerzfreien Schulterfunktion mit normalem Bewegungsumfang und normaler Kraft ist dabei das Ziel (Cummins et al. 2005).

St. Pierre et al. (1995) führten eine in-vivo-Studie an Ziegen durch. Sie zeigten, dass die Stabilität der Rotatorenmanschetten-Refixation zwischen der sechsten und zwölften Woche postoperativ noch signifikant zunahm. Die Rekonstruktion des „Footprints“ muss bis zum biologischen Sehnenanheilen ausreichend durch die Refixationstechnik stabilisiert und gesichert werden.

Laut Gerber et al. (1994) zeichnet sich die ideale Rotatorenmanschetten-Rekonstruktionstechnik durch hohe initiale Stabilität, minimale Elongation unter zyklischer Belastung und Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität bis zum stabilen Anheilen des Sehnenansatzes am Knochen aus.

Während bei der offenen Rotatorenmanschetten-Rekonstruktion transossäre Refixationstechniken zur Anwendung kommen, sind für die arthroskopischen Reparaturen Naht-Anker-Techniken die Methode der Wahl (Scheibel und Habermeyer 2003). Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Anwendung von Naht-Anker-Fixation mindestens gleichwertig zu den traditionellen Fixationstechniken, wie z.B. transossäre Tunnel (Craft et al. 1996, Hecker et al. 1993) oder sogar überlegen ist (Burkhart et al. 1997 b, Reed et al. 1996).

Craft et al. (1996) verglichen in einer Studie die Festigkeit der klassischen transossären Naht-Reparatur mit Reparaturen mittels vier unterschiedlichen Naht-Ankern der 3. Generation (Statak, Harpoon, Superanchor, Revo screw). Der Startak Naht-Anker zeigte eine signifikant höhere Festigkeit als die andere drei Naht-Anker. Die Reparaturen mittels Startak, Harpoon und Superanchor Naht-Ankern zeigten, verglichen zur transossären Nahttechnik keine signifikanten Unterschiede. Jedoch war die Reparatur mittels transossäre Nahttechnik signifikant fester als die Reparatur mittels Revo screw Naht-Anker.

Hecker et al. (1993) verglichen Polyacetat-Naht-Anker-Fixation mit Fixation mittels konventioneller Nahttechnik, in Bezug auf die sofortige Zugfestigkeit der Fixierung. Außerdem untersuchten sie die pull-out Festigkeit der Polyacetat-Naht-Anker verglichen mit metallischen Nahtankern. Die Untersuchungen führten sie an frischen menschlichen Leichenschultern durch. Die Ergebnisse zeigten, bezüglich der Fixationsfestigkeit, keine signifikanten Unterschiede zwischen der konventionellen Nahttechnik und den Polyacetat-Naht-Ankern. Jedoch wiesen Polyacetat-Naht-Anker höhere pull-out Kräfte auf als metallische Naht-Anker. In der Studie von Hecker et al. (1993) lieferten Polyacetat-Naht-Anker ausreichende sofortige Fixierung für Weichgewebsreparaturen in der menschlichen Schulter.

Burkhart et al. (1997 b) erzeugten 1×2 cm Defekte der Rotatorenmanschette in 16 menschlichen Leichenschultern und reparierten jeden Defekt anschließend mit drei Mitek RC Naht-Ankern. Als Nahtmaterial nutzten sie No2. Ethibond. Die Ergebnisse wurden mit einer früheren Studie über transossäre Knochentunnel-Fixation (Burkhart et al. 1997 a) verglichen. Es resultiert aus diesen beiden Studien, dass die Fixation durch Naht-Anker signifikant weniger anfällig für Misserfolg ist, als Fixation durch Knochentunnel.

Reed et al. (1996) führten einen Vergleich zwischen zwei Rotatorenmanschetten-Reparatur-Techniken (Naht-Anker versus transossäre Naht), unter Nutzung menschlicher Leichen (durchschnittliches Alter von 65 Jahren), durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Naht-Anker-Reparaturen signifikant fester waren als die Standard-Nahttechnik, unabhängig von der Knochenqualität.

Klinger et al. (2009) untersuchten die zellbiologischen und biomechanischen Aspekte nach zwei verschiedenen Techniken in offener Rotatorenmanschetten-Chirurgie – doppelt-geladene bioresorbierbare Nahtanker in Verbindung mit arthroskopischen Mason-Allen-Stichen und eine transossäre Nahttechnik in Kombination mit traditionellen modifizierten Mason-Allen-Stichen. 36 reife weibliche Merino Schafe wurden für die Studie genutzt. 6, 12 und 26 Wochen postoperativ erfolgte die zellbiologische und biomechanische Bewertung. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich in Bezug auf die mechanische Belastbarkeit, Misserfolg und Steifigkeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergaben. Weiterhin fanden Klinger et al. (2009) zwischen den beiden Gruppen keine ultrastrukturellen Unterschiede in der Organisation der Kollagenfasern. Jedoch konnten sie zeigen, dass die Zellbiologie in der Naht-Anker-Gruppe eine günstigere Sehnen-Knochen-Heilung aufwies, als die traditionelle transossäre Nahttechnik. Deshalb sind sie der Meinung, dass die Naht-Anker-Technik geeigneter für die arthroskopische Reparatur sei.

Aufbauend auf die Ergebnisse von Klinger et al. (2009), wurden in der hier vorliegenden Studie die beiden arthroskopischen Reparaturtechniken – *single row* und *double row* – in Bezug auf die Sehnen-Knochen-Heilung, miteinander verglichen.

Die arthroskopische Rotatorenmanschetten-Refixierung ist mittlerweile eine häufig angewandte und beschriebene Operationstechnik in der Schulterchirurgie. Im Allgemeinen kommt eine single-row-Refixation mit guten klinischen Resultaten zur Anwendung (Galatz et al. 2004, Gartsman et al. 1998, Ide et al. 2005, Lichtenberg et al. 2006, Tauro 1998).

Einige Studien wiesen jedoch nach, dass bei der Versorgung, vor allem großer chronischer Rupturen, durch single-row-Technik, noch immer eine Rupturrate von 25 bis 94% und ein inkomplettes Anheilen des Sehnenansatzes am „Footprint“ auftreten können (Boileau et al. 2005, Charousset et al. 2006, Franceschi et al. 2007, Galatz et al. 2004, Lichtenberg et al. 2006).

Apreleva et al. 2002 zeigten in ihrer biomechanischen Studie an 10 menschlichen Leichenschultern, dass single-row-Refixierungstechniken nur 67% der normalen „Footprint-Insertion“ der Supraspinatussehne am großen Tuber erreichen können. Diese Problematik führte zu der Entwicklung einer double-row-Rotatorenmanschetten-Refixierung, die durch Lo und Burkhart (2003) wie folgt beschrieben wurde. Nach Debridement der Rotatorenmanschette und Vorbereitung des Knochenbetts wurde die Mobilität der Rotatorenmanschette beurteilt. Es wurden zwei Reihen Naht-Anker im Knochenbett des

Humerus platziert. Die mediale Ankerreihe wurde zuerst unmittelbar lateral der Gelenkfläche des Humeruskopfes platziert. Sie verwendeten eine 18-Gauge-Nadel als Leitfaden für die Ankerplatzierung, gefolgt von einer Knochenstanze und einem Nahtanker (5,0 mm BioCorkscrew, Arthex) mit No.2 Ethibond (Ethicon, Sommerville, NJ) oder No.2 Fiberwire (Arthex). Es ist darauf zu achten, dass jeder Anker in einem Winkel von 45° (Burkhart 1995) inseriert wird. Weiterhin konnte eine Reihe von Nahtankern auf der lateralen Seite des Knochenbetts platziert werden. Bei der Planung der Lage der medialen und lateralen Ankerreihe, ist darauf zu achten, für eine ausreichende Knochenbrücke zwischen den medialen und lateralen Ankern zu sorgen und dass jeder Anker in einem ordnungsgemäßen Winkel (Burkhart 1995) inseriert wird. Abhängig von der Größe des Risses, erfordern die mediale und laterale Ankerreihe jeweils einen oder zwei Anker. Die Nähte durchliefen die Rotatorenmanschette, beginnend mit der medialen Ankerreihe. Um eine große Brücke von Rotatorenmanschettengewebe für die Fixation zu gewährleisten, wurde ein retrograder Fadendurchlauf mittels modifizierten Neviaser Zugang genutzt. Dieser Zugang wurde ca. 2-3 cm posteromedial des Akromioklavikular-Gelenks erstellt. Es wurde eine spinale Nadel als Leitfaden für die Bestimmung der richtigen Zugangsposition genutzt, um einen angemessenen Gleitwinkel auf die zentrale Rotatorenmanschette zu ermöglichen. Da keine Kanüle notwendig war, war nur eine kleine 3 mm Hautpunktion erforderlich, um die Naht-Instrumente unterzubringen. Unter Nutzung der Nadel als Leitfaden, wanderte ein Nahtinstrument (Penetrator, Arthex) an der Nadel hinab. Die Rotatorenmanschette wurde durchdrungen und ein Teil des Fadens wurde durch die Rotatorenmanschette zurückgezogen. Die anderen Nähte verliefen ähnlich durch den medialen Teil der Rotatorenmanschette, so dass die Nähte in einer Art Matratze über der Sehnenbrücke gebunden wurden. Wenn nicht bereits platziert, konnte nun die laterale Ankerreihe in den lateralen Teil des „Footprints“ inseriert werden. Um die Naht für den lateralen Anker zu platzieren, war ein anterogrades Naht-Pass-Instrument notwendig, wie z.B Viper suture passer (Arthex). Anschließend passierte die Naht die Ränder des Rotatorenmanschettenrisses. Diese wurden in einer einfachen Nahtform durchdrungen. Die Autoren bevorzugten es, statische Knoten zu binden. Zuerst wurden die medialen Matratzennähte und dann die lateralen Nähte verknotet.

In der Literatur werden Vor- und Nachteile dieser Rotatorenmanschetten-Refixierungstechnik gegenüber bisher angewandten Techniken diskutiert. Verschiedene biomechanische Studien zeigten, dass die Knochen-Sehnen-Kontaktfläche bei double-row-Reparatur signifikant größer ist als bei single-row und transossärer Reparatur (Tuoheti et al. 2005, Mazzocca et al. 2005, Meier und Meier 2006).

Tuoheti et al. (2005) beobachtete bei der double-row-Rekonstruktion mit Nahtankern eine um 60% größere Kontaktfläche zwischen dem Knochen und der refixierten Sehne gegenüber der single-row-Technik. Dabei war der Anpressdruck bei der single-row-Technik höher. Allerdings wurde diese Studie von Tuoheti et al. nicht unter zyklischer, sondern unter statischer Belastung durchgeführt.

Mazzocca et al. (2005) untersuchten die Defektkraft, zyklische Verschiebung und anatomische Grundfläche von vier arthroskopischen Rotatorenmanschetten-Reparaturtechniken an 20 menschlichen Leichenschultern. Die single-row-Reparaturtechnik war in Defektkraft, zyklischer Verschiebung und Spaltbildung der double-row-Reparatur ähnlich. Bei der double-row-Reparatur konnten sie jedoch eine größere Supraspinatus-Grundfläche beobachten.

Die meisten biomechanischen Untersuchungen zeigten für double-row-Fixation eine signifikant höhere Belastbarkeit, eine kleinere Elongation unter zyklischer Belastung und bessere anatomische Wiederherstellung des Sehnenansatzes am Knochen im Vergleich zu single-row-Techniken (Cummins et al. 2005, Ma et al. 2004,2006, Kim et al. 2006, Meier und Meier 2006, Milano et al. 2008).

In klinischen Studien wurde jedoch festgestellt, dass double-row-Refixationen verglichen mit single-row-Techniken postoperativ keine besseren klinischen Resultate erbringen (Sugaya et al. 2005, Charousset et al. 2007, Franceschi et al. 2007).

Sugaya et al. (2005) berichteten in einer Studie über den Vergleich zwischen single- und double-row-Reparaturtechniken bei arthroskopischer Manschettenreparatur. Bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 35 Monaten konnten sie keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Bezug auf das klinische Ergebnis erkennen. Eine postoperative MRT Untersuchung zeigte jedoch ein signifikant besseres strukturelles Ergebnis bei Patienten, die mit double-row-Technik behandelt wurden.

Charousset et al. (2007) verglichen in einer Studie von 66 Fällen die klinischen Ergebnisse nach single- und double-row-Reparatur. Eine 6 Monate postoperativ durchgeführte Computertomografische Arthrographie zeigte eine signifikant bessere Sehnenheilung in der

double-row-Gruppe. In klinisch objektiven Ergebnissen zeigten sich nach 24 Monaten Beobachtungszeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Franceschi et al. (2007) zeigten durch eine postoperative MRT-Angiographie nach einem Beobachtungszeitraum von ca. 23 Monaten, dass die double-row-, verglichen mit der single-row-Rotatorenmanschetten-Refixierung weder signifikant bessere Heilungseigenschaften, noch signifikant bessere klinische Ergebnisse erreicht. Daraus schlussfolgerten sie, dass die Verwendung der double-row-Technik keine Vorteile bei der Wiederherstellung des anatomischen „Footprints“ liefert.

Ji et al. (2010) untersuchten 22 Patienten, die mittels single-row-Technik behandelt wurden und 25 Patienten, bei denen eine double-row-Rekonstruktion durchgeführt wurde. Das durchschnittliche Patientenalter betrug zwischen 56 und 58 Jahren. Die Bewertung führten sie anhand der University of California Los Angeles (UCLA) Rating-Skala und des Schulter-Indexes der American Shoulder and Elbow Surgeons (ASES) durch. Bei einem durchschnittlichen Nachbeobachtungszeitraum von 24 Monaten konnten sie keine statistischen klinischen Unterschiede zwischen beiden Behandlungsmethoden erkennen. Jedoch zeigten sich nach double-row-Rekonstruktion bessere Ergebnisse in Bezug auf die wiedererlangte Kraft und die Zufriedenheit bei den Patienten.

Aufgrund schwierigerer Operationstechniken, längerer Operationszeiten und höherer Implantatkosten erhöhen sich die Operationskosten bei der double-row-, verglichen zur single-row-Technik (Franceschi et al. 2007, Sugaya et al. 2005).

Meist werden in biomechanischen Studien nur single-row-Rekonstruktionen kombiniert mit einfachen U-Nähten beschrieben, die mit double-row-Fixationen verglichen werden (Kim et al. 2006, Mazzocca et al. 2005, Meier und Meier 2006, Smith et al. 2006, Sugaya et al. 2005, Waltrip et al. 2003). Die Refixaion muss Belastungen während der biologischen Sehnenheilung in der postoperativen Rehabilitationsphase standhalten (Nho et al. 2007). Eine starke Spannung der Rotatorenmanschetten-Refixation und Elongation unter zyklischer Belastung in der anfänglichen postoperativen Belastungsphase könnte zu einem Versagen der Rekonstruktion führen. Die Belastungsübertragung von der Sehne auf den Knochen erfolgt in der postoperativen Phase nur durch die Refixationskomponenten Anker und Naht, da in diesem Stadium noch kein Heilen zwischen Knochen und Sehnenansatz stattgefunden hat (Kim et al. 2006, Smith et al. 2006). Die Schnittstelle zwischen Naht und Sehne ist das schwächste Glied in der Refixationkette (Kim et al. 2006, Mazzocca et al. 2005, Nho et al. 2007, Scheibel und Habermeyer 2003, Smith et al. 2006).

Aus diesem Grund wurden stabilere modifizierte Nahttechniken angewandt, um biomechanische und klinische Ergebnisse der Rotatorenmanschetten-Refixation zu verbessern (Cummins et al. 2005, Gerber et al. 1994, Gerber et al. 1999, Ma et al. 2006, Scheibel und Habermeyer 2003).

Scheibel und Habermeyer (2003) beschrieben eine Nahtmethode für Rotatorenmanschetten-Reparatur mit Nahtankern, die entweder arthroskopisch oder während der offenen Rotatorenmanschetten-Reparatur durchgeführt werden kann. Die Technik, die sie verwendeten, bestand aus einer Matratzen- und einer Einzelnahnt und repräsentierte somit die Grundsätze der Mason-Allen-Naht-Technik. Die modifizierte Mason-Allen-Naht-Technik für Anker-Reparaturen ist nach der Meinung der Autoren einfach durchzuführen und bietet hervorragende anfängliche Festigkeit und ermöglicht dauerhafte Fixierung.

Der Heilungsprozess sollte in der Restauration der vier physiologischen Zonen des Sehnen-Knochen-Komplexes - Sehne, nicht-mineralisierter Faserknorpel, mineralisierter Faserknorpel und Knochen – resultieren (Cooper und Misol 1970). Die Restauration der vier Zonen erfordert laut Rodeo et al. (1993) ca. 12 Wochen. Nach den Untersuchungen von Klinger et al. (2009) kam es nach arthroskopischer Naht-Anker-Technik früher zu einer Normalisierung der vier Zonenstruktur als nach transossärer Nahttechnik.

In dieser Studie wurde der Heilungsprozess der Rotatorenmanschette nach zwei unterschiedlichen Fixationstechniken – *single row* und *double row* – in Kombination mit arthroskopischer Mason-Allen-Naht untersucht. Bei der *single-row*-Technik wurde die Sehne mit Hilfe von zwei doppelt-geladenen Nahtankern in einer Reihe im Knochenbett befestigt, während bei der *double-row*-Technik vier doppelt-geladene Nahtanker in zwei Reihen zur Anwendung kamen.

Die Ausbildung einer fibrovaskulären Verbindungsfläche zwischen der Sehne und dem Knochen ist die primäre Voraussetzung für eine ausreichende Heilung (Baums et al. 2009). Mit solch einer Verbindungsfläche ist es möglich, die faserknorpelige Sehneninsertion wieder herzustellen (Klinger et al. 2008). Die Wiederherstellung der anatomischen Konfiguration der Sehnen-Knochen-Insertion ist ein Schlüsselfaktor in der Optimierung dieses Prozesses (Apreleva et al. 2002). Eine breite Kontaktfläche an der Insertionsstelle („Footprint Adaptation“) wird angestrebt (Hedtmann und Fett 2002).

Anatomie und Dimension der natürlichen Kontaktfläche wurde durch verschiedene Studien untersucht (Dugas et al 2002, Ruotolo et al. 2004).

Dugas et al. (2002) berichteten, dass die mittlere Supraspinatus-Insertion in medial-lateraler Richtung gemessen, $12,7 \pm 6,3$ mm beträgt, während die anterior-posteriore Dimension $16,3 \pm 5,5$ cm ausmacht.

Ruotolo et al. (2004) führten ebenfalls eine Untersuchung durch und zeigten einen medial-lateralen Abstand von ca. 12 mm und einen anterior-posterioren Abstand von 25 mm. Obwohl die meisten Techniken, die ursprüngliche Grundfläche nicht angemessen wiederherstellen, ermöglicht die double-row-Technik fast 100% Abdeckung (Apreleva et al. 2002).

Kim et al. (2006) kamen zu dem Ergebnis, dass bei der double-row-Rekonstruktion die Spaltbildung verringert und die initiale Festigkeit und Steifigkeit im Vergleich zur single-row-Rekonstruktion verbessert wird.

Doch die hervorragende erste mechanische Festigkeit und Grundflächendeckung der double-row-Technik garantiert laut Charouset et al. (2007) und Franceschi et al. (2007) nicht klinische Überlegenheit.

Die strukturelle Integrität der Sehnen-Knochen-Heilung hängt von den spezifischen Matrix-Komponenten an der Sehnen-Knochen-Verbindungsfläche ab. Genauer gesagt, die biomechanischen Eigenschaften des Sehnen-Knochen-Komplexes werden von der molekularen Organisation des Kollagennetzwerkes bestimmt (Liu et al. 1997). Daher ist die korrekte Funktion einer Sehne von der Anzahl und Art der Kollagene abhängig. Der Zusammenhang von Matrix-Organisation, Zusammensetzung und mechanischen Kräften in der Sehne wurde erstmals von Gillard et al. (1979) beschrieben. Sie wiesen darauf hin, dass die Region der Kaninchensehne, welche mit dem Talus und Fersenbein artikuliert und Druck- sowie Zugkräften ausgesetzt ist, eine faserknorpelige Organisation und erhöhte Werte von Glycosaminoglycanen, im Gegensatz zu anderen Regionen der gleichen Sehne, aufweist.

Es wurde lange Zeit gedacht, dass Sehnenkollagen prinzipiell aus Typ-I-Kollagen besteht, obwohl Ergebnisse von Immunlokalisationsstudien die Präsenz von Typ-II- und Typ-III-Kollagen in der Sehne indizieren (Duance et al. 1977, Becker et al. 1976, Swadison und Mayne 1989). Ebenfalls wurde gezeigt, dass Fibroblasten diese drei Kollagentypen synthetisieren (Herrmann et al. 1980, Taylor et al. 1982). Allerdings wurde nicht von biochemischen Isolationen verschiedener Kollagenarten und ihren posttranslationalen Modifikationen berichtet (Tsuzaki et al. 1993, Yamauchi und Katz 1993).

Viele Gewebe enthalten eine Mischung aus Typ-I- und Typ-III-Kollagen. Die Ratio dieser beiden Kollagene im Gewebe ist nicht statisch, sondern erfährt Veränderungen während der Entwicklung und bei Krankheit (Williams et al. 1984).

Die Quantifizierung dieser Kollagen-Typ-I- und Typ-III-Verteilung ist wichtig, da diese sich auf die Funktion des Gewebes beziehen kann (Naimark et al. 1992).

Koob und Vogel (1987) demonstrierten, dass der Kollagengehalt in der Oberflächenschicht der tensionalen Region der Rinder-Flexorsehne durchschnittlich 82% des Trockengewichts der Sehne betrug, währenddessen in der komprimierten Region der Kollagengehalt geringer war, durchschnittlich 69% des Trockengewichts. Diese Studie belegt, dass der Kollagengehalt in der Nähe der Insertion höher ist als in der eigentlichen Sehne. Das dominierende Kollagen war Typ I, jedoch war eine signifikante Menge an Typ-III-Kollagen präsent.

Kollagen Typ III wird normalerweise im embryonalen oder elastischen Gewebe gefunden (Epstein 1974), aber ebenfalls wird es als Teil der Reparaturantwort auf Gewebsverletzung synthetisiert (Bailey et al. 1975, Barnes et al. 1976). Ein erhöhter Anteil an Typ-III-Kollagen wird in der frühen Phase der Sehnen-Wundheilung produziert (Williams et al. 1984). Dieses wird allmählich durch Typ-I-Kollagen ersetzt, bis das Narbengewebe reift und die mechanische Stabilität der Wunde zum normalen zurückkehrt, obwohl eine abnorme Kollagenzusammensetzung viele Monate nach Verletzung fortbesteht (Williams et al. 1984). Clore et al. (1979) berichteten, dass die Synthese von Typ-III-Kollagen in heilender Rattenhaut innerhalb von 10 Stunden nach Verletzung erhöht war.

Barnes et al. (1976) zeigten, dass das Verhältnis von Kollagen Typ III zum Gesamtkollagen in Guinea Schweinehaut 21 Tage nach Verletzung noch erhöht war, obwohl in reifen Narben oder fibrösen Verwachsungen die überwiegende Kollagenform Typ-I-Kollagen ist.

In der frühen Sehnenheilung ist Kollagen III durchgehend im Gewebe vorhanden (Williams et al. 1980).

Normale Sehnen beinhalten hauptsächlich in parallelen Faserbündeln organisiertes Kollagen Typ I, während Kollagen Typ III auf das Endotendineum, welches die Bündel umgibt, begrenzt ist (Duance et al. 1977). Kollagen Typ III neigt dazu dünne, retikuläre Fasern auszubilden, die ein Netzwerk erzeugen (Lapiere et al. 1977). Es scheint, dass ein Fortbestehen von Kollagen III in heilenden Sehnenläsionen für eine normale Sehnenfunktion nachteilig sein könnte.

Diese Studie präsentiert die zeitliche Verteilung von Kollagen Typ I, Typ II und Typ III während den ersten 26 Wochen der Wundheilung, in der Infraspinatussehne des Schafes.

Ein wichtiger Bestandteil der Untersuchung war dabei die Verteilung von Kollagen Typ III in der frühen Wundheilungsphase.

In dem hier vorgestellten Modell zeigten die immunhistologischen Ergebnisse eine ausgedehnte Lokalisation von Kollagen Typ III am Anfang der Rotatorenmanschettenheilung. Die Anwesenheit von Kollagen Typ III war wesentlich größer als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Während 12 Wochen nach single-row-Rekonstruktion kein Kollagen Typ III nachweisbar war, ließ sich bereits in der 6. Wochen nach double-row-Rekonstruktion keine positive Kollagen-III-Reaktion erkennen.

Dies zeigt, dass 6 Wochen nach double-row-Rekonstruktion der Gewebeumbau fast abgeschlossen ist, während dieser Prozess in der single-row-Gruppe noch bis zur 12. Woche andauert.

Ab der 12. Woche findet in beiden behandelten Gruppen eine Erhöhung von Kollagen Typ I in der Sehne und im Knochen statt. Diese Ergebnisse zeigen eine Verschiebung in der Kollagenproduktion und einen laufenden Umbauprozess. Es scheint als würde das Kollagen Typ III durch Kollagen Typ I ersetzt.

Kollagen Typ II wurde untersucht, um den knorpeligen Charakter des Faserknorpels anzuzeigen. Es wurde eindeutig in frühen Studien durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen, dass an der Sehnenbefestigungszone Kollagen Typ II reichlich im Faserknorpel vorhanden ist (Benjamin et al. 1991, Ralphs et al. 1992, Rufai et al. 1992). Das zeitweise Vorkommen von Kollagen Typ II im Knochengewebe ist wahrscheinlich durch Knorpelversprengung begründet.

Drei Wochen nach double-row-Rekonstruktion kam es zu einer Zusammenlagerung von Chondrozyten zu Clustern, die sich in der 26. Woche wieder aufgelöst hatte. Dies könnte ein Hinweis auf einen vermehrten Gewebeumbau zwischen der 3. und 26. Woche in der double-row-Gruppe sein, da Chondrozytencluster auf Proliferation des Knorpelgewebes hinweisen. Diese Proliferation des Knorpelgewebes stellt den Kompensationsversuch des Gewebes dar, die stattgefundenen Zerstörung aufzufangen.

Basierend auf diesen Versuch am Schafmodell, zeigt diese Studie, dass die double-row-Technik im Vergleich zur single-row-Technik zu einem zellbiologisch günstigeren Sehnen-Knochen-Heilungsprozess führt.

5. Zusammenfassung

Einleitung

In neueren biomechanischen Studien zeigte die double-row-Naht-Anker-Rekonstruktion zur operativen Therapie der Rotatorenmanschettenruptur gegenüber der single-row-Technik bessere biomechanische Resultate.

Das Ziel dieser Studie war die histologische und immunhistologische Untersuchung der Kollagenverteilung, während des Heilungsprozesses der Knochen-Sehnen-Kontaktstelle nach single- und double-row-Nahtankerrekonstruktion.

Material und Methoden

Diese Studie untersuchte die Sehnen-Knochenheilung am Schafmodell. Bei 22 reifen weiblichen Merino-Schafen wurde eine standardisiert erzeugte Ruptur der Infraspinatussehne refixiert. Zwei unterschiedliche Techniken wurden für die Refixation angewandt. Bei der single-row-Technik kamen zwei doppelt geladene Nahtanker, kombiniert mit arthroskopischer Mason-Allen-Naht, zum Einsatz. Bei der double-row-Refixation kamen vier doppelt geladene Nahtanker in Kombination mit arthroskopischer Mason-Allen-Naht zur Anwendung.

Die Lokalisation der Kollagene Typ I, II und III während der Sehnen-Knochen-Heilung wurde 1, 2, 3, 6, 12 und 26 Wochen nach Chirurgie durch den Einsatz von konventioneller Histologie und Immunhistologie ausgewertet.

Ergebnisse

Der Gewebeumbau ist sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion fast abgeschlossen, da kein positiver Kollagen-III-Nachweis erkennbar war, während dieser Prozess in der single-row-Gruppe noch bis zur 12. Woche andauert. Die immunhistologischen Ergebnisse zeigten eine Verschiebung der Kollagen-Ratio. Ab der 12. Woche fand in beiden behandelten Gruppen eine Erhöhung von Kollagen Typ I in der Sehne und im Knochen statt.

Diskussion

Die arthroskopische Rotatorenmanschettenrekonstruktion ist mittlerweile eine häufig angewandte und beschriebene Operationstechnik in der Schulterchirurgie. Die meisten biomechanischen Untersuchungen zeigten für double-row-Rekonstruktion eine signifikant höhere Belastbarkeit, eine kleinere Elongation unter zyklischer Belastung und bessere anatomische Wiederherstellung des Sehnenansatzes am Knochen im Vergleich zu single-row-Techniken (Cummins et al. 2005, Ma et al. 2004,2006, Kim et al. 2006, Meier und Meier 2006, Milano et al. 2008).

Diese Studie zeigt, dass die double-row-Technik im Vergleich zur single-row-Technik zu einem zellbiologisch günstigeren Sehnen-Knochen-Heilungsprozess führt.

6. Literaturverzeichnis

Apreleva M, Özbaydar M, Fritzgibbons PG, Warner JJ (2002): Rotator cuff tears: the effect of the reconstruction methode on three dimensional repair site area. *Arthroscopy* 18, 519-526

Bailey AJ, Sims TJ, Le Lous, Bazin S (1975): Collagen polymorphism in experimental granulation tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 66, 1160-1165

Barnes MJ, Morton LF, Bennett RC, Bailey AJ, Sims TJ (1976): Presence of type III collagen in guinea-pig dermal scar. *Biochem J* 157, 263-266

Baums MH, Buchhorn GH, Spahn G, Poppendieck B, Schultz W, Klinger HM (2008): Biomechanical characteristics of single-row repair in comparison to double-row repair with consideration of the suture configuration and suture material. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16, 1052-1060

Baums MH, Spahn G, Steckel H, Fischer A, Schultz W, Klinger HM (2009): Comparative evaluation of the tendon-bone interface contact pressure in different single- versus double-row suture anchor repair techniques. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17, 1466–1472

Becker U, Nowack H, Gay S, Timpl R (1976): Production and specificity of antibodies against the aminoterminal region in type III collagen. *Immunology* 31, 57–65

Benjamin M, Tyers RN, Ralphs JR (1991): Age-related changes in tendon fibrocartilage. *J Anat* 179, 127-136

Bigliani LU, Levine WN (1997): Subacromial impingement syndrome. *J Bone Joint Surg Am* 79, 1854-1868.

Boileau P, Brassart N, Watkinson DJ, Carles M, Hatzidakis AM, and Krishnan SG (2005): Arthroscopic repair of full-thickness tears of the supraspinatus: does the tendon really heal? *J Bone Joint Surg Am* 87, 1229-1240.

Bornstein P (1974): The biosynthesis of collagen. *Annu Rev Biochem* 43, 567-603

Burkhart SS (1995): The deadman theory of suture anchors: observations along a south Texas fence line. *Arthroscopy* 11, 119-123

Burkhart SS, Johnson TC, Wirth MA, Athanasion KA (1997 a): Cyclic loading of transosseous rotator cuff repairs: "Tension overload" as a possible cause of failure. *Arthroscopy* 13, 172-176

Burkhart SS, Diaz Pegan JL, Wirth MA, Athanasiou KA (1997 b): Cyclic loading of anchor-based rotator cuff repairs: confirmation of the tension overload phenomenon of suture anchor fixation with transosseous fixation. *Arthroscopy* 13, 720-724

Burman MS, Umansky M (1930): An experimental study of free periosteal transplants, wrapped around tendon. With a review of literature. *J Bone Joint Surg Am* 12, 579-594

Canoso JJ (1981): Bursa, tendons and ligaments. *Clin Rheum Dis* 7, 189-221

Charousset C, Duranthon LD, Grimberg J, Bellaiche L (2006): Arthro-C-scan analysis of rotator cuff tears healing after arthroscopic repair: analysis of predictive factors in a consecutive series of 167 arthroscopic repairs. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 92, 223-233.

Charousset C, Grimberg J, Duranthon LD, Bellaiche L, Petrover D (2007): Can a double-row anchorage technique improve tendon healing in arthroscopic rotator cuff repair? A prospective, nonrandomized, comparative study of double-row and single-row anchorage techniques with computed tomography arthrography tendon healing assessment. *Am J Sports Med* 35, 1247-1253

Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF (1979): Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med* 161, 337-340

Cooper RR, Misol S (1970): Tendon and ligament insertion: A light and electron and microscopic study. *J Bone Joint Surg Am* 52, 1-170

Craft DV, Moseley JB, Cawley PW, Noble PC (1996): Fixation strength of rotator cuff repairs with suture anchors and the transosseous suture technique. *J Shoulder Elbow Surg* 5, 32-40

Crenshaw AH: Shoulder and elbow injuries; in: Campbell's Operativ Orthopaedics; Mosby-Year Book, St. Louis 1992, 1745-1753

Cummins CA, Murell GA (2003): Mode of failure for rotator cuff repair with suture anchors identified at revision surgery. *J Shoulder Elbow Surg* 12, 128-133

Cummins CA, Appleyard RC, Strickland S, Haen PS, Chen S, Murrell GA (2005): Rotator cuff repair: an ex vivo analysis of suture anchor repair techniques on initial load to failure. *Arthroscopy* 21, 1236-1241.

Dejardin LM, Arnoczky SP, Ewers BJ, Haut RC, Clarke RB (2001): Tissue-engineered rotator cuff tendon using porcine small intestine submucosa: histologic and mechanical evaluation in dogs. *Am J Sports Med* 29, 175-184

Demirhan M, Atalar AC, Kilicoglu O (2003): Primary fixation strength of rotator cuff repair techniques: a comparative study. *Arthroscopy* 19, 572-576.

DeOrio JK, Cofield RH (1984): Results of a second attempt at surgical repair of a failed initial rotator-cuff repair. *J Bone Joint Surg Am* 66, 563-567

Deutzmann R, Brückner-Tudermann L, Brückner P: Binde- und Stützgewebe; in: Biochemie und Pathochemie; 8. Auflage; hrsg. v. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC; Springer, Heidelberg 2007, 715-754

Dines DM, Warren RF, Inglis AE, and Pavlov H (1990): The coracoids impingement syndrome. *J Bone Joint Surg Br* 72, 314-316.

Duance VC, Restall DJ, Beard H, Bourne JJ, Bailey AJ (1977): The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett* 79, 248-252

Dugas JR, Campbell DA, Warren RF, Robie BH, Millett PJ (2002): Anatomy and dimensions of rotator cuff insertions. *J Shoulder Elbow Surg* 11, 498-503.

Epstein EH (1974): (Alpha 1(3))₃ human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J Biol Chem* 249, 3225-3231

Fan L, Sarkar K, Franks DJ, Uhthoff HK (1997): Estimation of total collagen and Types I and III collagen in canine rotator cuff tendons. *Calcif Tissue Int* 61, 223-229

Fearly S, Kingham TP, Altcheck DW (2002): Mini open rotator cuff repair using a two-row fixation technique outcomes analysis in patients with small, moderate and large rotator cuff tears. *Arthroscopy* 18, 665-670

Forward AD, Cowan RJ (1963): Tendon Suture to Bone: An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 45, 807-823

France EP, Paulos LE, Harner CP, Straight CB (1989): Biomechanical evaluation of rotator cuff fixation methods. *Am J Sports Med* 17, 176-181

Franceschi F, Ruzzino L, Longo UG, Martina FM, Zobel BB (2007): Equivalent clinical results of arthroscopic single-row and double-row suture anchor repair for rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 35, 1254-1260

Galatz LM, Ball CM, Tefey SA, Middleton WD, Yamaguchi K (2004): The outcome and repair integrity of completely arthroscopically repaired large and massive rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am* 86, 219-224

Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, Das R, Mastny A, Havlioglu N, Silva MJ, Thomopoulos S (2006): Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res* 24, 541-550

Gallie WE (1913): VIII. Tendon Fixation: A Preliminary Report of a Simple Operation for the Prevention of Deformity in Paralytic Talipes. *Ann Surg* 57, 427-429

Gallie WE, Lemesurier AB (1921): The Use of Living Sutures in Operative Surgery. Can Med Assoc J 11, 504-513

Gartsman GM (1997): Massive, irreparable tears of the rotator cuff: results of operative debridement and subacromial decompression. J Bone Joint Surg Am 79, 715-721

Gartsman GM, Khan M, Hammerman SM (1998): Arthroscopic repair of full-thickness tears of the rotator cuff. J Bone Joint Surg Am 80, 832-840

Gazielly DF, Gleyze P, Montagnon C (1994): Functional and anatomical results after rotator cuff repair. Clin Orthop Relat Res 304, 43-53

Gerber C, Schneeberger AG, Beck M, Schlegel U (1994): Mechanical strength of repair of the rotator cuff. J Bone Joint Surg Br 76, 371-380

Gerber C, Schneeberger AG, Perren SM, Nyffeler RW (1999): Experimental rotator cuff repair: a preliminary study. J Bone Joint Surg Am 81, 1281-1290

Gillard GC, Reilly HC, Bell-Booth PG, Flint MH (1979): The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. Connect Tissue Res 7, 37-46

Gohlke F, Rolf O, Böhm D (2007): Offene Rekonstruktion der Rotatorenmanschette. Orthopäde 36, 834-847

Goradia VK, Mullen DJ, Boucher HR, Parks BG, O'Donnel JB (2001): Cyclic loading of rotator cuff repairs: a comparison of bioabsorbable sutureless screw anchors and transosseous sutures. Arthroscopy 17, 360-364

Harryman DT, Mack LA, Wang KY, Jackins SE, Richardson ML, Matsen FA (1991): Repairs of the rotator cuff: correlation of functional results with integrity of the cuff. J Bone Joint Surg Am 73, 982-989

Hatstrup SJ (1995): Rotator cuff repair: relevance of patient age. *J Shoulder Elbow Surg* 4, 95-100

Hecker AT, Shea M, Hayhurst JO, Myers ER, Meeks LW, Hayes WC (1993): Pull-out strength of suture anchors for rotator cuff and Bankart lesion repairs. *Am J Sports Med* 21, 874-879.

Hedtmann A, Fett H: Erkrankungen der Rotatorenmanschette; in: *Schulter*; hrsg. v. Gohlke F, Hedtmann A; Thieme, Stuttgart 2002, 286-310

Herrmann H, Dessau W, Fessler LI, Vor der Mark K (1980): Synthesis of types I, III and AB2 collagen by chick tendon fibroblasts in vitro. *Eur J Biochem* 105, 63-74

Ide J, Maeda S, Takagi K (2005): A comparison of arthroscopic and open rotator cuff repair. *Arthroscopy* 21, 1090-1098

Ji JH, Shafi M, Kim WY, Kim YY (2010): Clinical outcomes of arthroscopic single and double row repair in full thickness rotator cuff tears. *Indian J Orthop* 44, 308-313

Kernwein G (1941): Tendon Implantations to Bone: A Study of the Factors Affecting Tendon-Bone Union as Determined by the Tensile Strength. *Ann Surg* 113, 1103-1104

Kessel L, Watson M (1977): The painful arc syndrome. Clinical classification as a guide to management. *J Bone Joint Surg Br* 59, 166-172.

Kim DH, ElAttrache NS, Tibone JE, Jun BJ, DeLaMora SN, Kvitne RS, Lee TQ (2006): Biomechanical comparison of a single-row versus double-row suture anchore technique for rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 34, 407-414

Klinger HM, Steckel H, Spahn G, Buchhorn GH, Baums MH (2007): Biomechanical comparison of double-loaded suture anchore using arthroscopic Mason-Allen stitches versus traditional transosseous suture technique and modified Mason-allen stitches for rotator cuff repair. *Clin Biomech* 22, 106-111

Klinger HM, Koelling S, Baums MH, Kahl E, Steckel H, Smith MM, Schultz W, Miosge N (2009): Cell biological and biomechanical evaluation of two different fixation techniques for rotator cuff repair. *Scand J Med Sci Sports* 19, 329-337

Koob TJ, Vogel KG (1987): Site-related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J Orthop Res* 5, 414-424

Kölbel R: Rotatorendefekte: Rekonstruktion und Ergebnisse; in *Degenerative Schultererkrankungen*; hrsg. Hedtmann A; Enke, Stuttgart 1990, 100-105

Kölbel R, Hedtmann A: Rekonstruktive Eingriffe an der Rotatorenmanschette; in: *Schulter*; hrsg. Gohlke F, Hedtmann A; Thieme, Stuttgart 2002, 286-310

Lapiere CM, Nusgens B, Pierard GE (1977): Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res* 5, 21-29

Lewis CW, Schlegel TF, Hawkins RJ, James SP, Turner AS (1999): Comparison of tunnel suture and suture anchor methods as a function of time in a sheep model. *Biomed Sci Instrum* 35, 403-408

Lewis CW, Schlegel TF, Hawkins RJ, James SP, Turner AS (2001): The effect of immobilization on rotator cuff healing using modified Mason-Allen stitches: a biomechanical study in sheep. *Biomed Sci Instrum* 37, 263-268

Lichtenberg S, Liem D, Magosch P, Habermeyer P (2006): Influence of tendon healing after arthroscopic rotator cuff repair on clinical outcome using single-row Mason-Allen suture technique: a prospective, MRI controlled study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 14, 1200-1206.

Liu SH, Panossian V, Al-Ahaikh R, Tomin E, Shepherd E, Finerman GA, Lane JM (1997): Morphology and matrix composition during early tendon to bone healing. *Clin Orthop Rel Res* 339, 253-260

- Lo IK**, Burkhart SS (2003): Double-row arthroscopic rotator cuff repair: reestablishing the footprint of the rotator cuff. *Arthroscopy* 19, 1035-1042.
- Ma CB**, MacGillivray JD, Clabeaux J, Lee S, Otis JC (2004): Biomechanical evaluation of arthroscopic rotator cuff stitches. *J Bone Joint Surg Am* 86, 1211–1216.
- Ma CB**, Comerford L, Wilson J, Puttlitz CM (2006): Biomechanical evaluation of arthroscopic rotator cuff repairs: double-row compared with single-row fixation. *J Bone Joint Surg Am* 88, 403-410.
- MacNab I** (1973): Rotator cuff tendinitis. *Ann Royal Coll Surg Eng* 52, 271-287
- Mantone JK**, Burkhead WZ, Noonan J (2000): Nonoperative treatment of rotator cuff tears. *Orthop Clin North Am* 31, 295-311.
- Mazzocca AD**, Millett PJ, Guanche CA, Santangelo SA, Arciero RA (2005): Arthroscopic single-row versus double-row suture anchor rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 33, 1861-1868
- McFarland EG**, Park HB, Keyurapan E, Gill HS, Selhi HS (2005): Suture anchors and tacks for shoulder surgery, part 1: biology and biomechanics. *Am J Sports Med* 33, 1918-1923.
- McLaughlin HL** (1944): Lesions of the musculotendinous cuff of the shoulder. The exposure and treatment of tears with retraction. *J Bone Joint Surg Am* 26, 31-51
- Meier SW**, Meier JD (2006): The effect of double-row fixation on initial repair strength in rotator cuff repair: a biomechanical study. *Arthroscopy* 22, 1168-1173.
- Milano G**, Grasso A, Zarelli D, Deriu L, Cillo M, Fabbriani C (2008): Comparison between single-row and double-row rotator cuff repair: A biomechanical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16, 75-80

Milgrom C, Schaffler M, Gilbert S, van Holsbeeck M (1995): Rotator-cuff changes in asymptomatic adults. The effect of age, hand dominance and gender. *J Bone Joint Surg Br* 77, 296-298.

Morrey BF, An K-N: Biomechanics of the shoulder; in: *The shoulder*; hrsg. Rockwood CA, Matsen FA; WB Saunders, Philadelphia 1990, 208-245

Naimark WA, Lee JM, Limeback H, Cheung DJ (1992): Correlation of structure and viscoelastic properties in the pericardia of four mammalian species. *Am J Physiol* 263, 1095–1106

Neer CS (1972): Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome in the shoulder: a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 54, 41-50.

Neer CS (1983): Impingement lesions. *Clin Orthop Relat Res* 173, 70-77

Netter FH: *Atlas der Anatomie des Menschen*; 3. Auflage; Thieme, Stuttgart 2006, 406-408

Nho SJ, Yadav H, Pensak M, Dodson CC, Good CR, MacGillivray JD (2007): Biomechanical fixation in arthroscopic rotator cuff repair. *Arthroscopy* 23, 94-102

Nicholson GP, Goodman DA, Flatow EL, Bigliani LU (1996): The acromion: morphologic condition and age-related changes. A study of 420 scapulas. *J Shoulder Elbow Surg* 5, 1-11

Oguma H, Murakami G, Takahashi-Iwanaga H, Aoki M, Ishii S (2001): Early anchoring collagen fibers at the bone-tendon interface are conducted by woven bone formation: light microscope and scanning electron microscope observation using a canine model. *J Orthop Res* 19, 873-880

Patte D, Goutallier D, Debeyre J (1981): Rotatorenmanschettenruptur. Ergebnisse und Perspektiven der Retrostruktur. *Orthopäde* 10, 206-215.

Poppen NK: Soft-tissue lesions of the shoulder; in: *Operative Orthopaedics*; hrsg. Chapman MW; J.B. Lippincott, Philadelphia 1988, 745-746

Ralphs JR, Tyers RN, Benjamin M (1992): Development of functionally distinct fibrocartilages at two sites in the quadriceps tendon of the rat: the suprapatella and the attachment to the patella. *Anat Embryol* 185, 181-187

Reed SC, Glossop N, Ogilvie-Harris DJ (1996): Full-thickness rotator cuff tears. A biomechanical comparison of suture versus bone anchor techniques. *Am J Sports Med* 24, 46-48

Reilly P, Amis AA, Wallace AL, Emery RJH (2003): Mechanical factors in the initiation and propagation of tears of the rotator cuff: quantification of strains of the supraspinatus tendon in vitro. *J Bone Joint Surg Br* 85, 594-599

Riley GP, Harrel RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL (1994): Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis* 53, 359-366

Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzilli PA, Hidaka C, Warren RF (1993): Tendon healing in a bone tunnel: a biomechanical and histological study in the dog. *J Bone Joint Surg Am* 75, 1795-1803.

Rokito AS, Zuckerman JD, Gallagher MA, Cuomo F (1996): Strength after surgical repair of the rotator cuff. *J Shoulder Elbow Surg* 5, 12-17

Romeo AA, Hang DW, Bach BR, Shott S (1999): Repair of full thickness rotator cuff tears: gender, age, and other factors affecting outcome. *Clin Orthop Relat Res* 367, 243-255

Rossouw DJ, McElroy BJ, Amis AA, Emery RJH (1997): A biomechanical evaluation of suture anchors in repair of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Br* 79, 458-461

Rothman RH, Parke WW (1965): The vascular anatomy of the rotator cuff. *Clin Orthop Rel Res* 41, 176-186

Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR (1992): Development and aging of phenotypically distinct fibrocartilage associated with the rat Achilles tendon. *Anat Embryol* 186, 611-618

Ruotolo C, Fow JE, Nottage WM (2004): The supraspinatus footprint: an anatomic study of the supraspinatus insertion. *Arthroscopy* 20, 246-249.

Samilson RL, Binder WF (1975): Symptomatic full thickness tears of rotator cuff. An analysis of 292 shoulders in 276 patients. *Orthop Clin North Am* 6, 449-466.

Sano H, Uthoff HK, Backman DS, Brunet JA, Trudel G, Pham B, Ishii H (1998): Structural disorders at the insertion of the supraspinatus tendon. *J Bone Joint Surg Br* 80, 720-725

Scheibel MT und Habermeyer P (2003): A modified Mason-Allen technique for rotator cuff repair using suture anchors. *Arthroscopy* 19, 330-333

Schlegel TF, Hawkins RJ, Lewis CW, Motta T, Turner AS (2006): The effects of augmentation with swine small intestine submucosa on tendon healing under tension. Histological and biomechanical evaluations in sheep. *Am J Sports Med* 34, 275-280

Schlegel TF, Hawkins RJ, Lewis CW, Turner AS (2007): An in vivo comparison of the modified Mason-Allen suture technique versus an inclined horizontal mattress suture technique with regard to tendon-to-bone healing: a biomechanical and histologic study in sheep. *J Shoulder Elbow Surg* 16, 115-121

Smith CD, Alexander S, Hill AM, Huijsmans PE, Bull AMJ, Amis AA, De Beer JF, Wallace AL (2006): A biomechanical comparison of single and double-row fixation in arthroscopic rotator cuff repair. *J Bone Joint Surg Am* 88, 2425-2431.

St. Pierre P, Olson EJ, Elliott JJ, O'Hair KC, McKinney LA, Ryan J (1995): Tendon-healing to cortical bone compared with healing to a cancellous trough. A biomechanical and histological evaluation in goats. *J Bone Joint Surg Am* 77, 1858-1866

Sugaya H, Maeda K, Matsuki K, Moriishi J (2005): Repair integrity and functional outcome after arthroscopic full-thickness rotator cuff repair: Single-row versus dual-row fixation. *Arthroscopy* 21, 1307-1316

Swadison S, Mayne R (1989): Location of intergrin complex and extracellular matrix molecule at the chicken myotendinous junction. *Cell Tissue Res* 257, 537–543

Tauro JC (1998): Arthroscopic rotator cuff repair: analysis of technique and results at 2- and 3-year follow-up. *Arthroscopy* 14, 45-51.

Taylor CM, Oelbaum RS, Grant ME (1982): The biosynthesis of glycoproteins by cultured bovine tendon fibroblasts. *Connect Tissue Res* 10, 319–331

Tuoheti Y, Itoi E, Yamamoto N, Seki N, Abe H, Minagawa H, Okada K, Shimada Y (2005): Contact area, contact pressure, and pressure patterns of the tendon-bone interface after rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 33, 1869-1874.

Tsuzaki M, Yamauchi M, Banes AJ (1993): Tendon collagens: extracellular matrix composition in shear stress and tensile components of flexor tendons. *Connect Tissue Res* 29,141–152

Turner AS (2008): Experiences with sheep as an animal model for shoulder surgery: strengths and shortcomings. *J Shoulder Elbow Surg* 16, 158-163

Uthhoff HK, Loehr J, Hammond I, Sarkar K (1986): Ätiologie und Pathogenese der Rupturen der Rotatorenmanschette. *Hefte Unfallheilkd* 180, 3-9

Von der Mark K (1981): Localization of collagen types in tissues. *Int Rev Connect Tissue Res* 9, 265-324

Waltrip RL, Zheng N, Dugas JR, and Andrews JR (2003): Rotator cuff repair. A biomechanical comparison of three techniques. *Am J Sports Med* 31, 493-497.

Warner JJ, Tetreault P, Lehtinen J, Zurakowski D (2005): Arthroscopic versus mini-open cuff repair: a cohort comparison study. *Arthroscopy* 21, 328-332

Welsch U: Gewebe; in: *Lehrbuch Histologie*; 2. Auflage; Urban & Fischer, München 2006, 85-201

Whiston TB, Walmsley R (1960): Some observations on the reaction of bone and tendon after tunneling of bone and insertion of tendon. *J Bone Joint Surg Br* 42, 377-386

Williams IF, Heaton A, McCullagh KG (1980): Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. *Res Vet Sci* 28, 302-310

Williams IF, McCullagh KG, Silver IA (1984): The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. *Connect Tissue Res* 12, 211-227

Yamaguchi K (2001): Mini-Open Rotator Cuff Repair. A updated Perspective. *J Bone Joint Surg Am* 83, 764-772

Yamauchi M, Katz EP (1993): The post-translational chemistry and molecular packing of mineralizing tendon collagens. *Connect Tissue Res* 29, 81-98

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Articulatio glenohumeralis des Menschen mit umgebenden Strukturen	S.2
Abb. 1.2	Menschliche Rotatorenmanschette	S.2
Abb. 1.3	Struktur der Polypeptidkette von fibrillären Kollagenen am Beispiel der α_1 (III)-Kette	S.9
Abb. 1.4	Intrazelluläre Biosynthese	S.11
Abb. 1.5	Extrazelluläre Biosynthese	S.12
Abb. 2.1	single-row-Technik	S.16
Abb. 2.2	double-row-Technik	S.16
Abb. 2.3	Schemazeichnung der Drei-Schritt-Technik	S.25
Abb. 3.1	lichtmikroskopische Histologie des Knochen-Sehnen-Komplexes unbehandelter Kontrolltiere	S.28
Abb. 3.2	Toluidinblau-Färbung der unbehandelten Kontrolltiere	S.29
Abb. 3.3	Toluidinblau-Färbung drei Wochen nach double-row-Rekonstruktion	S.30
Abb. 3.4	Chondrozyten-Cluster (gelber Pfeil) sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion, Toluidinblau-Färbung	S.31

Abb. 3.5	Toluidinblau-Färbung der single-row- und double-row-Gruppe zu den 6 Untersuchungszeitpunkten	S.32
Abb. 3.6	immunhistologische Färbung von Kollagen Typ I, unbehandelte Kontrolle	S.33
Abb. 3.7	immunhistologische Färbung von Kollagen Typ I eine Woche nach double-row-Rekonstruktion	S.34
Abb. 3.8	behandelte Tiere, immunhistologische Färbung von Kollagen Typ I über einen Untersuchungszeitraum von 26 Wochen	S.36
Abb. 3.9	immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II, unbehandelte Kontrollgruppe	S.37
Abb. 3.10	immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II zwei Wochen nach single-row-Rekonstruktion	S.38
Abb. 3.11	immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II sechs Wochen nach single-row-Rekonstruktion	S.39
Abb. 3.12	immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion	S.40
Abb. 3.13	behandelte Tiere, immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II über einen Untersuchungszeitraum von 26 Wochen	S.41
Abb. 3.14	immunhistologische Färbung von Kollagen Typ III, unbehandelte Kontrolle	S.42
Abb. 3.15	immunhistologische Färbung von Kollagen Typ III sechs Wochen nach double-row-Rekonstruktion	S.44

Abb. 3.16	immunhistologische Färbung zwölf Wochen nach single-row-Rekonstruktion	S.44
Abb. 3.17	behandelte Tiere, immunhistologische Färbung von Kollagen Typ III über einen Untersuchungszeitraum von 26 Wochen	S.46

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Stadien des Impingementsyndroms nach Neer(1983)	S.4
Tab. 1.2	Kollagentypen	S.8
Tab. 2.1	Abfolge im Einbettautomaten	S.19
Tab. 2.2	Färbeprotokoll Trichrom	S.20
Tab. 2.3	Färbeprotokoll Toluidin-Blue-O-Färbung	S.22
Tab. 2.4	Auflistung der verwendeten Primärkörper	S.26
Tab. 3.1	Kollagenverteilung	S.47

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für die Überlassung dieses Studienthemas und die gute Zusammenarbeit bedanken. Weiterhin danke ich den Mitgliedern der AG orale Biologie und Geweberegeneration für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche. Instruktion, Unterstützung, Ermutigung und postwendende Korrekturen waren positive Erfahrungen während der Entstehungszeit meiner Doktorarbeit.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Dr. med. Hans-Michael Klinger und seinen Mitarbeitern für die Durchführung des chirurgischen Studienabschnittes und die Überlassung der Schafschulterpräparate.

Lebenslauf

Mein Name ist Andrea Posmyk, wohnhaft in der Bachstraße 7 in 37308 Heilbad Heiligenstadt. Ich wurde am 28.03.1983 in Heilbad Heiligenstadt geboren.

Meine Mutter Annett Posmyk, geborene Schyma, wurde am 13.05.1963 geboren. Sie ist gelernte Lebensmittelchemielaborantin und qualifizierte sich im Fernstudium als Finanzökonom. Seit 18 Jahren ist sie als Disponentin bei Magna Automobiltechnik in Heilbad Heiligenstadt tätig.

Mein Vater Heino Posmyk wurde am 27.06.1963 geboren. Er ist gelernter Elektromonteur und arbeitet als Hausmeister am Staatlichen Gymnasium „Johann-Georg-Lingemann“ in Heilbad Heiligenstadt.

Ich habe einen jüngeren Bruder, Michael Posmyk, der am 04.10.1986 geboren wurde. Er studiert im 8. Semester Pharmazie in Marburg.

Von 1989 bis 1993 besuchte ich die Grundschule IV in Heilbad Heiligenstadt. Das Staatliche Gymnasium „Johann-Georg-Lingemann“ besuchte ich von 1993 – 2001. Die Hochschulreife erlangte ich am 21. Juni 2001 am Staatlichen Gymnasium „Johann-Georg-Lingemann“.

Im April 2002 begann ich das Zahnmedizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen, welches ich am 31. Mai 2007 erfolgreich mit dem Staatsexamen beendete.

Am 01. Juli 2007 begann ich meine Assistenzzeit in der Zahnarztpraxis Andreas Fasshauer in Bad Sooden-Allendorf. Am 30. November 2008 verließ ich die Zahnarztpraxis Andreas Fasshauer und absolvierte den Rest meiner Assistenzzeit vom 01. Dezember 2008 bis 31. Juni 2009 in der Gemeinschaftspraxis Dr. med. dent. Karin Theus und Dr. med. dent. Nicola Theus in Heilbad Heiligenstadt. Seit dem 01. Juli 2009 bin ich in der Zahnarztpraxis Dr. med. dent. Nicola Theus in Heilbad Heiligenstadt als angestellte Zahnärztin tätig.