

Charakterisierung der Schädigungsmechanismen einer equinen oberflächlichen Beugesehne zur gezielten Behandlung von läsionierten Arealen unter Anwendung eines morphofunktionell und biomechanisch bewerteten Fasergerüsts

CHRISTIAN FREITAG



SIEGENER WERKSTOFFKUNDLICHE BERICHTE | BAND 19/2018
HERAUSGEBER: PROF. DR.-ING. HABIL. H.-J. CHRIST



Christian Freitag

Charakterisierung der Schädigungsmechanismen einer equinen oberflächlichen Beugesehne zur gezielten Behandlung von läsierten Arealen unter Anwendung eines morphofunktionell und biomechanisch bewerteten Fasergerüsts

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Dissertation, Universität Siegen, 2018

Herausgeber:
Prof. Dr.-Ing. habil. H.-J. Christ
Lehrstuhl für Materialkunde und Werkstoffprüfung
Institut für Werkstofftechnik
Paul-Bonatz-Str. 9-11
Universität Siegen
D-57068 Siegen

© Copyright Christian Freitag 2018
© Copyright Lehrstuhl für Materialkunde und Werkstoffprüfung,
Universität Siegen 2018
Alle Rechte vorbehalten, auch das des auszugsweisen Nachdruckes,
der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung
in Datenverarbeitungsanlagen und das der Übersetzung.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

urn:nbn:de:hbz:467-12862
ISSN 2193-5114

Charakterisierung der Schädigungsmechanismen einer
equinen oberflächlichen Beugesehne zur gezielten
Behandlung von läsionierten Arealen unter Anwendung
eines morphofunktionell und biomechanisch bewerteten
Fasergerüstes

genehmigte
DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Ingenieurwissenschaften

vorgelegt von
Dipl.-Ing. Christian Freitag
aus Troisdorf

eingereicht bei der
Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität Siegen
Siegen 2018

Referent: Prof. Dr.-Ing. habil. Hans-Jürgen Christ
Korreferent: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Februar 2018

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Materialkunde und Werkstoffprüfung der Universität Siegen.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Professor Dr.-Ing. habil. Hans-Jürgen Christ, der mir mit der Bereitstellung einer Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter und der Schaffung erstklassiger Arbeits- und Forschungsbedingungen eine Promotion ermöglicht hat. Auch danke ich Herrn Professor Dr. Dr. Stefan Arnhold für die stets angenehme Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung im Rahmen der Forschungsgruppe und darüber hinaus für die Übernahme des Korreferenten dieser Arbeit.

Diese Dissertation wäre ohne die Hilfe sowie fachliche Kompetenz meines Arbeitsgruppenleiters Herrn Dr.-Ing. Arne Ohrndorf kaum möglich gewesen. Ihm verdanke ich die konstruktiven Gespräche und Diskussionen während meiner Zeit am Lehrstuhl.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Ing. Wolfgang Kramer, der mich nicht nur bei technischen Problemstellungen unterstützt hat sondern zusammen mit Frau Antje Zamponi in unserem gemeinsamen Büro für eine hervorragende Arbeitsatmosphäre gesorgt hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Birgit Stoffers, Janina Schmidt, Ana Suarez und insbesondere bei Mustafa Yazlak, deren Mitarbeit bei diesem Projekt für mich eine große Unterstützung war.

Abseits des Forschungsprojektes war es sehr hilfreich einen Kollegenkreis am Lehrstuhl zu haben, der mich in Frustrationsphasen aufbauen konnte und mir insbesondere bei einem abendlichen Beisammensein motiviert hat meinen Weg beizubehalten. Hier bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Dr.-Ing. Martin Cremer und Herrn Dipl.-Ing. Sven Brück, die dadurch für mich mehr als nur Kollegen geworden sind.

Meiner Frau Sonja danke ich sehr für ihre moralische Unterstützung sowie Motivation insbesondere während der Anfertigung dieser Dissertation. Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Maschinenbaustudium ermöglichten und mir auch während der Promotion unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

Troisdorf, im Februar 2018

Christian Freitag

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IX
Nomenklatur	X
Kurzfassung.....	XIII
Abstract.....	XIV
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Grundlagen und Stand der Forschung	3
2.1 Anatomie und struktureller Aufbau equiner oberflächlicher Beugesehnen	3
2.2 Sehnenverletzungen und –erkrankungen	7
2.2.1 Definition.....	7
2.2.2 Ätiologie und Pathogenese.....	8
2.2.3 Therapiemöglichkeiten	11
2.3 Biomechanische Eigenschaften von Beugesehnen	12
2.3.1 Verformungsverhalten	13
2.3.1.1 Anatomische Gegebenheiten	15
2.3.1.2 Materialspezifische Eigenschaften	17
2.3.2 Ermüdungsverhalten	21
2.4 Bildgebende Verfahren zur Untersuchung der Strukturzustände.....	30
2.4.1 Ultraschalldiagnostik.....	30
2.4.2 Durchlicht-Polarisationsmikroskopie.....	34
2.5 Tissue Engineering	35
2.5.1 Dezellularisierung und die Anwendbarkeit auf biologisches Gewebe	36
2.5.2 Prozessbedingte Strukturveränderungen nach der Anwendung des Dezellularisierungsprozesses.....	37
2.6 Grundlagen der Finite-Elemente-Methode in der speziellen Anwendung auf Kollagenstrukturen	38

2.6.1	Materialmodelle	39
2.6.2	Formänderungsenergiefunktionen.....	39
3	Experimentelle Methoden.....	41
3.1	Verwendetes Probenmaterial und Untersuchungsmethoden.....	41
3.2	Zug- und Ermüdungsversuche.....	44
3.2.1	Servohydraulisches Prüfsystem	44
3.2.1.1	Umgebungssimulationsbad	46
3.2.1.2	Einspannvorrichtung.....	48
3.2.1.3	Ultraschallsystem	50
3.2.2	<i>In situ</i> Prüfmaschine implementiert in ein Durchlicht- Polarisationsmikroskop.....	51
3.3	Einrichtungen zur Nachuntersuchung der Sehnenstruktur	53
3.3.1	Rasterelektronenmikroskop.....	54
3.3.2	Stereomikroskop.....	55
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Analyse der Gewebestruktur.....	56
4.2	Zyklische Schädigungsentwicklung eines künstlich eingebrachten Defektes in bovinen tiefen Beugesehnen.....	57
4.3	Auswirkungen des Dezellularisierungsprozesses auf das Werkstoffverhalten equiner oberflächlicher Beugesehnen unter monotoner Beanspruchung	60
4.4	Auswirkungen des Dezellularisierungsprozesses auf das Werkstoffverhalten equiner oberflächlicher Beugesehnen unter zyklischer Beanspruchung	65
4.4.1	Wechselverformungsverhalten	65
4.4.2	Ultrasonographische Charakterisierung	71
4.4.3	Morphologische Bewertung	74
4.5	<i>In situ</i> Untersuchungen an equinen Faszikeln aus zentralen und peripheren Faserarealen	76
4.5.1	Charakterisierung der Crimp-Struktur.....	77
4.5.2	Analyse des Verformungsverhaltens.....	83

4.6	Finite-Elemente-Analyse zur Bewertung des Verformungsverhaltens	87
4.6.1	Entwicklung des Finite-Elemente-Modells	87
4.6.2	Simulation	92
4.6.2.1	Definition der Materialkennwerte	93
4.6.2.2	Einfluss der Crimp-Struktur auf das Verformungs- und Schädigungsverhalten	96
4.6.2.3	Auswirkung von Strukturveränderungen im Gewebe	99
5	Diskussion	101
5.1	Prozessbedingte Einflussfaktoren auf das Schädigungsverhalten	101
5.1.1	Biomechanische Betrachtung	105
5.1.1.1	Monotone Beanspruchung	106
5.1.1.2	Zyklische Beanspruchung	108
5.1.2	Polarisationsmikroskopische Charakterisierung	112
5.1.2.1	Auswirkungen der Crimp-Struktur auf die Schädigung	114
5.1.2.2	Verformungsverhalten einzelner Faszikel	115
5.1.3	Morphologische Betrachtung	121
5.1.4	Ultrasonographische Bewertung	122
5.2	Deutung der Schädigungsmechanismen unter Anwendung der Finite- Elemente-Analyse	123
5.2.1	Beurteilung des CAD-Modells	124
5.2.2	Gegenüberstellung des experimentell bestimmten Verformungsverhaltens mit der Finite-Elemente-Analyse	125
6	Zusammenfassung und Ausblick	129
7	Literaturverzeichnis	132
8	Anhang	163

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung des Bandapparates des rechten Vorderfußes eines Pferdes (modifiziert nach Nickel et al. [8])	3
Abbildung 2.2:	Schematische Darstellung des fibrösen Aufbaus der Bindegewebsstruktur (modifiziert nach Kastelic et al. [18])	4
Abbildung 2.3:	Schematischer Aufbau der extrazellulären Schritte – von der Abspaltung der Propeptide bis zur kovalenten Quervernetzung (modifiziert nach Löffler et al. [83]).....	7
Abbildung 2.4:	Schematische Darstellung eines Spannung-Dehnung-Diagramms einer Sehne (modifiziert nach Arnoczky et al. [203] und Rees et al. [204]).....	13
Abbildung 2.5:	Schematische Darstellung der Crimp-Struktur (modifiziert nach Patterson-Kane et al. [49])	15
Abbildung 2.6:	Spannung-Dehnung-Kurve des zentralen und peripheren Areals einer Kollagenstruktur (modifiziert nach Wilmink et al. [235])	17
Abbildung 2.7:	Transversale Verteilung des Kollagengehaltes innerhalb einer Faser (modifiziert nach Angel et al. [282])	21
Abbildung 2.8:	a) Kraft-Dehnung-Hystereseschleifen und b) Kraft-Dehnung-Kurven von Rattenschwanzsehnen bei charakteristischen Zyklenzahlen (modifiziert nach Rigby et al. [290])	22
Abbildung 2.9:	Einteilung der Sekantensteifigkeit des Zehenbeugers einer Ratte in drei charakteristische Phasen (modifiziert nach Fung et al. [298])	23
Abbildung 2.10:	Schematische Darstellung des mechanischen Verformungsverhaltens von Elastomeren (modifiziert nach Cantournet et al. [303])	24
Abbildung 2.11:	a) Wechselperformungskurve und b) konfokale Bilddarstellung von zyklisch belasteten Faszikeln einer equinen OBS der Jungtiere sowie c) der Alttiere (modifiziert nach Thorpe et al. [314]).....	26
Abbildung 2.12:	Darstellung der maximalen Längenänderung von Faszikeln einer bovinen Beugesehne unter zyklischer Belastung (modifiziert nach Shepherd et al. [292])	27
Abbildung 2.13:	Konfokale Bilddarstellung von zyklisch belasteten Faszikeln einer bovinen a), c) Streck- und b), d) Beugesehne nach a), b) 0 Lastspielen sowie c) 300 Lastspielen und d) 900 Lastspielen (modifiziert nach Shepherd et al. [293]).....	28
Abbildung 2.14:	Schematische Darstellung der Schädigungsmechanismen bei einer Sehnenermüdung [298]	29

Abbildung 2.15:	Konfokale Bilddarstellungen zeigen die Zellen im a) unbelasteten Zustand und b) nach einer Belastung der Sehne [127]	30
Abbildung 2.16:	Sonogramme einer zwei Monate alten Tendinitis der OBS. a) Transversales Sonogramm (rechts: medial), b) longitudinales Sonogramm (rechts: distal) [327].....	32
Abbildung 2.17:	Schematische Darstellung des Verlaufes der Crimp-Struktur unter Angabe der Rotationsachsen A und N (modifiziert nach Diamant et al. [38]).....	34
Abbildung 2.18:	Schematische Darstellung des Rotationseffektes entlang der N-Achse für $\theta = 0$, $\theta > 0$ und $\theta < 0$ (modifiziert nach Diamant et al. [38]).....	35
Abbildung 2.19:	Schematische Darstellung des Prinzips der Gewebezüchtung [354]	36
Abbildung 3.1:	Entnahme einer equinen OBS	42
Abbildung 3.2:	Darstellung einer a) equinen OBS und einer b) bovinen TBS nach der Entnahme	43
Abbildung 3.3:	Dezellularisierte equine OBS	44
Abbildung 3.4:	Schematischer Aufbau einer servohydraulischen Prüfmaschine (modifiziert nach Schöler et al. [427])	45
Abbildung 3.5:	Übersichtsaufnahme der servohydraulischen Prüfeinrichtung mit dem US-Gerät, der Kryoapparatur und dem Wärmethermostat	47
Abbildung 3.6:	Schematische Darstellung der a) servohydraulischen Prüfmaschine und der b) Umgebungssimulationskammer	48
Abbildung 3.7:	Reale und schematische Ansicht der Einspannvorrichtung.....	49
Abbildung 3.8:	Schematische Darstellung der Positionierung zweier Ultraschallsonden zur Erzeugung von longitudinalen und transversalen Sonogrammen.....	51
Abbildung 3.9:	a) Darstellung der Belastungsvorrichtung implementiert in das Durchlicht-Polarisationsmikroskop Olympus (Typ BX51) und b) schematische Ansicht mit Bezeichnung der Komponenten.....	52
Abbildung 3.10:	a) Platziertes Mikrotomschnitt auf einem Aluminiumträger und b) fixiert im mit PBS gefüllten Umgebungsbad	53
Abbildung 3.11:	Sehnenfaszikel aufgetragen auf eine Trägerplattform zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung.....	55
Abbildung 3.12:	Einteilung der equinen OBS in zahlreiche Segmente zur transversalen Betrachtung des Gewebezustandes	55
Abbildung 4.1:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Kryobrüchen einer a), b) initial intakten und c), d) dezellularisierten OBS	56

Abbildung 4.2:	Darstellung des gestempelten Messrasters zur Bestimmung der Dehnungsverteilung entlang einer bovinen TBS bei einer Kraftamplitude von a) 250 N und b) 3 kN.....	58
Abbildung 4.3:	Betrachtung der Schädigungsentwicklung gezielt läsionierter boviner TBS anhand longitudinaler Sonogramme	59
Abbildung 4.4:	Spannung-Dehnung-Verhalten von vier Proben der equinen initial intakten Kontrollgruppe	61
Abbildung 4.5:	Detektierte Partialruptur im zentralen Areal einer equinen OBS (S3) in der a) transversalen Ansicht und b) longitudinalen Ansicht	62
Abbildung 4.6:	Spannung-Dehnung-Verhalten von vier Proben der equinen dezellularisierten Gruppe	62
Abbildung 4.7:	Darstellung des arithmetisch gemittelten Spannung-Dehnung-Verhaltens der a) equinen initial intakten und b) dezellularisierten OBS	63
Abbildung 4.8:	Transversales Sonogramm einer equinen OBS zur Bestimmung der intakten Querschnittsfläche im mittleren Metakarpalbereich (Pferd 1).....	64
Abbildung 4.9:	Wechselverformungskurven der equinen OBS von Pferd 7 (a) initial intakt, b) dezellularisiert) und Pferd 9 (c) initial intakt, d) dezellularisiert).....	66
Abbildung 4.10:	Wechselverformungsverhalten der a), b) initial intakten OBS (S21) und der c) dezellularisierten OBS (S22). Die grüne Linie kennzeichnet den Beginn des linearen Verformungsverhaltens mit zunehmender Zyklenzahl.....	68
Abbildung 4.11:	Darstellung von vier Spannung-Dehnung-Hysteresen (S21) bei einer Spannungsamplitude von $\Delta\sigma/2 = 22$ MPa und charakteristischen Lastspielzahlen	69
Abbildung 4.12:	Spannung-Dehnung-Hysterese der Zyklen 2 und 3 (S21).....	70
Abbildung 4.13:	Verlauf des Elastizitätsmoduls über der Zyklenzahl der initial intakten equinen OBS (S21)	70
Abbildung 4.14:	Verlauf des Elastizitätsmoduls über der Zyklenzahl der dezellularisierten OBS (S22).....	71
Abbildung 4.15:	Visualisierung des Schädigungszustands einer initial intakten OBS (S25) an charakteristischen Lastspielpositionen mit Hilfe von longitudinalen Sonogrammen	72
Abbildung 4.16:	Visualisierung des Schädigungszustands einer dezellularisierten OBS (S26) an charakteristischen Lastspielpositionen mit Hilfe von longitudinalen Sonogrammen	73

Abbildung 4.17:	Auswirkung der zyklischen Belastung auf die Gewebestruktur einer a), b), c) initial intakten OBS (S25) und einer d), e) dezellularisierten OBS (S22) an den identischen Positionen	75
Abbildung 4.18:	Schematische Einteilung der Entnahmepositionen im transversalen Sehnenchnitt.....	77
Abbildung 4.19:	Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Probe P2 (periphere Zone) in der a) Hell- und b) Dunkelfeldansicht zur Charakterisierung des Crimp-Winkels im unbelasteten Zustand	79
Abbildung 4.20:	Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Probe P2 (periphere Zone) in der a) Hell- und b) Dunkelfeldansicht zur Charakterisierung des Crimp-Winkels nach einer Dehnung von 7,3 %.....	80
Abbildung 4.21:	Arithmetisch gemittelt Winkel-Dehnung-Diagramm für das zentrale und periphere Phasereareal.....	81
Abbildung 4.22:	Polarisationsmikroskopische Aufnahme der Probe Z4 im definiert unbelasteten Zustand zur Charakterisierung der Crimp-Länge	82
Abbildung 4.23:	Spannung-Dehnung-Verlauf von Faszikeln entnommen aus dem zentralen und peripheren Sehnenareal. Darstellung der a) einzelnen Versuchsproben und der b) arithmetisch gemittelten Verläufe.....	84
Abbildung 4.24:	Entwicklung der Crimp-Struktur eines Sehnenfaszikels im zentralen Areal unter einsinniger konstanter Vorschubgeschwindigkeit	86
Abbildung 4.25:	a) Drei-periodisches CAD-Modell einer equinen OBS und b) Detailansicht des hierarchischen Aufbaus.....	88
Abbildung 4.26:	Definition der für die CAD-Geometrie notwendigen Parameter	89
Abbildung 4.27:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zur gezielten Beurteilung des Fibrillendurchmessers ($d_{\text{Fibrille}} = 242 \text{ nm}$).....	89
Abbildung 4.28:	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Transversalschnittes durch eine Pferdesehne zur Analyse des Flächenanteils der Fibrillen am Gesamtaufbau ($S_{\text{Fibrille}} = 62 \%$) [442].....	90
Abbildung 4.29:	Vernetzte Geometrie eines repräsentativen CAD-Modells, bestehend aus fünf Fasern, die den zentralen und peripheren Abschnitt beinhalten.....	92
Abbildung 4.30:	Ermittlung der für die Berechnung der Formänderungsenergie benötigten Kennwerte am Beispiel der Fibrille.....	95

Abbildung 4.31: Spannungsverteilung im transversalen Schnitt des fünffaserigen Modells.....	97
Abbildung 4.32: Zweifibrilläres Modell zur Visualisierung der Spannungsverteilung entlang der Kollagenstruktur	98
Abbildung 4.33: Variierende a) Crimp-Winkel und b) –Längen führen zu veränderten Spannung-Dehnung-Verläufen	99
Abbildung 4.34: Fibrillen-Matrix-Darstellung in einer geöffneten Matrixstruktur	100
Abbildung 4.35: Auswirkungen einer Matrix-Fibrillen-Verknüpfung auf das Verformungsverhalten der Struktur.....	100
Abbildung 5.1: Angehaftete OBS an Klemmbacke 2 nach Beendigung des biomechanischen Versuchs und Demontage der Einspannung	102
Abbildung 5.2: Makroskopisch sichtbarer Verlust der quervernetzten Struktur an einer a) dezellularisierten gegenüber einer b) initial intakten equinen OBS.....	107
Abbildung 5.3: Darstellung von a) vier Spannung-Dehnung-Hysteresen (S21) bei einer Spannungsamplitude von $\Delta\sigma/2 = 22$ MPa und charakteristischen Lastspielzahlen sowie b) einer projizierten Ansicht des Sekantenmoduls und der Entwicklung der Toe-Dehnung	109
Abbildung 5.4: Sekantenmodul einer humanen Achillessehne (modifiziert nach Wren et al. [296])	112
Abbildung 5.5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der zentralen (-c) und peripheren Areale (-p) einer equinen oberflächlichen Beugesehne im Sehnen-Knochen-Übergang (MTJ), im mittleren Metakarpalbereich (mM) und im Übergang zum Knochen (OTJ) [460].....	117
Abbildung 5.6: Freiliegende Faseranteile bei einer definierten Zugbelastung ($0,1 R_m$) kennzeichnen eine Schädigung der Kollagenstruktur vor Belastungsbeginn	119
Abbildung 5.7: Positionsabhängiges Spannung-Dehnung-Diagramm der Proben P4 und Z5 aus dem zentralen und peripheren Areal	120
Abbildung 5.8: Vergleich des experimentell bestimmten und des simulierten Verformungsverlaufes einer initial intakten equinen OBS unter Anwendung des hyperelastischen und linear-elastischen Materialmodells.....	126
Abbildung 5.9: Vergleich des a) realen Spannung-Dehnung-Verhalten der initial intakten und dezellularisierten equinen OBS und der b) Simulationsergebnisse des fünffibrillaren Modells.....	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Darstellung der in vitro gemessenen biomechanischen Materialkennwerte einer equinen OBS	14
Tabelle 2.2:	Darstellung der in vivo wirkenden Belastungen einer equinen OBS in Abhängigkeit von der Gangart	15
Tabelle 2.3:	Übersicht der charakteristischen Crimp-Struktur einer equinen OBS in Abhängigkeit des Alters und Trainingszustandes des Tieres	16
Tabelle 2.4:	Übersicht der charakteristischen Querkontraktionszahlen verschiedener Kollagenstrukturen	18
Tabelle 2.5:	Übersicht des charakteristischen Elastizitätsmoduls einer equinen OBS	19
Tabelle 2.6:	Übersicht der charakteristischen Elastizitätsmoduln der Fibrille und der Extrazellulärmatrix in Abhängigkeit von der Kollagenstruktur.....	20
Tabelle 2.7:	Bewertungsmöglichkeiten des Ausmaßes einer Sehnenläsion [327].....	33
Tabelle 4.1:	Darstellung der Kennwerte der equinen initial intakten Kontrollgruppe und der dezellularisierten OBS.....	63
Tabelle 4.2:	Darstellung der ermüdeten OBS und der erreichten Bruchzyklenzahl.....	67
Tabelle 4.3:	Experimentell ermittelte Crimp-Struktur für den definiert unbelasteten Zustand einer equinen OBS im zentralen und peripheren Sehnenareal	83
Tabelle 4.4:	Biomechanische Kennwerte der equinen Faszikel in der peripheren und zentralen Zone.....	85
Tabelle 4.5:	Anatomische Kennwerte für die Gestaltung des CAD-Modells unter Berücksichtigung des zentralen und peripheren Areals.....	91
Tabelle 4.6:	Für die Vernetzung verwendeten Elementtypen, Elementanzahl und der kleinste Elementwinkel	92
Tabelle 4.7:	Hyperelastische Materialparameter für die Berechnung der Formänderungsenergie in Abaqus FEA.....	96
Tabelle 5.1:	Biomechanische Kennwerte der Mikrotomschnitte im zentralen und peripheren Areal sowie der initial intakten equinen OBS.....	118

Nomenklatur

Lateinische Symbole

<u>Zeichen</u>	<u>Bedeutung</u>	<u>Einheit</u>
A_0	Ausgangsquerschnittsfläche	mm ²
d_{Fibrille}	Fibrillendurchmesser	nm
D_p	Materialparameter	-
E	Elastizitätsmodul	N/mm ²
F_z	Zugkraft	N
J	Volumenverhältnis	-
J^{el}	elastisches Volumenverhältnis	-
J^{th}	thermisches Volumenverhältnis	-
L	Crimp-Länge	μm
l_0	Ausgangsmesslänge	mm
L_v	virtuelle Crimp-Länge	μm
N	Lastspielzahl	-
R_m	Zugfestigkeit	MPa
S_{Fibrille}	Flächenanteil der Fibrillen am Gesamtaufbau	%
U	Formänderungsenergie	J

Griechische Symbole

<u>Zeichen</u>	<u>Bedeutung</u>	<u>Einheit</u>
α	Materialparameter	-
α_p	spezifischer Materialparameter	-
ε	Dehnung	%
$\Delta\varepsilon$	Dehnungsschwingbreite	%
ε^{th}	thermische Dehnung	%
$\Delta\varepsilon_{\text{IV}}$	Schwingbreite der linear-viskoelastischen Dehnung	%
λ	Wellenlänge	μm
λ_l	Eigenwerte	-
ν	Querkontraktionszahl	-
μ_p	spezifischer Materialparameter	-
ρ	Elementenwinkel	$^\circ$
σ	Spannung	MPa
τ	Auslöschungswinkel	$^\circ$
θ	Crimp-Winkel	$^\circ$

Abkürzungen

ABI	autologe Blutinjektion
B-Mode	brightness modulation
CAD	Computer-aided design
COX	Cyclooxygenase
CPD	Critical Point Drying
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
FE	Finite Elemente
FEA	Finite-Elemente-Analyse
GAG	Glykosaminoglykane
GP	Glykoproteine
IL	Interleukin
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
OBS	oberflächliche Beugesehne
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PG	Proteoglykane
PRP	plättchenreiches Plasma
REM	Rasterelektronenmikroskopie
TBS	tiefe Beugesehne
TE	Tissue Engineering

Kurzfassung

Eine Schädigung der oberflächlichen Beugesehne (OBS) an den vorderen Extremitäten des Pferdes führt nicht selten zu einer Außerdienststellung, die in schwerwiegenden Fällen in einer Euthanasie des Tieres resultiert. Das Ziel dieser Arbeit ist es, neben der Ergründung der Schädigungsmechanismen einer initial intakten equinen OBS, die Eignung eines implantierten dezellularisierten Ersatzgewebes zur Behandlung eines topischen Schädigungsabschnittes zu evaluieren.

Nach einer zyklischen Belastung wird der Schädigungsbeginn durch Inhomogenitäten der Matrix, in Form von interfibrillaren Aufweitungen und Diskontinuitäten innerhalb der Kollagenstruktur, bis hin zu einer vollständigen Ruptur im mittleren Metakarpalbereich deutlich. Ein größerer Crimp-Winkel im peripheren Areal führt zu einer größeren Toe-Dehnung, was im Umkehrschluss in einer frühzeitigen Belastung der zentralen Fasern resultiert. Neben den rein strukturbedingten Einflussfaktoren konnten zusätzlich biochemische Verformungseinflüsse registriert werden. Ein für die Festigkeit der Sehne ausschlaggebender höherer Fibrillenanteil, gemessen am gesamten Gewebekonstrukt, sorgt im zentralen Areal für einen höheren Elastizitätsmodul, was zusätzlich für eine höhere Belastung in dieser Zone bei einer identischen Dehnung der peripheren Fasern führt.

Zur Vermeidung eines minderwertigen Narbengewebes in dem läsierten Sehnenabschnitt ist eine Eignung des dezellularisierten Spendergewebes als implantierte Ersatzstruktur bis zu einer definierten Belastung gegeben. Auf Grundlage vorhandener *in vivo* Studien kann während der Rekonvaleszenzzeit lediglich eine gering belastende Schrittbewegung des Pferdes, verbunden mit einem geeigneten Bewegungsuntergrund, empfohlen werden, um eine erneute Ruptur in dem Behandlungszeitraum zu unterbinden. Eine Behandlung des rupturierten Sehnenabschnittes mit einer geeigneten Nahttechnik wird zur Fixierung der Kollagenstruktur weiterhin notwendig sein. Vielmehr könnte das dezellularisierte Implantat als Füllmaterial den Heilungsverlauf positiv beeinflussen. Eine hinreichende Festigkeit der Implantatstruktur oberhalb der zulässigen Belastbarkeit der Nahtverbindung ist nachweislich mit Hilfe der Erkenntnisse dieser Arbeit gegeben.

Abstract

A damage to the superficial digital flexor tendon (SDFT) on the anterior extremities of the horse often leads to an out-of-service position, which in serious cases results in an euthanasia of the animal. The aim of this work is to evaluate the suitability of an implanted decellularized replacement tissue for the treatment of a topical lesion section in addition to the investigation of the damage mechanisms of an initially intact equine SDFT.

After fatigue loading, the onset of damage is indicated by inhomogeneities of the matrix, in the form of interfibre space widening and discontinuities within the collagen structure, up to complete rupture in the middle metacarpal region. A larger crimp angle in the peripheral area leads to a larger toe strain, which in turn results in an early loading of the central fibres. In addition to the purely structural factors, biochemical deformation effects were registered. A higher proportion of fibrils, which is decisive for the strength of the tendon, measured in the entire tissue construct, ensures a higher modulus of elasticity in the central area, which additionally leads to a higher load in this zone with a identical strain of the peripheral fibres.

In order to avoid an inferior scar tissue in the lesioned tendon section, the decellularized donor tissue is suitable as an implanted substitute structure up to a defined load. On the basis of existing *in vivo* studies during the convalescence, only a low-loading step movement of the horse, combined with a suitable ground, can be recommended as to prevent a renewed rupture in the treatment period. Treatment of the ruptured tendon section with a suitable suture technique will continue to be necessary for the fixation of the collagen structure. Rather, the decellularized implant as a filling material could positively influence the healing process. A sufficient strength of the implant structure above the permissible load-bearing capacity of the suture connection can be demonstrated by means of this work's findings.

1 Einleitung und Zielsetzung

Sehnenläsionen sowie Schädigungen des muskuloskeletalen Systems gehören zu den häufigsten Erkrankungen in der equinen Veterinärmedizin. Insbesondere eine Schädigung der oberflächlichen Beugesehne (OBS) an den vorderen Extremitäten des Pferdes führt nicht selten zu einer Außerdienststellung, die in schwerwiegenden Fällen in einer Euthanasie des Tieres resultiert. Die Heilung des rupturierten Sehnengewebes ist mit einer langen Rekonvaleszenzzeit verbunden, wobei die biomechanischen Festigkeitseigenschaften des Ursprungsgewebes nicht erreicht werden und die vorgeschädigten Sehnenabschnitte eine erneute Erkrankung erleiden können [1]. Da die Anwendung von herkömmlichen Therapieansätzen eine zuvor beschriebene hohe Rezidivrate zur Folge hat und der vergleichsweise einfache Aufbau der Sehne eine Behandlung mittels Tissue Engineering prädestiniert, werden in zahlreichen Forschungsgruppen regenerative Therapieformen an Labortieren erprobt. Diese Behandlungsmöglichkeit beinhaltet die Implantation einer Gerüstsubstanz sowie anschließender Injektion verschiedener Substrate in das läsionierte Sehnenareal, wie Eigenblutbestandteile oder kernhaltige Zellen (Stammzellen), die aus dem Knochenmark oder Fettgewebe des Spenders entnommen werden. Ein mit Hilfe dieser Methode geschaffenes Ersatzgewebe wird im Idealfall die funktionellen Eigenschaften des Ursprungsgewebes erfüllen und einen Gegensatz zum unzureichenden Narbengewebe bilden.

Der typische Bewegungsablauf eines Pferdes sorgt für eine Beanspruchung nahe der kritischen Belastbarkeit der Sehne [2] in einer leicht hyperthermischen Umgebung [3], was zu extrazellulären und biochemischen Veränderungen der Gewebestruktur führt [4]. Dieses Erkenntnis eingeschlossen ist das Ziel dieser Arbeit, neben der Ergründung der Schädigungsmechanismen einer initial intakten equinen OBS, die Eignung eines in den rupturierten Abschnitt implantierten dezellularisierten Ersatzgewebes zu evaluieren und eine Bewegungsvorgabe des Tieres in der Rekonvaleszenzzeit zu definieren.

Im zweiten Kapitel dieser Arbeit werden die Grundlagen zur Anatomie und zum strukturellen Aufbau einer equinen OBS geschildert und der Stand der Forschung zum biomechanischen monotonen sowie zyklischen Verformungsverhalten erläutert. Im Anschluss werden in Kapitel 3 die verwendeten experimentellen Methoden zur Prüfung der Kollagenstruktur und Analyse der prozessbedingten Schädigungsmechanismen aufgeführt.

Der Ergebnisabschnitt schildert nach einer Analyse der initial intakten und dezellularisierten Gewebestrukturen die prozessbedingten Auswirkungen auf das Verformungs- und Schädigungsverhalten unter monotoner und zyklischer Belastung. Das in das servohydraulische Prüfsystem implementierte bildgebenden Bewertungsverfahren in Form eines

Ultraschallsystems soll die Schädigungsentstehung und -entwicklung an vollständigen Sehnensträngen der zellulären und azellulären Behandlungszuständen ergründen. Zur Evaluierung der erlangten Erkenntnisse werden morphologische Untersuchungen an dem rupturierten Gewebe vorgenommen, um die Strukturveränderungen zu visualisieren.

Zusätzlich werden im weiteren Verlauf des Ergebnisabschnittes die Erkenntnisse aus den polarisationsmikroskopischen Untersuchungen an einzelnen Faszikeln beschrieben, die insbesondere die Mechanismen der Schädigungsentstehung ergründen und neben den anatomischen Einflüssen auch biochemische Veränderungen durch den Behandlungsprozess betrachten. Abschließend wird ein auf Basis der polarisations- und raster-elektronenmikroskopischen Ergebnisse kreierte CAD-Modell für die Einschätzung der aus den biomechanischen Versuchsreihen postulierten Materialkennwerten der einzelnen Sehnenkomponenten genutzt und zusätzlich für eine Bewertung verschiedener anatomischer Gegebenheiten herangezogen. In Kapitel 5 werden die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse zusammen mit den anatomischen Grundlagen und dem Stand der Forschung diskutiert und das Strukturverhalten sowie die Verformungs- und Schädigungsmechanismen offengelegt.

Aufgrund der pathophysiologischen Vergleichbarkeit des muskuloskeletalen Systems ist das Pferd ein exzellentes Modell, um humane degenerative orthopädische Erkrankungen zu ergründen [5]. Darüber hinaus ist das Spendergewebe, im Vergleich zu anderen Modelltieren, in einem relativ großen Umfang verfügbar und hat eine große klinische Bedeutung. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse sollen über den veterinärmedizinischen Bereich hinaus, Empfehlungen für eine Übertragung auf muskuloskeletale Erkrankungen des Menschen liefern.

2 Grundlagen und Stand der Forschung

2.1 Anatomie und struktureller Aufbau equiner oberflächlicher Beugesehnen

Um einen Bewegungsablauf des Tieres zu ermöglichen, sorgen Sehnen innerhalb des muskuloskeletalen Systems für eine Übertragung der Muskelkontraktionen auf das Skelett. Dies ist mit hohen Anforderungen an den equinen Bandapparat verbunden und setzt ein ausreichendes Maß an Belastbarkeit und Elastizität der Sehnen sowie hohe Gleiteigenschaften im peritendinösen Gewebe voraus [6]. Der equine Bandapparat einer Extremität besteht neben zahlreichen Unterstützungsbändern aus der gemeinsamen Strecksehne, der tiefen (TBS) und der oberflächlichen Beugesehne (OBS) (siehe Abbildung 2.1) [7].

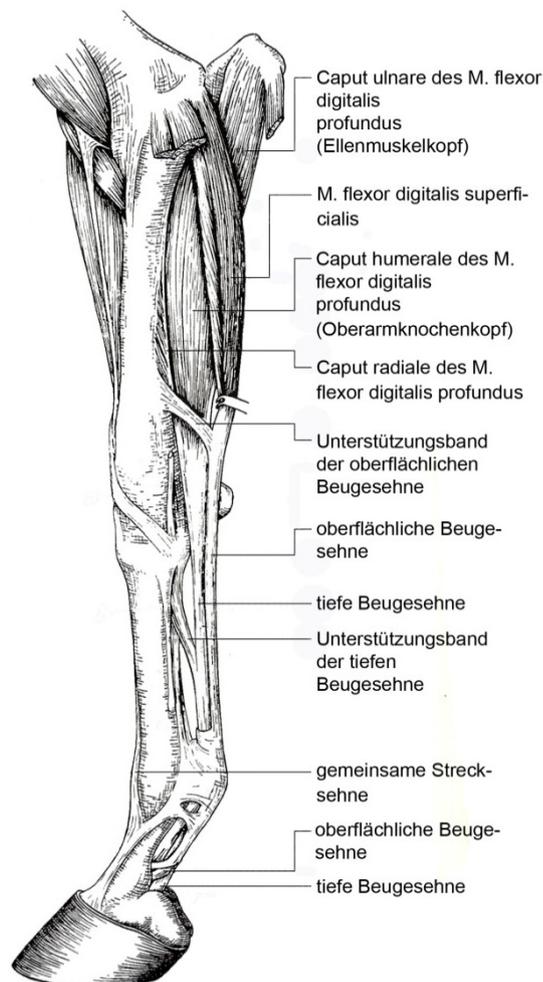


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Bandapparates des rechten Vorderfußes eines Pferdes (modifiziert nach Nickel et al. [8])

Die letztgenannte ist bedingt durch ihre Verletzungsanfälligkeit Gegenstand dieses Forschungsvorhabens [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16].

Die OBS verläuft distal, ausgehend von dem Muskelbauch des Musculus flexor digitalis superficialis unterhalb des Karpus, bis zum Anschluss der Sehnenschenkel lateral und medial an der Kronbeinlehne und an den Seitenrändern des Fesselbeins [8]. Ein Unterstützungsband (Ligamentum accessorium), welches am kaudomedialen Radius proximal des Antebrachiokarpalgelenks verwachsen ist, sorgt für eine Stabilisierung der OBS [17].

Sehnen bestehen aus longitudinal angeordneten, hierarchischen Kollagenstrukturen, die zusammen mit ihrer größten Untereinheit, den durch ein Endotendineum abgetrennten Faszikeln die Gesamtheit der Sehne beschreiben [18]. Im Bereich dieser Grenzflächen sorgt das lockere Bindegewebe für eine Integration der Blutgefäße sowie der Nerven- und Lymphbahnen, um das organische Material mit Nährstoffen versorgen zu können [18, 19, 20]. Der Anteil des straffen Bindegewebes an den Beugesehnen beträgt 85 - 88 %, zusammen mit 11 - 14 % lockerem Bindegewebe und gefäßhaltigen Septen sowie 0,5 - 1 % Blutgefäße [21]. Der Ansatzbereich zum Muskel und Knochen ist durch einen erhöhten Anteil an Bindegewebe und der zwischen den Fasern befindlichen Knorpelstruktur gekennzeichnet [22]. Abbildung 2.2 zeigt schematisch den fibrösen Aufbau der Bindegewebsstruktur vom Tropokollagen bis zur intakten Sehne.

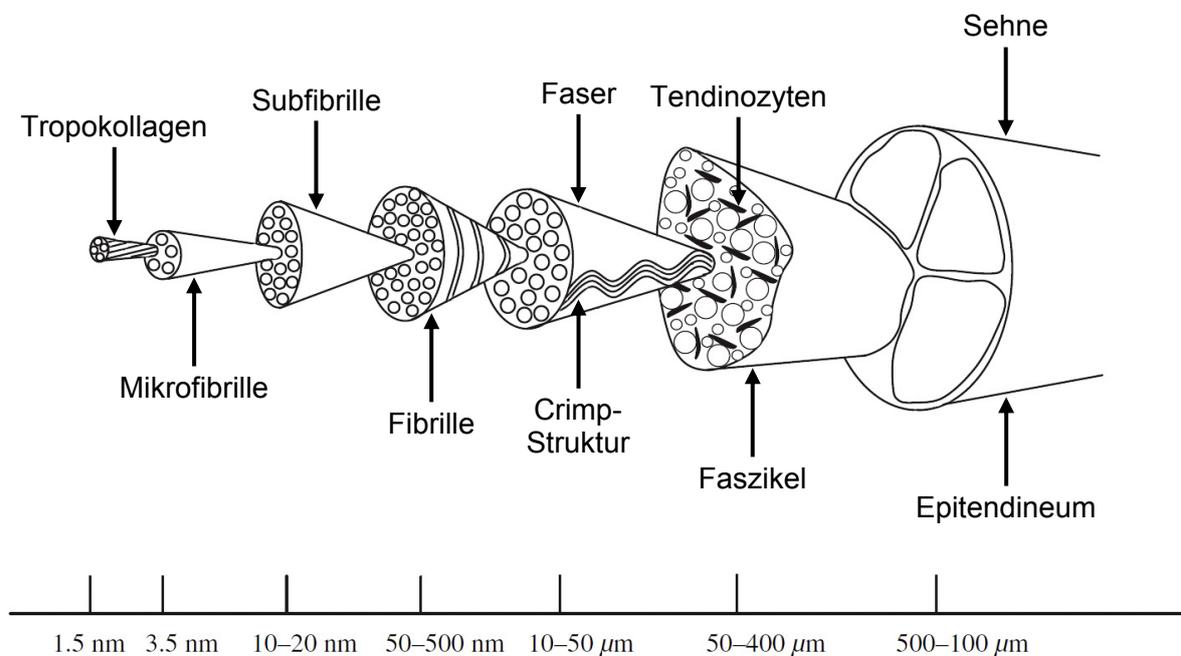


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des fibrösen Aufbaus der Bindegewebsstruktur (modifiziert nach Kastelic et al. [18])

Umgeben von flachen, langgestreckten Tendinozyten bilden die Kollagenfasern, in einer Vielzahl in einem Peritenonium eingebettet, die nachfolgende Untereinheit, bevor die Kollagenfibrille als kleinste noch im Rasterelektronenmikroskop nachweisbare Struktur den Sehnenaufbau auf dieser Betrachtungsebene abschließt [18, 23]. Bestehend aus parallel sowie aperiodisch angeordneten Kollagenfibrillen durchschreiten die Fasern vollständig den intakten Sehnenstrang [24, 25, 26] und bilden damit die kleinste mechanisch prüfbare Einheit [27]. Fibrillen können hingegen nur eine Länge bis zu mehreren Millimetern und einen Durchmesser von 20 - 500 nm einnehmen [28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35] und sind in einer periodischen sinusoidalen Wellenform angeordnet, die als Crimp-Struktur bezeichnet wird [36, 37, 38, 39, 40, 41, 42]. Diese Crimp-Struktur fungiert als Dämpfer, um unerwartet auftretende Belastungen sowie hohe Spannungskonzentrationen, bedingt durch einen unzulässigen Untergrund, abzufedern und eine Schädigung des muskuloskeletalen Systems zu unterbinden [27, 43]. Zusätzlich dient diese als eine für den Bewegungsablauf des Tieres relevante Energiespeicherung und -abgabe [44, 45].

Das Bindegewebsprotein Kollagen umfasst mit 75 % der Trockenmasse den Hauptbestandteil einer Sehne [46], wobei 80 - 95 % des Gesamtkollagens durch Typ-I abgedeckt werden [47, 48]. Die durch den Kollagentyp I gebildeten Fibrillen besitzen je nach Alter, Trainingszustand und Verfassung des Tieres abweichende Durchmesser [25, 49], die Auswirkungen auf die Zugfestigkeit der Sehne haben. Mit zunehmendem Alter des Tieres und ansteigendem Fibrillendurchmesser wird die Anzahl der Vernetzungen reduziert [50] und die damit verbundene Zugbelastbarkeit der Sehne herabgesetzt [51, 52, 53]. Birch et al. [46] verdeutlichen in ihrer Arbeit, dass die Anzahl an Fibrillen mit einem geringen Durchmesser mit zunehmendem Alter und aktivem Trainingsverhalten zunimmt. Neben den in geringen Mengen an diversen Sehnenabschnitten nachweisbaren Kollagentypen IV, V, IX, X und XII [54, 55, 56], bildet der Kollagentyp III mit 4 - 5 % des Gesamtkollagens im mittleren Metakarpalbereich ein für den strukturellen Aufbau der Sehne relevantes Gewebekonstrukt [46, 57]. Einen Teil des Binde- und Stützgewebes in unmittelbarem Umfeld der Kollagenfasern bildet die extrazelluläre Matrix, die aus kollagenen Faserbestandteilen, Elastin und Fibrillin, nicht kollagenen Glykoproteinen (GP), Glykosaminoglykanen (GAG) und Proteoglykanen (PG) bestehen [56, 58, 59]. Proteoglykane sind orthogonal zu den Fibrillen angeordnete Filamente, die die Kollagenstrukturen untereinander vernetzen [29, 60, 61] und somit bei der Regulierung der Fibrillogenese [26, 62, 63, 64, 65, 66] sowie der Übertragung von Zugbelastungen beteiligt sind [61, 67, 68]. Unterstützt wird diese Vernetzung durch das nicht-fibrillare Typ VI Kollagen, welches durch die extrazelluläre Matrix hindurch Typ I Fibrillen verknüpft [69]. Glykosaminoglykane sind in Form von Heparansulfat, Dermatansulfat, Chondroitinsulfat und Keratansulfat als nicht verzweigte Poly-

saccharid-Ketten an Proteoglykane im Stütz- und Bindegewebe gebunden und werden in der Literatur zumeist zusammen als PG GAG bezeichnet [29]. Sie sorgen für eine regelmäßige Orientierung, Anordnung und Organisation der Kollagenfibrillen [70]. Die Entstehung von Glykosaminoglykanen ist an die biomechanische Umgebung geknüpft, in der sich die Sehnen befinden [71]. Batson et al. [72] verdeutlichen eine Abhängigkeit zwischen der Bildung von Glykosaminoglykanen und der Kontraktion verschiedener Sehnen-typen. Eine hohe elastische Dehnbarkeit der OBS bewirkt aufgrund einer ausgiebigen Kontraktion des Gewebes eine verstärkte Entstehung von GAG im Gewebe [72]. Der GAG Gehalt wiederum variiert entlang der Längsachse der equinen OBS und definiert den Minimalwert im mittleren Metakarpalbereich, was die biomechanischen Materialeigenschaften beeinflusst [73, 74]. Auf mikrofibrillärer und tropokollagener Strukturebene verknüpfen Quervernetzungen, die sogenannten Crosslinks, die in einer Tripelhelix aus drei alpha-helikalen Polypeptidketten angeordneten Kollagenmoleküle [27, 34, 75]. Die durch Kondensation von Lysin- oder Hydroxylysinresten gebildeten Crosslinks dienen der strukturellen Stabilisierung [76] und Kraftübertragung zwischen den einzelnen Gewebebestandteilen [77]. Die Moleküle sind kovalent intramolekular zwischen den alpha-Polypeptidketten eines mit einer Länge von 285 nm und einem Durchmesser von 1,4 nm [78] auftretenden Tropokollagens und intermolekular zwischen benachbarten Tropokollagenmonomeren gebunden und bilden ein Pentamer, die Mikrofibrille [79, 80, 81, 82]. Eine Mikrofibrille ist durch einen Durchmesser von 3,5 nm charakterisiert [78]. Bedingt durch die charakteristische Ladungsverteilung der Moleküle resultiert eine um 67 nm versetzte Anordnung (D-Spacing), die in Form von Querstreifungen anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen visualisiert werden kann [34, 83, 84]. Abbildung 2.3 verdeutlicht schematisch die extrazellulären Schritte, beginnend von der Abspaltung der Propeptide bis zur kovalenten Quervernetzung.

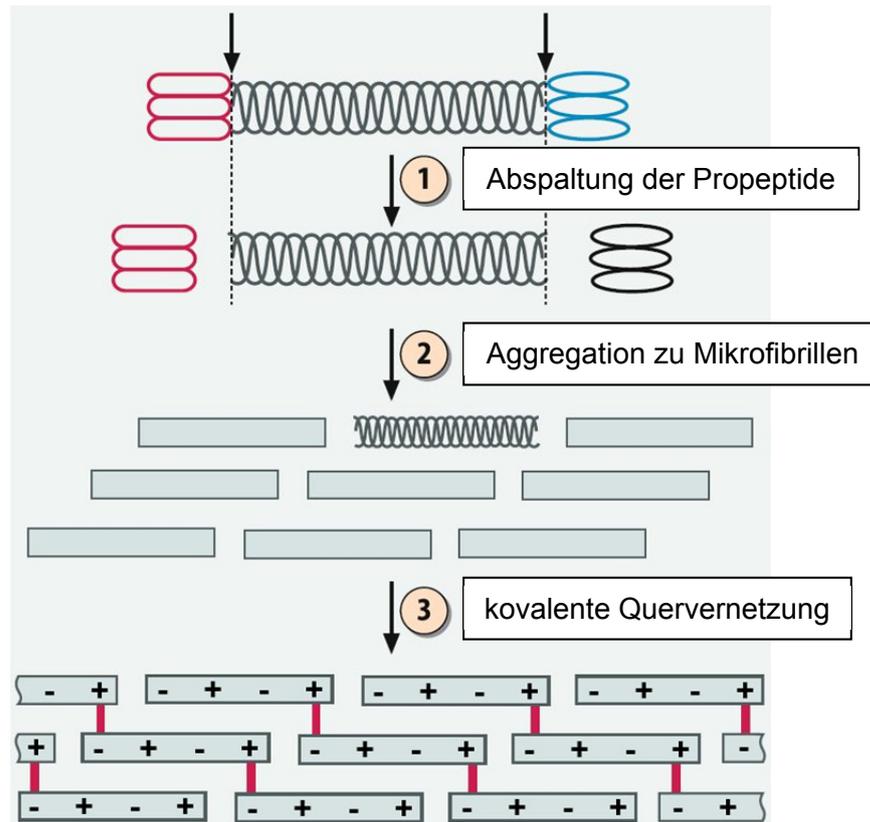


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau der extrazellulären Schritte – von der Abspaltung der Propeptide bis zur kovalenten Quervernetzung (modifiziert nach Löffler et al. [83])

2.2 Sehnenverletzungen und -erkrankungen

2.2.1 Definition

Abakterielle Entzündungen und Erkrankungen der Sehnen werden in der Human- und Veterinärmedizin durch eine Vielzahl von Bezeichnungen beschrieben, die dem Krankheitsbild vielfach nicht hinreichend zugeordnet werden können [85]. In diesem Zusammenhang beschreibt Tendopathie und die oft in der Medizin verwendeten Synonyme Tendinitis, Myotendinose, Tendomyose, Tendoperiostose, Enthesiopathie und Enthesitis Ursachen einer Sehnenentzündung, die eine degenerative Erkrankung hervorruft und durch die Entwicklung von Mikrorupturen gekennzeichnet ist [86, 87].

McIlwraith et al. [88] bezeichnen die Entzündung einer Sehne oder eines mit Paratendineum umgebenen Muskel- und Sehnenansatzes als Tendinitis. Stashak [7] betitelt eine Tendinitis als eine durch Überdehnung hervorgerufene Sehnenentzündung. Als Desmitis definiert er eine Erkrankung des Unterstützungsbandes, eine Entzündung in der

Umgebung einer Sehnenscheide wird als Tendosynovitis deklariert. Sönnichsen [89] spricht im Fall einer Tendinitis als einziger von einer chronischen Ermüdungsschädigung der Sehne und präferiert, wie von zahlreichen Wissenschaftlern gestützt, bei einer einmaligen Überbelastung, die zu einer Läsion führt, das Fachvokabular Tendinose [90, 91, 92, 93, 94, 95]. Schädigungen, die ohne vorausgehende klinische Symptome einhergehen, werden allgemein als Sehnenruptur bezeichnet [91, 96].

2.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Sehnenerkrankungen sind eines der am häufigsten vorkommenden Schädigungsformen des muskuloskeletalen Systems, die Pferde in allen Wettbewerbsdisziplinen, insbesondere im professionellen Leistungssport betreffen [10, 13, 97, 98]. 82 % aller Erkrankungen eines im Wettbewerb aktiven Rennpferdes tangieren das muskuloskeletale System und davon 46 % Sehnen- und Bänderverletzungen [16, 99, 100]. Lam et al. [101] zeigen in einer zwölfjährigen epidemiologischen Studie, dass Sehnenverletzungen die häufigsten Gründe für eine Außerdienststellung von Rennpferden sind. Lediglich 45 - 65 % der an einer Beugesehne erkrankten Pferde können das Niveau ihrer athletischen Funktion vor der Tendinitis wieder erlangen [6, 102, 103, 104, 105].

Außerdem bekunden wissenschaftliche Forschungsaktivitäten über eine Periode von einer Saison, dass an 15 % aller Renn- [16] und Jagdpferde [100] im Training Sehnen- und Bändererkrankungen mit Hilfe von Ultraschall diagnostiziert wurden. Bedingt durch die Lage des Massenmittelpunktes im ventralen und mittleren Drittel des Rumpfes und die aus dem Bewegungsablauf des Tieres resultierenden höheren vertikalen Belastungen [106, 107, 108, 109], geschieht die Hauptanzahl aller Sehnenverletzungen (97 - 99 %) an den vorderen Extremitäten [13, 15, 16, 101] und betrifft eine Ruptur im mittleren Metakarpalbereich der OBS in 75 - 93 % aller Fälle [16, 100]. Die Position des Körperschwerpunktes inmitten des Thorax beruht vorwiegend auf einer in gewisser Entfernung vor den Vorderextremitäten gelagertem Kopf und Hals des Tieres [8].

Estrada et al. [110] konnten einen abweichenden Heilungsverlauf zwischen den vorderen und hinteren Gliedmaßen nach einer definierten Defektsetzung diagnostizieren, ohne eine handfeste Begründung für dieses Phänomen liefern zu können. Verletzungen der TBS und der gemeinsamen Strecksehne im Bereich der distalen Sehnenscheide wurden in wissenschaftlichen Forschungsarbeiten registriert, die Prävalenz ist jedoch unbedeutend [111, 112].

In der Veterinärmedizin werden entstandene Sehnenerkrankungen mit einer Reihe von intrinsischen wie auch extrinsischen Faktoren assoziiert [113]. Akute und chronische

Überbelastungen, Muskelermüdung mit Inkoordination, ungeeignetes Trainingsterrain, verursachte Fehlstellungen durch einen unfachmännischen Beschlag sowie eine hohe Geschwindigkeit des Bewegungsablaufs in der Aufwärmphase des Tieres führen nicht selten zu extrinsischen Sehnenverletzungen [113, 114, 115, 116, 117]. Prädisponierende intrinsische Faktoren, aus denen eine Erkrankung des muskuloskeletalen Systems resultieren kann, sind ein erhöhtes Alter, Übergewicht des Tieres und des Reiters, Aufzucht- und Fütterungsfehler sowie anatomische Einflüsse, wie Fehlstellungen der Extremität oder Längendiskrepanzen [7, 14, 100, 116, 118, 119, 120, 121, 122]. Nach Kannus [123, 124] können eine hohe Körpermasse und körperlich bedingte Gegebenheiten erhöhte Beanspruchungen in den Sehnen hervorrufen und folglich in ihrer Auswirkung auch extrinsischen Faktoren zugeordnet werden. Eine bewegungsarme Lebensweise mit zeitweise besonders hohen körperlichen Anforderungen durch eine Beschäftigungstätigkeit oder sportliche Aktivität kann zu einer erhöhten Rupturwahrscheinlichkeit führen. Der Einfluss des Geschlechts und des genetischen Hintergrunds ist unbekannt, wobei Auswirkungen durch Erbanlagen in Studien postuliert wurden [123, 125]. Gendefekte, die explizit die kollagene Faserbildung sowie den Stoffwechsel des Organismus betreffen, könnten diese Behauptung stützen, obwohl noch kein Mangel festgestellt werden konnte, der auf eine Tendinose zurückzuführen war [126].

Die Akkumulation von Mikrotraumata führt zu einer Veränderung der Zellstruktur, wobei dies nur unzureichend untersucht ist [127]. Zahlreiche Studien sind an der Lokalisation von entzündlichen Markierungen innerhalb des erkrankten Gewebes gescheitert [94, 128]. Dakin et al. [129] und Manning et al. [130] konnten in ihren Arbeiten hingegen eine gewisse Anzahl von entzündlichen Bestandteilen in plötzlich auftretenden Rupturen nachweisen, was zu der Annahme führt, dass Sehnenzellen eine Entzündungskaskade initiieren, die die Heilung des Gewebes fördert [131]. Gestützt werden diese Erkenntnisse von Legerlotz et al. [132], die in rupturierten Achillessehnen das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) und das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) als relevanten Bestandteil einer existierenden Entzündung nachweisen konnten. Ein Anstieg von IL-6 konnte auch in abheilenden Sehnen, zwei Wochen nach der Schädigungseinleitung [133] sowie *in vitro* nach zyklischer Belastung von Sehnenfaszikeln [134], nachgewiesen werden. In der Veterinärmedizin ist die Meinung etabliert, dass Mikrotraumata mit einer Veränderung des Niveaus der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) einhergehen [97, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141]. Dies sind Enzyme, die im aktivierten Zustand für einen Abbau vieler Komponenten der extrazellulären Matrix sorgen können [127]. Insbesondere MMP-3 ist in der Lage Kollagen III, IV, IX und X, Elastin sowie die für die Quervernetzungen unerlässlichen Proteoglykane zu degradieren und weitere MMP zu aktivieren [142]. Riley et al. [143] maßen den Glyko-

saminoglykanegehalt in makroskopisch intakten sowie rupturierten Rotatorenhnenmanschetten und stellten eine Verringerung des GAG-Gehaltes in dem geschädigten Abschnitt fest. Aus diesem Grund müssen Matrix-Metalloproteinasen im Zusammenhang mit einer Schädigungsentstehung im frühen Stadium betrachtet werden [127] sowie ein direkter Zusammenhang zwischen eingeleiteten degenerativen Veränderungen und einer Reduktion des Glykosaminoglykanegehalts geschlossen werden. Paterson-Kane et al. [49] definieren aus ihren Forschungsaktivitäten heraus eine Reduktion des Fibrillendurchmessers als eine Ursache für eine degenerative Veränderung und ein damit verbundenes Mikrotrauma.

Neben akuter Überbelastung oder multiplen Mikrotraumata können degenerative Veränderungen in der extrazellulären Matrix [4] sowie vaskuläre Beeinträchtigungen eine entscheidende Ursache für die Bildung von Sehnen- und Bandverletzungen sein [123, 144, 145, 146, 147, 148, 149]. In unmittelbarem Zusammenhang mit degenerativen Strukturveränderungen der Sehne steht ein Anstieg des Kollagengehaltes vom Typ III, der mit einer Reduktion der Faserdurchmesser und einer Herabsetzung der Zugfestigkeit verbunden ist [4, 57, 58, 150, 151, 152]. Nach Kobayashi et al. [25] ist neben einer Durchmesserreduktion eine pathologische Veränderung an eine Verringerung der Fibrillendichte geknüpft. Avaskularität beeinträchtigt insbesondere bei Gleitsehnen die Rekonvaleszenzzeit nach mehrmaligen Mikrotraumata und ist somit ein wichtiger Einflussfaktor für die Ätiologie von degenerativen Sehnenkrankungen [153, 154]. Eine Abnahme der Blutmengenzirkulation kann eine Folge des Alterns, von Gefäßerkrankungen oder eines Traumas sein, was zu Hypoxie des Gewebes führt und die Lebensfähigkeit der Sehnenzellen reduziert [116]. Ein Zusammenhang zwischen einer chronischen Sehnenentzündung, die mit einem reduzierten Blutfluss und einer verminderten Durchblutung des Gewebes einhergeht, sowie einer Degeneration des Gewebes, vermuten Kannus et al. [155]. Eine reduzierte Versorgung des rupturierten Abschnitts verbunden mit einer eingeschränkten Kollagenbildung wäre die Folge. Doch im scheinbaren Widerspruch zu dieser Theorie zeigen chronische Sehnenläsionen oft eine Steigerung der Durchblutung in den betroffenen Extremitäten sowie eine erhöhte Zellularität [92, 156]. Eine sogenannte angiofibroblastische Hyperplasie [157] ist die Folge und sorgt für eine Erhöhung der Sehnen durchblutung [158, 159]. Ob dies eine Reaktion des tierischen Organismus auf die primäre Schädigung der Sehne ist, ist ungewiss [159]. Jopp [160] konnte in ihren wissenschaftlichen Forschungsarbeiten zahlreiche avaskuläre Sehnenabschnitte aufzeigen. Insbesondere bei Sportpferden, die über einen längeren Wettkampfzeitraum hohen körperlichen Belastungen ausgesetzt sind, können diese Mikrotraumata kumulieren und unter Einwirkung eines Bagatelltraumas zur Ruptur der Sehne führen [124, 154, 161, 162, 163, 164].

Bedingt durch die Gleitreibung in den Sehnenscheiden resultiert eine lokal erhöhte Körpertemperatur in der unmittelbaren Sehnenumgebung von über 42,5 °C, was unter *in vitro* Bedingungen zum Zelltod zahlreicher Fibroblasten geführt hat [153]. Dies beschreibt einen zusätzlichen Einflussfaktor, der eine weitere Degeneration von avaskulärem Gewebe begünstigt.

2.2.3 Therapiemöglichkeiten

Der Heilungserfolg einer zuvor rupturierten equinen Beugesehne ist meist unzureichend [113] und beinhaltet eine Rekonvaleszenzzeit von einem Monat bis hin zu einem Jahr [11]. Der läsionierte Abschnitt wird durch ein unelastisches Narbengewebe, welches die biomechanischen Eigenschaften des Grundgewebes nicht erfüllt [10, 165, 166, 167], ersetzt und bietet dadurch ein hohes Risiko einer erneuten Verletzung [168]. Thornton et al. [169] ermittelten eine Reduktion des Elastizitätsmoduls nach einer sechswöchigen Rekonvaleszenzzeit um 60 %. Nach konservativen Behandlungsmethoden, wie z.B. intra-tendinöse Injektionen, einer Vielzahl von Therapeutika sowie chirurgischen Maßnahmen, wird in Arbeiten von Marr et al. [170] und Dyson [171] berichtet, dass innerhalb von zwei Jahren bis zu 67 % aller revidierten Sehnenerkrankungen an Pferden wiederholt läsionieren. Nach Anwendung der 3-Loop-Pulley-Technik ist die koaptierte Sehne vier bis sechs Wochen postoperativ lediglich fähig ein Drittel der Gewichtskraft des Pferdes ohne erneute Schädigung zu übertragen [172, 173, 174, 175]. Entwickelte Naht-Ankertech-niken zeigen gegenüber der zuvor genannten Verbindungstechnik eine 36 %-ige Zugfestigkeit [176].

Aufgrund dieser hohen Rezidivrate und einer langsamen Sehnenheilung (sechs bis 15 Monate) sind eine Verbesserung des Ersatzgewebes und eine Beschleunigung der Heilung unerlässlich [177]. Regenerative Therapieansätze bieten hingegen die Möglichkeit, erkrankte Sehnenabschnitte durch ein Ersatzgewebe einer intakten Sehne mit vergleichbaren biomechanischen und strukturellen Eigenschaften zu ersetzen [178]. Ergänzt wird dieses Therapieverfahren durch Wachstumsfaktoren, die die Vitalität von Zellen stimulieren und Stammzellen, die Reparaturprozesse koordinieren und unter optimalen Bedingungen zu gewebetypischen Zellen differenzieren [179, 180].

Wachstumsfaktoren können in Form von unterschiedlichen Substraten für die Behandlung genutzt werden:

- *Aus dem Blut abstammende Substrate*

Die Injektion von autologem Vollblut (ABI) in das läsionierte Sehnenareal ergab am

Modelltier Ratte eine Zunahme der Zugfestigkeit von Kniescheibenbändern [181]. Des Weiteren existieren Behandlungserkenntnisse der humanen Epikondylitis [182] und zur Desmitis der Patellarsehne [183]. Eine weitaus größere Konzentration an Wachstumsfaktoren, die einen erfolgsversprechenden Einfluss auf den Heilungsverlauf von Sehnen- und Bandschäden haben, enthält das thrombozytenreiche Blutplasma (PRP) [184]. Mit Hilfe von zahlreichen kommerziell erhältlichen Herstellungskits wird das Plasma aus dem Eigenblut des Patienten gewonnen. Im Zusammenspiel mit implantierten Gewebeträgern sorgt PRP *in vitro* für eine Proteinexpression [185] und hat somit nachweislich einen positiven Einfluss auf einen Heilungserfolg [186, 187].

- *Ersatzgewebe als Gerüstsubstanz*

Nach Injektion in die erkrankte Struktur bieten Gerüstsubstanzen, als Träger für Wachstumsfaktoren und Zellen, in synthetischer sowie biologischer Form, die Möglichkeit das Zellwachstum zu optimieren [178].

- *Stammzellen aus körpereigenen Regionen*

Nixon et al. [188] und Koch et al. [189] beschreiben die Möglichkeit der Andauung von kernhaltigen Zellen, wie Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten, glatten Muskelzellen, Makrophagen und Stammzellen mittels Kollagenase aus der Unterhaut im Bereich der Schweifwurzel. Körpereigene equine mesenchymale Stammzellen können nachweislich aus nahezu allen Gewebeteilen des Körpers, wie aus Knochenmark [190, 191], Unterhautfett [191], Skelettmuskel [192], Periost [193], Synovia [194], Lunge [195], Zähne [196], Haut [197], Blut [198] sowie Knochen [199] isoliert werden und eine Entstehung von Tenozyten induzieren. Nach Hinzunahme von Differenzierungsfaktoren sind Stammzellen *in vitro* in der Lage beispielsweise in Sehnen, Fett-, Muskel- und Bindegewebe zu differenzieren und zur Bildung eines Gewebeersatzes wiederum Zytokine und Wachstumsfaktoren zu produzieren [200, 201, 202].

2.3 Biomechanische Eigenschaften von Beugesehnen

Die Übertragung von Muskelkontraktionen auf das Skelett des Tieres sowie die Gewährleistung von Federungs- und Stützfunktionen setzt eine hohe Belastbarkeit des equinen Bandapparates voraus. In den folgenden Kapiteln werden das statische Verformungsverhalten sowie die bisherigen Kenntnisse des Ermüdungsverhaltens equiner OBS evaluiert.

2.3.1 Verformungsverhalten

Das statische Verformungsverhalten der Sehne ist durch anatomische und material-spezifische Einflüsse gekennzeichnet. Abbildung 2.4 zeigt ein charakteristisches Spannung-Dehnung-Diagramm einer equinen initial intakten OBS.

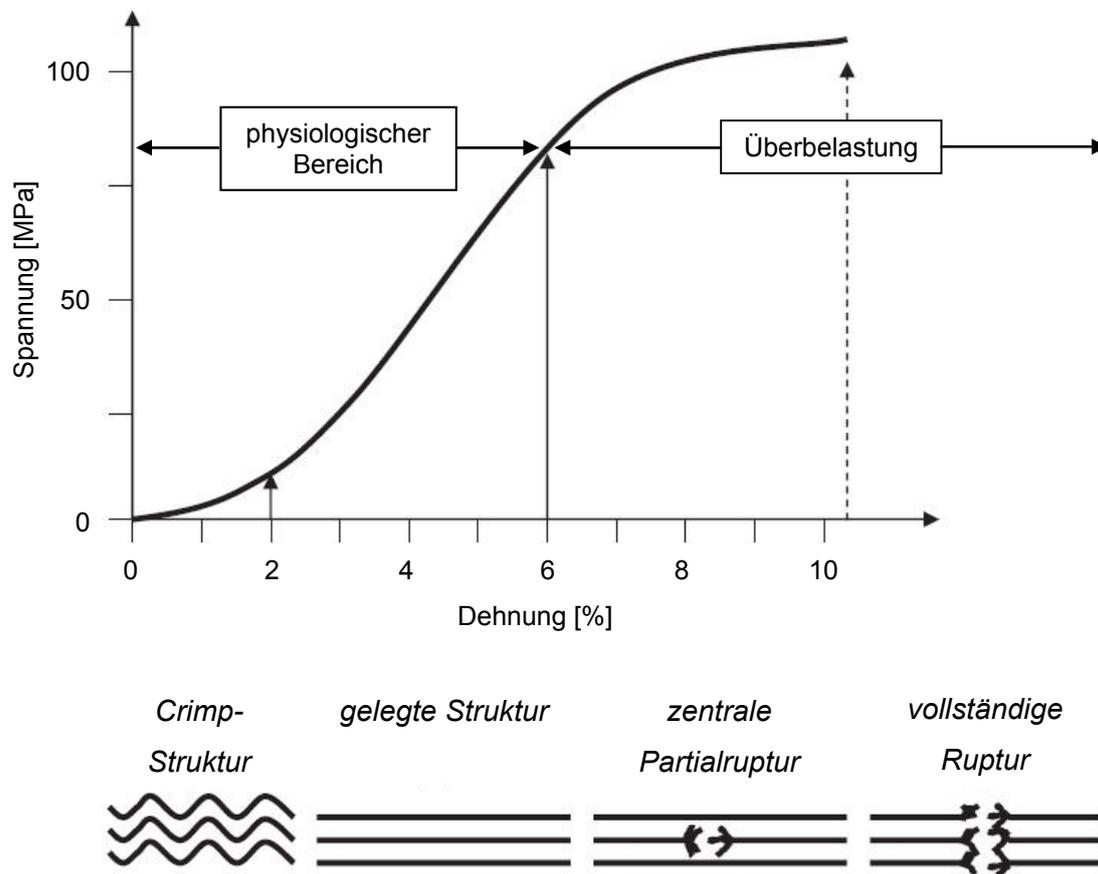


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung eines Spannung-Dehnung-Diagramms einer Sehne (modifiziert nach Arnoczky et al. [203] und Rees et al. [204])

Die *in vitro* biomechanischen Eigenschaften der equinen OBS approximieren einen sigmoidalen Kurvenverlauf [2, 98, 203, 205, 206, 207, 208]. Nach Cribb et al. [61], Diamant et al. [38] und Woo et al. [209, 210] führt eine charakteristische Wellenstruktur der Kollagenfibrillen (Crimp-Struktur) zu einem nichtlinearen, konvexen Verlauf (Toe-Region) des Graphen, bevor ab einer Dehnung von 3 - 4 % eine linear-viskoelastische Phase [211] folgt, in der die zuvor gelegten Fasern einer Streckung unterzogen werden und neben einem elastischen Werkstoffverhalten [212] mit zunehmender Dehnung mikroskopische Schädigungen der Fasern resultieren [36, 41, 164, 210, 213]. Innerhalb der nichtlinearen Toe-Region ist auf mikrofibrillarer Ebene das zuvor beschriebene D-Spacing unverändert, bevor im linearen Abschnitt ein Anstieg von 67 nm auf 69 nm zu verzeichnen ist [214].

Nachdem ein konkaver Übergang mit dem Erreichen der Zugfestigkeit abschließt und partielle Rupturen entstehen, sorgt die Schädigung einer Vielzahl von Kollagenfasern für einen Verlust der Kraftübertragung in dem Gewebe [35, 215, 216, 217, 218]. Riley [116] postuliert, ohne Quellenverweise zu nennen, eine Einleitung der Ruptur vereinzelter Faserbündel ab einer Dehnung von 4 % und einem vollständigen Versagen der Sehne ab einer Längenzunahme von 8 - 12 %. Entgegen der in diesem Kapitel offenbarten Schädigungscharakteristik würde diese Annahme für eine degenerative Gewebeveränderung zu Beginn des linear-viskoelastischen Verformungsverhaltens sprechen.

Im Rahmen wissenschaftlicher Arbeiten wurden *in vitro* in einer Luftumgebung die Zugfestigkeit, Rupturgrenze und –dehnung im Metakarpalbereich bestimmt. Tabelle 2.1 zeigt zusammenfassend die *in vitro* ermittelten Kennwerte einer equinen OBS.

Tabelle 2.1: Darstellung der *in vitro* gemessenen biomechanischen Materialkennwerte einer equinen OBS

Zugfestigkeit	Rupturgrenze	Rupturdehnung	Quelle
96 MPa*	12,36 ± 1,33 kN	12,5 ± 1,7 %	Crevier et al. [207]
116 ± 21 MPa	-	10,9 ± 1,4 %	Jansen et al. [219]
65 ± 4,1 MPa	7,5 ± 0,9 kN	17,3 ± 1,2 %	Dowling et al. [208]
128,1 ± 74,7 MPa	12,38 ± 2,49 kN	17,7 ± 3,9 %	Thorpe et al. [220]
57,5 ± 9,6 MPa	6,65 ± 1,38 kN	15,0 ± 1,6 %	Gerard et al. [221]
110 ± 33 MPa	-	13,1 ± 2,0 %	Batson et al. [72]
-	-	12,3 %	Riemersma et al. [216]
-	13,6 kN	21 %	Wilson et al. [206]

*Wert aus dem Quelldiagramm abgelesen

Die Wichtigkeit des Umgebungsmediums nahe des Einspannungssystems wird von Wang et al. [222] mit ihren Untersuchungen an Kängurusehnen verdeutlicht. Die Schädigungseinleitung dehydrierter Sehnen geschieht in unmittelbarer Nähe der Klemmung. Außerhalb der physiologischen Umgebung zeigen Untersuchungen an equinen TBS ein unterschiedliches Spannung-Dehnung-Verhalten in verschiedenen Zonen entlang der Sehnenlängsachse und verdeutlichen einen versprödungsbedingten Anstieg der Steifigkeit im direkten Einspannungsumfeld [223].

In vivo Untersuchungen während des Bewegungsablaufs des Pferdes verdeutlichen im Galopp eine Belastung der OBS nahe des physiologischen Grenzwertes [2]. In Abhängigkeit von der Gangart wurden nachfolgend aufgelistete Messwerte ermittelt (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Darstellung der *in vivo* wirkenden Belastungen einer equinen OBS in Abhängigkeit von der Gangart

Belastung	Dehnung	Gangart	Quelle
844,8 N	2,19 - 4,60 %	Schritt	[224, 225, 226, 227, 228]
6,9 kN	4,15 % (ungeritten) - 10,1 % (geritten)	Trab	[225, 226, 229]
-	9 % - 16,6 %	Galopp	[225, 230, 231]

Haut [232] und Noyes et al. [233] beschreiben die täglichen Aktivitäten in einem Belastungsbereich innerhalb der Toe-Region bis hin zum Beginn des linearen Abschnitts. Dieses Erkenntnis wird von Viidik [41] gestützt. Er beziffert eine geringe messbare Schädigung oberhalb des ersten Belastungsdrittels. Butcher et al. [234] bestimmten das Belastungskollektiv während des Schritts, Trabs und leichten Galopps an dem equinen oberflächlichen und tiefen Beuger und ermittelten eine maximale Belastung von $6,6 \pm 0,5$ kN.

2.3.1.1 Anatomische Gegebenheiten

Abbildung 2.4 verdeutlicht die Auswirkungen struktureller Einflüsse auf das Verformungsverhalten einer equinen OBS. Die Bestimmung der wellenartigen Anordnung der Kollagenfibrillen im unbelasteten Zustand wird in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten charakterisiert und im Verlauf dieses Kapitels detailliert betrachtet. Abbildung 2.5 illustriert schematisch den Wellenverlauf und die zur Beschreibung unerlässlichen Kennwerte, wie den Crimp-Winkel θ sowie die virtuelle Crimp-Länge L_v und reale Crimp-Länge L .

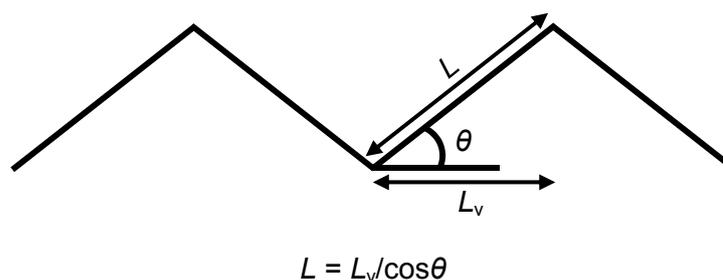


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Crimp-Struktur (modifiziert nach Patterson-Kane et al. [49])

Bei der Betrachtung des zentralen sowie peripheren Sehnenareals im transversalen Schnitt wurden je nach Alter und Trainingszustand abweichende Crimp-Strukturen lokalisiert. Wilminck et al. [235] ermittelten bei ihren Untersuchungen an equinen OBS lediglich im fortgeschrittenen Alter des Tieres einen verringerten Crimp-Winkel im zentralen Seh-

nenareal. Bei Jungtieren war zwischen den betrachteten Abschnitten ein geringfügig höherer zentraler Crimp-Winkel zu verzeichnen. Patterson-Kane et al. [32, 49, 236] kamen in ihren Arbeiten in zahlreichen Untersuchungen zu der Erkenntnis, dass bei Jungtieren sowie bei Pferden, die außerhalb des Turnierbetriebs aktiv sind, im zentralen Areal ein höherer Crimp-Winkel herrscht. Die im Rahmen dieser Studien erzielten Messergebnisse waren mit einer großen Streuung verbunden, was die Wissenschaftler auf abweichende Probenvorbereitungen und Versuchsdurchführungen zurückführten [49]. Tabelle 2.3 illustriert zusammenfassend die mit Hilfe der Durchlicht-Polarisationsmikroskopie nach dem Verfahren von Diamant et al. [38] an einer equinen OBS erzielten Crimp-Winkel und -Längen.

Tabelle 2.3: Übersicht der charakteristischen Crimp-Struktur einer equinen OBS in Abhängigkeit des Alters und Trainingszustandes des Tieres

Parameter an der untersuchte Position				Probenfixierung	Zustand	Quelle
zentral		peripher				
θ	L	θ	L			
20,1 ± 2,0 ° 12,2 ± 2,6 °	17,0 ± 3,0 µm 11,0 ± 1,9 µm	19,6 ± 2,0 ° 17,1 ± 1,6 °	19,2 ± 2,1 µm 14,9 ± 1,4 µm	ohne Angabe einer definierten Belastung	Jungtier Alttier	Wilmink et al. [235]
14,6 ± 0,6 ° 10,5 ± 0,7 °	23,0 ± 1,2 µm 17,9 ± 2,4 µm	13,2 ± 0,5 ° 12,7 ± 0,4 °	21,2 ± 1,3 µm 20,3 ± 2,4 µm	in 812 Resin fixiert und mit Ethanol dehydriert	Jungtier Alttier	Patterson-Kane et al. [32]
4,7 ± 0,1 ° 5,3 ± 0,1 °	24,5 ± 2,7 µm 33,2 ± 1,0 µm	5,6 ± 0,1 ° 4,6 ± 0,1 °	28,4 ± 1,3 µm 29,6 ± 3,2 µm	in Formalin und anschließend in Wachs fixiert	trainiert untrainiert	Patterson-Kane et al. [49]
11,2 ± 0,3 ° 11,0 ± 0,3 °	20,9 ± 0,4 µm 20,8 ± 0,4 µm	12,3 ± 0,3 ° 11,3 ± 0,3 °	21,4 ± 0,5 µm 21,3 ± 0,5 µm	in DPX nach Dehydrierung fixiert	trainiert untrainiert	Patterson-Kane et al. [236]

Mit Ausnahme der Arbeit von Wilmink et al. [235] wurden in den präsentierten Untersuchungen die Fasersegmente dehydriert und alle Faszikel für eine Bestimmung der Crimp-Struktur in einem undefinierten Belastungszustand belassen.

Ein verringerter Crimp-Winkel im zentralen Areal sorgt bei Belastung der Sehne für eine höhere Beanspruchung der Fibrillen in dieser Zone und für ein früheres Erreichen der Elastizitätsgrenze [235], woraus Sehnenschädigungen im Kern (Kernläsionen) resultieren [49, 237, 238]. Abbildung 2.6 verdeutlicht diesen Zusammenhang schematisch.

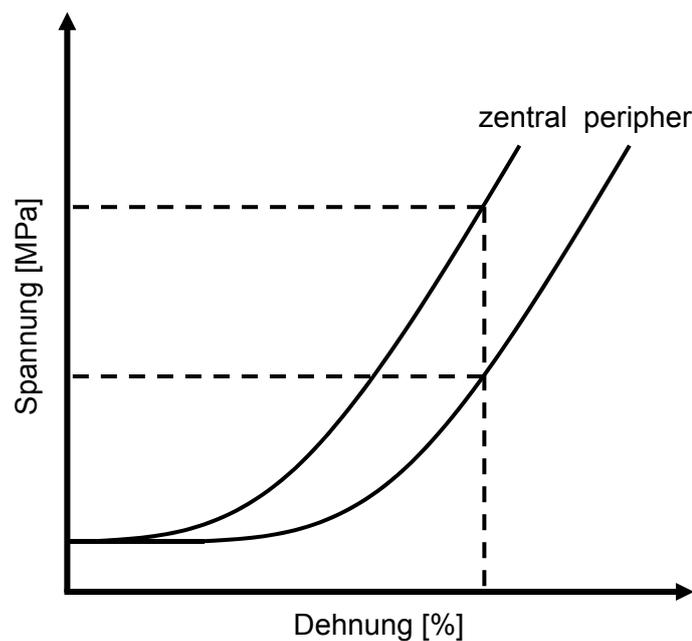


Abbildung 2.6: Spannung-Dehnung-Kurve des zentralen und peripheren Areals einer Kollagenstruktur (modifiziert nach Wilmlink et al. [235])

Patterson-Kane et al. [236] zeigen in ihrer Veröffentlichung eine identische Annahme der Winkelabhängigkeit auf das Verformungsverhalten, weshalb diese Grafik nicht zusätzlich aufgeführt wird.

Nach Wilmlink et al. [235] begünstigt eine Verringerung der zentralen Crimp-Länge zusätzlich eine Degeneration des Gewebes im Zentrum [212] und sorgt mit fortgeschrittenem Alter des Tieres für eine Zunahme der Dehngrenze der Toe-Region. Wood et al. [239] schildern eine alleinige Abhängigkeit der Schädigungsposition von dem Crimp-Winkel. *In vitro* Untersuchungen an Rattensehnen zeigen unter Einwirkung von zyklischen Belastungen bis zum konkaven Verformungsabschnitt eine Reduktion der Crimp-Länge [240, 241]. Außerhalb von biomechanischen Versuchsreihen zeigen Ermüdungsversuche an synthetischen Fasern, die über die Toe-Region hinaus belastet wurden, eine Reduktion des Crimp-Winkels [241].

2.3.1.2 Materialspezifische Eigenschaften

Neben den im vorherigen Kapitel vorgestellten anatomischen Gegebenheiten einer equinen OBS, existieren materialspezifische Eigenschaften, die das Verformungsverhalten der Sehne maßgeblich beeinflussen.

Im Gegensatz zu isotropen, metallischen Werkstoffen, bei denen eine Querkontraktionszahl von $\nu = 0,33$ [242] zur Beschreibung des elastischen Verformungsverhaltens her-

angezogen wird, sorgt eine Volumenabnahme der fibrillaren Kollagenstrukturen, mit Ausnahme des Gelenkknorpels, unter Zugbelastung für eine Poissonzahl von $\nu > 0,5$ [243]. Eine Auflistung der bestimmten Querkontraktionszahlen von Typ I und Typ II Kollagenstrukturen in Zug- und Druckversuchen ist aus Übersichtlichkeitsgründen in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Übersicht der charakteristischen Querkontraktionszahlen verschiedener Kollagenstrukturen

Querkontraktionszahl ν	Kollagenstruktur	Belastungsart	Quelle
0,15 - 0,20	Boviner Gelenkknorpel	Druckbelastung	Jurvelin et al. [244] Kiviranta et al. [245]
0,16	Boviner Gelenkknorpel	Druckbelastung mittels Mikroindenter	Miller et al. [246]
0,45	Humaner Gelenkknorpel	Druckbelastung	Hayes et al. [247]
0,5 - 1,6	Dura mater spinalis	Uniaxiale Zugbelastung	Persson et al. [248]
0,6 - 1,9	Humaner Patellarknorpel	Zugbelastung	Elliot et al. [249]
0,8 \pm 0,3	Faszikel eines Rattenschwanzes	Druckbelastung	Cheng et al. [250]
1,2	Gelenkknorpel	Zugbelastung	Edelsten et al. [251]
2,0 \pm 1,9	Kapselband	Zugbelastung	Hewitt et al. [252]
2,98 \pm 2,59	Bovine Beugesehne	Zugbelastung	Lynch et al. [253]
4	Sehnfaszikel	Zugbelastung	Reese et al. [254]

Screen et al. [255] untersuchten auf mikrostruktureller Basis die fibrillare Struktur unter Einwirkung einer Zugbelastung. Dabei wurde die Dehnung der Fasern maßgeblich durch Gleitvorgänge zwischen den Fibrillen und nicht alleine durch die Extension dieser beeinflusst. Lynch et al. [253] beziffern eine Zunahme der Querkontraktionszahl mit steigender Dehnung und begründen dies mit einer sich legenden Crimp-Struktur und einer damit verbundenen Querschnittsverringering. Neben strukturbedingten Einflüssen wird eine Flüssigkeitsausscheidung während des Dehnvorgangs als möglicher Einflussfaktor für eine Volumenabnahme betitelt [256, 257, 258], wobei ein makroskopisch sichtbarer Flüssigkeitsverlust in gezielt durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden konnte [251, 259]. Vielmehr wird durch einen messbaren Gewichtsverlust auf das zuvor beschriebene Phänomen geschlossen [260]. Zusätzlich zu einem Verlust von Materie können Geometriefaktoren für eine hohe Poissonzahl der Sehne verantwortlich sein. Forschungsarbeiten an faserbasierten Verbundwerkstoffen zeigen den Einfluss zweier mikrostruktureller Fasergeometrien auf die Querkontraktionszahl. Ein Einflussfaktor ist durch die Kreuzung zahlreicher Faserfamilien unter nicht-orthogonaler Anordnung zueinander gegeben [261], wobei morphologische Untersuchungen an biologischem Fasergewebe ein paralleles Ar-

rangement nachweisen konnten [262]. Es konnten jedoch auch vereinzelt helikale Strukturen von Fasern und Fibrillen im Verbund nachgewiesen werden, die ein Querkontraktionsvermögen maßgeblich beeinflussen würden [263, 264, 265, 266].

In statischen Versuchsreihen wurde neben der Rupturgrenze, -dehnung und der Zugfestigkeit als weiterer materialspezifischer Kennwert die Steifigkeit (Elastizitätsmodul) ermittelt. In diesem Zusammenhang muss zwischen der Betrachtung des vollständigen Verbundgewebes und der Bestimmung der E-Moduln der Einzelkomponenten Fibrille sowie extrazelluläre Matrix differenziert werden.

Der Elastizitätsmodul einer equinen OBS wurde in statischen Versuchsreihen an Luft wie folgt bestimmt:

Tabelle 2.5: Übersicht des charakteristischen Elastizitätsmoduls einer equinen OBS

Elastizitätsmodul E	Quelle
1000 - 1282 MPa	Riemersma et al. [216]
1086 ± 261 MPa	Batson et al. [72]
1189 ± 63 MPa	Crevier et al. [207]
$1217 \pm 199,4$ MPa	Thorpe et al. [220]
1440 ± 220 MPa	Gillis et al. [267]

Zur Bestimmung der Elastizitätsmoduln der Einzelkomponenten innerhalb des Sehnenverbunds muss die Kollagenstruktur in ihre Bestandteile separiert werden. Zahlreiche Forschungsarbeiten verdeutlichen durch eine breite Streuung der Messergebnisse die Problematik der Charakterisierung dieser Kennwerte. Tabelle 2.6 listet die ermittelten Elastizitätsmoduln für die Hauptbestandteile, die Kollagenfibrille und die umhüllende Extrazellulärmatrix auf.

Tabelle 2.6: Übersicht der charakteristischen Elastizitätsmoduln der Fibrille und der Extrazellulärmatrix in Abhängigkeit von der Kollagenstruktur

Elastizitätsmodul E		Kollagenstruktur	Quelle
Fibrille	Extrazellulärmatrix		
-	0,1 MPa	Bandscheibe	Leahy et al. [268]
-	0,25 MPa	Rattenschwanzsehnen	Ault et al. [269]
32 MPa	-	Humane Fibroblasten	Graham et al. [270]
50 - 70 MPa	8 MPa	Meniskus	Whipple et al. [271]
89 MPa (dehydriert) 500 MPa (hydriert)	-	Humane Patellasehne	Svensson et al. [272, 273]
170 MPa	-	Meniskus	Fithian et al. [274]
200 - 500 MPa	-	Bovine Achillessehne	van der Rijt et al. [275]
400 MPa	-	Fibrille	Sasaki et al. [276]
550 MPa	-	Seegurke	Eppell et al. [277]
2 GPa	-	Berechnungsannahme	Redaelli et al. [29]
5 GPa	-	Berechnungsannahme	Chan et al. [278]
5 ± 2 GPa	-	Bovine Beugesehne	van der Rijt et al. [275]
5 - 11,5 GPa	-	Fibrille eines Rattenschwanzes	Wenger et al. [279]

Um den Geometrieinfluss durch die Crimp-Struktur nicht in die Berechnung des Elastizitätsmoduls einfließen zu lassen, wird in allen aufgelisteten Publikationen der Tangentenmodul, anliegend an den linear-viskoelastischen Verlauf, dem Sekantenmodul vorgezogen und beispielhaft in [221] aufgetragen.

Batson et al. [72] erzielten in ihren Untersuchungen an equinen OBS und der gemeinsamen Strecksehne keine Korrelation zwischen dem Kollagengehalt und der Steifigkeit des Prüflings. Des Weiteren war keine Steifigkeitsvariation mit zunehmendem Alter zu verzeichnen. Dem gegenüber stehen die Erkenntnisse von Woo et al. [280] sowie Hinchcliff et al. [281], die im Vergleich der gemeinsamen Strecksehne und der Beugesehnen einen proportionalen Zusammenhang zwischen dem Kollagengehalt und dem Elastizitätsmodul herausstellen konnten. Angel et al. [282] ergründen eine Ungleichverteilung des transversalen Kollagengehaltes innerhalb einer Rattenschwanzfaser ohne explizit einen Bezug zu dem Elastizitätsmodul hergestellt zu haben. Abbildung 2.7 verdeutlicht den strukturellen Aufbau der Kollagenfaser im transversalen Querschnitt, welche eine um den Kern angelegte Ringanordnung von abwechselnd hoher und niedriger Dichte beinhaltet.

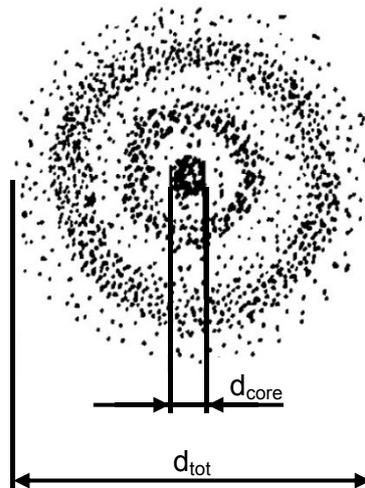


Abbildung 2.7: *Transversale Verteilung des Kollagengehaltes innerhalb einer Faser (modifiziert nach Angel et al. [282])*

Die Gestaltung des Modells illustriert mehrere Ringabschnitte verschiedener Kollagen-dichten angeordnet um den zentralen Kern der Faser. Erkenntnisse von Kjaer et al. [283] veranschaulichen anhand von Untersuchungen an humanen Athleten nach einer dreistündigen Trainingseinheit einen reversiblen Anstieg des Kollagengehaltes bis 48 Stunden nach Beendigung der Belastung.

Gillis et al. [267] erzielten in ihren Untersuchungen einen ansteigenden Elastizitätsmodul bis zu einem Alter des Tieres von 15 Jahren bevor die Steifigkeit abfällt. Studien an der humanen Achillessehne, dem menschlichen Pendant zur equinen OBS, bestätigen diese Erkenntnisse [284, 285]. Goh et al. [286] verdeutlichten dieses Phänomen anhand von Versuchen an Schwanzsehnen von Mäusen. Im Rahmen dieser Forschungsaktivität wurde an transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen die Flächenverteilung von Kollagenfasern zur Matrix evaluiert. Dabei wird ein direkter Zusammenhang zwischen einem Anstieg des raumfüllenden Fibrillenanteils und einer Zunahme des Elastizitätsmoduls deutlich.

Das in diesem Kapitel beschriebene altersabhängige Werkstoffverhalten führt nach Rooney et al. [238] zu einer Tendinitis bei Jungtieren, da diese eine vollständige Sehnenreife verbunden mit dem Erlangen der biomechanischen Belastbarkeit noch nicht erreicht haben.

2.3.2 Ermüdungsverhalten

In den vorherigen Kapiteln wurden das Verformungsverhalten unter statischer Belastung und die daraus abgeleiteten Materialkennwerte definiert. Im realen Bewegungsablauf

des Tieres sorgen jedoch zeitlich veränderliche zyklische Belastungen für eine Akkumulation von Mikrotraumata innerhalb der Sehne, die im Gegensatz zu einer einmaligen Überbelastung primär eine Schädigung hervorrufen [135, 287, 288]. Innerhalb des lebenden Organismus haben Sehnen die Möglichkeit zu regenerieren, wobei die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei einer Ungleichheit von Schädigung und Rekonvaleszenz bei repetitiven Belastungen ansteigt [289].

Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Materialermüdung an kollagenhaltigen Gewebestrukturen leistete Rigby [290] mit seinen Untersuchungen an Rattenschwanzsehnen im Jahr 1964. Innerhalb einer salinen Atmosphäre konnte im Rahmen von mehreren hundert Zyklen das Ermüdungsverhalten bei lediglich geringen Lastspielzahlen ergründet werden. Abbildung 2.8 zeigt zwei Kraft-Dehnung-Verläufe in dehnung- und kraft geregelter Versuchsdurchführung.

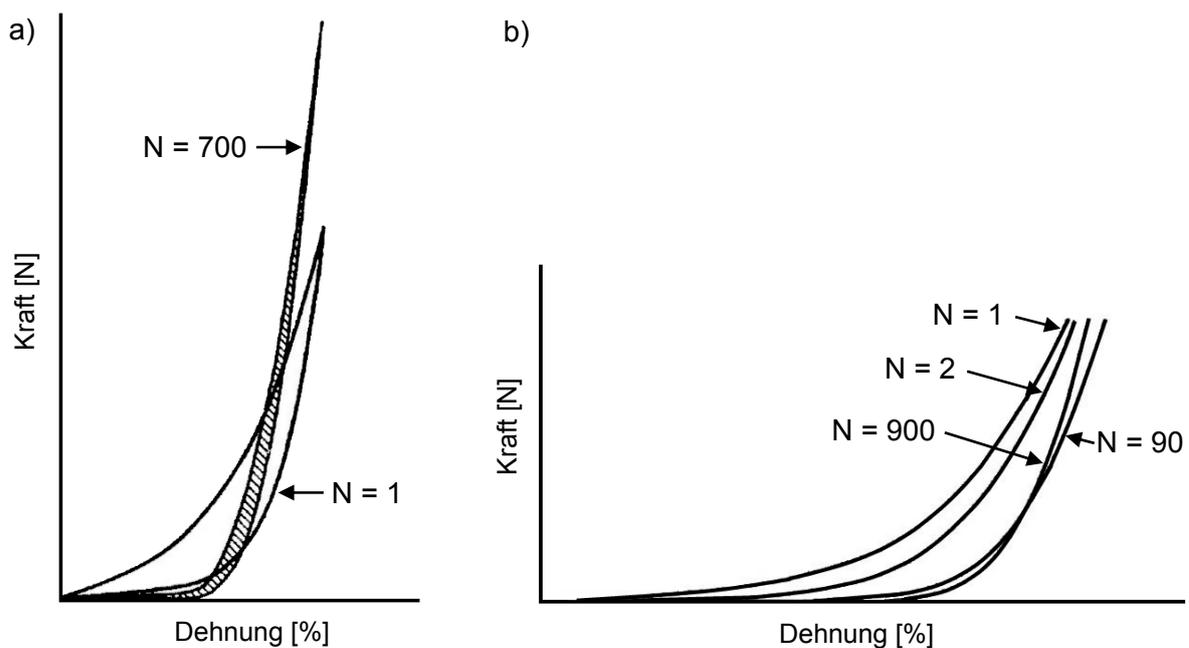


Abbildung 2.8: a) Kraft-Dehnung-Hystereseschleifen und b) Kraft-Dehnung-Kurven von Rattenschwanzsehnen bei charakteristischen Zyklenzahlen (modifiziert nach Rigby et al. [290])

Die Versuchsauswertung verdeutlicht einen Anstieg des Elastizitätsmoduls und der Kraft mit zunehmender Zyklenzahl, wobei die Versuchsproben nicht bis zur Ermüdung belastet wurden. Chimich et al. [291] untersuchten die Auswirkung einer zyklischen Belastung auf den Flüssigkeitsgehalt der viskoelastischen Kollagenstruktur am Modelltier Kaninchen. Innerhalb einer phosphatgepufferten Salzlösung reduziert sich der Flüssigkeits-

gehalt des medialen Kollateralbands um 5 % nach lediglich 50 Zyklen. Weitere kraftgeregelte Ermüdungsversuche von Thornton et al. [258] an Kaninchensehnen führten nach 30 Zyklen zu einem Flüssigkeitsverlust von 4 %. Eine Erholungsphase von 20 min innerhalb einer Flüssigkeitsumgebung sorgt für eine vollständige Regeneration des Flüssigkeitsgehalts auf den Ausgangszustand vor Versuchsbeginn.

Der Spannungshorizont wird in Anlehnung an die zuvor bestimmte sowie meist aus der Literatur bekannte Zugfestigkeit der untersuchten Sehne beziehungsweise der Faszikel bestimmt. Dieser ist zwischen 10 - 90 % der Zugfestigkeit definiert [292, 293, 294, 295]. Aufgrund der im Vergleich zu metallischen Werkstoffen größeren Dehnungen ist die Prüffrequenz meist auf 1 - 4 Hz begrenzt [292, 293, 294, 295, 296, 297].

Eine Auswirkung der Umgebungstemperatur, in der sich der Prüfling befindet, auf das Ermüdungsverhalten von Kängurusehnen wurde von Wang et al. [222] untersucht. In ihren Untersuchungen erzielten sie in zyklischen Versuchsreihen eine deutlich höhere Lebensdauer in einer Umgebung bei Raumtemperatur, als in einer dem tierischen Organismus angepassten Umgebung von 37 °C.

Eine Veränderung der Sekantensteifigkeit über die Zyklenzahl und eine daraus resultierende Einteilung in drei charakteristische Ermüdungsphasen wurde von Fung et al. [298, 299] anhand von Versuchsreihen an Zehenbeugern einer Ratte (siehe Abbildung 2.9) und Shepherd et al. [300] mit Hilfe von Faszikeln humaner und boviner Beuge- und Strecksehnen beschrieben.

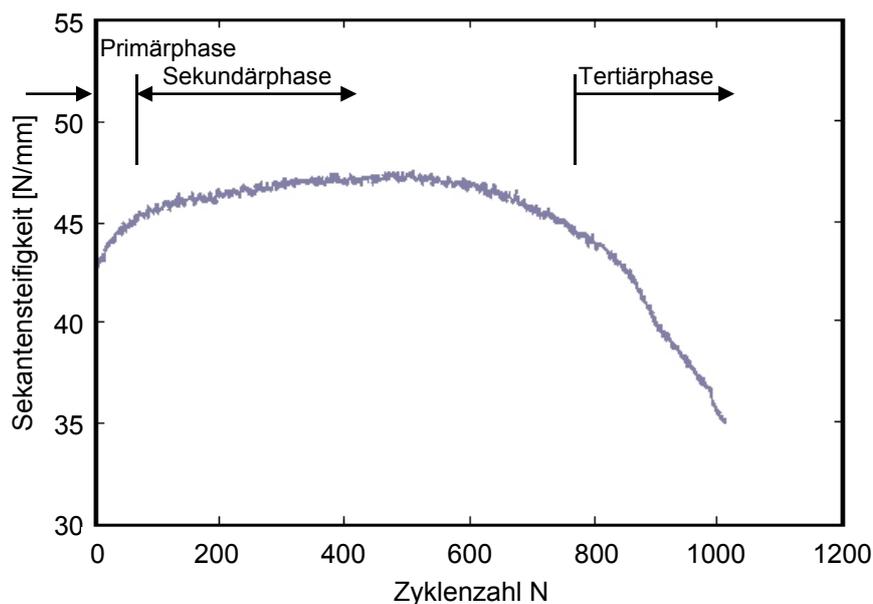


Abbildung 2.9: Einteilung der Sekantensteifigkeit des Zehenbeugers einer Ratte in drei charakteristische Phasen (modifiziert nach Fung et al. [298])

Die Primärphase ist durch einen Anstieg der Steifigkeit bis zu einem konstanten Verlauf der Sekundärphase gekennzeichnet, bevor die Tertiärphase bis zur Ruptur der Sehne, verbunden mit einer Entfestigung, den Versagensabschnitt der Struktur einleitet. Dieses charakteristische Werkstoffverhalten wird von weiteren wissenschaftlichen Arbeiten gestützt. Thornton et al. [301] zeichnen Hystereseschleifen in den ersten 30 Zyklen einer vom Kaninchen abstammenden Beugesehne auf und sind mit einer gemessenen Steifigkeitszunahme im Einklang mit den zuvor beschriebenen Erkenntnissen. Wren et al. [296] beschränkten sich bei der Definition des Steifigkeitsverhaltens ebenfalls auf die Betrachtung des Sekantenmoduls. Mit Hilfe dieses Kennwertes ist eine Steifigkeitszunahme in einem zweistelligen Lastspielbereich nicht zu verzeichnen. Weisbecker et al. [302] modellierten das zyklische Verformungsverhalten an der Gewebestruktur einer Aorta im Bereich der Toe-Region und verweisen auf den aus dem Bereich der Polymere bekannten Mullins-Effekt. Dieser beschreibt eine Entfestigung innerhalb der ersten Lastspielzahlen, die in einer kraftgeregelten Versuchsdurchführung durch eine Dehnungszunahme im konvexen Abschnitt des Spannung-Dehnung-Diagramms zu vernehmen ist [303, 304], wobei eine explizite Begründung für dieses Materialverhalten nur postuliert werden kann [305]. Dieses Materialverhalten unterscheidet sich maßgeblich von der in Abbildung 2.8 a) dargestellten Verfestigung mit zunehmender Zyklenzahl einer Rattenschwanzsehne.

Abbildung 2.10 verdeutlicht in einer dehnungsgeregelten Versuchsdurchführung schematisch anhand von Hystereseschleifen die Entfestigung eines Elastomers in den ersten drei Belastungszyklen.

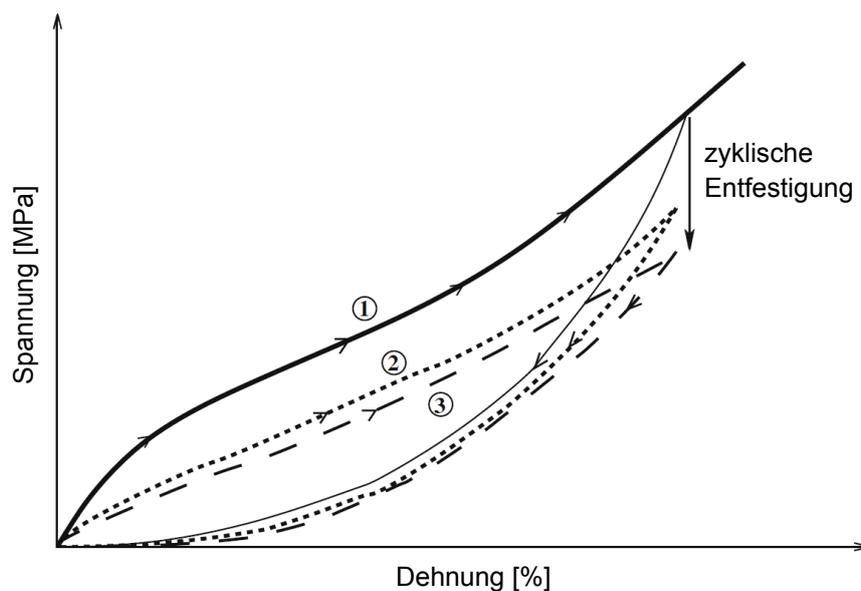


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung des mechanischen Verformungsverhaltens von Elastomeren (modifiziert nach Cantournet et al. [303])

Bei einem gewissen Temperatureinfluss und unter Zuhilfenahme von Lösungsmitteln sowie einer mehrwöchigen Erholungsphase konnte ein partial reversibles Materialverhalten an rußhaltigen Kautschukmischungen nachgewiesen werden [306, 307, 308]. Ein gewisser Schädigungseffekt ist jedoch nach einer geringen Zyklenzahl nicht auszuschließen [305]. Harwood und Payne [308, 309] postulieren anhand ihrer wissenschaftlichen Arbeiten an Kautschukstrukturen, die polysulfide Quervernetzungen zwischen den Polymermolekülen aufweisen, einen möglichen Verlust dieser für die Festigkeit relevanten Verknüpfungen. Peña et al. [310, 311, 312] unterstützen ein Vorhandensein des Mullins-Effektes bei faserigen Biomaterialien im Zusammenhang mit einer Entfestigung und integrieren diesen in ihre Schädigungsbetrachtung.

Die Ermüdungsschädigung äußert sich in einer Verringerung des Rückstoßvermögens der Sehne, das durch die gegebene Federwirkung der Crimp-Struktur charakterisiert wird. Mikrostrukturelle Veränderungen sind in Form von interfibrillaren Delaminationen sowie durch sichtbare Knicke in dem Faserverlauf zu erkennen [298, 299, 313, 314]. Abbildung 2.11 illustriert diese sichtbare Strukturschädigung.

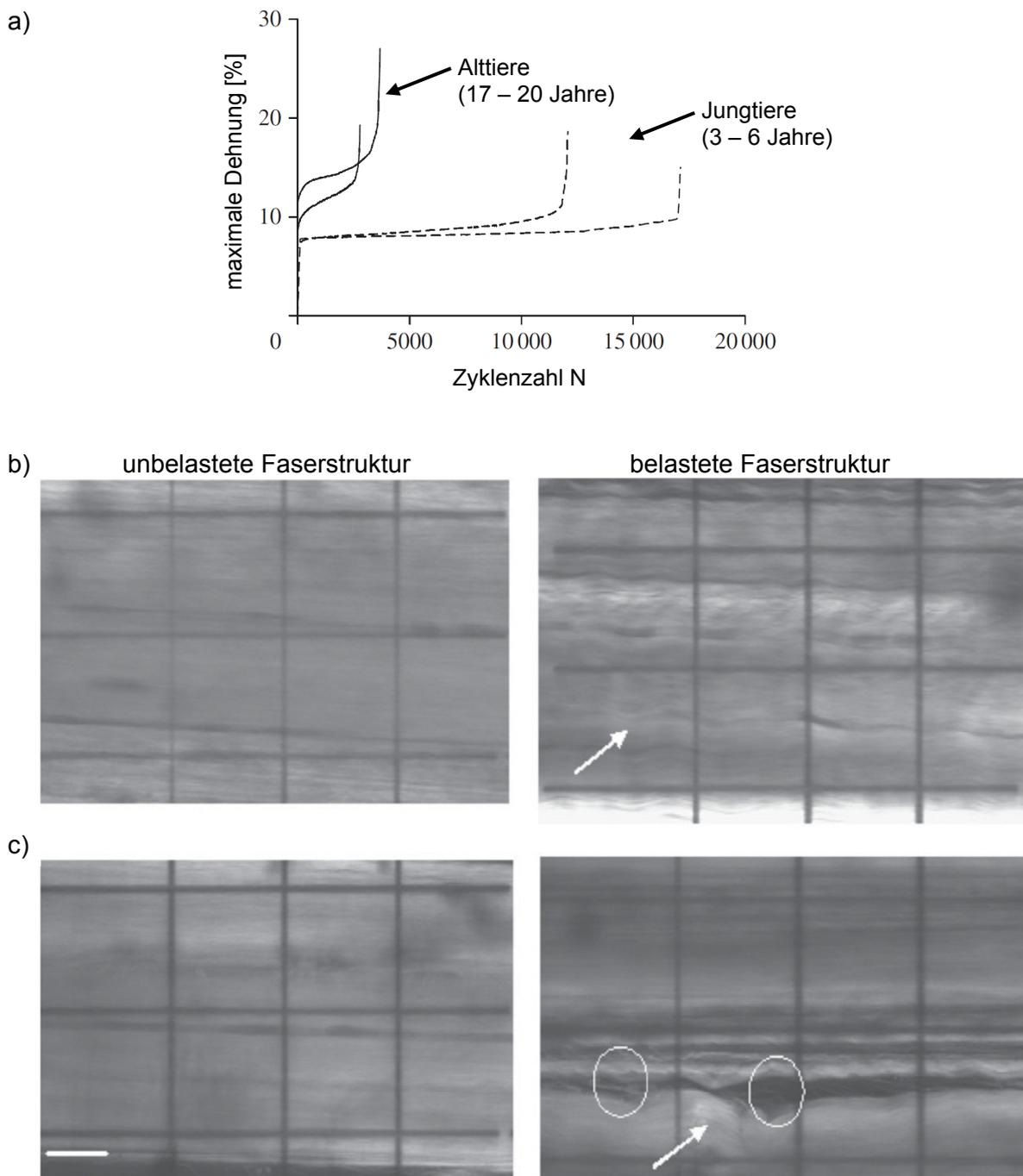


Abbildung 2.11: a) Wechselverformungskurve und b) konfokale Bilddarstellung von zyklisch belasteten Faszikeln einer equinen OBS der Jungtiere sowie c) der Alttiere (modifiziert nach Thorpe et al. [314])

Der Autor differenziert bei seiner Ergebnisdarstellung innerhalb der Rasse das Alter des Tieres. Die Gruppe der 3 – 6 jährigen Probanden zeigt eine deutlich längere Lebensdauer gegenüber der 17 – 20 jährigen Versuchsgruppe. Die interfibrillaren Aufweitungen (Kreise) und insbesondere die Knickungen der Fasern (Pfeile) sind verstärkt bei einem fortgeschrittenen Alter zu verzeichnen.

Shepherd et al. [292] führten kraftgeregelte Ermüdungsversuche (60 % R_m) bei einer Frequenz von 1 Hz an einzelnen Faszikeln boviner Beugesehnen durch und erhielten die in Abbildung 2.12 erzielten Verläufe.

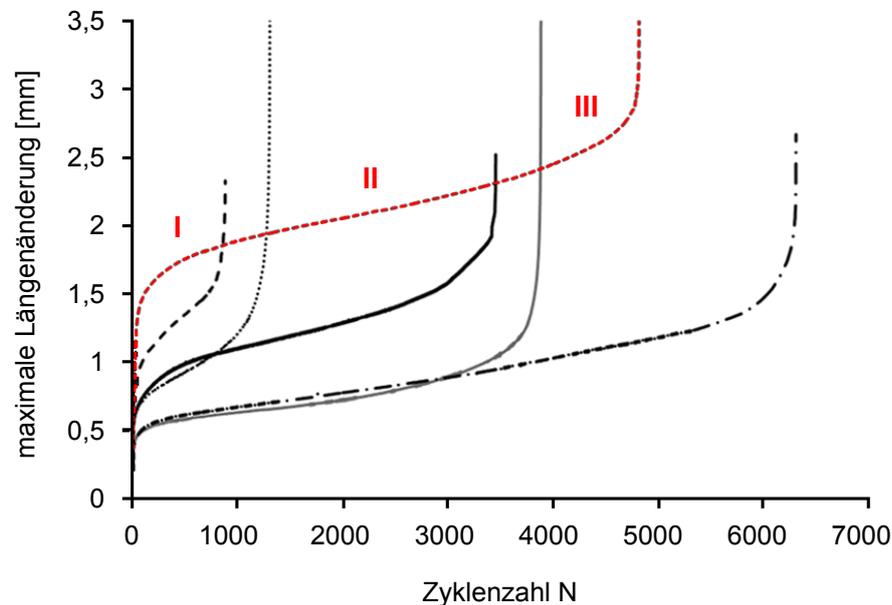


Abbildung 2.12: Darstellung der maximalen Längenänderung von Faszikeln einer bovinen Beugesehne unter zyklischer Belastung (modifiziert nach Shepherd et al. [292])

Die zyklischen Versuchsreihen wurden bei einer Maximalbelastung von 36,6 % der Zugfestigkeit der bovinen Beugefaszikel durchgeführt. Die Kurvenverläufe zeigen eine Einteilung in drei Phasen, die beispielhaft anhand einer rot eingefärbten Verformungskurve illustriert werden. Die Primärphase (I) ist durch einen konkaven Kurvenverlauf gekennzeichnet, bevor ein linearer Abschnitt die sekundäre Phase (II) beschreibt. Partialrupturen leiten die konvex verlaufende tertiäre Schädigungsphase (III) ein, die mit einer vollständigen Ruptur des Kollagengewebes abschließt [292].

Bei einer zyklischen Belastung von 25 % der Zugfestigkeit der Faszikel (25 % R_m) zeigen konfokale Darstellungen nach lediglich 300 Lastspielen Knickungen der bovinen Fibrillen sowie interfibrillaren Aufweitungen nach 900 Zyklen, die als Bestandteil einer Schädigung im frühen Stadium bezeichnet werden [292, 293] (siehe Abbildung 2.13).

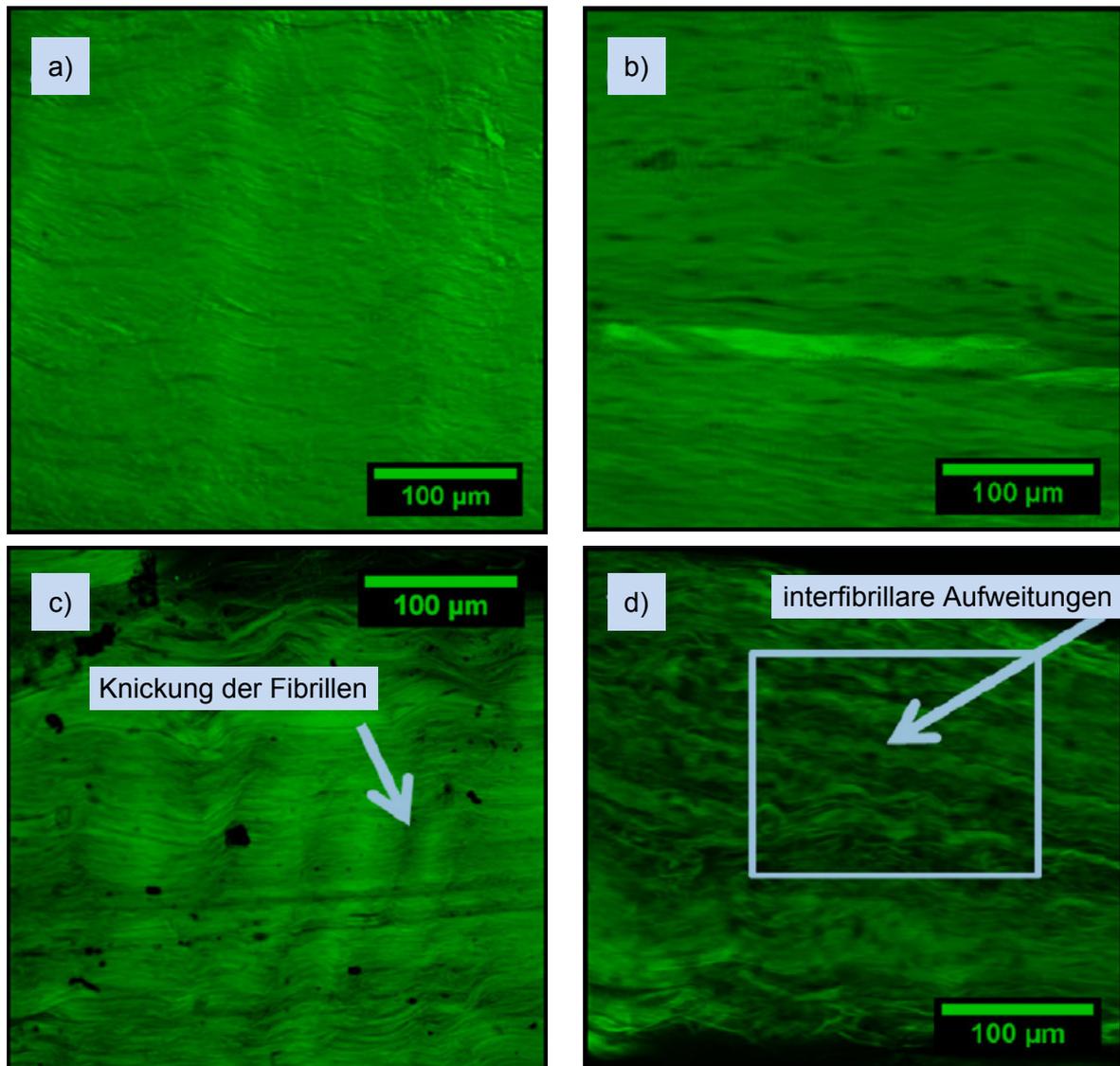


Abbildung 2.13: Konfokale Bilddarstellung von zyklisch belasteten Faszikeln einer bovinen a), c) Streck- und b), d) Beugesehne nach a), b) 0 Lastspielen sowie c) 300 Lastspielen und d) 900 Lastspielen (modifiziert nach Shepherd et al. [293])

Fung et al. [298] postulieren auf der Grundlage ihrer Erkenntnisse schematisch die Schädigungsmechanismen einer Sehne unter einer zyklischen Belastung. Abbildung 2.14 verdeutlicht auf mikrostruktureller Ebene die Schädigungsmorphologie in vier Prozessschritten.

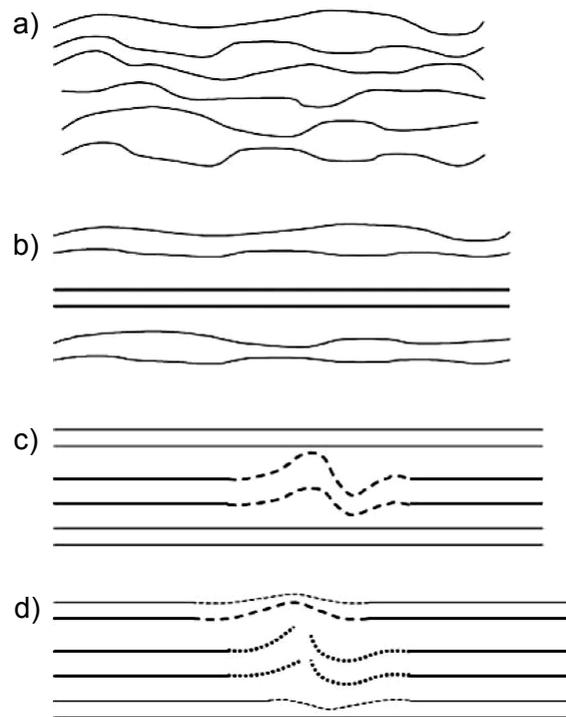


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der Schädigungsmechanismen bei einer Sehnenermüdung [298]

Eine Muskelkontraktion bewirkt eine Dehnung der zuvor unbelasteten Kollagenfasern (siehe Abbildung 2.14 a)) und je nach Winkelbeschaffenheit ein vollständiges Legen der Struktur einzelner Fasern (siehe Abbildung 2.14 b)). Bei fortschreitender Kontraktion überschreiten lokale Populationen von Kollagenfasern die elastische Dehngrenze, was aufgrund des irreversiblen Verformungszustands in einer druckspannungsbedingten Knickung der Fasern resultiert (siehe Abbildung 2.14 c)). Die nun plastisch verformten Strukturen sind mit einer erhöhten Rupturanfälligkeit verbunden und sorgen somit für eine Schädigungseinleitung (siehe Abbildung 2.14 d)).

Wie in Kapitel 2.2.2 angedeutet, bewirkt eine andauernde zyklische Belastung eine histochemische Beeinträchtigung der Gewebestruktur, insbesondere im Bereich der extrazellulären Matrix. Thorpe et al. [127] konnten in ihren Ermüdungsversuchen an equinen Faszikeln einer OBS zusätzlich zelluläre Veränderungen detektieren. Konfokale Bilddarstellungen (siehe Abbildung 2.15) zeigen eine belastungsbedingte Veränderung im Erscheinungsbild der Zellen nach einer vorangegangenen Behandlung mit einem Fluoreszenzfarbstoff.

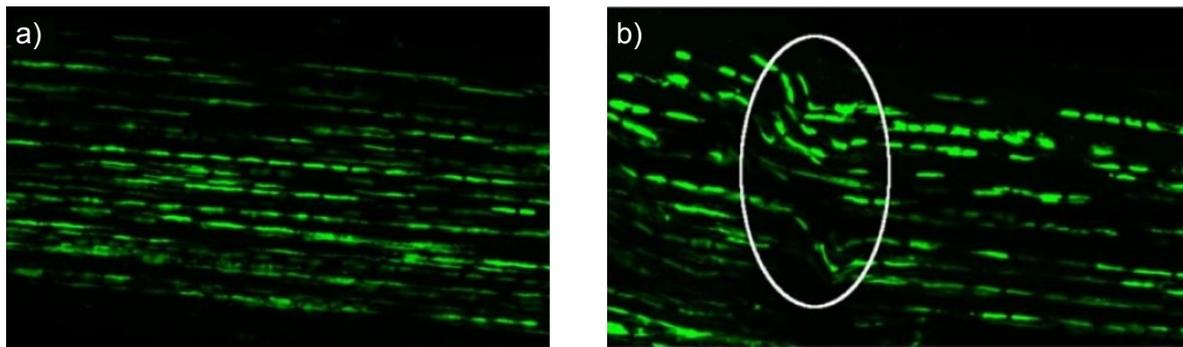


Abbildung 2.15: Konfokale Bilddarstellungen zeigen die Zellen im a) unbelasteten Zustand und b) nach einer Belastung der Sehne [127]

Die zwischen den Fasern befindlichen Tenozyten werden durch die Matrixschädigung freigelegt und durch den daraus resultierenden Strukturverlust nicht mehr belastet, woraus eine Transformation in eine rundliche Form resultiert. Der mit einer Entzündung verbundene Anstieg des Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) und des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) konnte innerhalb dieser Versuchsreihen sowie in weiteren wissenschaftlichen Arbeiten unter zyklischer Belastung ebenfalls nachgewiesen werden [134].

2.4 Bildgebende Verfahren zur Untersuchung der Strukturzustände

Es existieren zahlreiche Verfahren in der Medizin, um die Strukturveränderungen des Gewebes sowie Anomalien im Körper bildgebend zu diagnostizieren. Neben der Magnetresonanztomographie (MRT) [315, 316] und der Röntgentechnik [317] ist die Ultraschalldiagnostik ein seit Jahren bewährtes Analyseverfahren. Für Detailuntersuchungen an einzelnen Sehnenfasern bietet die Durchlicht-Polarisationsmikroskopie mit ihrem deutlich höheren Auflösungsvermögen Vorteile.

2.4.1 Ultraschalldiagnostik

Die Ultraschalldiagnostik ist ein weltweit etabliertes [170, 318, 319], non-invasives bildgebendes Verfahren zur Untersuchung der Sehnenstruktur nach einer Erkrankung und während des Heilungsprozesses [320, 321, 322, 323]. Ein Ultraschallsystem bietet Klinikern und Wissenschaftlern gleichermaßen die Möglichkeit die Integrität sowie Schädigung einer equinen OBS anhand eines B-Bild-Sonogramms (B-Mode) qualitativ und subjektiv zu bewerten [324, 325, 326]. Bei dem verwendeten Impulseechoverfahren werden piezoelektrische Kristalle durch hochfrequente Impulse zur Aussendung von mechanischen, gleichfrequenten Longitudinalwellen angeregt und nach der Reflektion am zu untersuchenden Medium zum Empfang des Echos genutzt. Die Intensität der reflektierten, emit-

tierten und absorbierten Energieanteile führt unter Hinzunahme der Fresnelschen Gleichungen nach einer EDV-Verarbeitung zu einem mit unterschiedlichen Grauschattierungen charakterisierbaren Sonogramm. Die Graustufenverteilung erstreckt sich von einer schwarzen Pixeldarstellung bei einer vollständigen Transmission sowie Absorption der emittierten Schallwellen (Anechogenität) bis hin zur völligen Reflexion (Hyperechogenität), was als weiße Farbdarstellung auf dem Sonogramm erkennbar ist. Aus diesem Grund werden die ausgesendeten Ultraschallwellen in Flüssigkeiten oder Luft bedingt durch fehlende Impedanzdifferenzen nicht reflektiert und im Gegensatz zu äußeren Hüllschichten, wie beispielsweise dem Epitendineum, im Sonogramm schwarz dargestellt [327, 328].

Die echogenen Eigenschaften der Sehne resultieren aus der Präsenz von parallelen und linear-hyperechogenen Strukturen, ausgelöst durch die kohärente Reflexion an den Übergängen der interfaszikulären Matrix zu den Fasern [325, 329, 330]. Im Fall einer Läsion führen Strukturveränderungen der interfaszikulären Matrix sowie der Kollagenfaserdichte zu einer Reduktion der Echogenität bis hin zum vollständig anechogenen oder hypoechogenen Verhalten [328, 331].

Abbildung 2.16 zeigt ein transversales und longitudinales Sonogramm einer Tendonitis an einer OBS in einem equinen Bandapparat. Deutliche Kontinuitätsunterbrechungen und ein daraus resultierender Hohlraum, häufig mit Flüssigkeitsansammlungen im Rupturbereich, bietet für die vom Schallkopf ausgesendeten Ultraschallwellen keine Reflektionsmöglichkeit, weshalb der Defekt als läionierte, anechogene Zone gekennzeichnet ist [332, 333].

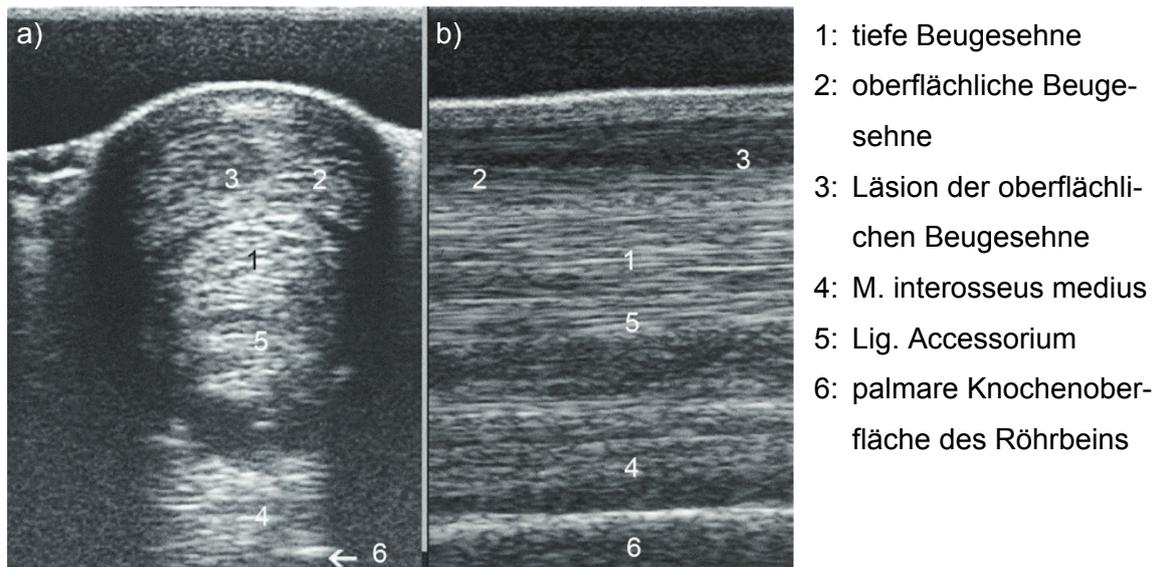


Abbildung 2.16: Sonogramme einer zwei Monate alten Tendinitis der OBS. a) Transversales Sonogramm (rechts: medial), b) longitudinales Sonogramm (rechts: distal) [327]

Eine korrekte Detektion und Interpretation der Sonogramme ist nur unter strengster Einhaltung definierter Vorgaben gegeben. Transversale und longitudinale Projektionen des untersuchten Objektes werden durch eine quer und längs zur Faserrichtung positionierte Ultraschallsonde erreicht [334]. Dabei ist kontinuierlich auf einen orthogonal zum Faserverlauf ausgerichteten Schalleintritt zu achten [327, 329, 335, 336]. Die Verwendung eines modernen Linear-Schallkopfs erleichtert die Darstellung und macht den Einsatz einer Vorlaufstrecke teilweise überflüssig [337]. Nach Nicoll et al. [338] ist nicht nur die Handhabung des Ultraschallsystems für eine zufriedenstellende Interpretation der Sonogramme entscheidend, sondern zusätzlich ein in Längsrichtung konstant belastetes Gewebe, um eine parallele Anordnung der Fasern zu gewährleisten. Um die Lage des lokalisierten Defektes beschreiben zu können, existiert eine definierte Zoneneinteilung, angefangen am proximalen Muskelanschlusspunkt der Sehne (Level 1A) bis zum distalen Kontaktpunkt am Gleichbein (Level 3C).

Mit Hilfe dieser Zuteilung kann auch *in vitro* das läsierte Sehnenareal eindeutig positioniert werden. Neben der Lage des Defektes sind bei der Durchführung und Auswertung des Beschallungsvorgangs unter anderem folgende Einflüsse einzubeziehen:

- Die vordefinierte *Schallfrequenz* bestimmt maßgeblich das Auflösungsvermögen, welches nach Frey und Sohn [339] den Mindestabstand zwischen zwei Strukturen definiert, sodass deren Existenz noch als zwei getrennte Elemente in dem Sonogramm dargestellt werden kann. Ein Anstieg der Frequenz hat eine Erhöhung des

Auflösungsvermögens bei gleichzeitiger Zunahme der Dämpfung (Absorptionseffekt) der Schallwellen im Gewebe zur Folge [340, 341]. Bei der Darstellung tieferer Strukturen wird auf niedrigere Frequenzen und einem damit verbundenen geringeren Auflösungsvermögen zurückgegriffen, um diesen Absorptionseffekt zu vermindern [327, 339]. Für die Nahfeldbeschallung werden in unmittelbarer *in vitro* Umgebung und am lebenden Objekt Frequenzen zwischen 7,5 und 10 MHz für eine optimale sonographische Darstellung empfohlen [328, 342, 343].

- Bei der Interpretation von Ultraschallbildern müssen verfälschende Artefakte, die aus Diskrepanzen zwischen idealisierten Annahmen der Bildverarbeitung und wellenmechanischen Gegebenheiten resultieren, berücksichtigt werden. Zu den relevantesten Ultraschallartefakten gehören in der Praxis *Schallschatten* sowie *Bildrauschen*. Schallschatten entstehen aufgrund von distaler Schalldämpfung bis hin zur vollständigen Auslöschung an Grenzflächen mit hohen Impedanzunterschieden, sodass eine echofreie Zone an tiefer liegenden Strukturen entsteht [327, 340, 344, 345]. Um Bildrauschen und damit verbundene überlagernde hyperechogene Erscheinungen während der Ultraschalluntersuchung zu unterbinden, sollte die Signalverstärkung einen für die Darstellung ausreichenden Wert annehmen [327, 345].

Nach Glatzel et al. [327] ist unter Beachtung dieser Einflussfaktoren der Schädigungsgrad der läsierten Sehne charakterisierbar. Tabelle 2.7 schildert die Beschreibungsmöglichkeiten mit Hilfe der Echogenität und der Parallelität der Faserausrichtung. Der prozentuale Anteil der geschädigten Sehnenfläche gemessen an der Gesamtfläche veranschaulicht eine messbare Schädigungsbeschaffenheit.

Tabelle 2.7: Bewertungsmöglichkeiten des Ausmaßes einer Sehnenläsion [327]

Grad	Echogenität	Parallelität der Faserausrichtung	Prozentualer Schädigungsanteil	
0	homogene Echogenität (Isoechogen)	75 - 100 %	bis 15 %	geringgradiger Sehnen Schaden
1	geringgradig hypoechogen	50 - 75 %	15 - 25 %	mittelgradiger Sehnen Schaden
2	mittelgradig hypoechogen (je 50 % echogen / anechogen)	25 - 50 %	über 25 %	hochgradiger Sehnen Schaden
3	überwiegend anechogen	0 - 25 %		

2.4.2 Durchlicht-Polarisationsmikroskopie

Das vorherige Kapitel verdeutlicht die klinische Relevanz der Sonographie für eine zuverlässige Beurteilung defektbehafteter Sehnenareale. Die Durchlicht-Polarisationsmikroskopie ermöglicht die Darstellung einzelner Kollagenfasern im Verbund zur Beschreibung der Crimp-Struktur sowie möglicher Schädigungsmechanismen [32, 49, 235, 236]. Die Sehne fungiert aufgrund ihres optisch anisotropen Aufbaus als doppelbrechendes Medium zwischen zwei in ihrer Durchlassrichtung orthogonal angeordneten Polarisationsfiltern. Diese für biologische Materialien typische Brechungscharakteristik hat zur Folge, dass nach einer Lichtdurchschreitung der Kollagenstruktur nur noch zwei senkrecht zueinander orientierte Schwingungsebenen vorhanden sind. Jene ordentlichen sowie außerordentlichen Wellenzüge treffen in einer um 45° zur Polarisationssebene gedrehten Anordnung auf den Analysator, der neben einer Abschwächung der Intensität für eine konstruktive Interferenz der beiden Wellenzüge sorgt und eine Darstellung der Sehnenstruktur ermöglicht.

Zur Beschreibung des Crimp-Winkels wird das aus der Mineralmikroskopie bekannte Prinzip der Auslöschungsschiefe angewendet. Pionierarbeit auf dem Gebiet der Darstellung der Crimp-Struktur eines biologischen Gewebes leisteten Diamant et al. [38] mit ihren polarisationsmikroskopischen Untersuchungen an Rattenschwanzsehnen. Diese wissenschaftliche Arbeit diente als Grundlage für alle in den Folgejahren durchgeführten Forschungsaktivitäten im Bereich der Strukturcharakterisierung von tierischen Sehnen [32, 49, 235, 236].

Der in diesem Verfahren bestimmte Auslöschungswinkel τ bildet den Winkel zwischen einer morphologisch definierten Bezugsrichtung und der bei einem Durchtritt des Lichtes durch das doppelbrechende Medium erlangten Schwingungsrichtung [346]. Abbildung 2.17 illustriert die für die nachfolgende Beschreibung der Crimp-Struktur notwendige Achsendefinition.

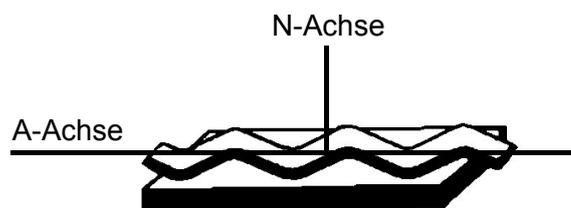


Abbildung 2.17: Schematische Darstellung des Verlaufes der Crimp-Struktur unter Angabe der Rotationsachsen A und N (modifiziert nach Diamant et al. [38])

Für eine zuverlässige Winkelbestimmung wird der Mikroskopisch nach vorheriger Zentrierung um die Normale der Faserausrichtung (N-Achse) rotiert, bis die morphologische Bezugsrichtung der Sehne parallel zu der Ausbreitungsrichtung des Polarisators oder des Analysators orientiert ist. Dieser am Nonius der Winkelanzeige des Mikroskopisches abzulesende Wert beschreibt die Nulllage, in der, bedingt durch die Parallelstellung, der betrachtete Faserabschnitt die geringste Lichtintensität aufweist. Ausgehend von dieser Nulllage entsteht durch Rotation der Probe entlang der N-Achse eine durch die Topografie der Sehne bedingte Veränderung der Lichtintensität bis hin zur vollständigen Auslöschung einzelner Crimp-Abschnitte. Diese Auslöschung resultiert aus der Deckung der optischen Bezugsrichtung mit der Orientierung der Durchlassrichtung des Analysators [346]. Bedingt durch die senkrecht aufeinander stehenden Schwingungsrichtungen des anisotropen Mediums resultieren durch eine Rotation der Probe jeweils vier Orientierungen mit Auslöschung sowie Interferenzcharakteristik.

Abbildung 2.18 verdeutlicht die durch eine Interferenz und Auslöschung entstehenden sichtbaren sowie abgedunkelten Faserstrukturen.

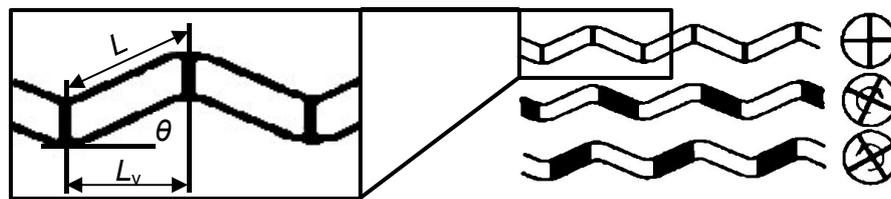


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung des Rotationseffektes entlang der N-Achse für $\theta = 0$, $\theta > 0$ und $\theta < 0$ (modifiziert nach Diamant et al. [38])

Dieses symmetriebehaftete Erscheinungsbild kennzeichnet den zweiten am Nonius des Mikroskopisches abzulesenden Winkelwert, deren Differenz unter Hinzunahme des Nulllagenpendants den Crimp-Winkel ergibt [38].

2.5 Tissue Engineering

Die Regeneration eines partial rupturierten Sehnengewebes ist, aufgrund der geringen Blutversorgung, ohne äußere Behandlungsmethoden mit einer langen Rekonvaleszenzzeit verbunden [347, 348]. Insbesondere für große Sehnendefekte bietet das Tissue Engineering (TE), in Verbindung mit einer Stammzelltherapie, eine hervorragende Aussicht auf eine erfolgreiche Rekonstruktion der erkrankten Sehnenstruktur [349, 350, 351, 352, 353]. Abbildung 2.19 illustriert schematisch das Prinzip der Gewebezüchtung.

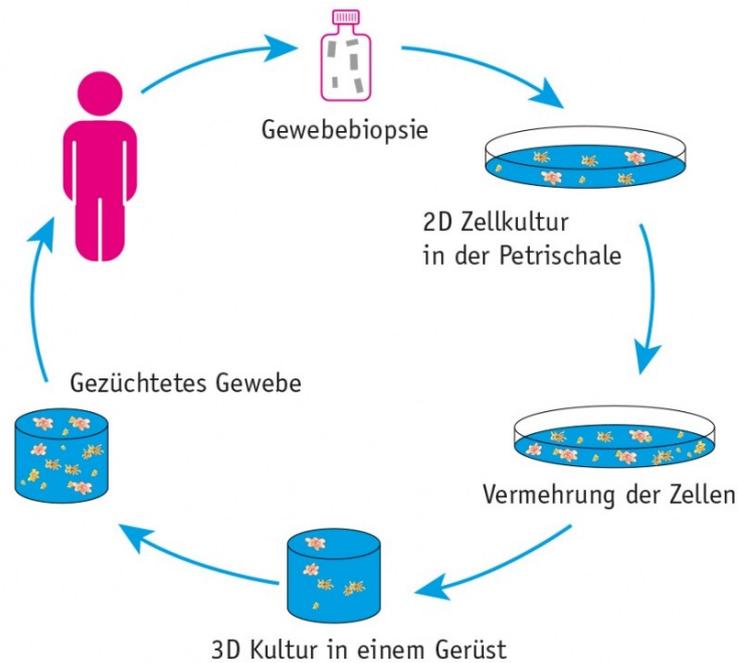


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung des Prinzips der Gewebezüchtung [354]

Das in der Gewebebiopsie gewonnene üblicherweise körpereigene (autologe) Zellmaterial wird zur Gewebezüchtung verwendet. Aus der Gewebeprobe werden die Zellen isoliert, vermehrt und nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl auf ein zuvor dezellularisiertes Fasergerüst gesät und zu einem Ersatzgewebe kultiviert [355].

Teebken et al. [354] klassifizieren drei Methoden des Tissue Engineering. In der in Abbildung 2.19 schematisch dargestellten klassischen Variante werden Zellen expandiert und zuvor dezellularisierte Matrizen besiedelt, um ein empfangbares Gewebe für den Patienten zu generieren. Im Falle des *Guided Tissue Engineering* werden zellfreie Trägerstrukturen implantiert und *in vivo* rebesiedelt. Ein selektiver Zelltransfer bietet als kennzeichnende dritte Variante autologen, allogenen oder xenogenen Zellpräparationen die Möglichkeit topisch den Heilungsverlauf der degenerierten Gewebesubstanz zu fördern.

2.5.1 Dezellularisierung und die Anwendbarkeit auf biologisches Gewebe

In der regenerativen Medizin steigt die Akzeptanz des Einsatzes eines dezellularisierten Fasergerüsts, abstammend von einem entnommenen Sehnenabschnitt eines Spendertiers [356]. Biologische Fasergerüste, erzeugt aus dezellularisiertem Gewebe und Organen, konnten in präklinischen Tierstudien sowie in humanen klinischen Applikationen erfolgreich angewendet werden [357, 358, 359, 360, 361, 362, 363]. Extrazelluläre Matrizen von einer Vielfalt an Geweben, einschließlich Herzklappen [364, 365, 366, 367, 368,

369, 370], Blutgefäße [371, 372, 373, 374], Haut [375], Nerven [376, 377], skeletalen Muskeln [378], Sehnen [352, 379, 380, 381, 382, 383, 384], Bänder [385], Dünndarm-Submukosa (SIS) [386, 387, 388], Harnblase [358, 389, 390] und Leber [391] konnten für eine Applikation im Rahmen des Tissue Engineering und der regenerativen Medizin genutzt werden. Es existieren zahlreiche Dezellularisierungsverfahren, beginnend bei physikalischen über chemischen bis hin zu enzymatischen Methoden, die im Zusammenhang mit einer variierenden Spenderspezies eine Vielzahl von Behandlungsmöglichkeiten zur Förderung des Heilungsverlaufes definieren [355, 356, 392]. Jede dieser Variablen beeinflusst die Beschaffenheit sowie die Ultrastruktur der extrazellulären Matrix und beeinträchtigt das Wirtsgewebe infolge des implantierten rebesiedelten Fasergerüsts.

Sehnen und Bänder sind aufgrund ihrer vergleichsweise einfachen Anatomie und ihrer häufigen Verwicklung in die muskuloskeletale Pathologie ein wichtiges Ziel für eine Behandlung mittels Tissue Engineering. Bevor das dezellularisierte Fasergerüst in das rupturierte Sehnenareal implantiert werden kann, muss das Spendergewebe von den nativen Zellen befreit werden, um eine Krankheitsübertragung sowie eine mögliche Entzündungsreaktion zu vermeiden und das Risiko einer Abstoßung, hervorgerufen durch das Immunsystem des Empfängers, zu verhindern [357, 379, 392]. Die Wichtigkeit bei der Entwicklung von biologischem Ersatzgewebe besteht in der Gestaltung eines Fasergerüsts, welches möglichst eine naturgetreue Nachbildung der ursprünglichen Kollagenstruktur, insbesondere seiner biomechanischen Eigenschaften, darstellt [393].

Da im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit der Dezellularisierungsprozess mit Hilfe von Triton X-100 durchgeführt wurde, wird in Kapitel 2.5.2 im Bereich der chemischen Behandlungsmethode explizit auf die prozessbedingten Strukturveränderungen dieses nicht-ionischen Detergens eingegangen. Dieses ist ein in der Literatur etabliertes Tensid zur Durchführung einer Dezellularisierung von biologischem Gewebe [392], da es in Verbindung mit Frost-Tau-Zyklen nach dem Rebesiedelungsprozess für eine bessere Zellverteilung sorgt [394]. Die Expositionsdauer dieser chemischen Behandlungsmethode in das Gewebe variiert zwischen mehreren Stunden und bis zu 14 Tagen [358, 372, 379, 385, 391, 395, 396].

2.5.2 Prozessbedingte Strukturveränderungen nach der Anwendung des Dezellularisierungsprozesses

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben existiert eine Vielzahl von möglichen Dezellularisierungstechniken, die physikalische, chemische und enzymatische Behandlungsmethoden sowie Kombinationen von diesen Verfahren beinhalten. Die erstgenannte Methode

umfasst die Zerstörung der Zellmembran aufgrund eines Gefriervorganges [397, 398, 399, 400, 401, 402] sowie einer mechanischen Belastung [389, 391]. Alle genannten Prozessschritte, die einen Verlust der Zellen verursachen, sorgen für eine Veränderung der nativen dreidimensionalen Architektur der extrazellulären Matrix [392]. Chemische Behandlungsmethoden sorgen für eine Denaturierung der Proteine und Auflösung der Zellelemente sowie anlässlich einer Veränderung der Nukleinsäuren RNA und DNA für eine Ruptur der Zellen [403, 404]. Neben den genannten negativen Auswirkungen hat die Anwendung des nichtionischen Tensids Triton X-100 einen Verlust der Glykosaminoglykane zur Folge [352, 366, 405]. Weitere Untersuchungen an biologischem Gewebe nach der Behandlung mit Triton X-100 zeigen keine vollständige Entfernung des zellulären Materials nach einer Expositionsdauer von vier Tagen [372, 379, 385]. Immunhistochemische Färbungen verdeutlichen die Präsenz des Zytoskelettprotein Vimentin, welches ein Bestandteil von Mesenchymzellen ist, innerhalb des humanen vorderen Kreuzbandes. Enzymatische Behandlungsverfahren sorgen für eine Spaltung der Peptidbindungen (Arg - Lys) und eine daraus resultierende degenerative Strukturveränderung der extrazellulären Matrix. Hinzukommend ist die Behandlungsmethode mit einer Reduktion des kollagenähnlichen Glykoproteins Laminin, des Glykoproteins Fibronectin, Elastin sowie vergleichbar mit dem chemischen Behandlungsverfahren mit einer Involution der Glykosaminoglykane verbunden [364, 406, 407, 408]. Zusätzlich können die in diesem Zusammenhang verwendeten Wirkstoffe Trypsin, Endonukleasen und Exonukleasen aufgrund ihrer diffizilen Entfernbarkeit aus dem Gewebe eine Reaktion des Immunsystems zur Folge haben [369, 372, 385, 409].

Das gewählte Verfahren sollte eine Lyse der Zellmembranen und der Überreste des Zellkerns ermöglichen, alle verbliebenen Chemikalien und zellulären Komponenten entfernen und die Struktur und Beschaffenheit des initial intakten Kollagengewebes gewährleisten [379, 392].

2.6 Grundlagen der Finite-Elemente-Methode in der speziellen Anwendung auf Kollagenstrukturen

In den letzten 23 Jahren ist der phänomenologischen Modellierung von biologischem Gewebe zunehmend eine hohe Bedeutung zugesprochen worden [311]. Um das Verformungs- sowie Schädigungsverhalten simulieren zu können, ist es notwendig, Modelle zu definieren, die das Werkstoffverhalten unter einer anliegenden Belastung beschreiben. Im nachfolgenden Kapitel werden die für den Sachverhalt geeigneten Materialmodelle vorgestellt, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit Anwendung finden.

2.6.1 Materialmodelle

Ein komplexes nichtlineares und zeitabhängiges Materialverhalten unter einsinniger Zugbelastung charakterisiert das Verformungsverhalten einer Sehne. Fung [410] stellte als erster ein quasi linear-viskoelastisches Modell für diese Art von Biomaterial auf, welches jedoch in den Folgejahren durch einen nichtlinearen visko-hyperelastischen Ansatz ersetzt wurde [411, 412, 413, 414]. Generell besitzt eine Sehne aufgrund ihrer ausgezeichneten Faserrichtung anisotrope Materialeigenschaften [412, 415]. Eine Simulation auf Basis dieser Vorgabe wäre zu komplex und würde eine Bestimmung der optimalen Materialparameter für eine definierte Formänderungsenergiefunktion unmöglich machen [412]. Um nun einen handhabbaren Optimierungsprozess für dieses biologische Gewebe zu erhalten, wird die allgemeine Theorie finiter transversaler Isotropie zur Beschreibung herangezogen [413, 416, 417, 418, 419]. Die vorhandene einachsige Vorzugsrichtung sowie die senkrecht zu dieser Achse befindliche isotrope Ebene verdeutlichen die Allgemeingültigkeit dieses Materialgesetzes [420]. Unter der Vorgabe eines isotropen Werkstoffverhaltens ist es nun möglich mit Hilfe einer geeigneten Formänderungsenergiefunktion, in Abhängigkeit von den Dehnungsinvarianten, das Verformungsverhalten bis hin zur frühen Schädigung zu simulieren.

2.6.2 Formänderungsenergiefunktionen

Eine Vielzahl von Formänderungsenergiefunktionen zur Modellierung inkompressibler sowie nahezu inkompressibler hyperelastischer Materialien ist in Abaqus FEA definiert. Die in der Praxis zumeist angewendeten Funktionen, bezogen auf ein hyperelastisches Materialverhalten, sind das Neo-Hooke, Mooney-Rivlin sowie das Ogden-Modell [421]. Im Folgenden wird lediglich auf die Formänderungsenergiefunktion des im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit angewendeten Ogden-Modells vertieft eingegangen. Das auf der Cauchy-Elastizität aufbauende Ogden-Modell für inkompressible Materialien ist wie folgt definiert:

$$U = \sum_{p=1}^n \frac{\mu_p}{\alpha_p} \cdot (\lambda_1^{\alpha_p} + \lambda_2^{\alpha_p} + \lambda_3^{\alpha_p} - 3) \quad (2.1)$$

wobei λ_i , ($i = 1,2,3$) die Streckung in die jeweilige Achsrichtung und μ_p sowie α_p die Materialkonstanten beinhalten [422].

In Abaqus FEA ist das Ogden Modell in einer abgewandelten Variante (siehe Gleichung (2.2)) allgemein für kompressible Materialien formuliert [423]. Über die Beziehung

$$2\bar{\mu}_p = \sum_{p=1}^n \mu_p \cdot \alpha_p \quad \text{mit} \quad \mu_p \cdot \alpha_p > 0 \quad (2.2)$$

resultiert [417]:

$$U = \sum_{p=1}^n \frac{2 \cdot \bar{\mu}_p}{\alpha_p^2} \cdot (\bar{\lambda}_1^{\alpha_p} + \bar{\lambda}_2^{\alpha_p} + \bar{\lambda}_3^{\alpha_p} - 3) + \sum_{p=1}^n \frac{1}{D_p} (J^{\text{el}} - 1)^{2p} \quad (2.3)$$

In Gleichung (2.3) sind zusätzlich zu den bereits aus Gleichung (2.1) bekannten Variablen die materialabhängige Variable D_p sowie das elastische Volumenverhältnis J^{el} implementiert. Das elastische Volumenverhältnis ist der Quotient aus dem totalen und dem thermischen Volumenverhältnis J^{th} . Unter Berücksichtigung eines isothermen Zustandes ohne thermische Ausdehnung des Materials, was über Gleichung (2.4) verdeutlicht wird,

$$J^{\text{th}} = (1 + \varepsilon^{\text{th}})^3 = 1 \quad (2.4)$$

resultiert im Zusammenhang mit einer definierten Volumenkonstanz $J = 1$ [417] ein elastisches Volumenverhältnis:

$$J^{\text{el}} = \frac{J}{J^{\text{th}}} = 1 \quad (2.5)$$

Dadurch vereinfacht sich der Term für die Berechnung der Formänderungsenergie in Abaqus FEA nach Ogden wie folgt, was eine Bestimmung von D_p überflüssig macht:

$$U = \sum_{p=1}^n \frac{2 \cdot \bar{\mu}_p}{\alpha_p^2} \cdot (\bar{\lambda}_1^{\alpha_p} + \bar{\lambda}_2^{\alpha_p} + \bar{\lambda}_3^{\alpha_p} - 3) \quad (2.6)$$

Mit Hilfe der Beschreibung der Formänderungsenergie ist es nun möglich, unter Einwirkung einer Belastung auf die Sehne, das Verformungsverhalten nach einer erfolgreichen Ausgleichsrechnung zu ermitteln. Abaqus FEA bietet die Möglichkeit Materialkennwerte über diese Methode grafisch zu ermitteln. Ferner ermöglichen externe Softwarelösungen, unter Berücksichtigung des verwendeten Ogden-Terms, eine Implementierung der erlangten Kennwerte für die Simulation in Abaqus FEA.

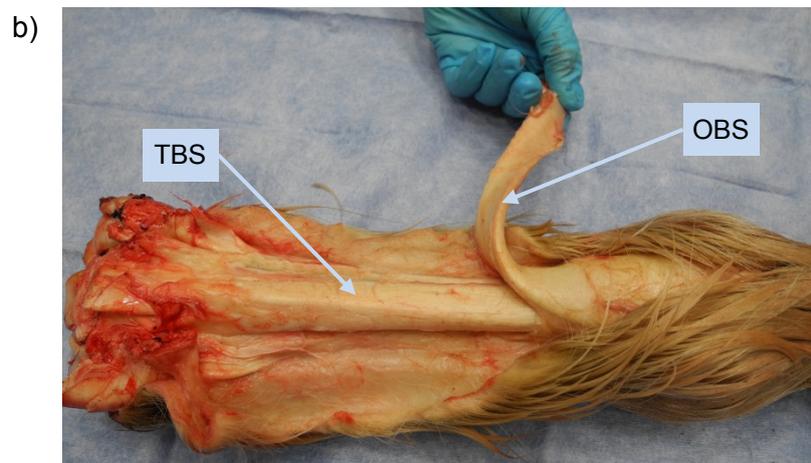
3 Experimentelle Methoden

3.1 Verwendetes Probenmaterial und Untersuchungsmethoden

Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verwendeten equinen OBS und bovinen TBS stammen von den vorderen Extremitäten der jeweiligen Tiere. Eine Rupturhäufigkeit an diesen Gliedmaßen ist der Grund für die Erforschung der Schädigungsmechanismen dieser Strukturen. Die nachfolgend beschriebene Probenentnahme zeigt die spezifische Sezierung einer equinen OBS (siehe Abbildung 3.1). Die Vorgehensweise ist eine in der Medizin bewährte Methode und auf die Entnahme einer bovinen TBS projizierbar.



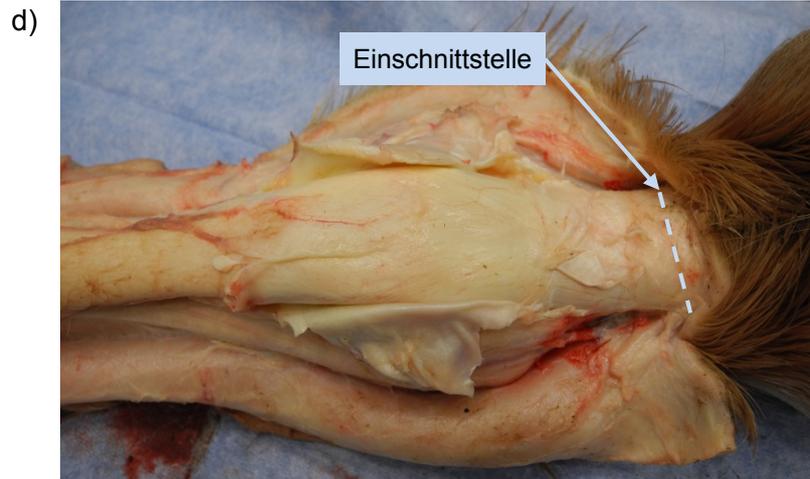
Öffnen der Extremität in distaler Richtung bis zum Fesselringband



Freilegen der OBS sowie der dorsal anliegenden TBS



Freilegen des Fesselringbandes, um den Anschluss am Kronbein erreichen zu können



*Durchtrennen des Fesselringbandes und anschließender
Einschnitt zur Teilung der OBS von der Extremität*

Abbildung 3.1: Entnahme einer equinen OBS

Die Extremität wird am Karpalgelenk von dem Tier abgetrennt, sodass der vollständige Bandapparat in distaler Richtung für die anstehenden Versuchsreihen zur Verfügung steht. Nach Reinigung und Desinfektion der Hautoberfläche wird die Extremität mit einem Längsschnitt geöffnet (siehe Abbildung 3.1 a, b)). Die in unmittelbarer Nähe unterhalb der Hautoberfläche befindliche OBS und das umschließende Bindegewebe darf dabei nicht verletzt werden. Um den Kontaktpunkt der Sehne am Kronbein erreichen zu können und damit die vollständige Sehnenlänge für die Versuche zu nutzen, wird der Bandapparat bis zum Hufknorpel freigelegt (siehe Abbildung 3.1 c)). Nach dem Auftrennen des Fesselringbandes sind die OBS sowie die TBS zugänglich und können am Hufansatz abgeschnitten werden (siehe Abbildung 3.1 d)).

Für die Vorversuche wurden bovine TBS verwendet, die sich lediglich in distaler Richtung durch zwei Verzweigungselemente vor dem Anschluss am Klauensesambein von der equinen OBS unterscheiden. Aufgrund einer in größerer Stückzahl aus hiesigen Schlachthöfen verfügbaren Menge, eignete sich die Rindersehne für die Vorversuche und die damit verbundene Evaluierung des Prüfsystems. Im Gegensatz zum Pferd, welches als Unpaarhufer bezeichnet wird, sorgt die Charakteristik des bovinen Paarhufers für eine variierende Sehnenanatomie. Die Dimension der beiden Sehnen ist trotz abweichender Spenderspezies vergleichbar. Abbildung 3.2 verdeutlicht die unterschiedliche Anatomie beider Sehnen.

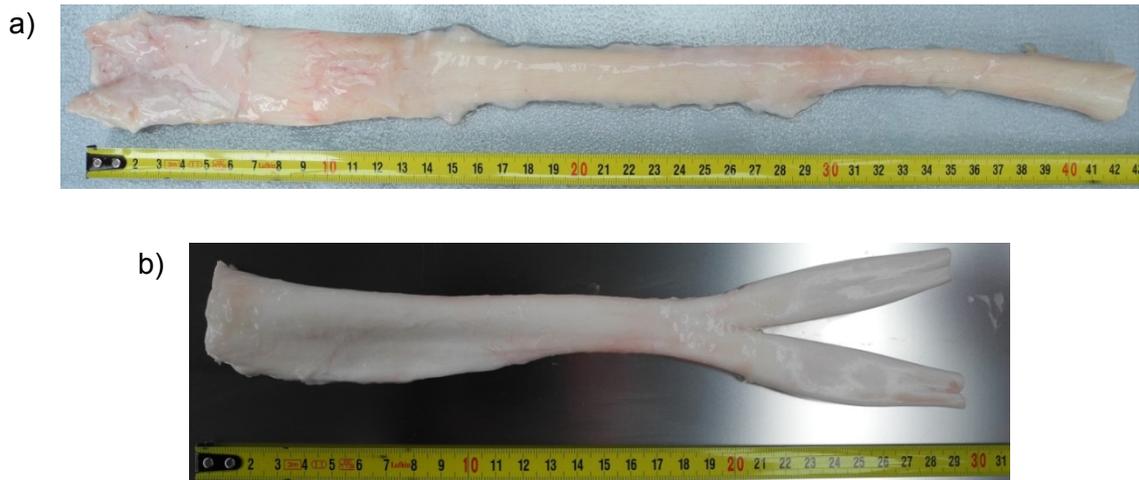


Abbildung 3.2: Darstellung einer a) equinen OBS und einer b) bovinen TBS nach der Entnahme

Um die Eignung des Fasergerüsts als Sehnenersatzmaterial kritisch bewerten zu können, wurden sowohl initial intakte equine OBS (Kontrollgruppe), als auch die dezellularisierten Ableger statischen und zyklischen Tests unterzogen. In Anlehnung an den in Kapitel 2.5 beschriebenen Dezellularisierungsprozess wurden die von den Versuchstieren entnommenen equinen OBS nach der chemischen Behandlungsmethode mit dem nicht-ionischen Detergens Triton X-100 präpariert.

Nachfolgend sind die durchgeführten Prozessschritte im Detail dargestellt. Die Verwendung einer Kombination aus der physikalischen und chemischen Behandlungsmethode beginnend mit fünf Zyklen einer zweiminütigen Gefrierung und zehnminütigen Auftauphase in 37 °C temperierter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) leitet die chemische Behandlungsmethode ein. Beginnend mit einer 48-stündigen Aufbewahrung in einer hypotonischen Lösung (destilliertes Wasser) bei Raumtemperatur folgt eine ebenfalls 48-stündige Verweilung in einem zur Lösung von Proteinen verwendeten TBS-Puffer (Carl Roth; pH 7,6) verbunden mit einer Hinzugabe von 1 % Triton X-100 (Carl Roth). Der Dezellularisierungsprozess wird in zwei Waschschritten zu jeweils 15 min in destilliertem Wasser und einer anschließenden nächtlichen Aufbewahrung in einem definierten Zellkulturmedium sowie einer weiteren nächtlichen Lagerung in PBS abgeschlossen [394]. Abbildung 3.3 zeigt das Erscheinungsbild einer nach den zuvor beschriebenen Behandlungsschritten durchgeführten dezellularisierten equinen OBS.



Abbildung 3.3: Dezellularisierte equine OBS

3.2 Zug- und Ermüdungsversuche

Aus wissenschaftlichen Veröffentlichungen ist bekannt, dass die Umgebung in der biologisches Gewebe mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt ist, dramatische Auswirkungen auf das Materialverhalten des Prüflings hat [291, 424, 425]. Insbesondere die Zusammensetzung sowie die Temperatur des verwendeten Umgebungsmediums beeinflussen die Viskoelastizität der Sehne [426]. Eine akkurate Charakterisierung des Materialverhaltens setzt neben einer geeigneten physiologischen Umgebung eine präzise Regelung der Prüfmaschine und Aufzeichnung der Versuchsergebnisse voraus. Die folgenden Kapitel beinhalten eine Vorstellung des für die Versuchsdurchführung an den vollständigen Sehnensträngen notwendigen Umgebungssimulationsbads, implementiert in eine servohydraulische Universalprüfmaschine und das zur Schädigungsdetektion notwendige Ultraschallsystem. Im Anschluss wird das Prüfsystem zur Ergründung des Verformungsverhaltens an equinen Faszikeln präsentiert.

3.2.1 Servohydraulisches Prüfsystem

Die Zug- und Ermüdungsversuche an den equinen OBS sowie den bovinen TBS wurden an einer servohydraulischen Prüfmaschine der Firma MTS (Typ 810) mit digitaler Regelelektronik MTS TestStar II durchgeführt. Der Lastrahmen des Systems bietet dem Bediener die Möglichkeit, zusammen mit einem in der Höhe verstellbaren oberen Querschnitt, einen ausreichend großen Bauraum für die Implementierung des Umgebungsbades und den dazugehörigen Anbauteilen zu schaffen. Um präzise Versuchsergebnisse ohne hohe Messabweichungen, die unter anderem auf ungeeignetes Versuchsequipment zurückzuführen sind, zu erhalten, wurde ein 20 kN Kraftaufnehmer der Firma HBM (Typ U3) in das Prüfsystem integriert, der den zu erwartenden Messbereich abdeckt.

Der schematische Aufbau einer servohydraulischen Prüfmaschine, im Zusammenhang mit dem Regelungsvorgang zur Durchführung von statischen sowie zyklischen Versuchsreihen, ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

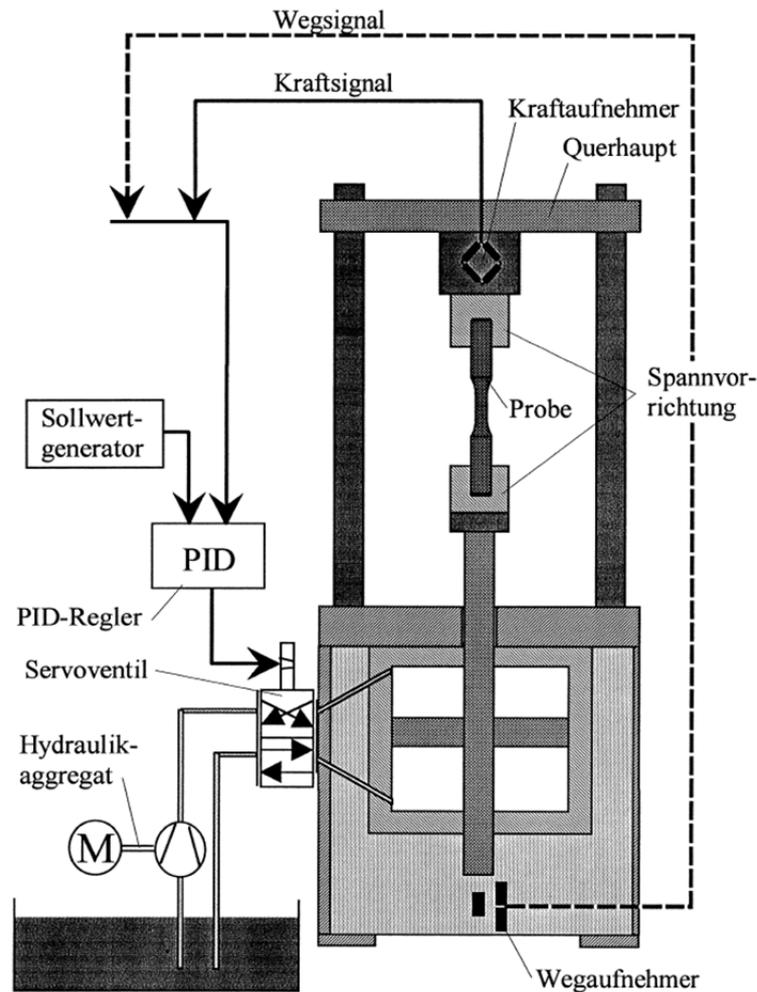


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau einer servohydraulischen Prüfmaschine (modifiziert nach Schöler et al. [427])

Ein für die Funktionsweise der servohydraulischen Prüfmaschine notwendiger konstanter Hydrauliköl-Arbeitsdruck wird mit Hilfe des Hydraulikaggregats erzeugt. Das Servoventil sorgt für eine Verteilung des Hydrauliköls in die zwei Kammern des Arbeitszylinders und somit für eine gezielte Kolbenbewegung. Der Wert des in den Regelkreis rückgeführten Ist-Signals wird mit dem Sollwert verglichen und mittels einer PID-Regelung ein geschlossener Regelkreis realisiert. Im Fall einer Soll-Istwert-Abweichung wird durch das elektrische Stellsignal des PID-Reglers die Position des Steuerkolbens beeinflusst und die Stellung des Arbeitszylinders dem Sollwert entsprechend angepasst. Verfügbare Regelgrößen sind in dem genutzten Prüfmaschinenaufbau der Weg des Arbeitszylinders und die Belastung auf die Probe. Im Rahmen der Ermüdungsversuche wird das Probenmaterial mit einer konstanten Beanspruchungsamplitude beaufschlagt und die zeitliche Veränderung der Dehnungsantwort für eine Analyse des Werkstoffverhaltens betrachtet. Die Sollwertvorgabe wird von einem an den Regler angeschlossenen Computer mit Hilfe der

Software MTS MPT vollzogen.

3.2.1.1 Umgebungssimulationsbad

Die Eignung eines kommerziell erhältlichen Umgebungssimulationsbades der Hersteller MTS, Zwick und Bose ElectroForce®, welches mit Hilfe von Anpassungsvorgängen in die servohydraulische Prüfmaschine integriert werden muss, ist bedingt durch zahlreiche Gründe nicht gegeben. Zwar bieten alle Systeme ein temperierbares, mit Flüssigkeit gefülltes Innenvolumen, um die physiologischen Gegebenheiten des Tieres zu erfüllen, jedoch sind weder die Innenraumabmaße ausreichend dimensioniert noch die notwendigen Anpassungsmöglichkeiten geeignet. Eine vollständige Selbstgestaltung des Umgebungssimulationsbades bewirkt eine Adaption des Systems an die notwendigen Anbauteile. Wilson et al. [426] gestalteten eine mit Wasserdampf (99 % relative Luftfeuchtigkeit) gefüllte Kammer, um die anspruchsvolle Abdichtproblematik, und daraus resultierend austretende Umgebungsflüssigkeit, zu umgehen.

Der Aufbau des Umgebungssimulationsbades ist mit einer Reihe anspruchsvoller Vorgaben verknüpft. Das Innenvolumen des mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Behälters muss aus Gewichtsgründen möglichst gering gewählt werden, wobei zugleich alle Versuchskomponenten wie Sehneneinspannung, Ultraschallsonden und ein Widerstandsthermometer für die Temperaturerfassung der Ringerlösung innerhalb des Behälters platziert werden müssen. Diese Temperaturerfassung verbunden mit einem Umwälzvorgang des Umgebungsmediums sind notwendige Voraussetzungen für eine Nachbildung der physiologischen Gegebenheiten des Tieres, wodurch *in vitro* Versuchsreihen an Beugesehnen ermöglicht werden. Eine konstante Temperatur von 37 °C sowie eine homogene Durchmischung der Badflüssigkeit werden mit Hilfe eines externen Wärmethermostaten der Firma LAUDA (Typ Proline P8) realisiert. Dieser wird über jeweils eine Zu- sowie Ablaufvorrichtung an den Behälter gekoppelt.

Abbildung 3.5 verdeutlicht in einer Übersichtsaufnahme die in Form eines Acrylglasbehälters gestaltete Umgebungssimulationskammer im implementierten Zustand in der servohydraulischen Universalprüfmaschine MTS (Typ 810) in Verbindung mit dem Ultraschallgerät der Firma General Electric (Typ LOGIC A5 Pro), dem Wärmethermostat der Firma LAUDA (Typ Proline P8) und einer gestalteten Kryoapparatur, bestehend aus dem Eintauchkühler der Firma Thermo Haake (Typ EK90) sowie einem Sammelbehälter und einer Kreiselpumpe.

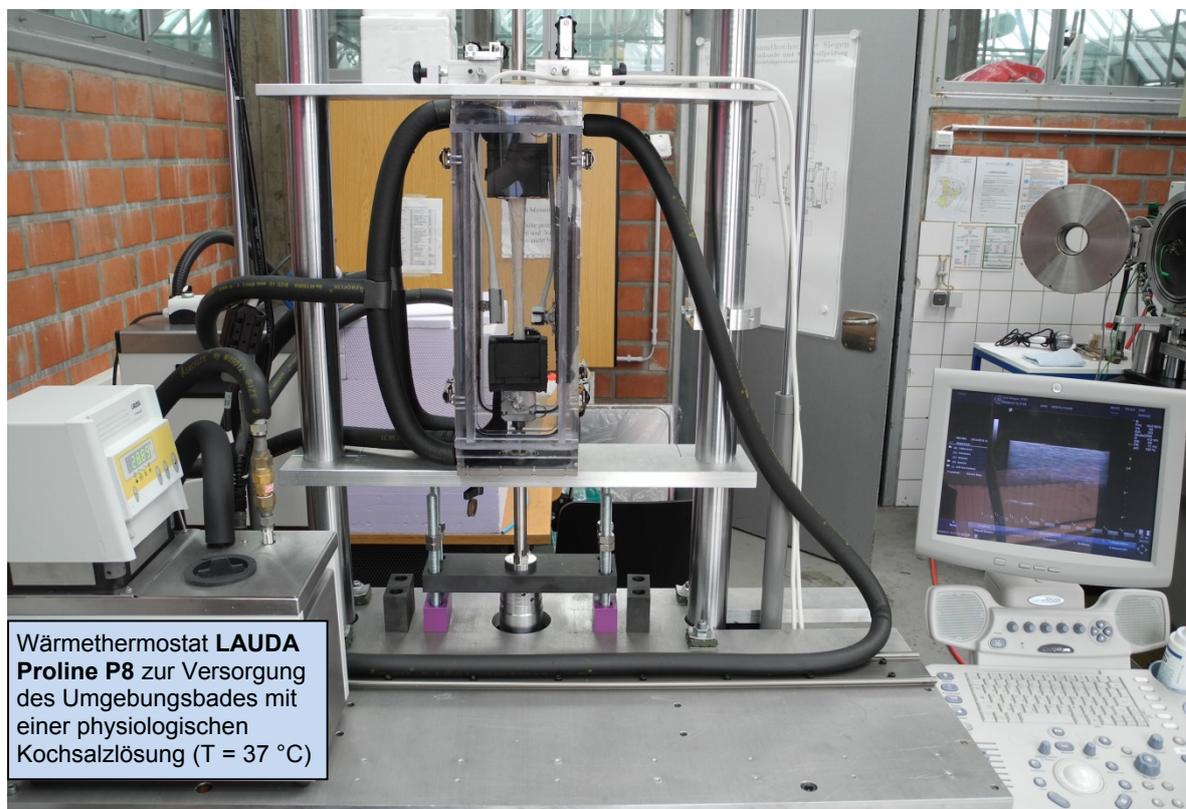
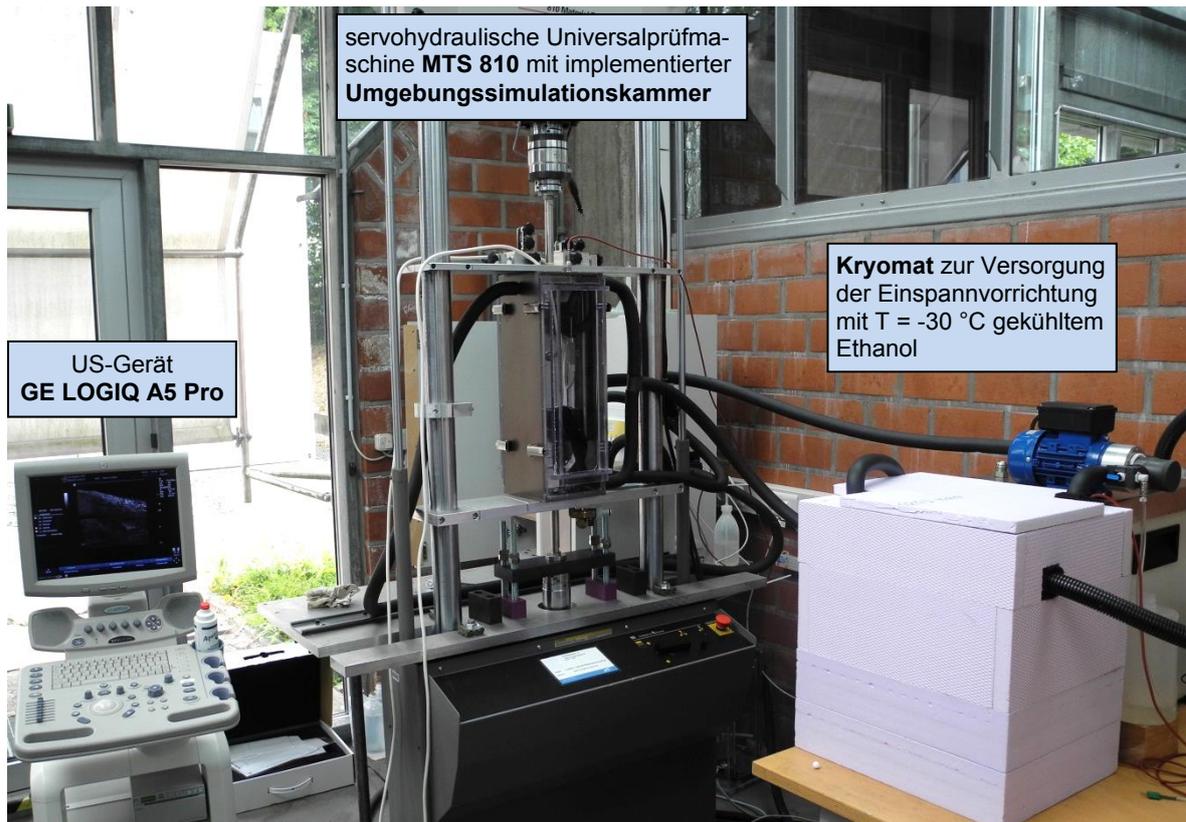


Abbildung 3.5: Übersichtsaufnahme der servohydraulischen Prüfeinrichtung mit dem US-Gerät, der Kryoapparatur und dem Wärmethermostat

Abbildung 3.6 zeigt detailliert das CAD-Modell des Prüfaufbaus mit der Positionierung der relevanten Komponenten. Sämtliche Isolierungsabschnitte der Einspannungsvorrichtung werden aus Übersichtsgründen ausgeblendet. Um einen besseren Einblick in das Behälterinnere zu gewährleisten, werden in der Detailansicht des Umgebungsbades die vordere sowie rückseitige Behältertür entfernt.

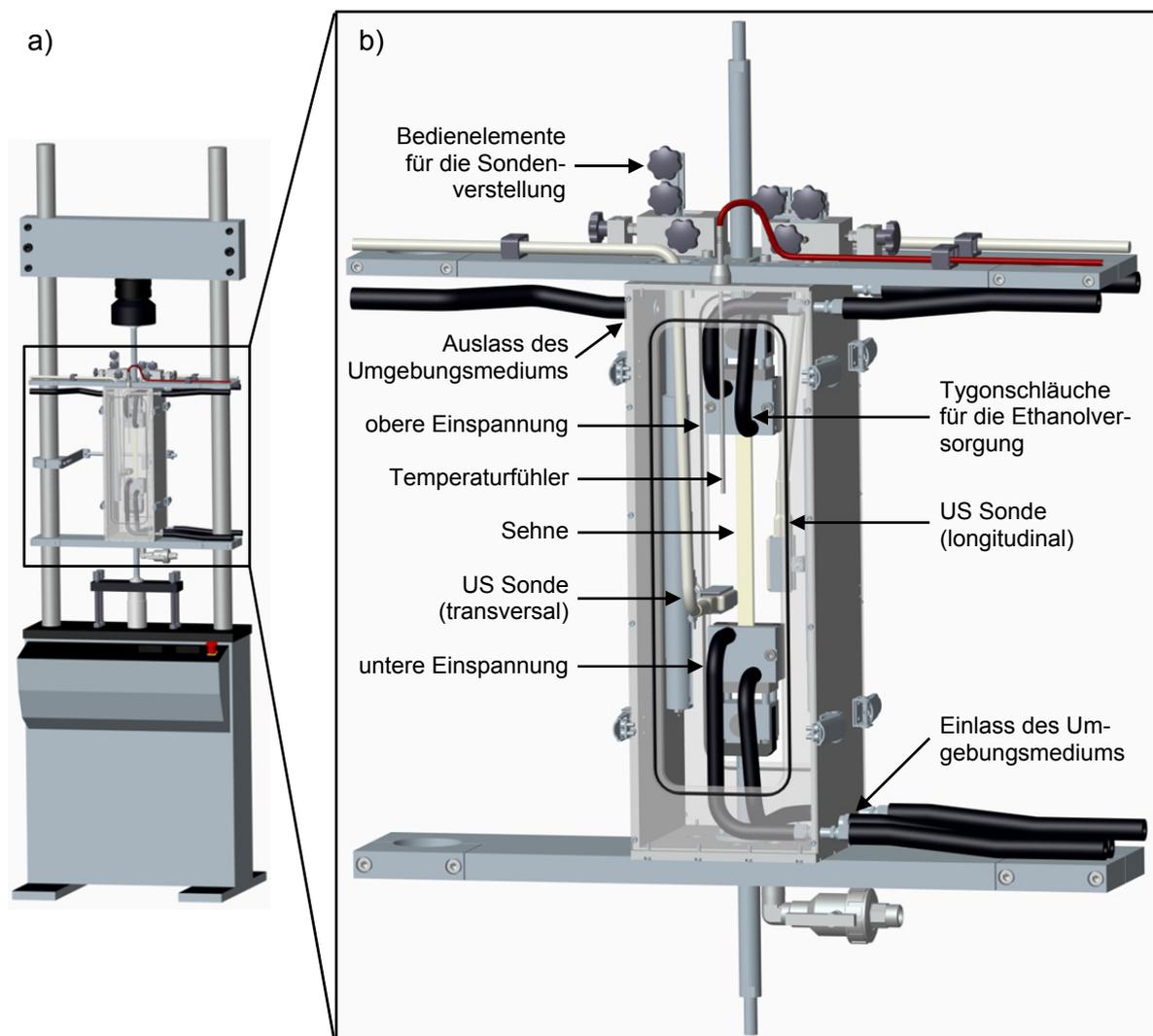


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der a) servohydraulischen Prüfmaschine und der b) Umgebungssimulationskammer

3.2.1.2 Einspannvorrichtung

Im Gegensatz zu metallischen Versuchsproben zeichnet sich biologisches Gewebe durch eine deutlich geringere Festigkeit, verbunden mit einer schlüpfrigen Oberfläche, aus. Aufgrund dessen sind etablierte Spannverfahren, wie seitlich angreifende Klemmbanken, zur sicheren Fixierung nur bedingt anwendbar und eine modifizierte Gestaltung des

Einspannsystems notwendig. Hohe Presskräfte, hervorgerufen durch die Spannbacken, können das Sehnenmaterial verletzen und die biomechanischen Eigenschaften beeinflussen. Abbildung 3.7 verdeutlicht ein effektives Lösungsprinzip, um hohe Zugbelastungen, die von der Prüfmaschine ausgehen, auf die Sehne übertragen zu können.

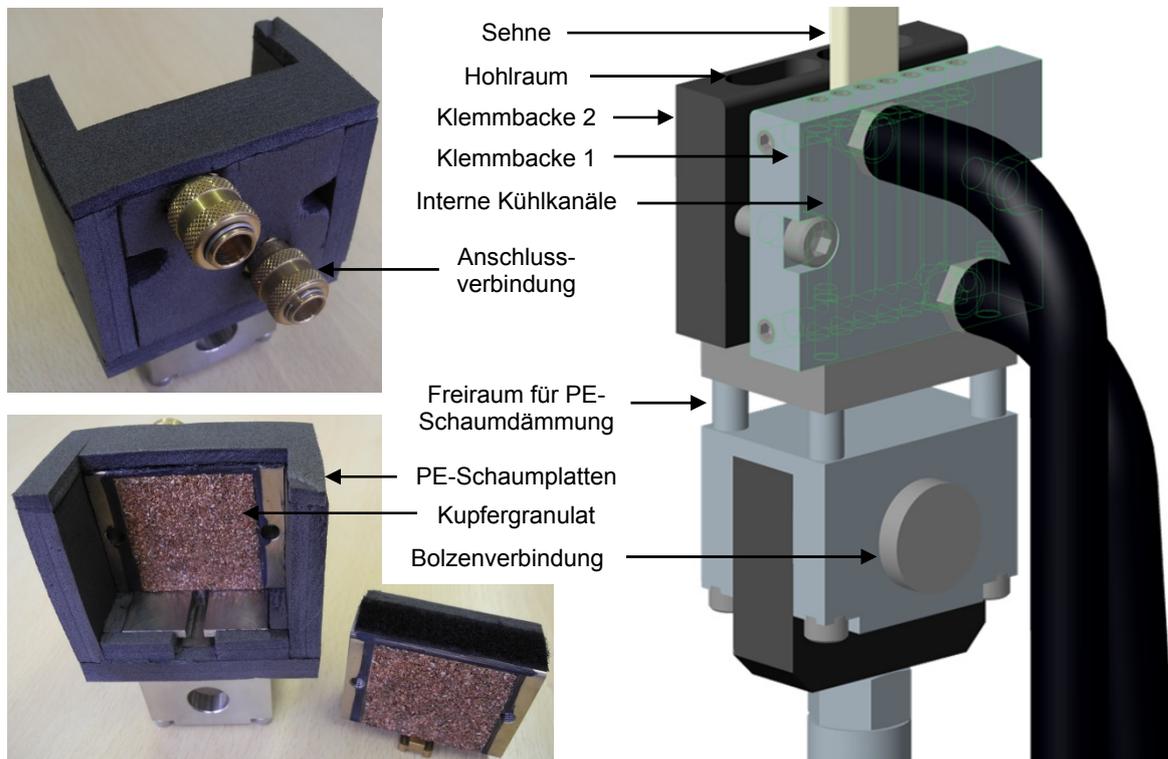


Abbildung 3.7: Reale und schematische Ansicht der Einspannvorrichtung

Neben einer Fixierung der Sehne mit zwei horizontal angreifenden Klemmbacken wird eine Kryostatkühlung genutzt, um ein Einfrieren der Sehnenenden über einen mehrstündigen Versuchszeitraum zu ermöglichen und die befürchtete Verletzung des Prüflings zu minimieren. Klemmbacke 1 ist dabei formschlüssig mit dem Unterbau verknüpft und mit innenliegenden Kühlkanälen (grün) versehen, in denen Ethanol bei einer Temperatur von $T = -30\text{ °C}$ zirkuliert. Um vertikale Belastungen aufnehmen zu können, wird Klemmbacke 2 in ein Schienensystem positioniert und horizontal mit Klemmbacke 2 verschraubt. Im Einklang mit den mit Kupfergranulat beschichteten Klemmbacken sorgt diese Methode für eine Belastungsübertragung bis zur Rupturgrenze der Sehne. Eine Kopplung mit der Universalprüfmaschine wird durch eine Bolzenverbindung unterhalb der Einspannung realisiert. Dieser Zusammenschluss bietet dem Prüfer, nach einer externen beidseitigen Fixierung der Sehne in den Einspannungen, die Möglichkeit einer schnellen Montage im Prüfsystem.

Die Verwendung des Einspannungssystems in der mit 37 °C temperierten physiologischen Umgebung würde zu einem sofortigen Auftauen der Sehnenenden führen und den zuvor gewonnenen Festigkeitsvorteil zu Nichte machen. Aus diesem Grund sind Polyethylen-schaumplatten in den Hohlräumen der Klemmbacke 2 und vollständig um die Einspannung positioniert. Zusätzlich sorgt ein leichter Flüssigkeitseintritt in das Einspannungsinnere nach einem kurzzeitigen Gefriervorgang für eine stoffschlüssige Verbindung und somit für eine zusätzliche Haltewirkung.

Kommerzielle Einspannsysteme sind für die geforderte Anwendung nicht verfügbar und aus der Literatur bekannte Lösungsmöglichkeiten nicht in einer physiologischen Umgebung und für einen längeren Versuchszeitraum anwendbar. Riemersa et al. [428], Morelli et al. [429], Jansen et al. [219] und Jopp et al. [154] nutzen ein in die Einspannung integriertes Trockeneisreservoir (CO₂), um die Sehnenenden zu gefrieren. Bowser et al. [430] tauchen die Einspannsysteme vor Versuchsbeginn in Flüssigstickstoff, um kurzzeitig einen Stabilitätsgewinn des Prüflings zu erzielen. Ohne die Kryotechnologie ist eine Fixierung der Sehne ohne Bewegung und Verletzung innerhalb der Einspannung nicht möglich [40, 431, 432, 433, 434, 435, 436].

3.2.1.3 Ultraschallsystem

Das Ultraschallsystem der Firma General Electric (Typ LOGIQ A5 Pro) kann mit zwei innerhalb des Umgebungsbades befindlichen Linearsonden (Typ i739) transversale sowie longitudinale Sonogramme des untersuchten Sehnenabschnitts erzeugen. Die mit einer verfügbaren Bandbreite von $f = 4 - 10$ MHz ausgestatteten Sonden sind an gestalteten Haltepunkten in unmittelbarer Sehnennähe positioniert und können während des Versuchs, durch oberhalb des Umgebungsbades befindliche Verstellmöglichkeiten, jeden Abschnitt des Prüflings außerhalb der Einspannung untersuchen. Abbildung 3.8 zeigt schematisch die Anordnung der Sonden. Parallel zur Faserrichtung werden longitudinal und orthogonal zur Längsachse der Sehne transversale Aufnahmen aufgezeichnet.

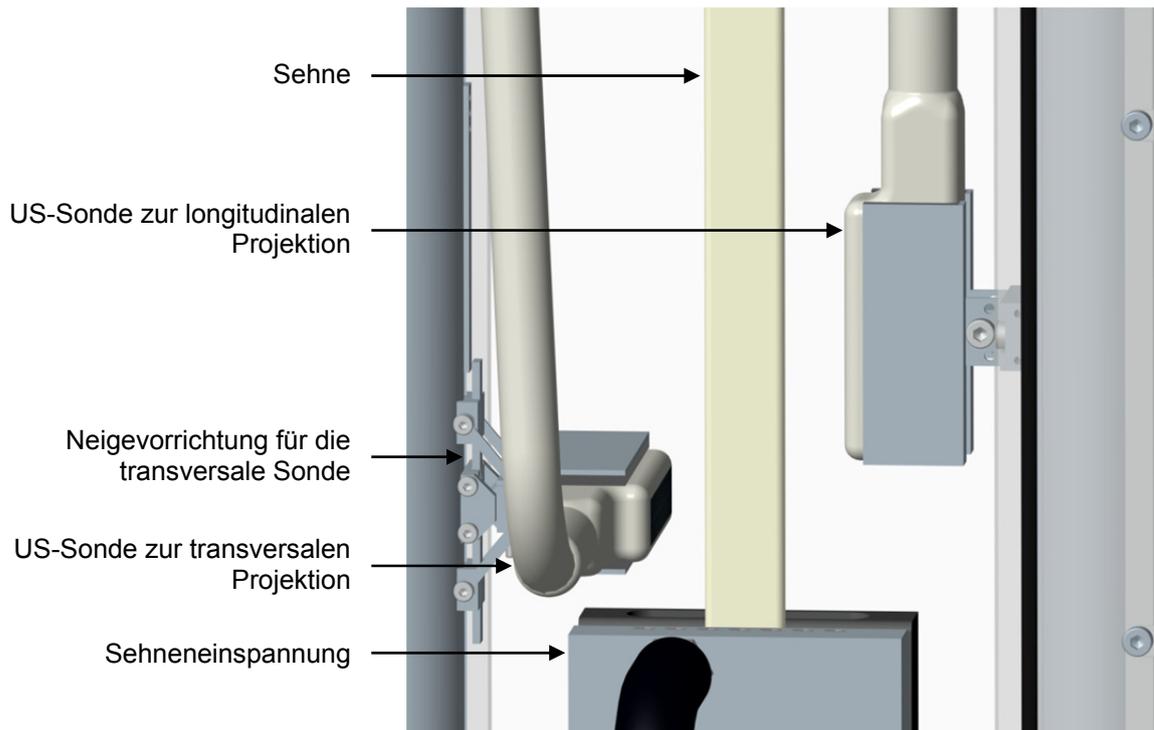


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Positionierung zweier Ultraschallsonden zur Erzeugung von longitudinalen und transversalen Sonogrammen

Bedingt durch den linearen Schallaustritt ist lediglich eine geringe Vorlaufstrecke verbunden mit einer kontaktfreien Anordnung des Schallkopfes zum Prüfling notwendig. Die Umgebungsflüssigkeit bildet dabei das Kontaktmedium, um eine vorzeitige Schallreflexion, bedingt durch zu hohe Impedanzunterschiede, zu vermeiden.

3.2.2 *In situ* Prüfmaschine implementiert in ein Durchlicht-Polarisationsmikroskop

Neben den biomechanischen Versuchsreihen an initial intakten OBS und TBS, durchgeführt an der servohydraulischen Universalprüfmaschine MTS (Typ 810), bietet ein gestaltetes *in situ* Prüfsystem die Möglichkeit das Verformungsverhalten einzelner Faszikel mikroskopisch zu betrachten. Der in Abbildung 3.9 dargestellte Aufbau wurde in ein Durchlicht-Polarisationsmikroskop der Firma Olympus (Typ BX51) implementiert und erlaubt die Charakterisierung der Sehnenstruktur unter variierenden Belastungszuständen.

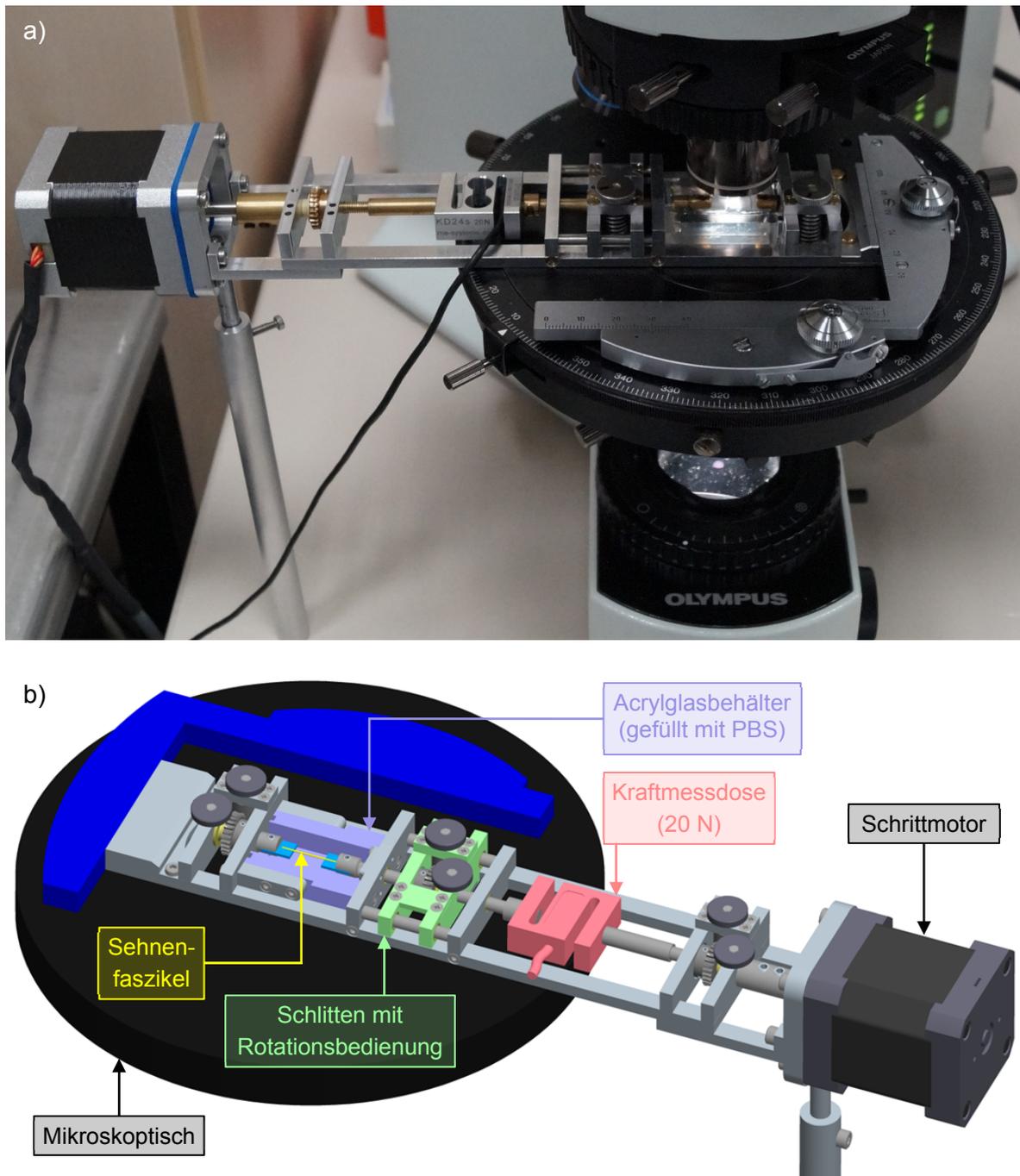


Abbildung 3.9: a) Darstellung der Belastungsvorrichtung implementiert in das Durchlicht-Polarisationsmikroskop Olympus (Typ BX51) und b) schematische Ansicht mit Bezeichnung der Komponenten

Zwei Rändelschrauben dienen der Rotation um die Längsachse des als Mikrotom-schnitt gefertigten Faszikels. Dies erleichtert einerseits die Montage der Trägerplatten im Prüfsystem und andererseits kann vor Versuchsbeginn eine geeignete Position für eine aussagekräftige Darstellung der Struktur bestimmt werden. Über einen Spindeltrieb kann die Rotation des Schrittmotors in eine translatorische vertikale Bewegung transferiert

werden und eine Belastung auf die Probe ausgeübt werden. Während des Versuchs wird die auf die Faszikel wirkende Kraft mittels eines 20 N Kraftaufnehmers der Firma ME-Systems (Typ KD24s), der über einen Messverstärker der Firma HBM (Typ Quantum X – MX840A) an ein EDV-System adaptiert ist, aufgezeichnet. Ein eigens für die *in situ* Versuche programmiertes LabVIEW Tool beinhaltet die vollständige Steuerung des Schrittmotors über eine Steuerung der Firma ISEL (Typ C10C) sowie die Aufnahme des Kraft- und Wegsignals, um den auf die Probe wirkenden Belastungen, resultierende Strukturveränderungen zuordnen zu können. Abbildung 3.10 a) zeigt die verwendete Probengeometrie, ein Mikrotomschnitt mit einer Schnittdicke von 150 μm , der in PBS befindlich oberhalb der Trägerplatten positioniert wird und nach Entfernen der Flüssigkeit mit Sekundenkleber für die Fixierung in der Belastungsvorrichtung an diesen befestigt wird. Bedingt durch die Auftriebskräfte hervorgerufen durch die Flüssigkeit wird eine reibungslose Positionierung des Fasersegmentes ermöglicht. Außerhalb dieser Umgebung ist eine Handhabung des filigranen Gewebes unmöglich. Der in der Belastungsvorrichtung innerhalb der PBS-Umgebung fixierte Faszikelabschnitt ist in einem unbelasteten Zustand in Abbildung 3.10 b) illustriert.

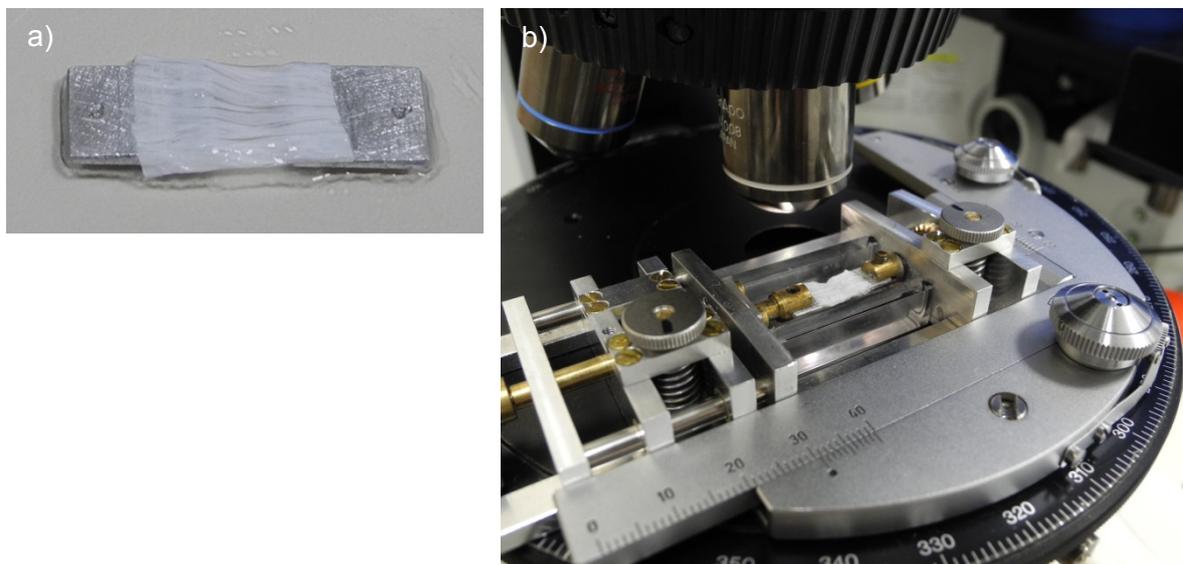


Abbildung 3.10: a) Platzierter Mikrotomschnitt auf einem Aluminiumträger und b) fixiert im mit PBS gefüllten Umgebungsbad

3.3 Einrichtungen zur Nachuntersuchung der Sehnenstruktur

Veränderungen in der Strukturbeschaffenheit der Sehne können während der biomechanischen Versuche anhand eines Anstiegs der maximalen Dehnung oder durch die bildgebende Sonographie detektiert werden. Dennoch bieten Nachuntersuchungen an der

rupturierten Sehne in makroskopischer sowie mikroskopischer Form die Möglichkeit, die erlangten Erkenntnisse morphologisch unter Anwendung eines Rasterelektronenmikroskops (REM) und eines Stereomikroskops zu bewerten.

3.3.1 Rasterelektronenmikroskop

Zur Charakterisierung der rupturierten Fasern und Bewertung der Beschaffenheit der Bindegewebsstruktur in der extrazellulären Matrix der untersuchten Sehnen wird ein Rasterelektronenmikroskop des Herstellers Philips (Typ XL-30) herangezogen. Für eine zufriedenstellende Visualisierung einzelner Fibrillen war eine aufwändige Probenvorbereitung in folgenden Schritten notwendig:

1. *Gewebeentnahme* und anschließende Primärfixierung
2. 120 min *Osmierung* in 1 % Osmiumtetroxid inklusive mehrmaliger Waschvorgänge in PBS
3. *Dehydrierung* in Ethanol (HPLC-Qualität) bei verschiedenen Konzentrationen (sechs Schritte zwischen 30 - 100 % Ethanol)
4. *Critical Point Drying* (CPD) in 16 Zyklen
5. *Befestigung* der Probe auf dem REM-Träger und *Beschichtung* mit einer leitenden Oberfläche (Sputtern)
6. Vor und nach der REM-Untersuchung ist der Faserabschnitt in einem *Exsikkator* zu *deponieren*

Der Prozess der überkritischen Trocknung ist für die REM-Präparation der Sehne unerlässlich, da im Fall einer unterkritischen Trocknung Verdampfungsprozesse Oberflächenspannungen zur Folge haben, woraus eine Schädigung des Gewebes resultiert. Zahlreiche Wissenschaftler kritisieren den Prozess der überkritischen Trocknung, da dieser zwar mit keiner Schädigung, jedoch mit einer Schrumpfung des Gewebes bis auf 67 % des Ausgangsvolumens einhergeht und in die Auswertung einbezogen werden muss [437, 438, 439]. Abbildung 3.11 zeigt beispielhaft eine nach den zuvor dargestellten Behandlungsschritten präparierte REM-Probe.

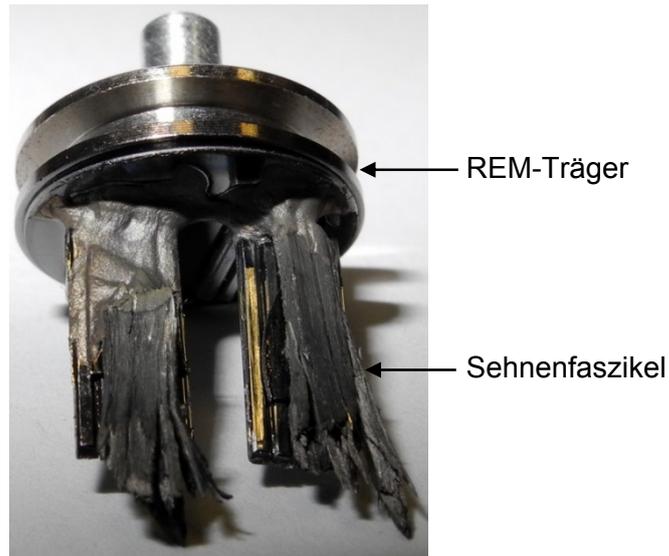


Abbildung 3.11: Sehnenfaszikel aufgetragen auf eine Trägerplattform zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung

3.3.2 Stereomikroskop

Die Bestimmung des läsierten Abschnitts und Charakterisierung des Schädigungsgrades wurde nach makroskopischer Begutachtung unter Anwendung eines Stereomikroskops der Firma Leica (Typ WILD M3Z) durchgeführt. Dieses Mikroskop bietet trotz eines geringen Vergrößerungsvermögens (40x) ausreichende Möglichkeiten eine eventuelle Schädigungseinleitung durch das Einspannsystem ausschließen zu können und die Größe und Position der Läsion zu deklarieren. Um dies in einem zufriedenstellenden Maß durchführen zu können, wurden die rupturierten Sehnen mit Hilfe von Querschnitten in 5 mm dicke Teilstücke getrennt und anschließend transversale Aufnahmen getätigt. Eine für die stereomikroskopische Analyse präparierte equine OBS ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Die einzelnen Segmente wurden schrittweise auf ihre Beschaffenheit untersucht.



Abbildung 3.12: Einteilung der equinen OBS in zahlreiche Segmente zur transversalen Betrachtung des Gewebezustandes

4 Ergebnisse

Das Ergebniskapitel umfasst, beginnend mit einer Analyse der Gewebestruktur der initial intakten und dezellularisierten equinen OBS, eine zyklische Versuchsreihe an künstlich läsionierten bovinen TBS, bevor in statischen sowie zyklischen Belastungsversuchen die Schädigungsmechanismen einer equinen OBS erforscht und die prozessbedingten Auswirkungen des Dezellularisierungsprozesses offengelegt werden. Die dabei erzielten Erkenntnisse werden mit Hilfe von Finite-Elemente Analysen evaluiert.

4.1 Analyse der Gewebestruktur

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an dezellularisierten und initial intakten equinen OBS wurden durchgeführt, um die prozessbedingten Auswirkungen des Verfahrens visualisieren zu können. Insbesondere die interfibrillare Struktur der extrazellulären Matrix und die Beschaffenheit des lockeren Bindegewebes, welche maßgeblich die biomechanischen Materialkennwerte beeinflussen, sind zu betrachten. Abbildung 4.1 illustriert rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Kryobruchflächenpaaren der zu untersuchenden Behandlungszustände.

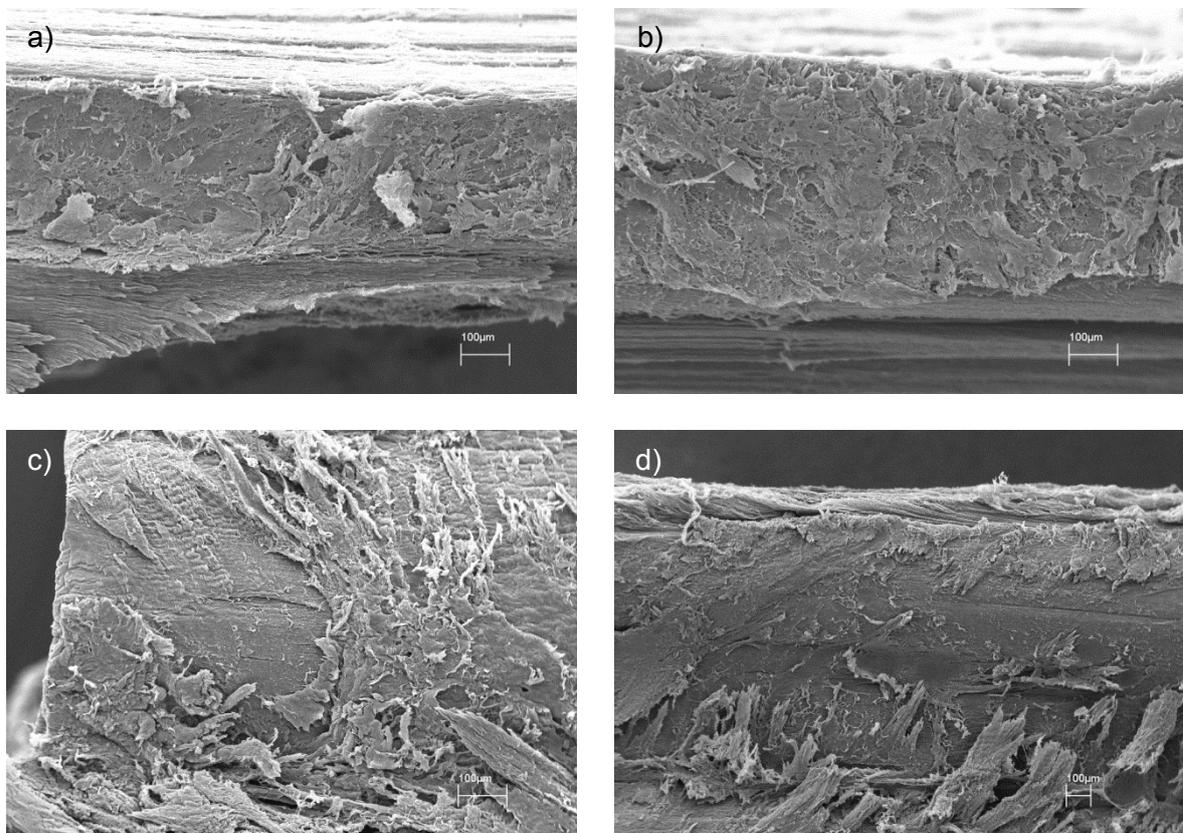


Abbildung 4.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Kryobrüchen einer a), b) initial intakten und c), d) dezellularisierten OBS

Die Darstellungen der initial intakten OBS zeigen an den Bruchflächen ein deutliches Maß von lockerem Bindegewebe (siehe Abbildung 4.1 a), b)), was bei detaillierter Betrachtung nicht mit den Darstellungen des dezellularisierten Gewebes korreliert (siehe Abbildung 4.1 c), d)). Der Behandlungsprozess sorgt für eine Reduzierung der Bindegewebsstruktur und daraus folgend für eine Sichtbarkeit des unterhalb dieser befindlichen Endotendineums.

4.2 Zyklische Schädigungsentwicklung eines künstlich eingebrachten Defektes in bovinen tiefen Beugesehnen

Eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungsverhaltens einer equinen OBS im initial intakten sowie dezellularisierten Zustand setzt neben einer zufriedenstellenden Probenvorbereitung und einem zuverlässigen Prüfsystem die Fähigkeit der Interpretation der ultrasonographischen Bildgebung voraus. Zu diesem Zweck wurden bovine TBS sowie equine OBS mit Hilfe einer Biopsiestanze makroskopisch sichtbar läsioniert, um eine Korrelation mit dem Sonogramm an identischer Position zu generieren. Um die Dehnungsverteilung entlang des Defektes bis hin zur intakten Zone visualisieren zu können, wurde auf der äußeren Hüllschicht mit Hilfe eines gestalteten Stempels ein Messraster aufgetragen. Zahlreiche Rasterpunkte wurden über ein optisches Kamerasystem erfasst und unter Verwendung der Bildbearbeitungssoftware ImageJ in Matrixschreibweise in MATLAB[®] implementiert. Die dargestellten Versuchsergebnisse sind an einer bovinen TBS unter kraft geregelter Vorgabe, bei einer konstanten Amplitude von 250 N bis 3 kN und einer Frequenz von 1 Hz entstanden. Eine Illustration des aufgetragenen Messrasters sowie eine graphische Darstellung der für die Auswertung der Dehnungsverteilung relevanten Koordinatenpunkte sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

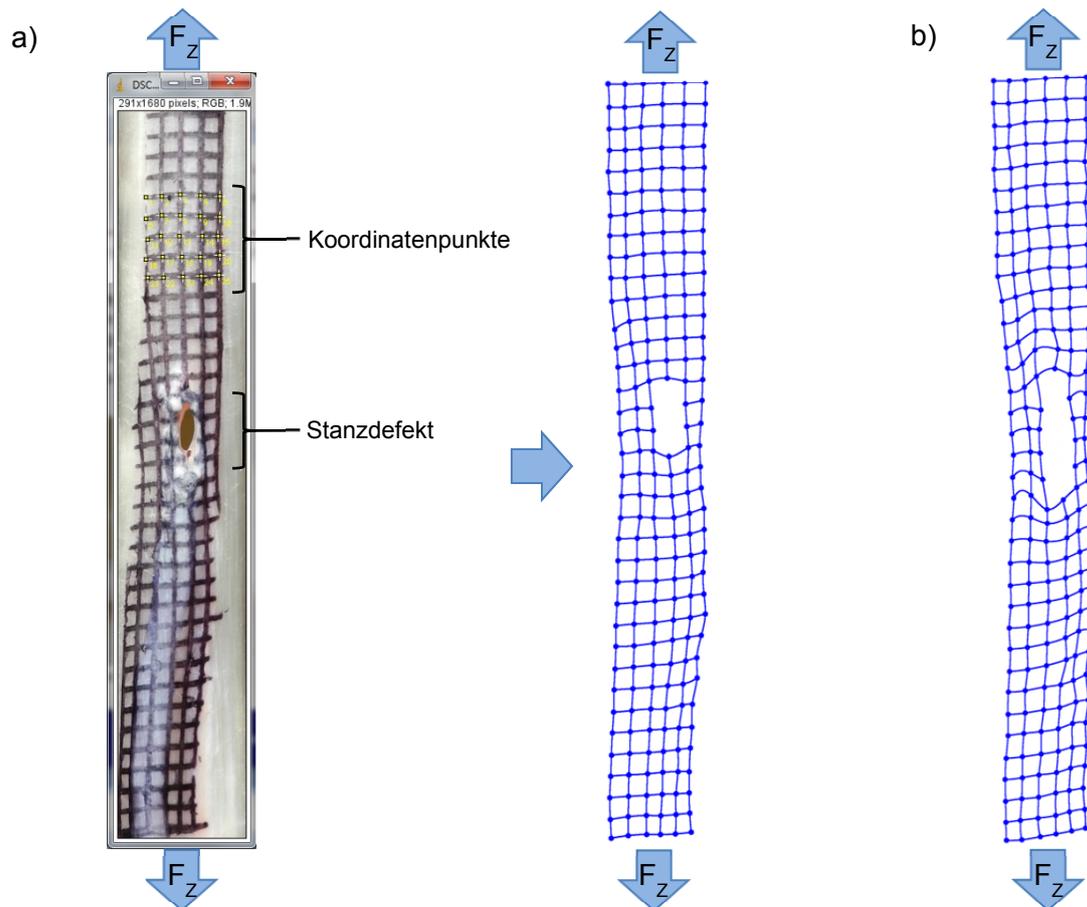


Abbildung 4.2: Darstellung des gestempelten Messrasters zur Bestimmung der Dehnungsverteilung entlang einer bovinen TBS bei einer Kraftamplitude von a) 250 N und b) 3 kN

Da die Möglichkeit einer Trigger-Funktion für die Erstellung der fotografischen Aufnahmen hardwareseitig nicht umsetzbar war, wurde in einem Intervall von 200 Zyklen im Zusammenhang mit einer Haltezeit von einer Sekunde, bei einer vollständigen Amplitude eine Serienaufnahme des Belastungszustands getätigt. Diese Haltezeit garantiert eine Darstellung des Messrasters im Bereich der maximalen Auslenkung der Sehne, um eine geometrische Veränderung des künstlich eingebrachten Defektes und folglich eine Schädigungsentwicklung verfolgen zu können. Abbildung 4.2 b) verdeutlicht anhand der Dehnungsverteilung eine Inhomogenität in unmittelbarer Läsionsnähe, bedingt durch den mittels Biopsiestanze provozierten Kontaktverlust der Kollagenfasern, im zentralen Sehnenareal. In der Schädigungszone wird durch eine deutliche Deformation des virtuellen Messrasters die größte Dehnung der peripheren Kollagenfasern visualisiert. Diese Auswirkung der Kraffteinleitung wird durch die Sonogramme (siehe Abbildung 4.3) gestützt, die eine Relativbewegung der zentralen Fasern zu der formschlüssig gebundenen peripheren Zone veranschaulichen.

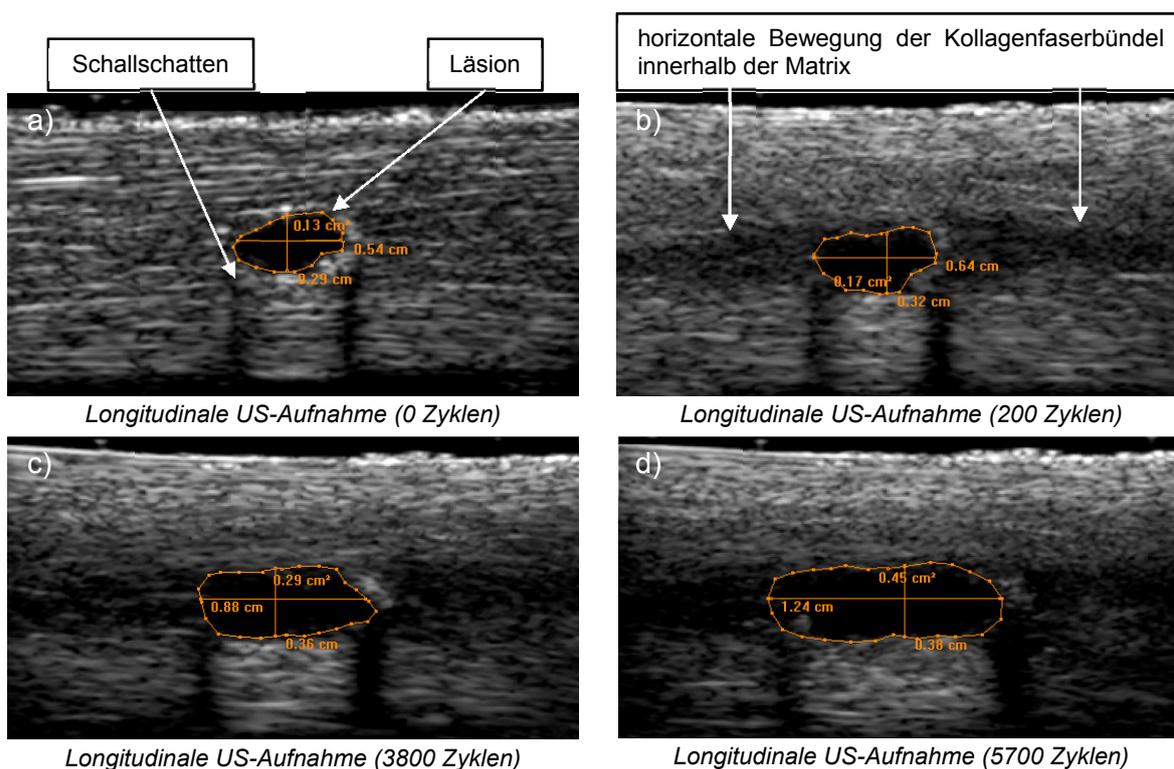


Abbildung 4.3: Betrachtung der Schädigungsentwicklung gezielt läsionierter boviner TBS anhand longitudinaler Sonogramme

Anhand der inhomogenen Echotextur, gekennzeichnet durch eine mittelgradige Hypoechoogenität, ist nach 200 Zyklen eine horizontale Bewegung der Kollagenfaserbündel, entgegen der Position der Schädigungseinleitung, erkennbar (siehe Abbildung 4.3 b)). Die Grauskala dieser Zone verdeutlicht, dass ein Teilbereich der Kollagenfasern, trotz der Faserdurchtrennung, Kontakt zum Ausgangsgewebe besitzt. Verdeutlicht durch eine überwiegend anechogene Bildwiedergabe scheint der vollständige Strukturverlust erst nach 5700 Zyklen vollzogen zu sein (siehe Abbildung 4.3 d)). Neben einer deutlichen Vergrößerung des anechogenen Stanzdefektes sind in dem zuletzt aufgeführten Sonogramm Zonen mit niedriger bis ebenfalls vollständig anechogenen Abschnitten erkennbar. In der mit Umgebungsflüssigkeit gefüllten Läsion werden die, ausgehend von der Ultraschallsonde emittierten Schallwellen nicht mehr reflektiert, wodurch der Schädigungsbe- reich lediglich als strukturloses schwarzes Feld visualisiert wird. Die nicht als Läsion zu interpretierenden vertikalen anechogenen Bereiche sind lediglich Schallschatten, die be- dingt durch die in unmittelbarer Defektnähe freiliegenden Faserenden entstehen. Hervor- gerufen durch einen hohen Impedanzunterschied zwischen der NaCl-Lösung und der Vielzahl von Kollagenfilamenten bewirken diese eine Schallreflektion sowie Absorption und sorgen für einen Anzeigeverlust der nachfolgenden Gewebestruktur. Hyperechogene

Erscheinungen sind vorzugsweise an der äußeren Hüllschicht, ebenfalls bedingt durch den vorherrschenden Impedanzunterschied zwischen dem auf der Sehnenoberfläche befindlichen, lockeren Bindegewebe und der umgebenen Flüssigkeit vorzufinden. Dieses Phänomen muss zusätzlich in die Interpretation der Schädigungsentwicklung einfließen und darf nicht als Strukturveränderung aufgefasst werden. Mit zunehmender Zyklenzahl war bei 5941 Lastspielen ein aus der Partialruptur resultierender Strukturverlust zu verzeichnen, der jedoch aufgrund der fehlenden Reflektionsebenen keine Illustration eines bewertbaren Sonogramms ermöglicht und aus diesem Grund in der Auswertung nicht aufgeführt wird.

4.3 Auswirkungen des Dezellularisierungsprozesses auf das Werkstoffverhalten equiner oberflächlicher Beugesehnen unter monotoner Beanspruchung

Eine Bestimmung der materialspezifischen Kennwerte unter Anwendung monotoner Versuchsreihen vermittelt eine primäre Erkenntnis über mögliche Auswirkungen des Dezellularisierungsprozesses auf die biomechanische Belastbarkeit einer equinen OBS. Morphologische Gesichtspunkte werden in diesem Kapitel nicht berücksichtigt. Um aussagekräftige Versuchsergebnisse sowie eine Reproduzierbarkeit zu garantieren, ist eine penible Probenvorbereitung notwendig. Nach dem bereits in Kapitel 3.1 beschriebenen Entnahmeprozess erfolgt vor der Fixierung der Sehne in die Einspannvorrichtung ein Zugschnitt des Prüflings auf eine vordefinierte Länge von 300 mm. Dabei ist eine Abtrennung außerhalb des mittleren Metakarpalbereichs, bevorzugt am distalen Sehnenende, einzuhalten. Das Ablösen des lockeren Bindegewebes von der Sehnenoberfläche sorgt für eine Kontaktverbesserung zwischen den Klemmbacken der Einspannvorrichtung und vermindert eine mögliche Bewegung des Prüflings innerhalb des Einspannsystems.

Es standen für die Zugversuche vier Versuchstiere zur Verfügung, an denen an beiden vorderen Extremitäten jeweils die OBS entnommen wurde und randomisiert, für eine Dezellularisierungsbehandlung oder für die als Kontrollgruppe bezeichnete Vergleichsbeurteilung verwendet wurden. Diese Vorgehensweise vermindert den strukturbedingten, anatomischen Einfluss auf die Materialkennwerte, da innerhalb eines Organismus lediglich die prozessbedingten Auswirkungen der Dezellularisierung untersucht werden sollen.

Die Zugversuche wurden an dem in Kapitel 3.2.1.1 vorgestellten biomechanischen Prüfsystem innerhalb der Flüssigkeitsumgebung bei einer konstanten, dem tierischen Organismus entsprechenden Temperatur von 37 °C durchgeführt, um eine realitätsnahe Versuchsumgebung zu definieren. Für die Versuchsreihen wurde eine konstante vertikale Vorschubgeschwindigkeit des Arbeitszylinders von 1 mm/s definiert, um die Sehnen bis

zur vollständigen Ruptur belasten zu können. Das Anbringen eines induktiven Wegaufnehmers an der Sehne innerhalb der Flüssigkeitsumgebung ist nicht möglich sowie ein optisches Wegmesssystem nicht verfügbar, weshalb auf den Maschinenverfahrweg zur Dehnungsberechnung zurückgegriffen werden musste. Nach Vorversuchen konnte eine erste Einschätzung der Belastbarkeit einer equinen OBS getroffen werden, wodurch das Prüfsystem um eine 20 kN Kraftmessdose ergänzt wurde, die in dem verlangten Messbereich eine geringere Abweichung erzielt. Abbildung 4.4 illustriert das Spannung-Dehnungsverhalten der initial intakten Kontrollgruppe, die in ihrem unbehandelten Zustand das *in vivo* biomechanische Materialverhalten widerspiegeln soll. Die Bedeutung der im Rahmen der Ergebnisdarstellung verwendeten Probennummerierung ist im Anhang dieser Arbeit tabellarisch hinterlegt.

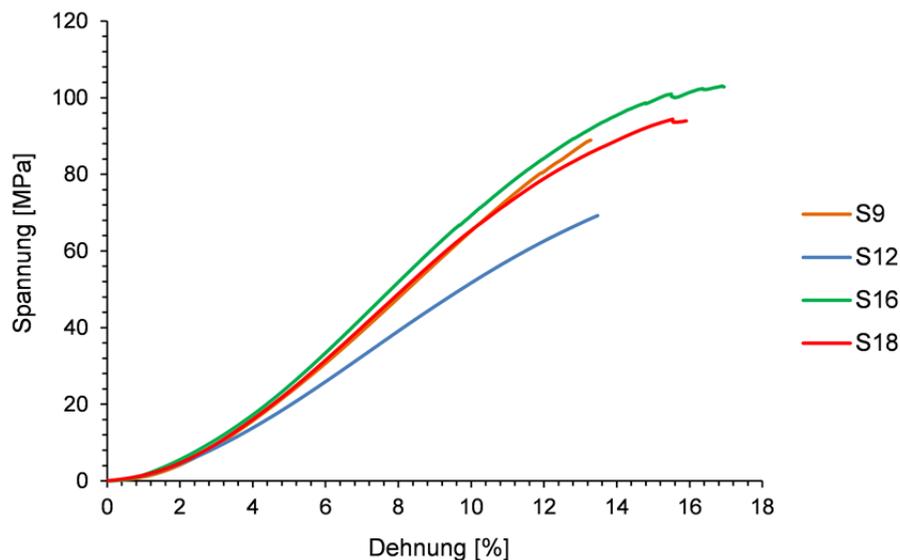


Abbildung 4.4: Spannung-Dehnung-Verhalten von vier Proben der equinen initial intakten Kontrollgruppe

Die Ergebnisdarstellung korreliert mit den aus der Literatur bekannten Verläufen, beginnend mit dem konvexen Verlauf (Toe-Region), dem sich anschließenden linear-viskoelastischen Materialverhalten bis schlussendlich Partialrupturen, den konkaven Verlauf beschreibend, zum Versagen der Sehne führen. Beispielhaft ist für eine Probe eine im transversalen Sonogramm detektierbare Läsion im zentralen Sehnenareal erkennbar (siehe Abbildung 4.5 a)), die zeitgleich mit der longitudinal ausgerichteten zweiten US-Sonde erfasst werden konnte (siehe Abbildung 4.5 b)).

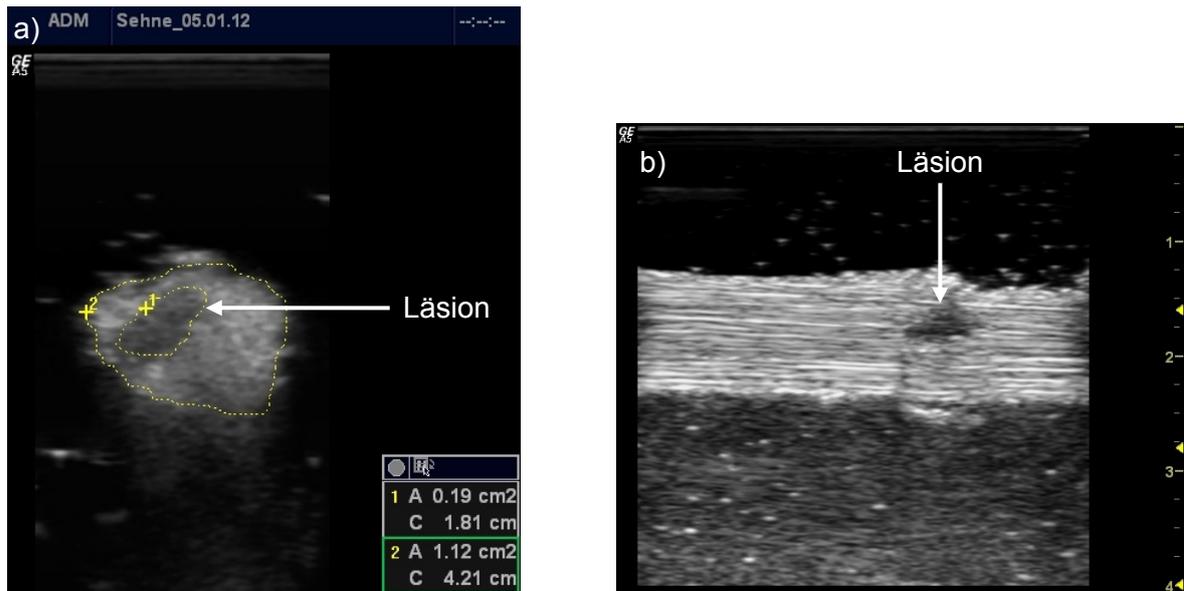


Abbildung 4.5: Detektierte Partialruptur im zentralen Areal einer equinen OBS (S3) in der a) transversalen Ansicht und b) longitudinalen Ansicht

Diese Aufnahmen wurden im konkaven Verformungsabschnitt getätigt und weisen bereits dort eine läSIONALE Defektfläche von 19 mm² auf. Der prozentuale Schädigungsanteil von 17 % führt nach Tabelle 2.7 zu einem mittelgradigen Sehnenschaden.

In Analogie zu den Zugversuchen an der Kontrollgruppe wurden unter identischen Versuchsvorgaben und -bedingungen die biomechanischen Materialkennwerte dezellularisierter equiner OBS in einem Spannung-Dehnung-Diagramm ermittelt (siehe Abbildung 4.6).

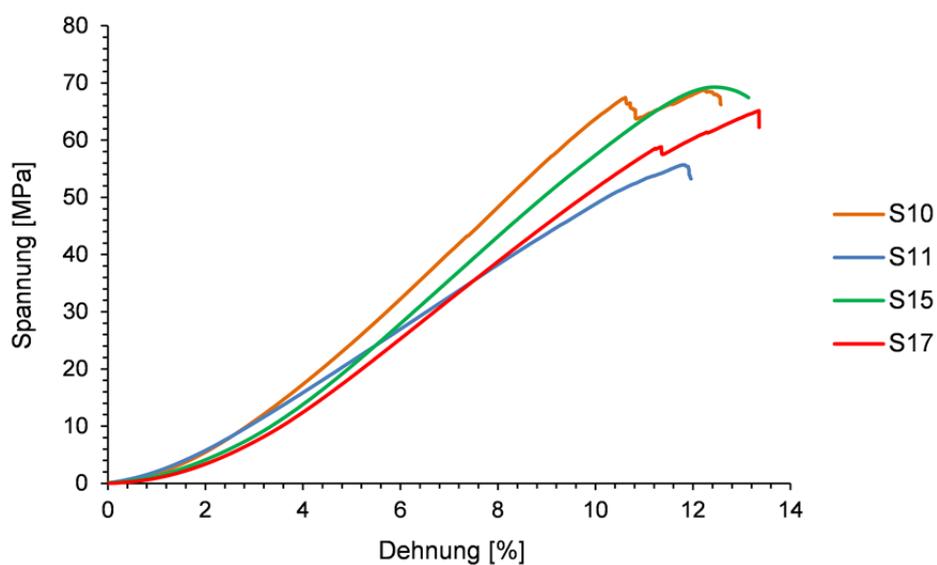


Abbildung 4.6: Spannung-Dehnung-Verhalten von vier Proben der equinen dezellulierten Gruppe

Die qualitative Gegenüberstellung der Spannung-Dehnung-Verläufe verdeutlicht ein augenscheinlich vergleichbares Verformungsverhalten der untersuchten Behandlungszustände. Gemittelt über die vier Versuchstiere für jeden Behandlungszustand und unter Hinzunahme der Standardabweichung resultiert ein im Folgenden abgebildeter Spannung-Dehnung-Zusammenhang für die initial intakte Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4.7 a)) sowie die dezellularisierten OBS (siehe Abbildung 4.7 b)).

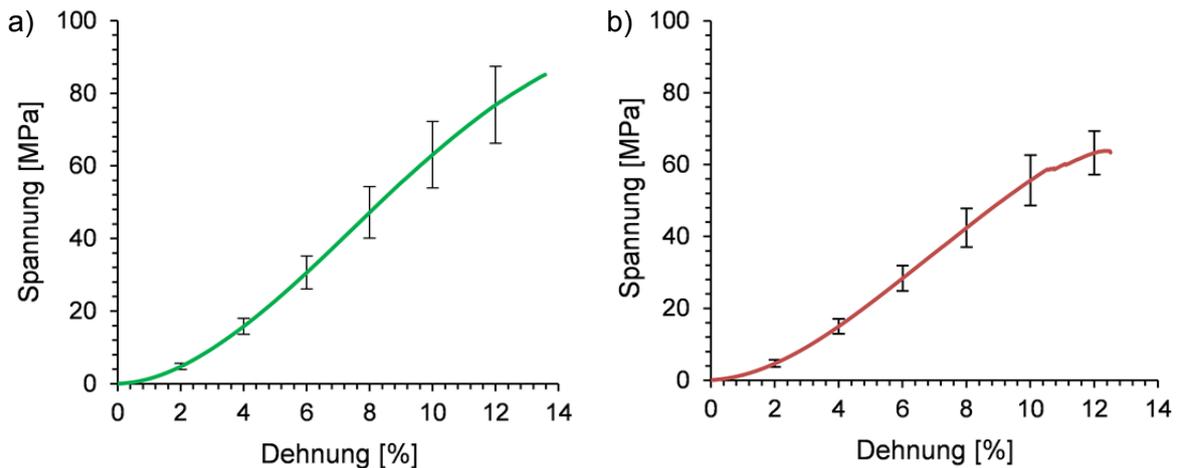


Abbildung 4.7: Darstellung des arithmetisch gemittelten Spannung-Dehnung-Verhaltens der a) equinen initial intakten und b) dezellularisierten OBS

Tabelle 4.1 zeigt die biomechanischen Materialkennwerte der initial intakten Kontrollgruppe sowie der dezellularisierten equinen OBS.

Tabelle 4.1: Darstellung der Kennwerte der equinen initial intakten Kontrollgruppe und der dezellularisierten OBS

Kennwert	Behandlungszustand	
	initial intakt	dezellularisiert
Rupturgrenze	9,47 ± 1,64 kN	7,07 ± 1,07 kN
Zugfestigkeit	85,12 ± 11,13 MPa	63,84 ± 5,52 MPa
Elastizitätsmodul	818 ± 94,09 MPa	714,26 ± 83,61 MPa
Toe-Dehnung	5,73 ± 0,43 %	5,05 ± 0,61 %
Rupturdehnung	13,57 ± 1,54 %	12,33 ± 0,35 %

Untersucht wurden die Zugfestigkeit, die als Rupturgrenze bezeichnete Maximalkraft, der Elastizitätsmodul, die Toe-Dehnung und die Rupturdehnung. Der Dezellularisierungsprozess sorgt für eine Abnahme der Zugfestigkeit um 25 %, eine Reduktion der Rupturdehnung um 9 % beim Erreichen der maximalen Belastbarkeit und einen Verlust der Stei-

figkeit (Elastizitätsmodul) von 12 %. Neben einer Betrachtung der klassischen Werkstoffkennwerte ist eine prozessbedingte Veränderung der Toe-Region zu verzeichnen, wodurch ein in der Literatur nicht verwendeter Kennwert eingeführt wird, der die Dehnung am Übergang in den linear-viskoelastischen Abschnitt beschreibt. Dieser als Toe-Dehnung bezeichnete Kennwert ist durch eine geringfügige Abnahme von 9 % charakterisiert.

Kapitel 2.3.1.2 beschreibt die aus der Literatur bekannten Kennwerte für den Elastizitätsmodul einer initial intakten equinen OBS, wobei bei der Recherche gezielt die mittels Tangentenmodul bestimmten Kennwerte betrachtet wurden. Die Zugfestigkeit wird aus dem Quotienten der Rupturgrenze und der mit Hilfe der ultrasonographischen Bildgebung gemessenen Ausgangsquerschnittsfläche im mittleren Metakarpalbereich berechnet. Abbildung 4.8 illustriert beispielhaft ein transversales Sonogramm an der zuvor beschriebenen Sehnenposition.

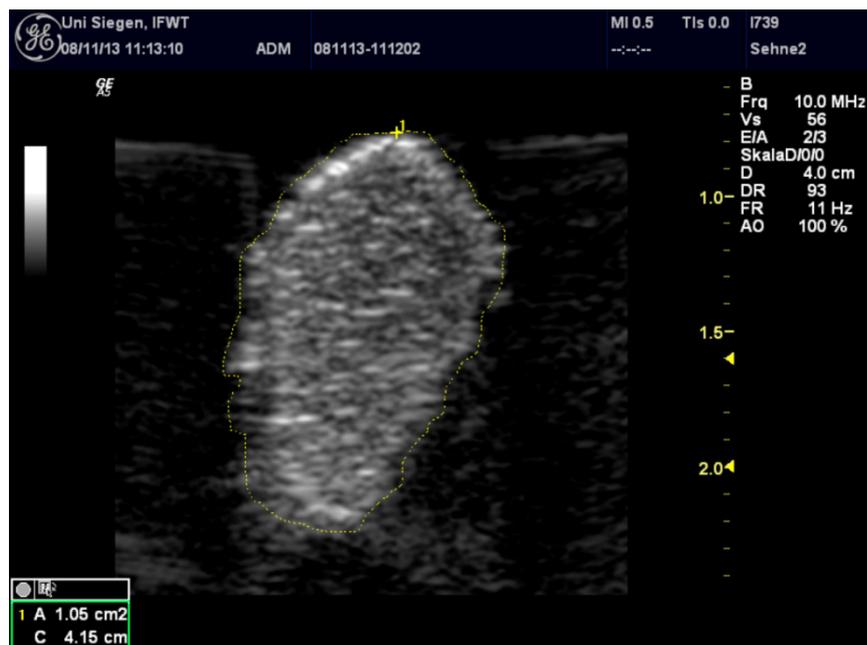


Abbildung 4.8: Transversales Sonogramm einer equinen OBS zur Bestimmung der intakten Querschnittsfläche im mittleren Metakarpalbereich (Pferd 1)

Die Ausgangsquerschnittsfläche A_0 wurde vor Versuchsbeginn bei einer konstant anliegenden Belastung von $F_z = 70$ N unter Anwendung des systeminternen Messtools des Ultraschallsystems definiert. Zusätzlich zur Ausgangsquerschnittsfläche wurde für jede Probe die Anfangsmesslänge l_0 zur nachfolgenden Dehnungsberechnung ermittelt. Dieser Wert beschreibt den Messabstand zwischen den beiden Sehneneinspannungen bei der zuvor beschriebenen identischen Vorlast.

4.4 Auswirkungen des Dezellularisierungsprozesses auf das Werkstoffverhalten equiner oberflächlicher Beugesehnen unter zyklischer Beanspruchung

Die Ermüdungsversuche an den dezellularisierten sowie initial intakten equinen OBS dienten der Analyse des Schädigungsverhaltens, wobei insbesondere die Position der Schädigungsentstehung und die fortschreitende Entwicklung der Läsion ultrasonographisch detektiert wurden. In den nachfolgenden Kapiteln werden das Wechselverformungsverhalten, die ultrasonographische Charakterisierung sowie die morphologische Bewertung der vorliegenden Kollagenstruktur evaluiert, um eine zuverlässige Aussage über den Schädigungsprozess zu erhalten.

4.4.1 Wechselverformungsverhalten

Die in dem Kapitel 4.3 beschriebenen Zugversuche dienten nicht nur der Ergründung des Einflusses des Dezellularisierungsprozesses auf das biomechanische Materialverhalten, sondern boten mit der Bestimmung der Zugfestigkeit die Grundlage für eine Definition des ersten Spannungshorizontes für die zyklischen Versuchsreihen. In Anlehnung an die in den Grundlagen dargelegten wissenschaftlichen Arbeiten von Schechtman et al. [294, 295] und Shepherd et al. [292, 293] wurden 50 % der Zugfestigkeit als Ausgangspunkt für den ersten Spannungshorizont gewählt. Um den Alterungsprozess der Sehne nicht zu stark in das Resultat einfließen zu lassen, wurde in Form eines Laststeigerungsversuches die Belastung auf die Sehne in einem Zyklusintervall von 10^5 Lastspielen um jeweils 10 % erhöht, bis eine Ruptur der Sehne erreicht wurde. Für die Untersuchungen standen drei Pferde zur Verfügung, an denen in identischer Vorbereitungsprozedur, wie bei den statischen Versuchsreihen, beide OBS der vorderen Extremitäten entnommen und anschließend vorbereitet wurden.

Abweichend von den im vorherigen Kapitel visualisierten Ergebnissen der monoton belasteten Sehnen in einem gemeinsamen Spannung-Dehnung-Diagramm werden nun die möglichen prozessbedingten Auswirkungen der Dezellularisierung auf das Wechselverformungsverhalten gesondert innerhalb eines Tieres betrachtet. Abbildung 4.9 illustriert vier Wechselverformungsdiagramme der initial intakten Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4.9 a), c)) sowie des dezellularisierten Zustandes (siehe Abbildung 4.9 b), d)) der Pferde 7 und 9. Es werden gezielt die OBS der genannten Pferde in der Ergebnisdarstellung illustriert, da diese dem gleichen Geschlecht und einer vergleichbaren Altersgruppe entsprechen.

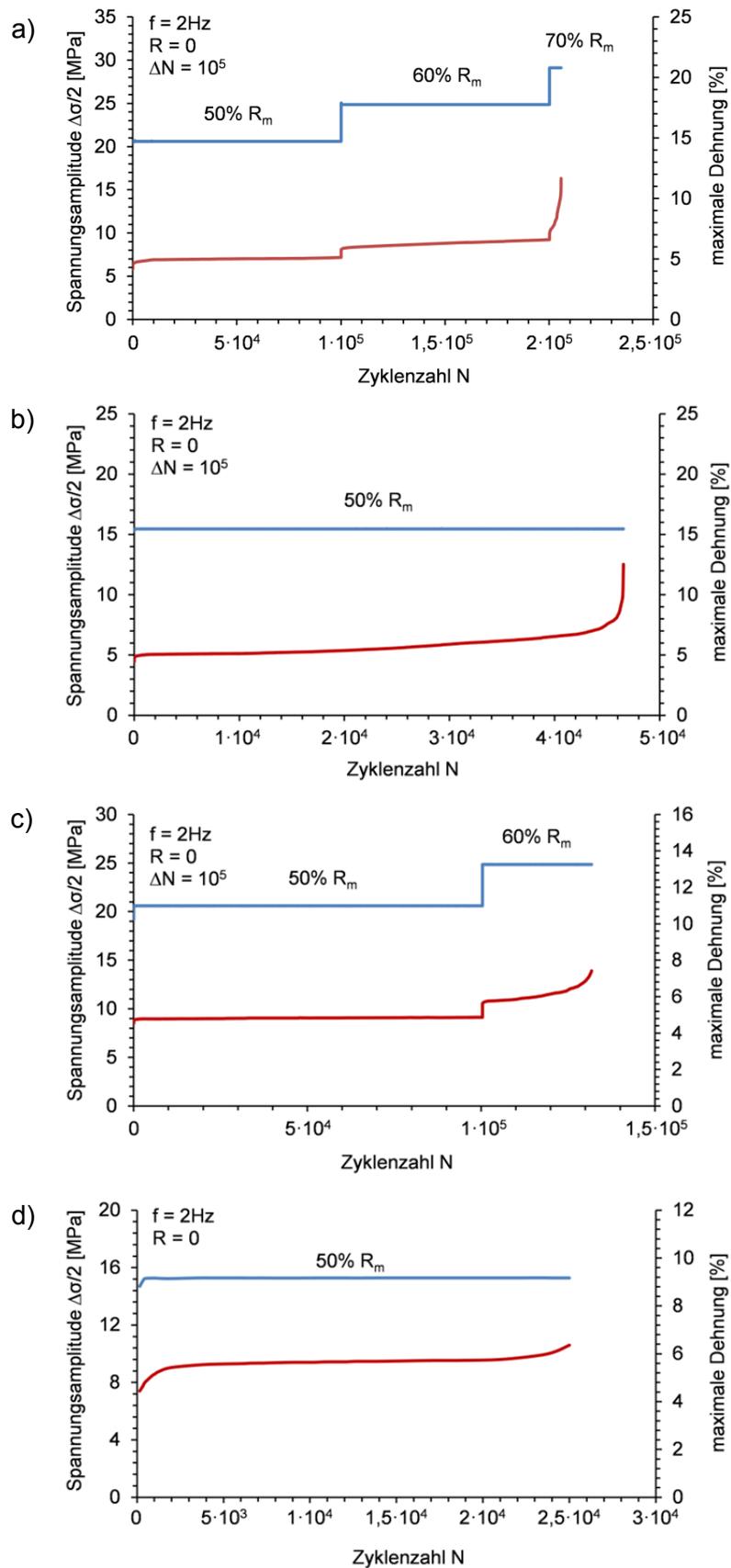


Abbildung 4.9: Wechselverformungskurven der equinen OBS von Pferd 7 (a) initial intakt, b) dezellularisiert) und Pferd 9 (c) initial intakt, d) dezellularisiert)

Die Wechselverformungskurven des Pferdes 8 wurden aus Platzgründen nicht explizit aufgeführt, da diese keine neuen Erkenntnisse beinhalten würden und zusätzlich mit einem Alter des Tieres von vier Jahren eine abweichende Kategorie bilden. Für eine Untermuerung der Ergebnisdarstellung wird jedoch die erreichte Bruchzyklenzahl für jede Sehne tabellarisch angegeben. Tabelle 4.2 veranschaulicht nach dem zuvor beschriebenen Ansatzpunkt die Definition der Spannungshorizonte und die erreichte Bruchzyklenzahl der jeweiligen Versuchsproben.

Tabelle 4.2: Darstellung der ermüdeten OBS und der erreichten Bruchzyklenzahl

Probennummer	Pferd	Spannungshorizont	Bruchzyklenzahl
S21 (initial intakt)	Pferd 7	42,56 MPa (50 % R_m)	205749
		51,07 MPa (60 % R_m)	
		59,58 MPa (70 % R_m)	
S22 (dezellularisiert)		31,92 MPa (50 % R_m)	46554
S23 (initial intakt)	Pferd 8	42,56 MPa (50 % R_m)	77512
S24 (dezellularisiert)			31,92 MPa (50 % R_m)
S25 (initial intakt)	Pferd 9	42,56 MPa (50 % R_m)	132536
S26 (dezellularisiert)		31,92 MPa (50 % R_m)	25096

Die Ermüdungsversuche wurden im Zugschwellbereich ($R = 0$) bei einer konstanten Frequenz von 2 Hz bis zur Ruptur der Sehne durchgeführt. Die blaue Linienführung (siehe Abbildung 4.9) kennzeichnet die auf die Probe wirkende Spannungsamplitude $\Delta\sigma/2$, die aus dem zugeordneten Spannungshorizont gebildet wird und das rote Pendant die Werkstoffantwort.

Die Wechselverformungskurven der untersuchten OBS verdeutlichen eine kontinuierliche zyklische Entfestigung bis zum Erreichen des nachfolgenden Spannungshorizontes beziehungsweise bis zum Erreichen der totalen Sehnenruptur. Detailliert betrachtet zeigt sich bei allen Pferden eine deutlich geringere Lebensdauer der dezellularisierten OBS im Vergleich zu der initial intakten Kontrollgruppe. Bei Sehne S25 (Pferd 9) musste die Belastung nach 10^5 Zyklen, bei Sehne S21 (Pferd 7) sogar nach 2×10^5 Lastspielen erneut erhöht werden, ohne durch einen fortgeschrittenen Alterungsprozess, sondern durch die anwachsende Belastung eine Ruptur der Kollagenstruktur erzielen zu können.

Im Nachfolgenden werden die detaillierten Ergebnisdarstellungen auf Pferd 7 bezogen, welche Erkenntnisse jedoch repräsentativ für die weiteren Proben interpretiert werden können. Die vergrößerte Darstellung des Verformungsverhaltens der ersten 5000 Zyklen, sowie die nach der ersten Haltezeit der initial intakten OBS mit erhöhter Spannungs-

amplitude erreichten Charakteristika, werden in Abbildung 4.10 illustriert.

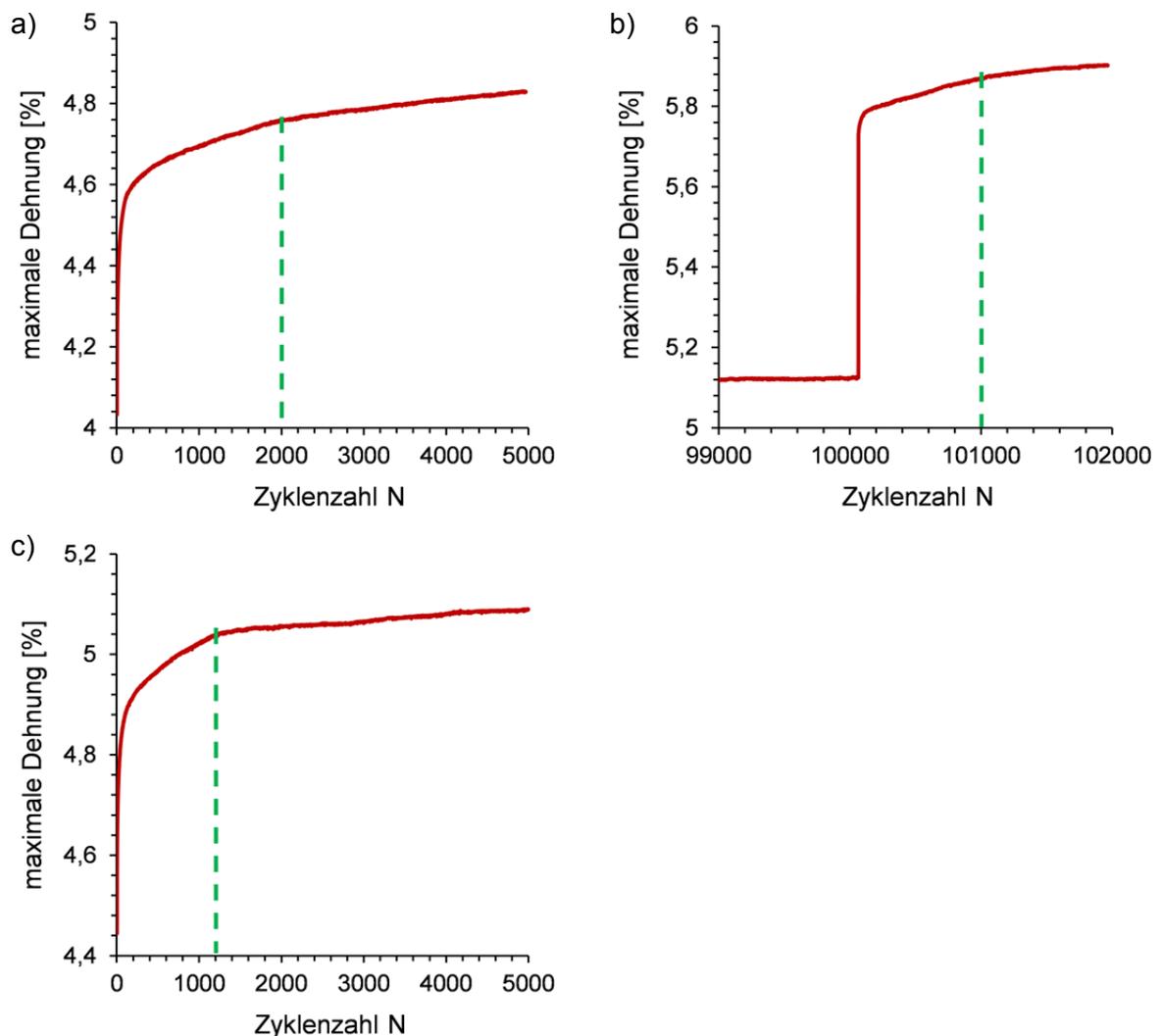


Abbildung 4.10: Wechselverformungsverhalten der a), b) initial intakten OBS (S21) und der c) dezellularisierten OBS (S22). Die grüne Linie kennzeichnet den Beginn des linearen Verformungsverhaltens mit zunehmender Zyklenzahl

Der bereits aus Kapitel 2.3.2 bekannte Mullins-Effekt, der eine materialbedingte Entfestigung vorzugsweise in den ersten Lastzyklen beinhaltet, konnte auch an diesen Untersuchungen nachgewiesen werden. Bis zu dem Erreichen des linearen Verformungsverhaltens ist ein konkaver Linienvverlauf erkennbar, der durch den Dezellularisierungsprozess bereits nach 1200 Lastspielen (siehe Abbildung 4.10 c)) abgeschlossen ist. Die Sehne S21 weist dieses Materialverhalten erst nach 2000 Lastspielen (Abbildung 4.10 a)) auf. Der Mullins-Effekt kann nach einer Ruhephase und der darauffolgenden Erhöhung der Spannungsamplitude $\Delta\sigma/2$ in einem abgeschwächten Ausmaß reproduziert werden (siehe Abbildung 4.10 b)).

Die Darstellung von vier Spannung-Dehnung-Hysteresen (S21) bei der kennzeichnenden Spannungsamplitude von $\Delta\sigma/2 = 22 \text{ MPa}$ (siehe Abbildung 4.11) verdeutlicht eine Zunahme der Dehnungsschwingbreite $\Delta\varepsilon$ und des Elastizitätsmoduls E in dem zugbelasteten Hystereseast verbunden mit einer kontinuierlichen Abnahme der Schwingbreite der linear-viskoelastischen Dehnung $\Delta\varepsilon_{iv}$ mit fortschreitender Zyklenzahl.

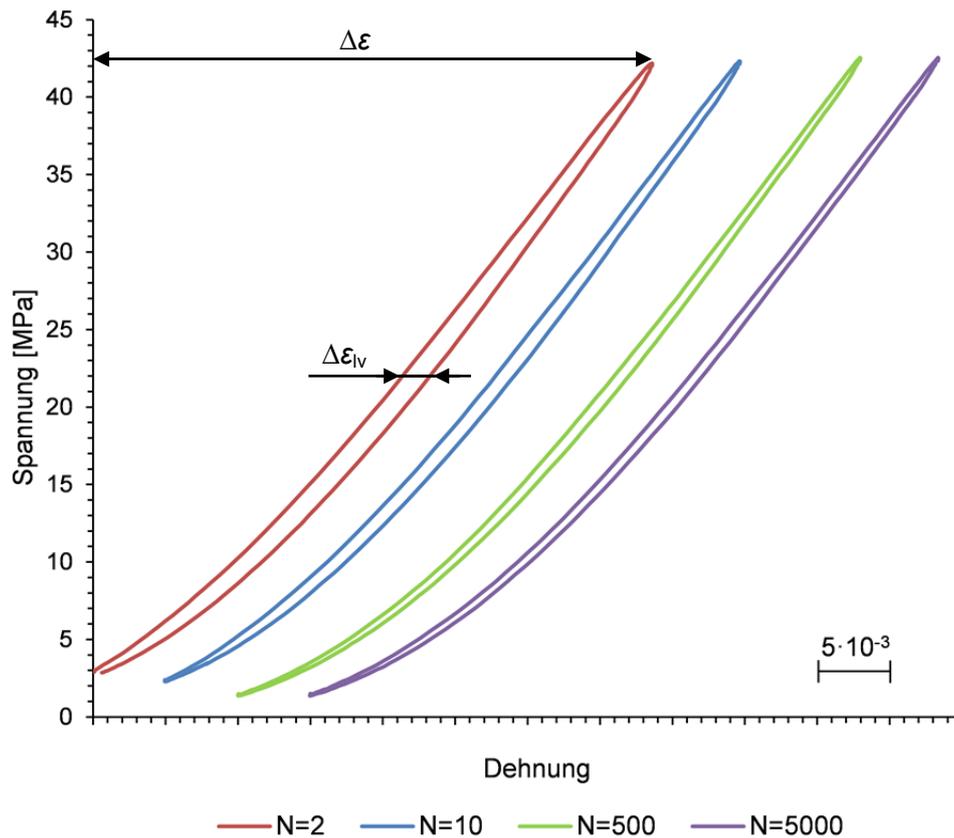


Abbildung 4.11: Darstellung von vier Spannung-Dehnung-Hysteresen (S21) bei einer Spannungsamplitude von $\Delta\sigma/2 = 22 \text{ MPa}$ und charakteristischen Lastspielzahlen

Zusätzlich zu der besagten Anordnung zeigt Abbildung 4.12 die Zyklen 2 und 3 farblich abgetrennt, jedoch fortlaufend umgesetzt, in zwei Hystereseschleifen.

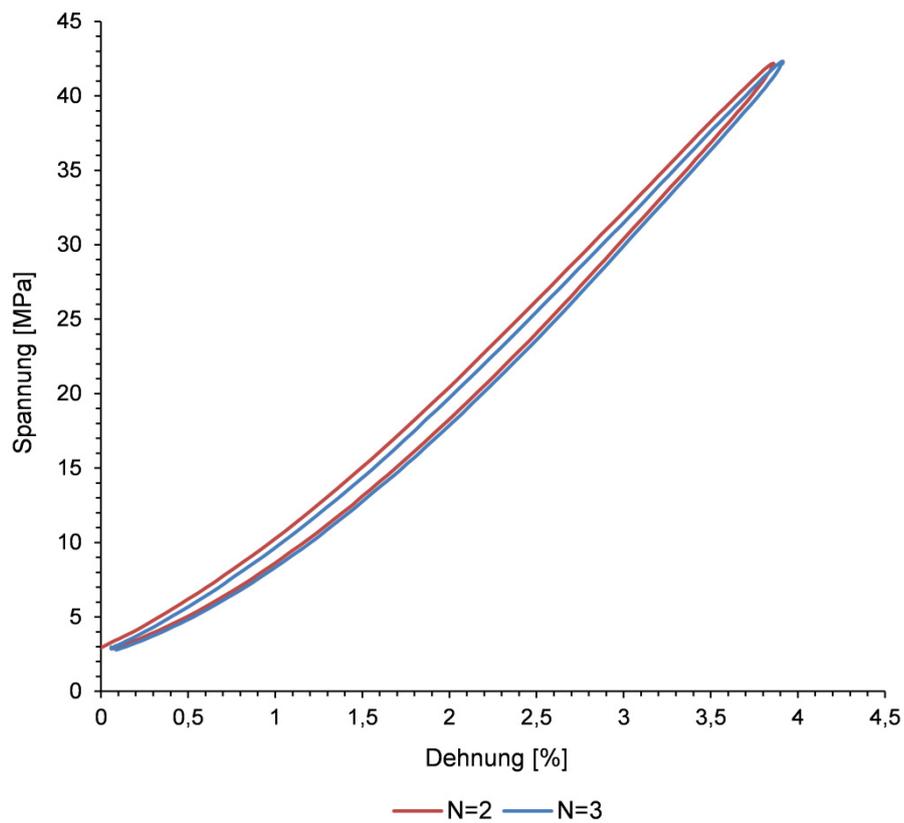


Abbildung 4.12: Spannung-Dehnung-Hysteresis der Zyklen 2 und 3 (S21)

Eine Zunahme der Maximaldehnung innerhalb eines Zyklus um 0,1 % ist in diesem frühen Stadium der Verformung deutlich zu erkennen. Abbildung 4.13 illustriert den Verlauf des Elastizitätsmoduls über der Zyklenzahl und vertieft die zuvor getätigte Aussage.

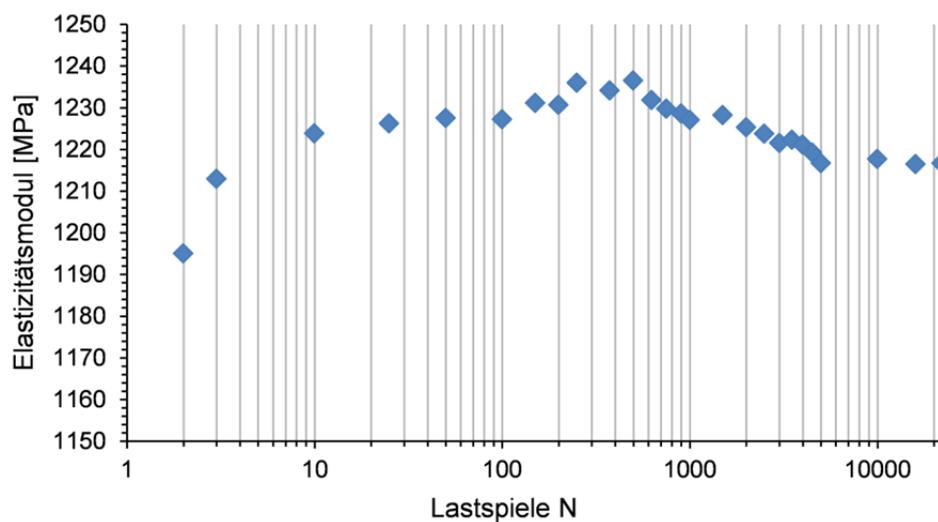


Abbildung 4.13: Verlauf des Elastizitätsmoduls über der Zyklenzahl der initial intakten equinen OBS (S21)

Beginnend mit der Betrachtung der initial intakten Kontrollgruppe zeigt sich eine Zunahme der Steifigkeit bis zu einem Maximalwert von 300 - 500 Zyklen. Dieser Werkstoffkennwert unterscheidet sich maßgeblich von der Steifigkeit der dezellularisierten OBS (siehe Abbildung 4.14). Der Verlauf von Sehne S22 verdeutlicht eine Zunahme der Steifigkeit bis zu einem Peak des Elastizitätsmoduls bei bereits drei Lastspielen, bevor eine kontinuierliche Entfestigung, bedingt durch zyklisches Kriechen, mit einem sich anschließenden Sättigungscharakter bis zur Ruptur der Sehne, belegbar ist.

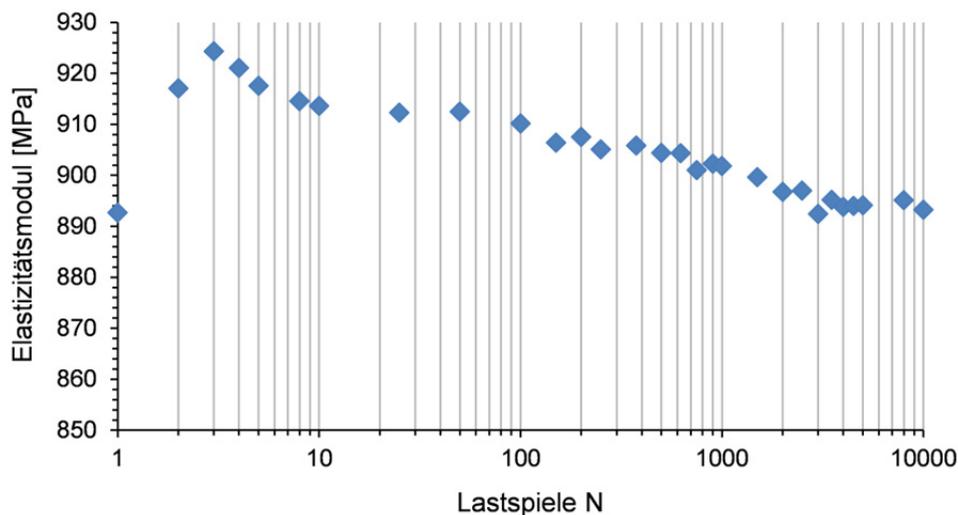


Abbildung 4.14: Verlauf des Elastizitätsmoduls über der Zyklenzahl der dezellularisierten OBS (S22)

4.4.2 Ultrasonographische Charakterisierung

Das Kapitel 4.2 hat gezeigt, dass das zyklische Verformungsverhalten und der Verlauf des Schädigungsprozesses bis zur vollständigen Ruptur der Sehne quantitativ visualisiert werden kann. Eine Lokalisation der Schädigungsentstehung sowie die Entwicklung einer Läsion konnte jedoch nicht differenziert werden. Mit Hilfe bildgebender Verfahren wie der Sonographie war es nun möglich, durch die Integration der Ultraschallsonden in das Umgebungsbad in unmittelbarer Sehnennähe, transversale sowie longitudinale Aufnahmen zu tätigen und in mehrstündigen Versuchen die Strukturveränderungen, bedingt durch die äußere Krafteinwirkung, zu verfolgen. Sowohl die Literaturerkenntnisse [16, 100] als auch die Zugversuche im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit zeigen verstärkt eine Läsion lokalisiert im mittleren Metakarpalbereich der equinen OBS. Aus diesem Grund war es notwendig, gezielt diesen Versagensabschnitt über den gesamten Versuchszeitraum zu betrachten. Über die äußere Verstellmöglichkeit in alle drei Raumrichtungen der innerhalb der Flüssigkeitsumgebung befindlichen Ultraschallsonden wird trotz der geringen Schall-

fläche eine vollständige Beschallung der Kollagenstruktur ermöglicht. Dies ist auch notwendig, um nach der Definition der Vorlaufstrecke nicht nur entlang der Sehnenlängsachse, sondern auch ausgehend von der Sagittalebene, die Struktur lateral zu erforschen. Während bei den monotonen Versuchsreihen ein transversales Sonogramm die zentrale Läsion visualisieren konnte, führten die longitudinalen Aufnahmen bei den durchgeführten Ermüdungsversuchen zu einer aussagekräftigeren Ergebnisdarstellung. Abbildung 4.15 zeigt die aus dem vorherigen Kapitel bekannte Wechselverformungskurve der initial intakten Sehne (S21) im Zusammenhang mit den anhand der Sonogramme erkennbaren Schädigungsverläufen.

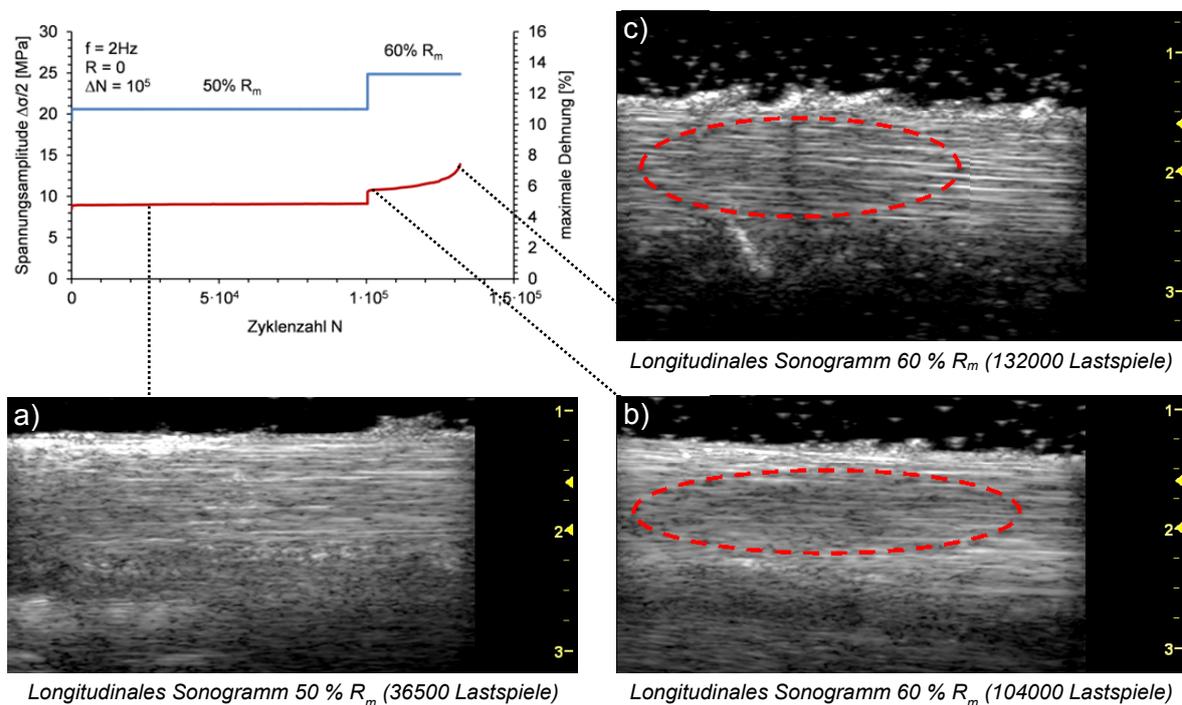


Abbildung 4.15: Visualisierung des Schädigungszustands einer initial intakten OBS (S25) an charakteristischen Lastspielpositionen mit Hilfe von longitudinalen Sonogrammen

Das longitudinale Sonogramm (siehe Abbildung 4.15 a)) illustriert bei einer Spannungsamplitude von $\Delta\sigma/2 = 22$ MPa (50 % der statisch bestimmten Zugfestigkeit) und 36500 Lastspielen eine homogene Echogenität über den vollständigen Längsschnitt der Sehne. Zonen mit geringgradiger Hypoechogenität bis hin zu einem überwiegend anechogenen Verhalten, die eine für eine Läsion charakteristische Hohlraumbildung verbunden mit einer eingedrungenen Umgebungsflüssigkeit vermuten lassen, sind zu erkennen. Hyperechogene Abschnitte an dem Übergang der Kollagenstruktur zur Umgebungsflüssigkeit resultieren aus dem Impedanzunterschied von der äußeren Bindegewebsoberflä-

che zur NaCl-Lösung, was einen hohen Reflexionsgrad der emittierten Schallwellen zur Folge hat. Unmittelbar nach der Laststeigerung war ab einer Zyklenzahl von 104000 Lastspielen eine Zunahme der anechogenen Zonen im zentralen Sehnenareal zu erkennen (siehe Abbildung 4.15 b)), welcher Zustand wie folgt mit einem definierten Echogenität Grad 1 - 2 bewertet werden kann. Die Läsion breitete sich mit fortlaufender Zyklenzahl bis zur Ruptur (Echogenität Grad 3) über die vollständige Sehnenlängsachse aus (siehe Abbildung 4.15 c)). Unmittelbar vor der Ermüdung der Sehne wurde das longitudinale Sonogramm bei 132000 Zyklen aufgezeichnet. Eine Aufweitung der anechogenen Teilbereiche bis in die peripheren Zonen ist nun erkennbar und sorgt in diesen Abschnitten für einen Strukturverlust, der schlussendlich in einer Ruptur der Sehne endet.

Eine Verknüpfung der longitudinalen Sonogramme mit der bereits bekannten Wechselverformungskurve des dezellularisierten Pendants lieferte bei einer definierten Spannungsamplitude von 16 MPa (50 % der statisch bestimmten Zugfestigkeit) folgende Erkenntnisse (siehe Abbildung 4.16).

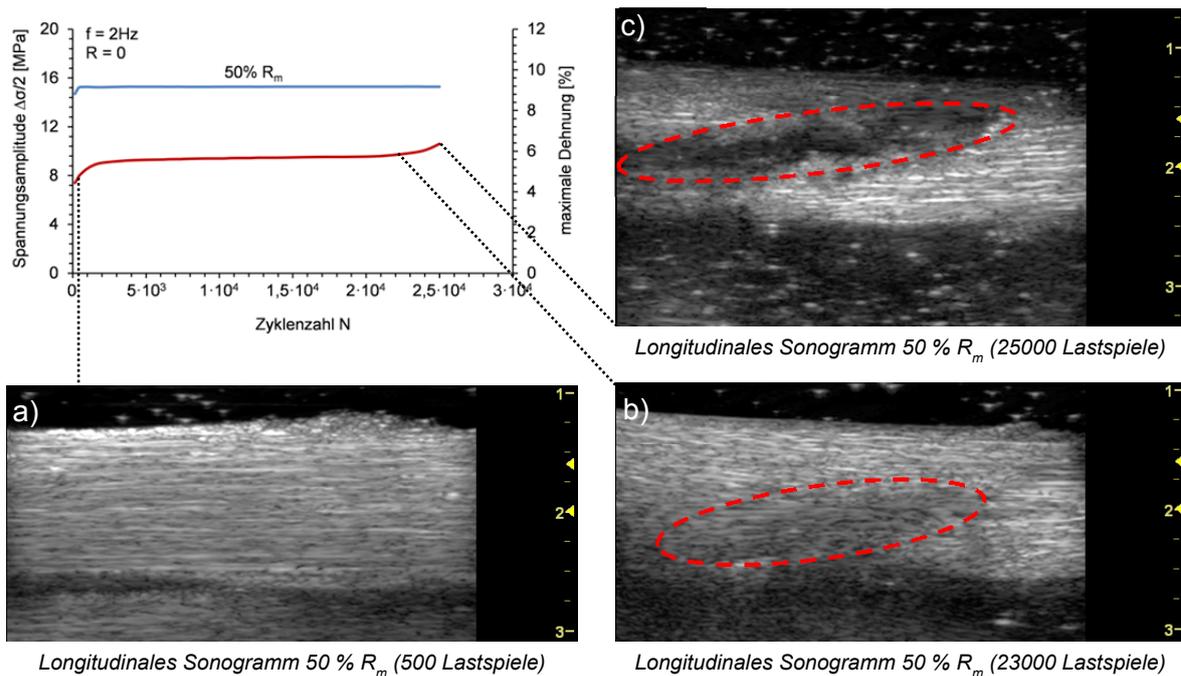


Abbildung 4.16: Visualisierung des Schädigungszustands einer dezellularisierten OBS (S26) an charakteristischen Lastspielpositionen mit Hilfe von longitudinalen Sonogrammen

Parallel zu den zuvor beschriebenen lokalen Läsionen der initial intakten Kontrollgruppe zeigt sich ein vergleichbares Schädigungsverhalten anhand der longitudinalen Sonogramme. Bei 500 Lastspielen ist eine homogene Echogenität verbunden mit den bekann-

ten hyperechogenen Erscheinungen im peripheren Areal an der Schalleintrittsseite zu verzeichnen (siehe Abbildung 4.16 a)). Mit zunehmender Zyklenzahl ($N = 23000$) ist eine geringgradig hypoechogene Zone (Echogenität Grad 1) in Richtung des zentralen Areals erkennbar (siehe Abbildung 4.16 b)), die bis zum Erreichen von $2,5 \cdot 10^4$ Zyklen als anechogene Kernläsion (Echogenität Grad 3) die vollständige Ruptur einleitet (siehe Abbildung 4.16 c)).

4.4.3 Morphologische Bewertung

Die morphologische Untersuchung des rupturierten Gewebes im direkten Anschluss an die Ermüdungsversuche dient der makroskopischen Bewertung des läsionierten Abschnitts, um die Erkenntnisse aus den ultrasonographischen Untersuchungen evaluieren zu können. Eine Verwendung der Sehne nach der morphologischen Analyse ist bedingt durch die Zerstückelung des Prüflings in 5 mm breite Abschnitte nicht möglich, weshalb sämtliche ultrasonographischen Nachuntersuchungen zuvor abgeschlossen sein müssen. Neben einem Vergleich der realen Defektstruktur mit den zuvor aufgenommenen Sonogrammen bietet die Morphologie zusätzlich eine Bewertungsgrundlage für eine durch das Einspannsystem entstandene mögliche Schädigungseinleitung. Dieser Einfluss würde die Versuchsergebnisse maßgeblich beeinträchtigen. Abbildung 4.17 zeigt die für die morphologische Betrachtung präparierten Sehnen in dezellularisierter und initial intakter Form.

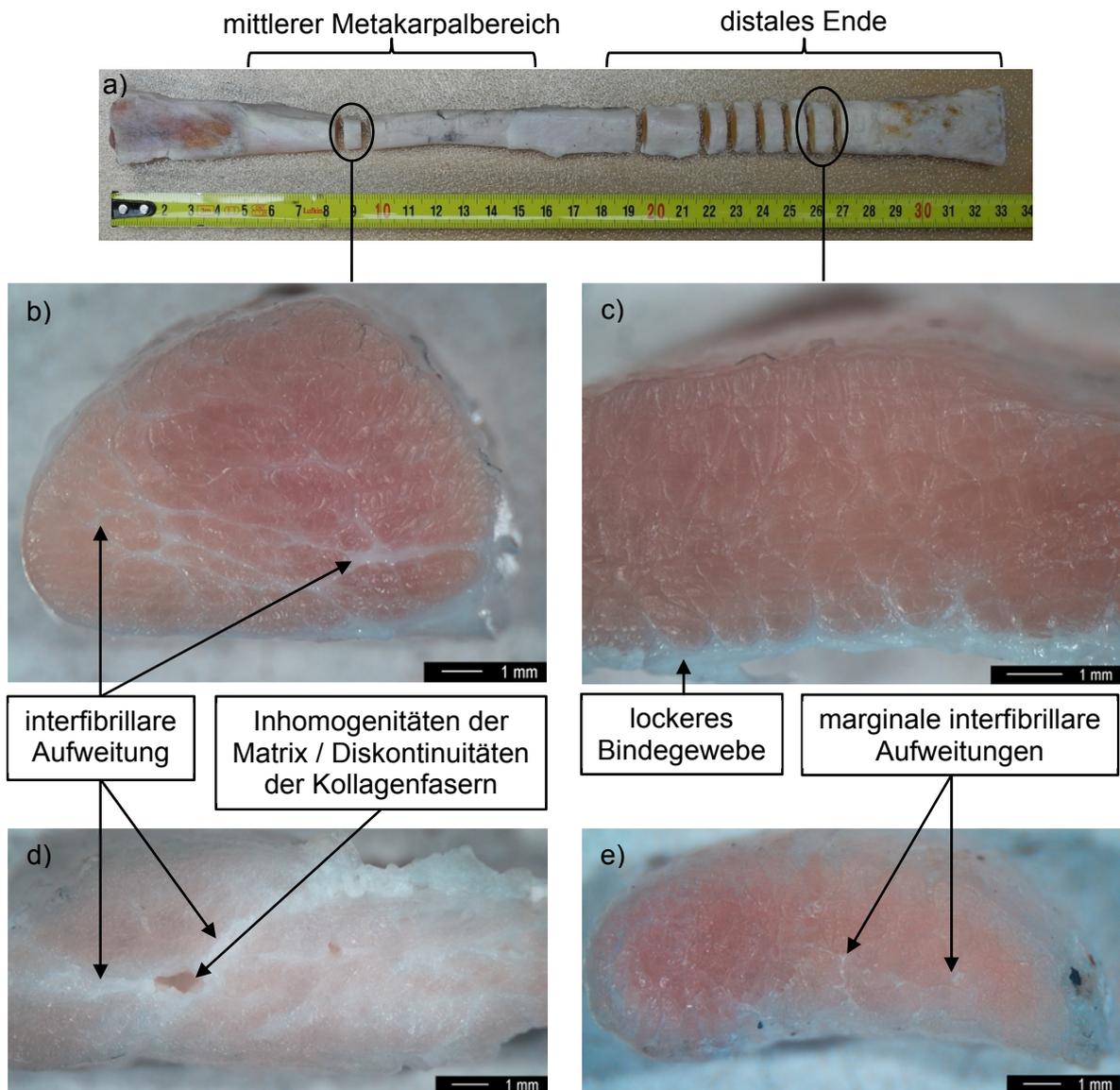


Abbildung 4.17: Auswirkung der zyklischen Belastung auf die Gewebestruktur einer a), b), c) initial intakten OBS (S25) und einer d), e) dezellularisierten OBS (S22) an den identischen Positionen

Die Zerstückelung des Prüflings am distalen Sehnenende, sowie im mittleren Metakarpalbereich, soll durch den unmittelbaren Gewebevergleich die Schädigung der Kollagenstruktur offenlegen. Wie zuvor wurde dabei zwischen den initial intakten und den dezellularisierten OBS unterschieden. Beginnend mit der unbehandelten Kontrollgruppe verdeutlichte die Morphologie eine interfibrillare Aufweitung der extrazellulären Matrix in der zentralen bis peripheren Zone des mittleren Metakarpalbereichs (siehe Abbildung 4.17 b)). Die distale Struktur zeigte eine homogene Faserverteilung ohne die in der Schädigungszone vorgefundenen Gewebeveränderungen. Lediglich im Randbereich des transversalen Gewebeschnittes ist an der Sehnenoberfläche lockeres Bindegewebe zu erkennen, was je-

doch keine Strukturschädigung beschreibt (siehe Abbildung 4.17 c)). Demgegenüber verdeutlichen die morphologischen Untersuchungen der vor Versuchsbeginn dezellularisierten Sehne bereits im Bereich des distalen Sehnenendes eine marginale interfibrillare Aufweitung der extrazellulären Matrix (siehe Abbildung 4.17 e)). Im mittleren Metakarpalbereich ist die Schädigung deutlich zu erkennen. Neben offensichtlichen Inhomogenitäten der Matrix sind Diskontinuitäten der Kollagenfasern zu identifizieren, die einen Strukturverlust der Sehne veranschaulichen (siehe Abbildung 4.17 d)). Die zuvor beschriebenen interfibrillaren Veränderungen sind im mittleren Metakarpalbereich im Vergleich zur initial intakten Kontrollgruppe an der identischen Position in einer ausgeprägteren Form erkennbar.

4.5 *In situ* Untersuchungen an equinen Faszikeln aus zentralen und peripheren Faserarealen

Die in den vorherigen Kapiteln gezeigten Ergebnisdarstellungen konnten das Ermüdungsverhalten nicht nur quantitativ bewerten, sondern eine Lokalisation einer Ruptur sowie die Betrachtung des Schädigungsverlaufs bis zum Versagen der Struktur waren ohne Einschränkungen möglich. Um die Mechanismen zu ergründen, die eine Schädigungsentstehung außerhalb einer schlagartigen externen Einwirkung begünstigen, wurden *in situ* Untersuchungen an equinen Faszikeln getätigt. Da die Ultrasonographie aufgrund ihres begrenzten Auflösungsvermögens von 300 µm Strukturveränderungen an den Kollagenfasern in ihrer Entstehung nicht darstellen kann, wurde zur Charakterisierung der in Kapitel 3.2.2 vorgestellte Aufbau im Zusammenhang mit einem Durchlicht-Polarisationsmikroskop angewendet. Die nachfolgenden Kapitel zeigen beginnend mit einer Charakterisierung der Kollagenstruktur eine Analyse des Verformungsverhaltens zentraler sowie peripherer Faserareale entnommen aus dem mittleren Metakarpalbereich equiner OBS. In Anlehnung an Ho et al. [440] und deren Untersuchungen an humaner Kornea wurde die Art der örtlichen Positionsbeschreibung auf die Sehnenquerschnittsfläche übertragen. Abbildung 4.18 visualisiert schematisch, neben der Einteilung des peripheren sowie zentralen Abschnitts, die Entnahmepositionen der Faszikelproben (P1 – 5; Z1 – 5) für die biomechanischen Untersuchungen.

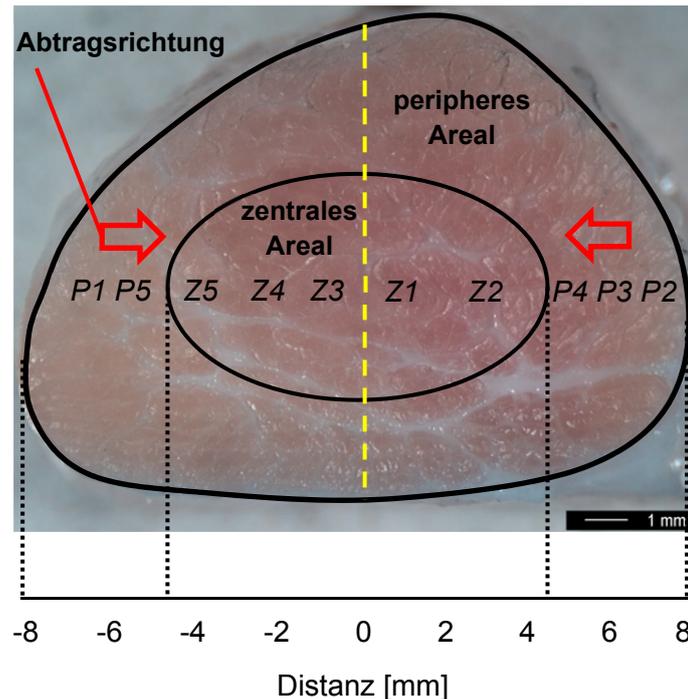


Abbildung 4.18: Schematische Einteilung der Entnahmepositionen im transversalen Sehnenquerschnitt

Diese Einteilung der Sehnenquerschnittsfläche ist für das Verständnis der nachfolgenden Kapitel unumgänglich. Nach einem Sagittalschnitt (gelbe Linie) wird die orthogonal zur transversalen Fläche generierte Ebene auf den Träger des Kryomikrotoms aufgebracht und ausgehend von dem Endotenonium in Richtung der Sagittalebene (rote Pfeile) mit dem Abtrag der peripheren Proben begonnen, bevor nach einem mehrmaligen Schnittabtrag das zentrale Areal erreicht wird.

4.5.1 Charakterisierung der Crimp-Struktur

Für eine aussagekräftige Charakterisierung der Crimp-Struktur, insbesondere der Crimp-Länge sowie des Crimp-Winkels, wurde das in den Grundlagen dieser wissenschaftlichen Arbeit beschriebene Verfahren nach Diamant et al. [38] verwendet. Abweichend von bereits bestehenden Untersuchungen zur Definition der Crimp-Struktur (siehe Tabelle 2.3), die jedoch ohne deklarierte Belastungsvorgabe an den Sehnensegmenten durchgeführt wurden, bildet der im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit konstruierte Versuchsaufbau reproduzierbare und gleichzeitig realitätsnahe Erkenntnisse.

Für die Versuchsreihen standen acht equine OBS im initial intakten Zustand zur Verfügung. Um das Verformungsverhalten vorzugsweise in der Schädigungszone bestimmen zu können, wurden mittels transversalen Schnittes 10 mm lange Sehnensegmente aus

dem mittleren Metakarpalbereich entnommen. Eine Unterteilung jedes Segmentes in periphere sowie zentrale Abschnitte gewährleistet eine Evaluierung der Strukturunterschiede entlang der Querschnittsfläche. Die mit Hilfe des Kryomikrotoms definierte Probengeometrie vermindert den Einfluss von anatomischen Irregularitäten und bildet die Grundlage für eine aufschlussreiche Ergebnisdarstellung des Verformungsverhaltens.

Nach dem erfolgreichen Einspannvorgang der zu untersuchenden Faszikel wurden die Crimp-Charakteristika bei verschiedenen Spannungshorizonten aufgezeichnet. Die wegeregelte Steuerung des Belastungssystems ermöglicht eine vordefinierte Versuchsdurchführung unter einer kontrollierten Belastung. Eine eigens für die Bedienung des Belastungssystems gestaltete Software auf Basis einer LabVIEW-Programmierung ermöglicht über die Schrittmotoransteuerung einen präzisen Vorschub der Probe. Für die Versuchsdurchführung ist ein translatorisches Vorschubintervall von 0,1 mm für eine aussagekräftige Ergebnisdarstellung sinnvoll.

Ausgehend von dem Beanspruchungsbeginn der Faszikel konnten bis zur Ruptur der Fasersegmente homogene Verschiebungspunkte für eine Visualisierung der Entwicklung der Crimp-Struktur festgelegt werden. Wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben ist durch eine Rotation des Mikroskoptisches jeweils die Dunkelfeldansicht beider Steigungsflächen zu bestimmen, woraus der Crimp-Winkel errechnet werden kann. Der transmittierte Lichtanteil ist durch eine maximale Helligkeitsdarstellung charakterisiert und die parallel zur Durchlassrichtung eines der Polarisationsfilter angeordneten Fibrillen kennzeichnen die lichtschwachen Abschnitte.

Abbildung 4.19 verdeutlicht die zur Bestimmung des Crimp-Winkels unabdingbaren Hell- bzw. Dunkelfelder an den Steigungsflächen der Gewebestruktur zu Belastungsbeginn. Abbildung 4.20 zeigt hingegen die Entwicklung der Crimp-Struktur in einem belasteten Zustand.

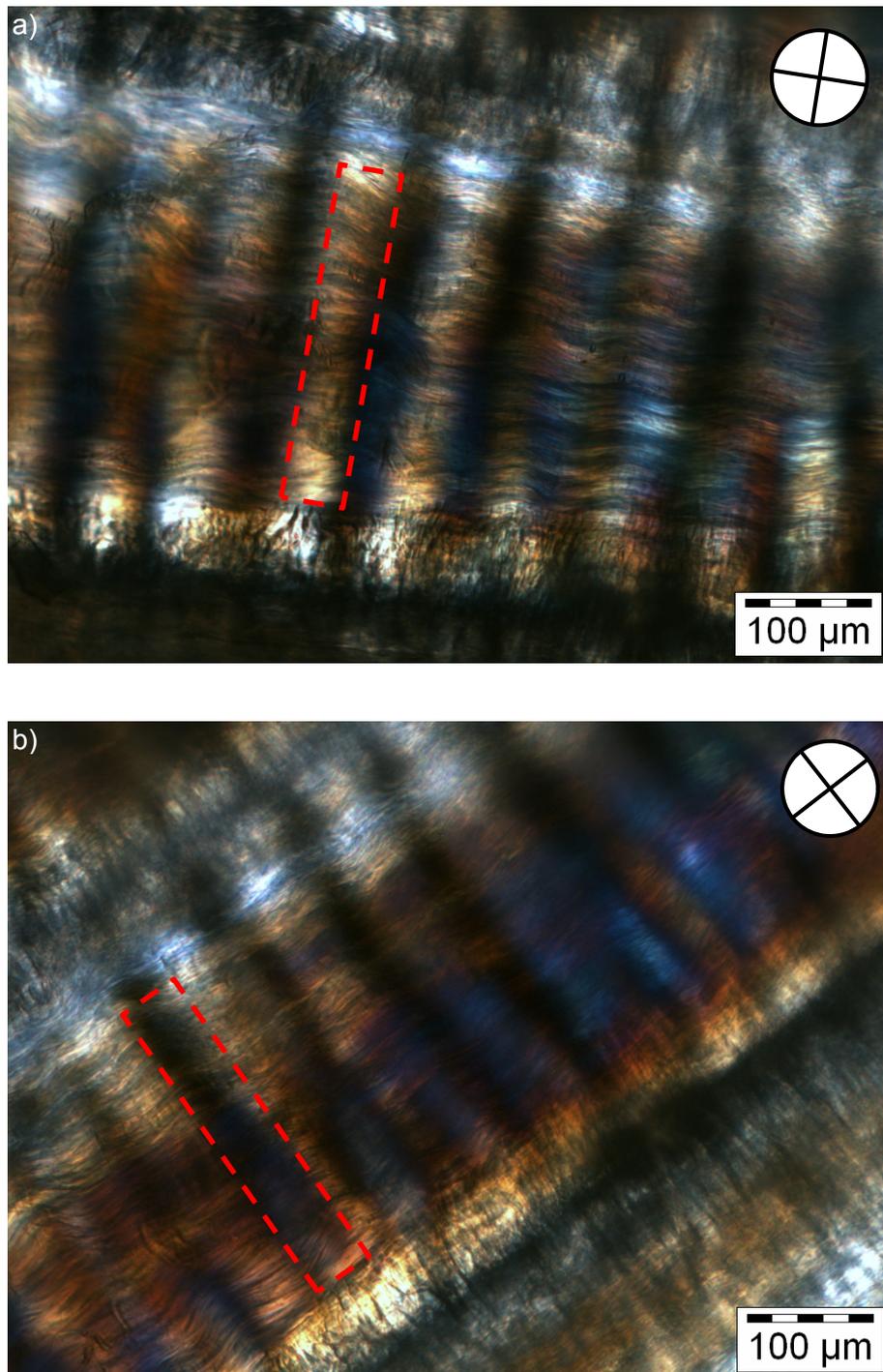


Abbildung 4.19: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Probe P2 (periphere Zone) in der a) Hell- und b) Dunkelfeldansicht zur Charakterisierung des Crimp-Winkels im unbelasteten Zustand

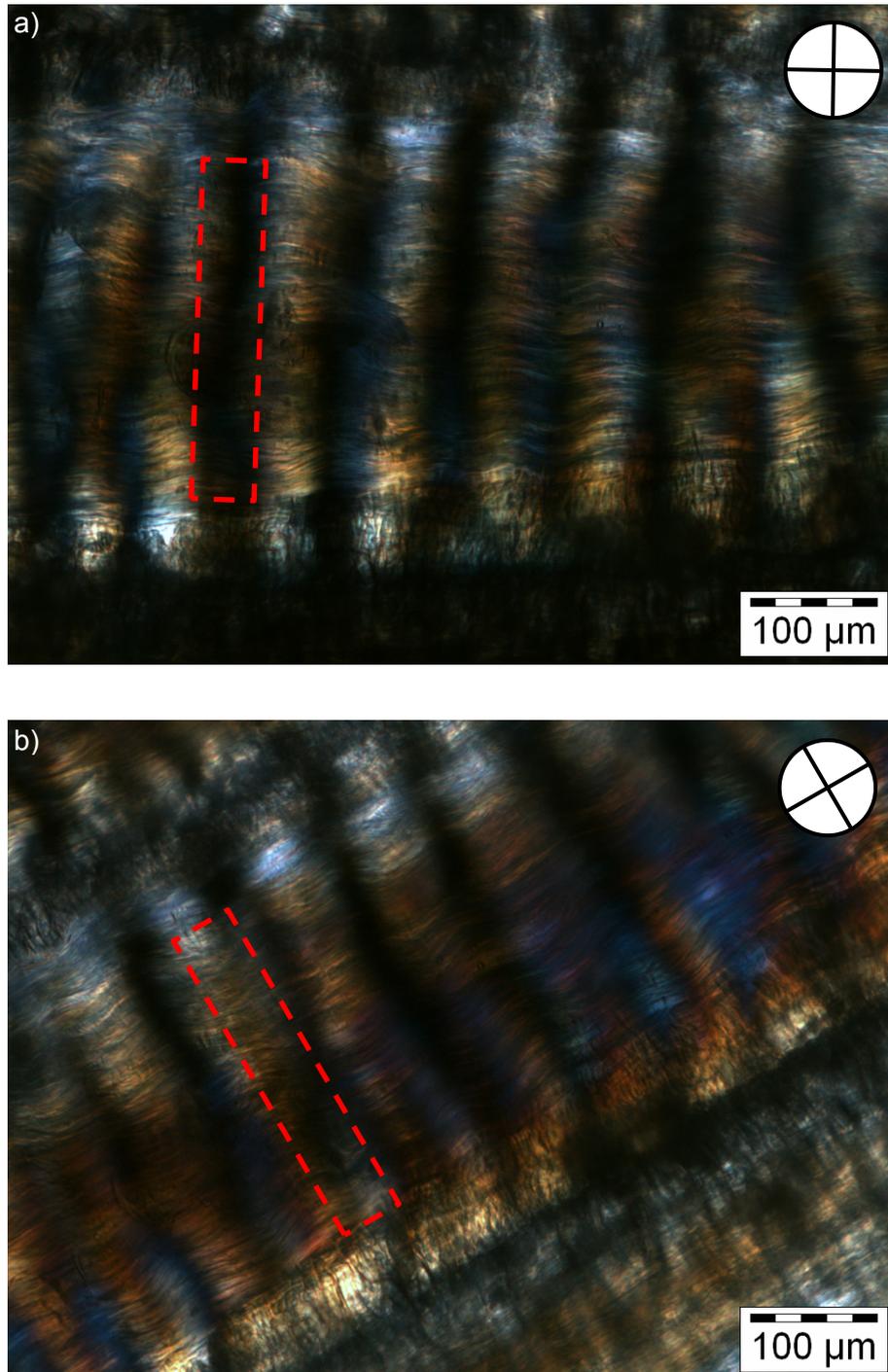


Abbildung 4.20: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Probe P2 (periphere Zone) in der a) Hell- und b) Dunkelfeldansicht zur Charakterisierung des Crimp-Winkels nach einer Dehnung von 7,3 %

Die polarisationsmikroskopische Aufnahme von Probe P2 (siehe Abbildung 4.19 a)), entnommen aus der peripheren Zone, zeigt auf dem Messabschnitt gegenüber Abbildung 4.19 b) eine um 47° rotierte Draufsicht des im unbelasteten Zustand dargestellten Segmentes, woraus ein Crimp-Winkel $\theta = 23,5^\circ$ hervorgeht. Im Steigungsbereich ist jeweils

der Wechsel der Hell- und Dunkelfelder zu erkennen (rote Markierung). Abbildung 4.20 zeigt die Probe P2 nach einer Dehnung von 7,3 %, um die Entwicklung des Crimp-Winkels beobachten zu können. Für jeden Dehnungswert werden alle innerhalb des Displayfensters vorhandenen Perioden in die arithmetische Mittelung der Crimp-Winkel einbezogen. Diese Illustration ist lediglich eine beispielhafte Darstellung für einen bestimmten Steigungswinkel, welcher sich mit zunehmender Belastung bis zum Versagen der Probe verringert. Zur Visualisierung der Winkelveränderung konnten, unter Hinzunahme von acht Mikrotomschnitten aus dem zentralen und peripheren Areal, in Abhängigkeit von der Dehnung des Faszikels folgende Crimp-Winkel bestimmt werden. Die zur Berechnung der Dehnung relevante Anfangsmesslänge l_0 ist durch die außerhalb der Klebefläche frei liegende Kollagenstruktur definiert. Mit Hilfe der ermittelten Messwerte wird das in Abbildung 4.21 dargestellte Winkel-Dehnung-Diagramm erstellt.

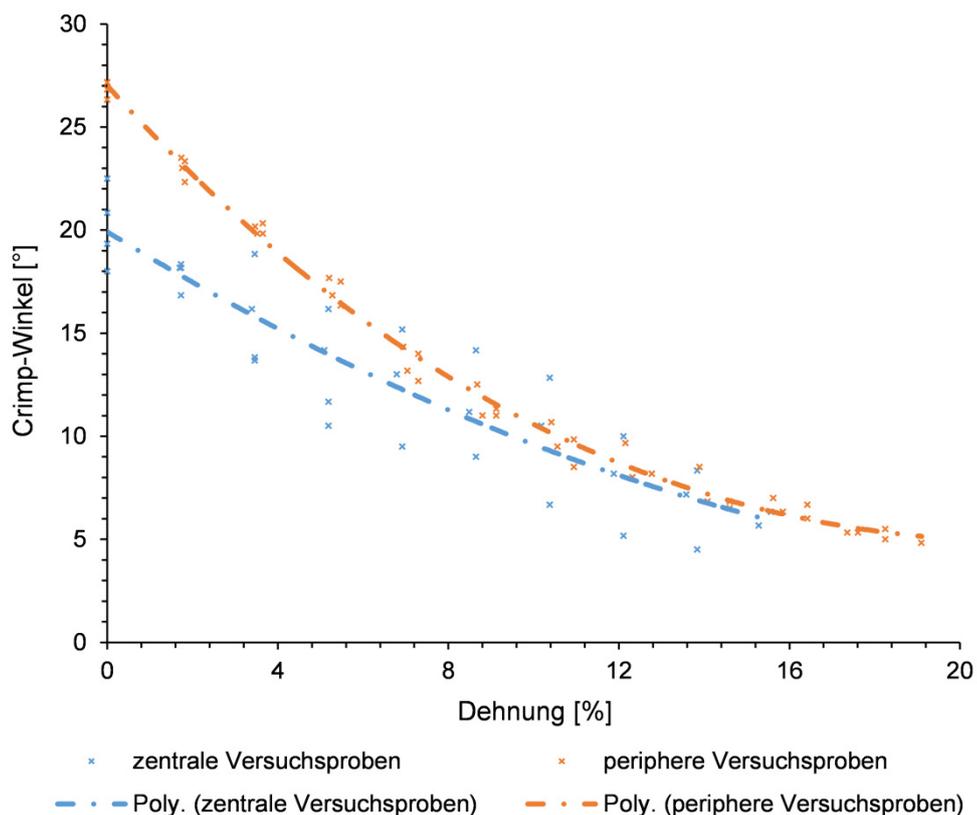


Abbildung 4.21: Arithmetisch gemittelttes Winkel-Dehnung-Diagramm für das zentrale und periphere Phaseraeral

Dieses verdeutlicht für den zentralen sowie peripheren Abschnitt des Sehensegments eine Abnahme des Strukturwinkels mit zunehmendem Verfahrweg der Belastungsvorrichtung. Im unbelasteten Zustand ist der zuvor bereits beschriebene Winkelunterschied zwi-

schen den betrachteten Positionen zu erkennen, der sich mit fortlaufender Dehnung verringert, jedoch niemals einen vergleichbaren Zahlenwert einnimmt. Eine geringere Rupturdehnung konnte im zentralen Sehnenareal nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis verdeutlicht einen höheren Verformungsgrad in der peripheren Zone, was bei einer identischen Gesamtdehnung beider Abschnitte ein vollständig gelegtes Faserzentrum, im Gegensatz zu einer geringen Wellencharakteristik im Randbereich, zur Folge hätte.

Den zuvor beschriebenen Crimp-Winkel einbezogen wurde die Crimp-Länge, wie in Kapitel 2.3.1.1 definiert, aus der gemessenen Periode bestimmt und über fünf Schwingungen in der Ansicht arithmetisch gemittelt (siehe Abbildung 4.22).

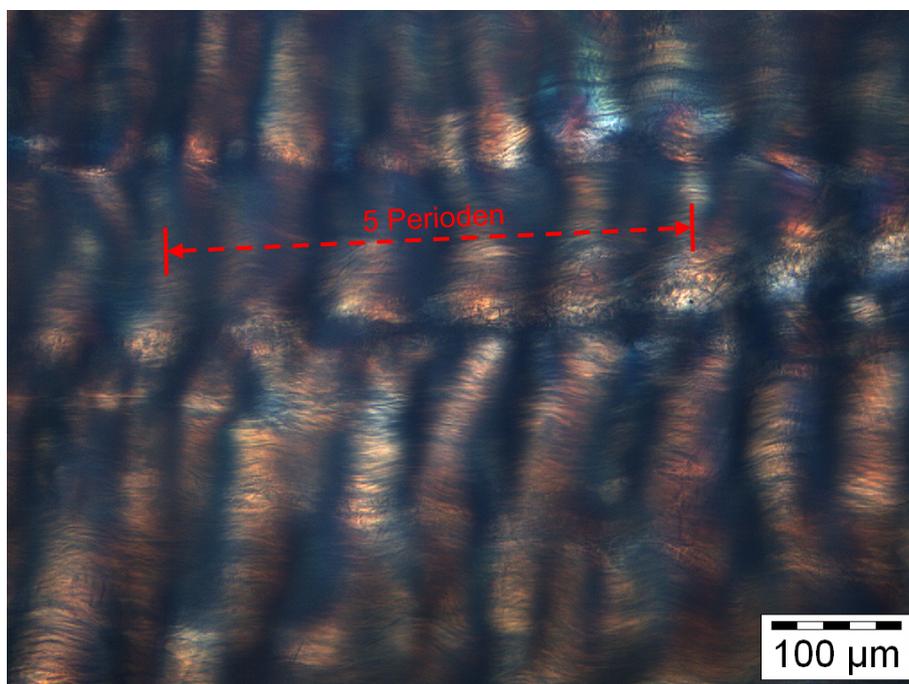


Abbildung 4.22: Polarisationsmikroskopische Aufnahme der Probe Z4 im definiert unbelasteten Zustand zur Charakterisierung der Crimp-Länge

Explizit für dieses in Abbildung 4.22 gezeigte Probenbeispiel führt die Messung zu einer virtuellen Crimp-Länge $L_v = 40,7 \mu\text{m}$, die mit Hilfe des, für diese Probe über ebenfalls fünf Perioden arithmetisch gemittelten Crimp-Winkels $\theta = 20,8^\circ$, in einer Crimp-Länge $L = 43,5 \mu\text{m}$ resultiert.

Tabelle 4.3 listet arithmetisch gemittelt die gemessenen Crimp-Winkel und -Längen im definiert unbelasteten Zustand für den zentralen sowie peripheren Abschnitt des vollständigen Probenkollektives.

Tabelle 4.3: Experimentell ermittelte Crimp-Struktur für den definiert unbelasteten Zustand einer equinen OBS im zentralen und peripheren Sehnenareal

zentrales Areal		peripheres Areal	
Crimp-Winkel	Crimp-Länge	Crimp-Winkel	Crimp-Länge
$20,2 \pm 1,7 \text{ }^\circ$	$54,3 \pm 10,7 \text{ } \mu\text{m}$	$26,9 \pm 0,3 \text{ }^\circ$	$64,6 \pm 1,6 \text{ } \mu\text{m}$

Die Auflistung verdeutlicht einen um etwa $\Delta\theta = 7 \text{ }^\circ$ größeren Crimp-Winkel der Kollagenfibrillen im peripheren Areal gegenüber der zentralen Zone im definiert fixierten, jedoch unbelasteten Zustand. Eine Betrachtung der Crimp-Länge zeigt einen von einer höheren Standardabweichung geprägten Kennwert im zentralen Areal, jedoch arithmetisch gemittelt eine um circa $\Delta L = 10 \text{ } \mu\text{m}$ geringere Länge im Vergleich zum peripheren Areal.

4.5.2 Analyse des Verformungsverhaltens

Der gestaltete Belastungsaufbau bietet im implementierten Zustand im Durchlicht-Polarisationsmikroskop die Möglichkeit Strukturveränderungen zu charakterisieren und unter einachsiger Zugbelastung bei einer konstanten Vorschubgeschwindigkeit ($v = 1 \text{ mm/s}$) Schädigungen zu erforschen. Zehn weitere Mikrotomschnitte standen zur Verfügung, um das Verformungsverhalten in Abhängigkeit von der Lokalisation in einem Spannung-Dehnung-Diagramm visualisierend ergründen zu können. Diese Versuchsreihen ermöglichen eine Evaluation der Zugfestigkeit sowie des Elastizitätsmoduls in den verschiedenen Sehnenarealen. Abbildung 4.23 a) zeigt die Verläufe aller geprüften Faszi-
kel, die bei einer ersten Betrachtung ein unharmonisches Erscheinungsbild aufweisen. Die arithmetische Mittelung (siehe Abbildung 4.23 b)) verdeutlicht einen bereits aus den Versuchsreihen an den vollständigen Sehnenarealen bekannten Verlauf.

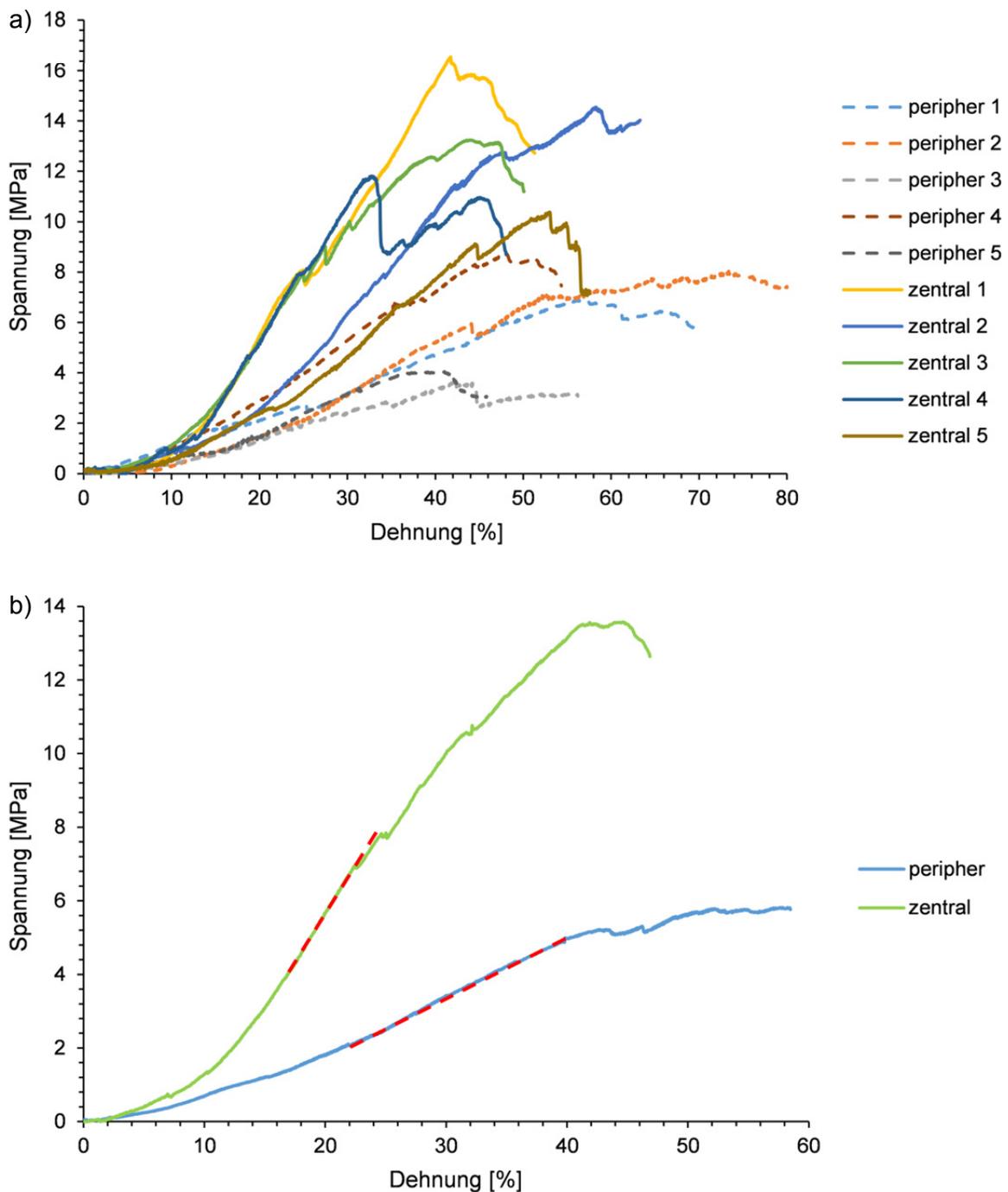


Abbildung 4.23: Spannung-Dehnung-Verlauf von Faszikeln entnommen aus dem zentralen und peripheren Sehnenareal. Darstellung der a) einzelnen Versuchsproben und der b) arithmetisch gemittelten Verläufe

Beginnend mit dem konvexen Verlauf folgt nach dem linear-viskoelastischen Materialverhalten eine konkave Entwicklung bis zur Ruptur des Fasersegmentes. Um den reinen materialspezifischen Einfluss auf das Verformungsverhalten ergründen zu können und die anatomischen Gegebenheiten der Crimp-Struktur von diesen Versuchsabschnitten zu

entkoppeln, wird im Folgenden, wie aus Kapitel 2.3.1.2 bekannt, der Tangentenmodul zur Bestimmung der Steifigkeit herangezogen. Die innerhalb der Abbildung 4.23 b) eingezeichneten rot gestrichelten Linien verdeutlichen die Position des angetragenen Elastizitätsmoduls. Tabelle 4.4 listet die erlangten biomechanischen Kennwerte.

Tabelle 4.4: Biomechanische Kennwerte der equinen Faszikel in der peripheren und zentralen Zone

Kennwert	zentral	peripher
Zugfestigkeit	13,5 ± 2,3 MPa	5,8 ± 2,0 MPa
Rupturdehnung	44 ± 5,4 %	58,5 ± 5,9 %
Elastizitätsmodul	53,7 ± 5,8 MPa	16,1 ± 3,7 MPa

Der Elastizitätsmodul und die Zugfestigkeit sind in der peripheren Zone mit 30 % respektive 43 % des zentralen Kennwertes deutlich geringer. Konträr ist das Dehnungsverhalten der Segmente im peripheren Areal zu betrachten, bei denen eine deutlich höhere Längenänderung erkennbar ist.

Die in Kapitel 4.5.1 illustrierten polarisationsmikroskopischen Darstellungen fordern eine Fokussierung der Gewebestruktur. Eine durch die Dehnung der Fibrillen anhaltende Veränderung der Topographie bewirkt einen variierenden Fokuspunkt. Aufgrund dessen wurde, unabhängig von der bildgebenden Charakterisierung, eine Aufstellung des Spannungs-Dehnungs-Verhaltens an zusätzlichen Versuchsproben durchgeführt, die ausschließlich für die Erstellung eines solchen Diagramms herangezogen wurden. Mit Hilfe der zuvor aufgezeichneten Belastung sowie Dehnung für jede polarisationsmikroskopische Aufnahme ist eine Zuordnung an dem Spannungs-Dehnungs-Verlauf uneingeschränkt möglich. Die in den Grundlagen von Wilmink et al. [235] postulierten Belastungs- und Strukturzusammenhänge können unter Anwendung dieser Versuchsdurchführung beurteilt werden.

Abbildung 4.24 zeigt die gemäß der beschriebenen Vorgehensweise dargestellte Entwicklung der Wellenstruktur der Kollagenfasern während des Zugversuchs. Das in Abbildung 4.24 a) dargestellte Spannungs-Dehnungs-Diagramm beinhaltet eine entlang des Verlaufes positionierte Buchstabenfolge, die die unterschiedlichen Zustände der Crimp-Struktur in Abhängigkeit von der wirkenden Belastung zuordnet.

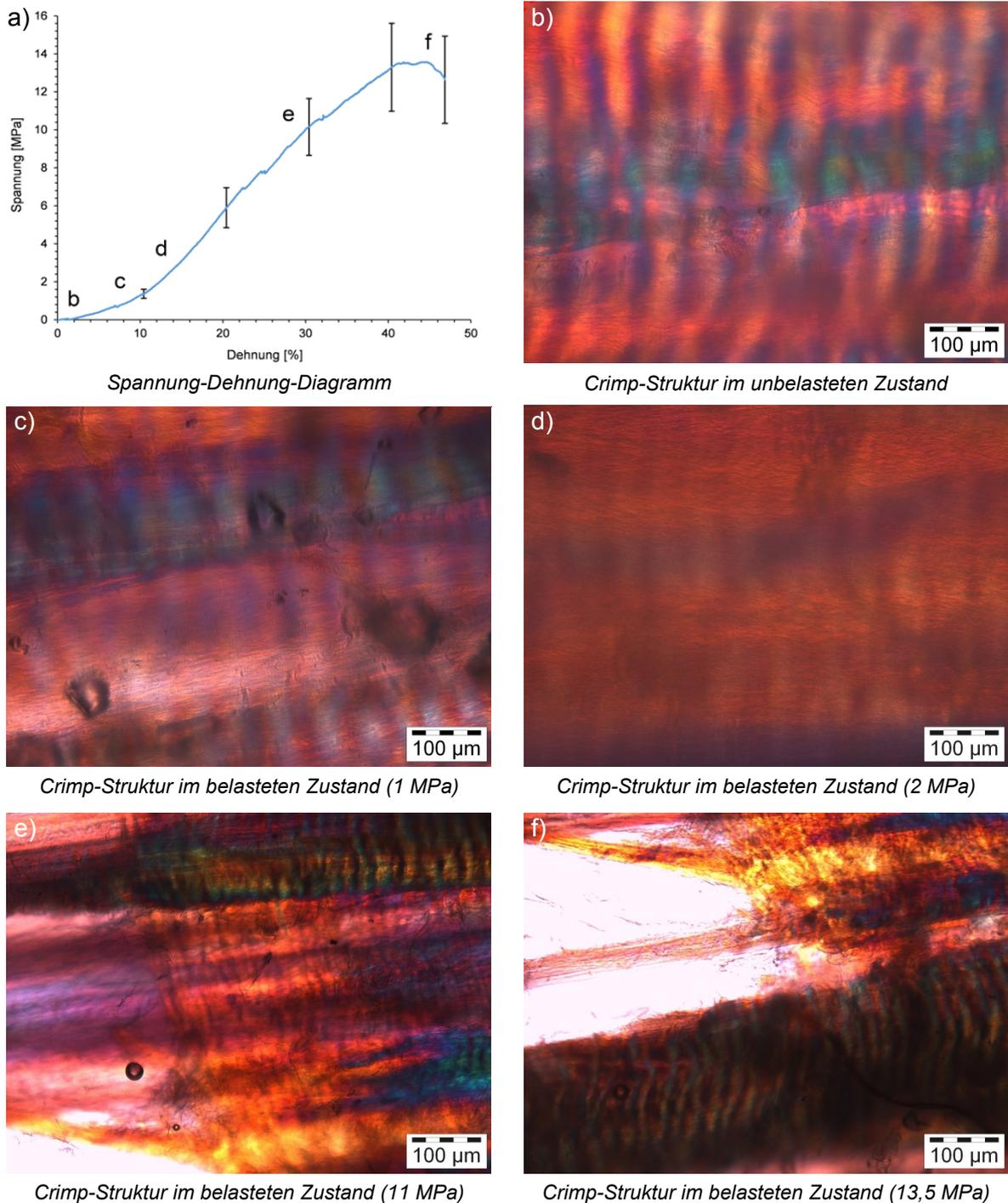


Abbildung 4.24: Entwicklung der Crimp-Struktur eines Sehnenfaszikels im zentralen Areal unter einsinniger konstanter Vorschubgeschwindigkeit

Die zu Versuchsbeginn unbelastete Probe (siehe Abbildung 4.24 b)) zeichnet sich durch eine ausgeprägte Crimp-Struktur über die vollständige Gewebestruktur aus, die mit fortschreitender Dehnung erwartungsgemäß einen verringerten Crimp-Winkel zur Folge hat (siehe Abbildung 4.24 c)). Ein vollständiges Legen der topographischen Struktur ist

mit dem Erreichen des linear-viskoelastischen Verformungsverhaltens sichtbar (siehe Abbildung 4.24 d)). Interfibrillare Aufweitungen und Rupturen einzelner Fasern sind nach dem Durchschreiten des konkaven Kurvenverlaufes ersichtlich (siehe Abbildung 4.24 e)). Die Partialrupturen führen aufgrund des Kontaktverlustes und der vertikalen sowie gleichzeitig horizontalen Verschiebung, zu einer lokalen Veränderung des Fokuspunktes, weshalb der betrachtete Abschnitt nicht vollständig charakterisiert werden kann (siehe Abbildung 4.24 f)).

4.6 Finite-Elemente-Analyse zur Bewertung des Verformungsverhaltens

Explizit auf die Fragestellung dieser wissenschaftlichen Arbeit bezogen bietet die Finite-Elemente-Analyse die Möglichkeit, die zuvor gezeigten Erkenntnisse zu differenzieren und materialspezifische sowie anatomische Einflüsse auf das Schädigungsverhalten zu separieren. Die FE-Analysen wurden mit der Simulationssoftware Abaqus FEA durchgeführt, in welche vor Berechnungsbeginn ein mit Hilfe der Software CREO Parametric erstelltes CAD-Modell implementiert wurde. Die nachfolgenden Kapitel zeigen das auf Basis der polarisations- und rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse gestaltete CAD-Modell sowie die Simulation des Verformungsverhaltens einer equinen OBS in dem reproduzierten initial intakten und dezellularisierten Zustand.

4.6.1 Entwicklung des Finite-Elemente-Modells

Grundlage für die Gestaltung der CAD-Geometrie ist ein entlang eines Sinusverlaufes extrudierter Volumenkörper, der aus einer Vielzahl von einzelnen Fibrillen besteht. Analog zu dem hierarchischen Sehnenaufbau nach Kastelic et al. [18], der in seinem Konstrukt in Kapitel 2.1 detailliert beschrieben wird, wurde das CAD-Modell bestehend aus drei Schwingungsperioden in Form von 361 Fibrillen aufgebaut. Abbildung 4.25 a) zeigt den Aufbau des periodischen CAD-Modells und die in einer extrazellulären Matrix eingebettete, hierarchisch aufgebaute Faserstruktur (siehe Abbildung 4.25 b)).

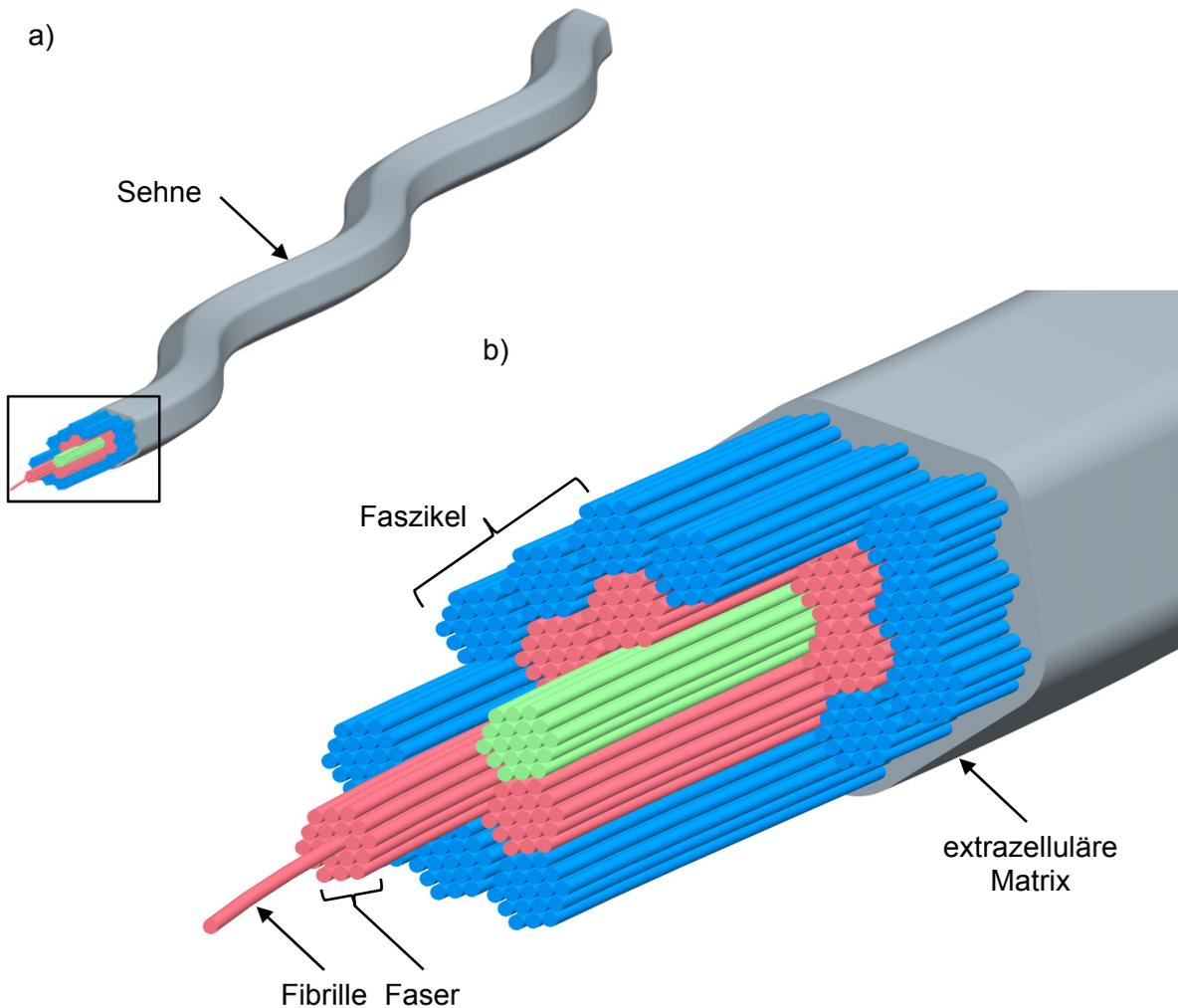
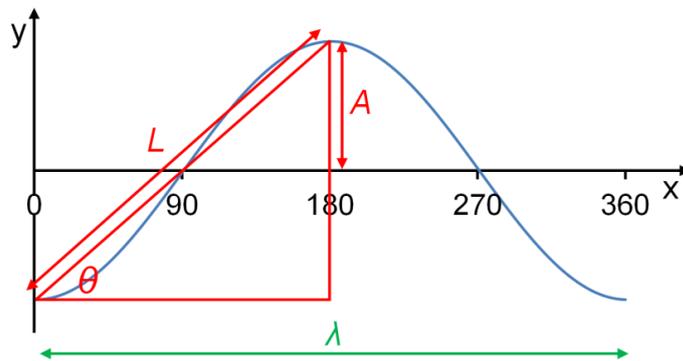


Abbildung 4.25: a) Drei-periodisches CAD-Modell einer equinen OBS und b) Detailansicht des hierarchischen Aufbaus

Jeweils 19 Fibrillen bilden eine Faser, wobei eine Vielzahl von Fasern ein Faszikel definiert. Zur Verdeutlichung sind die drei Faszikel mit einer räumlichen Trennung versetzt angeordnet. Die farbliche Gestaltung der Fibrillen beschreibt die Unterteilung von der zentralen (grün) über die mittlere periphere (rot) bis hin zum äußeren, peripheren Randbereich (blau). Die Anordnung der extrazellulären Matrix (grau) ist in dieser graphischen Darstellung interfibrillar nicht erkennbar und lediglich die Umrandung der äußeren peripheren Zone ersichtlic. Um eine möglichst naturgetreue Nachbildung der equinen OBS in CREO Parametric zu erzeugen, wurde der nachfolgend dargestellte schematische Verlauf (siehe Abbildung 4.26) für die Definition in einer Matrixschreibweise, in Abhängigkeit von der Crimp-Länge und dem -Winkel, deklariert (siehe Gleichung (4.3)).



Wellenlänge λ :

$$\lambda = 2 \cdot L \cdot \cos\theta \quad (4.1)$$

Amplitude A :

$$A = \frac{\lambda}{4} \cdot \tan\theta \quad (4.2)$$

Abbildung 4.26: Definition der für die CAD-Geometrie notwendigen Parameter

Aus dieser Definition resultiert die Matrixschreibweise für die Implementierung in CREO Parametric in folgender Form:

$$\begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 3 \cdot \lambda \cdot t \\ \frac{\lambda}{4} \cdot \tan\theta \cdot \sin(x + 270) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (4.3)$$

Der für die Strukturbildung unverzichtbare Fibrillendurchmesser einer equinen OBS ist wie in den Grundlagen dieser wissenschaftlichen Arbeit beschrieben (siehe Kapitel 2.1) mit einer großen Streuung verbunden ($d_{\text{Fibrille}} = 20 - 500 \text{ nm}$), weshalb eigene rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an dem Probenmaterial durchgeführt wurden, um diese einzugrenzen. Abbildung 4.27 zeigt beispielhaft eine REM-Aufnahme zur Bestimmung des Durchmessers einer Fibrille.

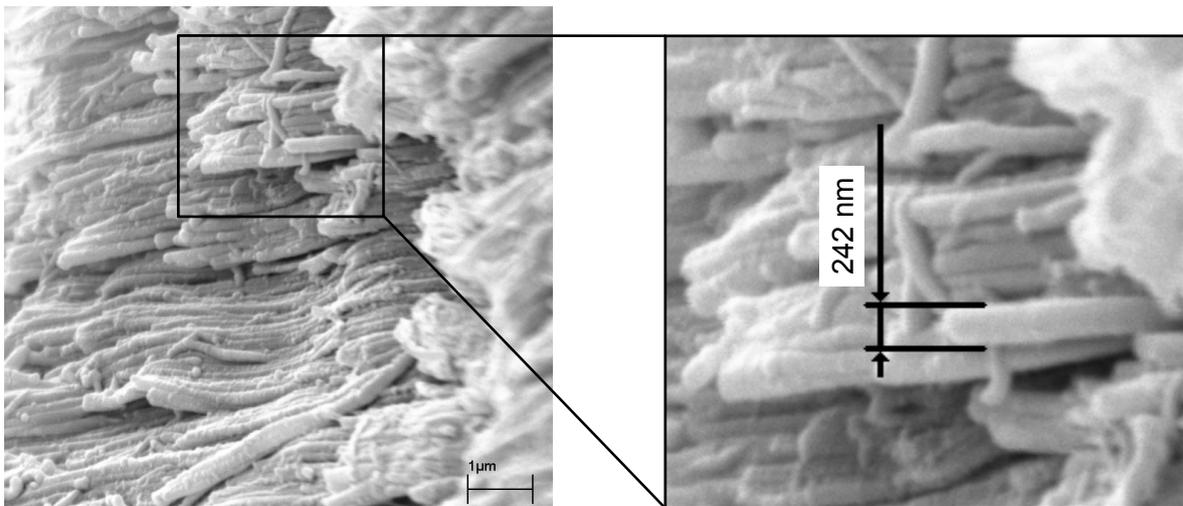


Abbildung 4.27: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zur gezielten Beurteilung des Fibrillendurchmessers ($d_{\text{Fibrille}} = 242 \text{ nm}$)

Die Untersuchungen an den unterschiedlichen Sehnenarealen zeigen einen vergleichbaren Fibrillendurchmesser, weshalb für die Gestaltung des CAD-Modells ein identischer Zahlenwert für die periphere und die zentrale Zone herangezogen wird.

Neben der Bestimmung der Crimp-Struktur sowie des Fibrillendurchmessers anhand von eigenen Untersuchungen ist der Flächenanteil S der Fibrillen in der sich umgebenden extrazellulären Matrix, unter Hinzunahme von Literaturangaben, in die Gestaltung einzu beziehen. Moeller et al. [441] zeigen in ihrer Publikation transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer transversalen equinen Faserstruktur, mit Hilfe dessen im Nachgang die Flächenanteile der Fibrillen im betrachteten Gesamtverbund bestimmt werden konnten. Abbildung 4.28 zeigt den unter Anwendung der Software ImageJ definierten Fibrillenanteil (rot markiert), woraus ein Flächenanteil von 62 % resultiert, der bei der Gestaltung des CAD-Modells berücksichtigt wurde.

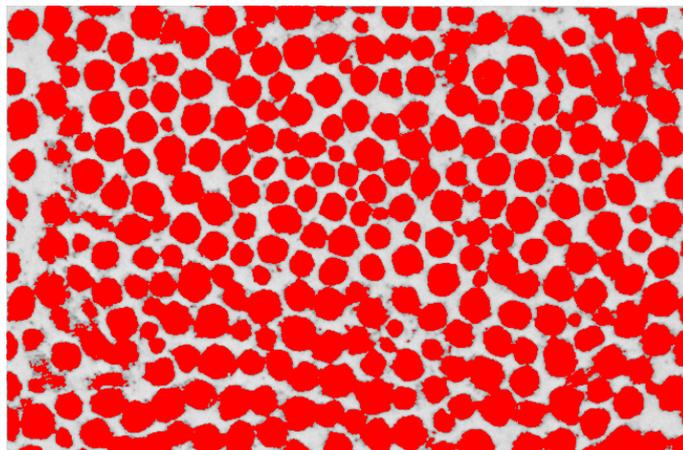


Abbildung 4.28: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Transversalschnittes durch eine Pferdesehne zur Analyse des Flächenanteils der Fibrillen am Gesamtaufbau ($S_{\text{Fibrille}} = 62\%$) [442]

Um die erlangten anatomischen Kennwerte aus den Versuchen in die Modellgenerierung übertragen zu können, wurde folgende Beziehung (siehe Gleichung (4.4)) genutzt:

$$\frac{d_{\text{Fibrille,Modell}}}{\lambda_{\text{Crimp,Modell}}} = \frac{d_{\text{Fibrille,Experiment}}}{\lambda_{\text{Crimp,Experiment}}} \quad (4.4)$$

Diese Umrechnung ist notwendig, da einerseits die CAD-Software Längenmaße in Millimeter verarbeitet und andererseits eine vollständige Periode durch die trigonometrische Funktion an einen Maximalwert von 360 mm gebunden ist.

Tabelle 4.5 illustriert die für die Gestaltung des CAD-Modells notwendigen anatomischen Kennwerte. Da die in Abbildung 4.25 abgebildete Geometrie neben einer zentralen und peripheren Zone zusätzlich ein rot dargestelltes mittleres Areal beinhaltet, werden dort arithmetisch gemittelte Kennwerte verwendet.

Tabelle 4.5: Anatomische Kennwerte für die Gestaltung des CAD-Modells unter Berücksichtigung des zentralen und peripheren Areals

Parameter	Experiment		CAD-Modell		
	zentral	peripher	zentral	Mitte	peripher
Crimp-Winkel θ	20 °	27 °	20 °	23,5 °	27 °
Wellenlänge λ	101,92 μm	115,22 μm	360 mm	360 mm	360 mm
Fibrillendurchmesser d_{Fibrille}	186 \pm 37 nm	186 \pm 37 nm	0,66 mm	0,62 mm	0,58 mm

Die Wellenlänge λ resultiert aus der Crimp-Länge L und dem Winkel θ . Trotz des zuvor genannten identischen Fibrillendurchmessers d_{Fibrille} in den verschiedenen Sehnenarealen ist ein variierender Zahlenwert in der tabellarischen Auflistung zu erkennen. Dies liegt in der experimentell bestimmten abweichenden Wellenlänge begründet, die bei der Modell-darstellung, aufgrund der geringen Fibrillenabstände, geometriebedingt zu einer Überschneidung der Fibrillen führen würde. Aus diesem Grund wird die aus Gleichung (4.4) bekannte Beziehung genutzt, um ausgehend von einer konstanten Wellenlänge λ einen abweichenden Fibrillendurchmesser in den Arealen ($d_{\text{Fibrille}} = 0,58 - 0,66$ mm) zu definieren.

Für die FE-Simulation wurde das CAD-Modell aus Ressourcengründen auf eine repräsentative fünf-Faser-Geometrie vereinfacht, welches die Crimp-Struktur im zentralen und peripheren Areal darstellt und somit jegliche Einflussfaktoren auf das Verformungsverhalten beinhaltet. Eine Berechnung des vollständigen CAD-Modells hätte aufgrund der Anzahl von 362 Einzelkomponenten eine umfangreiche Elementanzahl nach dem Vernetzungsprozess zur Folge, die mit den örtlichen Hardwaremöglichkeiten nicht umsetzbar gewesen wäre. Abbildung 4.29 zeigt das mit Abaqus FEA vernetzte CAD-Modell, in der für die Simulation gewählten Anordnung mit fünf Fasern, bestehend aus insgesamt 95 Fibrillen eingebettet in die extrazelluläre Matrix.

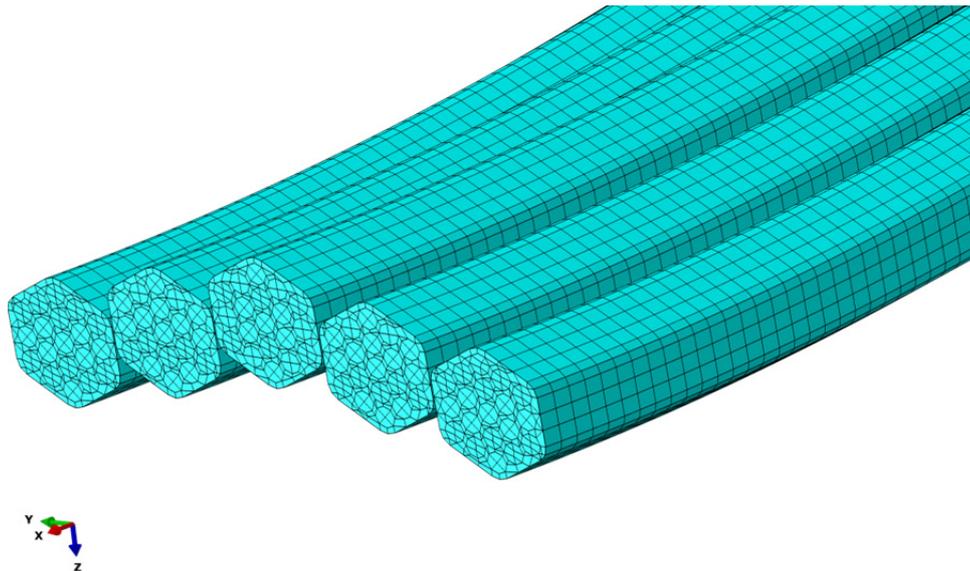


Abbildung 4.29: Vernetzte Geometrie eines repräsentativen CAD-Modells, bestehend aus fünf Fasern, die den zentralen und peripheren Abschnitt beinhalten

Um eine für die Berechnung zufriedenstellende Gitterqualität zu gewährleisten, wurde eine hybridisierte Anordnung aus Hexaedern und Wedges gewählt. Tabelle 4.6 listet neben den Elementtypen, -anzahl sowie den für eine aussagekräftige Ergebnisdarstellung kleinsten Elementwinkel ρ . Letztgenannter sollte einen Wert von $\rho = 15^\circ$ nicht unterschreiten, da daraus eine Spannungskonzentration in dem jeweiligen Element entsteht, die ausschließlich durch die Vernetzung und nicht aus der Geometrie des Modells resultiert.

Tabelle 4.6: Für die Vernetzung verwendeten Elementtypen, Elementanzahl und der kleinste Elementwinkel

Elementtyp	Elementanzahl	Kleinster Elementwinkel ρ
Hexaeder	608924	28,68 °
Wedge	266940	33,33 °

4.6.2 Simulation

Die Finite-Elemente Analyse soll im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit als Hilfsmittel dienen, um die folgenden Sachverhalte zu evaluieren. Kapitel 2.3.1.2 zeigt, dass eine Bestimmung der biomechanischen Kennwerte innerhalb des Sehnenverbundes nicht eindeutig durchführbar ist und die Ergebnisdarstellung von großen Abweichungen geprägt ist. Die FE-Analyse bietet in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, die in eigenen Versuchsreihen erzielten und zusätzlich mit Hilfe von statistischen Verfahren be-

stimmten Kennwerte für die Fibrille sowie die extrazelluläre Matrix zu validieren. Des Weiteren können die Auswirkungen der Crimp-Struktur auf das Verformungs- sowie Schädigungsverhalten ergründet werden und die Tauglichkeit eines linear-elastischen oder hyperelastischen Materialmodells beurteilt werden.

4.6.2.1 Definition der Materialkennwerte

Für die Simulation mit Abaqus FEA müssen neben einer realitätsnahen CAD-Geometrie der equinen OBS geeignete Materialkennwerte, insbesondere der Elastizitätsmodul und die Querkontraktionszahl, vor Berechnungsbeginn definiert werden. Der derzeitige Erkenntnisstand verdeutlicht eine offensichtliche Abweichung von mehreren Dekaden zwischen den Steifigkeiten der extrazellulären Matrix und der Fibrille. Aufgrund dessen ist für die Simulation eine Definition der Materialkennwerte für beide Komponenten unerlässlich. Große Abweichungen in den Messergebnissen dieser Kennwerte, durchgeführt im Rahmen von weiteren wissenschaftlichen Arbeiten, machten einen anderweitigen Bezug der Materialdaten erforderlich (siehe Tabelle 2.6). Die zuvor in Kapitel 4.3 vorgestellten Zugversuche an initial intakten equinen OBS dienten, neben der Bestimmung der Materialkennwerte eines vollständigen Sehnenstranges, der Berechnung der charakteristischen Kennwerte jeder Komponente mit Hilfe der aus Abbildung 4.28 bekannten Flächenverteilung der Fibrille und Matrix sowie der Voigt-Schranke. Unter Anwendung dieses Verfahrens konnten für die Fibrille ein Elastizitätsmodul von $E_{\text{Fibrille}} = 1,3 \text{ GPa}$ und für die extrazelluläre Matrix von $E_{\text{Matrix}} = 32 \text{ MPa}$ vor Simulationsbeginn postuliert werden. Tabelle 2.4 zeigt mit der Angabe von einem großen Wertebereich der gemessenen Querkontraktionszahlen die Schwierigkeit der Definition in Abaqus FEA. Unter der Vorgabe eines inkompressiblen Materialverhaltens und der zahlenmäßigen Begrenzung in der FE-Software für eine Poissonzahl $\nu = 0,49$ ist dieser Kennwert für die Verwendung prädestiniert. Goh et. al [443] bestätigen diese Vorgehensweise und nutzten in ihren Simulationen eine identische Querkontraktionszahl.

Der derzeitige wissenschaftliche Erkenntnisstand lässt die Schlussfolgerung zu, dass aufgrund des hohen Verformungsgrades der Sehne von einem linearen auf ein hyperelastisches Materialverhalten geschlossen werden muss. Eine Vielzahl von hyperelastischen Materialmodellen, wie das Neo-Hooke-, das Mooney-Rivlin- sowie das Ogden-Modell stehen in Abaqus FEA für eine Charakterisierung des Verformungsverhaltens zur Verfügung. Abweichend von der Simulation mittels linear-elastischen Ansatzes ist eine Bestimmung der Materialparameter α und μ zur Berechnung der Formänderungsenergie U in Anlehnung an die Querkontraktionszahl und den Elastizitätsmodul notwendig, um auf einer hy-

perelastischen Grundlage Simulationsberechnungen durchführen zu können. Diese beiden Konstanten wurden über eine Ausgleichsrechnung unter Zuhilfenahme des arithmetisch gemittelten einsinnigen Spannung-Dehnung-Verhaltens der initial intakten Messreihe (siehe Kapitel 4.3) gefittet. Für diese Art der Ausgleichsrechnung ist ausschließlich der linear-viskoelastische Verformungsabschnitt relevant, da außerhalb dieses Bereiches, in den konvex und konkav verlaufenden Zonen, strukturbedingte anatomische Veränderungen das Verformungsverhalten beeinflussen und nicht vorzugsweise materialspezifische Eigenschaften. Da jedoch keine Verläufe für die einzelnen Komponenten zur Verfügung standen, die eine differenzierte Ausgleichsrechnung ermöglicht hätten und die Literatur keine Kennwerte liefert, wurden ausgehend von den arithmetisch gemittelten experimentellen Verläufen und der Voigt-Schranke zwei voneinander getrennte Verformungsverläufe für den Fibrillen- und den Matrixanteil generiert. Abbildung 4.30 zeigt exemplarisch die Vorgehensweise zur Ermittlung der Werkstoffkennwerte für den Fibrillenanteil.

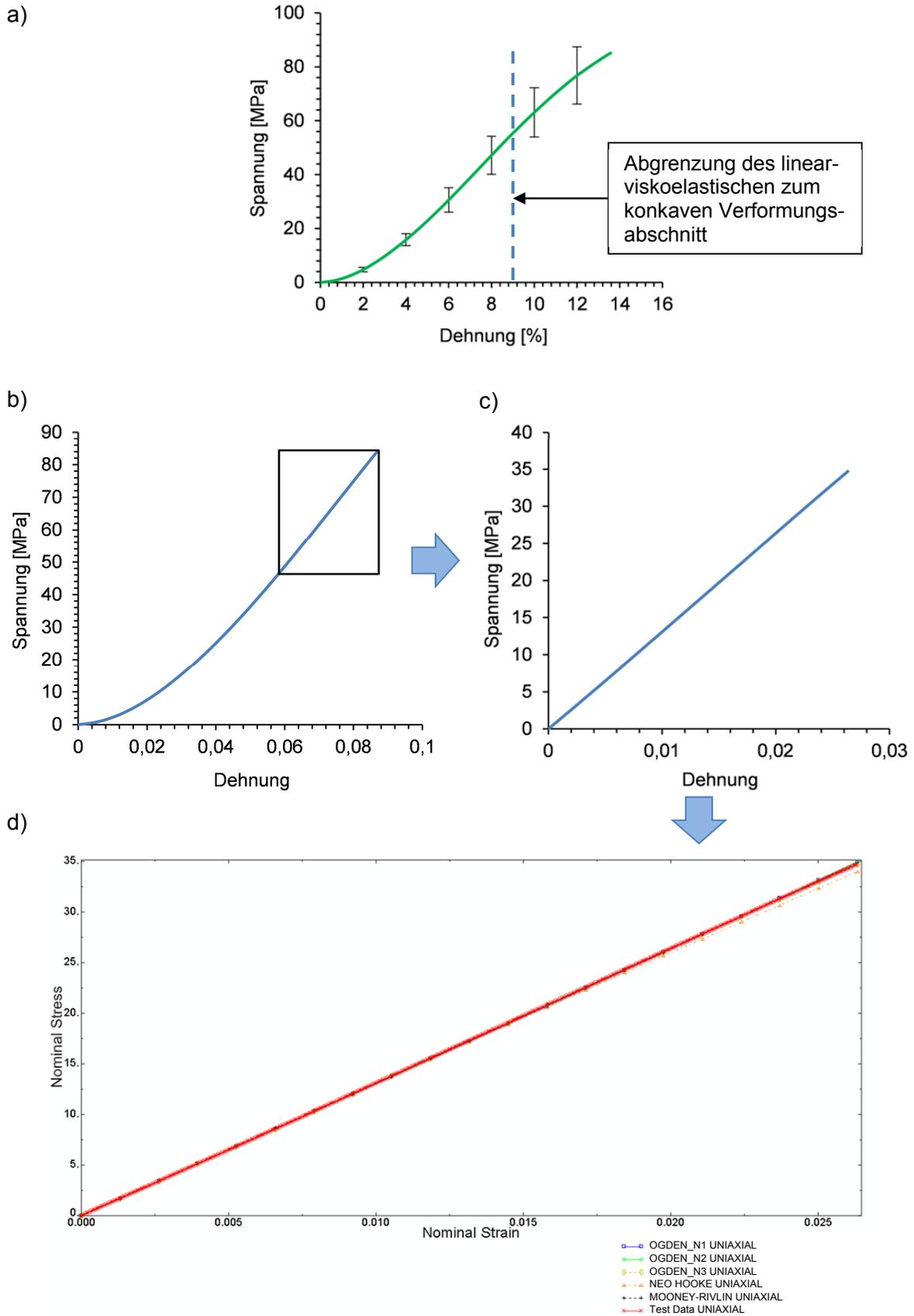


Abbildung 4.30: Ermittlung der für die Berechnung der Formänderungsenergie benötigten Kennwerte am Beispiel der Fibrille

Ausgehend von der aus Kapitel 4.3 bekannten Spannung-Dehnung-Kurve (siehe Abbildung 4.30 a)) wird den konkaven Schädigungsabschnitt vernachlässigend und die Voigt-Schranke einbeziehend, ein neuer Spannung-Dehnung-Verlauf generiert (siehe Abbildung 4.30 b)). Um lediglich die werkstofftechnischen Einflüsse in die Berechnung der hyperelastischen Materialparameter zu integrieren, wird der linear-viskoelastische Verformungsabschnitt entnommen (siehe Abbildung 4.30 c)) und eine Ausgleichsrechnung entlang der Geraden durchgeführt (Abbildung 4.30 d)). Eine größtmögliche Konvergenz konnte mit dem Ogden-Modell für $n = 1$ erzielt werden, wobei eine Betrachtung bis $n = 3$ keine für die Berechnung ausschlaggebende Fehlereingrenzung bewirkt hätte. Lediglich eine deutlich größere Berechnungsdauer in Abaqus FEA wäre die Folge gewesen. Das Fitting entlang dieses eingegrenzten Abschnittes führt zu folgenden hyperelastischen Materialparametern, die in Abaqus FEA zur Berechnung der Formänderungsenergie implementiert wurden (siehe Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Hyperelastische Materialparameter für die Berechnung der Formänderungsenergie in Abaqus FEA

$\alpha_{1,\text{Fibrille}}$	$\alpha_{1,\text{Matrix}}$	$\mu_{1,\text{Fibrille/Matrix}}$
430,35	0,33	9,43

Kapitel 2.6.2 verdeutlicht die Irrelevanz der Materialkonstante D_p in Abaqus FEA aufgrund der herrschenden Inkompressibilität.

4.6.2.2 Einfluss der Crimp-Struktur auf das Verformungs- und Schädigungsverhalten

Diamant et al. [38], Cribb et al. [61] und Woo et al. [209, 210] postulieren in ihren wissenschaftlichen Arbeiten einen Einfluss der Crimp-Struktur auf das konvexe Verformungsverhalten im Bereich der Toe-Region. Dieser Sachverhalt kann mit Hilfe der in Kapitel 4.6.1 erstellten CAD-Geometrie evaluiert werden. Im unbelasteten Zustand ist die Kollagenstruktur durch die in den polarisationsmikroskopischen Versuchsreihen ermittelten Crimp-Winkel sowie -Längen eindeutig definiert. In Anlehnung an die Muskelkontraktion in Längsrichtung der Sehne führt eine Beanspruchung des Modells zu einer Verringerung des Crimp-Winkels bei einer konstant messbaren Crimp-Länge. Eine Veränderung des Crimp-Winkels hat jedoch eine Beeinflussung der virtuellen Crimp-Länge zur Folge. Der Übergang der zuvor definierten ausgeprägten sinusförmigen Crimp-Struktur in eine gestreckte Anordnung wird zu Beginn des linear-viskoelastischen Verformungsabschnittes vollzogen. Abbildung 4.31 zeigt im Rahmen eines fünffaserigen Modells die anatomiebe-

dingte Spannungsverteilung, die an der Farbgebung erkennbar proportional zu dem charakteristischen Crimp-Winkel ist. In Richtung der peripheren Zone wird mit Abnahme des Winkels die wirkende Belastung auf die Fibrillen verringert.

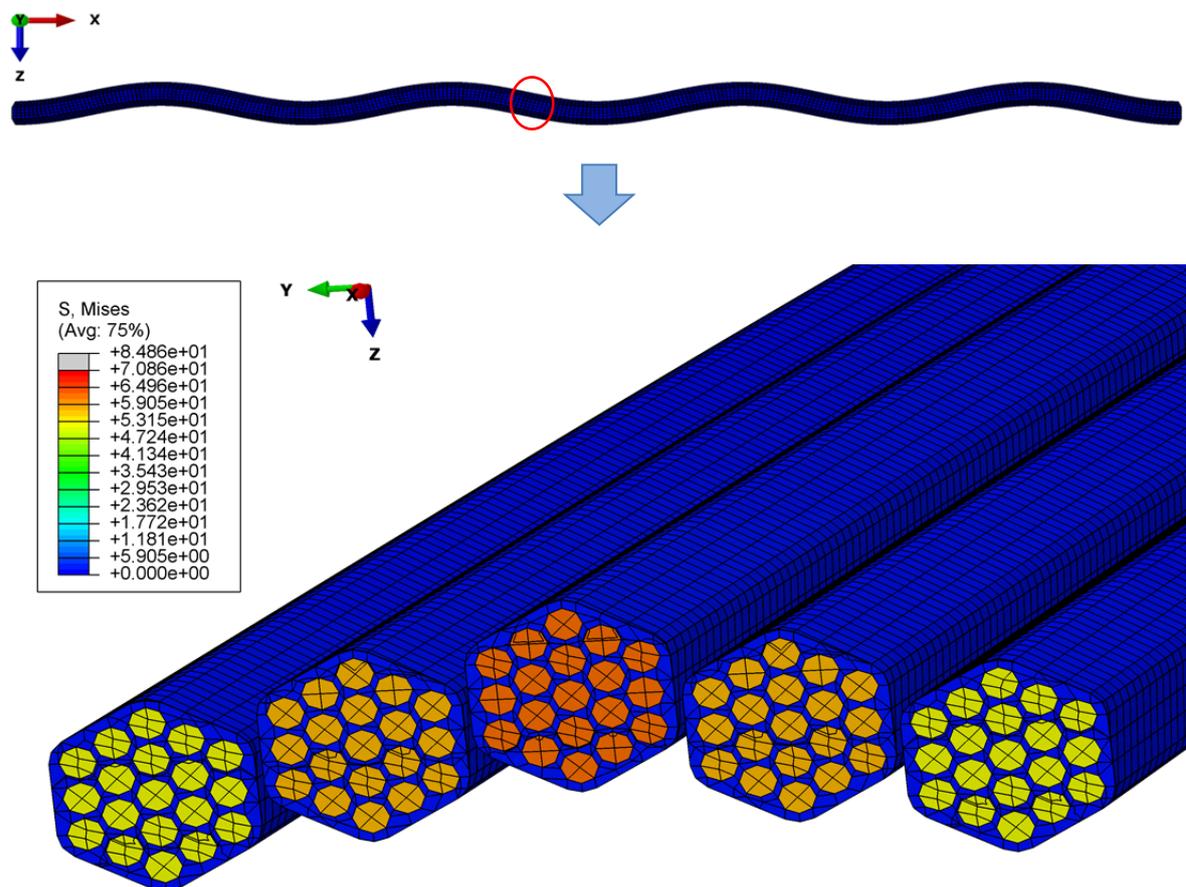


Abbildung 4.31: Spannungsverteilung im transversalen Schnitt des fünffaserigen Modells

Aufgrund der transversalen Spannungsbeurteilung im Bereich der Wendestelle ist innerhalb einer Faser lediglich ein Belastungsunterschied zu der umschließenden extrazellulären Matrix vorhanden. Aus Übersichtsgründen wird in Abbildung 4.32 ein zweifibrilläres Modell gewählt, das die wirkenden Phänomene effektiver darstellt, jedoch im vollen Umfang auf das fünffaserige Modell übertragbar ist.

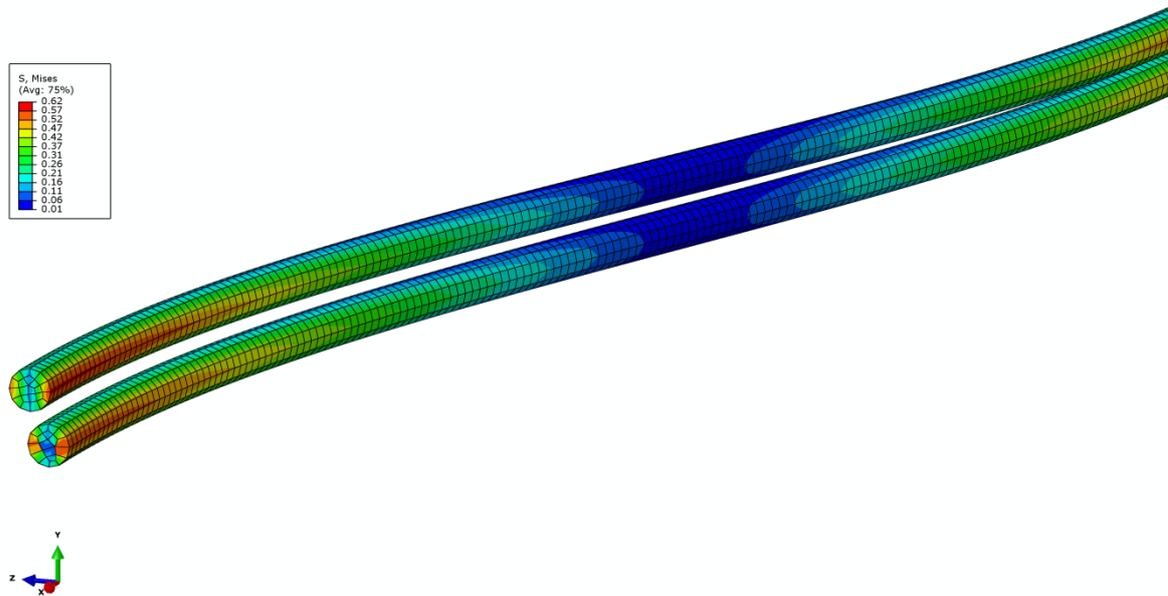


Abbildung 4.32: Zweifibrillares Modell zur Visualisierung der Spannungsverteilung entlang der Kollagenstruktur

In das zweifibrillare Modell ist repräsentativ für das fünffaserige Pendant eine zentrale und eine periphere Kollagenstruktur mit den charakteristischen Anatomiekennwerten integriert. Geometriebedingt ist mit der Verschiebung an den Hoch- und Tiefpunkten des vernetzten CAD-Modells die größte von-Mises-Vergleichsspannung zu erkennen. Diese erhöht sich mit zunehmender Dehnung der Sehne bis bei Erreichen des linear-viskoelastischen Verformungsabschnittes, selbst in den zuvor beschriebenen Maximalpunkten, eine über die transversale Ebene jeder Faser nahezu homogene Spannungsverteilung wirkt. Aufgrund der abweichenden Steigungswinkel zwischen den zentralen und peripheren Faserarealen und der zu erwartenden Abhängigkeit der von-Mises-Vergleichsspannung von der Crimp-Struktur resultiert mit abfallendem Crimp-Winkel eine höhere Belastung.

Um die Auswirkungen einer variierenden Crimp-Struktur visualisieren zu können, werden in Abbildung 4.33 abweichende Crimp-Winkel und -Längen betrachtet.

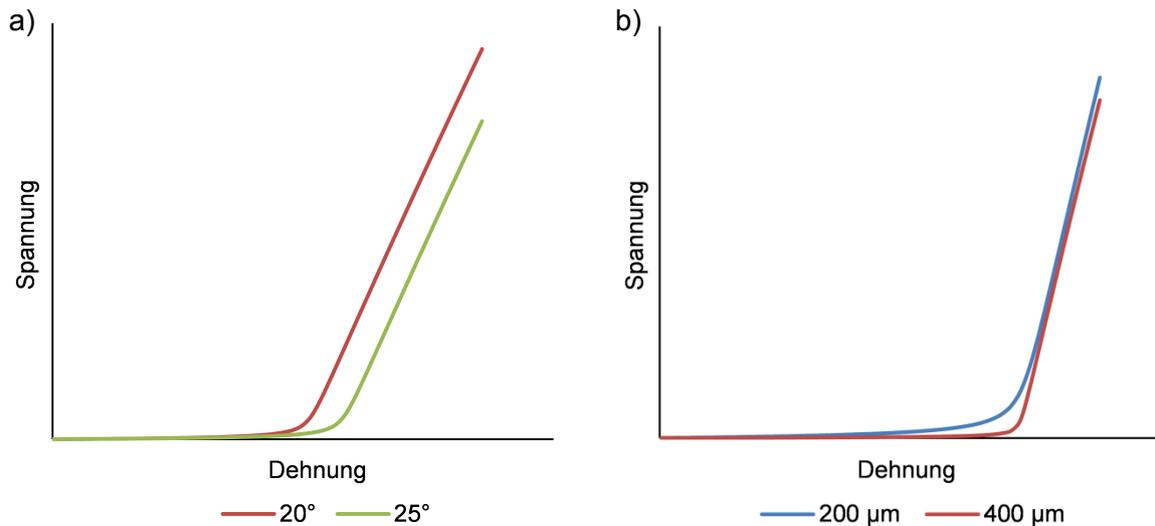


Abbildung 4.33: Variierende a) Crimp-Winkel und b) -Längen führen zu veränderten Spannung-Dehnung-Verläufen

Die Spannung-Dehnung-Verläufe verdeutlichen eine Unabhängigkeit der Steifigkeit von den dargestellten Anatomiefaktoren. Lediglich der Bereich der Toe-Region wird durch die Geometrieänderungen maßgeblich beeinflusst. Ein um $\Delta\theta = 5^\circ$ vergrößerter Crimp-Winkel sorgt für eine Parallelverschiebung des Verlaufes resultierend aus einer Zunahme der Toe-Dehnung. Eine Verdoppelung der Periodendauer bewirkt augenscheinlich eine Verringerung des Innenradius der Toe-Region.

4.6.2.3 Auswirkung von Strukturveränderungen im Gewebe

Die bisherigen Erkenntnisse aus den biomechanischen Zugversuchen an initial intakten sowie dezellularisierten equinen OBS lassen interfibrillare Strukturveränderungen im Gewebe vermuten. Um für eine im Anschluss an dieses Kapitel folgende Diskussion der Ergebnisse über eine ausreichende Bewertungsgrundlage verfügen zu können, wird die Finite-Elemente Methode genutzt, um die Auswirkungen eines Verlustes der Glykosaminoglykane auf das Verformungsverhalten zu evaluieren. Im Rahmen der Berechnungssoftware Abaqus FEA können die einzelnen Fibrillen wahlweise orthogonal zur Längsrichtung verknüpft werden sowie sich unabhängig voneinander unter einer anliegenden Zugbelastung relativ verschieben. Der durch die Anwendung des Dezellularisierungsprozesses resultierende Verlust der Glykosaminoglykane wird mit diesen Vorgaben simuliert.

Abbildung 4.34 verdeutlicht anhand eines vereinfachten Fibrillen-Matrix Verbundes, welcher in seiner Modellierung die experimentell bestimmte Crimp-Struktur beinhaltet, die voneinander abweichenden Fibrillenverläufe im zentralen (grün) und peripheren Areal (rot).

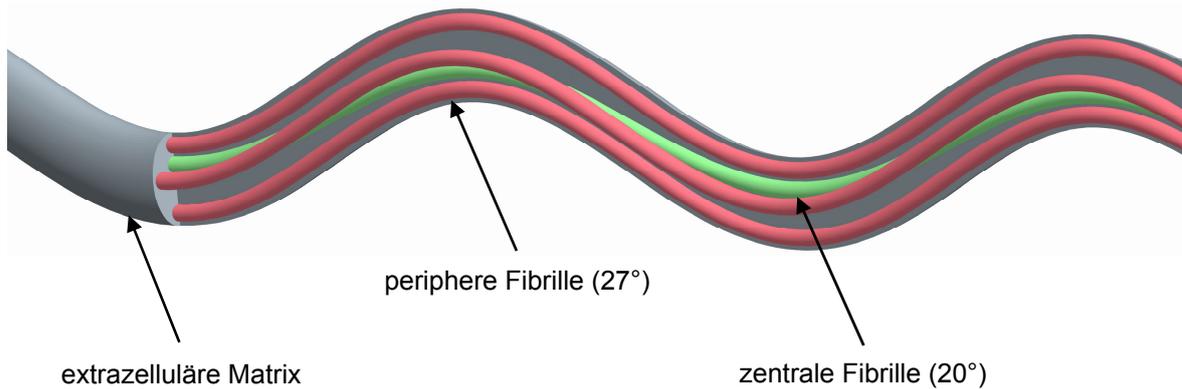


Abbildung 4.34: Fibrillen-Matrix-Darstellung in einer geöffnerten Matrixstruktur

Für diese Simulation sind die in Kapitel 4.5.1 erzielten Crimp-Winkel sowie -Längen für eine vereinfachte CAD-Geometrie herangezogen worden. Die Anordnung der Fibrillen und der Matrix beinhaltet ein repräsentatives Vergleichsmodell, welches aufgrund einer deutlich geringeren Zellenzahl zu einer Verringerung des Berechnungsaufwandes führt. Die in x-Richtung beanspruchten Fibrillen können lediglich im quervernetzten Zustand Schubspannungen interfibrillar übertragen, was die resultierende Belastbarkeit bei einer identischen Dehnung des Sehnenstranges beeinflusst. Eine vordefinierte Verschiebung führt zu folgender Ergebnisdarstellung in einem Spannung-Dehnung-Diagramm (siehe Abbildung 4.35).

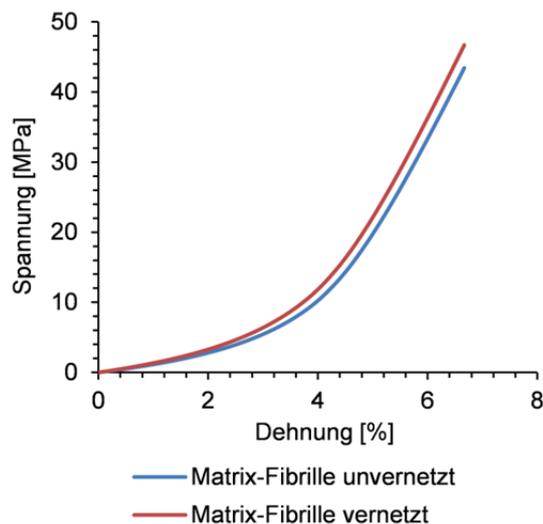


Abbildung 4.35: Auswirkungen einer Matrix-Fibrillen-Verknüpfung auf das Verformungsverhalten der Struktur

Die Darstellung verdeutlicht eine Abnahme der Festigkeit im Fall einer nicht quervernetzten Kollagenstruktur bei einer identischen Steifigkeit beider Zustände.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Diskussion werden die maßgeblichen Erkenntnisse dieser wissenschaftlichen Arbeit bezüglich der Ergründung des Verformungs- und Schädigungsverhaltens einer initial intakten equinen OBS diskutiert und die Eignung des produzierten dezellularisierten Fasergerüsts als Gewebeersatz evaluiert.

5.1 Prozessbedingte Einflussfaktoren auf das Schädigungsverhalten

Eine Durchführung von praktischen Versuchsreihen ist für eine Generierung von reproduzierbaren Messergebnissen an eine sorgfältige Versuchsvorbereitung sowie Durchführung gebunden. Beginnend mit dem Transport der post mortem entnommenen equinen OBS an den vorderen Extremitäten könnte eine Lagerung der Proben für eine Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften sorgen. Shepherd et al. [293] definieren ein Einfrieren des Prüflings, im Anschluss an die sterile Entnahme, als zufriedenstellende Möglichkeit ohne biomechanische Beeinträchtigung einen Transport zur Prüfstelle zu ermöglichen. Den anspruchsvollsten Aufgabenabschnitt des monotonen sowie zyklischen einachsigen Versuchs beinhaltet der Einspannvorgang am distalen und proximalen Sehnenende. Insbesondere in diesen Einspannabschnitten muss das lockere Bindegewebe von der Sehnenoberfläche entfernt werden, um einen unmittelbaren Kontakt der Faserstruktur mit den beschichteten Klemmbacken zu garantieren und die Haftreibung zu erhöhen. Kapitel 3.2.1.1 beschreibt den biomechanischen Versuchsaufbau des Prüfsystems und die unter Anwendung einer Kryotechnologie fixierten Sehnen. Diese Methodik ist wiederum an einen strikten Platzierungsvorgang geknüpft. Die Sehne darf vor dem Erreichen einer vollständigen Gefrierung innerhalb der Klemmbacken nur soweit vorfixiert werden, dass eine Bewegung zwischen diesen nicht ermöglicht wird. Andernfalls würde die mit Kupfergranulat beschichtete Kontaktstruktur Teile des Kollagengewebes verletzen und unter Umständen eine frühzeitigere Schädigung an einer durch diesen Vorgang vordefinierten Position provozieren. Abweichend von den mit Hilfe von Trockeneis gekühlten Klemmbacken [154, 219, 428, 429], die einen Versuch in einer mit 37 °C temperierten Kochsalzlösung nicht ermöglichen würden, bietet das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Prüfsystem, bedingt durch einen kontinuierlichen Ethanolfluss ($T = -30\text{ °}$) innerhalb der Klemmbacken, die Möglichkeit einer mehrstündigen Versuchsdurchführung. Dies ist vorzugsweise für die Durchführung von zyklischen Versuchsreihen von Bedeutung, da ein bis zu zweitägiger Ermüdungsversuch eine zuverlässige Fixierung im Einspannsystem voraussetzt. Eine Klebeverbindung würde gegenüber einer in dieser Forschungsaktivität eingesetzten kraftschlüssigen wie auch durch die sehnenumschließende Eisbildung resul-

tierenden formschlüssigen Verbindung nur die sehr anfällige Sehnenoberfläche verletzen und eine Übertragung von Schubkräften unterbinden. Wang et al. [222] beobachteten in ihren Versuchen an Kängurusehnen eine Vielzahl von Schädigungspositionen in unmittelbarer Nähe der Einspannungsöffnung, was durch das umliegende Flüssigkeitsmilieu und einer Vermeidung der Versprödung des Gewebes zusätzlich eingegrenzt werden kann. Abbildung 5.1 zeigt Sehne S19 nach Beendigung des Versuchs und anschließender Demontage der Einspannung. Die Befürchtung einer Schädigungseinleitung durch die Klemmbacken kann durch den Gefriervorgang unterbunden werden, was anhand des intakten Sehnenabschnittes in direkter Einspannungsumgebung erkennbar ist. Lediglich eine leichte Profilierung im Klemmabschnitt ist zu erkennen.



Abbildung 5.1: Angehaftete OBS an Klemmbacke 2 nach Beendigung des biomechanischen Versuchs und Demontage der Einspannung

Gleichzeitig bietet diese Ansicht die Möglichkeit eine Bewegung des Prüflings durch die wirkende Belastung nach der Versuchsreihe zu ergründen und somit eine fehlerhafte Dehnungsberechnung zu erkennen. Abbildung 5.1 zeigt jedoch eine bündig anliegende equine OBS an der Unterkante der Klemmbacke, was eine konstante Position während der gesamten Versuchsdurchführung garantierte.

Im Rahmen weiterer wissenschaftlicher Arbeiten wurden das Verformungs- sowie Schädigungsverhalten anhand von Ratten- [40] und Kängurusehnen [222, 444] analysiert. Beide eignen sich aufgrund ihrer großen Länge und des im Vergleich zur equinen OBS geringeren Durchmessers hervorragend für einen Einspannvorgang und eine anschließende biomechanische sowie strukturelle Bewertung. Die Problematik einer geringeren Einspannlänge und einer höheren Belastbarkeit der equinen OBS, angesichts einer größeren Querschnittsfläche, ist bei diesem Sehnentyp unbegründet. Die Rattensehnen so-

wie die in vielen Forschungsarbeiten verwendeten Rattenschwanzsehnen, die ein vergleichbares Kollagengerüst vorzuweisen haben, garantieren eine ausreichende Verfügbarkeit, verbunden mit einer einfacheren Versuchsdurchführung [289]. Ungeachtet dieser Analogie ist eine Erforschung des Schädigungsverhaltens, unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung einer Therapie von rupturierten equinen OBS, für eine erfolgreiche Gestaltung nur am selben Modelltier sinnvoll. Aufgrund dessen war trotz einer aufwändigeren Versuchsgestaltung der Einsatz einer equinen OBS unausweichlich. Lediglich für die Evaluierung der Eignung des servohydraulischen Prüfsystems und der implementierten Sonographie wurden bovine TBS verwendet, da diese in einer ausreichenden Menge zur Verfügung standen sowie eine vergleichbare Belastbarkeit vorweisen konnten.

Der aus dem im vorherigen Abschnitt aufgezeigte Temperaturgradient zwischen dem Umgebungsmedium und der Einspannvorrichtung verlangt eine effektive wie auch zuverlässige Isolierung des Fixierungsabschnittes mit Hilfe von Polyethylenschaumplatten. Dies ist notwendig, um neben einem Einfriervorgang und einer damit verbundenen zuverlässigen Fixierung der Sehne, eine für die Versuchsreihen notwendige Umgebungstemperatur von $T = 37\text{ °C}$ zu ermöglichen. Wang et al. [222] diskutierten in ihrer Veröffentlichung die Auswirkungen der Umgebungstemperatur auf die Lebensdauer einer Kängurusehne. Im Vergleich mit einer Prüfung unter Raumtemperatur verdeutlicht die Studie eine Abnahme der Lebensdauer der Proben bei Verwendung in einem temperierten Medium von $T = 37\text{ °C}$. Dies veranschaulicht die Wichtigkeit einer nicht nur konstanten, sondern auch an die physiologischen Gegebenheiten des Tieres angepassten Temperatur der NaCl-Lösung. Des Weiteren ist zusätzlich zu einer Temperaturabhängigkeit der mechanischen Materialeigenschaften des Kollagengewebes eine allgemeine Flüssigkeitsversorgung der Sehne über einen längeren Versuchszeitraum notwendig, um eine Versprödung des Prüflings zu vermeiden. Haut et al. [445] untersuchten die Abhängigkeit der biomechanischen Kennwerte einer humanen Patellasehne von dem Umgebungsmilieu. Im Rahmen von Zugversuchen wurden innerhalb einer hypertonen im Vergleich zu einer hypotonischen Lösung erhöhte Steifigkeitswerte ermittelt. Eine Verringerung der Rupturgrenze sowie der Längenänderung bis zur Ruptur der Sehne wurde zusätzlich erfasst. Die in den Grundlagen dieser Arbeit dargestellten Ermüdungsversuche an Sehnen verschiedener Tiere verdeutlichen im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen eine deutlich geringere Bruchzyklenzahl. Dies ist mit einer Prüfung außerhalb einer physiologischen Umgebung begründbar, da die verwendeten Sehneneinspannungen, abweichend von dieser Konstruktion, nur mit einem Trockeneisreservoir ausgestattet sind und bedingt durch einen schnellen Tauprozess lediglich eine Prüfung unter Luftatmosphäre ermöglichen. Innerhalb einer definierten Flüssigkeitsumgebung können damit realitätsnähere Ergebnisdarstellungen

gen erzielt werden. Um die Problematik der hohen Kraftübertragung auf einen intakten Sehnenstrang und die damit vorhandene Notwendigkeit der Kryotechnologie zu umgehen, verwenden zahlreiche Wissenschaftler einzelne Sehnenfaszikel, um daran das Verformungs- und Ermüdungsverhalten zu beschreiben [32, 49, 236, 250, 254, 292, 293, 300, 314].

Die verwendete physiologische Kochsalzlösung verfügt über einen vergleichbaren osmotischen Druck wie die Körperzellen und sorgt dadurch für einen Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten während des Versuchs [446], wodurch eine realitätsnähere Prüfumgebung definiert wird. Dem gegenüber stehen Versuche von Svensson et al. [272, 273] an humanen Patellasehnen. Seine Arbeitsgruppe untersuchte das Verformungsverhalten in einem getrockneten und hydrierten Zustand der Sehne und sie beobachteten eine Reduktion des Elastizitätsmoduls durch den Trocknungsvorgang. Dieses Erkenntnis ist jedoch nicht erklärbar, da eine Dehydrierung der Proben für eine Versprödung und für einen Anstieg der Steifigkeit sorgen sollte.

Batson et al. [72], Gillis et al. [267] und Goh et al. [286] veranschaulichen mit ihren statischen Versuchsreihen eine Abhängigkeit der Sehnensteifigkeit von dem Alter der Spezies. Ein im Rahmen der genannten Forschungsaktivitäten festgestellter Steifigkeitsanstieg bis zum Erreichen des 15. Lebensjahres konnte innerhalb dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Materialkennwerte der Sehnen der Jungtiere (Pferd 4, 5) sind von der älteren Probandengruppe (Pferd 1, 2) nur hinsichtlich der Rupturdehnung zu unterscheiden. Die gemessene Zugfestigkeit sowie der Elastizitätsmodul innerhalb eines Zustandes sind vergleichbar. Abbildung 4.4 und Abbildung 4.6 zeigen für beide Zustände eine erhöhte Dehnbarkeit der OBS der vier- und siebenjährigen Tiere (Pferd 4, 5) gegenüber der höheren Altersgruppe (Pferd 1, 2). Die zyklischen Versuche verdeutlichen hingegen eine geringere Lebensdauer der OBS (S23, S24) eines Jungtieres, was die Abhängigkeit des Ermüdungsverhaltens von dem Alter verdeutlicht und die Entstehung von Mikrotraumata insbesondere in einem frühen Entwicklungszustand der Sehne unterstützt. Eine Verwendung von lediglich drei Jungtieren beschreibt indessen keine ausreichende Statistik, bietet jedoch eine eindeutige Tendenz, dass nach dem Erreichen der vollständigen Sehnenreife die größtmögliche Ermüdungsfestigkeit erreicht wird. Thorpe et al. [314] konnten in ihren Ermüdungsversuchen an equinen Faszikeln einer OBS (siehe Abbildung 2.11) jedoch eine deutlich geringere Lebensdauer gegenüber den Versuchsreihen in dieser Arbeit feststellen. Dies kann mit einer altersbedingten Vorschädigung des Gewebes und mit einer abweichenden Probenvorbereitung verbunden sein.

Ein weiterer Einflussfaktor bezüglich der Genauigkeit der erzielten Messergebnisse

sind die vor Versuchsbeginn bestimmten Messgrößen wie die Sehnenquerschnittsfläche A_0 und die Anfangsmesslänge l_0 . Erstgenannte wird mit Hilfe des Ultraschallsystems im mittleren Metakarpalbereich der equinen OBS bei einer definierten Zugbelastung von 70 N ermittelt. Die Anfangsmesslänge l_0 ist als freiliegender Sehnenabschnitt zwischen den Einspannvorrichtungen definiert und wird ebenfalls bei einer monotonen identischen Belastung aufgezeichnet. In Anlehnung an die Arbeiten von Crevier et al. [207], Cherdchutham et al. [447] und Lynch et al. [253] wurde dieser Betrag als Zugkraft definiert. Beide Geometrie Kennwerte werden in der Berechnung der einsinnigen Spannung σ und Dehnung ε einbezogen und für die Erstellung des Spannung-Dehnung-Diagramms verwendet. Die Vorschubgeschwindigkeit des vertikal verfahrenen Arbeitszylinders der servohydraulischen Prüfmaschine wurde auf $v = 1 \text{ mm/s}$ festgelegt. Der Literaturkenntnisstand beschreibt jedoch einen Geschwindigkeitsbereich von 3 - 10 mm/s [448, 449] bei der Durchführung von einsinnigen Zugversuchen an biologischem Gewebe. Unter der Prämisse, dass während des Zugversuchs eine permanente ultrasonographische Überwachung der Schädigungsentwicklung ermöglicht werden muss und eine Auswirkung unterschiedlicher Geschwindigkeiten auf das biomechanische Materialverhalten nicht erforscht werden kann, wurde die beschriebene Vorschubgeschwindigkeit als zulässig erachtet.

Das in Abbildung 4.8 illustrierte transversale Sonogramm zeigt die unter Anwendung des integrierten Messtools eingefasste Sehnenquerschnittsfläche, wobei die Markierung der Grenzbereiche, bedingt durch das technisch unvermeidbare Bildrauschen, nicht eindeutig definierbar ist. Die in diesem Zusammenhang erzielten Querschnittsflächen wurden stichprobenartig mit Umfangsmessungen unmittelbar an der Sehne unter Anwendung eines Maßbandes verglichen, wodurch die Methodik der Ultraschallmessung als geeignet deklariert werden konnte.

5.1.1 Biomechanische Betrachtung

Die biomechanischen Versuchsreihen in Form von monotonen sowie zyklischen Tests sollen die Auswirkungen des Dezellularisierungsprozesses auf das Verformungs- sowie Schädigungsverhalten ermitteln. Zusätzlich zu dem genannten Vorhaben werden im Folgenden die Erkenntnisse für eine Eignung der Einsetzbarkeit des behandelten Fasergewebes in läsierten Abschnitten einer equinen OBS diskutiert und ein Belastungslimit während der Rekonvaleszenzzeit definiert.

5.1.1.1 Monotone Beanspruchung

Die monotonen Versuchsreihen zeigen infolge des Dezellularisierungsprozesses einen um 12 % verringerten Elastizitätsmodul gegenüber der initial intakten Sehne. Bei der Bestimmung dieses Werkstoffkennwertes wird abweichend zu den Arbeiten von Wren et al. [296] zur Beurteilung der Steifigkeit der Tangentenmodul dem Sekantenmodul vorgezogen, um keine geometrischen Einflussfaktoren, hervorgerufen durch die Toe-Region, in die Berechnung einzubeziehen. Die Definition der Steifigkeit bietet einen weitreichenden Interpretationsspielraum und kann Geometrieparameter beinhalten. Da jedoch im Rahmen dieser Forschungsaktivitäten gezielt die anatomischen Einflüsse von den werkstoffspezifischen Gegebenheiten separiert werden sollen, wird der Elastizitätsmodul zur Charakterisierung herangezogen. Dieser wird, wie bei der Beurteilung von metallischen Werkstoffen üblich, auch in dieser Arbeit als Maß für die Steifigkeit bezeichnet [242]. Im weiteren Verlauf dieser Diskussion werden die Auswirkungen der abweichenden Definitionsansätze in Bezug auf die Steifigkeit des Versuchsobjektes deutlich. Der Elastizitätsmodul wird in Anlehnung an die zuvor genannte Literatur mit Hilfe des Steigungsdreieckes an der Geraden des linear-viskoelastischen Verformungsabschnittes bestimmt.

Die Spannung-Dehnung-Diagramme illustrieren neben der Verringerung des Elastizitätsmoduls eine Abnahme der Zugfestigkeit um 25 % sowie der Rupturdehnung um 9 % infolge der vor Versuchsbeginn durchgeführten Dezellularisierung der equinen OBS. Des Weiteren ist eine Reduktion der Toe-Dehnung zu verzeichnen gewesen. Diese messbaren Unterschiede lassen auf Strukturveränderungen im Kollagengewebe schließen. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Kryobrüchen von initial intakten sowie dezellularisierten equinen OBS zeigen eine deutliche Verringerung des lockeren interfibrillären Bindegewebes. Ein Verlust der quervernetzten Struktur war makroskopisch in der Versuchsvorbereitung an der zellosoen Sehnengruppe sichtbar (siehe Abbildung 5.2), weshalb ein Einfluss auf die Kennwerte nicht verwunderlich ist.

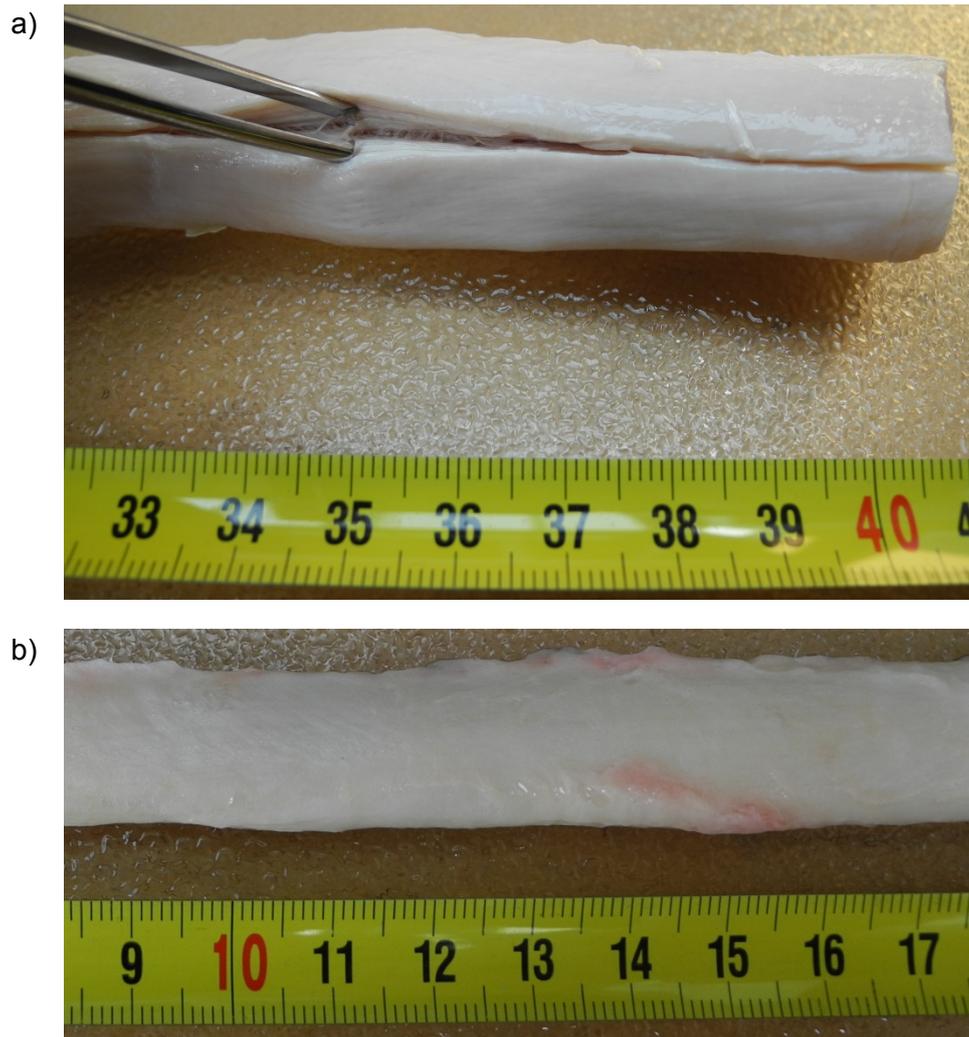


Abbildung 5.2: Makroskopisch sichtbarer Verlust der quervernetzten Struktur an einer a) dezellularisierten gegenüber einer b) initial intakten equinen OBS

Der Einsatz des dezellularisierten Kollagengerüsts als implantierte Ersatzstruktur für rupturierte Faserabschnitte ist bis zu einer definierten Belastung gegeben. *In vivo* Versuche zur Bestimmung der realen Beanspruchungsvorgänge bei verschiedenen Gangarten zeigten im Galopp eine bis über den linear-viskoelastischen Bereich hinaus verlaufende Dehnung der equinen OBS. Aufgrund der prozessbedingten Reduktion der Belastbarkeit der dezellularisierten Sehne zeigen die biomechanischen *in vitro* Zugversuche eine Eignung während der Rekonvaleszenzzeit lediglich in der Schrittbewegung des Pferdes.

Im Falle einer vollständigen Ruptur und einer angewandten Fixierung der beiden Sehnenenden würde eine verwendete Naht-Ankerteknik lediglich 36 % der Zugfestigkeit übertragen können [176]. Allein aus diesem Grund ist eine Trab- und Galoppbewegung des Pferdes ausgeschlossen. Vielmehr kann das Implantat als Füllmaterial für eine mögliche, bei der Zusammenführung der Sehnensegmente entstehende Hohlrumbildung [450]

fungieren und den Heilungsverlauf positiv beeinflussen. Nur unter diesen Bedingungen sind eine rasche Quervernetzung der Kollagenfibrillen und ein Aufbau der intrinsischen Blutversorgung möglich [451, 452].

Es ist nach der Implantation des zelllosen Fasergerüsts im Zusammenhang mit einer angewendeten Stammzelltherapie eine Boxenruhe zu empfehlen, wobei auf den Bodenuntergrund während der Rekonvaleszenzzeit zu achten ist. Crevier et al. [453] beschreiben in ihren Arbeiten die Auswirkungen von begehbaren Bodenuntergründen auf die Belastung der equinen OBS. Ein weicher Untergrund führt durch das Einsinken der Extremität zu einer höheren Beanspruchung der Beugesehne, was für den Heilungsverlauf gegebenenfalls nicht förderlich ist.

5.1.1.2 Zyklische Beanspruchung

Für eine möglichst realitätsnahe Durchführung der zyklischen Versuchsreihen gilt es, neben einer dem tierischen Organismus nachempfundenen physiologischen Umgebung, eine geeignete Krafteinleitung in die Sehne sowie einen Kompromiss zwischen der Prüffrequenz und der Versuchsdauer zu gewährleisten. Die Geschwindigkeit des Arbeitszylinders ist an Grenzwerte der in der Bodenplatte des Umgebungsbades verbauten Stangendichtung angepasst und ermöglicht bei einer Prüffrequenz von 2 Hz sowie einer notwendigen Amplitude eine simulierte harmonische Trabbewegung.

Um die Verformungsmechanismen strukturiert analysieren zu können, muss bei der Interpretation des zyklischen Verformungsverhaltens an Kollagenstrukturen von Tieren die reversible Toe-Region von dem linear-viskoelastischen Abschnitt separiert werden. Abbildung 5.3 a) ist aufbauend auf der aus Kapitel 4.4.1 bereits bekannten Abbildung 4.11 entstanden und dient als Diskussionsgrundlage, um die wirkenden Verformungsmechanismen zu erläutern. Abbildung 5.3 b) zeigt zur Verdeutlichung des Sachverhaltes eine projizierte Ansicht, die dem Leser das Verständnis erleichtern soll.

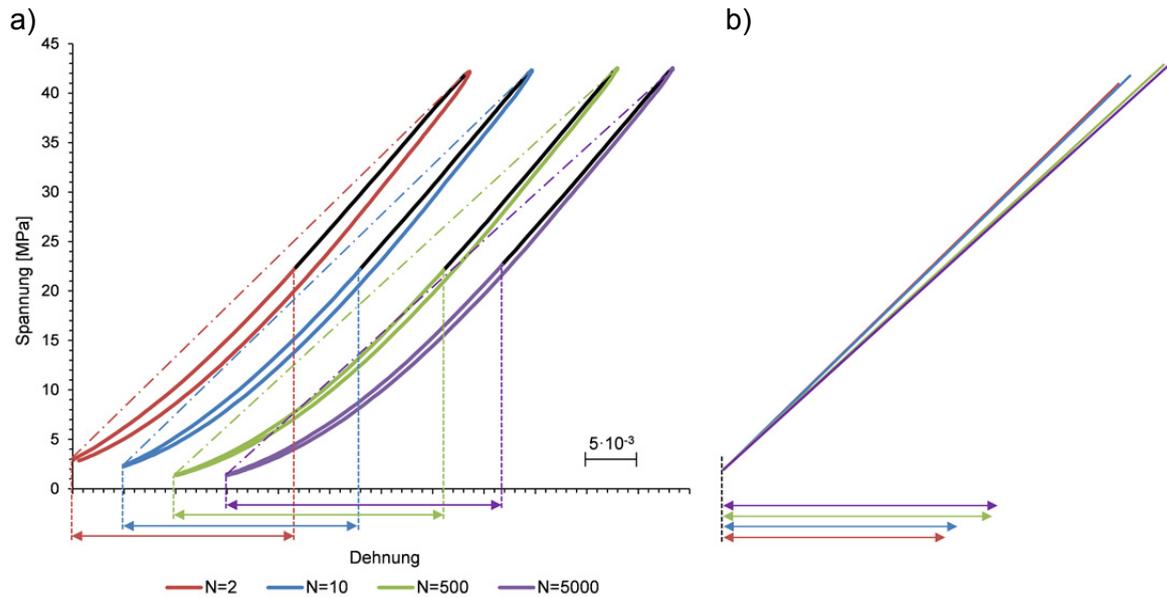


Abbildung 5.3: Darstellung von a) vier Spannung-Dehnung-Hysteresen (S21) bei einer Spannungsamplitude von $\Delta\sigma/2 = 22 \text{ MPa}$ und charakteristischen Lastspielzahlen sowie b) einer projizierten Ansicht des Sekantenmoduls und der Entwicklung der Toe-Dehnung

Eine farblich an die zugehörigen Hystereseschleifen angepasste Pfeildarstellung, unterhalb der Dehnungsachse, illustriert eine kontinuierliche Zunahme der Toe-Dehnung und eine Abnahme der Sekantensteigung mit steigender Zykluszahl. Der linear-viskoelastische Verformungsabschnitt ist zur Verdeutlichung in der Belastungshälfte der Hystereseschleife schwarz eingefärbt, um die Abtrennung von der konvex verlaufenden Crimp-Struktur zu verdeutlichen. Abbildung 5.3 b) illustriert für jede Hystereseschleife durch eine Projektion der farblichen Pfeildarstellung, sowie eine die Sekantensteigung beschreibende Liniendarstellung in einer aus Übersichtsgründen gestalteten interpretierbaren Ansicht den zuvor beschriebenen Sachverhalt. Ein Vergleich der Dehnungen offenbart die Begründung für eine aus dem Wechselverformungsdiagramm ersichtliche Entfestigung mit zunehmender Lastspielzahl. Die Pfeildarstellung illustriert eine Längenzunahme der Toe-Dehnung bis zum Erreichen der Zyklus-5000-Hysterese, wobei insbesondere in den ersten Lastspielen die umfangreichste Verformung erreicht wird. Verbunden mit einer zunehmenden Toe-Dehnung resultiert eine Abnahme der Sekantensteigung bei gleichzeitiger Zunahme des Elastizitätsmoduls. Die Beschaffenheit der Hystereseschleifen verdeutlicht eine Reduzierung der Schwingbreite der linear-viskoelastischen Dehnung mit steigender Zykluszahl verbunden mit einer kontinuierlichen Zunahme der Dehnungsschwingbreite, womit ein Anstieg des Elastizitätsmoduls geometrisch begründet werden kann.

Eine Zunahme des Elastizitätsmoduls wäre bei einem kraftgeregelten Belastungszustand in der Regel mit einer Verringerung der Dehnungsschwingbreite verbunden. Dieses Materialverhalten ist unter Hinzunahme der Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14 zu erörtern. Bei der initial intakten Kontrollgruppe ist in den ersten 300 - 500 Zyklen ein kontinuierlicher Steifigkeitszuwachs zu verzeichnen, obwohl eine deutliche Zunahme der Dehnung bis zur Sättigungszone vernommen wird. Die dezellularisierte Behandlungsgruppe zeigt einen Maximalwert für den Elastizitätsmodul nach einer deutlich geringeren Lastspielzahl (3 Zyklen). Die im Verhältnis zum Sättigungsbereich detektierte Längenzunahme in der ersten Verformungszone spricht für eine umfangreiche anatomische Veränderung der Crimp-Struktur bedingt durch die Beanspruchung der Fibrillen. Der erläuterte Anstieg des Elastizitätsmoduls in den ersten Zyklen ist im Einklang mit der Flüssigkeitsverdrängung zu begründen. Wie in den Grundlagen dieser wissenschaftlichen Arbeit an diversen Sehmentypen erläutert, ist die Beanspruchung mit einem Gewichtsverlust der Probe insbesondere in den ersten Zyklen verbunden, was mit einem Flüssigkeitsverlust erklärt wird [260]. Die Flüssigkeitsmoleküle fungieren vor dem Herausdiffundieren aus der Sehne als Hindernis und erhöhen die Steifigkeit. Laut Thornton et al. [258] hat sich der Flüssigkeitsgehalt in der Sehne nach einer Ruhezeit von 20 min wieder normalisiert. Dies begründet die Reproduzierbarkeit dieses Effektes nach einer Haltezeit und Wiederaufnahme des Ermüdungsversuches nach einer Erhöhung der Spannungsamplitude. Auf Grundlage dessen und die morphologischen Erkenntnisse eingeschlossen, ist die maximale Steifigkeit der dezellularisierten Sehne bei einer geringeren Zyklenzahl zu vernehmen als bei der initial intakten Kontrollgruppe. Die bereits makroskopisch sichtbaren degenerativen Strukturveränderungen (siehe Abbildung 5.2) sorgen für einen ungehinderten Flüssigkeitsverlust des innerhalb des Sehnenverbundes befindlichen Mediums.

Die Verläufe zeigen zwar einen Anstieg des Elastizitätsmoduls von lediglich 4 %, was jedoch aus folgenden Gründen keiner Messungengenauigkeit zugeordnet werden kann. Abbildung 4.12 verdeutlicht eine gute Regelung der Prüfmaschine mit Beginn der ersten Zyklen, erkennbar an den auf vergleichbaren Spannungshorizonten befindlichen Lastumkehrpunkten. Zusätzlich wurden die Versuchsbedingungen, wie die Umgebungstemperatur und das physiologische Medium nicht verändert. Ein erkennbarer Sättigungsbereich ohne Schwankungen in dem Kurvenverlauf unterstreicht ebenfalls die Gültigkeit der Messung.

In Kapitel 2.3.2 wird der Zusammenhang zwischen dem Mullins Effekt und einer Entfestigung der Struktur anhand dreier Spannung-Dehnung-Hysteresen in einer dehnungsgeregelten Versuchsdurchführung erläutert. Dieser vorzugsweise aus der Polymerforschung bekannte Mechanismus ist auf diese Kollagenstruktur übertragbar und beschreibt

die Entfestigung der Sehne in den ersten Prüfzyklen, bevor ein Sättigungsbereich erreicht wird, in dem bis zur ultrasonographisch erkennbaren Schädigungseinleitung eine nahezu konstante Dehnungsschwingbreite zu verzeichnen ist. Eine Gewebeschädigung wird durch diese umfangreiche Längenänderung in der ersten Zone nicht erreicht, was an der Reproduzierbarkeit des Mechanismus deutlich wird. Nach einer kurzen Haltezeit und Wiederaufnahme der zyklischen Belastung mit einem erhöhten Spannungshorizont kann der reversible Effekt in einer identischen Form erneut vernommen werden. Diese separierte Betrachtung verdeutlicht die Bedeutung der in Form eines Geometriefaktors in das Verformungsverhalten eingehenden Crimp-Struktur sowie den Elastizitätsmodul, der als materialspezifischer Werkstoffkennwert die Steifigkeit beschreibt. Aufgrund der hohen Prüffrequenz von 2 Hz erfährt die Sehne eine, bedingt durch diese geringe Rekonvaleszenzzeit resultierende, irreversible Verformung, die eine Rückführung in eine wellenförmige Fibrillenordnung in den unbelasteten Ausgangszustand nicht mehr ermöglicht. Abweichend von diesen Erkenntnissen zeigt das Ermüdungsverhalten von Rattenschwanzsehnen nach Rigby et al. [290] eine nicht zu erklärende Verfestigung nach 700 Lastspielen (siehe Abbildung 2.8).

Eine explizite Unterscheidung des konvexen und linear-viskoelastischen Verformungsabschnittes, wie in dieser Forschungsaktivität angewendet, wurde in der wissenschaftlichen Arbeit von Wren et al. [296] auf diesem Themengebiet nicht erforscht. Vielmehr wurde der Sekantenmodul, der nach den in diesem Kapitel postulierten Beobachtungen den geometriebedingten sowie den materialspezifischen Einflussfaktor undifferenziert betrachtet, angewendet, wodurch folglich die einzelnen Verformungsmechanismen nicht im Detail evaluiert werden konnten. Abbildung 5.4 verdeutlicht einen mit ansteigender Zyklenzahl abfallenden Sekantenmodul ohne die aus Abbildung 4.13 ersichtliche Erkenntnis einbeziehen zu können.

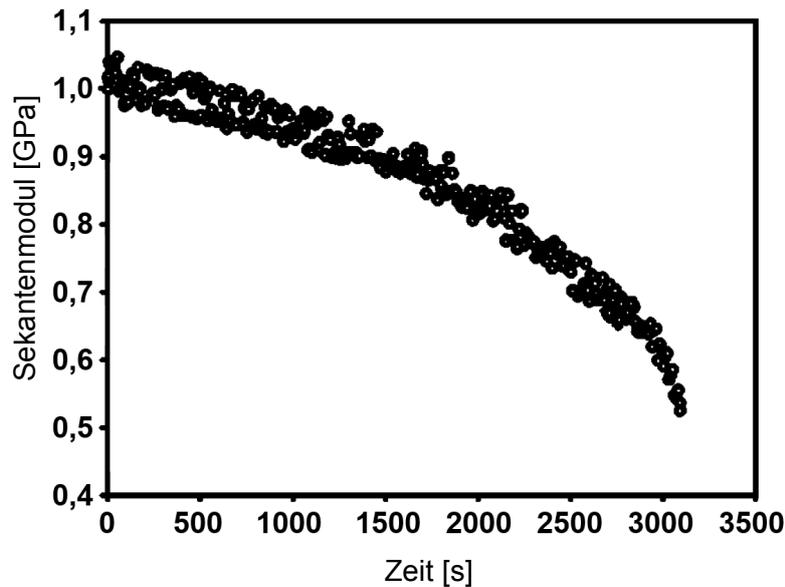


Abbildung 5.4: Sekantenmodul einer humanen Achillessehne (modifiziert nach Wren et al. [296])

Fung et al. [299] präsentieren, abweichend von dem in Abbildung 5.4 gezeigten und im Einklang mit dieser Arbeit stehenden Verlauf des Sekantenmoduls (siehe Abbildung 2.9) einen vergleichbar mit der Entwicklung des Elastizitätsmoduls verlaufenden Anstieg des Sekantenmoduls. Zwar wird der Sekantenmodul in dieser Darstellung auf die Längenänderung bezogen, was jedoch einen Anstieg des Moduls in der Primärphase nicht erklären lässt. Bei einer kraftregelten Versuchsdurchführung würde dies für eine Verkürzung der Gesamtlänge explizit in den ersten Lastzyklen sprechen, was in zahlreichen Versuchen im Rahmen dieses Forschungsprojektes nicht festgestellt werden konnte. Vielmehr spricht ein solches Materialverhalten für eine mangelhafte Regelung der Prüfmaschine, bei der erst nach mehreren Zyklen der vollständige Betrag des Spannungshorizontes erreicht wird.

Die Erkenntnisse aus den zyklischen Versuchsreihen verdeutlichen die Wichtigkeit der Evaluation verschiedener Auswerteverfahren. Erst mit der Anwendung des Tangentenmoduls als Maß für die Steifigkeit konnten die verschiedenen Einflussfaktoren betrachtet werden, woraus eine Allgemeingültigkeit über die Auswertung der Ermüdungsversuche hinaus für die monotonen Zugversuche gegeben ist.

5.1.2 Polarisationsmikroskopische Charakterisierung

Die Notwendigkeit der Durchführung von polarisationsmikroskopischen Untersuchungen ist dem geringen Auflösungsvermögen des Ultraschallsystems geschuldet, das eine

Detektion von Strukturveränderungen im Kollagengewebe sowie eine Charakterisierung der Crimp-Struktur nicht ermöglicht.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die Auswirkungen des Dezellularisierungsprozesses auf das Schädigungsverhalten nicht weiter ergründet, da von veterinärmedizinischer Seite keine Notwendigkeit bestand. Die in Kapitel 4.1 aufgezeigten Erläuterungen, die zwar ausschließlich die erkennbaren prozessbedingten Strukturveränderungen in der interfibrillaren Zone betreffen, jedoch im Zusammenhang mit literaturbasierten Erkenntnissen für eine aussagekräftige Erklärung der Abnahme der biomechanischen Festigkeit sprechen, sind weitestgehend begründbar und nicht Bestandteil dieser Untersuchungen. Unter Anwendung der Ultraschalltechnologie ist bei beiden Zuständen eine ersichtliche Schädigungsentstehung im zentralen Areal der Sehne erkennbar, die im fortgeschrittenen Stadium zu einer Kernläsion führt. Da eine bedingte Strukturabhängigkeit für eine Initiierung der Ruptur an dieser Position verstärkt postuliert wird [32, 235], wurden mit Hilfe eines Kryomikrotoms zentrale sowie periphere Faszikel aus dem Gewebe einer initial intakten equinen OBS sezirt und unter polarisationsmikroskopischer Betrachtung separiert Belastungstests unterzogen. Diese Form der Probenpräparation ist in Anlehnung an die Arbeit von Patterson-Kane et al. [236] mit einer entscheidenden Änderung der zentralen Probenabmessung entstanden. Die schematische Darstellung in der genannten Veröffentlichung verdeutlicht in der Sagittalebene eine definierte zentrale Flächenzuordnung, die dreiviertel der Gesamtfläche beinhaltet und somit einen peripheren Verformungscharakter in die Bestimmung der zentralen Crimp-Struktur einbringt. Abbildung 4.18 zeigt schematisch die Einteilung der Entnahmepositionen im transversalen Sehnenschnitt und verdeutlicht nur innerhalb der genannten Probenposition entnommene Schnitte.

Ein Herauslösen einzelner Faszikel aus dem Sehnenverbund ist ohne chemische Einwirkung und mechanische Belastung der Fasern nicht möglich. Für eine aussagekräftige und gleichzeitig reproduzierbare Bestimmung der Crimp-Winkel und -Längen darf die sehr empfindliche Faserstruktur zuvor jedoch keinen Verformungen unterzogen werden, weshalb die Probenpräparation mittels Kryomikrotom gewählt wird, die eine unbelastete Struktur für die Versuchsreihen definiert. Järvinen et al. [454] bewerten die Gewebestruktur anhand von überbelasteten sowie initial intakten humanen Achillessehnen und lokalisierten eine Reduktion der Crimp-Winkel und des Querschnitts der Fibrillen nach einer Schädigung der Sehne. Józsa et al. [455] stützen diese Erkenntnisse mit ihren Untersuchungen an humanen Achillessehnen, an denen im degenerierten Zustand ein großer Anteil an geringeren Fibrillendurchmessern aufgefunden werden konnte. Dies verdeutlicht die Empfindlichkeit sowie Irreversibilität des Gewebeverbundes nach einer einmaligen

Überbelastung. Die Abmessungen des Probenmaterials können mit Hilfe des Kryomikrotoms gezielt definiert werden, wodurch jedoch der komplexe und für die Festigkeit der Sehne notwendige Strukturverbund gelöst wird. Wie in den Grundlagen dieser Arbeit beschrieben sind die Fibrillen mit einer Länge von mehreren Millimetern durch Glykosaminoglykane orthogonal zur Längsachse miteinander verknüpft und bilden im Verbund die Faser. Durch die Probenpräparation mittels Kryomikrotom ist jedoch niemals ein parallel zur Längsachse verlaufender Schnitt möglich, ohne einzelne Fasern zu durchtrennen und die Beanspruchbarkeit über die vollständige, vor Versuchsbeginn gemessene Querschnittsfläche zu nutzen. Hervorgerufen durch die Topographie der Crimp-Struktur wird dies unter Umständen noch unterstützt.

In den folgenden Kapiteln werden detailliert die Charakterisierung der Crimp-Struktur sowie das Verformungsverhalten der Faszikel für eine aufschlussreiche Beschreibung der Schädigungsmechanismen diskutiert. Die Crimp-Struktur wurde an zuvor definierten Spannungshorizonten gemessen, um die visualisierende Darstellung der Topographie an charakteristischen Punkten der nachfolgend bestimmten Spannung-Dehnung-Diagramme zuordnen zu können (siehe Abbildung 4.24). Dies geschieht in zwei Prozessschritten, da aufgrund des Kriechverhaltens der Fibrillen an den Haltepunkten keine Aufnahme eines kontinuierlichen Kurvenverlaufes möglich gewesen wäre.

5.1.2.1 Auswirkungen der Crimp-Struktur auf die Schädigung

Die Beschaffenheit der Crimp-Struktur beeinträchtigt das Verformungsverhalten und ist, ausgehend vom zentralen Areal, maßgebend an der Schädigung der Sehne beteiligt. Es existieren keine *in vivo* Studien über die realen Crimp-Winkel sowie -Längen während des Bewegungsablaufs des Pferdes. Wilminck et al. [235] und Patterson-Kane et al. [32, 49, 236] untersuchten die Crimp-Struktur in einem undefinierten Belastungszustand mit Hilfe eines Durchlicht-Polarisationsmikroskops. Die Resultate der zweitgenannten Autoren entstanden zusätzlich in einem dehydrierten Zustand und anschließendem Einbettvorgang der Probe. Nach Nicholls et al. [456, 457] beeinflussen eine Dehydrierung mittels Alkohol und ein anschließender Einbettvorgang zur Fixierung der Faszikelsegmente entscheidend die Crimp-Struktur. Im Rahmen seiner Untersuchungen an Laborratten sorgten die genannten Behandlungsschritte für eine Reduktion des Crimp-Winkels und der -Länge. Dies weckte die Motivation, eine Belastungsvorrichtung, implementiert in ein Durchlicht-Polarisationsmikroskop, zu entwerfen, die es ermöglicht, unbehandelte Sehensegmente in einem Umgebungsmedium vordefiniert zu belasten und die Crimp-Struktur zu bestimmen. Diese Vorkenntnisse eingeschlossen sind die gemessenen größte-

ren Crimp-Längen in den eigenen Untersuchungen nicht unerwartet und beschreiben den Strukturzustand in einer realitätsnahen Umgebung. Die Crimp-Winkel des zentralen Areals sind im Einklang mit den Zahlenwerten nach Wilmink et al. [235], der die Versuche an hydrierten Proben durchführte. Lediglich die Crimp-Winkel der Struktur im peripheren Areal liegen 33 % oberhalb der Messwerte im Zentrum. Diese Beschaffenheit der Sehne sorgt, durch den Bewegungsablauf des Tieres, für eine frühzeitig höhere Beanspruchung der Fibrillen in der zentralen Zone, woraus Kernläsionen resultieren. Abbildung 4.21 zeigt die Abnahme der Crimp-Winkel mit steigendem Verfahrweg der Belastungsvorrichtung. Bedingt durch einen höheren Anfangswinkel erfolgt eine um 26 % größere Rupturdehnung der peripheren Fibrillen im Vergleich zum zentralen Pendant.

Die Entwicklung der Crimp-Struktur mit einer zunehmenden Längenänderung unterstreicht die Eignung des nach Diamant et al. [38] gültigen Verfahrens zur Bestimmung der Steigungswinkel. Bedingt durch eine Halbierung des Drehwinkels um die N-Achse wird eine Symmetrie der Dachhälften der Kollagenstruktur vorausgesetzt.

Aufgrund des undefinierten Belastungszustandes waren sehr große Abweichungen zwischen den Ergebnissen der zuvor genannten Autoren zu verzeichnen (siehe Tabelle 2.3). Eine wichtige Erkenntnis bezüglich der Altersabhängigkeit konnte jedoch gewonnen werden. Lediglich bei equinen Jungtieren wurde ein geringerer Crimp-Winkel im peripheren Areal lokalisiert, was das Auftreten einer Kernläsion nur bei ausschließlich älteren Pferden begründet. Degenerative Veränderungen der Kollagenstruktur bis hin zu einer vollständigen Ruptur der Sehne waren jedoch ebenfalls an Jungtieren zu beobachten, die zu Beginn ihrer Karriere als Hobby- und Sportpferde standen. In Anbetracht der Tatsache, dass anhand der eigens durchgeführten Charakterisierung der Crimp-Struktur an equinen Fasersegmenten eines vierjährigen Lewitzers in dieser Alterskategorie ein geringerer Crimp-Winkel im zentralen Areal nachgewiesen werden konnte, unterstreicht die Wichtigkeit einer definierten Belastung der Probanden und erläutert zusätzlich die Schädigungsmechanismen von Jungtieren.

5.1.2.2 Verformungsverhalten einzelner Faszikel

Wie im Verlauf dieser Arbeit erläutert, wurde im Rahmen von weiteren Forschungsaktivitäten [235, 236] der Einfluss der Crimp-Struktur auf das Verformungsverhalten in einer schematischen Form postuliert (siehe Abbildung 2.6), ohne gemessene Spannung-Dehnung-Diagramme von Faszikeln der zentralen und peripheren Areale zu präsentieren. Die konstruktive Gestaltung einer Belastungsvorrichtung, implementiert in das Durchlicht-Polarisationsmikroskop (siehe Abbildung 3.9), ermöglicht *in situ* eine vordefinierte Bean-

spruchung der Fasern bis zur vollständigen Ruptur, um das Verformungsverhalten sowie Strukturveränderungen definiert zu charakterisieren. Weiterführende Untersuchungen sollen nicht nur rein geometriebedingte Einflussfaktoren offenlegen, sondern auch material-spezifische Gegebenheiten als zusätzlichen Schädigungsparameter deklarieren. Um diesen werkstofftechnischen Gesichtspunkt zu manifestieren wurden die in Kapitel 4.5.2 illustrierten Spannung-Dehnung-Diagramme der zentralen und peripheren Areale erstellt. Aufgrund der geringen Belastbarkeit ist ein Beanspruchungsbeginn schwer zu definieren, weshalb auf einen Beschreibungsansatz von Riemersma et al. [458] zurückgegriffen wird. Die Autoren definieren über eine Ausgleichsrechnung mit einem Polynom dritten Grades den Nullpunkt und somit reproduzierbar den Verformungsanfang, was in dieser Versuchsauswertung ebenfalls berücksichtigt wurde.

Das Erscheinungsbild der Toe-Region ist durch die in Tabelle 4.3 charakterisierte Crimp-Anatomie determiniert und im Einklang mit dem postulierten Verlauf aus den zuvor genannten Forschungsaktivitäten. Die parallel angeordneten linear-viskoelastischen Verformungsabschnitte der zentralen und peripheren Areale (siehe Abbildung 2.6) konnten anhand der zehn Mikrotomschnitte nicht bestätigt werden. Ohne den Elastizitätsmodul mit Hilfe eines Steigungsdreiecks rechnerisch zu bestimmen, genügt eine augenscheinliche Betrachtung der Verläufe der separierten Gewebeabschnitte, um qualitativ das unterschiedliche Steifigkeitsverhalten abschätzen zu können (siehe Abbildung 4.23 b)). Anhand der in Tabelle 4.4 arithmetisch gemittelten Elastizitätsmoduln für die zentralen sowie die peripheren Sehnenareale ist eine deutlich höhere Steifigkeit der erstgenannten Faszikelgruppe ersichtlich.

Bedingt durch eine identische Probenvorbereitung müssen über einen Einfluss der Crimp-Struktur hinaus anatomisch bedingte Unterschiede im Aufbau, die die biochemische Zusammensetzung der Struktur beeinflussen, ergründet werden. Da die einzelnen Zustände (zentrale und periphere Sehnenareale) separiert betrachtet werden und innerhalb dieser ein nahezu konstanter Crimp-Winkel sowie eine vergleichbare Anordnung von Glykosaminoglykanfilamenten angenommen wird, muss eine unterschiedliche Steifigkeit der zentralen und peripheren Faserabschnitte anderweitig begründbar sein. Die Literaturrecherche konnte zwar keine eindeutigen Kennwerte für die Elastizitätsmoduln der beiden Strukturkomponenten liefern, es konnte jedoch ein um mehrere Dekaden größerer Wert des E-Moduls für den Fibrillenanteil nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.6.2.1). Ohne die mit Hilfe der FE-Analyse und den Erkenntnissen aus den biomechanischen Zugversuchen an initial intakten equinen Sehnen erzielten Kennwerte in die Diskussion mit einzu-beziehen, wird ein Einfluss des Volumenanteils der Fibrillen am Gesamtkonstrukt für die

Bildung der Gesamtsteifigkeit ersichtlich. Da die Fasern die Sehne vollständig durchlaufen, ist an jedem Punkt der Sehne, mit Ausnahme einer Vorschädigung, wo eine Gewebsverdickung für eine abweichende Faseranordnung sorgt [459], ein identisches Flächenverhältnis von Fibrille und Matrix vorhanden. Aus diesem Grund besteht ausschließlich die Möglichkeit die Fibrillenanzahl sowie die Fibrillenquerschnittsfläche zu variieren, um dadurch den Elastizitätsmodul ausschlaggebend zu beeinflussen. Es existieren nur zwei Veröffentlichungen, die diese anatomischen Einflüsse mit einer biomechanischen Belastbarkeit in Einklang bringen. Sese et al. [460] beziehen sich in ihrer wissenschaftlichen Arbeit lediglich auf den Fibrillendurchmesser im zentralen sowie peripheren Areal und resümieren eine Abhängigkeit der Zugfestigkeit von diesem ohne den Flächenanteil zu berücksichtigen. Diese Begründung beruht auf Forschungsarbeiten von Parry et al. [52] aus den achtziger Jahren des vorherigen Jahrhunderts, die ebenfalls einen großen Fibrillendurchmesser für die Begründung einer hohen Festigkeit heranziehen.

Eine Vielzahl von fein vernetzten Fibrillen führen jedoch zu einer effektiveren Raumauffüllung und folglich zu einer höheren Gesamtsteifigkeit der Sehne. Diese Theorie gilt es nun auf die zentralen sowie peripheren Abschnitte zu übertragen. Abbildung 5.5 illustriert im Rahmen von transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen diese Zonen aus der zuvor genannten und von den Autoren fehlinterpretierten Veröffentlichung.

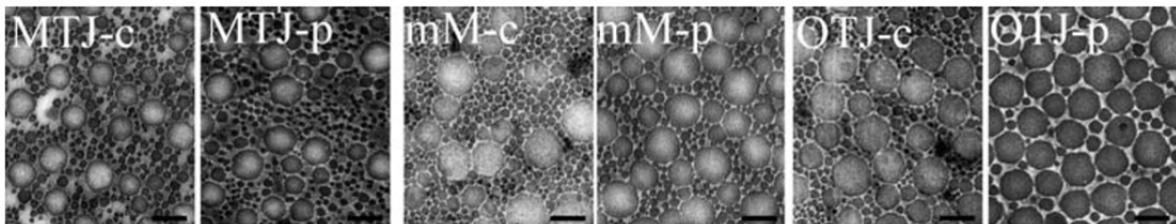


Abbildung 5.5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der zentralen (-c) und peripheren Areale (-p) einer equinen oberflächlichen Beugesehne im Sehnen-Knochen-Übergang (MTJ), im mittleren Metakarpalbereich (mM) und im Übergang zum Knochen (OTJ) [460]

Der mittlere Metakarpalbereich der equinen OBS konnte als relevante Schädigungszone bereits definiert werden, weshalb im Folgenden lediglich die Aufnahmen dieses Abschnittes betrachtet werden. Beginnend mit dem peripheren Faserabschnitt ist dort eine deutlich geringere Fibrillenanzahl, gekennzeichnet durch einen größeren charakteristischen Durchmesser, erkennbar. Bedingt durch diese anatomische Gegebenheit ist ein höherer Anteil an extrazellulärer Matrix für den Verbund notwendig. Das zentrale Areal ist mit Fibrillen geringeren Durchmessers versehen, die in ihrer Gesamtheit betrachtet zu

einer höheren Steifigkeit führen, da das Volumen der Sehne effektiver ausgefüllt wird. Dem gegenüber stehen die Erkenntnisse von Patterson-Kane et al. [32], die im arithmetischen Mittel keine Abhängigkeit des Fibrillendurchmessers von der untersuchten Position feststellen konnten, wobei eine von den Autoren angemerkte hohe Standardabweichung die Verwendbarkeit der Resultate in Frage stellt. Außerhalb des mittleren Metakarpalbereiches, in den Übergängen zum Muskel und zum Knochen, wird eine vergleichbare Durchmesser- und Dichte der Fibrillen deutlich.

Neben einer Betrachtung des Volumenanteils der Fibrillen am gesamten Sehnenaufbau wäre ein unterschiedlicher Kollagengehalt in den betrachteten Abschnitten eine Erklärung für das abweichende Verformungsverhalten, wie es Woo et al. [280] an ihren Untersuchungen aufzeigen können. Souza et al. [461] sowie Lin et al. [74] zeigen lediglich entlang der Längsachse einer bovinen und equinen Beugesehne lokale Veränderungen im Kollagengehalt, der jedoch nicht innerhalb der Querschnittsfläche an einer identischen Längsposition betrachtet wird. Die biomechanischen Zugversuche an den lokalen Faszikeln zeigen jedoch keine direkte Abhängigkeit von der Entnahmeposition innerhalb eines Sehnenquerschnittes. Auf Grundlage dieser geringen Anzahl von wissenschaftlichen Veröffentlichungen ist keine fundierte Begründung möglich, die Aufschluss über einen Einfluss des Kollagengehalts auf das Schädigungsverhalten und die Entstehung einer Kernläsion im Zentrum der Probe geben könnte.

Bemerkenswert sind hingegen die unerwartet hohen Unterschiede zwischen den im Zugversuch an intakten Sehnensträngen und den an Mikrotomschnitten ermittelten Kenngrößen. Tabelle 5.1 listet die gemessenen Kennwerte für die Faszikel der zentralen und peripheren Abschnitte sowie die Kennwerte des equinen initial intakten Sehnenverbundes.

Tabelle 5.1: Biomechanische Kennwerte der Mikrotomschnitte im zentralen und peripheren Areal sowie der initial intakten equinen OBS

Kennwert	Mikrotomschnitt	initial intakte OBS
	arithmetische Mittelung (zentral - peripher)	
Zugfestigkeit	9,65 MPa	85,12 ± 11,13 MPa
Rupturdehnung	51,25 %	13,57 ± 1,54 %
Elastizitätsmodul	34,9 MPa	818 ± 94,09 MPa

Nach einer arithmetischen Mittelung der Kennwerte beider Arealanteile der Kryoschnittproben zeigt die Auswertung eine um circa eine Dekade reduzierte Zugfestigkeit, eine Zunahme der Rupturdehnung sowie eine Abnahme des Elastizitätsmoduls.

Xing et al. [382] führten Belastungsversuche an Faszikeln einer Rattensehne durch, in deren Rahmen gleichermaßen eine Reduktion der biomechanischen Kennwerte und eine Zunahme der Rupturdehnung bei Verwendung von Triton X-100 ermittelt werden konnte. Diese Feststellung wird von Souza et al. [461] unterstützt, die im Rahmen ihrer biomechanischen Untersuchungen an bovinen Faszikeln eine drastische Verringerung der Zugfestigkeit sowie einen Zuwachs der Rupturdehnung gegenüber einer intakten Kontrollgruppe verzeichnen konnten, die annähernd denen der eigenen Versuchsreihen an equinen Mikrotomschnitten entsprechen. Ein direkter Vergleich zwischen den genannten Probenotypen wird innerhalb der zweitgenannten Veröffentlichung nicht hergestellt und folglich keine Erklärung für dieses Phänomen offengelegt. Elder et al. [405] beziffern eine prozessbedingte Strukturbeeinträchtigung in Abhängigkeit von der Kontaktzeit mit dem nichtionischen Tensid. Erwartungsgemäß wird die Steifigkeit des behandelten Gelenkknorpels mit zunehmender Dezellularisierungsdauer reduziert. Die in Kapitel 5.1.2 beschriebenen Auswirkungen des Herstellungsprozesses der Mikrotomschnitte auf die Beschaffenheit der Fibrillen resultiert in freiliegenden Faserendabschnitten, die bei einer bereits 10 %igen Belastung durch eine Holraumbildung sichtbar werden (siehe Abbildung 5.6).

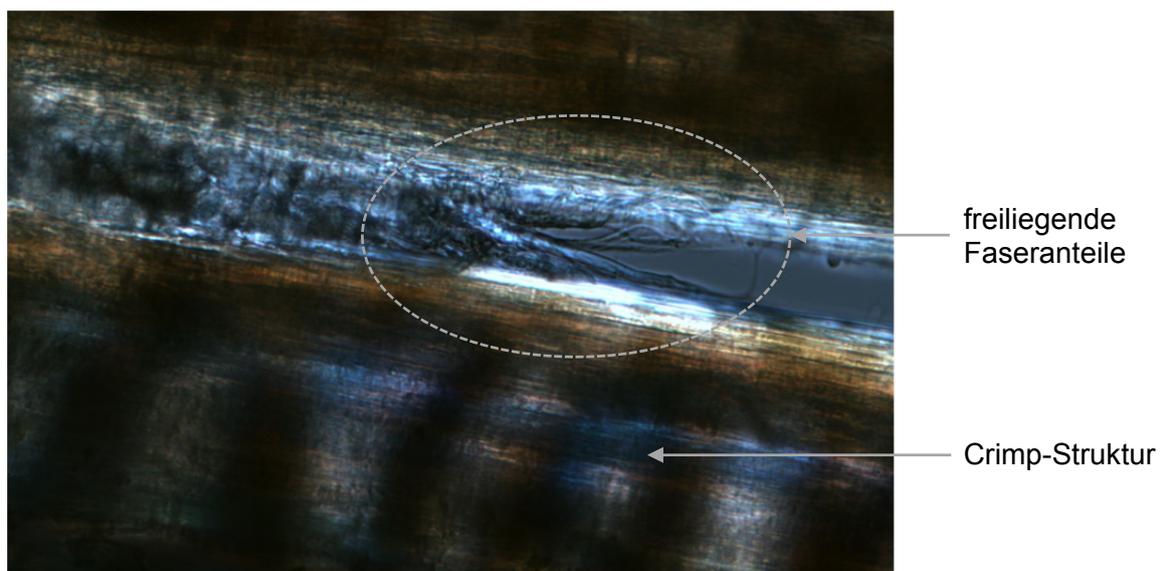


Abbildung 5.6: Freiliegende Faseranteile bei einer definierten Zugbelastung ($0,1 R_m$) kennzeichnen eine Schädigung der Kollagenstruktur vor Belastungsbeginn

Die ersichtliche Crimp-Struktur ist ein Indiz für eine Belastung der Fibrillen innerhalb des reversiblen Verformungsbereiches, wodurch von einer Vorschädigung der Kollagenstruktur ausgegangen werden muss.

Werden hingegen, hinsichtlich einer Betrachtung der Schädigungsmechanismen, die Kennwerte innerhalb der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen qualitativ verglichen, bietet diese Art der Präparation und Versuchsdurchführung eine hervorragende Möglichkeit Einflüsse durch die Probenvorbereitung ausschließen zu können, da ausgenommen von einer undefinierten Durchtrennung einzelner planar angeordneter Kollagenfasern konstante Probenmaße für eine Reproduzierbarkeit sorgen. Die Messergebnisse, welche im Rahmen der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt wurden, unterstützen anhand der geringen Messabweichung diese Ansicht und bilden damit eine aussagekräftige Darstellung sowie Ableitbarkeit auf das Schädigungsverhalten einer equinen OBS. Ein Beleg für dieses Postulat ist der Gegebenheit geschuldet, dass der Spannung-Dehnung-Verlauf der Probe Z5 und P4, die im Übergang vom zentralen zum peripheren Bereich entnommen wurden, inmitten der Verläufe dieser beiden charakteristischen Fasersegmente angeordnet sind. Abbildung 5.7 zeigt die aus Abbildung 4.18 und Abbildung 4.23 a) bekannten Darstellungen in einer farblich hervorgehobenen Ansicht.

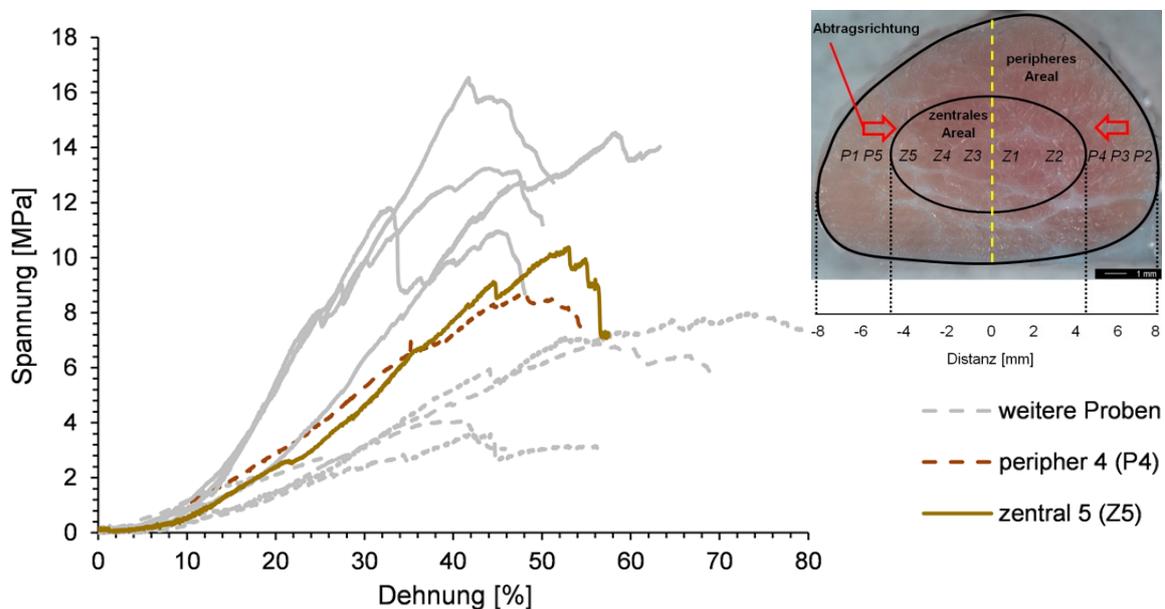


Abbildung 5.7: Positionabhängiges Spannung-Dehnung-Diagramm der Proben P4 und Z5 aus dem zentralen und peripheren Areal

5.1.3 Morphologische Betrachtung

Neben einem quantitativen Vergleich der Lebensdauern von den dezellularisierten equinen OBS sowie der Kontrollgruppe und einer Visualisierung des Schädigungsfortschrittes mit Hilfe des Ultraschallgerätes bietet die Morphologie eine aufschlussreiche Möglichkeit, die pathologischen Auswirkungen des Versuches auf die Sehne zu analysieren. Dies ist notwendig, um zum einen das pathologische Konstrukt der Sehne nach dem Versuch zu betrachten und mit den Erkenntnissen aus der Sonographie zu korrelieren. Zum anderen konnte eindeutig die relevante Schädigungsposition nach dem Experiment durch transversale Schnitte in mehreren Segmenten lokalisiert und betrachtet werden. Mit Hilfe dieser Methodik ist es auch möglich, einen Einfluss der Klemmwirkung der Sehneinspannung auf das Gewebe während des Versuchs zu erörtern. Schließlich ist ungeachtet einer vollständigen Gefrierung der Sehnenenden eine topische Schädigung der peripheren Kollagenstrukturen durch die mit Kupfergranulat beschichteten Klemmbacken möglich, die unter Umständen eine degenerative Veränderung einleitet und die Ergebnisdarstellung verfälschen könnte. Die morphologische Nachbetrachtung der rupturierten Sehnen zeigt in den beiden Einspannabschnitten eine durch Druckstellen gekennzeichnete Kontaktzone, die zwar eine Musterung bedingt durch die Granulatpartikel erkennen lässt, jedoch keineswegs eine pathologische Veränderung der Sehnenoberfläche (siehe Kapitel 5.1).

Insbesondere die morphologische Betrachtung der dezellularisierten sowie der initial intakten Kontrollgruppe und die zu beschreibenden schädigungsrelevanten interfibrillaren Aufweitungen sind mit dem Verfahren ausreichend abbildbar (siehe Abbildung 4.17). Die vorwiegend an den dezellularisierten Proben gesichtete Quervernetzungsproblematik ist zusätzlich in distaler Richtung, außerhalb der rupturierten Zone, lokalisierbar, was die Vermutung einer aus den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen (siehe Abbildung 4.1) relevanten degenerativen Strukturveränderung, erkennbar insbesondere im zentralen Sehnenareal, unterstützt. Eine Beeinträchtigung der extrazellulären Matrix durch den Dezellularisierungsprozess ist vor Versuchsbeginn makroskopisch ersichtlich, ohne die lokalen Strukturveränderungen im Detail zu kennen. Diese mehrere Millimeter in das Innere der Sehne hineinragende Strukturveränderung (siehe Abbildung 5.2) beeinflusst die für das Festigkeitsvermögen relevante Filamentstruktur zwischen den einzelnen Fibrillen. Es existiert bis zur Fertigstellung dieser Arbeit lediglich eine Veröffentlichung, die unter anderem die biomechanische Beeinträchtigung einer porcinen Beugesehne aufgrund einer enzymatischen Dezellularisierungsbehandlung beurteilt. Kwang-II Lee et al. [384] stellen trotz einer ersichtlichen Reduktion des Gehaltes an Glykosaminoglykanen innerhalb der Sehne keinen Zusammenhang zu einem diagnostizierten Festigkeitsverlust von

23 % her und bewerten eine prozessbedingte Reduktion des GAG-Anteils von 30 % als eine lediglich geringfügige Beeinträchtigung. Eine ausschlaggebende Beteiligung der einzelnen GAG-Filamente an der Übertragung der Schubbelastungen zwischen den einzelnen Faszikeln ist durch die anatomische Anordnung der Filamente belegt, weshalb diese degenerative Gewebeveränderung im interfibrillaren Raum ein eindeutiges Indiz für eine Schädigung darstellt und den Festigkeitsverlust in den monotonen sowie zyklischen Versuchsreihen begründet. Neben einer prozessbedingten Reduktion der Glykosaminoglykane sorgt der Verlust von Fibrozyten und Tendozyten für Hohlräume im Kollagenverbund und einem daraus resultierenden Kraftübertragungsverlust zwischen den Fibrillen [462].

5.1.4 Ultrasonographische Bewertung

Im Verlauf dieser Arbeit wurde bereits mehrfach angedeutet, dass das Auflösungsvermögen der Ultrasonographie nicht ausreicht, um eine Schädigungsentstehung zu ergründen. Ab einer definierten Echogenität (Grad 1) kann im Rahmen der monotonen sowie auch zyklischen Versuchsdurchführung eine ausgeprägte Kernläsion detektiert werden. Die Lokalisation einer Ruptur erweist sich während des zyklischen Versuchs als erfolgversprechend, da im Gegensatz zu den Zugversuchen eine um mindestens 30 % geringere Belastung der Sehne vorherrscht und folglich mit einem zeitlich ausgedehnten Schädigungsprozess zu rechnen ist. Die Vorversuche an läsionierten bovinen TBS dienten neben einer Betrachtung der Defektentwicklung dem zuverlässigen Umgang des Ultraschallsystems zur erfolgreichen Detektion des Schädigungsfortschrittes einer initial intakten sowie dezellularisierten equinen OBS. Abbildung 4.3 verdeutlicht die Eignung anhand von longitudinalen Sonogrammen für eine verlässliche Beurteilung des Schädigungsfortschrittes einer Kollagenstruktur.

Die Natriumchloridlösung, in der die equinen OBS geprüft werden, bietet eine physiologische Umgebung, um die Sehne in einer dem tierischen Organismus nachempfundenen Atmosphäre zu untersuchen. Zusätzlich hat dieses Umgebungsmedium den positiven Nebeneffekt, dass kein Kontaktkörper zwischen der Sehnenoberfläche und der Ultraschallsonde platziert werden muss und somit eine berührungslose Abtastung des Prüflings möglich ist. Insbesondere bei zyklischen Versuchsreihen wäre es nahezu unmöglich, im laufenden Betrieb einen spaltlosen Kontakt zum Prüfobjekt zu bewahren, wobei selbst im Fall eines Gelingens, bedingt durch die Kontaktreibung zur Oberfläche des Endotenioms, eine Schädigung eingeleitet würde.

Die Positionierung der Ultraschallsonden innerhalb des Umgebungsbadens ist über die äußeren Verstellmöglichkeiten an dem Prüfsystem gegeben. Vielmehr besteht die

Schwierigkeit, eine Schallausrichtung der einreihig inmitten des Sondenkopfes positionierten Piezokristalle in Defekthöhe zu platzieren, um diese Schädigung detektieren zu können und in einem longitudinalen Sonogramm zu illustrieren. Die transversalen Aufnahmen ergeben einen ersten Aufschluss über die Lage der Ruptur im mittleren Metakarpalbereich, wobei die vollständige Dimension der Läsion erst mit einer kombinierten Darstellung des longitudinalen Sonogramms erreicht werden kann. Bauartbedingt ermöglicht die Ultraschallsonde transversal sowie longitudinal keine der Sondenbreite entsprechende Überlagerung diverser Schallebenen, sondern lediglich eine einzige Darstellung. Dies hat zur Folge, dass nicht nur entlang der Längsachse der Sehne, sondern ebenfalls die vollständige Transversalebene in Bezug auf eine Schädigung betrachtet werden muss. Abbildung 4.5 zeigt die Korrelation von zwei Schädigungsebenen, die für eine aussagekräftige Beurteilung einer Läsion unumgänglich ist. Trotz dieser Notwendigkeit wird im Rahmen dieser Arbeit vorzugsweise die longitudinale Ansicht verwendet, um die Faszikelbewegungen entlang der Längsachse betrachten zu können.

Die ultrasonographischen Untersuchungen im Rahmen der zyklischen Versuchsreihen verdeutlichen eine eindeutige Korrelation der Defektentstehung sowie eines –fortschrittes mit einer ansteigenden Dehngeschwindigkeit, erkennbar anhand der Wechselverformungskurven. Der rasante Anstieg der Längenzunahme mit Beginn einer erkennbaren Läsion im Kern der Sehne über wenige Zyklen veranschaulicht die Notwendigkeit einer kontinuierlichen ultrasonographischen Überwachung des Ermüdungsprozesses bis zur vollständigen Ruptur. Mit Hilfe der Bediensoftware der Prüfmaschine können unter anderem die aufgrund der spannungsgeregelten Vorgabe resultierenden oberen sowie unteren Lastumkehrpunkte des servohydraulischen Arbeitszylinders am Display verfolgt werden. Im Falle einer Defekterscheinung muss eine größere Wegamplitude von der Prüfmaschine aufgebracht werden, um das partial rupturierte Kollagengewebe einer weiterhin konstanten Kraftamplitude aussetzen zu können.

5.2 Deutung der Schädigungsmechanismen unter Anwendung der Finite-Elemente-Analyse

Die Finite-Elemente-Analyse ist ein hilfreiches Instrument, um die Mechanismen, die zu einer pathologischen Veränderung in der Sehne führen, zu analysieren und separiert die verschiedenen Einflussfaktoren zu betrachten. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Simulationssoftware Abaqus FEA genutzt, um die Ergebnisse aus den morphologischen und den biomechanischen Versuchsreihen zu evaluieren. Die Ergebnisdarstellung verdeutlicht jedoch, dass die Simulation des Verformungsverhaltens einzig im Bereich der Toe-Region

sowie im linear-viskoelastischen Abschnitt durchgeführt wurde. Dies liegt in der Sachlage begründet, dass mit zunehmender Dehnung über diesen größtenteils reversiblen Verformungsbereich hinaus, die experimentell erzielte Rupturgrenze der einzelnen Faszikel in die FE-Analyse integriert werden müsste. Eine reine Implementierung der erzielten Schädigungsparameter in die Simulation würde keinen Mehrwert bieten und lediglich die bereits aus den praktischen Versuchsreihen bekannten Spannung-Dehnung-Diagramme nachbilden. Vielmehr wurden die Anatomie der Sehne, insbesondere der Fibrillendurchmesser und die verformungsrelevante Wellencharakteristik der Struktur, in die CAD-Geometrie übernommen. Hinsichtlich der erzielten Kennwerte wird alleinig die Bestimmung der Elastizitätsmoduln für die Fibrille sowie die extrazelluläre Matrix unter Anwendung der FE-Analyse bewertet. Darüber hinaus konnten die aus den morphologischen sowie den biomechanischen Versuchsreihen bestimmten Einflussfaktoren auf das Verformungsverhalten des dezellularisierten Gewebes beurteilt werden.

5.2.1 Beurteilung des CAD-Modells

Auf Grundlage des in zahlreichen Veröffentlichungen herangezogenen schematischen Sehnenaufbaus nach Kastelic et al. [18] wurde die hierarchische Struktur der equinen OBS in einer CAD-Geometrie nachgebildet. Da ein detailgetreues Abbild zu einer Vielzahl von Fibrillen innerhalb des Verbundes führen würde und damit weder die Gestaltung der CAD-Geometrie noch eine Vernetzung sowie Simulation dieser in einer ersten Einschätzung möglich wäre, wurde ein auf 361 Fibrillen vereinfachtes Modell erstellt. Weitere, insbesondere geometriebedingte Auswirkungen auf das Verformungsverhalten, wurden anhand zusätzlicher Modelle in zwei- und fünffibrillarem Aufbau beurteilt. Eine größere Anzahl von Fibrillen würde den Erkenntnisgewinn nicht ausschlaggebend beeinflussen, da folgende, für die Bewertung des Verformungsverhaltens sowie einer Ergründung der Schädigungsmechanismen notwendige Faktoren in die Gestaltung der CAD-Modelle eingeflossen sind. In Bezug auf die anatomische Gestaltung der Crimp-Struktur stellten die im Rahmen der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen erzielten Erkenntnisse die Basis für einen realitätsnahen Aufbau der Kollagenstruktur dar. Die gemessenen Crimp-Winkel und -Längen variieren in den zentralen sowie peripheren Arealen der Sehne, was auf die charakteristischen Zonen übertragen werden konnte. Die Anatomie der mittleren Strukturzone, befindlich zwischen den zentralen und peripheren Fasern, konnte durch einen Interpolationsprozess gemittelt definiert werden. Darüber hinaus wurden die raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen genutzt, um die Anordnung der Glykosaminoglykane zwischen den Fibrillen auf die CAD-Geometrie zu übertragen sowie die Fibrillendurchmesser zu deklarieren. Die polarisationsmikroskopischen Aufnahmen zeigen aus-

schließlich planar angeordnete Fibrillen ohne helikale Strukturen (siehe Abbildung 4.19), weshalb diese Beobachtungen in der Umsetzung des CAD-Modells berücksichtigt wurden. Abgesehen von den anatomischen Gegebenheiten, die detailliert übertragen werden konnten, wurden keine gefäßhaltigen Septen sowie Blutgefäße, die keine Funktion hinsichtlich einer Übertragung von biomechanischen Belastungen erfüllen, in den Aufbau übernommen.

Die morphologischen Untersuchungen verdeutlichten eine Beeinflussung des interfibrillaren Gewebes aufgrund des Dezellularisierungsprozesses, was nicht nur mit Hilfe der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen visualisiert werden konnte, sondern auch in monotonen sowie zyklischen Tests ersichtlich war. Diese Destruktion des Gewebes konnte erfolgreich in der Simulationssoftware Abaqus FEA implementiert werden. Das fünf-fibrillare CAD-Modell wurde gezielt so gestaltet, dass in Abaqus FEA die einzelnen Modellkomponenten, wie die fünf Fibrillen und die als Gesamtkomponente extrudierte extrazelluläre Matrix, wahlweise untereinander verknüpft werden konnten oder nicht als verschmolzene Geometrie betrachtet wurden. Folglich konnte neben den anatomisch bedingten Einflüssen wie Fibrillendurchmesser und Crimp-Struktur zusätzlich prozessbedingte Strukturveränderungen in die Berechnung einbezogen werden. Mit dieser Grundlage bietet das konstruierte CAD-Modell die Möglichkeit, separiert sämtliche geometriebedingte Einflüsse zu betrachten und die schädigungsrelevanten Faktoren zu extrahieren und somit das komplexe System verstehen zu können.

5.2.2 Gegenüberstellung des experimentell bestimmten Verformungsverhaltens mit der Finite-Elemente-Analyse

Über die Ergründung der Schädigungsmechanismen hinaus konnte mit Hilfe der Finite-Elemente-Analyse der Elastizitätsmodul evaluiert werden. Die Literaturrecherche im Rahmen dieser Arbeit hat gezeigt, dass kein geeignetes Messverfahren besteht, um die Steifigkeit der extrazellulären Matrix sowie der Fibrillen bestimmen zu können. Die erzielten Kennwerte waren mit einer viel zu großen Abweichung versehen, um diese ohne kritische Betrachtung in Abaqus FEA implementieren zu können. Anhand von selbst durchgeführten Zugversuchen an initial intakten und dezellularisierten equinen OBS konnten unter Hinzunahme der Flächenverteilung und der Voigt-Schranke die benötigten Werkstoffkennwerte bestimmt werden. Diese wurden nach Aufbau des Modells in die Simulation integriert und die berechneten Spannung-Dehnung-Diagramme mit den realen Verläufen verglichen, um eine Eignung der Kennwerte zu überprüfen. Gleichzeitig galt es, die Verwendbarkeit des hyperelastischen sowie des linear-elastischen Ansatzes innerhalb des

Simulationsvorhabens zu beurteilen. Abweichend von der Berechnung unter Verwendung des linear-elastischen Modellansatzes führte die hyperelastische Grundlage nach Ogden ($n = 1$) unter Verwendung der Ausgleichsrechnung zu einer zufriedenstellenden Konvergenz. Abbildung 5.8 illustriert den experimentell bestimmten und den simulierten Verformungsverlauf einer equinen OBS unter Anwendung des hyperelastischen und linear-elastischen Materialmodells.

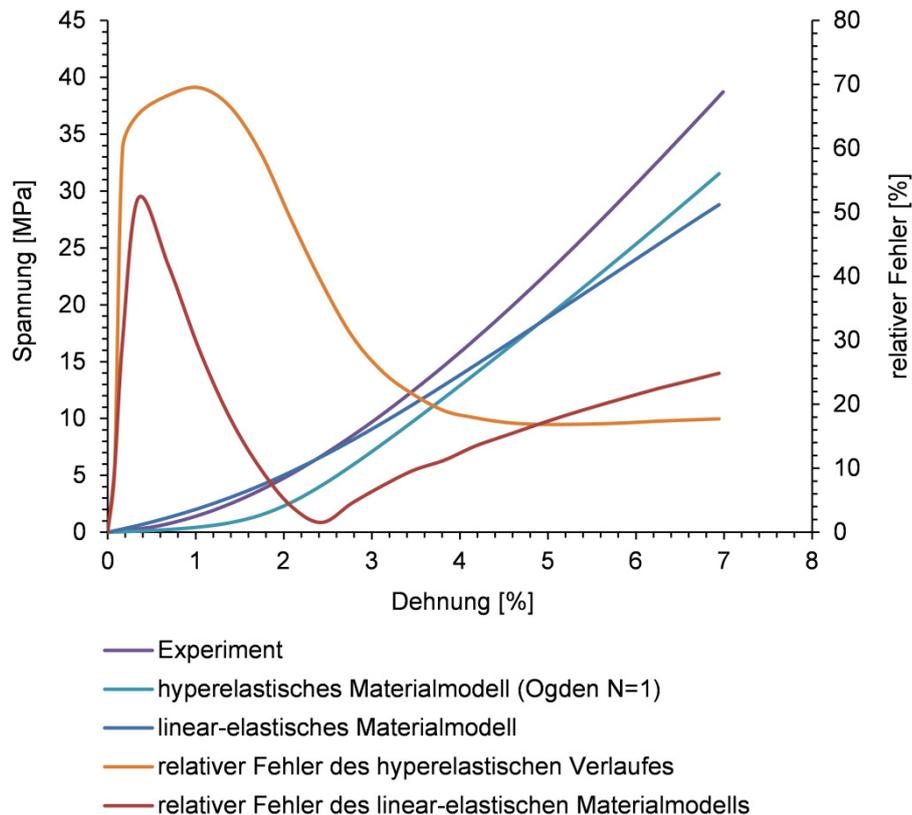


Abbildung 5.8: Vergleich des experimentell bestimmten und des simulierten Verformungsverlaufes einer initial intakten equinen OBS unter Anwendung des hyperelastischen und linear-elastischen Materialmodells

Die experimentelle Darstellung entspricht dem arithmetisch gemittelten Spannungs-Dehnung-Verhalten der equinen initial intakten OBS (siehe Abbildung 4.7 a)). Eine prinzipielle Eignung des CAD-Modells sowie des Materialgesetzes ist gegeben. Beginnend mit dem linear-elastischen Materialmodell wird eine, im Vergleich zum hyperelastischen Pendant, bessere Übereinstimmung im Bereich der Toe-Region deutlich, was durch einen geringeren relativen Fehler visualisiert wird. Lediglich im Fußpunkt des Verformungsverlaufes ist die größte Abweichung des hyperelastischen Ansatzes zu verzeichnen, was unter Hinzunahme der Erkenntnisse aus Abbildung 4.33 a) mit einem geringfügig zu ho-

hen Crimp-Winkel begründet werden kann. Dies ist nicht zwingend mit einer fehlerhaften Bestimmung der Crimp-Struktur am Durchlicht-Polarisationsmikroskop zu begründen, sondern bedingt durch variierende anatomische Unterschiede in dem Kollagenverbund. Nach Diamant et al. [38] und Torp et al. [240] nimmt der Crimp-Winkel mit zunehmendem Alter der Fibrille einer Ratte ab. Die Simulation anhand des zweifibrillaren Modells zeigt eine Abhängigkeit des Verformungsverhaltens explizit in dem konvexen Bereich des Spannung-Dehnung-Diagramms von der Crimp-Struktur (siehe Abbildung 4.33). In diesem Zusammenhang kann eruiert werden, dass eine Vergrößerung des Crimp-Winkels zu einer größeren Toe-Dehnung führt. Dieser Einfluss auf das Verformungsverhalten wurde von Wilmsink et al. [235] bereits postuliert. Da die polarisationsmikroskopischen Untersuchungen an Faszikeln eines vierjährigen Lewitzers durchgeführt wurden, welcher als Jungtier ein deutlich geringeres Alter als die Versuchstiere des in Abbildung 4.7 dargestellten Verlaufes vorweisen konnte, ist damit die Parallelverschiebung und die größere Toe-Dehnung begründbar. Eine Erhöhung der Crimp-Länge führt lediglich zu einer Radiusverringerung des konvexen Verformungsabschnittes, ohne eine nachfolgende Parallelverschiebung des linear-viskoelastischen Bereiches zu verursachen. Der im Vergleich zu Abbildung 4.35 und Abbildung 5.8 simulierte Verformungsverlauf ist aufgrund des verwendeten zweifibrillaren CAD-Modells, welches angesichts einer konstanten Crimp-Struktur ohne ummantelte Matrix charakterisiert ist, durch zwei nahezu lineare Einzelabschnitte geprägt. Folglich hat neben den diskutierten Anatomiefaktoren die Abstufung des Crimp-Winkels in Richtung des peripheren Areals zusätzlich eine Auswirkung auf das konvexe Erscheinungsbild.

Wie im vorherigen Kapitel bereits diskutiert, konnten die Glykosaminoglykanfilamente zwischen den einzelnen Kollagenfibrillen und der extrazellulären Matrix in Abaqus FEA über Verknüpfungspunkte (constraint ties) sowie mit Hilfe einer vollständigen Verschmelzung der Sehnenkomponenten (merge) erzielt werden, wobei bei Anwendung der zweiten Variante, trotz einer vollständigen Zusammenführung zu einem Bauteil, beiden Komponenten abweichende Materialkennwerte zugeordnet werden konnten. Abbildung 5.9 zeigt die aus Abbildung 4.7 und Abbildung 4.35 bekannten Verläufe des realen Spannung-Dehnung-Verhaltens der initial intakten und dezellularisierten equinen OBS und die Simulationsergebnisse des fünffibrillaren Modells.

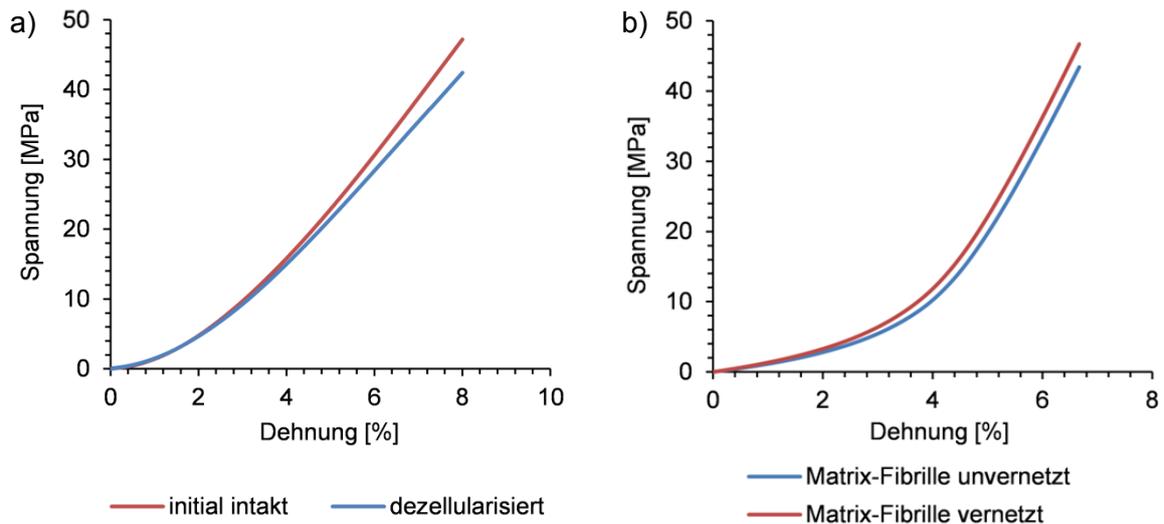


Abbildung 5.9: Vergleich des a) realen Spannung-Dehnung-Verhalten der initial intakten und dezellulierten equinen OBS und der b) Simulationsergebnisse des fünffibrillaren Modells

Diese Darstellung verdeutlicht einen vergleichbaren Kurvenverlauf des realen (siehe Abbildung 5.9 a)) und simulierten Zustandes (siehe Abbildung 5.9 b)), was für die Verantwortlichkeit der GAG als festigkeitsabhängige Strukturkomponente spricht. Eine Beeinflussung der Toe-Region durch den Verlust der Glykosaminoglykane ist ersichtlich, jedoch nicht in dem Ausmaß der simulierten Ansicht. Vielmehr ist mit einem Teilverlust zu rechnen, der durch die Anwendung des Dezellularisierungsprozesses begründet werden kann. Ein Zusammenhang zwischen der Anwendung des Behandlungsmediums Triton X-100 und einem Verlust der Glykosaminoglykane konnte, ohne einen Einfluss auf die biomechanische Festigkeit zu betrachten, bereits bewiesen werden [352, 366, 405]. Der parallele Verlauf der Verformungskurven im linear-viskoelastischen Abschnitt (siehe Abbildung 5.9 b)) zeigt eine rein strukturelle Abhängigkeit von der GAG-Struktur. Zusätzlich sind über die Quervernetzungsmechanismen hinaus Steifigkeitsunterschiede im realen Verlauf zu erkennen (siehe Abbildung 5.9 a) und Tabelle 4.1). Dies verdeutlicht eine prozessbedingte Veränderung der biochemischen Zusammensetzung, die neben einem Strukturwandel in einem Abbau des Kollagengehaltes resultiert. Elder et al. [405] und Youngstrom et al. [352] konnten in ihren Untersuchungen eine Reduktion des Kollagengehaltes ab einer einstündigen Behandlung mit Triton X-100 nachweisen, was die zuvor getätigte Behauptung unterstützt.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Untersuchung der Schädigungsmechanismen einer equinen oberflächlichen Beugesehne (OBS) im initial intakten und dezellularisierten Zustand sowie einer Evaluation der Eignung des gebildeten Gewebegerüsts zur Behandlung eines topischen Schädigungsabschnittes.

Um dieses Vorhaben umsetzen zu können, wurden innerhalb dieser Studie randomisiert 18 oberflächliche Beugesehnen (OBS) von den vorderen Extremitäten der dazugehörigen Pferde post mortem entnommen und innerhalb jedes Tieres eine OBS einem Dezellularisierungsprozess unterzogen sowie in einem initial intakten Zustand (Kontrollgruppe) belassen. Für die Versuchsreihen wurden Tiere unterschiedlicher Rasse und Alter verwendet, da aus Kosten- sowie ethischen Gründen keine Versuchstiere, sondern lediglich Tiere, die der Schlachtung zugeführt wurden, für die Studie zur Verfügung standen. Um etwaige anatomische Einflussfaktoren, aufgrund interindividueller Unterschiede in den Auswertungen separieren zu können, wurden explizit die Auswirkungen des Dezellularisierungsprozesses innerhalb eines Tieres betrachtet.

Es existiert keine Prüfeinrichtung, die Ermüdungsversuche an equinen OBS über einen Zeitraum von mehreren Stunden innerhalb einer physiologischen Kochsalzlösung bei permanenter ultrasonographischer Betrachtung ermöglicht, weshalb im Rahmen dieses Forschungsvorhabens die Eigenentwicklung eines Prüfsystems umgesetzt wurde.

Die behandelten equinen OBS zeigen im Rahmen der monotonen sowie zyklischen Versuchsreihen eine prozessbedingte Beeinträchtigung des Verformungsverhaltens und der Lebensdauer. Dieser Festigkeits- sowie Steifigkeitsverlust liegt vornehmlich in einer Reduktion der Glykosaminoglykane im interfibrillaren Gewebe begründet. Veränderungen der Quervernetzungsstruktur auf mikrofibrillarer und tropokollagener Ebene können mit den vorhandenen Visualisierungsmöglichkeiten nicht dargestellt werden. Aufgrund eines allgemeinen Auflösungsphänomens kollagenartiger Strukturen durch das nichtionische Tensid Triton X-100 wird ein Verlust der zuvor beschriebenen Quervernetzungen jedoch zusätzlich vermutet. Die nicht durch das vollständige Sehnenkonstrukt verlaufenden und durch Glykosaminoglykane orthogonal verknüpften Fibrillen verlieren durch den prozessbedingten Einfluss auf das Gewebe die Möglichkeit der Übertragung von Schubspannungen auf das benachbarte Fibrillenfilament. Dieser Verlust wird in morphologischen Untersuchungen an transversalen Schnittproben nach einer zyklischen Belastung durch Inhomogenitäten der Matrix, in Form von interfibrillaren Aufweitungen und Diskontinuitäten der Kollagenfasern deutlich. Eine bereits vor Versuchsbeginn vorhandene interfibrillare Schädigung der untersuchten Behandlungszustände wird von rasterelektronenmikroskopischen

Aufnahmen an Kryobrüchen gestützt. Mit zunehmender Lastspielzahl sorgt die Belastung der Sehne für eine Entstehung der Diskontinuitäten an den initial intakten Proben und aufgrund der bereits vorhandenen Schädigungen an den dezellularisierten equinen OBS für eine Läsionszunahme bis hin zur vollständigen Ruptur im mittleren Metakarpalbereich.

Die Finite-Elemente-Analyse wird innerhalb dieser Forschungsarbeit genutzt, um die anatomischen Strukturveränderungen, die das Verformungsverhalten maßgeblich beeinflussen, zu beurteilen und die Ergebnisse aus den morphologischen und den biomechanischen Versuchsreihen zu evaluieren. Mit Hilfe dieses Instruments konnten die durch experimentelle und statistische Verfahren bestimmten Elastizitätsmoduln separiert für die Kollagenfibrille und Matrix validiert werden.

Die ultrasonographischen Untersuchungen verdeutlichen eine Schädigungsposition im zentralen Areal des mittleren Metakarpalbereichs, was mit den inhomogenen Erscheinungen aus der Morphologie korreliert, jedoch keine Begründung für eine Belastungskonzentration im Zentrum liefert. Um die Mechanismen zu ergründen, die vorzugsweise zu diesem Schädigungsverhalten führen, wurden anatomische und materialspezifische Einflussfaktoren separiert betrachtet. Ein geringes Auflösungsvermögen des Ultraschallsystems ermöglicht jedoch keine Analyse der für eine Einschätzung notwendigen Crimp-Struktur sowie eine gezielte Betrachtung des Verformungsverhaltens einzelner Faszikel aus unterschiedlichen Sehnenarealen, um abweichende materialspezifische Kennwerte ermitteln zu können. Aus diesem Grund wurden Zugversuche an einzelnen Faszikeln aus dem zentralen und peripheren Areal durchgeführt, die eine höhere Steifigkeit sowie Zugfestigkeit der Faszikel im zentralen Areal nachweisen konnten. Neben einem Vergleich der Werkstoffkennwerte konnten mit Hilfe einer in das Durchlicht-Polarisationsmikroskop implementierten Belastungsvorrichtung die visualisierten Strukturveränderungen dem charakteristischen Verformungsverhalten zugeordnet werden. Eine kontinuierliche Reduktion der Crimp-Winkel bis zum Erreichen des linear-viskoelastischen Verformungsabschnittes konnte nachgewiesen werden. Zusätzlich führt ein größerer Crimp-Winkel im peripheren Areal zu einer größeren Toe-Dehnung, was im Umkehrschluss in einer frühzeitigen Belastung der zentralen Fasern resultiert. Neben den rein strukturbedingten Einflussfaktoren konnten biochemische Verformungseinflüsse registriert werden. Ein für die Festigkeit der Sehne ausschlaggebender höherer Fibrillenanteil, gemessen am gesamten Gewebekonstrukt, sorgt im zentralen Areal für die zuvor beschriebene höhere Steifigkeit, was zusätzlich zu einer höheren Beanspruchung in dieser Zone bei einer identischen Dehnung der peripheren Fasern führt.

Zur Vermeidung eines minderwertigen Narbengewebes in dem läsionierten Sehnen-

abschnitt ist eine Eignung des dezellularisierten Spendergewebes als implantierte Ersatzstruktur bis zu einer definierten Belastung gegeben. *In vivo* Versuche zur Bestimmung der realen Beanspruchungsvorgänge bei abweichenden Gangarten zeigen im Galopp eine bis über den linear-viskoelastischen Bereich hinaus verlaufende Dehnung der equinen OBS. Auf Grundlage dieser Studien kann während der Rekonvaleszenzzeit lediglich eine gering belastende Schrittbewegung des Pferdes, verbunden mit einem geeigneten Bewegungsuntergrund, empfohlen werden, um eine erneute Ruptur in dem Behandlungszeitraum zu unterbinden. Eine Behandlung des rupturierten Sehnenabschnittes mit einer geeigneten Nahttechnik wird zur Fixierung der Kollagenstruktur weiterhin notwendig sein. Vielmehr könnte das dezellularisierte Implantat als Füllmaterial den Heilungsverlauf positiv beeinflussen. Eine hinreichende Festigkeit der Implantatstruktur oberhalb der zulässigen Belastbarkeit der Nahtverbindung ist nachweislich mit Hilfe der Erkenntnisse dieser Arbeit gegeben.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse können auch über den Einsatz in der Veterinärmedizin hinaus im Rahmen des Tissue Engineerings in der Humanmedizin Verwendung finden.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Blevins, F.T.; Djurasovic, M.; Flatow, E.L.; Vogel, K.G.: *Biology of the rotator cuff tendon*, Orthopedic Clinics of North America, 28 (1997), 1-16
- [2] Dowling, B.A.; Dart, A.J.: *Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon*, Veterinary Journal, 170 (2005), 184-192
- [3] Birch, H.L.; Wilson, A.M.; Goodship, A.E.: *The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival*, Journal of Experimental Biology, 200 (1997), 1703-1708
- [4] Birch, H.L.; Bailey, A.J.; Goodship, A.E.: *Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition*, Equine Veterinary Journal, 30 (1998), 534-539
- [5] Patterson-Kane, J.C.; Becker, D.L.; Rich, T.: *The pathogenesis of tendon microdamage in athletes: The horse as a natural model for basic cellular research*, Journal of Comparative Pathology, 147 (2012), 227-247
- [6] Auer, J.A.; Stick, J.A.: *Equine surgery*, Elsevier, St. Louis, (2012)
- [7] Stashak, T.S.; Adams, O.R.: *Adams' Lahmheit bei Pferden*, Schaper, Alfeld, (2008)
- [8] Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E.: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere - Bewegungsapparat*, Parey, Stuttgart, (2004)
- [9] Thorpe, C.T.; Udeze, C.P.; Birch, H.L.; Clegg, P.D.; Screen, H.R.C.: *Capacity for sliding between tendon fascicles decreases with ageing in injury prone equine tendons: A possible mechanism for age related tendinopathy?*, European Cells and Materials, 25 (2013), 48-60
- [10] Thorpe, C.T.; Clegg, P.D.; Birch, H.L.: *A review of tendon injury: Why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk?*, Equine Veterinary Journal, 42 (2010), 174-180
- [11] Hosaka, Y.Z.; Takahashi, H.; Uratsuji, T.; Tangkawattana, P.; Ueda, H.; Takehana, K.: *Comparative study of the characteristics and properties of tendinocytes derived from three tendons in the equine forelimb*, Tissue and Cell, 42 (2010), 9-17
- [12] Lin, T.W.; Cardenas, L.; Soslowky, L.J.: *Biomechanics of tendon injury and repair*, Journal of Biomechanics, 37 (2004), 865-877
- [13] Murray, R.C.; Dyson, S.J.; Tranquille, C.; Adams, V.: *Association of type of sport and performance level with anatomical site of orthopaedic injury diagnosis*, Equine Veterinary Journal, 38 (2006), 411-416
- [14] Ely, E.R.; Avella, C.S.; Price, J.S.; Smith, R.K.W.; Wood, J.L.N.; Verheyen, K.L.P.: *Descriptive epidemiology of fracture, tendon and suspensory ligament injuries in national hunt racehorses in training*, Equine Veterinary Journal, 41 (2009), 372-378
- [15] Singer, E.R.; Barnes, J.; Saxby, F.; Murray, J.K.: *Injuries in the event horse: Training versus competition*, Veterinary Journal, 175 (2008), 76-81
- [16] Kasashima, Y.; Takahashi, T.; Smith, R.K.W.; Goodship, A.E.; Kuwano, A.; Ueno, T.; Hirano, S.: *Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in japanese thoroughbred flat racehorses in 1999*, Equine Veterinary Journal, 36 (2004), 346-350

- [17] Mülling, C.; Budras, K.; Fricke, W.: *Atlas der Anatomie des Pferdes*, Schlüter, Hannover, (2014)
- [18] Kastelic, J.; Galeski, A.; Baer, E.: *Multi composite structure of tendon*, Connective Tissue Research, 6 (1978), 11-23
- [19] Kannus, P.: *Structure of the tendon connective tissue*, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 10 (2000), 312-320
- [20] Gillis, C.; Pool, R.R.; Meagher, D.M.; Stover, S.M.; Reiser, K.; Willits, N.: *Effect of maturation and aging on the histomorphometric and biochemical characteristics of equine superficial digital flexor tendon*, American Journal of Veterinary Research, 58 (1997), 425-430
- [21] Geyer, H.; Loeschmann, Y.: *Histology of the flexor tendons and their environment distal in the digits of the horse*, Pferdeheilkunde, 23 (2007), 39-46
- [22] Denoix, J.: *The equine distal limb atlas of clinical anatomy and comparative imaging*, Manson, London, (2000)
- [23] Screen, H.R.C.; Lee, D.A.; Bader, D.L.; Shelton, J.C.: *An investigation into the effects of the hierarchical structure of tendon fascicles on micromechanical properties*, Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H-Journal of Engineering in Medicine, 218 (2004), 109-119
- [24] Curwin, S.: *Biomechanics of tendon and effects of immobilization*, Foot Ankle Clin, 2 (1997), 371-389
- [25] Kobayashi, A.; Sugisaka, M.; Takehana, K.; Yamaguchi, M.; Eerdunchaolu; Iwasa, K.; Abe, M.: *Morphological and histochemical analysis of a case of superficial digital flexor tendon injury in the horse*, Journal of Comparative Pathology, 120 (1999), 403-414
- [26] Franchi, M.; Trire, A.; Quaranta, M.; Orsini, E.; Ottani, V.: *Collagen structure of tendon relates to function*, The Scientific World Journal, 7 (2007), 404-420
- [27] O'Brien, M.: *Structure and metabolism of tendons*, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 7 (1997), 55-61
- [28] Canty, E.G.; Kadler, K.E.: *Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis*, Journal of Cell Science, 118 (2005), 1341-1353
- [29] Redaelli, A.; Vesentini, S.; Soncini, M.; Vena, P.; Mantero, S.; Montecvecchi, F.M.: *Possible role of decorin glycosaminoglycans in fibril to fibril force transfer in relative mature tendons: A computational study from molecular to microstructural level*, Journal of Biomechanics, 36 (2003), 1555-1569
- [30] Wood, G.C.; Keech, M.K.: *Formation of fibrils from collagen solutions. 1. The effect of experimental conditions: Kinetic and electron-microscope studies*, Biochemical Journal, 75 (1960), 588-598
- [31] Wood, G.C.: *Formation of fibrils from collagen solutions. 2. A mechanism of collagen-fibril formation*, Biochemical Journal, 75 (1960), 598-605
- [32] Patterson-Kane, J.C.; Firth, E.C.; Goodship, A.E.; Parry, D.A.D.: *Age related differences in collagen crimp patterns in the superficial digital flexor tendon core region of untrained horses*, Australian Veterinary Journal, 75 (1997), 39-44
- [33] Parry, D.A.D.; Craig, A.S.; Barnes, G.R.G.: *Tendon and ligament from horse: Ultrastructural study of collagen fibrils and elastic fibers as a function of age*, Proceedings of the Royal Society Series B. Biological Sciences, 203 (1978), 293

- [34] Kadler, K.E.; Holmes, D.F.; Trotter, J.A.; Chapman, J.A.: *Collagen fibril formation*, Biochemical Journal, 316 (1996), 1-11
- [35] Pins, G.D.; Christiansen, D.L.; Patel, R.; Silver, F.H.: *Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties*, Biophysical Journal, 73 (1997), 2164-2172
- [36] Kastelic, J.; Palley, I.; Baer, E.: *A structural mechanical model for tendon crimping*, Journal of Biomechanics, 13 (1980), 887-893
- [37] Patterson-Kane, J.C.; Firth, E.C.: *The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in thoroughbred racehorses*, Veterinary Journal, 181 (2009), 79-89
- [38] Diamant, J.; Arridge, R.G.C.; Baer, E.; Litt, M.; Keller, A.: *Collagen; Ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of aging*, Proceedings of the Royal Society Series B - Biological Sciences, 180 (1972), 293-315
- [39] Nauck, E.T.: *Die Wellung der Sehnenfasern, ihre Ursache und ihre funktionelle Bedeutung*, Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch, 68 (1931), 79
- [40] Rigby, B.J.; Hirai, N.; Spikes, J.D.; Eyring, H.: *The mechanical properties of rat tail tendon*, Journal of General Physiology, 43 (1959), 265-283
- [41] Viidik, A.: *Simultaneous mechanical and light microscopic studies of collagen fibers*, Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte, 136 (1972), 204-212
- [42] Verzar, F.; Huber, K.: *Structure of tendon fibers*, Acta Anatomica, 33 (1958), 215-229
- [43] Herchenhan, A.; Kalson, N.S.; Holmes, D.F.; Hill, P.; Kadler, K.E.; Margetts, L.: *Tenocyte contraction induces crimp formation in tendon-like tissue*, Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 11 (2012), 449-459
- [44] Wilson, A.M.; van den Bogert, A.J.; McGuigan, M.P.: *Optimisation of the muscle-tendon unit for economical locomotion in cursorial animals*, Skeletal Muscle Mechanics: From Mechanisms to Function, Wiley, West Sussex, (2000)
- [45] Alexander, R.M.: *Energy-saving mechanisms in walking and running*, Journal of Experimental Biology, 160 (1991), 55-69
- [46] Birch, H.L.; Bailey, J.V.B.; Bailey, A.J.; Goodship, A.E.: *Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons*, Equine Veterinary Journal, 31 (1999), 391-396
- [47] Watkins, J.P.; Auer, J.A.; Gay, S.; Morgan, S.J.: *Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: collagen-type transformation and tissue morphologic reorganization*, American Journal of Veterinary Research, 46 (1985), 2091-2096
- [48] Williams, I.F.; Heaton, A.; McCullagh, K.G.: *Cell morphology and collagen types in equine tendon scar*, Research in Veterinary Science, 28 (1980), 302-310
- [49] Patterson-Kane, J.C.; Wilson, A.M.; Firth, E.C.; Parry, D.A.D.; Goodship, A.E.: *Exercise-related alterations in crimp morphology in the central regions of superficial digital flexor tendons from young Thoroughbreds: A controlled study*, Equine Veterinary Journal, 30 (1998), 61-64
- [50] Scott, J.E.; Orford, C.R.; Hughes, E.W.: *Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron microscopical and biochemical investigation*, Biochemical Journal, 195 (1981), 573-581

- [51] Yoon, J.H.; Halper, J.: *Tendon proteoglycans: Biochemistry and function*, Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, 5 (2005), 22-34
- [52] Parry, D.A.D.; Barnes, G.R.G.; Craig, A.S.: *A comparison of size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties*, Proceedings of the Royal Society Series B. Biological Sciences, 203 (1978), 305-321
- [53] Wells, H.C.; Edmonds, R.L.; Kirby, N.; Hawley, A.; Mudie, S.T.; Haverkamp, R.G.: *Collagen fibril diameter and leather strength*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (2013), 11524-11531
- [54] Clegg, P.D.; Strassburg, S.; Smith, R.K.: *Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons*, International Journal of Experimental Pathology, 88 (2007), 227-235
- [55] Thomopoulos, S.; Williams, G.R.; Gimbel, J.A.; Favata, M.; Soslowsky, L.J.: *Variation of biomechanical, structural, and compositional properties along the tendon to bone insertion site*, Journal of Orthopaedic Research, 21 (2003), 413-419
- [56] Dowling, B.A.; Dart, A.J.; Hodgson, D.R.; Smith, R.K.W.: *Superficial digital flexor tendonitis in the horse*, Equine Veterinary Journal, 32 (2000), 369-378
- [57] Birk, D.E.; Mayne, R.: *Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter*, European Journal of Cell Biology, 72 (1997), 352-361
- [58] Dahlgren, L.A.; Brower-Toland, B.D.; Nixon, A.J.: *Cloning and expression of type III collagen in normal and injured tendons of horses*, American Journal of Veterinary Research, 66 (2005), 266-270
- [59] Jozsa, L.G.; Kannus, P.: *Structure and metabolism of normal tendons*, Human tendons: Anatomy, physiology and pathology, Human Kinetics, Champaign, (1997)
- [60] Scott, J.E.; Orford, C.R.: *Dermatan sulfate-rich proteoglycan associates with rat tail tendon collagen at the d-band in the gap region*, Biochemical Journal, 197 (1981), 213-216
- [61] Cribb, A.M.; Scott, J.E.: *Tendon response to tensile stress: An ultrastructural investigation of collagen: Proteoglycan interactions in stressed tendon*, Journal of Anatomy, 187 (1995), 423-428
- [62] Silver, F.H.; Freeman, J.W.; Seehra, G.P.: *Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties*, Journal of Biomechanics, 36 (2003), 1529-1553
- [63] Birk, D.E.; Zycband, E.I.; Winkelmann, D.A.; Trelstad, R.L.: *Collagen fibrillogenesis in situ: Fibril segments are intermediates in matrix assembly*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 86 (1989), 4549-4553
- [64] Birk, D.E.; Zycband, E.I.; Winkelmann, D.A.; Trelstad, R.L.: *Collagen fibrillogenesis in situ. Discontinuous segmental assembly in extracellular compartments*, Annals of the New York Academy of Sciences, 580 (1990), 176-194
- [65] Birk, D.E.; Nurminskaya, M.V.; Zycband, E.I.: *Collagen fibrillogenesis in situ: Fibril segments undergo postdepositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development*, Developmental Dynamics, 202 (1995), 229-243

- [66] Birk, D.E.; Zycband, E.I.; Woodruff, S.; Winkelmann, D.A.; Treilstad, R.L.: *Collagen fibrillogenesis in situ: Fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures*, *Developmental Dynamics*, 208 (1997), 291-298
- [67] Haverkamp, R.G.; Williams, M. A.K.; Scott, J.E.: *Stretching single molecules of connective tissue glycans to characterize their shape-maintaining elasticity*, *Biomacromolecules*, 6 (2005), 1816-1818
- [68] Liao, J.: *Mechanical and structural properties of valve chordae tendineae*, Dissertation, Cleveland State University, (2003)
- [69] Ker, R.F.: *The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function*, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 133 (2002), 987-1000
- [70] Scott, J.E.: *Extracellular matrix, supramolecular organization and shape*, *Journal of Anatomy*, 187 (1995), 259-269
- [71] Gillard, G.C.; Reilly, H.C.; Bellbooth, P.G.; Flint, M.H.: *Influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon*, *Connective Tissue Research*, 7 (1979), 37-46
- [72] Batson, E.L.; Paramour, R.J.; Smith, T.J.; Birch, H.L.; Patterson-Kane, J.C.; Goodship, A.E.: *Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions?*, *Equine Veterinary Journal*, 35 (2003), 314-318
- [73] Birch, H.L.; Smith, T.J.; Poulton, C.; Peiffer, D.; Goodship, A.E.: *Do regional variations in flexor tendons predispose to site-specific injuries?*, *Equine Veterinary Journal*, 34 (2002), 288-292
- [74] Lin, Y.L.; Brama, P.A.J.; Kiers, G.H.; van Weeren, P.R.; DeGroot, J.: *Extracellular matrix composition of the equine superficial digital flexor tendon: Relationship with age and anatomical site*, *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 52 (2005), 333-338
- [75] Viidik, A.: *Functional properties of collagenous tissues*, *International Review of Connective Tissue Research*, 6 (1973), 127-215
- [76] Ganten, D.; Ruckpaul, K.; Köhrle, J.; Adamski, J.: *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*, Springer, Berlin, Heidelberg, (2006)
- [77] Avery, N.C.; Bailey, A. J.: *Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation to turnover of collagen: Relevance to aging and exercise*, *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 15 (2005), 231-240
- [78] Freed, A.D.; Doehring, T.C.: *Elastic model for crimped collagen fibrils*, *Journal of Biomechanical Engineering*, 127 (2005), 587-593
- [79] Vailais, A.C.; Vailais, J.C.: *Physical activity and connective tissue*, *Physical activity, fitness and health, Human Kinetics*, Champaign, (1994)
- [80] Magnusson, S.P.; Hansen, P.; Kjaer, M.: *Tendon properties in relation to muscular activity and physical training*, *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 13 (2003), 211-223
- [81] Barnard, K.; Light, N.D.; Sims, T.J.; Bailey, A.J.: *Chemistry of the collagen cross-links. Origin and partial characterization of a putative mature cross-link of collagen*, *Biochemical Journal*, 244 (1987), 303-309

- [82] Bailey, A.J.: *Molecular mechanisms of ageing in connective tissues*, Mechanisms of Ageing and Development, 122 (2001), 735-755
- [83] Löffler, G.; Heinrich, P.C.: *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer, Berlin, Heidelberg, (2014)
- [84] Scott, J.E.: *Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans. In vitro and in the tissues*, Faseb Journal, 6 (1992), 2639-2645
- [85] Huskamp, B.; Nowak, M.: *Insertionsdesmopathien beim Pferd und einige ihrer Lokalisationen*, Pferdeheilkunde, 4 (1988), 3-12
- [86] Pschyrembel, W.; Arnold, U.: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, De Gruyter, Berlin, (2014)
- [87] Oberbeck, K.: *Klinische und morphologische Untersuchungen von Tendopathien der Beugesehnen beim Pferd*, Dissertation, Tierärztliche Hochschule, (1992)
- [88] McIlwraith, C.W.; Fessler, J.F.: *Evaluation of inferior check ligament desmotomy for treatment of acquired flexor tendon contracture in horse*, Journal of the American Veterinary Medical Association, 172 (1978), 293-298
- [89] Sönnichsen, H.V.: *Tendinitis, Tendinose, Desmitis*, Lehrbuch der Allgemeinen Chirurgie für Tierärzte, Fischer, Jena, (1985)
- [90] Puddu, G.; Ippolito, E.; Postacchini, F.: *A classification of achilles tendon disease*, The American Journal of Sports Medicine, 4 (1976), 145-150
- [91] Kannus, P.; Jozsa, L.: *Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon: A controlled study of 891 patients*, Journal of Bone and Joint Surgery, 73 (1991), 1507-1525
- [92] Aström, M.; Rausing, A.: *Chronic Achilles tendinopathy: A survey of surgical and histopathologic findings*, Clinical Orthopaedics and Related Research (1995), 151-164
- [93] Maffulli, N.; Khan, K.M.; Puddu, G.: *Overuse tendon conditions: Time to change a confusing terminology*, Arthroscopy, 14 (1998), 840-843
- [94] Khan, K.M.; Cook, J.L.; Bonar, F.; Harcourt, P.; Astrom, M.: *Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management*, Sports Medicine, 27 (1999), 393-408
- [95] Ireland, D.; Harrall, R.; Curry, V.; Holloway, G.; Hackney, R.; Hazleman, B.; Riley, G.: *Multiple changes in gene expression in chronic human achilles tendinopathy*, Matrix Biology, 20 (2001), 159-169
- [96] Jozsa, L.G.; Kannus, P.: *Spontaneous rupture of tendons*, Human tendons: Anatomy, physiology and pathology, Human Kinetics, Champaign, (1997)
- [97] Stamenkovic, I.: *Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases*, Journal of Pathology, 200 (2003), 448-464
- [98] Goodship, A.E.; Birch, H.L.; Wilson, A.M.: *The pathobiology and repair of tendon and ligament injury*, Veterinary Clinics of North America, 10 (1994), 323-349
- [99] Williams, R.B.; Harkins, L.S.; Hammond, C.J.; Wood, J.L.N.: *Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998*, Equine Veterinary Journal, 33 (2001), 478-486

- [100] Ely, E.R.; Verheyen, K.L.P.; Wood, J.L.N.: *Fractures and tendon injuries in national hunt horses in training in the UK: A pilot study*, Equine Veterinary Journal, 36 (2004), 365-367
- [101] Lam, K.H.; Parkin, T.D.H.; Riggs, C.M.; Morgan, K.L.: *Descriptive analysis of retirement of thoroughbred racehorses due to tendon injuries at the Hong Kong Jockey Club (1992-2004)*, Equine Veterinary Journal, 39 (2007), 143-148
- [102] Bertone, A.L.: *Tendon lacerations*, Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 11 (1995), 293-314
- [103] Jordana, M.; Wilderjans, H.; Boswell, J.; Dewulf, J.; Smith, R.K.W.; Martens, A.: *Outcome after lacerations of the superficial and deep digital flexor tendons, suspensory ligament and/or distal sesamoidean ligaments in 106 horses*, Veterinary Surgery, 40 (2011), 277-283
- [104] Taylor, D.S.; Pascoe, J.R.; Meagher, D.M.; Honnas, C.M.: *Digital flexor tendon lacerations in horses: 50 cases*, Journal of the American Veterinary Medical Association, 206 (1995), 342-346
- [105] Foland, J.W.; Trotter, G.W.; Stashak, T.S.; McIlwraith, C.W.; Turner, A.S.; Aanes, W.A.: *Traumatic injuries involving tendons of the distal limbs in horses: A retrospective study of 55 cases*, Equine Veterinary Journal, 23 (1991), 422-425
- [106] Back, W.; Schamhardt, H.C.; Hartman, W.; Barneveld, A.: *Kinematic differences between the distal portions of the forelimbs and hind limbs of horses at the trot*, American Journal of Veterinary Research, 56 (1995), 1522-1528
- [107] Merkens, H.W.; Schamhardt, H.C.: *Evaluation of equine locomotion during different degrees of experimentally induced lameness. I: Lameness model and quantification of ground reaction force patterns of the limbs*, Equine Veterinary Journal (1988), 99-106
- [108] Merkens, H.W.; Schamhardt, H.C.: *Evaluation of equine locomotion during different degrees of experimentally induced lameness. II: Distribution of ground reaction force patterns of the concurrently loaded limbs*, Equine Veterinary Journal (1988), 107-112
- [109] Merkens, H.W.; Schamhardt, H.C.; Vanosch, G.; Hartman, W.: *Ground reaction force patterns of dutch warmbloods at the canter*, American Journal of Veterinary Research, 54 (1993), 670-674
- [110] Estrada, R.J.; Van Weeren, P.R.; Van de Lest, C.H.A.; Boere, J.; Reyes, M.; Ionita, J.C.; Estrada, M.; Lischer, C.J.: *Comparison of healing in forelimb and hindlimb surgically induced core lesions of the equine superficial digital flexor tendon*, Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology, 27 (2014), 358-365
- [111] Smith, M.R.W.; Wright, I.M.: *Noninfected tenosynovitis of the digital flexor tendon sheath: A retrospective analysis of 76 cases*, Equine Veterinary Journal, 38 (2006), 134-141
- [112] Murray, R.C.; Blunden, T.S.; Schramme, M.C.; Dyson, S.J.: *How does magnetic resonance imaging represent histologic findings in the equine digit?*, Veterinary Radiology and Ultrasound, 47 (2006), 17-31
- [113] Avella, C.S.; Smith, R.K.W.: *Diagnosis and management of tendon and ligament disorders*, Equine Surgery, Elsevier, St. Louis, (2011)

- [114] Davis, C.S.; Smith, R.K.W.: *Diagnosis and management of tendon and ligament disorders*, Equine Surgery, Elsevier, St. Louis, (2003)
- [115] Goodrich, L.R.: *Intralesional*, Adams and Stashak's Lameness in Horses, Wiley-Blackwell, Chichester, (2011)
- [116] Riley, G.P.: *The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective*, Rheumatology, 43 (2004), 131-142
- [117] Hess, G.P.; Cappiello, W.L.; Poole, R.M.; Hunter, S.C.: *Prevention and treatment of overuse tendon injuries*, Sports Medicine, 8 (1989), 371-384
- [118] Stromberg, B.: *The normal and diseased superficial flexor tendon in race horses. A morphologic and physiologic investigation*, Acta Radiologica, 305 (1971), 1-94
- [119] Webbon, P.M.: *Equine tendon stress injuries*, Equine Veterinary Journal, 5 (1973), 58-64
- [120] Ammann, K.: *Tendinitis in horses*, Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 123 (1981), 305-310
- [121] Blobel, K.: *Ein Beitrag zur Sehnenbehandlung bei Reit- und Trabrennpferden*, Der Praktische Tierarzt, 69 (1988), 10-14
- [122] Perkins, N.R.; Reid, S. W.J.; Morris, R.S.: *Risk factors for injury to the superficial digital flexor tendon and suspensory apparatus in thoroughbred racehorses in New Zealand*, New Zealand Veterinary Journal, 53 (2005), 184-192
- [123] Kannus, P.: *Etiology and pathophysiology of chronic tendon disorders in sports*, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 7 (1997), 78-85
- [124] Kannus, P.: *Tendon pathology: Basic science and clinical applications*, Sports Exercise and Injury, 3 (1997), 62-75
- [125] Nirschl, R.P.: *Mesenchymal syndrome*, Virginia Medical Monthly, 96 (1969), 659-662
- [126] Jozsa, L.G.; Kannus, P.: *Tendon alterations in inherited diseases*, Human tendons: Anatomy, physiology and pathology, Human Kinetics, Champaign, (1997)
- [127] Thorpe, C.T.; Chaudhry, S.; Lei, I.I.; Varone, A.; Riley, G.P.; Birch, H.L.; Clegg, P.D.; Screen, H.R.C.: *Tendon overload results in alterations in cell shape and increased markers of inflammation and matrix degradation*, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 25 (2015), 381-391
- [128] Alfredson, H.; Lorentzon, R.: *Chronic tendon pain: No signs of chemical inflammation but high concentrations of the neurotransmitter glutamate. Implications for treatment?*, Current Drug Targets, 3 (2002), 43-54
- [129] Dakin, S.G.; Werling, D.; Hibbert, A.; Abayasekara, D.R.E.; Young, N.J.; Smith, R.K.W.; Dudhia, J.: *Macrophage sub-populations and the lipoxin A4 receptor implicate active inflammation during equine tendon repair*, PLOS ONE, 7 (2012), e32333
- [130] Manning, C.N.; Havlioglu, N.; Knutsen, E.; Sakiyama-Elbert, S.E.; Silva, M.J.; Thomopoulos, S.; Gelberman, R.H.: *The early inflammatory response after flexor tendon healing: A gene expression and histological analysis*, Journal of Orthopaedic Research, 32 (2014), 645-652

- [131] Dakin, S.G.; Dudhia, J.; Smith, R.K.W.: *Resolving an inflammatory concept: The importance of inflammation and resolution in tendinopathy*, Veterinary Immunology and Immunopathology, 158 (2014), 121-127
- [132] Legerlotz, K.; Jones, E.R.; Screen, H.R.C.; Riley, G.P.: *Increased expression of IL-6 family members in tendon pathology*, Rheumatology, 51 (2012), 1161-1165
- [133] Ackermann, P.W.; Domeij-Arverud, E.; Leclerc, P.; Amoudrouz, P.; Nader, G.A.: *Anti-inflammatory cytokine profile in early human tendon repair*, Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy, 21 (2013), 1801-1806
- [134] Legerlotz, K.; Jones, G.C.; Screen, H.R.C.; Riley, G.P.: *Cyclic loading of tendon fascicles using a novel fatigue loading system increases interleukin-6 expression by tenocytes*, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 23 (2013), 31-37
- [135] Riley, G.P.: *Tendinopathy - From basic science to treatment*, Nature Clinical Practice Rheumatology, 4 (2008), 82-89
- [136] Jones, G.C.; Corps, A.N.; Pennington, C.J.; Clark, I.M.; Edwards, D.R.; Bradley, M.M.; Hazleman, B.L.; Riley, G.P.: *Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human achilles tendon*, Arthritis and Rheumatism, 54 (2006), 832-842
- [137] de Mos, M.; van El, B.; DeGroot, J.; Jahr, H.; van Schie, H.T.M.; van Arkel, E.R.; Tol, H.; Heijboer, R.; van Osch, G.J.V.M.; Verhaar, J.A.N.: *Achilles tendinosis: Changes in biochemical composition and collagen turnover rate*, American Journal of Sports Medicine, 35 (2007), 1549-1556
- [138] Bosman, F.T.; Stamenkovic, I.: *Functional structure and composition of the extracellular matrix*, Journal of Pathology, 200 (2003), 423-428
- [139] Moore, R.M.; Eades, S.C.; Stokes, A.M.: *Evidence for vascular and enzymatic events in the pathophysiology of acute laminitis: Which pathway is responsible for initiation of this process in horses?*, Equine Veterinary Journal, 36 (2004), 204-209
- [140] Karousou, E.; Ronga, M.; Vigetti, D.; Passi, A.; Maffulli, N.: *Collagens, proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in human achilles tendon rupture*, Clinical Orthopaedics and Related Research, 466 (2008), 1577-1582
- [141] Fietz, S.; Einspanier, R.; Hoepfner, S.; Hertsch, B.; Bondzio, A.: *Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays*, Equine Veterinary Journal, 40 (2008), 266-271
- [142] Woessner, J.F.: *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective-tissue remodeling*, Faseb Journal, 5 (1991), 2145-2154
- [143] Riley, G.P.; Harrall, R.L.; Constant, C.R.; Chard, M.D.; Cawston, T.E.; Hazleman, B.L.: *Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: Changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis*, Annals of the Rheumatic Diseases, 53 (1994), 367-376
- [144] Dahlgren, L.: *Pathobiology of tendon and ligament injuries*, Clinical techniques in equine practice, 6 (2007), 168-173
- [145] Brooks, C.H.; Revell, W.J.; Heatley, F.W.: *A quantitative histological study of the vascularity of the rotator cuff tendon*, Journal of Bone and Joint Surgery, 74 (1992), 151-153

- [146] Ahmed, I.M.; Lagopoulos, M.; McConnell, P.; Soames, R.W.; Sefton, G.K.: *Blood supply of the Achilles tendon*, Journal of Orthopaedic Research, 16 (1998), 591-596
- [147] Leadbetter, W.B.: *Cell-matrix response in tendon injury*, Clinics in Sports Medicine, 11 (1992), 533-578
- [148] Fenwick, S.A.; Hazleman, B.L.; Riley, G.P.: *The vasculature and its role in the damaged and healing tendon*, Arthritis Research, 4 (2002), 252-260
- [149] O'Sullivan, C.B.: *Injuries of the Flexor Tendons: Focus on the superficial digital flexor tendon*, Clinical Techniques in Equine Practice, 6 (2007), 189-197
- [150] Eriksen, H.A.; Pajala, A.; Leppilahti, J.; Risteli, J.: *Increased content of type III collagen at the rupture site of human achilles tendon*, Journal of Orthopaedic Research, 20 (2002), 1352-1357
- [151] Buckley, M.R.; Satchel, L.N.; Matuszewski, P.E.; Chen, Y.L.; Evans, E.; Kumar, A.; Elliott, D.M.; Soslowsky, L.J.; Dodge, G.R.: *Distribution of Types I, II and III collagen by region in the human supraspinatus tendon*, Osteoarthritis and Cartilage, 21 (2013), 214
- [152] Williams, I.F.; McCullagh, K.G.; Silver, I.A.: *The distribution of type-I and type-III collagen and fibronectin in the healing equine tendon*, Connective Tissue Research, 12 (1984), 211-227
- [153] Pufe, T.; Petersen, W.J.; Mentlein, R.; Tillmann, B.N.: *The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease*, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 15 (2005), 211-222
- [154] Jopp, I.; Reese, S.: *Morphological and biomechanical studies on the common calcaneal tendon in dogs*, Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology, 22 (2009), 119-124
- [155] Kannus, P.; Natri, A.: *Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports*, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 7 (1997), 107-112
- [156] Movin, T.; Gad, A.; Reinholt, P.; Rolf, C.: *Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients*, Acta Orthopaedica Scandinavica, 68 (1997), 170-175
- [157] Nirschl, R.P.; Pettrone, F.A.: *Tennis elbow. The surgical treatment of lateral epicondylitis*, Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume, 61 (1979), 832-839
- [158] Aström, M.; Westlin, N.: *Blood flow in chronic achilles tendinopathy*, Clinical Orthopaedics and Related Research (1994), 166-172
- [159] Aström, M.: *Laser Doppler flowmetry in the assessment of tendon blood flow*, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 10 (2000), 365-367
- [160] Jopp, I.: *Morphologische und biomechanische Untersuchungen am Tendocalcaneus communis des Hundes*, Dissertation, Tierärztliche Fakultät, LMU München, (2001)
- [161] Herring, S.A.; Nilson, K.L.: *Introduction to overuse injuries*, Clinics in Sports Medicine, 6 (1987), 225-239
- [162] Selvanetti, A.; Cipolla, M.; Puddu, G.: *Overuse tendon injuries: Basic science and classification*, Operative Techniques in Sports Medicine, 5 (1997), 110-117

- [163] Kjaer, M.: *The treatment of overuse injuries in sports*, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 11 (2001), 195-196
- [164] Jozsa, L.G.; Kannus, P.: *Overuse injuries of tendons*, Human tendons: Anatomy, physiology and pathology, Human Kinetics, Champaign, (1997)
- [165] Corr, D.T.; Gallant-Behm, C.L.; Shrive, N.G.; Hart, D.A.: *Biomechanical behavior of scar tissue and uninjured skin in a porcine model*, Wound Repair and Regeneration, 17 (2009), 250-259
- [166] Hart, D.P.; Dahners, L.E.: *Healing of the medial collateral ligament in rats. The effects of repair, motion, and secondary stabilizing ligaments*, Journal of Bone and Joint Surgery, 69 (1987), 1194-1199
- [167] Oikawa, M.; Kasashima, Y.: *The Japanese experience with tendonitis in racehorses*, Journal of Equine Veterinary Science, 13 (2002), 41-56
- [168] Longo, U.G.; Lamberti, A.; Petrillo, S.; Maffulli, N.; Denaro, V.: *Scaffolds in tendon tissue engineering*, Stem Cells International, 2012 (2012), 1-12
- [169] Thornton, G.M.; Shrive, N.G.; Frank, C.B.: *Healing ligaments have decreased cyclic modulus compared to normal ligaments and immobilization further compromises healing ligament response to cyclic loading*, Journal of Orthopaedic Research, 21 (2003), 716-722
- [170] Marr, C.M.; Love, S.; Boyd, J.S.; McKellar, Q.: *Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in national hunt and point-to-point racehorses*, Veterinary Record, 132 (1993), 476-479
- [171] Dyson, S.J.: *Medical management of superficial digital flexor tendonitis: A comparative study in 219 horses (1992-2000)*, Equine Veterinary Journal, 36 (2004), 415-419
- [172] Easley, K.J.; Stashak, T.S.; Smith, F.W.; Vanslyke, G.: *Mechanical properties of four suture patterns for transected equine tendon repair*, Veterinary Surgery, 19 (1990), 102-106
- [173] Moores, A.P.; Owen, M.R.; Tarlton, J.F.: *The three loop pulley suture versus two locking loop sutures for the repair of canine achilles tendons*, Veterinary Surgery, 33 (2004), 131-137
- [174] Jann, H.W.; Stein, L.E.; Good, J.K.: *Strength characteristics and failure modes of locking loop and three loop pulley suture patterns in equine tendons*, Veterinary Surgery, 19 (1990), 28-33
- [175] Smith, R.L.; Murphy, D.J.; Day, R.E.; Lester, G.D.: *An ex vivo biomechanical study comparing strength characteristics of a new technique with the three loop pulley for equine tenorrhaphy*, Veterinary Surgery, 40 (2011), 768-773
- [176] Everett, E.; Barrett, J.G.; Morelli, J.; DeVita, R.: *Biomechanical testing of a novel suture pattern for repair of equine tendon lacerations*, Veterinary Surgery, 41 (2012), 278-285
- [177] Geburek, F.; Stadler, P.: *Regenerative therapy for tendon and ligament disorders in horses. Terminology, production, biologic potential and in vitro effects*, Tierärztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere, 39 (2011), 373-383
- [178] Geburek, F.; Stadler, P.: *Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Terminologie, Herstellung, biologisches Potenzial und In-vitro-Effekte*, Tierärztliche Praxis Grosstiere, 39 (2011), 373-383

- [179] Fortier, L.A.: *Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications*, Veterinary Surgery, 34 (2005), 415-423
- [180] Godwin, E.E.; Young, N.J.; Dudhia, J.; Beamish, I.C.; Smith, R.K.W.: *Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon*, Equine Veterinary Journal, 44 (2012), 25-32
- [181] Taylor, M.A.; Norman, T.L.; Clovis, N.B.; Blaha, J.D.: *The response of rabbit patellar tendons after autologous blood injection*, Medicine and Science in Sports and Exercise, 34 (2002), 70-73
- [182] Suresh, S.P.S.; Ali, K. E.; Jones, H.; Connell, D.A.: *Medial epicondylitis: Is ultrasound guided autologous blood injection an effective treatment?*, British Journal of Sports Medicine, 40 (2006), 935-939
- [183] James, S.L.; Ali, K.; Pocock, C.; Robertson, C.; Walter, J.; Bell, J.; Connell, D.: *Ultrasound guided dry needling and autologous blood injection for patellar tendinosis*, British Journal of Sports Medicine, 41 (2007), 518-521
- [184] Fortier, L.A.; Smith, R.K.: *Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses*, Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 24 (2008), 191-201
- [185] Yeom, K.H.; Ariyoshi, W.; Okinaga, T.; Washio, A.; Morotomi, T.; Kitamura, C.; Nishihara, T.: *Platelet-rich plasma enhances the differentiation of dental pulp progenitor cells into odontoblasts*, International endodontic journal, 49 (2016), 271-278
- [186] Shimojo, A.A.M.; Perez, A.G.M.; Galdames, S.E.M.; Brissac, I.C.S.; Santana, M.H.A.: *Stabilization of porous chitosan improves the performance of its association with platelet-rich plasma as a composite scaffold*, Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications, 60 (2016), 538-546
- [187] Wesner, M.; Defreitas, T.; Bredy, H.; Pothier, L.; Qin, Z.L.; McKillop, A.B.; Gross, D.P.: *A pilot study evaluating the effectiveness of platelet-rich plasma therapy for treating degenerative tendinopathies: A randomized control trial with synchronous observational cohort*, PLOS ONE, 11 (2016), 14
- [188] Nixon, A.J.; Dahlgren, L.A.; Haupt, J.L.; Yeager, A.E.; Ward, D.L.: *Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis*, American Journal of Veterinary Research, 69 (2008), 928-937
- [189] Koch, T.G.; Heerkens, T.; Thomsen, P.D.; Betts, D.H.: *Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood*, BMC Biotechnology, 7 (2007),
- [190] Smith, R.K.: *Principles of stem cell therapy in the horse - The science behind the technology*, Pferdeheilkunde, 24 (2008), 508-512
- [191] Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P.; Hedrick, M. H.: *Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies*, Tissue Engineering, 7 (2001), 211-228
- [192] Jankowski, R. J.; Deasy, B. M.; Huard, J.: *Muscle-derived stem cells*, Gene Therapy, 9 (2002), 642-647

- [193] Fukumoto, T.; Sperling, J.W.; Sanyal, A.; Fitzsimmons, J.S.; Reinholz, G.G.; Conover, C.A.; O'Driscoll, S.W.: *Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro*, Osteoarthritis and Cartilage, 11 (2003), 55-64
- [194] De Bari, C.; Dell'Accio, F.; Tylzanowski, P.; Luyten, F. P.: *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane*, Arthritis and Rheumatism, 44 (2001), 1928-1942
- [195] Noort, W.A.; Kruisselbrink, A.B.; in't Anker, P.S.; Kruger, M.; van Bezooijen, R.L.; de Paus, R.A.; Heemskerk, M.H.M.; Lowik, C.W.; Falkenburg, J.H.F.; Willemze, R.; Fibbe, W.E.: *Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice*, Experimental Hematology, 30 (2002), 870-878
- [196] Miura, M.; Gronthos, S.; Zhao, M. R.; Lu, B.; Fisher, L. W.; Robey, P. G.; Shi, S. T.: *SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100 (2003), 5807-5812
- [197] Young, H. E.; Steele, T. A.; Bray, R. A.; Hudson, J.; Floyd, J. A.; Hawkins, K.; Thomas, K.; Austin, T.; Edwards, C.; Cuzzourt, J.; Duenzl, M.; Lucas, P. A.; Black, A. C.: *Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors*, Anatomical Record, 264 (2001), 51-62
- [198] Zvaifler, N. J.; Marinova-Mutafchieva, L.; Adams, G.; Edwards, C. J.; Moss, J.; Burger, J. A.; Maini, R. N.: *Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals*, Arthritis Research, 2 (2000), 477-488
- [199] Wenisch, S.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Hose, D.; Herde, K.; Heiss, C.; Kilian, O.; Alt, V.; Schnettler, R.: *Human reaming debris: A source of multipotent stem cells*, Bone, 36 (2005), 74-83
- [200] Violini, S.; Ramelli, P.; Pisani, L.F.; Gorni, C.; Mariani, P.: *Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12*, BMC Cell Biology, 10 (2009), 1-10
- [201] Vidal, M.A.; Kilroy, G.E.; Lopez, M.J.; Johnson, J.R.; Moore, R.M.; Gimble, J.M.: *Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*, Veterinary Surgery, 36 (2007), 613-622
- [202] Arnhold, S.J.; Goletz, I.; Klein, H.; Stumpf, G.; Beluche, L.A.; Rohde, C.; Addicks, K.; Litzke, L.F.: *Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells*, American Journal of Veterinary Research, 68 (2007), 1095-1105
- [203] Arnoczky, S.P.; Lavagnino, M.; Egerbacher, M.: *The mechanobiological aetiopathogenesis of tendinopathy: Is it the over-stimulation or the under-stimulation of tendon cells?*, International Journal of Experimental Pathology, 88 (2007), 217-226
- [204] Rees, J.D.; Wilson, A.M.; Wolman, R.L.: *Current concepts in the management of tendon disorders*, Rheumatology, 45 (2006), 508-521
- [205] Evans, J.H.; Barbenel, J.C.: *Structural and mechanical properties of tendon related to function*, Equine Veterinary Journal, 7 (1975), 1-8

- [206] Wilson, A.M.; Goodship, A. E.: *Mechanical properties of the equine superficial digital flexor tendon*, Journal of Biomechanics, 24 (1990), 474
- [207] Crevier, N.; Pourcelot, P.; Denoix, J.M.; Geiger, D.; Bortolussi, C.; Ribot, X.; Sanaa, M.: *Segmental variations of in vitro mechanical properties in equine superficial digital flexor tendons*, American Journal of Veterinary Research, 57 (1996), 1111-1117
- [208] Dowling, B.A.; Dart, A.J.; Hodgson, D.R.; Rose, R.J.; Walsh, W.R.: *Recombinant equine growth hormone does not affect the in vitro biomechanical properties of equine superficial digital flexor tendon*, Veterinary Surgery, 31 (2002), 325-330
- [209] Woo, S.L.; Ritter, M.A.; Amiel, D.; Sanders, T.M.; Gomez, M.A.; Kuel, S.C.; Garfin, S.R.; Akeson, W.H.: *The biomechanical and biochemical properties of swine tendons: Long term effects of exercise on the digital extensors*, Connective Tissue Research, 7 (1980), 177-183
- [210] Woo, S.L.Y.: *Mechanical properties of tendons and ligaments. I. Quasi-static and nonlinear viscoelastic properties*, Biochemistry, 19 (1982), 385-396
- [211] Kwan, M.K.; Lin, T.H.C.; Woo, S.L.Y.: *On the viscoelastic properties of the anteromedial bundle of the anterior cruciate ligament*, Journal of Biomechanics, 26 (1993), 447-452
- [212] Atkins, E.D.T.: *Structure of fibrous biopolymers: Proceedings of the 26th symposium of the Colston Research Society held in the University of Bristol*, Butterworth, London, (1975)
- [213] Wang, J.H.C.: *Mechanobiology of tendon*, Journal of Biomechanics, 39 (2006), 1563-1582
- [214] Fratzl, P.; Misof, K.; Zizak, I.; Rapp, G.; Amenitsch, H.; Bernstorff, S.: *Fibrillar structure and mechanical properties of collagen*, Journal of Structural Biology, 122 (1998), 119-122
- [215] Butler, D.L.; Grood, E.S.; Noyes, F.R.; Zernicke, R.F.: *Biomechanics of ligaments and tendons*, Exercise and Sport Sciences Reviews, 6 (1978), 125-181
- [216] Riemersma, D.J.; Schamhardt, H.C.: *In vitro mechanical properties of equine tendons in relation to cross sectional area and collagen content*, Research in Veterinary Science, 39 (1985), 263-270
- [217] Wilson, A.M.: *The effect of exercise intensity on the biochemistry, morphology and mechanical properties of tendon*, Dissertation, University of Bristol, (1991)
- [218] Kotha, S.P.; Guzelsu, N.: *Tensile damage and its effects on cortical bone*, Journal of Biomechanics, 36 (2003), 1683-1689
- [219] Jansen, M.O.; Savelberg, H.H.C.M.: *Stress and strain of equine tendons of the forelimb at failure*, Equine Veterinary Journal, 26 (1994), 57-60
- [220] Thorpe, C.T.; Stark, R.J.F.; Goodship, A.E.; Birch, H.L.: *Mechanical properties of the equine superficial digital flexor tendon relate to specific collagen cross-link levels*, Equine Veterinary Journal, 42 (2010), 538-543
- [221] Gerard, M.P.; Hodgson, D.R.; Rose, R.J.; Walsh, W.R.: *Effects of recombinant equine growth hormone on in vitro biomechanical properties of the superficial digital flexor tendon of standardbred yearlings in training*, Veterinary Surgery, 34 (2005), 253-259

- [222] Wang, X.T.; Ker, R.F.: *Creep rupture of wallaby tail tendons*, Journal of Experimental Biology, 198 (1995), 831-845
- [223] Matthews, G.L.; Keegan, K.G.; Graham, H.L.: *Effects of tendon grip technique (frozen versus unfrozen) on in vitro surface strain measurements of the equine deep digital flexor tendon*, American Journal of Veterinary Research, 57 (1996), 111-115
- [224] Silver, I.A.; Brown, P.N.; Goodship, A.E.; Lanyon, L.E.; McCullagh, K.G.; Perry, G.C.; Williams, I.F.: *A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse*, Equine Veterinary Journal (1983), 1-43
- [225] Stephens, P.R.; Nunamaker, D.M.; Butterweck, D.M.: *Application of a Hall-effect transducer for measurement of tendon strains in horses*, American Journal of Veterinary Research, 50 (1989), 1089-1095
- [226] Riemersma, D.J.; van den Bogert, A.J.; Jansen, M.O.; Schamhardt, H.C.: *Tendon strain in the forelimbs as a function of gait and ground characteristics and in vitro limb loading in ponies*, Equine Veterinary Journal, 28 (1996), 133-138
- [227] Lochner, F.K.; Milne, D.W.; Mills, E.J.; Groom, J.J.: *In vivo and in vitro measurement of tendon strain in the horse*, American Journal of Veterinary Research, 41 (1980), 1929-1937
- [228] Riemersma, D.J.; van den Bogert, A.J.; Jansen, M.O.; Schamhardt, H.C.: *Influence of shoeing on ground reaction forces and tendon strains in the forelimbs of ponies*, Equine Veterinary Journal, 28 (1996), 126-132
- [229] Meershoek, L.S.; Lanovaz, J.L.: *Sensitivity analysis and application to trotting of a noninvasive method to calculate flexor tendon forces in the equine forelimb*, American Journal of Veterinary Research, 62 (2001), 1594-1598
- [230] Herrick, W.C.; Kingsbury, H.B.; Lou, D.Y.S.: *Study of normal range of strain, strain rate, and stiffness of tendon*, Journal of Biomedical Materials Research, 12 (1978), 877-894
- [231] Dimery, N.J.; Alexander, R.M.; Ker, R.F.: *Elastic extension of leg tendons in the locomotion of horses (Equus-cabullus)*, Journal of Zoology, 210 (1986), 415-425
- [232] Haut, R.C.: *The mechanical and viscoelastic properties of the anterior cruciate ligament and of ACL fascicles*, The anterior cruciate ligament: Current and future concepts, Wolters Kluwer, New York, (1993)
- [233] Noyes, F.R.; Butler, D.L.; Grood, E.S.; Zernicke, R.F.; Hefzy, M.S.: *Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee ligament repairs and reconstructions*, Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume, 66 (1984), 344-352
- [234] Butcher, M.T.; Hermanson, J.W.; Ducharme, N.G.; Mitchell, L.M.; Soderholm, L.V.; Bertram, J.E.A.: *Contractile behavior of the forelimb digital flexors during steady state locomotion in horses (Equus caballus): An initial test of muscle architectural hypotheses about in vivo function*, Comparative Biochemistry and Physiology, 152 (2009), 100-114
- [235] Wilmink, J.; Wilson, A.M.; Goodship, A.E.: *Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibers in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses*, Research in Veterinary Science, 53 (1992), 354-359

- [236] Patterson-Kane, J.C.; Parry, D.A.D.; Goodship, A.E.; Firth, E.C.: *Exercise modifies the age related change in crimp pattern in the core region of the equine superficial digital flexor tendon*, New Zealand Veterinary Journal, 45 (1997), 135-139
- [237] Webbon, P.M.: *Post-mortem study of equine digital flexor tendons*, Equine Veterinary Journal, 9 (1977), 61-67
- [238] Rooney, J.R.; Genovese, R.L.: *A survey and analysis of bowed tendon in thoroughbred racehorses*, Journal of Equine Veterinary Science, 1 (1981), 49-53
- [239] Wood, T.O.; Cooke, P.H.; Goodship, A.E.: *The effect of exercise and anabolic steroids on the mechanical properties and crimp morphology of the rat tendon*, American Journal of Sports Medicine, 16 (1988), 153-158
- [240] Torp, S.; Arridge, R.G.C.; Armeniades, C.D.; Baer, E.: *Structure-property relationships in tendon as a function of age*, Structure of Fibrous Biopolymers, Butterworths, London, (1975)
- [241] Dale, W.C.; Baer, E.: *Fiber-buckling in composite systems: A model for ultrastructure of uncalcified collagen tissues*, Journal of Materials Science, 9 (1974), 369-382
- [242] Rösler, J.; Harders, H.; Bäker, M.: *Mechanisches Verhalten der Werkstoffe*, Springer Vieweg, Wiesbaden, (2012)
- [243] Wells, H.C.; Sizeland, K.H.; Kayed, H.R.; Kirby, N.; Hawley, A.; Mudie, S.T.; Haverkamp, R.G.: *Poisson's ratio of collagen fibrils measured by small angle X-ray scattering of strained bovine pericardium*, Journal of Applied Physics, 117 (2015),
- [244] Jurvelin, J.S.; Buschmann, M.D.; Hunziker, E.B.: *Optical and mechanical determination of Poisson's ratio of adult bovine humeral articular cartilage*, Journal of Biomechanics, 30 (1997), 235-241
- [245] Kiviranta, P.; Rieppo, J.; Korhonen, R.K.; Julkunen, P.; Toyras, J.; Jurvelin, J.S.: *Collagen network primarily controls Poisson's ratio of bovine articular cartilage in compression*, Journal of Orthopaedic Research, 24 (2006), 690-699
- [246] Miller, G.J.; Morgan, E.F.: *Use of microindentation to characterize the mechanical properties of articular cartilage: Comparison of biphasic material properties across length scales*, Osteoarthritis and Cartilage, 18 (2010), 1051-1057
- [247] Hayes, W.C.; Mockros, L.F.: *Viscoelastic properties of human articular cartilage*, Journal of Applied Physiology, 31 (1971), 562-568
- [248] Persson, C.; Evans, S.; Marsh, R.; Summers, J.L.; Hall, R.M.: *Poisson's ratio and strain rate dependency of the constitutive behavior of spinal dura mater*, Annals of Biomedical Engineering, 38 (2010), 975-983
- [249] Elliott, D.M.; Narmoneva, D.A.; Setton, L.A.: *Direct measurement of the Poisson's ratio of human patella cartilage in tension*, Journal of Biomechanical Engineering, 124 (2002), 223-228
- [250] Cheng, V.W.T.; Screen, H.R.C.: *The micro structural strain response of tendon*, Journal of Materials Science, 42 (2007), 8957-8965
- [251] Edelsten, L.; Jeffrey, J.E.; Burgin, L.V.; Aspden, R.M.: *Viscoelastic deformation of articular cartilage during impact loading*, Soft Matter, 6 (2010), 5206-5212
- [252] Hewitt, J.; Guilak, F.; Glisson, R.; Vail, T.P.: *Regional material properties of the human hip joint capsule ligaments*, Journal of Orthopaedic Research, 19 (2001), 359-364

- [253] Lynch, H.A.; Johannessen, W.; Wu, J.P.; Jawa, A.; Elliott, D.M.: *Effect of fiber orientation and strain rate on the nonlinear uniaxial tensile material properties of tendon*, Journal of Biomechanical Engineering, 125 (2003), 726-731
- [254] Reese, S.P.; Weiss, J.A.: *Tendon fascicles exhibit a linear correlation between Poisson's ratio and force during uniaxial stress relaxation*, Journal of Biomechanical Engineering, 135 (2013), 1-5
- [255] Screen, H.R.C.; Bader, D.L.; Lee, D.A.; Shelton, J.C.: *Local strain measurement within tendon*, Strain, 40 (2004), 157-163
- [256] Adeeb, S.; Ali, A.; Shrivani, N.; Frank, C.; Smith, D.: *Modelling the behaviour of ligaments: A technical note*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, 7 (2004), 33-42
- [257] Wellen, J.; Helmer, K.G.; Grigg, P.; Sotak, C.H.: *Application of porous media theory to the investigation of water ADC changes in rabbit achilles tendon caused by tensile loading*, Journal of Magnetic Resonance, 170 (2004), 49-55
- [258] Thornton, G.M.; Leask, G.P.; Shrive, N.G.; Frank, C.B.: *Early medial collateral ligament scars have inferior creep behaviour*, Journal of Orthopaedic Research, 18 (2000), 238-246
- [259] Helmer, K.G.; Nair, G.; Cannella, M.; Grigg, P.: *Water movement in tendon in response to a repeated static tensile load using one-dimensional magnetic resonance imaging*, Journal of Biomechanical Engineering, 128 (2006), 733-741
- [260] Hannafin, J.A.; Arnoczky, S.P.: *Effect of cyclic and static tensile loading on water content and solute diffusion in canine flexor tendons: An in vitro study*, Journal of Orthopaedic Research, 12 (1994), 350-356
- [261] Peel, L.D.: *Exploration of high and negative Poisson's ratio elastomer matrix laminates*, Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics, 244 (2007), 988-1003
- [262] Provenzano, P.P.; Vanderby, R.: *Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon*, Matrix Biology, 25 (2006), 71-84
- [263] Yahia, L.H.; Drouin, G.: *Microscopical investigation of canine anterior cruciate ligament and patellar tendon: Collagen fascicle morphology and architecture*, Journal of Orthopaedic Research, 7 (1989), 243-251
- [264] Vidal, B.C.: *Crimp as part of a helical structure*, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie, 318 (1995), 173-178
- [265] Vidal, B.D.: *Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy*, Micron, 34 (2003), 423-432
- [266] Vidal, B.D.; Mello, M.L.S.: *Structural organization of collagen fibers in chordae tendineae as assessed by optical anisotropic properties and fast fourier transform*, Journal of Structural Biology, 167 (2009), 166-175
- [267] Gillis, C.; Sharkey, N.; Stover, S.M.; Pool, R.R.; Meagher, D.M.; Willits, N.: *Effect of maturation and aging on material and ultrasonographic properties of equine superficial digital flexor tendon*, American Journal of Veterinary Research, 56 (1995), 1345-1350

- [268] Leahy, J.C.; Hukins, D.W.L.: *Viscoelastic properties of the nucleus pulposus of the intervertebral disk in compression*, Journal of Materials Science, 12 (2001), 689-692
- [269] Ault, H.K.; Hoffmann, A.H.: *A composite micromechanical model for connective tissues: Part II-Application to rat tail tendon and joint capsule*, Journal of Biomechanical Engineering, 114 (1992), 142-146
- [270] Graham, J.S.; Vomund, A.N.; Phillips, C.L.; Grandbois, M.: *Structural changes in human type I collagen fibrils investigated by force spectroscopy*, Experimental Cell Research, 299 (2004), 335-342
- [271] Whipple, R.; Wirth, C.R.; Mow, V.C.: *Mechanical properties of the meniscus*, Journal of Advanced in Bioengineering, 32 (1984),
- [272] Svensson, R.B.; Hassenkam, T.; Grant, C.A.; Magnusson, S.P.: *Tensile properties of human collagen fibrils and fascicles are insensitive to environmental salts*, Biophysical Journal, 99 (2010), 4020-4027
- [273] Svensson, R.B.; Hassenkam, T.; Hansen, P.; Magnusson, S.P.: *Viscoelastic behavior of discrete human collagen fibrils*, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 3 (2010), 112-115
- [274] Fithian, D.C.; Schmidt, M.B.; Ratcliffe, A.; Mow, V.C.: *Human meniscus tensile properties: Regional variation and biochemical correlation*, Orthopaedic Research Society, 14 (1989), 205
- [275] van der Rijt, J.A.J.; van der Werf, K.O.; Bennink, M.L.; Dijkstra, P.J.; Feijen, J.: *Micromechanical testing of individual collagen fibrils*, Macromolecular Bioscience, 6 (2006), 697-702
- [276] Sasaki, N.; Odajima, S.: *Elongation mechanism of collagen fibrils and force-strain relations of tendon at each level of structural hierarchy*, Journal of Biomechanics, 29 (1996), 1131-1136
- [277] Eppell, S.J.; Smith, B.N.; Kahn, H.; Ballarini, R.: *Nano measurements with micro-devices: Mechanical properties of hydrated collagen fibrils*, Journal of the Royal Society Interface, 3 (2006), 117-121
- [278] Chan, Y.P.; Tang, C.Y.; Tsui, C.P.; Kojic, M.; Ng, G.Y.F.: *A mechanistic study of tendon fibre using a cell model*, Indian Engineering Research, 5 (2008), 28-37
- [279] Wenger, M.P.E.; Bozec, L.; Horton, M.A.; Mesquida, P.: *Mechanical properties of collagen fibrils*, Biophysical Journal, 93 (2007), 1255-1263
- [280] Woo, S.L.Y.; Gomez, M.A.; Woo, Y.K.; Akeson, W.H.: *Mechanical properties of tendons and ligaments. II. The relationships of immobilization and exercise on tissue remodeling*, Biorheology, 19 (1982), 397-408
- [281] Hinchcliff, K.W.; Kaneps, A.J.; Geor, R.J.: *Equine exercise physiology the science of exercise in the athletic horse*, Elsevier, Edinburgh, (2008)
- [282] Angel, G.; Gheorghe, V.: *Interferometric evaluation of collagen concentration in tendon fibres*, Connective Tissue Research, 13 (1985), 323-337
- [283] Kjaer, M.; Langberg, H.; Miller, B.F.; Boushel, R.; Cramer, R.; Koskinen, S.; Heinemeier, K.; Olesen, J.L.; Dossing, S.; Hansen, M.; Pedersen, S.G.; Rennie, M.J.; Magnusson, P.: *Metabolic activity and collagen turnover in human tendon in response to physical activity*, Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, 5 (2005), 41-52

- [284] Karamanidis, K.; Arampatzis, A.: *Mechanical and morphological properties of human quadriceps femoris and triceps surae muscle-tendon unit in relation to aging and running*, Journal of Biomechanics, 39 (2006), 406-417
- [285] Rosager, S.; Aagaard, P.; Dyhre-Poulsen, P.; Neergaard, K.; Kjaer, M.; Magnusson, S.P.: *Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners*, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 12 (2002), 90-98
- [286] Goh, K.L.; Holmes, D.F.; Lu, H.Y.; Richardson, S.; Kadler, K.E.; Purslow, P.P.; Wess, T.J.: *Ageing changes in the tensile properties of tendons: Influence of collagen fibril volume fraction*, Journal of Biomechanical Engineering, 130 (2008),
- [287] Becker, C.K.; Savelberg, H.H.; Barneveld, A.: *In vitro mechanical properties of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon in horses in relation to age*, Equine Veterinary Journal, 26 (1994), 454-459
- [288] Platt, D.; Wilson, A.: *The role of biomechanics research in the understanding of equine lameness*, Equine Veterinary Journal, 26 (1994), 435-436
- [289] Ker, R.F.: *Mechanics of tendon, from an engineering perspective*, International Journal of Fatigue, 29 (2007), 1001-1009
- [290] Rigby, B.J.: *Effect of cyclic extension on the physical properties of tendon collagen and its possible relation to biological ageing of collagen*, Nature, 202 (1964), 1072-1074
- [291] Chimich, D.; Shrive, N.; Frank, C.; Marchuk, L.; Bray, R.: *Water content alters viscoelastic behavior of the normal adolescent rabbit medial collateral ligament*, Journal of Biomechanics, 25 (1992), 831-837
- [292] Shepherd, J.H.; Legerlotz, K.; Demirci, T.; Klemt, C.; Riley, G.P.; Screen, H.R.C.: *Functionally distinct tendon fascicles exhibit different creep and stress relaxation behaviour*, Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine, 228 (2014), 49-59
- [293] Shepherd, J.H.; Riley, G.P.; Screen, H.R.C.: *Early stage fatigue damage occurs in bovine tendon fascicles in the absence of changes in mechanics at either the gross or micro structural level*, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 38 (2014), 163-172
- [294] Schechtman, H.; Bader, D.L.: *In vitro fatigue of human tendons*, Journal of Biomechanics, 30 (1997), 829-835
- [295] Schechtman, H.; Bader, D.L.: *Fatigue damage of human tendons*, Journal of Biomechanics, 35 (2002), 347-353
- [296] Wren, T.A.L.; Lindsey, D.P.; Beaupre, G.S.; Carter, D.R.: *Effects of creep and cyclic loading on the mechanical properties and failure of human achilles tendons*, Annals of Biomedical Engineering, 31 (2003), 710-717
- [297] Parent, G.; Huppe, N.; Langelier, E.: *Low stress tendon fatigue is a relatively rapid process in the context of overuse injuries*, Annals of Biomedical Engineering, 39 (2011), 1535-1545
- [298] Fung, D.T.; Wang, V.M.; Laudier, D.M.; Shine, J.H.; Basta-Pljakic, J.; Jepsen, K.J.; Schaffler, M.B.; Flatow, E.L.: *Subrupture tendon fatigue damage*, Journal of Orthopaedic Research, 27 (2009), 264-273

- [299] Fung, D.T.; Wang, V.M.; Andarawis-Puri, N.; Basta-Pljakic, J.; Li, Y.H.; Laudier, D.M.; Sun, H.B.; Jepsen, K.J.; Schaffler, M.B.; Flatow, E.L.: *Early response to tendon fatigue damage accumulation in a novel in vivo model*, Journal of Biomechanics, 43 (2010), 274-279
- [300] Shepherd, J.H.; Screen, H.R.C.: *Fatigue loading of tendon*, International Journal of Experimental Pathology, 94 (2013), 260-270
- [301] Thornton, G.M.; Shrive, N.G.; Frank, C.B.: *Ligament creep recruits fibres at low stresses and can lead to modulus reducing fibre damage at higher creep stresses: A study in rabbit medial collateral ligament model*, Journal of Orthopaedic Research, 20 (2002), 967-974
- [302] Weisbecker, H.; Viertler, C.; Pierce, D.M.; Holzapfel, G.A.: *The role of elastin and collagen in the softening behavior of the human thoracic aortic media*, Journal of Biomechanics, 46 (2013), 1859-1865
- [303] Cantournet, S.; Desmorat, R.; Besson, J.: *Mullins effect and cyclic stress softening of filled elastomers by internal sliding and friction thermodynamics model*, International Journal of Solids and Structures, 46 (2009), 2255-2264
- [304] Gultova, E.; Horny, L.; Chlup, H.; Zitny, R.: *A comparison between the exponential and limiting fiber extensibility pseudo elastic model for the Mullins effect in arterial tissue*, Journal of Theoretical and Applied Mechanics, 49 (2011), 1203-1216
- [305] Diani, J.; Fayolle, B.; Gilormini, P.: *A review on the Mullins effect*, European Polymer Journal, 45 (2009), 601-612
- [306] Hanson, D.E.; Hawley, M.; Houlton, R.; Chitanvis, K.; Rae, P.; Orlor, E.B.; Wroblewski, D.A.: *Stress softening experiments in silica filled polydimethylsiloxane provide insight into a mechanism for the Mullins effect*, Polymer, 46 (2005), 10989-10995
- [307] Rigbi, Z.: *Reinforcement of rubber by carbon black*, Advances in Polymer Science, 36 (1980), 21-68
- [308] Harwood, J.A.C.; Payne, A.R.: *Stress softening in natural rubber vulcanizates. Part IV: Unfilled vulcanizates*, Journal of Applied Polymer Science, 10 (1966), 1203-1211
- [309] Harwood, J.A.C.; Mullins, L.; Payne, A.R.: *Stress softening in natural rubber vulcanizates. Part II: Stress softening effects in pure gum and filler loaded rubbers*, Journal of Applied Polymer Science, 9 (1965), 3011-3021
- [310] Pena, E.; Pena, J.A.; Doblare, M.: *On the Mullins effect and hysteresis of fibered biological materials: A comparison between continuous and discontinuous damage models*, International Journal of Solids and Structures, 46 (2009), 1727-1735
- [311] Pena, E.: *Prediction of the softening and damage effects with permanent set in fibrous biological materials*, Journal of the Mechanics and Physics of Solids, 59 (2011), 1808-1822
- [312] Pena, E.; Doblare, M.: *An anisotropic pseudo elastic approach for modelling Mullins effect in fibrous biological materials*, Mechanics Research Communications, 36 (2009), 784-790
- [313] Thorpe, C.T.; Riley, G.P.; Birch, H.L.; Clegg, P.D.; Screen, H.R.C.: *Effect of fatigue loading on structure and functional behaviour of fascicles from energy-storing tendons*, Acta Biomaterialia, 10 (2014), 3217-3224

- [314] Thorpe, C.T.; Riley, G.P.; Birch, H.L.; Clegg, P.D.; Screen, H.R.C.: *Fascicles from energy storing tendons show an age-specific response to cyclic fatigue loading*, Journal of the Royal Society Interface, 11 (2014),
- [315] van Hamel, S.E.; Bergman, H.J.; Puchalski, S.M.; de Groot, M.W.; van Weeren, P.R.: *Contrast enhanced computed tomographic evaluation of the deep digital flexor tendon in the equine foot compared to macroscopic and histological findings in 23 limbs*, Equine Veterinary Journal, 46 (2014), 300-305
- [316] Zarucco, L.; Wisner, E.R.; Swanstrom, M.D.; Stover, S.M.: *Image fusion of computed tomographic and magnetic resonance images for the development of a three dimensional musculoskeletal model of the equine forelimb*, Veterinary Radiology and Ultrasound, 47 (2006), 553-562
- [317] Khasru, M.R.; Farjana, N.; Salek, A.K.M.; Siddiq, A.B.; Haseen, F.; Azad, M.S.A.; Anwar, N.; Karim, M.A.; Rahman, S.M.: *Diagnostic accuracy of achilles tendon pathology by ultrasonography and plain x-ray*, Osteoporosis International, 27 (2016), 162-163
- [318] Martinoli, C.; Derchi, L.E.; Pastorino, C.; Bertolotto, M.; Silvestri, E.: *Analysis of echotexture of tendons with us*, Radiology, 186 (1993), 839-843
- [319] Nicoll, R.G.; Wood, A.K.W.; Rothwell, T.L.W.: *Ultrasonographical and pathological studies of equine superficial digital flexor tendons: Initial observations, including tissue characterization by analysis of image gray scale, in a thoroughbred gelding*, Equine Veterinary Journal, 24 (1992), 318-320
- [320] Rantanen, N.W.: *The use of diagnostic ultrasound in limb disorders of the horse: A preliminary report*, Journal of Equine Veterinary Science, 2 (1982), 62-64
- [321] Genovese, R.L.; Rantanen, N.W.; Hauser, M.L.; Simpson, B.S.: *Diagnostic ultrasonography of equine limbs*, Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 2 (1986), 145-226
- [322] Denoix, J.M.; Perrot, P.; Bousseau, B.; Crevier, N.: *Apport de l'échographie dans le diagnostic des affections articulaires chez le cheval*, Pratique Vétérinaire Equine, 26 (1994), 197-206
- [323] Craychee, T.J.: *Ultrasonographic evaluation of equine musculoskeletal injury*, Veterinary Diagnostic Ultrasound, Veterinary World, Philadelphia, (1995)
- [324] Meghoulfel, A.; Cloutier, G.; Crevier-Denoix, N.; de Guise, J.A.: *Tissue characterization of equine tendons with clinical B-scan images using a shock filter thinning algorithm*, Transactions on Medical Imaging, 30 (2011), 597-605
- [325] Denoix, J.M.; Busoni, V.: *Ultrasonographic anatomy of the accessory ligament of the superficial digital flexor tendon in horses*, Equine Veterinary Journal, 31 (1999), 186-191
- [326] Gillis, C.; Meagher, D.M.; Cloninger, A.; Locatelli, L.; Willits, N.: *Ultrasonographic cross-sectional area and mean echogenicity of the superficial and deep digital flexor tendons in 50 trained thoroughbred racehorses*, American Journal of Veterinary Research, 56 (1995), 1265-1269
- [327] Glatzel, P.; Berg, R.: *Atlas der Ultraschalluntersuchung beim Pferd*, Schlütersche, Hannover, (2011)

- [328] Crevier-Denoix, N.; Ruel, Y.; Dardillat, C.; Jerbi, H.; Sanaa, M.; Collobert-Laugier, C.; Ribot, X.; Denoix, J.M.; Pourcelot, P.: *Correlations between mean echogenicity and material properties of normal and diseased equine superficial digital flexor tendons: An in vitro segmental approach*, Journal of Biomechanics, 38 (2005), 2212-2220
- [329] Meghoufel, A.; Cloutier, G.; Crevier-Denoix, N.; de Guise, J.A.: *Ultrasound B-scan image simulation, segmentation, and analysis of the equine tendon*, Medical Physics, 37 (2010), 1038-1046
- [330] van Schie, H.T.M.; Bakker, E.M.; Jonker, A.M.; van Weeren, P.R.: *Ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of gray level statistics*, American Journal of Veterinary Research, 61 (2000), 210-219
- [331] Micklethwaite, L.; Wood, A.K.W.; Sehgal, C.M.; Polansky, M.; Dowling, B.A.; Dart, A.J.; Rose, R.J.; Hodgson, D.R.: *Use of quantitative analysis of sonographic brightness for detection of early healing of tendon injury in horses*, American Journal of Veterinary Research, 62 (2001), 1320-1327
- [332] Mountford, D.R.; Smith, R.K.W.; Patterson-Kane, J.C.: *Mesenchymal stem cell treatment of suspensory ligament branch desmitis: Post mortem findings in a 10 year old russian warmblood gelding - a case report*, Pferdeheilkunde, 22 (2006), 559-563
- [333] van Schie, H.T.M.; Bakker, E.M.; Jonker, A.M.; van Weeren, P.R.: *Efficacy of computerized discrimination between structure-related and non-structure-related echoes in ultrasonographic images for the quantitative evaluation of the structural integrity of superficial digital flexor tendons in horses*, American Journal of Veterinary Research, 62 (2001), 1159-1166
- [334] Scharner, D.: *Ultrasonographic evaluation of the palmar (plantar) aspect of the equine pastern region: 1. Ultrasonographic anatomy*, Pferdeheilkunde, 14 (1998), 209-218
- [335] Miles, C.A.; Fursey, G.A.J.; Birch, H.L.; Young, R.D.: *Factors affecting the ultrasonic properties of equine digital flexor tendons*, Ultrasound in Medicine and Biology, 22 (1996), 907-915
- [336] Garcia, T.; Hornof, W.J.; Insana, M.F.: *On the ultrasonic properties of tendon*, Ultrasound in Medicine and Biology, 29 (2003), 1787-1797
- [337] Bachmann, C.E.; Gruber, G.; Konermann, W.; Arnold, A.; Gruber, G.M.; Ueberle, F.: *ESWT und Sonographie der Stütz- und Bewegungsorgane*, Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, (1999)
- [338] Nicoll, R.G.; Wood, A.K.W.; Martin, I.C.A.: *Ultrasonographic observations of the flexor tendons and ligaments of the metacarpal region of horses*, American Journal of Veterinary Research, 54 (1993), 502-506
- [339] Sohn, C.; Baier, P.M.: *Ultraschall in Gynäkologie und Geburtshilfe*, Thieme, Stuttgart, (2013)
- [340] Delorme, S.; Debus, J.: *Ultraschalldiagnostik verstehen, lernen und anwenden*, Hippokrates Verlag, Stuttgart, (1998)
- [341] Zoller, W.G.: *Einführung in die Ultraschalldiagnostik*, Karger, Basel, (1994)

- [342] Rantanen, N.W.; Hauser, M.L.; Genovese, R.L.: *Superficial digital flexor tendinitis; Diagnosis using real-time ultrasound imaging* Journal of Equine Veterinary Science 5(1985), 115-119
- [343] Fahie, M.A.: *Healing, diagnosis, repair, and rehabilitation of tendon conditions*, Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 35 (2005), 1195-1211
- [344] Wood, A.K.W.; Newell, W.H.; Borg, R.P.: *An ultrasonographic offset system for examination of equine tendons and ligaments*, American Journal of Veterinary Research, 52 (1991), 1945-1947
- [345] Schmidt, G.; Görg, C.: *Kursbuch Ultraschall: Nach den Richtlinien der DEGUM und der KBV*, Thieme, Stuttgart, (2015)
- [346] Markl, G.; Marks, M.: *Minerale und Gesteine: Mineralogie - Petrologie - Geochemie*, Springer Spektrum, Berlin, (2015)
- [347] Ning, L.; Zhang, Y.; Chen, X.; Luo, J.; Li, X.; Yang, Z.; Qin, T.: *Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 100 (2012), 1448-1456
- [348] Caliari, S.R.; Harley, B.A.C.: *The effect of anisotropic collagen-GAG scaffolds and growth factor supplementation on tendon cell recruitment, alignment, and metabolic activity*, Biomaterials, 32 (2011), 5330-5340
- [349] Derwin, K.; Androjna, C.; Spencer, E.; Safran, O.; Bauer, T.W.; Hunt, T.; Caplan, A.; Iannotti, J.: *Porcine small intestine submucosa as a flexor tendon graft*, Clinical Orthopaedics and Related Research (2004), 245-252
- [350] Majima, T.; Funakoshi, T.; Iwasaki, N.; Yamane, S.T.; Harada, K.; Nonaka, S.; Minami, A.; Nishimura, S.I.: *Alginate and chitosan polyion complex hybrid fibers for scaffolds in ligament and tendon tissue engineering*, Journal of Orthopaedic Science, 10 (2005), 302-307
- [351] Sahoo, S.; Toh, S.L.; Goh, J.C.H.: *A bFGF-releasing silk/PLGA-based biohybrid scaffold for ligament/tendon tissue engineering using mesenchymal progenitor cells*, Biomaterials, 31 (2010), 2990-2998
- [352] Youngstrom, D.W.; Barrett, J.G.; Jose, R.R.; Kaplan, D.L.: *Functional characterization of detergent decellularized equine tendon extracellular matrix for tissue engineering applications*, PLOS ONE, 8 (2013),
- [353] Keane, T.J.; Londono, R.; Turner, N.J.; Badylak, S.F.: *Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response*, Biomaterials, 33 (2012), 1771-1781
- [354] Teebken, O.E.; Kofidis, T.; Akhyari, P.; Haverich, A.: *Tissue-Engineering ist mehr als nur Gewebezüchtung*, Zentralblatt für Chirurgie, 132 (2007), 236-246
- [355] Fu, R.; Wang, Y.; Liu, S.; Shih, T.; Lin, H.; Chen, Y.; Sung, J.; Lu, C.; Wei, J.; Wang, Z.; Huang, S.; Tsai, C.; Shyu, W.; Lin, S.: *Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering*, Cell Transplantation, 23 (2014), 621-630
- [356] Crapo, P.M.; Gilbert, T.W.; Badylak, S.F.: *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*, Biomaterials, 32 (2011), 3233-3243
- [357] Badylak, S.F.: *Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction*, Transplant Immunology, 12 (2004), 367-377

- [358] Chen, F.; Yoo, J.J.; Atala, A.: *Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair*, *Urology*, 54 (1999), 407-410
- [359] Dellgren, G.; Eriksson, M.; Brodin, L.A.; Radegran, K.: *The extended biocor stentless aortic bioprosthesis. Early clinical experience*, *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 33 (1999), 259-264
- [360] Harper, C.: *Permacol: Clinical experience with a new biomaterial*, *Hospital Medicine*, 62 (2001), 90-95
- [361] Kolker, A.R.; Brown, D.J.; Redstone, J.S.; Scarpinato, V.M.; Wallack, M.K.: *Multilayer reconstruction of abdominal wall defects with acellular dermal allograft (AlloDerm) and component separation*, *Annals of Plastic Surgery*, 55 (2005), 36-41
- [362] Lee, M.S.: *Graftjacket augmentation of chronic achilles tendon ruptures*, *Orthopedics*, 27 (2004), 151-153
- [363] Wainwright, D.J.: *Use of an acellular allograft dermal matrix (alloderm) in the management of full-thickness burns*, *Burns*, 21 (1995), 243-248
- [364] Bader, A.; Schilling, T.; Teebken, O.E.; Brandes, G.; Herden, T.; Steinhoff, G.; Haverich, A.: *Tissue engineering of heart valves - human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 14 (1998), 279-284
- [365] Booth, C.; Korossis, S.A.; Wilcox, H.E.; Watterson, K.G.; Kearney, J.N.; Fisher, J.; Ingham, E.: *Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: Development and histological characterization of an acellular porcine scaffold*, *Journal of Heart Valve Disease*, 11 (2002), 457-462
- [366] Grauss, R.W.; Hazekamp, M.G.; Oppenhuizen, F.; van Munsteren, C.J.; Gittenberger-de Groot, A.C.; DeRuijter, M.C.: *Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods*, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 27 (2005), 566-571
- [367] Kasimir, M.T.; Rieder, E.; Seebacher, G.; Silberhumer, G.; Wolner, E.; Weigel, G.; Simon, P.: *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves*, *International Journal of Artificial Organs*, 26 (2003), 421-427
- [368] Korossis, S.A.; Booth, C.; Wilcox, H.E.; Watterson, K.G.; Kearney, J.N.; Fisher, J.; Ingham, E.: *Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: Biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves*, *Journal of Heart Valve Disease*, 11 (2002), 463-471
- [369] Rieder, E.; Kasimir, M.T.; Silberhumer, G.; Seebacher, G.; Wolner, E.; Simon, P.; Weigel, G.: *Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells*, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 127 (2004), 399-405
- [370] Schenke-Layland, K.; Vasilevski, O.; Opitz, F.; Konig, K.; Riemann, I.; Halbhuber, K.J.; Wahlers, T.; Stock, U.A.: *Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves*, *Journal of Structural Biology*, 143 (2003), 201-208
- [371] Conklin, B.S.; Richter, E.R.; Kreutziger, K.L.; Zhong, D.S.; Chen, C.: *Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft*, *Medical Engineering and Physics*, 24 (2002), 173-183

- [372] Dahl, S.L.M.; Koh, J.; Prabhakar, V.; Niklason, L.E.: *Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation*, Cell Transplantation, 12 (2003), 659-666
- [373] Schmidt, C.E.; Baier, J.M.: *Acellular vascular tissues: Natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering*, Biomaterials, 21 (2000), 2215-2231
- [374] Uchimura, E.; Sawa, Y.; Taketani, S.; Yamanaka, Y.; Hara, M.; Matsuda, H.; Miyake, J.: *Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol)*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 67 (2003), 834-837
- [375] Chen, R.N.; Ho, H.O.; Tsai, Y.T.; Sheu, M.T.: *Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications*, Biomaterials, 25 (2004), 2679-2686
- [376] Hudson, T.W.; Liu, S.Y.; Schmidt, C.E.: *Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing*, Tissue Engineering, 10 (2004), 1346-1358
- [377] Kim, B.S.; Yoo, J.J.; Atala, A.: *Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 68 (2004), 201-209
- [378] Borschel, G.H.; Dennis, R.G.; Kuzon, W.M.: *Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold*, Plastic and Reconstructive Surgery, 113 (2004), 595-602
- [379] Cartmell, J.S.; Dunn, M.G.: *Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties*, Journal of Biomedical Materials Research, 49 (2000), 134-140
- [380] Pridgen, B.C.; Woon, C.Y.L.; Kim, M.; Thorfinn, J.; Lindsey, D.; Hung, P.; Chang, J.: *Flexor tendon tissue engineering: Acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility*, Tissue Engineering Part C: Methods, 17 (2011), 819-828
- [381] Raghavan, S.S.; Woon, C.Y.L.; Kraus, A.; Megerle, K.; Choi, M.S.S.; Pridgen, B.C.; Pham, H.; Chang, J.: *Human flexor tendon tissue engineering: Decellularization of human flexor tendons reduces immunogenicity in vivo*, Tissue Engineering Part A, 18 (2012), 796-805
- [382] Xing, S.; Liu, C.; Xu, B.; Chen, J.; Yin, D.; Zhang, C.: *Effects of various decellularization methods on histological and biomechanical properties of rabbit tendons*, Experimental and Therapeutic Medicine, 8 (2014), 628-634
- [383] Martinello, T.; Bronzini, I.; Volpin, A.; Vindigni, V.; Maccatrozzo, L.; Caporale, G.; Bassetto, F.; Patrino, M.: *Successful recellularization of human tendon scaffolds using adipose derived mesenchymal stem cells and collagen gel*, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 8 (2014), 612-619
- [384] Lee, K.I.; Lee, J.S.; Kim, J.G.; Kang, K.T.; Jang, J.W.; Shim, Y.B.; Moon, S.H.: *Mechanical properties of decellularized tendon cultured by cyclic straining bioreactor*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 101 (2013), 3152-3158
- [385] Woods, T.; Gratzer, P.F.: *Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft*, Biomaterials, 26 (2005), 7339-7349

- [386] Badylak, S.F.; Lantz, G.C.; Coffey, A.; Geddes, L.A.: *Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog*, Journal of Surgical Research, 47 (1989), 74-80
- [387] Badylak, S.F.; Tullius, R.; Kokini, K.; Shelbourne, K.D.; Klootwyk, T.; Voytik, S.L.; Kraine, M.R.; Simmons, C.: *The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for achille's tendon repair in a dog model*, Journal of Biomedical Materials Research, 29 (1995), 977-985
- [388] Kropp, B.P.: *Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute*, Urology, 46 (1995), 396-400
- [389] Freytes, D.O.; Badylak, S.F.; Webster, T.J.; Geddes, L.A.; Rundell, A.E.: *Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds*, Biomaterials, 25 (2004), 2353-2361
- [390] Gilbert, T.W.; Stolz, D.B.; Biancaniello, F.; Simmons-Byrd, A.; Badylak, S.F.: *Production and characterization of ECM powder: Implications for tissue engineering applications*, Biomaterials, 26 (2005), 1431-1435
- [391] Lin, P.; Chan, W.C.W.; Badylak, S.F.; Bhatia, S.N.: *Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering*, Tissue Engineering, 10 (2004), 1046-1053
- [392] Gilbert, T.W.; Sellaro, T.L.; Badylak, S.F.: *Decellularization of tissues and organs*, Biomaterials, 27 (2006), 3675-3683
- [393] Lutolf, M.P.; Hubbell, J.A.: *Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering*, Nature Biotechnology, 23 (2005), 47-55
- [394] Burk, J.; Erbe, I.; Berner, D.; Kacza, J.; Kasper, C.; Pfeiffer, B.; Winter, K.; Brehm, W.: *Freeze-thaw cycles enhance decellularization of large tendons*, Tissue Engineering Part C-Methods, 20 (2014), 276-284
- [395] De Filippo, R.E.; Yoo, J.J.; Atala, A.: *Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices*, Journal of Urology, 168 (2002), 1789-1792
- [396] Grauss, R.W.; Hazekamp, M.G.; van Vliet, S.; Gittenberger-de Groot, A.C.; DeRuiter, M.C.: *Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling*, Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 126 (2003), 2003-2010
- [397] Jackson, D.W.; Grood, E.S.; Arnoczky, S.P.; Butler, D.L.; Simon, T.M.: *Cruciate reconstruction using freeze dried anterior cruciate ligament allograft and a ligament augmentation device (LAD). An experimental study in a goat model*, American Journal of Sports Medicine, 15 (1987), 528-538
- [398] Jackson, D.W.; Grood, E.S.; Arnoczky, S.P.; Butler, D.L.; Simon, T.M.: *Freeze dried anterior cruciate ligament allografts. Preliminary studies in a goat model*, American Journal of Sports Medicine, 15 (1987), 295-303
- [399] Jackson, D.W.; Grood, E.S.; Wilcox, P.; Butler, D.L.; Simon, T.M.; Holden, J.P.: *The effects of processing techniques on the mechanical properties of bone anterior cruciate ligament bone allografts. An experimental study in goats*, American Journal of Sports Medicine, 16 (1988), 101-105

- [400] Jackson, D.W.; Windler, G.E.; Simon, T.M.: *Intraarticular reaction associated with the use of freeze dried, ethylene oxide sterilized bone patella tendon bone allografts in the reconstruction of the anterior cruciate ligament*, American Journal of Sports Medicine, 18 (1990), 1-11
- [401] Roberts, T.S.; Drez, D.; McCarthy, W.; Paine, R.: *Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts - 2 year results in 36 patients*, American Journal of Sports Medicine, 19 (1991), 35-41
- [402] Gulati, A.K.: *Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve*, Journal of Neurosurgery, 68 (1988), 117-123
- [403] Reing, J.E.; Brown, B.N.; Daly, K.A.; Freund, J.M.; Gilbert, T.W.; Hsiong, S.X.; Huber, A.; Kullas, K.E.; Tottey, S.; Wolf, M.T.; Badylak, S.F.: *The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds*, Biomaterials, 31 (2010), 8626-8633
- [404] Vavken, P.; Joshi, S.; Murray, M.M.: *TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering*, Journal of Orthopaedic Research, 27 (2009), 1612-1618
- [405] Elder, B.D.; Eleswarapu, S.V.; Athanasiou, K.A.: *Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs*, Biomaterials, 30 (2009), 3749-3756
- [406] Gamba, P.G.; Conconi, M.T.; Lo Piccolo, R.; Zara, G.; Spinazzi, R.; Parnigotto, P.P.: *Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix*, Pediatric Surgery International, 18 (2002), 327-331
- [407] McFetridge, P.S.; Daniel, J.W.; Bodamyali, T.; Horrocks, M.; Chaudhuri, J.B.: *Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 70 (2004), 224-234
- [408] Teebken, O.E.; Bader, A.; Steinhoff, G.; Haverich, A.: *Tissue engineering of vascular grafts: Human cell seeding of decellularised porcine matrix*, European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 19 (2000), 381-386
- [409] Courtman, D.W.; Pereira, C.A.; Kashef, V.; McComb, D.; Lee, J.M.; Wilson, G.J.: *Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: Biochemical and mechanical effects of cell extraction*, Journal of Biomedical Materials Research, 28 (1994), 655-666
- [410] Fung, Y.C.B.: *Elasticity of soft tissues is simple elongation*, American Journal of Physiology, 213 (1967), 1532-1544
- [411] Natali, A.N.; Carniel, E.L.; Pavan, P.G.; Sander, F.G.; Dorow, C.; Geiger, M.: *A visco-hyperelastic-damage constitutive model for the analysis of the biomechanical response of the periodontal ligament*, Journal of Biomechanical Engineering, 130 (2008),
- [412] Pena, E.; Calvo, B.; Martinez, M.A.; Doblare, M.: *An anisotropic visco hyperelastic model for ligaments at finite strains. Formulation and computational aspects*, International Journal of Solids and Structures, 44 (2007), 760-778
- [413] Ciarletta, P.; Dario, P.; Micera, S.: *Pseudo hyperelastic model of tendon hysteresis from adaptive recruitment of collagen type I fibrils*, Biomaterials, 29 (2008), 764-770

- [414] Grytz, R.; Meschke, G.: *Constitutive modeling of crimped collagen fibrils in soft tissues*, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2 (2009), 522-533
- [415] Saleeb, A.F.; Trowbridge, D.A.; Wilt, T.E.; Marks, J.R.; Vesely, Ivan: *Dynamic pre-processing software for the hyperviscoelastic modeling of complex anisotropic biological tissue materials*, Advances in Engineering Software, 37 (2006), 609-623
- [416] Spencer, A.J.M.: *Continuum theory of the mechanics of fibre-reinforced composites*, Springer, Wien, (1984)
- [417] Holzapfel, G.A.: *Nonlinear solid mechanics*, Wiley, Kanada, (2000)
- [418] Earmme, Y.; Choi, S.T.; Shin, H.: *Anisotropic and isotropic elasticity, and its equivalence for singularity, interface and crack in bimetals and trimetals*, Advances in Fracture and Failure Prevention, 261-263 (2004), 23-32
- [419] Cheng, T.; Gan, R.Z.: *Experimental measurement and modeling analysis on mechanical properties of tensor tympani tendon*, Medical Engineering and Physics, 30 (2008), 358-366
- [420] Hart, R.T.; Hennebel, V.V.; Thongpreda, N.; Vanbuskirk, W.C.; Anderson, R.C.: *Modeling the biomechanics of the mandible: A three-dimensional finite element study*, Journal of Biomechanics, 25 (1992), 261-286
- [421] Tang, C.Y.; Ng, G.Y.F.; Wang, Z.W.; Tsui, C.P.; Zhang, G.: *Parameter optimization for the visco-hyperelastic constitutive model of tendon using FEM*, Bio-Medical Materials and Engineering, 21 (2011), 9-24
- [422] Ogden, R.W.: *Large deformation isotropic elasticity: On the correlation of theory and experiment for compressible rubberlike solids*, Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, 328 (1972), 567-588
- [423] Bradley, G.L.; Chang, P.C.; McKenna, G.B.: *Rubber modeling using uniaxial test data*, Journal of Applied Polymer Science, 81 (2001), 837-848
- [424] Haut, R.C.; Powlison, A.C.: *The effects of test environment and cyclic stretching on the failure properties of human patellar tendons*, Journal of Orthopaedic Research, 8 (1990), 532-540
- [425] Lam, T.C.; Thomas, C.G.; Shrive, N.G.; Frank, C.B.; Sabiston, C.P.: *The effects of temperature on the viscoelastic properties of the rabbit in medial collateral ligament*, Journal of Biomechanical Engineering, 112 (1990), 147-152
- [426] Wilson, A.M.: *An environment chamber for soft tissue testing*, American Society of Mechanical Engineers, 29 (1995), 255-256
- [427] Schöler, K.; Christ, J.H.: *Servohydraulische Prüfsysteme vergleichen. Untersuchungen zum Regelverhalten*, Zeitschrift Materialprüfung, 38 (1996), 488-492
- [428] Riemersa, D.J.; Schamhardt, H.C.: *The cryo jaw, a clamp designed for in vitro rheology studies of horse digital flexor tendons*, Journal of Biomechanics, 15 (1982), 619-620
- [429] Morelli, F.; Ferretti, A.; Conteduca, F.; Nanni, F.; Monteleone, L.; Valente, M.: *A modified cryo-jaw for in vitro biomechanical testing of tendons*, Journal of Applied Biomechanics, 18 (2002), 384-389

- [430] Bowser, J.E.; Elder, S.H.; Rashmir-Raven, A.M.; Swiderski, C.E.: *A cryogenic clamping technique that facilitates ultimate tensile strength determinations in tendons and ligaments*, Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology, 24 (2011), 370-373
- [431] Arnold, G.: *Mechanical properties of tendons*, Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, 66 (1971), 499-504
- [432] Abrahams, M.: *Mechanical behaviour of tendon in vitro - A preliminary report*, Medical and Biological Engineering, 5 (1967), 433-443
- [433] Benedict, J.V.; Walker, L.B.; Harris, E.H.: *Stress-strain characteristics and tensile strength of unembalmed human tendon*, Journal of biomechanics, 1 (1968), 53-63
- [434] Blanton, P.L.; Biggs, N.L.: *Ultimate tensile strength of fetal and adult human tendons*, Journal of Biomechanics, 3 (1970), 181-184
- [435] Glogowski, G.; Prestele, D.: *Experimental tendon rupture demonstrated on the tendons of the caput longum of the biceps brachii muscle*, Zeitschrift fur Orthopadie und ihre Grenzgebiete, 107 (1970), 711-716
- [436] Viidik, A.: *Tensile strength properties of achilles tendon systems in trained and untrained rabbits*, Acta Orthopaedica Scandinavica, 40 (1969), 261-272
- [437] Moncur, M.W.: *Shrinkage of plant material during critical point drying*, Scanning, 2 (1979), 175-177
- [438] Boyde, A.; Boyde, S.: *Further studies of specimen volume changes during processing for SEM: Including some plant tissue*, Scanning Electron Microscopy (1980), 117-124
- [439] Beckett, A.; Read, N.D.; Porter, R.: *Variations in fungal spore dimensions in relation to preparatory techniques for light-microscopy and scanning electron-microscopy*, Journal of Microscopy, 136 (1984), 87-95
- [440] Ho, L.T.Y.; Harris, A.M.; Tanioka, H.; Yagi, N.; Kinoshita, S.; Caterson, B.; Quantock, A.J.; Young, R.D.; Meek, K.M.: *A comparison of glycosaminoglycan distributions, keratan sulphate sulphation patterns and collagen fibril architecture from central to peripheral regions of the bovine cornea*, Matrix Biology, 38 (2014), 59-68
- [441] Moeller, H.D.; Bosch, U.; Decker, B.: *Collagen fibril diameter distribution in patellar tendon autografts after posterior cruciate ligament reconstruction in sheep: Changes over time*, Journal of Anatomy, 187 (1995), 161-167
- [442] Williams, I.F.; Craig, A.S.; Parry, D.A.D.; Goodship, A.E.; Shah, J.; Silver, I.A.: *Development of collagen fibril organization and collagen crimp patterns during tendon healing*, International Journal of Biological Macromolecules, 7 (1985), 275-282
- [443] Goh, K.L.; Aspden, R.M.; Mathias, K.J.; Hukins, D.W.L.: *Finite element analysis of the effect of material properties and fibre shape on stresses in an elastic fibre embedded in an elastic matrix in a fibre composite material*, Proceedings of the Royal Society A: Mathematical Physical and Engineering Sciences, 460 (2004), 2339-2352
- [444] Wang, X.T.; Ker, R.F.; Alexander, R.M.: *Fatigue rupture of wallaby tail tendons*, Journal of Experimental Biology, 198 (1995), 847-852

- [445] Haut, T.L.; Haut, R.C.: *The state of tissue hydration determines the strain rate sensitive stiffness of human patellar tendon*, Journal of Biomechanics, 30 (1997), 311-311
- [446] Marsch, F.; Marsch, D.: *Physik für Pflegeberufe*, Thieme, Stuttgart, (1999)
- [447] Cherdchutham, W.; Meershoek, L.S.; van Weeren, P.R.; Barneveld, A.: *Effects of exercise on biomechanical properties of the superficial digital flexor tendon in foals*, American Journal of Veterinary Research, 62 (2001), 1859-1864
- [448] Silver, W.P.; Creighton, R.A.; Triantafillopoulos, I.K.; Devkota, A.C.; Weinhold, P.S.; Karas, S.G.: *Thermal microdebridement does not affect the time zero biomechanical properties of human patellar tendons*, American Journal of Sports Medicine, 32 (2004), 1946-1952
- [449] Dowling, B.A.; Dart, A.J.; Hodgson, D.R.; Rose, R.J.; Walsh, W.R.: *The effect of recombinant equine growth hormone on the biomechanical properties of healing superficial digital flexor tendons in horses*, Veterinary Surgery, 31 (2002), 320-324
- [450] Kumar, N.; Sharma, A.K.; Kumar, S.: *Carbon fibers and plasma-preserved tendon allografts for gap repair of flexor tendon in bovines: Gross, microscopic and scanning electron microscopic observations*, Journal of the American Veterinary Medical Association, 49 (2002), 269-276
- [451] El-Shafaey, E.A.; Karrouf, G.I.; Zaghloul, A.E.: *Clinical and biomechanical evaluation of three bioscaffold augmentation devices used for superficial digital flexor tenorrhaphy in donkeys (equus asinus): An experimental study*, Journal of Advanced Research, 4 (2013), 103-113
- [452] Crowson, C.L.; Jann, H.W.; Stein, L.E.; Claypool, L.P.; Moll, H.D.; Blaik, M.A.: *Quantitative effect of tenorrhaphy on intrinsic vasculature of the equine superficial digital flexor tendon*, American Journal of Veterinary Research, 65 (2004), 279-282
- [453] Crevier-Denoix, N.; Pourcelot, P.; Ravary, B.; Robin, D.; Falala, S.; Uzel, S.; Grison, A.C.; Valette, J.P.; Denoix, J.M.; Chateau, H.: *Influence of track surface on the equine superficial digital flexor tendon loading in two horses at high speed trot*, Equine Veterinary Journal, 41 (2009), 257-261
- [454] Jarvinen, T.A.H.; Jarvinen, T.L.N.; Kannus, B.B.; Jozsa, L.; Jarvinen, M.: *Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle*, Journal of Orthopaedic Research, 22 (2004), 1303-1309
- [455] Jozsa, L.G.; Reffy, A.; Balint, J.B.: *Polarization and electron microscopy studies on the collagen of intact and ruptured human tendons*, Acta Histochemica, 74 (1984), 209-215
- [456] Nicholls, S.P.; Gathercole, L.J.; Keller, A.; Shah, J.S.: *Crimping in rat tail tendon collagen: Morphology and transverse mechanical anisotropy*, International Journal of Biological Macromolecules, 5 (1983), 283-288
- [457] Nicholls, S.P.; Gathercole, L.J.; Shah, J.S.: *Morphology of human palmaris longus tendon*, Annals of the Rheumatic Diseases, 43 (1984), 477-482
- [458] Riemersma, D.J.; van den Bogert, A.J.: *A method to estimate the initial length of equine tendons*, Acta Anatomica, 146 (1993), 120-122
- [459] Fackelman, G.E.: *The nature of tendon damage and its repair*, Equine Veterinary Journal, 5 (1973), 141-149

- [460] Sese, M.; Ueda, H.; Watanabe, T.; Yamamoto, E.; Hosaka, Y.; Tangkawattana, P.; Takehana, K.: *Characteristics of collagen fibrils in the entire equine superficial digital flexor tendon*, Okajimas Folia Anatomica Japonica, 84 (2007), 111-114
- [461] Souza, M.V.; van Weeren, P.R.; van Schie, H.T.M.; van de Lest, C.H.A.: *Regional differences in biochemical, biomechanical and histomorphological characteristics of the equine suspensory ligament*, Equine Veterinary Journal, 42 (2010), 611-620
- [462] Hammer, N.; Huster, D.; Fritsch, S.; Haedrich, C.; Koch, H.; Schmidt, P.; Sichtung, F.; Wagner, M.; Boldt, A.: *Do cells contribute to tendon and ligament biomechanics?*, PLOS ONE, 9 (2014),

8 Anhang

Übersicht der verwendeten Versuchsproben

Pferd	Probennummer	Entnahmedatum	Rasse	Alter	Geschlecht
1	S9/S10	10.10.2013	Pinto Hunter	14	Wallach
2	S11/S12	18.10.2013	Dt Reitpony	16	Stute
3	S13/S14	12.12.2013	Trakehner	13	Wallach
4	S15/S16	16.12.2013	Hannoveraner	4	Stute
5	S17/S18	17.12.2013	Dt Sportpferde	7	Wallach
6	S19/S20	26.03.2013	Dt Sportpferde	14	Wallach
7	S21/S22	10.12.2015	Hannoveraner	14	Wallach
8	S23/S24	14.12.2015	Lewitzer	4	Stute
9	S25/S26	09.01.2015	Warmblut	16	Wallach