



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Medizinische Fakultät

Abteilung und Poliklinik für Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. A. B. Imhoff)

**Biomechanische Untersuchung des Einflusses von lentiviral  
transduzierten Stammzellen mit basic fibroblast-growth-factor (bFGF)  
auf die Sehnenheilung im in-vivo Rattenmodell**

**Florian Balthasar Imhoff**

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

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. S. Vogt
2. Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 22.02.2016 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.07.2016 angenommen.

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Einführung	3
2.2	Heutige Standardtherapien	4
2.3	Biomechanische Eigenschaften einer Sehne	5
2.4	Sehnenheilung	7
2.4.1	<i>Physiologie</i>	7
2.4.2	<i>Regulierung</i>	8
2.5	Therapieansätze	9
<b>3</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>10</b>
3.1	Tiermodell	10
3.2	Gentransfer	10
3.3	Stammzellen	11
3.4	Hypothese	12
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
4.1	Versuchsaufbau	14
4.2	Stammzellen	15
4.2.1	<i>Isolierung, Kultivierung und lentivirale Transduktion</i>	15
4.2.2	<i>Charakterisierung der transduzierten rMSC</i>	15
4.3	Operatives Procedere	15
4.3.1	<i>Tiere</i>	15
4.3.2	<i>Tieroperation</i>	16
4.3.3	<i>Euthanasie und Sehnenentnahme</i>	18
4.4	Datengewinnung	19
4.4.1	<i>Makroskopische Beurteilung</i>	19
4.4.2	<i>Biomechanische Analyse</i>	20
4.4.3	<i>Histologie/Immunhistologie</i>	22
4.4.4	<i>Statistische Analyse</i>	23
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
5.1	Heilungsverlauf und Makroskopie der Sehnenregenerate	24
5.2	Biomechanik	25
5.2.1	<i>Maximale Versagenslast nach 2 und 4 Wochen</i>	25
5.2.2	<i>Steifheit nach 2 und 4 Wochen</i>	27
5.3	Charakterisierung der Stammzellen	30
5.4	Histologische und immunhistochemische Auswertung	32
5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	35
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>36</b>
6.1	Interpretation der Ergebnisse	36
6.2	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	37
6.3	Limitation	41
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>45</b>

## 2 Einleitung

### 2.1 Einführung

Im muskuloskeletalen System sind Sehnen ein wichtiges und vor allem verletzungsanfälliges Glied. Die biomechanischen Eigenschaften einer Sehne ermöglichen es, unterschiedlichen Belastungen im Laufe eines Lebens adäquat standzuhalten<sup>1</sup>. Sehnen übermitteln die Kraft die in der Muskulatur gebildet wird auf die Knochen und bewegen bzw. stabilisieren dadurch die Gelenkpartner. Sehnen können starken Kräften Widerstand bieten<sup>2</sup>. Gründe für Sehnenrupturen sind Mikrotraumen<sup>3</sup> durch rezidivierende Belastungen, wie es zum Beispiel bei sportlicher Belastungen<sup>4</sup> vorkommt, hypoxische und degenerative Veränderungen<sup>5</sup>, wie auch Tendinitiden aufgrund verminderter Perfusion, Tendolipomatosis oder kalzifizierende Tendinopathien<sup>6</sup>. Zudem können lokale Infiltrationen von Kortikosteroiden oder systemisch applizierte Medikamente Ursache für Risse sein<sup>7</sup>. Die Achillessehne ist mit ca. 35% besonders häufig von Rupturen betroffen mit steigender Inzidenz<sup>8-10</sup>.

Die erste Heilungsphase eines Sehnenrisses dauert beim Menschen über sechs Wochen und hinterlässt ein minderwertiges Sehnen-Narben-Gewebe. Auch im fortlaufenden Prozess der „Remodellingphase“, welche weitere Wochen und Monate andauert, ist keine „Restitutio ad integrum“ zu sehen. Das intratendinöse Regeneratgewebe ist histologisch und biomechanisch minderwertig und entspricht mit veränderten Phänotypen und Durchmesser der Kollagenfibrillen der Kollagenanteile auch nach Monaten nicht der Zusammensetzung des Ursprungsgewebes<sup>11</sup>. Dadurch kann es zu Reruptur oder einer Sehneninsuffizienz mit entsprechenden Einschränkungen des Patienten kommen.

## 2.2 Heutige Standardtherapien

Für die Behandlung der Achillessehnenruptur stehen unterschiedliche Verfahren zur Auswahl, die je nach Art der Ruptur, Alter des Patienten sowie Begleiterkrankung ihre jeweiligen Vorzüge haben, wie in einem Review (Cochrane Database) von Khan et al.<sup>12</sup> 2004 dargestellt wird. Klinisch werden Partial- von Komplettrupturen und traumatisch von degenerativ bedingten Rupturen unterschieden. Des Weiteren ist für die weitere Therapie entscheidend, ob die Ruptur intratendinös, im Muskel-Sehnen-Übergang, oder ansatznah am Knochen entstanden ist. Zu den heutigen Standardtherapieverfahren gehören zum einen die konservative Ausbehandlung und zum anderen die operative Versorgung.

Bei konservativer Therapie mittels Ruhigstellung in einem Gips oder einem speziellen Unterschenkel-Stiefel ist die Dehiszenz der Sehnenstümpfe, welche zum Beispiel sonografisch oder MR-tomografisch dargestellt werden kann ein wichtiges Kriterium. Es wird weiter eine sechswöchige Ruhigstellung und Entlastung an Unterarm-Gehstützen mit physiotherapeutischer Beübung verordnet mit anschließender Aufbelastung, sodass eine normale Gehfähigkeit erst nach acht bis zehn Wochen erreicht wird und sportliche Aktivitäten wie Sprung- und Spielsportarten frühestens nach drei Monaten wieder aufgenommen werden können. Die Langwierigkeit der Behandlung beeinträchtigt die Patienten stark im privaten und beruflichen Leben und stellt somit ein großes Problem dar.

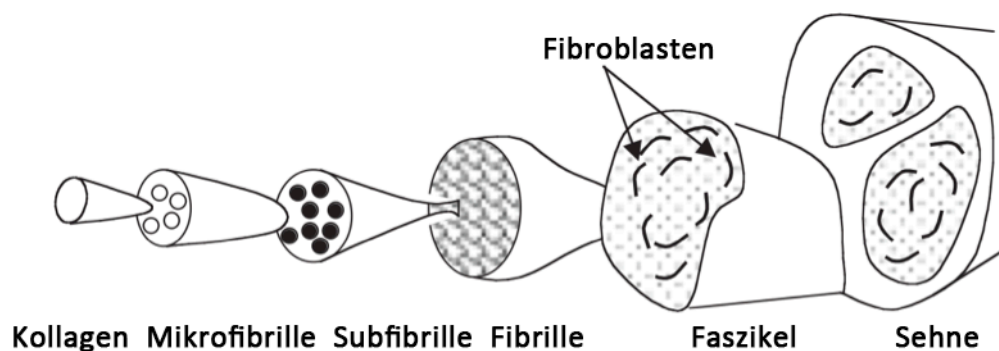
In der operativen Therapie werden primäre Sehnennähte (End-zu-End) entweder in einem offenen oder minimalinvasiven Verfahren durchgeführt. Bei ansatznahen Rupturen können zusätzlich Knochenanker mit Fäden als Zugsystem verwendet werden. Auch hier schließt sich eine gewisse Ruhigstellung für mehrere Wochen an.

Die heutige Studienlage zeigt nach wie vor keine signifikanten Unterschiede bei akuten Achillessehnenrupturen bezüglich konservativer gegenüber operativer Therapieformen, wie eine randomisierte Studie von Nilsson-Helander et al.<sup>13</sup> 2010 und eine randomisierte multizentrische Studie von Willits et al.<sup>14</sup> 2010 zeigte. Es wurde jedoch übereinstimmend beobachtet, dass eine frühzeitige Mobilisation sowohl nach operativem, als auch nach konservativem Vorgehen, die Sehnenheilung positiv beeinflusst.

### 2.3 Biomechanische Eigenschaften einer Sehne

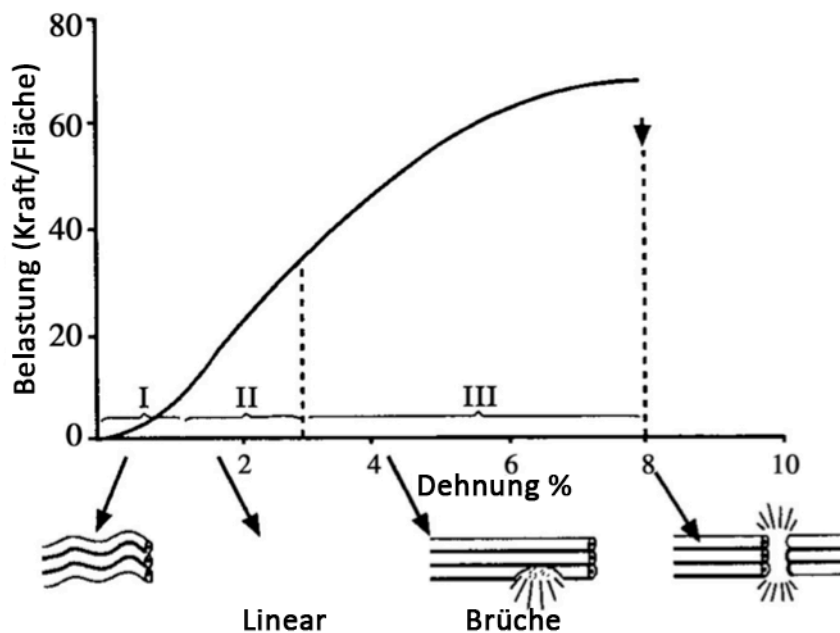
Sehnen agieren als eine Art Puffer zwischen Muskel und Knochen um von außen einwirkende Kräfte absorbieren zu können<sup>15</sup>. Der Aufbau einer Sehne wird schematisch in Abbildung 1 dargestellt<sup>16</sup>. Das Epitenon und Peritenon bestehen aus einem dichten Netzwerk aus longitudinal, schräg und transversal verlaufenden Kollagenfibrillen, welche die Sehnenbündel kreuzen und zusammenhalten. Im Inneren eines Bündels sind Faszikel zu finden, welche wiederum aus mehreren Fibrillen bestehen. Hier verlaufen die Kollagenfibrillen nicht nur längs, sondern auch quer und nicht parallel, sodass auch Spindeln gebildet werden<sup>17</sup>. Eine Kollagenfaser stellt die kleinste Einheit einer Sehne dar.

Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Sehne<sup>16</sup>



Eine Sehne besteht in ihren festen Bestandteilen zu 70 - 80% aus Kollagen<sup>18</sup>. Am häufigsten findet man Kollagen I als Bestandteil, neben Kollagen III, V und VI<sup>19</sup>. Die visko-elastische Eigenschaft einer Sehne hängt von den intermolekularen Verbindungen ab<sup>20</sup>. Hier sind insbesondere die Kollagenfasern und Fibrillen von Bedeutung<sup>21</sup>. Bis zu einem gewissen Punkt der ziehenden Kraft ist die Ausdehnung der Kollagenfasern linear und die Anordnung der Fasern wird zunehmend parallel<sup>22</sup> (Abbildung 2).

Abbildung 2: Belastung/Ausdehnung in % (aus JBJS 2005<sup>23</sup>)



Nach Ablassen der Kraft zeigt die Sehne ihre Elastizität und kann wieder in ihre ursprüngliche Länge und Form zurückkehren<sup>24</sup>. Bei zunehmender Kraft kommt es zu Mikroverletzungen einzelner Fasern, welche jedoch noch regenerieren können. Wenn die Ausdehnung der Sehne ca. 8% bis 10% überschreitet, kommt es im Sinne der Mikroverletzungen zu einem Auseinandergleiten einzelner Fibrillen, was in einer Studie mittels radiologischer Diffraktion gezeigt werden konnte<sup>25</sup>. Die Folge ist eine Ruptur der Sehne mit Einkräuseln der einzelnen Fasern am Stumpfende.

## 2.4 Sehnenheilung

### 2.4.1 Physiologie

Die Sehnenheilung vollzieht sich ähnlich wie die allgemeine Wundheilung in mehreren Phasen<sup>23</sup>: Nach akutem Riss beginnt der Heilungsverlauf mit der inflammatorischen Phase, in der eine Migration und Proliferation von insbesondere neutrophilen Granulozyten aus dem extrinsischen, peritendinösen Gewebe, sowie eine intrinsische Gewebeantwort aus Epitenon und Endotenon erfolgt. Es dominieren primär Monozyten und Makrophagen, welche nekrotisches Material phagozytieren. Hierbei werden chemotaktische und vasoaktive Faktoren ausgeschüttet um den Reparaturvorgang voranzutreiben. Es werden Tenozyten rekrutiert, welche in die Zone des Gewebes Schadens migrieren und dort Kollagen Typ III synthetisieren<sup>26</sup>. In der folgenden proliferativen Phase erreicht die Expression von Kollagen Typ III ihren Höhepunkt.

Vorliegende Untersuchungen an azellularisierten Sehnen, die mit Fibroblasten neu besiedelt wurden, haben einen ähnlichen Prozess gezeigt<sup>27</sup>. Die endgültige biomechanische Stabilität wird erst durch die organisierende Phase, das sogenannte *Remodeling* erzielt, wobei es zur Organisation der Kollagenfasern entlang der Belastungsachse und zu einer Umverteilung des in der reparativen Phase primär gebildeten Kollagen Typ III in das mechanisch stabilere Typ I Kollagen kommt. Die Interaktion zwischen Kollagen I und III und deren gegenseitige Organisation wurden bereits 1977 von Lapiere et al.<sup>28</sup> erkannt.

Bei der Heilung kommt es jedoch nicht zu einer vollständigen Regeneration der Sehne mit einem weiterhin im Vergleich zur gesunden Sehne erhöhtem Typ III Kollagen Anteil, der umgekehrt proportional zur mechanischen Stabilität der Sehne ist<sup>28</sup>. Daher sollte für eine optimierte Sehnenheilung das Regenerat einen möglichst hohen Anteil an Kollagen

Typ I aufweisen. Eine frühe kontrollierte Mobilisierung in den ersten Wochen zeigte einen positiven Effekt auf die Anlagerung und Orientierung von Kollagenfibrillen und damit Verbesserung der Festigkeit des Sehnenregenerats<sup>29</sup>.

## 2.4.2 Regulierung

Die Regulierung der Sehnenheilung wird durch eine Reihe von Proteinen gesteuert. Eine besondere Bedeutung spielen dabei folgende Wachstumsfaktoren:

1. *insulin like growth factor-1 (IGF-1)* wird vor allem in der frühen Inflammations-Phase exprimiert und unterstützt die Proliferation<sup>30</sup> und Migration von Fibroblasten. Dadurch erhöht sich der Kollagenanteil<sup>31</sup>.

2. *transforming growth factor beta (TGF beta)* führt zur Erhöhung von Typ I Kollagen und Fibronectin<sup>32</sup>. Die höchste Expression zeigt sich 10 Tage nach Verletzung<sup>33</sup>, die im Rahmen der Sehnenheilung über 8 Wochen mit erhöhten Werten anhält<sup>34,35</sup>.

3. *vascular endothelial growth factor (VEGF)* stimuliert die Angiogenese. Die höchste Expression findet sich nach der Inflammations-Phase<sup>31</sup>.

4. *platelet-derived growth factor (PDGF)* spielt eine wichtige Rolle im „Remodeling“ von Weichteilgewebe<sup>36</sup> und verbessert im Tierversuch die biomechanischen Eigenschaften von Sehnen<sup>37,38</sup>. Außerdem bewirkt PDGF eine verstärkte Kollagensynthese<sup>39,40</sup>.

5. *basic fibroblast growth factor (bFGF)* führt zu einer Stimulation der Angiogenese, Zell-Migration und Zell-Proliferation<sup>31,41-44</sup>.

Von diesen genannten Faktoren hat in der experimentellen Sehnenheilung insbesondere bFGF einen positiven Einfluss mit einer erhöhten Produktion von Kollagen Typ I und III gezeigt<sup>42,43,45,46</sup>.



## 2.5 Therapieansätze

Vielversprechende Ergebnisse mit positivem Effekt von Stammzellen auf die Sehnenheilung, bzw. Sehnen-Knochenheilung konnten bisher in wenigen Tierversuchen gezeigt werden<sup>6,47,48</sup>. Stammzellen können jedoch nicht nur durch direkte Differenzierung, sondern auch durch das Exprimieren von Wachstumsfaktoren, wie IGF-1, TGF- $\beta$ , VEGF, PDGF und bFGF, den Heilungsprozess positiv beeinflussen<sup>49,50</sup>. Aus dieser Überlegung ergibt sich die mögliche Therapie mit Induktion einer kontinuierlichen Wachstumsfaktorenabgabe im Gewebe durch genveränderte Stammzellen.

Der Transfer von bestimmten Genen in Zellen, um eine erhöhte oder gegebenenfalls regulierbare Expression von spezifischen Faktoren im Gewebe zu erreichen, ist vielversprechend. *In-vitro* Versuche zeigen hier bereits gute Erfolge<sup>44</sup>, weshalb der nächste Schritt nun die Durchführung eines Tierversuches *in-vivo* darstellt.

Aus den bekannten Wachstumsfaktoren, wie oben beschrieben, wurde bFGF gewählt, da dieser insbesondere die Kollagenproduktion anregt<sup>40</sup>. Die transduzierten Stammzellen können somit kontinuierlich bFGF exprimieren.

## **3 Problemstellung**

### **3.1 Tiermodell**

Um den Effekt von transduzierten Stammzellen auf die Sehnenheilung zu untersuchen und entsprechend zu vergleichen, wurde ein in der Literatur mehrfach beschriebenes Tiermodell an Ratten<sup>51-55</sup> zur Untersuchung der Sehnenheilung an der Achillessehne angewendet.

Ratten eignen sich in mehrfacher Hinsicht als Versuchstiere diese Hypothese. Stammzellen können standardisiert gewonnen, angezchtet und eine lentivirale Transduktion vorgenommen werden. Die Haltung der Tiere ist einfach und überschaubar. Die Heilungstendenz sowohl der Wunde, als auch des Sehnengewebes ist, bei geringem Infektionsrisiko, gut. Außerdem zeigen gezüchtete Lewisratten kein aggressives Verhalten untereinander. Die Operation der Achillessehne kann in minimalinvasiver Technik erfolgen und die Sehne standardisiert präpariert werden. Auch die Durchführung der histologischen Schnitte und biomechanischen Versuche kann nach einem standardisierten Protokoll ablaufen, um Ergebnisse mit oben genannten Studien zu vergleichen. Hinsichtlich der Anatomie, Sehnenaufbau und Heilungsverläufe können schließlich Vergleiche zum Menschen gezogen werden.

### **3.2 Gentransfer**

In der experimentellen Sehnenheilung spielt der basic fibroblast growth factor (bFGF) eine große Rolle. Bereits im dem Jahr 2000 konnte in der Arbeitsgruppe um B. Chan et al.<sup>56</sup> nachweisen, dass die bFGF Applikation zu Beginn der Heilung eine Steigerung der Kollagenproduktion bewirkt<sup>40,56</sup>.

Durch die Gentherapie kann ein „therapeutisches Gen“ in eine Zelle transferiert werden, um zum Beispiel eine kontinuierliche Expression des „therapeutischen Gens“ zu erreichen. Bei der *in-vivo* Methode erfolgt der Transfer in Zellen über Vektoren direkt im Organismus. Bei der *ex-vivo* Methode werden Zellen entnommen, außerhalb des Organismus gentherapeutisch bearbeitet und zurück in den Organismus replantiert.

Sogenannte Vektoren, die das „therapeutische Gen“ beinhalten, können als Trägermolekül verwendet werden. So wird die DNA/RNA des „therapeutischen Gens“ als Zelltransduktion in das Zytoplasma bzw. in den Zellkern gelangen.

Zu den nicht-viralen Vektoren<sup>57</sup> gehören die Plasmide. Die Vorteile des nicht-viralen Gentransfers bestehen in der Einfachheit der Durchführung mit unterschiedlicher DNA Größe, sowie geringer Toxizität. Jedoch ist die Stabilität des Transfers und die Transduktionsrate im Vergleich zu viralen Vektoren<sup>58</sup> geringer. Als virales Transfersystem können Lentiviren bzw. lentivirale Vektoren aus der Gruppe der Retroviren ruhende Zellen infizieren. Um die Gefahr der Insertionsmutagenese zu reduzieren, wurden sogenannte selbstinaktivierende Vektoren konstruiert. Diese Vektoren wurden im Bereich der Sehnenregeneration jedoch bisher nicht angewendet.

### **3.3 Stammzellen**

Stammzellen gelten als pluripotente Vorläuferzellen, welche in verschiedene Gewebe differenzieren können. So sind mesenchymale Stammzellen in der Lage zu Knochen, Knorpel, Muskel, Sehnen, Fett und Bindegewebe zu differenzieren was 1994 von Caplan<sup>59</sup> als „Mesengenic Process“ beschrieben wurde.

Die Stammzellapplikation zur Förderung der Sehnenheilung wurde in verschiedenen Arbeiten untersucht. Der alleinige Zusatz von Stammzellen zeigte sowohl in der frühen Knochen-Sehnenheilung als auch in der intertendinösen Heilung bei Sehndefekten

vielversprechende Ergebnisse<sup>47,60</sup>. Die Fähigkeit adulter mesenchymaler Stammzellen in verschiedene Zellspezies, wie Osteoblasten, Fibroblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren ist in der Literatur vielfältig dokumentiert<sup>61</sup>.

Neben der Verwendung von nicht modifizierten mesenchymalen Stammzellen (MSC) verschiedener Spezies ist auch die genetische Manipulation mit verschiedenen viralen<sup>62</sup> und nicht-viralen Vektoren<sup>63</sup> in-vitro u.a. zur Expression von Reportergenen beschrieben. Die in vivo Stabilität der Genexpression kann mit Hilfe des Reportergens eGFP getestet werden. Da es sich bei dem therapeutischen Genprodukt bFGF um ein sezerniertes Protein handelt, ist dessen Nachweis nur im Gesamtgewebe möglich und nicht auf Einzelzellebene. Das Reportergen eGFP hingegen lässt Rückschlüsse auf die Genexpression auf Einzelzellebene zu und ist damit ein wichtiger Bestandteil in der Auswertung wie Vogt et al. 2008<sup>44</sup> zeigen konnte. Um eine Aussage über die qualitative Bestimmung von bFGF und eGFP zu bekommen, kann eine spezifische Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) aus dem Gesamtgewebe erfolgen.

### **3.4 Hypothese**

Um eine primäre Sehnenheilung qualitativ zu verbessern und zu beschleunigen wurden verschiedene Ansätze ausprobiert, wie die lokale Injektion von Wachstumsfaktoren<sup>64</sup>, Blutplättchenkonzentraten<sup>53</sup> oder die systemische Gabe von Vitaminpräparaten<sup>65</sup>. Die Verwendung von Stammzellen als Möglichkeit zur Regeneration wird schon seit Jahren postuliert. Dies war und ist Stand der gegenwärtigen Forschung. Eine fördernde Einflussnahme auf die Prozesse der Sehnenheilung ist mittels Applikation von rekombinanten Wachstumsfaktoren möglich. Proteine, welche lokal appliziert werden,

haben nur einen temporären therapeutischen Effekt. Um einen konstanten Gewebespiegel zu erreichen bedarf es einer repetitiven Gabe<sup>44</sup>.

Nach den in der Literatur vorliegenden Berichte über positive Sehnenheilungseffekt durch entweder den Wachstumsfaktor (bFGF) oder Stammzellen ist das Ziel dieser Studie nun die randomisierte Testung zu analysieren. Bis zum aktuellen Zeitpunkt wurde die Kombination aus Stammzellen und die kontinuierliche Expression von bFGF in-vivo nicht analysiert.

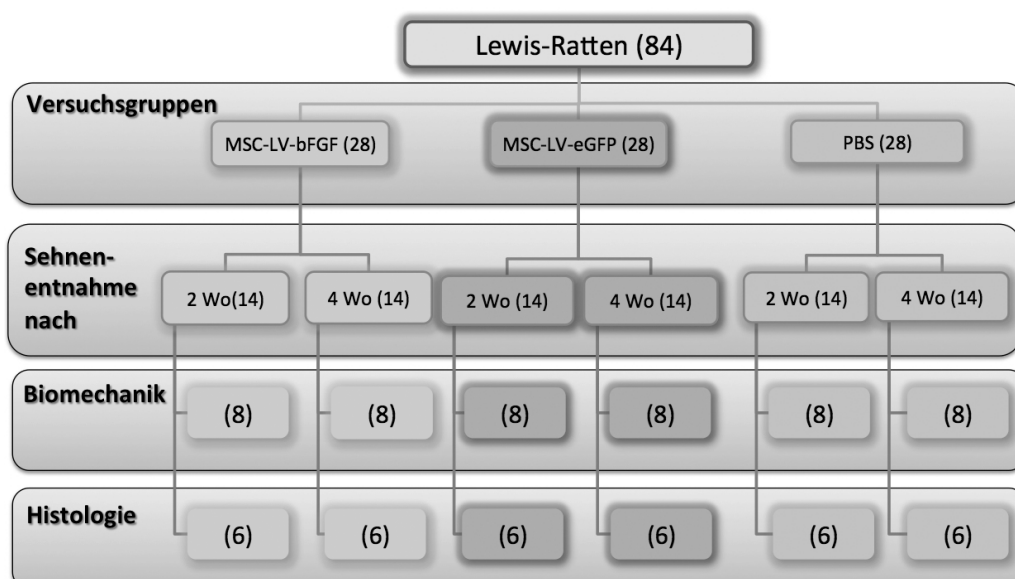
Die Hypothese ist, dass bFGF-exprimierende Stammzellen den Heilungsprozess von Ratten-Achillessehnen im akuten Defekt-Model, im Vergleich zu Stammzellen alleine und einer Kontrollgruppe (Leergruppe ohne Stammzellen), beschleunigen und ein qualitativ hochwertigeres und funktionell stärker belastbares Regeneratgewebe entstehen lassen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Versuchsaufbau

Das Studiendesign wurde mehrdimensional angelegt. Es sollten zwei Versuchsgruppen, mit eGFP markierte mesenchymale Stammzellen (MSC-LV-eGFP) und bFGF exprimierende mesenchymale Stammzellen (MSC-LV-bFGF) gegenüber einer Kontrollgruppe, welche eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) injiziert erhielt, ausgewertet werden. Zusätzlich werden die Regenerate zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, 14 und 28 Tage postoperativ, analysiert (Abbildung 3). Der Versuchsaufbau umfasste insgesamt 84 Tiere plus 12 Reservetiere. Ein Tierversuchsantrag wurde entsprechend bei der Regierung von Oberbayern eingereicht und genehmigt (TVA 55.2- 1-54-2531.8-160-09). Die Berechnungsgrundlage der Gruppengröße beruht auf einem statistischen Gutachten von Herrn Dipl.-Stat. Tibor Schuster, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie, TUM. Für die statistische Auswertung wurden pro Gruppe und Zeitpunkt jeweils 6 Tiere der histologischen und immunhistochemischen und 8 Tiere der biomechanischen Testung zugeführt.

Abbildung 3: Versuchsaufbau, Anzahl der Tiere



## **4.2 Stammzellen**

### **4.2.1 Isolierung, Kultivierung und lentivirale Transduktion**

Die Verfahren zur Stammzellentnahme aus Rattenknochen, die Isolierung, Kultivierung und Differenzierung der Zellen sind in unserem Labor etabliert und standardisiert (Dr. Martina Anton, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung). Es wurden mesenchymale Stammzellen durch Ausspülung aus Rattenknochen (Tibia und Femur) nach einem standardisierten Protokoll gewonnen und in der Zellkultur vermehrt<sup>18,66</sup>. Zusätzlich wurden, selbst-inaktivierende lentivirale Vektoren produziert, welche eGFP oder bFGF exprimieren<sup>67</sup>. Anschließend erfolgte in der einen Gruppe die lentivirale Transduktion mit dem Wachstumsfaktor bFGF. Die zweite Stammzellgruppe wurde mittels eGFP Markergen transduziert für die spätere immunhistologische Auswertung. Zusätzlich sollte die Transduktion mit einem Markergen die Variable der lentiviralen Transduktion ausschließen, um gezielt die Variable bFGF analysieren zu können.

### **4.2.2 Charakterisierung der transduzierten rMSC**

Die Effizienz der Transduktion wurde mittels Flow-Zytometrie (FACS Vantage, Bectin Dickinson, Deutschland) der eGFP transduzierten Zellen festgestellt<sup>67</sup>. Die bFGF Exprimierung wurde durch eine reverse Transkriptase PCR ermittelt.

## **4.3 Operatives Procedere**

### **4.3.1 Tiere**

Für den Versuch wurden 14 Wochen alte, männliche Lewis-Ratten (LEW /Crl inbred, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tierhaltung wurde unter üblichen Bedingungen mit ständiger Betreuung durch eine Tierärztin (Dr. G. Wexel) im Zentrum

für präklinische Forschung (ZPF), Klinikum rechts der Isar, TU München, durchgeführt. Die Akklimatisationsphase der Tiere betrug 7 Tage, während 2 bis 4 Tiere zusammen in einem Standardkäfig (Makralon Typ IV Käfig) mit autoklavierten Sägespänen als Nestmaterial gehalten wurden. Die Ratten hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Rattenpellets Fa. Altromin, Deutschland). Der Tages/Nacht-Rhythmus wurde mit einem 12h Zyklus eingehalten, die Raumtemperatur betrug 22° Celsius (+/- 2°C). Zum Zeitpunkt der Operation hatten die Ratten durchschnittlich ein Gewicht von 412g (SD 20,37g) erreicht. Die Tierhaltung und Umgang vor, während und nach der Operation wurden nach den Richtlinien des Instituts, welche sich auf nationale und internationale Vorgaben und Rechte stützt, durchgeführt (EU-Richtlinie 86/609).

#### **4.3.2 Tieroperation**

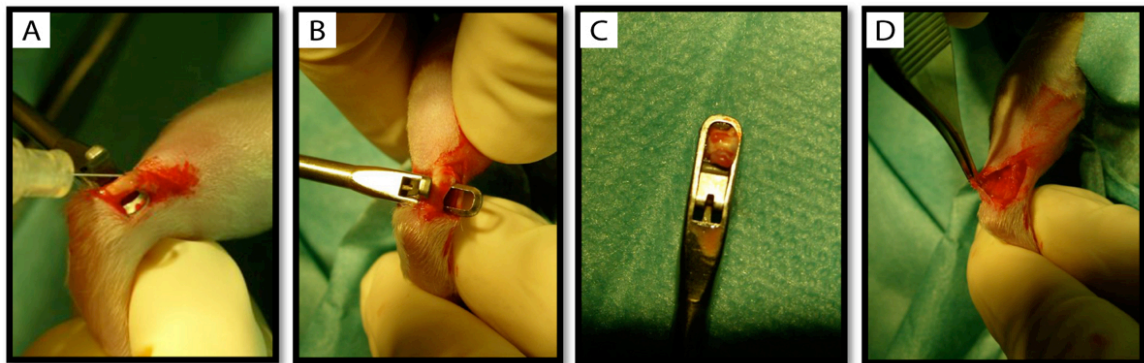
Für die perioperative Analgesie wurde Metamizol (30mg/Kg) oral gegeben. Eingeleitet wurde die Narkose mit einer intramuskulären Injektion der Kombination aus Medetomidin (0,15 mg/kg), Midazolam (2 mg/kg) und Fentanyl (0,005mg/kg). Der operative Eingriff geschah unter sterilen Bedingungen nach Rasieren des linken Hinterlaufes und Desinfektion mit Cutasept (Bode Cutasept® F, Bode Chemie GmbH, Germany). Während der Operation wurden die Tiere mit 100% Sauerstoff als Atemluft beatmet und die Körpertemperatur durch eine Wärmematte mit konstanten 37°C aufrecht erhalten. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Augen mit einer fettenden Salbe versehen (Bepanthen, Bayer Vital GmbH, Germany) und eine subkutane Injektion mit 5ml NaCl gegen die Dehydratation gegeben. Es erfolgte eine Narkoseüberwachung mittels Pulsoximetrie (Pulsfrequenz, periphere Sauerstoffsättigung) und einer rektalen Sonde zur Temperaturüberwachung. Nach Einwirkung des Aseptikums über 3 Minuten



wurde der linke Hinterlauf mit einem sterilen Lochtuch abgeklebt und abermals steril abgesprüht.

Es erfolgte eine ca. 15mm lange Hautinzision medial der Achillessehne mit scharfer und stumpfer Freipräparation der Sehne nach distal bis zum Kalkaneus und nach proximal bis zum Muskelsehnenübergang. Danach wurde ein sogenannter „Punch“, ein Handinstrument aus dem arthroskopischen Bereich (Meniskusresektion) (Fa. Arthrex, USA), angelegt und bei 90 Grad Stellung des Fußes zum Unterschenkel ganz nach distal geschoben. Als nächster Schritt folgte nun randomisiert und in Unwissenheit des Operateurs die Applikation von entweder wachstumsfaktor-exprimierenden Stammzellen (MSC-LV-bFGF), markierten Stammzellen (MSC-LV-eGFP) oder PBS mittels Insulinspritze. Entsprechend den einzelnen Gruppen wurde eine Zellsuspension, (100.000 Stammzellen/ml PBS), durch mehrmaliges Ansetzen der Spritze fächerförmig proximal und distal des angelegten Punch-Instrumentes in die Sehne injiziert (Abb. 4: A). Die Sehne wurde nun intratendinös mit dem Punch scharf durchtrennt, wodurch ein standardisierter Substanzverlust der Sehne von 2,4mm entstand (Abb. 4: B/C). Die Sehnenstümpfe wurden in situ ohne Adaption belassen (Abb. 4: D). Abschließend wurde lediglich eine Hautnaht in Intrakutantentechnik mit einem resorbierbaren Faden der Stärke 4-0 (Monocryl® suture (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Germany) durchgeführt und die Wunde wurde mit einem Sprühpflaster (OpSite, Smith & Nephew, Germany) versehen.

Abbildung 4: Operationsschritte



Am Ende des Eingriffs wurde die Narkose mit der Kombination aus Atipamezol (0,75 mg/kg), Flumazenil (0,2 mg/kg) und Naloxon (0,12 mg/kg) als subkutane Injektion antagonisiert. Die Tiere erhielten zur postoperativen Analgesie Buprenorphin (0,05 mg/Kg) subkutan sowie Metamizoltropfen zweimal pro Tag für drei Tage. Die Extremität wurde anschließend ohne Ruhigstellung belassen, sodass eine freie Bewegung möglich war.

#### 4.3.3 Euthanasie und Sehnenentnahme

Am jeweiligen Versuchsende 14 bzw. 28 Tage postoperativ wurden alle Tiere mit einer intravenös applizierten Überdosis Pentobarbital (80 mg/Kg) euthanasiert. Zuvor wurden die Tiere mit Medetomidine (0,15 mg/kg), Midazolam (2 mg/kg) und Fentanyl (0,005mg/kg) anästhesiert.

Nun wurde über den vorgegebenen Zugang die Achillessehne exploriert und der M. triceps surae weiter nach proximal bis zum Knie freigelegt und scharf abgetrennt. Distal erfolgte die Präparation des Kalkaneus mit Belassen des Sehnenansatzes am Knochen. Der Fuß wurde im Sprunggelenk exartikuliert und konnte mit der am Kalkaneus ansetzenden Achillessehne, inklusive Muskelbauch, als Ganzes entnommen werden.

Danach erfolgte eine fotografische Dokumentation und makroskopische Beurteilung der Kontinuität des Sehnenregenerats.

Für die Versuchsreihe der biomechanischen Analyse wurde das entnommene Material in Zellophan-Folie eingebettet und auf -18 Grad Celsius gefroren. Die Sehnen, welche der histologischen Untersuchung zugeteilt waren, unterliefen eine weitere Resektion des Kalkaneus, sowie des proximalen Muskelbauchs, sodass allein das Sehnenregenerat mit beiden angrenzenden Sehnenstümpfen in eine 70%-Alkohollösung gelegt wurde. Zudem wurde jeweils ein kleiner Sehnenteil von ca. 1mm seitlich abpräpariert und in flüssigem Stickstoff auf -80 Grad Celsius gekühlt, um für die spätere PCR Analyse verwendet werden zu können. Anschließend wurde bei allen Tieren, die für die Biomechanik vorgesehen waren, die gesunde kontralaterale Achillessehne in gleicher Weise präpariert und entnommen, um sie für spätere Vergleichsanalysen verwendet zu können.

## **4.4 Datengewinnung**

### **4.4.1 Makroskopische Beurteilung**

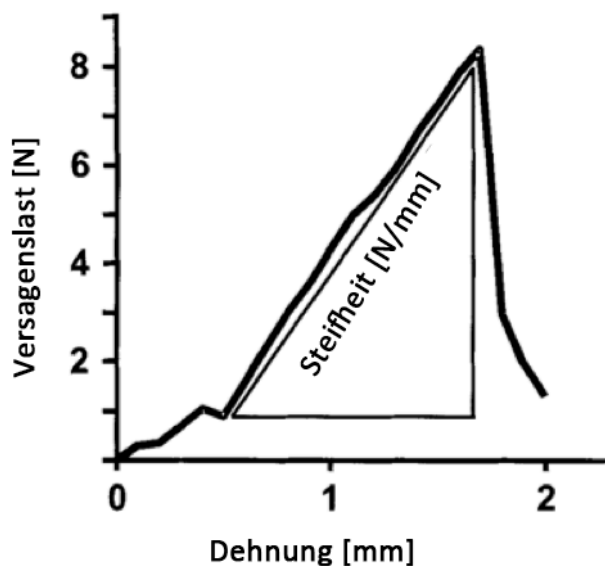
Nach Euthanasie und Präparation der Sehnen wurden diese fotodokumentiert und die einzelnen Präparate makroskopisch auf ihre Durchgängigkeit und somit funktionelle Beständigkeit überprüft. Auf eine genauere Analyse des Durchmessers und der Länge des Regenerates wurde verzichtet, da eine Messung der Sehnendicke auf unterschiedlichen Höhen des Regenerats zu unterschiedlichen Werten führen würde. Es wurde deshalb die gesunde kontralaterale Achillessehne zum biomechanischen statistischen Vergleich genommen.

#### 4.4.2 Biomechanische Analyse

Die Methode der biomechanischen Testung der Sehnenheilung im Hinblick auf Zugfestigkeit und Versagenslast wurde bereits in mehreren Studien durchgeführt<sup>68</sup>. Um vergleichende Ergebnisse und eine eindeutige Aussage über die Festigkeit der Sehnenstruktur zu erhalten wurde in der Biomechanik ein Protokoll mit azyklischer Belastung bis zum Versagen gefahren wie es bisherige Studien verwendeten<sup>51-54</sup>.

Die Analyse erfolgte mittels eines kontinuierlichen axialen Zugversuchs ohne zyklische Belastung. Es sollten die maximale Versagenslast (N), die Steifheit (N/mm) (Abbildung 5) und der Ort des Zerreißen des Sehnenregenerats ausgewertet werden.

Abbildung 5: Ermittlung der Steifheit (Palmes et al.<sup>52</sup>)



Die in Folie eingepackten, gefrorenen Präparate wurden mit lauwarmem Wasser innerhalb von 15 Minuten aufgetaut. Die Präparation des Regenerats erfolgte proximal durch Ausstreichen des Muskelbauchs bis auf die Sehnenplatte des M. Triceps surae. Diese wurde in eine Schraubzwinde eingespannt, welche anschließend von außen mit

flüssigem Stickstoff gekühlt wurde („Cryo-Clamp“)<sup>69</sup>. Diese Methode ist in der Literatur mehrfach beschrieben und stellt eine validierte proximale Fixierung dar. Distal wurde der Kalkaneus mit Fuß an der Sehne belassen und durch eine Schlitzplatte, welche als Widerlager dient und von uns speziell hergestellt wurde, geführt (Abb. 4: A). Danach konnte die „Cryo-Clamp“ mit zwei definierten Schöpfkellen (10ml) mit Stickstoff befüllt werden und nach sichtbarem Einfrieren der Klemme sowie des proximalsten Sehnenansatzes konnte der Zugversuch freigegeben werden. Der Winkel zwischen Achillessehne und Kalkaneus entsprach dabei 30° Flexion.

Die Universalprüfmaschine (Typ Zwicki 1120, Fa. Zwick, Deutschland) spannte die Sehnen mit einer initialen Kraft von 2N, bei der sich das Regenerat in axialer Zugrichtung ausrichtet und derotiert. Anschließend wurde mit einer Geschwindigkeit von 0.16mm/s statisch gezogen<sup>54,70</sup> und die Kraft-Weg-Kurven erfasst. Bei plötzlichem Verlust der Zugkraft, bzw. Sinken der benötigten Kraft unter 90% des Höchstwertes in Newton wurde der Versuch als beendet erklärt und die Sehne entnommen. Die Lokalisation des Versagens wurde fotografisch dokumentiert (Abb. 6: B,C).

**Abbildung 6: Testaufbau**



A: „Cryo-Clamp“ mit Stickstoff gefüllt (oben), Schlitzplatte als Widerlager (unten)  
B, C: Sehnenregenerat nach Testung

Es wurden anschließend die kontralateralen gesunden Achillessehnen in gleicher Weise getestet. Die Werte wurden in prozentualen Bezug zur operierten Seite gestellt und vergleichend ausgewertet.

#### **4.4.3 Histologie/Immunhistologie**

Die histologische und immunhistochemische Analyse war Teil der Dissertation von L. Lenz, einer zweiten medizinischen Doktorandin aus unserer Arbeitsgruppe.

Für die histologische Auswertung wurden die Proben, die in Methanol fixiert worden waren, in EDTA entkalkt und anschließend in Succroslösung für das Schneiden mittels Kryomikrotom in 12 µm dicke Schnitte vorbereitet. Um das histologische Ergebnis zu beurteilen, wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefertigt und ein leicht abgeändertes semiquantitatives Bewertungsschema nach Longo et al. 2009<sup>71</sup> verwendet, das die Parameter Kernform der Tenozyten, die regionalen Unterschiede bezüglich der Zellzahl, die Vaskularisierung, die Anfärbarkeit des Kollagens und vor allem die Faserstruktur und Faserausrichtung bewertete. Diese Parameter wurden in einem 4-Punkte Schema von 0 (gesundes Sehngewebe) bis 3 (stark degeneriertes Gewebe) ermittelt und ausgewertet.

Für weitergehende Untersuchungen über die Sehnenheilung wurden die Schnitte mittels etablierter immunhistochemischer Untersuchungen weiter charakterisiert<sup>72</sup>. Für den immunhistochemischen Nachweis einzelner Sehnenregeneratsbestandteile wurden monoklonale Primärantikörper für Kollagen I und III (Fa. Sigma, Germany) verwendet. Weiter wurden für Pro-Kollagen I der Antikörper M38, für Vimentin der Antikörper AMF-17b, für Fibronectin der Antikörper HFN 7,1, für Laminin der Antikörper 2E8 und für Versikan der Antikörper 12C5 (Developmental Studies Hybridoma Bank der University of Iowa, USA) bezogen. Für die Auswertung der immunhistochemischen

Färbungen wurden die Schnitte in drei Drittel - distal, medial und proximal- eingeteilt und jedes Drittel je nach Farbreaktion mit 0 Punkten (keinerlei Färbung), 1 Punkt (sehr schwache positive Reaktion) oder 2 Punkten (deutlich positive Reaktion) bewertet und statistisch dargestellt.

#### **4.4.4 Statistische Analyse**

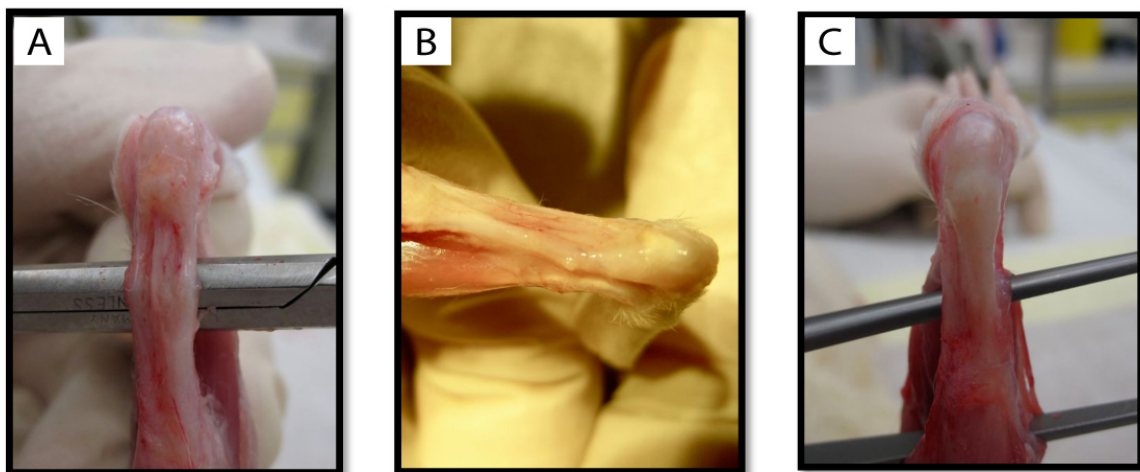
Die Anzahl der biomechanisch zu testenden Explantate wurde mittels Power Analyse (R version 2.10.1) (Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$ , Power >80%) berechnet. Ihr wurde nach Durchsicht der aktuellen Literatur eine Gruppendifferenz der Steifheit von durchschnittlich 7.5N/mm zugrunde gelegt. Die Varianzen der biomechanischen Messwerte der Sehnen wurden pro Gruppe bestimmt und das Signifikanzniveau zwischen den Gruppen sowie zwischen den Untersuchungszeitpunkten auf 0,05 festgelegt. Paarweise Vergleiche wurden mittels abhängigem, zwei-armigen t-Test berechnet. Die statistischen Berechnungen wurden mittels SPSS Software (SPSS v12.0; SPSS, Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Die Analyse der histologischen Daten erfolgte mit derselben Software mittels exaktem Chi-Quadrat- und Kruskal-Wallis-Test.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Heilungsverlauf und Makroskopie der Sehnenregenerate

Alle 84 Ratten konnten den operierten Fuß nach initialer Schonung der Extremität und leicht hinkendem Gangbild ab dem 5. bis 7. postoperativen Tag bereits wieder als Hinterlauf verwenden. Ebenso waren bei keinem der Tiere Probleme bezüglich Wundheilungsstörung oder Infektion zu sehen, sodass alle Sehnen analysiert werden konnten. Nach Euthanasie und anschließender Präparation der Achillessehne zeigte die Begutachtung „in situ“ bei allen Sehnen ein komplett geheiltes, funktionell intaktes Regeneratgewebe (Abb. 7). Es waren makroskopisch unterschiedlich dicke Teilstränge mit teils sehnigen Strängen, teils narbigen Platten und unterschiedlich stark ausgeprägten Vaskularisationen zu sehen.

Abbildung 7: Makroskopie der Sehnen „in situ“ nach 2 Wochen (A,B) und nach 4 Wochen (C)





## 5.2 Biomechanik

### 5.2.1 Maximale Versagenslast nach 2 und 4 Wochen

Alle Sehnen zeigten ein gleiches Reißverhalten insofern, dass die Rissstelle stets intratendinös im Bereich des Regeneratgewebes zu finden war. Die maximale Versagenslast nach zwei Wochen zeigte in der MSC-LV-bFGF Gruppe einen Mittelwert von 47,5N, bei einer Standardabweichung von 7,5N gegenüber der MSC-LV-eGFP Gruppe mit einem Mittelwert von 45,4N, Standardabweichung 8,9N und der PBS Gruppe mit einem Mittelwert von 42,4N bei einer Standardabweichung von 8,5N. In der Gruppe der PBS-Sehnen musste eine Sehne aufgrund unkontrollierten Anfrierens und anschließend verfälschtem Messergebnis (>100N) ausgeschlossen werden.

Bei den Tieren mit vier Wochen Heilungszeit erreichte die PBS Gruppe die höchsten Werte mit einem Mittelwert von 53,1N, Standardabweichung 15,6N, versus einem Mittelwert von 53,1N bei einer Standardabweichung von 10,8N in der MSC-LV-eGFP Gruppe und einem Mittelwert von 47,6N, Standardabweichung 12,8N, in der MSC-LV-bFGF Gruppe.

Der Reißversuch der kontralateralen gesunden Achillessehne zeigte einen Mittelwert von 73,7N bei einer Standardabweichung von 11,1N.

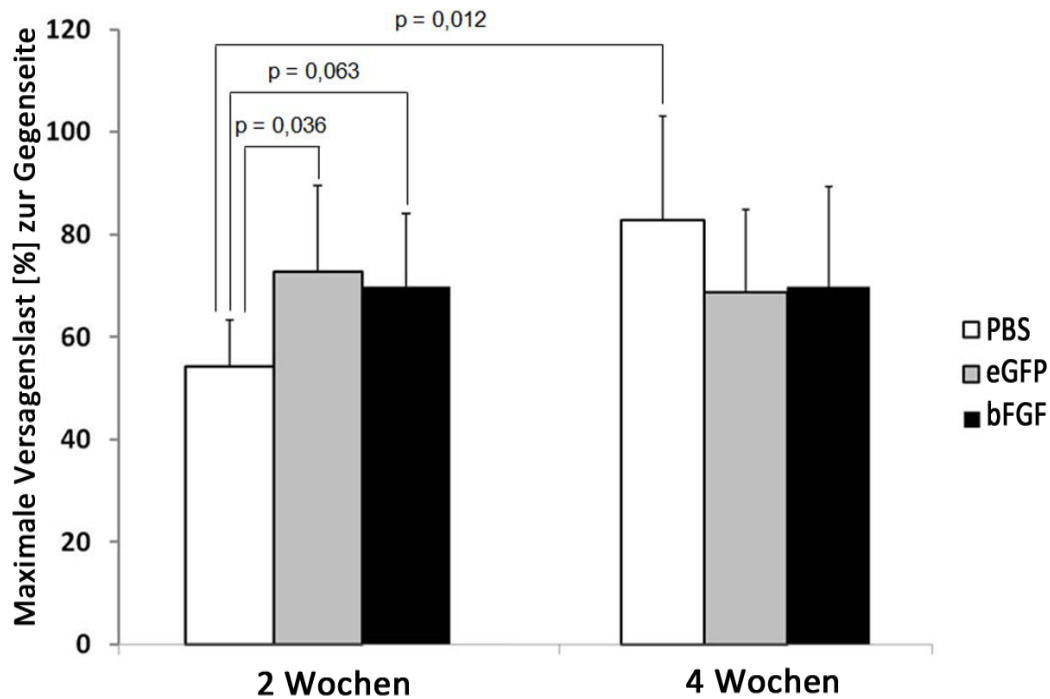
**Tabelle 1: Maximale Versagenslast (N) , absolute Werte**

	2 Wochen	4 Wochen
bFGF	47,5 (SD 7,5)	47,6 (SD 12,8)
eGFP	45,4 (SD 8,9)	53,1 (SD 10,8)
PBS	42,4 (SD 8,5)	53,1 (SD 15,6)
Kontralateral		73,7 (SD 11,1)

Zwischen den Gruppen zum gleichen Zeitpunkt, wie auch innerhalb einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten zeigten die Proben keine signifikanten Unterschiede in der max. Versagenslast (PBS 2 vs. 4 Wochen  $p=0,98$ ; eGFP 2 vs. 4 Wochen  $p=0,144$ ; bFGF 2 vs. 4 Wochen  $p=0,129$ ).

Es konnten nach Einbeziehung der kontralateralen intakten Achillessehne jedoch weitere interessante Ergebnisse gezeigt werden (Grafik 1). Die Auswertung der Messwerte nicht operierter gesunder Sehnen im prozentualen Bezug zur jeweiligen Gegenseite ergab bei der maximalen Versagenslast einen signifikanten Unterschied in der MSC-LV-eGFP Gruppe ( $p=0,036$ ; 95% KI 0,02-0,36) im Vergleich zur PBS Gruppe nach 2 Wochen. Des Weiteren war die MSC-LV-bFGF Gruppe ( $p=0,063$ ; 95% KI -0,01-0,32) ebenfalls besser, als die Kontrollgruppe (PBS) jedoch statistisch nur als Trend. Zwischen den zwei Stammzell-Gruppen konnten jedoch keine Unterschiede ausgemacht werden. Die zusätzliche Expression von Wachstumsfaktor bFGF war hier ohne signifikanten Effekt.

Grafik 1: Maximale Versagenslast nach 2 und 4 Wochen, prozentual zur Gegenseite



Es zeigte sich in der PBS-Gruppe ein signifikanter Anstieg ( $p=0,012$ , 95% KI -0,58- -0,10) von 2 zu 4 Wochen, während innerhalb der beiden Stammzell-Gruppen kein derartiger Anstieg zu beobachten war (eGFP:  $p=0,971$ , 95% KI -0,26-0,25; bFGF:  $p=0,678$ , 95% KI -0,26-0,18). Jedoch waren nach 4 Wochen alle Gruppen ohne signifikante Unterschiede bei der maximalen Versagenslast (PBS vs. eGFP  $p=0,285$ ; PBS vs. bFGF  $p=0,296$ ; eGFP vs. bFGF  $p=0,929$ ).

### 5.2.2 Steifheit nach 2 und 4 Wochen

Die Auswertung der Steifheit (Stiffness) ergab nach zwei Wochen für die MSC-LV-bFGF Gruppe einen Mittelwert von 13,7N/mm mit einer Standardabweichung von 4,4N/mm gegenüber der MSC-LV-eGFP Gruppe mit einem Mittelwert von 10,8N/mm bei einer Standardabweichung von 2,8N/mm und der PBS Gruppe mit dem Mittelwert 12,8N/mm und der Standardabweichung 4,3N/mm.

Die Berechnung der Steifheit nach vier Wochen zeigte in der MSC-LV-bFGF Gruppe einen Mittelwert von 18,8N/mm bei einer Standardabweichung von 5,0N/mm. Die MSC-LV-eGFP Gruppe ergab einen Mittelwert von 16,3N/mm bei einer Standardabweichung von 7,9N/mm. Die PBS Gruppe zeigte einen Mittelwert von 23,9N/mm bei einer Standardabweichung von 7,2N/mm.

Die Testung der kontralateralen gesunden Achillessehne zeigte einen physiologischen Mittelwert von 50,2N/mm bei einer Standardabweichung von 13,5N/mm.

**Tabelle 2: Steifheit (N/mm) , absolute Werte**

	2 Wochen	4 Wochen
bFGF	13,7 (SD 4,4)	18,8 (SD 5,0)
eGFP	10,8 (SD 2,8)	16,3 (SD 7,9)
PBS	12,8 (SD 4,3)	23,9 (SD 7,2)
Kontralateral		50,2 (SD 13,5)

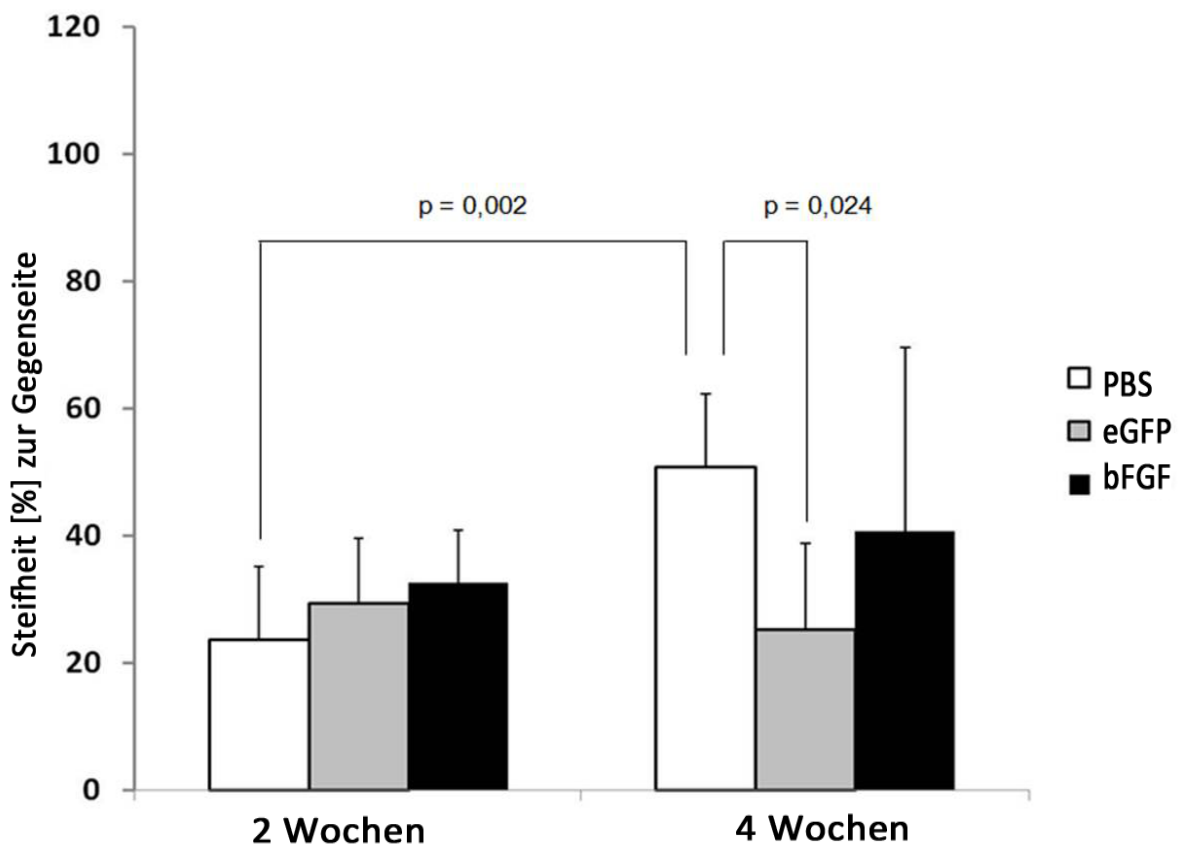
Es fand sich ein hoch signifikanter Unterschied in der PBS Gruppe 2 Wochen versus 4 Wochen bei einem p-Wert von 0,003 mit höherer Steifheit nach 4 Wochen. Weiter wurde eine signifikant höhere Steifheit ( $p = 0,048$ ) nach 4 Wochen innerhalb der bFGF Gruppe beobachtet. Innerhalb der eGFP Gruppe war zwischen 2 und 4 Wochen lediglich eine positive Tendenz der Steigerung der Steifheit zu sehen (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Zunahme der Steifheit von 2 zu 4 Wochen innerhalb der Gruppen**

b-FGF 2 Wo vs. 4 Wo	0,048
eGFP 2 Wo vs. 4 Wo	0,09
PBS 2 Wo vs. 4 Wo	0,003

Um die Auswirkung der Heilung in Bezug auf die gesunde Kontralaterale Seite zu untersuchen, wurden auch hier die Werte der kontralateralen gesunden Seite jeweils prozentual einberechnet (Grafik 2). Das Verhältnis der Steifheit war nach 2 Wochen zwischen den Gruppen gleich (PBS vs. eGFP  $p=0,415$ ; PBS vs. bFGF  $p=0,186$ ; eGFP vs. bFGF  $p=0,522$ ). Im Vergleich von 2 zu 4 Wochen konnte hier insbesondere die PBS Gruppe einen signifikanten Zuwachs erreichen ( $p=0,002$ ; 95% KI -0,44- -0,10). Die Stammzell-Gruppen konnten keinen signifikanten Zuwachs von 2 zu 4 Wochen zeigen (eGFP  $p=0,523$ , 95% KI -0,35-0,19; bFGF  $p=0,592$ ; 95% KI 0,12-0,20).

Grafik 2: Steifheit nach 2 und 4 Wochen, prozentual zur Gegenseite

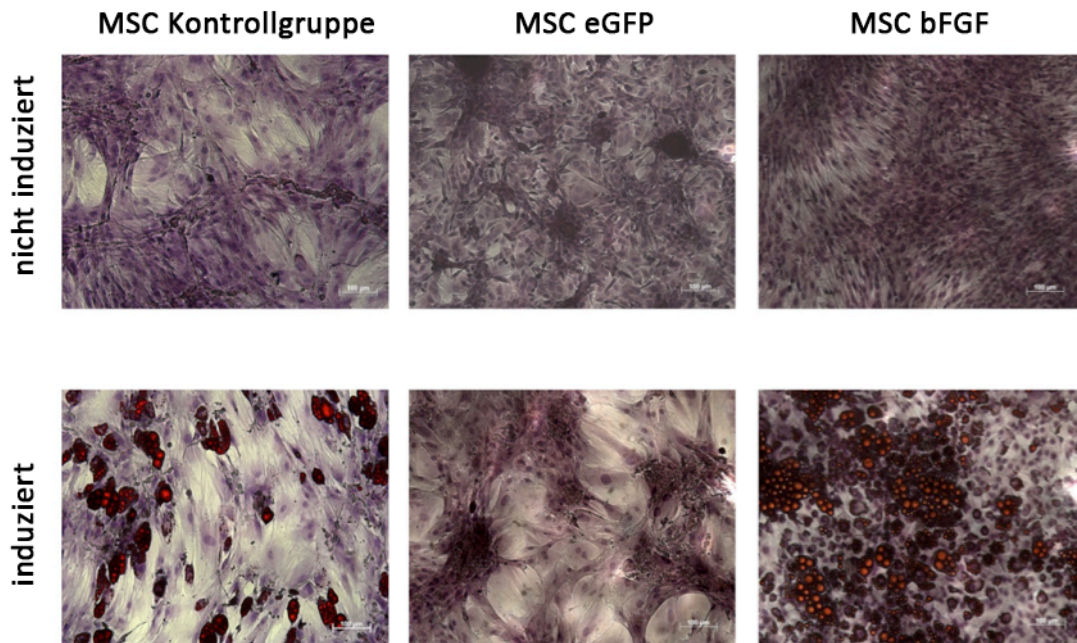


Die Kontrollgruppe (PBS) zeigte signifikant bessere Ergebnisse im Vergleich zu der eGFP Gruppe ( $P=0,024$ , 95% KI -0,46- -0,05) nach 4 Wochen. Die Werte der PBS Gruppe im Vergleich zur bFGF Gruppe nach 4 Wochen zeigten einen p-Wert von 0,431. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede nach 4 Wochen zwischen der eGFP und der bFGF Gruppe ( $p=0,259$ ).

### **5.3 Charakterisierung der Stammzellen**

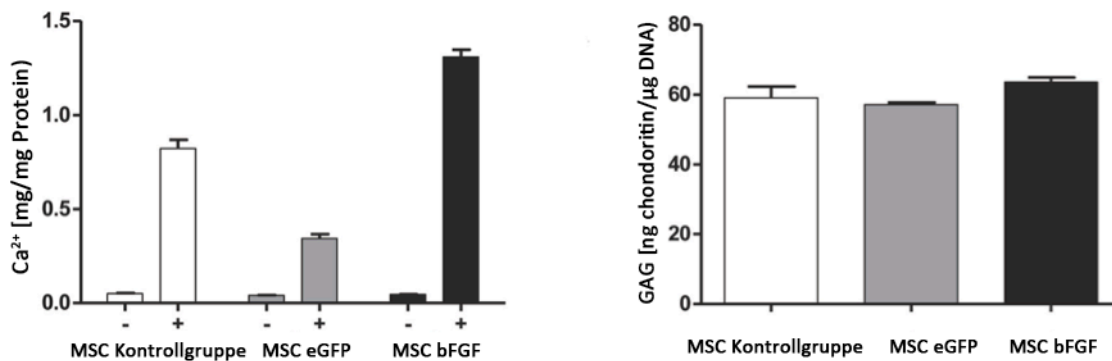
Die aus dem Knochenmark ausgespülten Stammzellen wurden mittels FACS detektiert und zeigten entsprechende Oberflächen-Marker, CD73 (38  $\uparrow$  2%), CD49a (88  $\uparrow$  2%) und CD90 (99  $\uparrow$  1%). Des Weiteren konnte das adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungspotential in vitro verifiziert werden (Abbildung 8 und 9). Um die Effizienz der Transduktion der lentiviralen Vektoren nachzuvollziehen wurde die Gruppe der Stammzellen (MSC-LV-eGFP) mit einem eGFP-exprimierenden Vektor versehen, welcher in der FACS Analyse hoch positiv (96,3  $\uparrow$  2,5%) war. Die Negativkontrolle von nicht transduzierten Zellen und bFGF-transduzierten Zellen zeigten eine Hintergrund-Fluoreszenz von unter 0,5%. Es wurde davon ausgegangen, dass die Effizienz zwischen bFGF und eGFP exprimierenden Vektoren vergleichbar ist.

Abbildung 8: Differenzierungspotential



Die Oil-red Färbung zeigt die Differenzierung und Speicherung sowohl der transduzierten Stammzellen als auch der Kontrollgruppe nach Induzierung.

Abbildung 9: Osteogene Differenzierung (Ca<sup>2+</sup>), chondrogene Differenzierung (GAG)

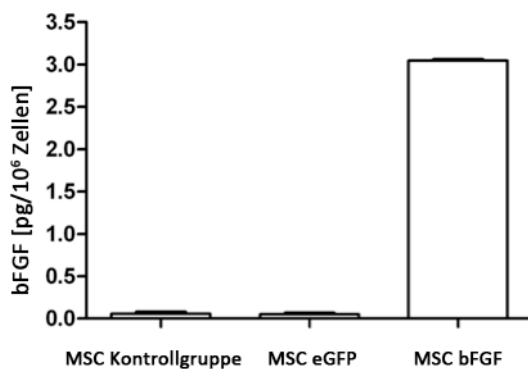


Kontrollgruppe und Stammzellgruppen wurden zur Osteogenese induziert (14 Tage Inkubation). Die Quantifizierung des Kalziums zeigt die Speicherkapazität der lentiviral transduzierten Zellen.

Chondrogene Differenzierung (GAG): Die Kontrollgruppe und die lentiviral transduzierten Stammzellen zeigten das gleiche Potential der Chondrogenese

Der Nachweis der bFGF Expression wurde mittels RT-PCR erbracht und mittels ELISA konnte das bFGF Protein quantifiziert werden. Aus der bFGF Transduktion erfolgte ein sechzig-mal höherer Anstieg von bFGF Proteinen im Vergleich zu nicht transduzierten Stammzellen und eGFP transduzierten Stammzellen ( $3.045 \pm 0.020 \text{pg bFGF}/10^6 \text{ Zellen}$  im Vergleich zu  $0,05 \pm 0,019 \text{pg bFGF}/10^6 \text{ Zellen}$  (Kontrolle) und  $0,058 \pm 0,024 \text{pg bFGF}/10^6 \text{ Zellen}$  (eGFP transduzierte Zellen) (Abbildung 10).

**Abbildung 10: bFGF Expression von lentiviral transduzierten mesenchymalen Stammzellen**



## 5.4 Histologische und immunhistochemische Auswertung

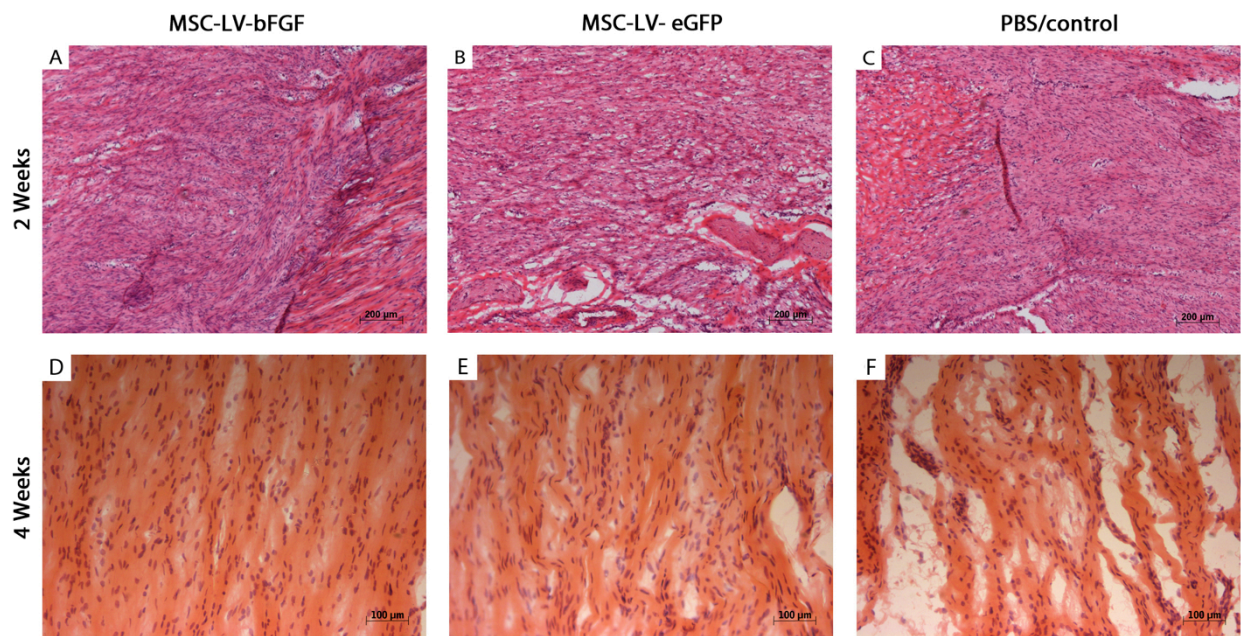
Die detaillierten Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Auswertung werden in der Dissertation von L. Lenz dargestellt.

Die Schnitte der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnen zeigten überwiegend Narbengewebe, besonders ausgeprägt in den Übergängen zu den verbliebenen distalen und proximalen Sehnenstümpfen. Eine beginnende Organisation von Granulationsgewebe hin zu Sehnenngewebe war dennoch beobachtbar, obgleich diese bei den nach 4 Wochen entnommenen Sehnen deutlich ausgeprägter war. Die Hauptunterschiede des



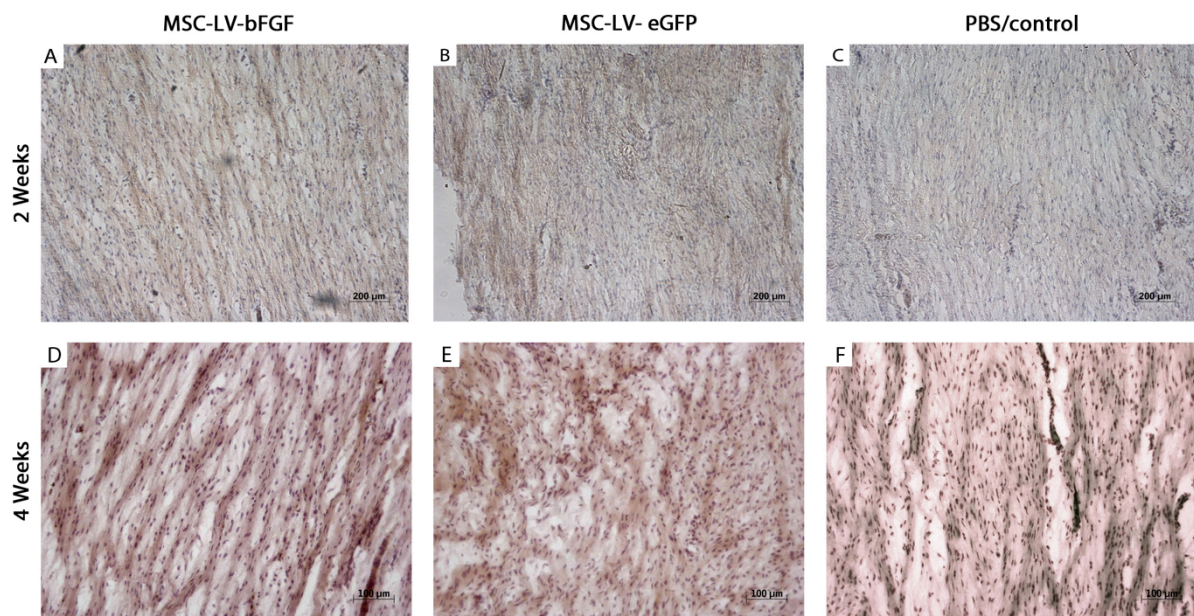
Heilungsverlaufs von 2 zu 4 Wochen waren in einer verbesserten Faserstruktur und einer stärkeren Parallelisierung zu sehen. Außerdem nahm die Ovalisierung der Zellkerne zu, die regionalen Unterschiede der Zellzahlen sanken und die Intensität der Kollagenfaserfärbung normalisierte sich. Ein Vergleich des semiquantitativen Punktwertes ergab, alle Gruppen betrachtet, ein signifikant niedrigeres und somit besseres Ergebnis nach 4 Wochen. Aber auch nach 4 Wochen zeigte kein Regenerat das Erscheinungsbild einer gesunden Sehne. In der PBS-Gruppe konnten nach 2 und auch nach 4 Wochen mehr Sehnen mit schlechtem Ergebnis gezählt werden, was v.a. auf die Parameter Struktur und Anordnung der Fasern zurückging. Die bFGF-Gruppe und die eGFP-Gruppe zeigten überwiegend Regenerate mit parallelen Kollagenfasern (Abb. 11), was jedoch statistisch nicht signifikant war.

**Abbildung 11: HE-Färbung, Sehnen nach 2 Wochen und 4 Wochen Heilungszeit**



In der immunhistochemischen Analyse konnten bzgl. Kollagen I, Kollagen III, Fibronectin, Laminin und Versikan keine Unterschiede zwischen allen 3 Gruppen nachgewiesen werden. Jedoch war die Kollagensynthese in der MSC-LV-bFGF Gruppe und der MSC-LV-eGFP Gruppe erhöht, was durch die signifikant höhere Prokollagen I Färbung (Abb. 12: A,B / D,E) im Vergleich zur PBS-Gruppe (Abb. 12: C,F) nach 2 Wochen ( $p=0.0009$  resp.  $0.0041$ ) und ebenso nach 4 Wochen ( $p=0.004$  resp.  $0.132$ ) zum Ausdruck gebracht werden konnte. Zwischen der eGFP Gruppe und der bFGF Gruppe war nach 4 Wochen histologisch kein Unterschied zu sehen.

**Abbildung 12: Prokollagen I (braun) Färbung nach 2 und 4 Wochen**



## 5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Studie zeigt in Teilen einen positiven Effekt durch Stammzellen auf die Struktur und Beschaffenheit der geheilten Sehnennarbe. Die Verbesserungen der biomechanischen Eigenschaften sind in der Frühphase marginal und nach 4 Wochen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nicht signifikant nachzuweisen. In der Frühphase zeichnete sich eine positive Tendenz in der maximalen Versagenslast ab, welche nach 4 Wochen nicht signifikant war. Die zusätzliche Expressierung eines Wachstumsfaktors (bFGF) zeigte auch nach einer Heilungsphase von 4 Wochen keinen signifikanten positiven Effekt auf die Sehnenheilung gegenüber Stammzellen sowie gegenüber der Kontrollgruppe. Eine interessante Beobachtung ist die signifikante Zunahme der Steifheit innerhalb der Kontrollgruppe. Die biomechanische Analyse konnte die teilweise besseren histologischen Ergebnisse durch Stammzellen somit nicht unterstützen.

Die histologischen Ergebnisse zeigten in den Stammzell-Gruppen eine positive Tendenz mit besserem „Remodeling,“ jedoch ist dies in dem Bewertungsschemata nicht signifikant. Die immunhistochemischen Parameter zeigten nach 2 und nach 4 Wochen in allen Gruppen vergleichbare Ergebnisse, bis auf die Prokollagen I –Färbung. Hier konnte eine signifikante Mehranreicherung in der eGFP-Gruppe und der bFGF-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe nachgewiesen werden.

## 6 Diskussion

### 6.1 Interpretation der Ergebnisse

Die biomechanische und histologische Untersuchung des Einflusses von lentiviral transduzierten Stammzellen mit bFGF auf die Sehnenheilung im *in-vivo* Rattenmodell widerlegt unsere Hypothese zur verbesserten Sehnenheilung nach 4 Wochen Heilungszeit.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen positiven Effekte von bFGF<sup>73</sup>, war unsere Hypothese, dass bFGF ein geeigneter Wachstumsfaktor für die Förderung der Sehnenheilung ist. Eine etablierte Methode, um gewisse Wachstumsfaktoren vermehrt zu exprimieren, wurde durch die Gentherapie entwickelt. Hier ist die retrovirale Gentransduktion besonders wirksam, wenn man sich die Menge an exprimierten Proteinen und deren Produktion über einen längeren Zeitraum ansieht<sup>44,57</sup>. Die Forschungsgruppe um Vogt et al.<sup>44</sup> konnte 2008 eine wirksame Methode unter Anwendung von retroviralen Vektoren zum Transfer von Genen vorstellen. Es wurden VSV.G pseudotypisierte retrovirale Vektoren benutzt um Zellen zu markieren und einen produzierenden Wachstumsfaktor einzubringen. Wir verwendeten spezielle retrovirale (lentivirale) Vektoren, um eine möglichst hohe Konzentration eines Wachstumsfaktors im Gewebe und damit einen möglichst großen Effekt zu erreichen.

In unserer Studie konnten die immunhistochemischen Ergebnisse eine Mehranreicherung von bFGF in beiden Stammzellengruppen erbringen. Die Prokollagen Färbung zeigte eine signifikant höhere Konzentration in der bFGF-Gruppe, wie auch in der eGFP Stammzell-Gruppe. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Zugabe von Stammzellen allgemein eine höhere Konzentration an Prokollagen hervorruft, jedoch die

lentiviral transduzierten Stammzellen mit vermehrter Wachstumsfaktorexpression keinen signifikanten zusätzlichen Effekt erzielen.

In der biomechanischen Analyse zeigte die Stammzellgruppe mit eGFP nach 2 Wochen, wenn man die gesunde Gegenseite prozentual einbezieht, eine signifikant höhere Reißkraft im Vergleich zu der nicht therapierten Gruppe (PBS). Die bFGF-Gruppe wies hier ebenfalls tendenziell bessere Werte auf als die Kontrollgruppe. Im weiteren Vergleich nach 4 Wochen, war jedoch dieser Früheffekt nicht mehr nachzuweisen. Hier konnte insbesondere die PBS-Gruppe ein kräftiges Narbengewebe vorzeigen mit einem signifikanten Zuwachs innerhalb von 14 Tagen, sodass nach einer Heilungszeit von 4 Wochen keine Unterschiede zwischen den Gruppen bzgl. der maximalen Versagenslast zu sehen waren.

Die Theorie des positiven Einflusses der Stammzellen auf die Sehnenheilung in der Frühphase konnten wir somit nachweisen. Jedoch zeigt sich, dass bei Ratten nach vier Wochen Heilungszeit auch eine nicht behandelte Sehne gleichwertige, bzw. tendenziell sogar bessere biomechanische Qualitäten hinsichtlich der maximalen Versagenslast und der Steifheit aufweist. Es muss konstatiert werden, dass die vermehrte Expression von bFGF alleine nicht zu einer biomechanisch besseren Sehnenqualität führt. Die Methode der lentiviral transduzierten Stammzellen ist jedoch eine gute Möglichkeit, eine kontinuierliche Sezernierung vor Ort zu gewährleisten.

## **6.2 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur**

Die Zugabe von Blutbestandteilen, um eine verbesserte Sehnenheilung zu erreichen, wurde schon in mehreren Studien veröffentlicht. In einer Arbeit von Zhang et al. wurde der Heilungsprozess nach Zugabe des *vascular endothelial growth factor (VEGF)* an

Achillessehnen von Ratten untersucht. Es ergab sich nach einer und zwei Wochen eine signifikant höhere Belastbarkeit der entsprechenden Sehnen im Gegensatz zur Kontrollgruppe<sup>68</sup>.

Im Jahre 2004 konnte Aspenberg et al.<sup>53</sup> zeigen, dass sich die Zugabe von Blutplättchenkonzentrat (Plättchen-reiches-Plasma), welches nach 6 Stunden in das durch die durchtrennte Achillessehne entstandene Hämatom injiziert wurde, auf die Sehnenheilung von Achillessehnen von Ratten positiv auswirkt. Die mechanische Stabilität konnte in den Nachuntersuchungen nach 28 Tagen eine Verbesserung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erzielen. Die Gründe für den positiven Effekt wurden damals in den nicht näher bezeichneten, aber vermuteten Wachstumsfaktoren gesehen. Wir konnten ebenfalls einen positiven Früheffekt auf die mechanische Stabilität des Sehnenregenerats nachweisen. Jedoch zeigte sich nach 4 Wochen in der Kontrollgruppe ein ebenfalls gleichwertige biomechanische Eigenschaft.

In der Arbeit von Chong et al.<sup>47</sup> aus dem Jahr 2007 wird bei einem Achillessehnenmodell am Kaninchen durch die Applikation von Knochenmarksstammzellen sowohl histologisch als auch biomechanisch ein qualitativ besseres Sehnenregenerat gewonnen als in der Vergleichsgruppe. Darüber hinaus wird die Knochen-Sehnenheilung durch den Zusatz von Stammzellen ebenso beschleunigt, wie in der Arbeit von Ju et al.<sup>60</sup> beschrieben. In der histologischen Untersuchung zeigte sich im Tierversuch an Ratten bei operativer Kreuzbandversorgung nach Stammzellenzusatz eine verbesserte Heilungspotenz durch die gesteigerte Kollagensynthese im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Stammzellzusatz.

Eine Arbeit von Young et al.<sup>74</sup> aus dem Jahr 1998 zeigte einen signifikant besseren biomechanischen Effekt von mesenchymalen Stammzellen auf die Sehnenheilung. In

einem Kaninchenmodell wurde eine Kollagenmatrix mit Stammzellen an einem Nahtmaterial als Führung ex vivo kultiviert und anschließend in einen Sehndefekt (1cm) der Achillessehne implantiert. Young beschreibt eine Verbesserung der Sehne sowohl biomechanisch, wie auch histologisch, nach 4, 8 und 12 Wochen beim Kaninchen.

In unseren Ergebnissen war die Stammzellgruppe in der Frühphase hinsichtlich der maximalen Versagenslast gegenüber der Kontrollgruppe überlegen. Ebenfalls zeigte sich in der Stammzellgruppe eine höhere Prokollagen Anreicherung in den immunhistologischen Schnitten nach 2 und nach 4 Wochen. Die biomechanischen Eigenschaften des Regeneratgewebes der Kontrollgruppe übertrafen jedoch die Stammzellgruppe nach 4 Wochen.

Mehrere Studien haben positive Effekte des Wachstumsfaktors bFGF in Bezug auf die Sehnenheilung beschrieben. Tang et al.<sup>75</sup> konnte 2008 durch die Verwendung von bFGF im Huhnmodell einen positiven Effekt der Sehnenheilung zeigen. Hierbei erfolgte ein Gentransfer eines bFGF codierenden Gens mit einem Adenovirus. Außerdem wurden die Sehnen nach Durchtrennung primär End-zu-End genäht. Die histologische und biomechanische Untersuchung erfolgte an der langen Beugesehne der Langfinger und zeigte nach Wachstumsfaktorapplikation von bFGF eine deutliche Festigkeitssteigerung der Sehne im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Follow-up bis zu 12 Wochen. Jedoch zeigten die histologischen Ergebnisse keine verbesserte Charakteristika in der Anordnung des Sehnenbestandteile.

Chan et al.<sup>40</sup>, welche das Protein bFGF als Wachstumsfaktor in einem Rattenmodell mit Patellarsehnenheilung einmalig verabreichten, konnten einen positiven Effekt auf die histologischen und immunhistologischen Charakteristika des Heilungsprozesses nach nur 7 Tagen nachweisen. In einem Rattenmodell wurde die Patellarsehne gefenstert und

in der Versuchsgruppe bFGF lokal in die Sehne appliziert. Er fand größere Mengen an Kollagen III und höhere Zellproliferationsraten. Letztendlich ist Kollagen III dünner und dehnungsfähiger als Kollagen I und zusammen mit Prokollagen I ein wichtiger Faktor in der ersten Heilungsphase von Sehnengewebe. Im Gegensatz zu dieser Studie verwendeten wir eine innovative Alternative mit kontinuierlicher Abgabe von bFGF im Gewebe durch lentiviral transduzierte, mesenchymale Stammzellen. Obwohl wir zeigen konnten, dass die bFGF Transduktion funktionierte, konnte letztlich kein klarer Langzeiteffekt in den biomechanischen Ergebnissen dargestellt werden. Des Weiteren muss man erkennen, dass unsere Stammzellgruppen bezüglich der Prokollagensynthese keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die benötigte Menge an bFGF Proteinen geringer ist und „normale“ Stammzellen alleine schon ausreichend den Wachstumsfaktor bFGF produzieren. Eine größere Menge an bFGF vor Ort hat in diesem Modell keinen Vorteil erbracht.

In diesem Zusammenhang ist eine Studie von Chen et al.<sup>76</sup> 2008 zum Nachweis von verschiedenen Wachstumsfaktoren nach Durchtrennung der Achillessehne in einem Hühnchen Modell zu nennen. Es zeigte sich, dass neben einer hohen Expression von TGF-beta nach 3 Wochen, insbesondere die Expression von bFGF gering war und sich sogar im Verlauf nach 3 Wochen verringerte. Dies lässt ebenfalls die Vermutung zu, dass das Vorhandensein von bFGF als Wachstumsfaktor in einer hohen Konzentration nicht auf Dauer wichtig ist.

In einer bereits oben beschriebenen Studie von Zhang et al.<sup>68</sup> wurden in einem Rattenmodell an der Achillessehne signifikante positive Effekte von VEGF als Wachstumsfaktor bezüglich der biomechanischen Eigenschaften in der Frühphase der Heilung (7 und 14 Tagen) gezeigt. Jedoch wurden diese nach 4 Wochen nicht mehr nachgewiesen.



In einer Studie an Rattenachillessehnen konnte Okamoto et al.<sup>6</sup> nachweisen, dass die Therapie mit mesenchymalen Stammzellen und Knochenmarkszellen zu besseren biomechanischen Eigenschaften auf die Sehnenheilung führt. Zusätzliche Wachstumsfaktoren wurden hier nicht verwendet. Jedoch wurde die Sehne zum einen nur durchtrennt und kein Defekt erstellt und zum anderen erfolgte eine Immobilisation.

Ein wichtiger Punkt in der Heilungsphase ist neben der Verwendung von Wachstumsfaktoren oder Stammzellen sicherlich auch die Mobilisation oder Immobilisation. In unserem Tiermodell erlaubten wir vollen Bewegungsumfang und Belastung der betroffenen Extremität. Außerdem wurde die Sehne nicht adaptiert. Der positive Effekt einer frühfunktionellen Beübung gegenüber einer Ruhigstellung wurde von Stehno-Bittel et al. 1998 in einem Tiermodell an der Achillessehne von Kaninchen gezeigt<sup>77</sup>. In unserem Tiermodell haben wir bewusst auf eine primäre Sehnennaht verzichtet. Durch die Dehiszenz der Sehnenstümpfe konnte sich Regeneratgewebe bilden, welches histologisch und biomechanisch gut und vergleichend untersucht werden konnte. In der makroskopischen Beurteilung zeigten sich verlängerte Sehnen, die jedoch alle durchgängig waren und ein Regeneratgewebe aufwiesen, wie histologisch gezeigt wurde.

### **6.3 Limitation**

Unsere Methode mit Setzen eines Substanzdefektes zeigt in allen Versuchstieren eine vollständige Wiederherstellung einer durchgängigen Sehne, insbesondere auch in der Kontrollgruppe. Die Datenlage über die Heilungsphasen und deren genauen Zeitenabfolgen bei Ratten ist sehr gering. Es scheint, dass nach 4 Wochen noch kein ausreichendes „Remodelling“ stattgefunden hat. Hier könnte eine biomechanische und

histologische Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt, zum Beispiel nach 10 - 12 Wochen, weitere interessante Ergebnisse bringen.

Für die Applikationsform von Stammzellen sind zum Beispiel Scaffolds in Betracht zu ziehen, wo Stammzellen und/oder Wachstumsfaktoren eingebettet werden können und am Ort des Geschehens verbleiben.

Die Frage, ob bFGF ein geeigneter Wachstumsfaktor für die Sehnenheilung ist, kann auch diese Studie letztlich nicht beweisen. Einzelne Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF TGF-alpha) haben zwar in einzelnen Studien positive Effekte nachweisen können, jedoch nicht auf eine Sehnenregeneration mit dem Wunsch einer „Restitutio ad integrum“ im „in vivo“ Modell. Vermutlich ist ein Zusammenspiel verschiedener, heute wohl noch nicht gänzlich verstandenen, bzw nachgewiesenen Faktoren nötig um einen Sehnenregeneration zu erzielen.

Die Risiken und Nebenwirkungen einer viralen Gentransduktion und vermehrten Expression einzelner Proteine sind hinsichtlich Tumorneogenese nicht hinreichend erforscht, sodass die Übertragbarkeit auf den Menschen in naher Zukunft nicht realisierbar sein wird.

Bisherige in-vivo und in-vitro Studien mit Stammzellen ohne Gentransfer können teilweise positive Effekte nachweisen. Stammzellen gelten allgemein als Hilfe gegen viele Krankheiten und Verletzungen. Aufgrund mangelnder Studienlage und fehlender Langzeitresultate sind die Einsatzmöglichkeiten im klinischen Alltag jedoch stark begrenzt.

## **7 Zusammenfassung**

Ziel dieser Studie war es die biomechanischen Effekte auf die Sehnenheilung von lentiviral transduzierten Stammzellen mit vermehrter bFGF Produktion in einem in-vivo Sehnen-Defekt-Modell an der Ratte zu untersuchen. Die histologische Auswertung zeigte einen partiellen Effekt von Stammzellen auf Struktur und Zusammensetzung des Sehnenregenerates. In der immunhistochemischen Anfärbung konnten eine signifikant höhere Konzentration an Prokollagen in der eGFP-Gruppe und der bFGF-Gruppe nachgewiesen werden. Biomechanisch waren diese beiden Gruppen ebenfalls in der Frühphase der Heilung der Kontrollgruppe signifikant überlegen. Die biomechanischen Eigenschaften relativierten sich nach 4 Wochen. Insbesondere die Kontrollgruppe zeigte eine signifikante Steigerung in der biomechanischen Analyse. Der Wachstumsfaktor bFGF konnte im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen keinen positiven Effekt auf die Sehnenheilung hervorrufen.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Sehne <sup>16</sup> .....	5
Abbildung 2: Belastung/Ausdehnung in % (aus JBJS 2005 <sup>23</sup> ) .....	6
Abbildung 3: Versuchsaufbau, Anzahl der Tiere .....	14
Abbildung 4: Operationsschritte .....	18
Abbildung 5: Ermittlung der Steifheit (Palmes et al. <sup>52</sup> ) .....	20
Abbildung 6: Testaufbau .....	21
Abbildung 7: Makroskopie der Sehnen „in situ“ nach 2 Wochen (A,B) und nach 4 Wochen (C) .....	24
Abbildung 8: Differenzierungspotential .....	31
Abbildung 9: Osteogene Differenzierung (Ca 2+), chondrogene Differenzierung (GAG). 31	
Abbildung 10: bFGF Expression von lentiviral transduzierten mesenchymalen Stammzellen .....	32
Abbildung 11: HE-Färbung, Sehnen nach 2 Wochen und 4 Wochen Heilungszeit .....	33
Abbildung 12: Prokollagen I (braun) Färbung nach 2 und 4 Wochen .....	34
Grafik 1: Maximale Versagenslast nach 2 und 4 Wochen, prozentual zur Gegenseite .....	27
Grafik 2: Steifheit nach 2 und 4 Wochen, prozentual zur Gegenseite .....	29
Tabelle 1: Maximale Versagenslast (N) , absolute Werte .....	25
Tabelle 2: Steifheit (N/mm) , absolute Werte .....	28
Tabelle 3: Zunahme der Steifheit von 2 zu 4 Wochen innerhalb der Gruppen .....	28

## 9 Literaturverzeichnis

1. Kirkendall DT, Garrett WE. Function and biomechanics of tendons. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7:62-6.
2. O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7:55-61.
3. Nakama LH, King KB, Abrahamsson S, Rempel DM. Evidence of tendon microtears due to cyclical loading in an in vivo tendinopathy model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2005;23:1199-205.
4. Fox JM, Blazina ME, Jobe FW, Kerlan RK, Carter VS, Shields CL, Carlson GJ. Degeneration and rupture of the Achilles tendon. *Clinical orthopaedics and related research* 1975:221-4.
5. Kannus P, Jozsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1991;73:1507-25.
6. Okamoto N, Kushida T, Oe K, Umeda M, Ikehara S, Iida H. Treating Achilles tendon rupture in rats with bone-marrow-cell transplantation therapy. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2010;92:2776-84.
7. Mahler F, Fritschy D. Partial and complete ruptures of the Achilles tendon and local corticosteroid injections. *Br J Sports Med* 1992;26:7-14.
8. Beskin JL, Sanders RA, Hunter SC, Hughston JC. Surgical repair of Achilles tendon ruptures. *The American journal of sports medicine* 1987;15:1-8.
9. Jozsa L, Kvist M, Balint BJ, Reffy A, Jarvinen M, Lehto M, Barzo M. The role of recreational sport activity in Achilles tendon rupture. A clinical, pathoanatomical, and sociological study of 292 cases. *The American journal of sports medicine* 1989;17:338-43.
10. Maffulli N, Waterston SW, Squair J, Reaper J, Douglas AS. Changing incidence of Achilles tendon rupture in Scotland: a 15-year study. *Clin J Sport Med* 1999;9:157-60.
11. Molloy A, Wood EV. Complications of the treatment of Achilles tendon ruptures. *Foot and ankle clinics* 2009;14:745-59.
12. Khan RJ, Fick D, Brammar TJ, Crawford J, Parker MJ. Interventions for treating acute Achilles tendon ruptures. *The Cochrane database of systematic reviews* 2004:CD003674.
13. Nilsson-Helander K, Silbernagel KG, Thomee R, Faxen E, Olsson N, Eriksson BI, Karlsson J. Acute achilles tendon rupture: a randomized, controlled study comparing surgical and nonsurgical treatments using validated outcome measures. *The American journal of sports medicine* 2010;38:2186-93.
14. Willits K, Amendola A, Bryant D, Mohtadi NG, Giffin JR, Fowler P, Kean CO, Kirkley A. Operative versus nonoperative treatment of acute Achilles tendon ruptures: a multicenter randomized trial using accelerated functional rehabilitation. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2010;92:2767-75.
15. O'Brien M. Functional anatomy and physiology of tendons. *Clinics in sports medicine* 1992;11:505-20.
16. Chowdhury P, Matyas JR, Frank CB. The "epiligament" of the rabbit medial collateral ligament: a quantitative morphological study. *Connective tissue research* 1991;27:33-50.

17. Jozsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta anatomica* 1991;142:306-12.
18. Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol* 2008;36:1176-85.
19. Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 1998;16:457-70.
20. Buss V, Lippert H, Zech M, Arnold G. Biomechanics of human tendons: connection between stress relaxation and stress recovery (author's transl). *Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie* 1976;86:169-82.
21. Oxlund H. Relationships between the biomechanical properties, composition and molecular structure of connective tissues. *Connective tissue research* 1986;15:65-72.
22. Mosler E, Folkhard W, Knorz E, Nemetschek-Gansler H, Nemetschek T, Koch MH. Stress-induced molecular rearrangement in tendon collagen. *Journal of molecular biology* 1985;182:589-96.
23. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2005;87:187-202.
24. Butler DL, Grood ES, Noyes FR, Zernicke RF. Biomechanics of ligaments and tendons. *Exercise and sport sciences reviews* 1978;6:125-81.
25. Sasaki N, Shukunami N, Matsushima N, Izumi Y. Time-resolved X-ray diffraction from tendon collagen during creep using synchrotron radiation. *Journal of biomechanics* 1999;32:285-92.
26. Oakes BW. *Tissue Healing and Repair: Tendons and Ligaments. Rehabilitation of Sports Injuries: Scientific Basis: Blackwell Science Ltd; 2008:28-98.*
27. Tischer T, Vogt S, Aryee S, Steinhauser E, Adamczyk C, Milz S, Martinek V, Imhoff AB. Tissue engineering of the anterior cruciate ligament: a new method using acellularized tendon allografts and autologous fibroblasts. *Arch Orthop Trauma Surg* 2007;127:735-41.
28. Lapiere CM, Nussgens B, Pierard GE. Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connective tissue research* 1977;5:21-9.
29. Vailas AC, Tipton CM, Matthes RD, Gatt M. Physical activity and its influence on the repair process of medial collateral ligaments. *Connective tissue research* 1981;9:25-31.
30. Tsuzaki M, Brigman BE, Yamamoto J, Lawrence WT, Simmons JG, Mohapatra NK, Lund PK, Van Wyk J, Hannafin JA, Bhargava MM, Banes AJ. Insulin-like growth factor-I is expressed by avian flexor tendon cells. *Journal of Orthopaedic Research* 2000;18:546-56.
31. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 2003;33:381-94.
32. Ignatz RA, Massagué J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* 1986;261:4337-45.
33. Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, Das R, Mastny A, Havlioglu N, Silva MJ, Thomopoulos S. Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *Journal of Orthopaedic Research* 2006;24:541-50.
34. Chang J, Most D, Stelnicki E, Siebert JW, Longaker MT, Hui K, Lineaweaver WC. Gene Expression of Transforming Growth Factor Beta-1 in Rabbit Zone II Flexor Tendon Wound Healing: Evidence for Dual Mechanisms of Repair. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1997;100:937-44.

35. Natsu-ume T, Nakamura N, Shino K, Toritsuka Y, Horibe S, Ochi T. Temporal and spatial expression of transforming growth factor-beta in the healing patellar ligament of the rat. *Journal of Orthopaedic Research* 1997;15:837-43.
36. Hildebrand KA, Woo SL-Y, Smith DW, Allen CR, Deie M, Taylor BJ, Schmidt CC. The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Healing of the Rabbit Medial Collateral Ligament. *The American Journal of Sports Medicine* 1998;26:549-54.
37. Nakamura N, Shino K, Natsuume T, Horibe S, Matsumoto N, Kaneda Y, Ochi T. Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. *Gene Therapy*. 1998 Sep;5(9):1165-70.
38. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
39. Thomopoulos S, Harwood FL, Silva MJ, Amiel D, Gelberman RH. Effect of Several Growth Factors on Canine Flexor Tendon Fibroblast Proliferation and Collagen Synthesis In Vitro. *The Journal of hand surgery* 2005;30:441-7.
40. Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta orthopaedica Scandinavica* 2000;71:513-8.
41. Baragi VM, Renkiewicz RR, Qiu L, Brammer D, Riley JM, Sigler RE, Frenkel SR, Amin A, Abramson SB, Roessler BJ. Transplantation of adenovirally transduced allogeneic chondrocytes into articular cartilage defects in vivo. *Osteoarthritis and Cartilage* 1997;5:275-82.
42. Madry H, Cucchiaroni M, Terwilliger EF, Trippel SB. Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors Efficiently and Persistently Transduce Chondrocytes in Normal and Osteoarthritic Human Articular Cartilage. *Human Gene Therapy* 2003;14:393-402.
43. Gouze E PR, Pilapil C, Gouze JN, Fleet C, Palmer GD, Evans CH, Leboulch P, Ghivizzani SC. In Vivo Gene Delivery to Synovium by Lentiviral Vectors. *Molecular Therapy* 2002;5, 397-404.
44. Vogt S, Ueblacker P, Geis C, Wagner B, Wexel G, Tischer T, Kruger A, Plank C, Anton M, Martinek V, Imhoff AB, Gansbacher B. Efficient and stable gene transfer of growth factors into chondrogenic cells and primary articular chondrocytes using a VSV.G pseudotyped retroviral vector. *Biomaterials* 2008;29:1242-9.
45. Ikeda T KT, Arai Y, Nakanishi T, Kobayashi K, Takahashi K, Imanishi J, Takigawa M, Hirasawa Y. Adenovirus mediated gene delivery to the joints of guinea pigs. *Journal of Rheumatology* 1998;25(9):1666-73.
46. Ueblacker P, Wagner B, Krüger A, Vogt S, DeSantis G, Kennerknecht E, Brill T, Hillemanns M, Salzmann GM, Imhoff AB, Plank C, Gänsbacher B, Martinek V. Inducible nonviral gene expression in the treatment of osteochondral defects. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004;12:711-9.
47. Chong AK, Ang AD, Goh JC, Hui JH, Lim AY, Lee EH, Lim B. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2007;89:74-81.
48. Nourissat G, Diop A, Maurel N, Salvat C, Dumont S, Pigenet A, Gosset M, Houard X, Berenbaum F. Mesenchymal stem cell therapy regenerates the native bone-tendon junction after surgical repair in a degenerative rat model. *PloS one* 2010;5:e12248.
49. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of Pathology* 2009;217:318-24.
50. Schmitt A, van Griensven M, Imhoff AB, Buchmann S. Application of stem cells in orthopedics. *Stem cells international* 2012;2012:394962.
51. Best TM, Collins A, Lilly EG, Seaber AV, Goldner R, Murrell GA. Achilles tendon healing: a correlation between functional and mechanical performance in the rat.

Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society 1993;11:897-906.

52. Palmes D, Spiegel HU, Schneider TO, Langer M, Stratmann U, Budny T, Probst A. Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2002;20:939-46.

53. Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta orthopaedica Scandinavica* 2004;75:93-9.

54. Rickert M, Wang H, Wieloch P, Lorenz H, Steck E, Sabi D, Richter W. Adenovirus-mediated gene transfer of growth and differentiation factor-5 into tenocytes and the healing rat Achilles tendon. *Connective tissue research* 2005;46:175-83.

55. Murrell GA, Lilly EG, 3rd, Goldner RD, Seaber AV, Best TM. Effects of immobilization on Achilles tendon healing in a rat model. *Journal of orthopaedic research* 1994;12:582-91.

56. Chan BP, Chan KM, Maffulli N, Webb S, Lee KK. Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing. *Clinical orthopaedics and related research* 1997:239-47.

57. Vogt S, Wexel G, Tischer T, Schillinger U, Uebalcker O, Wagner B, Hensler D, Willisch J, Geis C, Wubbenhorst D, Aigner J, Gerg M, Kruger A, Salzmann GM, Martinek V, Anton M, Plank C, Imhoff AB, Gansbacher B. The influence of the stable expression of BMP2 in fibrin clots on the remodelling and repair of osteochondral defects. *Biomaterials* 2009;30:2385-92.

58. Schillinger U, Wexel G, Hacker C, Kullmer M, Koch C, Gerg M, Vogt S, Uebalcker P, Tischer T, Hensler D, Willisch J, Aigner J, Walch A, Stemberger A, Plank C. A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors. *Pharmaceutical research* 2008;25:2946-62.

59. Caplan AI. The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery* 1994;21:429-35.

60. Ju YJ, Muneta T, Yoshimura H, Koga H, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. *Cell and tissue research* 2008;332:469-78.

61. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2004;36:568-84.

62. McMahon JM, Conroy S, Lyons M, Greiser U, O'Shea C, Strappe P, Howard L, Murphy M, Barry F, O'Brien T. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem cells and development* 2006;15:87-96.

63. Aslan H, Zilberman Y, Arbeli V, Sheyn D, Matan Y, Liebergall M, Li JZ, Helm GA, Gazit D, Gazit Z. Nucleofection-based ex vivo nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration. *Tissue engineering* 2006;12:877-89.

64. Zhang F, Liu H, Stile F, Lei MP, Pang Y, Oswald TM, Becken J, Borsett-Martin W, Lineaweaver WC. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2003;112:1613-9.

65. Omeroglu S, Peker T, Turkozkan N, Omeroglu H. High-dose vitamin C supplementation accelerates the Achilles tendon healing in healthy rats. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 2009;129:281-6.

66. Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, Dennis JE, Caplan AI. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research* 1995;219:211-22.



67. Wubbenhorst D, Dumler K, Wagner B, Wexel G, Imhoff A, Gansbacher B, Vogt S, Anton M. Tetracycline-regulated bone morphogenetic protein 2 gene expression in lentivirally transduced primary rabbit chondrocytes for treatment of cartilage defects. *Arthritis and Rheumatology* 2010;62:2037-46.
68. Zhang F, Liu H, Stile F, Lei MP, Pang Y, Oswald TM, Beck J, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2003;112:1613-9.
69. Wieloch P, Buchmann G, Roth W, Rickert M. A cryo-jaw designed for in vitro tensile testing of the healing Achilles tendons in rats. *Journal of biomechanics* 2004;37:1719-22.
70. Majewski M, Ochsner PE, Liu F, Fluckiger R, Evans CH. Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum. *The American journal of sports medicine* 2009;37:2117-25.
71. Longo UG, Franceschi F, Ruzzini L, Rabitti C, Morini S, Maffulli N, Denaro V. Characteristics at haematoxylin and eosin staining of ruptures of the long head of the biceps tendon. *British Journal of Sports Medicine* 2009;43:603-7.
72. Tischer T, Milz S, Maier M, Schieker M, Benjamin M. An immunohistochemical study of the rabbit suprapatella, a sesamoid fibrocartilage in the quadriceps tendon containing aggrecan. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2002;50:955-60.
73. Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthopaedica Scandinavia* 2000 Oct;71(5):513-8 2000.
74. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 1998;16:406-13.
75. Tang JB, Cao Y, Zhu B, Xin KQ, Wang XT, Liu PY. Adeno-associated virus-2-mediated bFGF gene transfer to digital flexor tendons significantly increases healing strength. an in vivo study. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2008;90:1078-89.
76. Chen CH, Cao Y, Wu YF, Bais AJ, Gao JS, Tang JB. Tendon healing in vivo: gene expression and production of multiple growth factors in early tendon healing period. *The Journal of hand surgery* 2008;33:1834-42.
77. Stehno-Bittel L, Reddy GK, Gum S, Enwemeka CS. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part I. Effects of rigid plaster casts and functional casts. *Medicine and science in sports and exercise* 1998;30:788-93.