

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie**

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Winkelmann-

**Immobilisation nach elektrothermischem Shrinkage
kollagenhaltigen Gewebes - histologische Auswertung
einer in-vivo Tierversuchsstudie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Kümpers, Philipp

aus Steinfurt

2005

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Wolfgang Pötzl

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med Tim J. Filler

Tag der mündlichen Prüfung:

31.08.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Winkelmann-

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Wolfgang Pötzl

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med Tim J. Filler

ZUSAMMENFASSUNG

Immobilisation nach elektrothermischem Shrinkage kollagenhaltigen Gewebes -
histologische Auswertung einer in-vivo Tierversuchsstudie

Kümpers, Philipp

In dieser Studie wurden die Ligg. patellae von 66 Kaninchen mittels Radiofrequenz (RF)-Energie verkürzt und postoperativ unterschiedlich lange immobilisiert. Ziel war es, erstmals die Auswirkungen einer postoperativen Immobilisation nach RF-Behandlung histologisch zu untersuchen.

Die Evaluation der Sehnenheilung erfolgte überwiegend durch Polarisationsmikroskopie, Immunhistologie und TUNEL-Labeling. Mittels computer-assistierter Bildanalyse, sowie histologischer Scores wurden die Effekte von RF-Behandlung auf Zellularität und Apoptose, extrazelluläre Matrix, Nervengewebe und Vaskularisierung untersucht.

RF-Behandlung induziert Apoptose von Fibroblasten. Immobilisation reduziert während der frühen Phase der Sehnenheilung die Hyperzellularität des Gewebes. Im histologischen Vergleich zeigen die immobilisierten Sehnen bessere Ergebnisse gegenüber den mobilen Sehnen. Von einer konsekutiv reduzierten Degradation und Neusynthese der Kollagenfasern profitiert die Gewebereifung und damit auch die biomechanische Stabilität der Sehnen.

Während der Rehabilitationsphase nach RF-Behandlung ist die biomechanische Belastbarkeit kollagenen Gewebes aufgrund aktiver Regenerationsprozesse stark beeinträchtigt. Um Rezidiven vorzubeugen, sollte eine Immobilisation für 3-6 Wochen nach dem Eingriff erwogen werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 31.08.2005

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1 Pathophysiologie der Schultergelenkinstabilität	5
1.2 Die Behandlungsoptionen der multidirektionalen Schulterinstabilität..	6
1.2.1 Konservative Therapie	6
1.2.2 Offene Operation	7
1.2.3 Arthroskopische Operation	7
1.2.4 Thermische Kapselschrumpfung	7
1.2.5 Vergleich der Behandlungsverfahren.....	8
1.3 Die Histologie von kollagenem Gewebe.....	9
1.3.1 Fibroblasten	9
1.3.2 Kollagen.....	10
1.3.3 Vaskularisierung und nutritive Versorgung	11
1.3.4 Nerven und Propriozeption	11
1.4 Technik und Grundlagen der thermischen Kapselschrumpfung	13
1.4.1 Technische Grundlagen der Elektrochirurgie.....	13
1.4.2 RF-Energie verändert die molekulare Architektur der Kollagenfasern .	13
1.4.3 Morphologische Veränderungen des kollagenen Gewebes.....	15
1.4.4 Thermisch behandeltes Gewebe ist biomechanische geschwächt.....	15
1.4.5 Propriozeptive Defizite werden durch operative Intervention reduziert	16
1.5 Physiology der Wundheilung von Sehnen und Ligamenten	16
1.6 Vor- und Nachteile der postoperativen Immobilisation	17
1.7 Untersuchungsziel	18
2. MATERIAL UND METHODE	20
2.1 Versuchstiere.....	20
2.1.1 Versuchsgruppen.....	21
2.1.2 Kontrollgruppe	21
2.2 Einschlusskriterien	21
2.2.1 Operationsvoraussetzungen	21

2.3 Operationsmethode.....	22
2.3.1 Anästhesie	22
2.3.2 Einbringen der Kirschnerdrähte	23
2.3.3 ETACS.....	25
2.4 Immobilisationsmethode	27
2.5 Postoperative Überwachung und Nachsorge	29
2.6 Tötung der Tiere	29
2.7 Explantation der Sehnen und Probengewinnung.....	29
2.8 Schnittherstellung.....	31
2.9 Färbungen.....	32
2.9.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung	32
2.9.3 Polarisationsmikroskopie	34
2.9.4 Feulgen-Färbung	34
2.9.5 Apoptose (TUNEL-Labeling).....	34
2.9.6 Neurofilament (Immunhistochemie).....	36
2.10 Digitale Dokumentation und Bildanalyse	38
2.10.1 Fotodokumentation von histologischen Präparaten	38
2.10.2 Computer-gestützte Bildanalyse	39
2.11 Statistik	39
3. ERGEBNISSE	40
3.1 Fibroblasten.....	40
3.1.1 Score an Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitten.....	40
3.1.1.1 Histologische Auswertung gemäß der Beobachtungszeitpunkte... 40	40
3.1.1.2 Histologische Auswertung im zeitlichen Verlauf	43
3.1.2 Kernanzahl ermittelt durch die Feulgen-Färbung	45
3.1.3 Kernanzahl ermittelt durch Apoptose-Färbung (TUNEL-Labeling).....	47
3.2 Kollagen	50
3.2.1 Score an Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitten.....	50
3.2.1.1 Histologische Auswertung gemäß der Beobachtungszeitpunkte... 50	50
3.2.1.2 Histologische Auswertung im zeitlichen Verlauf	51
3.2.2 Score mittels Polarisationsmikroskopie.....	52
3.2.2.1 Histologische Auswertung gemäß der Beobachtungszeitpunkte... 52	52
3.2.2.2 Histologische Auswertung im zeitlichen Verlauf	55

3.3 Vaskularisierung	57
3.3.1 Kapillarenzustand	57
3.3.1.1 Score an Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitten	57
3.3.1.1.1 Histologische Auswertung gemäß der Beobachtungszeitpunkte	57
3.3.1.1.2 Histologische Auswertung im zeitlichen Verlauf.....	59
3.3.2 Kapillarendichte	61
3.3.2.1 Score an Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitten	61
3.3.2.1.1 Histologische Auswertung gemäß der Beobachtungszeitpunkte	61
3.3.2.1.2 Histologische Auswertung im zeitlichen Verlauf.....	63
3.4 Nerven	64
3.4.1 Verteilungsdichte neuronaler Areale („Spots“)	64
3.4.2 Nervenfasern	66
3.4.3 Nervenbündel	68
4. DISKUSSION	72
4.1 Zellularität und Apoptose	72
4.1.1 RF-Behandlung schädigt Fibroblasten und induziert Apoptose	72
4.1.3 Die postoperative Zellularität bestimmt die Biomechanik der Sehnen .	77
4.2 Kollagen	79
4.2.1 Deutliche Alteration der kollagenen Mikroarchitektur nach ETACS	79
4.2.2 Shrinkage beruht auf einer Entspiralisierung der Tripelhelix.....	80
4.2.4 Geschrumpftes Gewebe ist biomechanisch beeinträchtigt	81
4.2.5 Ist der Heilungsverlauf der Sehnen unter Immobilisation günstiger? ...	82
4.3 Vaskularisierung	84
4.3.1 Revaskularisierung wird durch Immobilisation beeinträchtigt.....	84
4.3.3 Revaskularisierung und Angiogenese in Sehnen	85
4.3.4 Revaskularisierung: Capsular shrinkage vs. Kreuzbandtransplantat ...	85
4.3.5 Immobilisation reduziert die Revaskularisierung	87
4.4 Innervation	87
4.4.1 Immobilisation beschleunigt die Reinnervation der Sehnen.....	87
4.4.2 Intakte Innervation leistet einen wichtigen Beitrag zur Wundheilung ...	89
4.5 Limitationen der Studie.....	91
5. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	93
6. LITERATURVERZEICHNIS	95

7. DANKSAGUNG	113
8. CURRICULUM VITAE	114
9. VERÖFFENTLICHUNGEN	116
9.1 Originalarbeiten	116
9.2 Abstracts (zitierfähig).....	117
9.3 Vorträge und Poster	117
ANHANG	I
Bildverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Tierversuchsantrag	IV

1. Einleitung

1.1 Pathophysiologie der Schultergelenkinstabilität

Hyperlaxe Kapsel- und Bandstrukturen können an vielen Gelenken für die Entstehung uni-, bi-, und multidirektionaler Gelenkinstabilität verantwortlich sein. Dabei sind die weichteil- und bandgeführten Gelenke wie Schulter-, Knie- und Sprunggelenke besonders prädestiniert. Dieser Gruppe wird entsprechend großes Interesse in der sportmedizinischen Versorgung zuteil. Ein momentaner Forschungsschwerpunkt ist das Schultergelenk, für das multidirektionale Instabilität erstmals 1980 von Neer und Foster beschrieben wurde.⁹⁴

Multidirektionale Schulterinstabilität (MDI) entsteht demnach durch repetitive Mikrotraumen, die konsekutiv eine Hyperlaxität des Kapsel- und Bandapparates hervorrufen.^{46,47,94,104,117} Hyperlaxität kann allerdings auch konstitutionell bedingt sein, oder im Rahmen von angeborenen Bindegewebserkrankungen auftreten. Die gegenwärtigen Autoren sehen Hyperlaxität zwangsläufig als Risikofaktor für glenohumerale Instabilität.^{35,46,47,95,117}

Dabei wird der Begriff „Hyperlaxität“ oft benutzt, obwohl er nur unscharf definiert ist. Gerade die Schultergelenkscapsel zeigt sehr große interindividuelle Unterschiede, so dass eine Abgrenzung zwischen physiologischen und pathologischen Zuständen bisher subjektiv vom Untersucher getroffen wird. Momentan gilt eine Schulter als hyperlax, wenn der Untersucher den Humeruskopf in anteriorer, inferiorer oder posteriorer Richtung aus der Gelenkspfanne subluxieren kann. Dieser Umstand kann als semiquantitatives Maß für Hyperlaxität gewertet werden.^{46,95,117}

Als Folge der insuffizienten Gelenkstabilisierung kommt es oft schon durch Bagatelltraumen zu rezidivierenden Subluxations- oder Luxationsereignissen, die den Patienten bei sportlicher wie alltäglicher Belastung stark einschränken.^{47,88,92} Klinisch finden sich sowohl deutliche Zeichen vorzeitigen Gelenkverschleißes als auch starke Schmerzen.²⁸ Diese sind meist chronisch

physiotherapeutischer Betreuung keine Besserung erfahren oder zu rezidivierenden Subluxationen neigen, sollte eine Operation durchgeführt werden.

1.2.2 Offene Operation

Bei der offenen Behandlung wird die Schultergelenkscapsel über einen etwa 10 cm langen transkutanen Zugang von ventral dargestellt und T-förmig inzidiert. Die neu entstandenen Kapselränder werden anschließend überlappend vernäht, und so die Kapsel verkleinert.^{94,95,130} Diese Methode des „capsular shift“ gilt noch immer als Goldstandard zur Behandlung der MDI. Altchek et al.³ sowie Cooper und Brems³⁰ erzielten Rezidivraten von ca. 10% nach zwei Jahren. Pollock et al.¹⁰⁵ operierte professionelle Überkopfsportler mit einer Rezidivrate von 30%. Steinbeck et al. operierten 20 Patienten mit anteriorer nicht-traumatischer Schulterinstabilität. Nach drei Jahren betrug die Rezidivrate 5%.¹³⁰

1.2.3 Arthroskopische Operation

Fortschritte in der arthroskopischen Schulterchirurgie haben viele Autoren dazu bewogen, die arthroskopische Kapselraffung der offenen Operation vorzuziehen.^{33,87,134,143} Dabei unterscheiden sich die Techniken je nach Autor vor allem im Detail. Generell wird die Kapsel auf arthroskopischem Wege mit Hilfe transglenoidaler Nahttechniken oder versenkbarer Knochenanker gerafft, wodurch ebenfalls das Kapselvolumen verringert wird. Duncan und Savoie³³ sowie McIntyre⁸⁷ fixierten die Kapsel mit transglenoidalen Nähten und erzielten bei ihren Patienten gute Erfolge mit Rezidivraten von 1-5% nach einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren. Wichmann und Snyder¹⁴³ berichten über eine Erfolgsrate von 80%.

1.2.4 Thermische Kapselschrumpfung

Eine unter vielen Orthopäden an Popularität gewinnende Operationsmethode ist die Applikation von Wärmeenergie durch nichtablative Radiofrequenzgeräte (ETACS= elektro-thermally assisted capsular shrinkage) oder Laser (LACS= laser-assisted capsular shrinkage).^{45,53,88,141} Prinzipiell führen beide Techniken

durch arthroskopisch applizierte Photo- (Lasengeräte) bzw. Elektrostimulation (Radiofrequenzgeräte) zu Gewebeveränderungen durch Hitzeeinwirkung. Viele Forschungsarbeiten der letzten Jahre haben zu dem Erkenntnis geführt, dass durch Wärmeapplikation die Ultrastruktur von Kollagenfasern, die als extrazelluläre Matrix (ECM) für die Stabilität von Band- und Kapselgewebe hauptverantwortlich sind, stark verändert wird. Folge dieser Hitzeeinwirkung ist eine deutliche Längenreduktion kollagener Fasern, die zur Verkleinerung der Gelenkkapsel führt.

In mehreren Kadaverstudien konnte die signifikante Reduktion der glenohumeralen, bzw. multidirektionalen Translation gezeigt werden.^{70,83,139} Savoie und Field¹¹⁹ erzielten eine Erfolgsrate von 97% nach LACS in einem Beobachtungszeitraum von 27 Monaten. Eine Studie von Favorito und Langenderfer³⁵ über Profisportler mit MDI zeigte in 81,5% der Fälle gute oder exzellente Resultate. Die bislang größte Erhebung veröffentlichten Wong et al. im Jahre 2001. Demnach mussten sich 8,3 % der ETACS- und 7,1 % der LACS-Patienten einer offenen Revisionsoperation unterziehen.¹⁴⁶ D'Allessandro³¹ et al. erhoben eine Rezidivrate von 37% im bislang längsten Nachbeobachtungszeitraum von zwischen zwei und fünf Jahren.

1.2.5 Vergleich der Behandlungsverfahren

Gemessen an den Rezidivraten, der zum Teil recht unterschiedlichen Patientenpopulationen und Beobachtungszeiträume, scheint keine der drei operativen Methode den anderen überlegen zu sein. Der große Vorteil arthroskopischer Nahttechniken, aber auch von LACS oder ETACS gegenüber den offenen Operationstechniken ist ihre minimale Invasivität. Um das Gelenk optimal einsehen zu können, werden nur drei kleine Stichinzisionen vorgenommen. Im Vergleich zur offenen Operation muss auch die früher einsetzende und schmerzfreiere Rehabilitation aller arthroskopischen Techniken gesehen werden⁸¹. Ferner erfordert eine arthroskopisch vorgenommene Kapselraffung eine große operative Expertise, die nicht in allen Abteilungen angeboten werden kann.

Im Gegensatz dazu stellen LACS oder ETACS relativ einfache Behandlungsmethoden dar.^{45,53,81,88,141} Gerade die geringeren Anschaffungs- und Betriebskosten, sowie ein einfacheres Handling von Radiofrequenzgeräten im Gegensatz zu Lasergeräten sind für die momentan große Popularität von ETACS verantwortlich.

1.3 Die Histologie von kollagenem Gewebe

Straffes Bindegewebe wie es in Bändern, Kapseln und Sehnen vorkommt erfüllt in erster Linie mechanische Aufgaben. Es besteht hauptsächlich aus parallel angeordneten Kollagenfaserbündeln. Diese werden als extrazelluläre Matrix (ECM) von Fibroblasten (sog. Flügelzellen) synthetisiert, die zwischen den Faserbündeln in Reihen angeordnet liegen. Sehnen werden von lockerem Bindegewebe umhüllt (Peritendineum externum), das zwischen die Kollagenfaserbündel der Sehne eindringt (Peritendineum internum) und dabei kleinere und größere Bündel umfasst. Entlang dieser Bindegewebssepten ziehen Nerven und Blutgefäße in die Sehne.⁶⁸

1.3.1 Fibroblasten

In jedem Bindegewebe kommen Fibroblasten und Fibrozyten vor. Das Suffix „-blast“ steht üblicherweise für Stammzellen. Fibroblast bedeutet jedoch hier, dass es sich um eine syntheseaktive Zelle handelt. Fibroblasten besitzen viele irreguläre zytoplasmatische Fortsätze. Ihre Zellkerne sind oval, groß und hell mit feinem Chromatin und deutlichem Nukleolus. Das granuläre endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat sind gut entwickelt. Fibroblasten sind sehr teilungsaktiv und befähigt, Prokollagen sowie alle anderen Bestandteile der Grundsubstanz zu synthetisieren. Ist ihre Syntheseleistung stark vermindert (Erhaltungsumsatz) werden sie Fibrozyten genannt. Diese sind eher spindelförmig, haben weniger Fortsätze sowie kleinere Zellkerne als Fibroblasten. Beide Zustandsformen gehen fließend ineinander über. Deshalb können diese Bindegewebszellen auch ohne ihre Zustandsform zu berücksichtigen allgemein als Fibroblasten bezeichnet werden. Bei Stimulation der Zellen im Rahmen von Wundheilungsprozessen,

durch mechanischen Stress und Mediatoren, resultiert eine Steigerung der Mitoserate und der Syntheseleistung, die sich morphologisch vor allem in einer Volumenzunahme der Zellkerne widerspiegelt.^{13,68}

Neben diesen beiden funktionstüchtigen Zustandsformen können syntheseinaktive Fibroblasten histologisch bzw. immunhistochemisch noch genauer differenziert werden. Dabei kann grundsätzlich zwischen Nekrose und Apoptose, zwei Hauptmechanismen für den Zelltod unterschieden werden [fawthrop]. Der klassische nekrotische Zelltod tritt vor allem nach Traumen oder Kontakt mit verschiedensten Noxen auf, während der Vorgang der Apoptose Bestandteil der physiologischen Zellregulation ist. Während Nekrose sich meist in Zellyse äußert, ist Apoptose morphologisch durch Zellschrumpfung, Kernpyknose, Chromatinkondensation und Alterationen der Plasmamembran charakterisiert.⁷²

1.3.2 Kollagen

Kollagen ist mit 30 % das absolut häufigste Protein des menschlichen Körpers. Vor allem die drei Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin sind am Aufbau der Kollagenmoleküle beteiligt.^{68,147} Kollagenfasern bestehen aus Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von 0,3 - 0,5 µm, die wiederum aus Mikrofibrillen zusammengesetzt sind. Letztere bestehen aus parallel verschobenen Tropokollagenmolekülen, die allerdings nur im Elektronenmikroskop sichtbar sind.

Die Bildung der vielfältigen Kollagenvorläufermoleküle, sowie deren posttranslationale Modifikation findet teilweise intrazellulär in den Fibro-, Osteo-, oder Chondroblasten, teilweise extrazellulär statt.^{68,102} Die Anzahl der zu einem Bündel zusammengefassten Kollagenfasern bestimmt den Durchmesser der Kollagenfaserbündel. Es werden bis zu elf Kollagentypen unterschieden, von denen die Typen I - IV am besten charakterisiert sind. Kollagen Typ I ist der häufigste aller Kollagentypen und kommt u.a. in Sehnen, Knochen und Faszien vor, wo es mit einer Zugfestigkeit von bis zu 6 kp / mm² maßgeblich für die mechanische Integrität des Gewebes verantwortlich ist.^{68,102} Bei polarisationsmikroskopischer Betrachtung erscheinen Kollagenfasern aufgrund

der über lange Strecken parallel verlaufenden Fasern einachsiger doppelbrechend (anisotrop).^{68,93}

1.3.3 Vaskularisierung und nutritive Versorgung

Obwohl Sehnen oft den bradytrophen, hypovaskularisierten Geweben zugeordnet werden, besitzen sie ein ausgeprägtes vaskuläres Netzwerk.²² Die Perfusion erfolgt durch drei verschiedene Versorgungsgebiete: Erstens durch Gefäße des Perimysiums am Übergang zwischen Muskel und Sehne, zweitens aus periostalen Gefäßen am Übergang zwischen Sehne und Knochen und drittens durch Gefäße, die aus der Sehnenscheide stammen.⁷⁴ Letztere stellen den größten Anteil am Versorgungsvolumen.^{22,25} Eine weitere gängige Nomenklatur unterscheidet zwischen intrinsischer und extrinsischer Blutversorgung. Per definitionem sind bei dieser Einteilung die Übergangszonen zu beiden Seiten der Sehne als intrinsisch, die von der Sehnenscheide versorgten Bereiche als extrinsisch versorgt anzusehen.⁷⁴ Je nach Lokalisation verlaufen sehr kleinkalibrige Arteriolen zusammen mit kleinen Nervenbündeln innerhalb der Bindegewebsscheiden des Peritendineum internum und verzweigen sich anschließend zu Kapillaren mit typischem Endothel.^{68,74} Die mechanische Integrität von Sehnen und Bändern ist abhängig von deren Perfusion.^{21,86} So existiert im Rahmen von Wundheilungsprozessen eine positive Korrelation zwischen Regenerationspotential und Perfusionsrate.^{23,69}

1.3.4 Nerven und Propriozeption

Gelenkkapseln, Sehnen und gelenknahe Bänder sind reich innervierte Gewebe mit einer Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren.^{1,48,64,97,129,138} So beeinflussen beispielsweise propriozeptive Informationen aus den Mechanorezeptoren der Schultergelenkkapsel sowie assoziierten Muskeln und Sehnen des Schultergürtels motorische Bewegungsmuster, Muskeltonus und Reflexantwort. Durch dieses Kontrollsystem können sowohl optimale Gelenkstabilität, als auch möglichst geringe Gelenkabnutzung gewährleistet werden.

Die propriozeptiven Eigenschaften freier Nervenendigungen, GOLGI-MAZZONIScher Körperchen, VATER-PACCINISchen Körperchen sowie der GOLGI-Sehnenorgane werden im folgenden kurz erläutert:

Über die Funktion freier Nervenendigungen in Sehnen wird noch spekuliert. Man nimmt an, dass sie bei Lokalisation im Bindegewebe als Mechanorezeptoren Dehnung registrieren, in direkter Assoziation mit Gefäßen eher nozi-, chemo- oder thermorezeptive Funktion besitzen.

Aus der Vielfalt der in der Literatur beschriebenen rezeptiven Lamellenkörperchen mit perineuraler Kapsel sind für die ligamentären Anteile des Bewegungsapparates vor allem die GOLGI-MAZZONI-Körperchen sowie die VATER-PACCINI-schen Körperchen von Bedeutung. Beide funktionieren überwiegend als schnell-adaptierende Beschleunigungsdetektoren, die vor allem auf Vibrationsreize reagieren.^{64,68}

GOLGI-Sehnenorgane gehören zur Gruppe der eingekapselten Rezeptoren des Bewegungsapparates und sind hauptsächlich (94%) an den Übergängen zwischen Muskulatur und Sehne lokalisiert. Die spindelförmigen Körperchen versorgen als langsam adaptierende Mechanorezeptoren zusammen mit den GOLGI-MAZZONI-Körperchen und den VATER-PACCINI-schen Körperchen die propriozeptiven Zentren des Rückenmarks mit wichtigen Grundinformationen für Steuerung und Motorik⁶⁴.

Zusätzlich zu afferenten Nervenfasern innervieren unmyelinisierte, efferente Fasern des sympathischen Nervensystems Gelenke und assoziierte Ligamente. Diese Efferenzen des vegetativen Nervensystems haben auch Einfluss auf den Tonus der artikulären Blutgefäße und regulieren so deren Flussrate bzw. deren nutritive Funktion.²⁹

Diese afferente und efferente Anbindung der Rezeptoren an das periphere und zentrale Nervensystem erfolgt sowohl über einzelne Nervenfasern (Typ III und IV) als auch strukturierte Nervenfaserbündel, deren Zytoskelett aus neurofilamentärem Tripelprotein besteht. Dieses gehört zur großen Familie der Intermediärfilamente, zu denen unter anderem auch Zytokeratin, Desmin, Gliafibrilläres saures Protein (GFAP) und Vimentin gehören.¹²¹

1.4 Technik und Grundlagen der thermischen Kapselschrumpfung

1.4.1 Technische Grundlagen der Elektrochirurgie

Seit einigen Jahren werden elektrochirurgische Verfahren verstärkt im Rahmen arthroskopischer Operationsmethoden eingesetzt. Unter Elektrochirurgie ist im weitesten Sinne jede Anwendung von (Wechsel-) Strom in der operativen Medizin zu verstehen [Bortnik]. Vor allem seit der Markteinführung bipolarer Systeme (Mitek VAPR®, siehe Kap.: 2.3.3), bei denen Aktiv- und Neutralelektrode in einer arthroskopischen Sonde integriert wurden, ist die Attraktivität der Elektrochirurgie, aufgrund präziserer Wärmeapplikation und geringerer Kollateralschäden gestiegen.^{45,53,144}

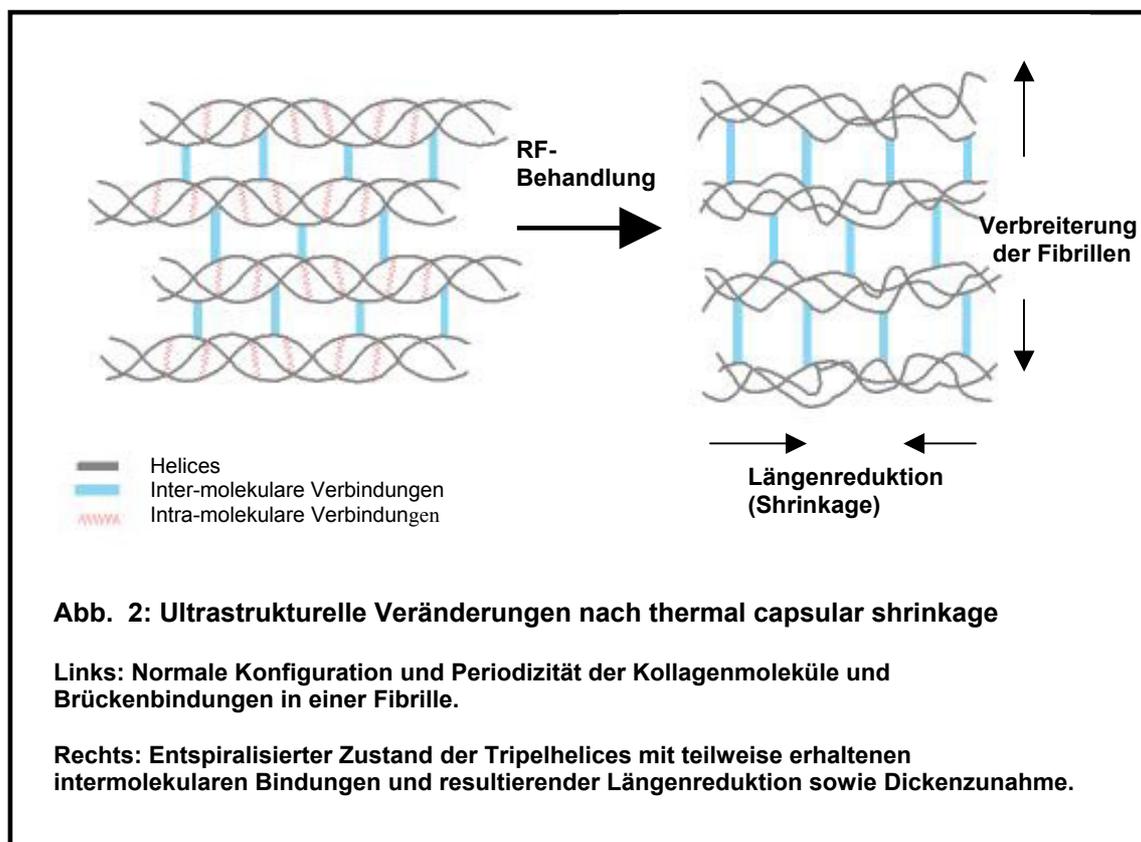
Sobald ein hochfrequenter Strom zwischen beiden Elektroden an der Sondenspitze fließt, formt sich im leitendem Medium (NaCl-Spüllösung) ein scharf definiertes Plasmafeld (ca. 75 °C), bestehend aus ionisierten Teilchen. Organisch-molekulare Verbindungen werden bei direktem Kontakt schrittweise desintegriert ohne dass unkontrolliert Zellen zerplatzen, wie es bei der Elektrokauterisation der Fall ist. Das Plasmafeld erzeugt seine maximale Temperatur im Gewebe 0,3 mm unterhalb der Sondenspitze, und liegt bei einem Abstand von 1,5 mm bei unter 45 °C, unabhängig von der Maximaltemperatur.¹⁴⁴

Die derzeit intensiv diskutierten Einsatzmöglichkeiten dieser radiochirurgischen Methode erstrecken sich theoretisch nicht nur auf die Kapselschrumpfung an Schulter oder Hüfte, sondern auch auf die Behandlung definierter Strukturen, wie zum Beispiel vordere Kreuzbänder oder Menisci.^{88,103}

1.4.2 RF-Energie verändert die molekulare Architektur der Kollagenfasern

Kollagenmoleküle bestehen aus drei Peptidketten die als eng gewundene Tripelhelix angeordnet sind. Diese aggregieren in komplexer und streng geordneter Form zu Fasern, die durch inter- und intramolekulare Brückenbindungen stabilisiert werden.

Sobald Wärmeenergie mit 65 - 75°C appliziert wird, lösen sich die hitzelabileren intramolekularen Wasserstoffbrücken, die die Tripelhelix zusammenhalten, auf. Im Gegensatz dazu bleiben die meisten intermolekularen Verbindungen bestehen. Entspiralisieren sich die Helices, während sie aber gleichzeitig noch mit ihren benachbarten Molekülen in Verbindung stehen, resultiert ein Längenreduzierung, mit gleichzeitiger Querschnittsausdehnung der einzelnen Fasern (siehe Abb.2).



Da das Kapsel- und Bandgewebe der Gelenke größtenteils aus Kollagenfasern des Typs I besteht, resultiert, nach Wärmeapplikation mit arthroskopischen RF-Sonden, eine deutlich sichtbare Schrumpfung der Kapselinnenseite.^{60,63,80} Dieses Phänomen führte zu der Bezeichnung des „thermal capsular shrinkage“ bzw. „thermal capsulorrhapy“.

Mit Hilfe des LACS- (Laser-assisted capsular shrinkage) oder ETACS- (Electrothermally-assisted capsular shrinkage) Verfahrens ist es also ebenfalls möglich, das Kapselvolumen hyperlaxer Gelenke zu reduzieren.

1.4.3 Morphologische Veränderungen des kollagenen Gewebes

Die Hitzeeinwirkung verändert nicht nur die Ultrastruktur des Kollagens. Vielmehr zeigen sich bei den momentan verwendeten Betriebstemperaturen von 65 - 75°C auch histologisch deutliche morphologische Veränderungen. ETACS und LACS verursachen dabei trotz unterschiedlicher Funktionsweise vergleichbare Gewebeveränderungen.^{53,98} Diese sind durch „Hyalinisierung“ der Kollagenfasern in Sinne einer Koagulationsnekrose sowie Kernpyknose von Fibroblasten und Endothelzellen gekennzeichnet.^{56,57,59,61,62,80,114} Der darauf folgende aktive Reparatursprozess wurde schon mehrfach untersucht.^{57,62} Zeitlich abhängig vom Gewebetyp und Versuchstier, findet nach spätestens zwei bis vier Wochen eine Degradation hyalinisierter Gewebestrukturen und denaturierter Fibroblasten statt. Eine milde, aseptische Entzündungsreaktion bedingt die Migration intakter Fibroblasten aus weniger stark geschädigten Bereichen, die gestützt auf das nun geschrumpfte Kollagenetz neue ECM synthetisieren. Im weiteren Verlauf nähert sich das histo-morphologische Erscheinungsbild des Gewebes wieder dem nativen Zustand an, behält aber im Idealfall die reduzierte Länge. Zur vollständigen, histologisch erkennbaren Regeneration benötigt die Schultergelenkkapsel beispielsweise mindestens zwölf.^{53,62}

1.4.4 Thermisch behandeltes Gewebe ist biomechanisch geschwächt

Für die Dauer der Regeneration, insbesondere während der ersten zwei bis drei Wochen, haben die histologischen und ultrastrukturellen Veränderungen direkten Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des behandelten Gewebes.^{112,120,142} Hayashi⁵⁵ konnte in einer in vitro Studie zeigen, dass bei einer Kapselschrumpfung um 26 % die Gewebefestigkeit signifikant abnahm. Schaefer¹²⁰ berichtet nach einer Verkürzung von etwa 6% sowohl von einer Reduktion der Festigkeit um 19% als auch einer pathologischen Längenzunahme über das präoperative Maß hinaus. ETACS und LACS schrumpfen das behandelte Kapsel-Band-Gewebe also nicht nur, sondern schwächen es auch deutlich.

1.4.5 Propriozeptive Defizite werden durch operative Intervention reduziert

Patienten mit multidirektionaler Schulterinstabilität haben eine reduzierten Lagesinn aufgrund propriozeptiver Defizite. Lephart und Myers^{77,78} konnten zeigen, dass sich der Lagesinn von Patienten sechs Monate nach „thermal capsulorrhaphy“ nicht mehr signifikant von Patienten mit traditioneller Operation oder gesunden Probanden unterscheidet. Eine chirurgische Intervention wirkt sich damit potentiell positiv auf die Propriozeption im Schultergelenk aus. Pözl et al.¹¹¹ bestätigten diesen Sachverhalt in einer Langzeitstudie nach konventioneller Operationsmethode. Zum Prozess der Reinnervation bzw. Regeneration der Schultergelenkkapsel nach RF-Behandlung gibt es bislang keine histologischen Daten.¹¹¹

In Anbetracht der histologischen, molekularen und biomechanischen Alterationen, die durch Radiofrequenz- oder Laser- Energie ausgelöst werden, ist es durchaus legitim, Schädigungen an den sensorischen Rezeptoren zu unterstellen. Arnoczky⁶ postuliert sogar eine mögliche symptomatische Schmerzlinderung durch „Deafferenzierung“ nach ETACS/ LACS die möglicherweise zu unvorteilhaftem, frühen Mobilisationsverhalten der Patienten führen könnte.

Auch für die Wundheilung scheint eine intakte vegetative Innervation von großer Bedeutung für die biomechanische Integrität des kollagenen Grundgerüsts zu sein.^{66,73}

1.5 Physiology der Wundheilung von Sehnen und Ligamenten

Der Prozess der Geweberegeneration bedarf einer hochkomplexen Regulation einer Vielzahl von metabolischen Funktionen. Dabei handelt es sich prinzipiell um Degradation von Kollagen, Abbau des Zelldetritus und Synthese extrazellulärer Matrixproteine. Ein Großteil dessen, was über die Regeneration von Sehnen bekannt ist, stammt aus diversen Tiermodellen zur Sehnenheilung nach chirurgischer Tenotomie bzw. Sehnenruptur. Demnach vollzieht sich die Defektheilung zwischen den Sehnenstümpfen prinzipiell in einer inflammativen,

einer reparativen und einer organisierenden Phase, die auch als Remodeling bezeichnet wird.⁸⁴

Die inflammative Phase erstreckt sich im wesentlichen auf die ersten 3 – 5 Tage nach der Verletzung. Zusätzlich zu einer Proliferation intrinsischer Zellen des Epi- und Endotenon⁴⁴ findet eine Immigration extrinsischer Zellen aus dem Peritendinösen Gewebe, wie Sehnenscheide, Periost, Subkutangewebe und Faszien statt.^{106,136} Initial übertrifft die extrinsische die intrinsische Gewebeantwort bei weitem, so dass der Defekt schnell mit Granulationsgewebe aufgefüllt wird. Den immigrierenden Fibroblasten kommt dabei auch die wichtige Aufgabe der Phagozytose zu. Ferner beginnen sie nach ca. 6 Tagen mit der Kollagen-Neosynthese, wobei eine einheitliche Faserorientierung anfänglich noch fehlt.

Innerhalb der ersten 5 Wochen nimmt der Kollagenanteil kontinuierlich zu, wobei die Fibroblasten die dominierenden Zellen innerhalb der Läsion sind. In der vierten Woche kommt es zusätzlich zu einer deutlich gesteigerten Proliferation von Fibroblasten intrinsischer Herkunft.

Um den 40. Tag übernehmen diese Zellen die weitaus aktivste Rolle im Regenerationsprozess ein, indem sie gleichzeitig Kollagen aktiv resorbieren und synthetisieren. So kommt es schließlich zu einer Gewebereifung und gleichzeitiger paralleler Ausrichtung der Kollagenfasern entlang der Zugachse der Sehne. Im Rahmen des Remodeling erhält die Sehne bei physiologischer Belastung ihre biomechanische Stabilität zurück.⁸⁹ Hierbei wird die Organisation der ECM durch zusätzliche Querverbindungen zwischen den Kollagenfibrillen gefestigt. Im Rahmen des Remodeling kommt es allmählich zu einer Verschiebung, des in der reparativen Phase gebildeten fibrillären Typ-III-Kollagen zu dem biomechanisch beständigeren Typ-I-Kollagen.¹⁰⁰ Dieser Vorgang kann vereinzelt länger als 12 Monate andauern.¹⁴⁵

1.6 Vor- und Nachteile der postoperativen Immobilisation

Der Erfolg chirurgischer Schulterstabilisation basiert nicht nur auf der durchgeführten Technik, sondern hängt auch entscheidend vom postoperativen Rehabilitationsprogramm ab. Daher wird die Dauer postoperativer

Immobilisation, z.B. durch Gipsschienen oder Verbände, seit langem kontrovers diskutiert. Um den passenden Zeitrahmen sowie die Gewichtung zwischen Immobilisation und früh einsetzender Mobilisation zu definieren, wurden daher zahlreiche Tierversuche und klinische Studien durchgeführt. Eine lange Ruhigstellung verschlechtert offenbar die biomechanischen und viskoelastischen Eigenschaften kollagenen Gewebes.^{99,113,150-152} Andererseits konnte gezeigt werden, dass durch physiotherapeutische Übungen und Training eine Stärkung solchen Gewebes erreicht werden kann.^{135,148,149} Klinische Rehabilitationsprogramme sind daher auf eine kurze Immobilisationsphase zugunsten einer früh einsetzenden, passiven Mobilisation ausgelegt.

Da thermische Kapselschrumpfung ein Phänomen der letzten Jahre ist, gibt es noch keine Daten zur adäquaten Nachbehandlung. Ein Zustand, der von vielen Autoren bemängelt wird.^{53,88,141} Favorito³⁵ und Levy⁷⁹ fordern nach ersten klinischen Beobachtungen eine Ruhigstellung der Schulter nach LACS für mindestens drei Wochen.

Zudem häufen sich Berichte signifikanter Verlängerungen thermisch geschrumpfter Sehnen, die postoperativ nicht immobilisiert wurden.^{112,120,142} Dieses Phänomen ist aber dem eigentlichen Behandlungsziel diametral entgegengesetzt. Vermutlich liegt dies an den anfangs molekulararchitektonischen Veränderungen, die durch thermale Kapselschrumpfung hervorgerufen werden. Es wäre also durchaus ein protektiver Effekt durch Immobilisation für die Zeit des Heilungsprozesses denkbar, obwohl diese, unter anderen Bedingungen, biomechanische Parameter kollagenen Gewebes eher beeinträchtigt (siehe oben).

1.7 Untersuchungsziel

Die bisherigen Studien zur thermischen Kapselschrumpfung sind größtenteils in vitro Experimente oder klinische Studien mit kurzer Nachbeobachtung. Ferner wurde den biomechanischen Aspekten ein Großteil der Aufmerksamkeit zu Teil. Nur ein kleiner Kreis von Untersuchern hat bisher die histologischen Parameter in vivo untersucht. So gibt es lediglich zwei tierexperimentelle

Studien^{61,62} und nur eine histologische Evaluation von humanen Gewebeproben, die bei Nachuntersuchungen entnommen wurden.⁵⁶

Ziel der Studie ist es, den Einfluss der Immobilisation auf die histologische Regeneration von Radiofrequenz-behandeltem Kapsel-Band-Gewebe zu untersuchen.

In unserem Tiermodell sollen 66 New Zealand White Rabbits am rechten Lig. patellae mit RF- Energie behandelt werden. Nach einer Schrumpfung um 5 % der Ausgangslänge soll ein Teil der behandelten Sehnen in verschiedenen Nachbehandlungsgruppen immobilisiert werden. Andere Versuchstiergruppen werden hingegen mobil belassen. Die Regeneration des Gewebes soll an drei definierten Zeitpunkten (direkt postoperativ, bzw. jeweils drei, sechs oder neun Wochen nach dem shrinkage) erfasst werden. Die unbehandelten Sehnen der linken Seite dienen als unbehandelte Kontrollen.

Nach unterschiedlichen Untersuchungs-zeiträumen sollen die Sehnen entnommen, und histologisch bzw. immunhistochemisch aufbereitet und untersucht werden. Es soll dabei insbesondere die Regenerationsdynamik anhand der Parameter Apoptose und Zellularität, Kollagenturnover, Reinnervation und Revaskularisierung evaluiert werden.

Bislang finden sich in der Literatur keine histologischen Daten zu den Auswirkungen einer postoperativen Immobilisation nach ETACS,- oder LACS-Behandlung. Detaillierte Informationen über den Regenerationsprozess im Rahmen unterschiedlicher Nachbehandlungsmodalitäten sind jedoch für einen verantwortungsvollen Einsatz dieser Methode unverzichtbar.

2. Material und Methode

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 66 weibliche New Zealand White Rabbits aus einem Zuchtbetrieb (Peter Rollie, Ennigerloher Str. 111, 59302 Oelde) verwendet. Für die Unterbringung der Tiere standen die zentrale tierexperimentelle Einrichtung des UKM, sowie der Tierstall der Klinik für Allgemeine Orthopädie zur Verfügung. Die Haltung erfolgte standardisiert: Nach Lieferung wurden die Tiere in Einzelkäfigen mit einer Grundfläche von 105 cm x 60 cm untergebracht. Hier stand ihnen Wasser und Fertigfutter (Höveler Kaninchenfutter K 810®, Höveler Spezialfutterwerke GmbH & Co. KG, 40764 Langenfeld, pro KG 20.000 i.E. Vitamin A -, 2000 i.E. Vitamin D3 -, 20 mg Vitamin E – Zusatz), jeweils ad libitum, zur Verfügung. Um einen Tag-Nacht-Rhythmus zu simulieren, wurde die Deckenbeleuchtung in den Stallungen jeweils von 6.30 Uhr bis 19.00 Uhr per Zeitschaltuhr eingeschaltet. Den Tieren wurde immer der gleiche Tagesablauf geboten und ihre Aktivität dadurch so weit wie möglich standardisiert.

Tab. 1: Versuchstiergruppen

Gruppe	Immobilisationszeitraum (Wochen)	Beobachtungszeitraum Post. (Wochen)	Tiere (n)
1	0	3	10
2	0	9	10
3	3	3	10
4	3	6	10
5	6	6	10
6	6	9	10
7	0	0	6

2.1.1 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden randomisiert in sieben Versuchsgruppen eingeteilt. Sie unterlagen verschiedenen langen Immobilisations- und Beobachtungszeiten im Anschluss an die Operation, die in Tab. 1 erläutert werden.

2.1.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt zwölf Tieren, von denen je zwei randomisiert aus den Versuchstiergruppen 1 bis 6 ausgewählt wurden.

2.2 Einschlusskriterien

Die Tiere wurden zwecks präoperativer Eingewöhnung mindestens 7 Tage im selben Stall belassen. Es wurde täglich eine Visite durchgeführt und jeweils im Abstand von drei Tagen Temperatur, Gewicht und Gesundheitszustand dokumentiert. Um die Integrität des Gipsverbandes nach der Operation sicherzustellen, bekamen die Tiere am Tag zuvor Halskrausen, die sie weder bei der Nahrungsaufnahme noch beim Trinken beeinträchtigten. Das Nagen am Gipsverband konnte so wirkungsvoll verhindert werden.

2.2.1 Operationsvoraussetzungen

Um zur Operation zugelassen zu werden, durfte die präoperativ und in Narkose gemessene Rektaltemperatur ein Maximum von 39 °C nicht überschreiten. Dies entspricht der normalen Körpertemperatur von Kaninchen.

Ferner mussten die Epiphysenfugen des Tibiakopfes geschlossen sein. Diese Bedingung wurde durch die Kontrolle des postoperativen Röntgenbildes sichergestellt und war bei allen Tieren mit einem Gewicht von mehr als 4000g zweifelsfrei nachweisbar (siehe Abb. 3). Von leichteren Kaninchen (n = 18) wurden präoperativ Kontrollaufnahmen angefertigt, die auch hier ausnahmslos geschlossene Epiphysenfugen aufzeigen konnten. Bedeutsam war dieser Umstand vor allem für die korrekte Auswertung der Längenveränderung der behandelten Sehnen, da diese nicht durch natürliches Wachstum beeinflusst werden sollte. Auch für die biomechanische Testung, die schwerpunktmäßig in

einer Parallelstudie behandelt wird, mussten die Epiphysenfugen geschlossen sein, um bei Zugbelastung an dieser Stelle nicht zu Zerreißen zu neigen. Nur ein intraligamentäres Reißen konnte hierbei gewertet werden (siehe 2.8).

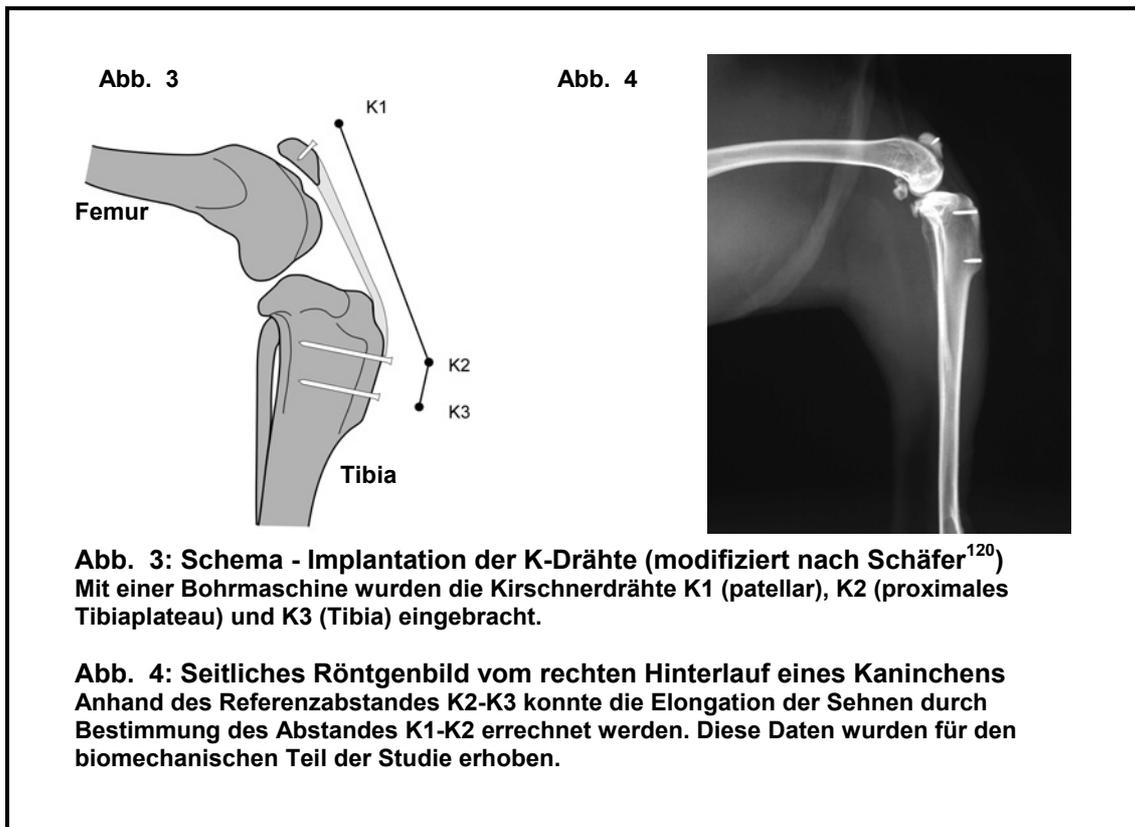
2.3 Operationsmethode

2.3.1 Anästhesie

Die Narkose wurde durch intramuskuläre Applikation von Ketamin (NMDA-Rezeptorantagonist, Handelsname Ketanest®, Fa. Parke Davis) und Xylazin (α -2-Rezeptoragonist, Handelsname Rompun®, Fa. Bayer) erzielt. Hierbei handelte es sich um eine dissoziative Anästhesie, die von den Tieren gut vertragen wurde. Die Dosis betrug 0,25 ml / kg Körpergewicht Ketamin und 0,15 ml / kg Körpergewicht Xylazin. Die Injektion erfolgte intramuskulär in den M. erector spinae. Weder bei der Applikation noch während der Narkose traten Komplikationen auf. Der Eintritt in das Exzitationsstadium konnte durch das Vorfallen der Nickhaut, einer typisch caudalen Bulbusrotation, sowie einer starken Miosis überwacht werden. Nach Abschluss dieser Phase wurde der gesamte Hinterlauf sowie die angrenzenden Bereiche von Bauch und Rücken über eine Fläche von jeweils 10 x 10 cm mit einer elektrischen Kleintierrasiermaschine vom Fell befreit. Anschließend wurden die Kaninchen auf einer weichen Fläche in Rückenlage positioniert. Der Hinterlauf wurde desinfiziert (Cutasept® -G/ gefärbt, Fa. Bode) und bis auf das Op-Feld steril abgedeckt. Im Abstand von 15 min. wurden die Medikamente in oben genannter Dosierung zur Aufrechterhaltung der Narkose nachgespritzt. Das Toleranzstadium war bei den Tieren an einer mydriatischen Pupille erkennbar.

2.3.2 Einbringen der Kirschnerdrähte

Nachdem die Haut über der Patellarsehne ca. 4 bis 5 cm längs inzidiert wurde, konnten die zahlreichen subkutanen bindegewebigen Verschiebeschichten mit einer Schere stumpf abpräpariert werden. Im Weiteren galt es, die Patellarsehne in ihrer gesamten Länge unter sorgfältiger elektrischer Blutstillung darzustellen. Als proximale Grenze der Sehne wurde die Patella, als distale Begrenzung die Insertionstelle an der Tibia definiert.



Um die Längenentwicklung auf dem Röntgenbild und auch intraoperativ nachweisen zu können, brachte man mit Hilfe einer pressluftgetriebenen Bohrmaschine drei röntgengedichtete Kirschnerdrähte von jeweils 0,8 mm Stärke an folgenden Stellen ein: der erste Draht (K1) wurde zentral in die Patella, und somit am Ursprung der Patellarsehne eingebracht. Der zweite (K2) kam knapp unterhalb des Tibiaplateaus in Höhe des distalen Endes der Patellarsehne zu liegen. Der dritte (K3) wurde ca. 5 mm distal von K2 in der Tibia positioniert.

Alle Drähte wurden orthogonal zur Sehnenoberfläche positioniert. Die Anordnung der Drähte zeigen Abb. 3 und 4.

Als Berechnungsgrundlage für die Längenentwicklung im postoperativen Verlauf wurden die Abstände K1-K2, sowie K2-K3 mittels einer digitalen Präzisionsschieblehre intraoperativ bestimmt. Anschließend wurde die Sehne in



Abb. 5: OP-Situs, Sehne mit K-Drähten

Intraoperatives Bild der ungekürzten K-Drähte. Man erkennt die freipräparierte Patellarsehne zwischen linkem (K1) und mittlerem (K2) Draht. Der rechte Draht ist in der Tibia eingebracht.

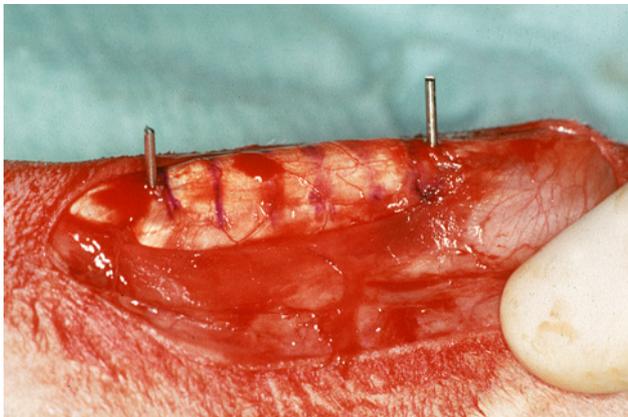


Abb. 6: OP-Situs, Sehne nach Shrinkage

Auf der Oberfläche sind Markierungen im Abstand von je 5 mm mit einem sterilen Filzstift angezeichnet. Entlang dieser Linien wird die Sehne mit der RF-Elektrode abgefahren.



Abb. 7: OP- Situs, K-Drähte eingebracht, K3 gekürzt

Die Patellarsehne wird von einer künstlichen Gummi-Membran umspannt. Anschließend wird NaCl in das künstliche Becken gegeben um ein ionales Milieu für ETACS bereitzustellen. K3 wird zuvor gekürzt.

ihrer proximalen, mittleren und distalen Breite mittels Präzisionsschieblehre vermessen und dokumentiert.

Danach konnte zuerst K3 mit einem Seitenschneider knapp über dem Oberflächenniveau der Implantationsstelle gekappt werden. Ebenso wurde nach dem „Shrinkage“ (s. 2.3.3) mit K1 und K2 verfahren. Um Irritationen des Gewebes zu vermeiden, wurden die verbliebenen Enden mit Hammer und Stößel vollständig versenkt.

Wir nutzten einen wasserfesten, sterilen Filzstift um ein standardisiertes und gleichmäßiges Muster für alle Radiofrequenzapplikationen zu gewährleisten. Dabei wurden in Abstand von je 5 mm mehrere Striche im rechten Winkel zum Sehnenverlauf über die volle Länge der Sehne aufgezeichnet (siehe Abb. 6, 9).

2.3.3 ETACS

Die Abkürzung ETACS steht für „elektrothermal assisted capsular shrinkage“. Essentiell für diesen Arbeitsschritt war ein ionales Milieu, das bei Arthroskopien von vornherein durch die Anatomie des Gelenkraumes und den Einsatz von NaCl 0,9% als Spülmedium gegeben ist. Da aber die Operation im Fall dieser Studie von der Außen- und nicht von der Innenseite der Gelenkkapsel erfolgte, musste eine Vorrichtung konstruiert werden, um deren geschlossene Bauweise nachzuahmen. Zu diesem Zweck wurde ein speziell angefertigter Plastikring in Kombination mit einem darin eingespannten Boden aus einer Gummimembran (Pure Latex Dental Dam™, one square yard, 6 inches wide, gauge: heavy, The Hygienic Corporation / Akron, Ohio 44310, USA) verwendet (siehe Abb. 8). So entstand eine Art Wasserbecken, dessen Boden aus einer elastischen Membran bestand. Diese wurde im Zentrum einige Millimeter weit eingeschnitten. Dann wurde das gebeugte Kniegelenk von unten durch diesen Schnitt geführt, so dass es im Inneren des Topfes zu Vorschein kam (siehe Abb. 6). Danach wurde der Hinterlauf in eine neutrale Streckstellung gebracht, in der kein Zug mehr auf der Sehne lastete. Es wurde isotone NaCl Lösung (0,9 - % Braun® Isotone Kochsalzlösung zur i.v. – Infusion, B. Braun Melsungen AG) in den Topf eingefüllt. Die Gummimembran schmiegte sich an den Hinterlauf eng an, so dass ein Flüssigkeitsverlust weitestgehend verhindert

werden konnte (siehe Abb. 7). Die gegenüber der Außenwelt abgeschlossene Bauweise des flüssigkeitsgefüllten Gelenkraumes wurde also durch eine künstliches Wasserbassin simuliert.

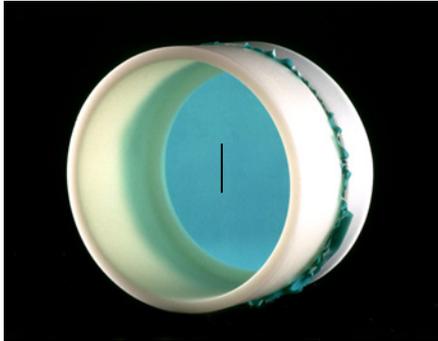


Abb. 8: Plastikring mit Gummimembran
Plastikring in Kombination mit einem darin eingespannten Boden aus einer Gummimembran. Diese wurde im Zentrum einige Millimeter weit eingeschnitten. Dann wurde das gebeugte Kniegelenk von unten durch diesen Schnitt geführt, so dass es im Inneren des Topfes zu Vorschein kam (siehe Abb. 6).

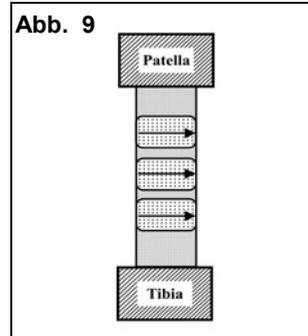


Abb. 9: Schemazeichnung zur RF-Sondenführung auf der Patella
Die Sehnen wurden mit der RF-Elektrode abgefahren, wobei sich ca. 3 mm breite behandelte Streifen mit ca. 5 mm breiten unbehandelten Stellen abwechselten. Die Vorschubgeschwindigkeit betrug etwa 2 mm/ sec.

Ein Radiofrequenzgenerator (Mitek VAPR™ Generator, Cat. No. 225001, Mitek™ Westwood, MA, USA) wurde durch ein steriles Kabel (Mitek VAPR™ Power Cord, Cat. No. 225005) mit einer bipolaren RF-Arthroskopielektrode (VAPR™ TC End Effect Electrode, Cat. No. 225252) verbunden. Diese hatte einen Durchmesser von 3.5 mm und eine Applikationsfläche von 2 mm². Im Vergleich zu einer „Side-effect-Elektrode“, bei der die Elektrodenoberfläche größer ist und seitlich an der Sonde sitzt, ist bei dieser Sonde eine sehr exakte Applikation der Energie gewährleistet. Mit Hilfe eines integrierten Sensors wurde die Arbeitstemperatur an der Sondenspitze exakt kontrolliert, und so automatisch eine gleichbleibende, genau definierte Energiemenge in das Gewebe applizieren. Ein Zweifach-Fußschalter (VAPR™ Footswitch, Cat. No. 225003) der die Modi „Coagulation“ und „Ablation“ bot, diente im erstgenannten Modus der Energiesteuerung während der Operation.

Die Einstellungen am VAPR™ von 70 °C Sondentemperatur und 40 Watt Energieleistung waren für alle Versuchstiere gleich. Man bestrich die Sehne mit der Elektrode in einem „Grid-Pattern“ (Strickleitermuster) entlang der vorher aufgezeichneten Linien (siehe Abb. 6 und 9). Dabei hatte die Elektrode direkten Kontakt zum Sehnengewebe und wurde mit einer Geschwindigkeit von ca. 1-2 mm/ sec bewegt. So wechselten sich ca. 3 mm breite behandelte Streifen mit ca. 5 mm breiten unbehandelten Stellen ab.⁸² Während der Wärmeapplikation veränderte sich die Sehnenoberfläche makroskopisch vom normalen weißlich-rosafarbenen und glatten Aspekt zu einem weißlich-bräunlichen und stumpfen Aussehen.

2.4 Immobilisationsmethode

Um eine zuverlässige Immobilisation des rechten Hinterlaufes zu gewährleisten, wurden Vorversuche an einem Kaninchen durchgeführt, das später nicht in die Versuchsauswertung aufgenommen wurde. Aus Gründen der Praktikabilität und Haltbarkeit wurde eine Weißgipsschiene, die eine kompromisslose Ruhigstellung des Kniegelenkes gewährleistete, ausgewählt.

Diese Weißgipsschiene (Weißgips, Lohmann GmbH & Co KG, 56504 Neuwied) wurde den Tieren in Narkose (s. oben) angelegt, wobei zuerst ein Baumwollstrumpf (TG-Schlauchverband tg 3, Lohmann GmbH & Co KG, 56504 Neuwied) über das operierte Bein gestreift wurde (siehe Abb. 10). Dann folgte ein in Schraubentouren gewickelter Watteverband (Cellona Verbandwatte, Lohmann GmbH & Co KG, 56504 Neuwied) (siehe Abb. 11). Der Bauch und Rücken des Tieres wurde zur besseren Modellierbarkeit des Gipses initial ebenfalls mit Watte versorgt. Anschließend umwickelte man das Bein mit dem wassergetränkten Weißgips (siehe Abb. 12). Alle Arbeitsschritte wurden in einer 90° Beugstellung des Kniegelenkes durchgeführt. Dieser Winkel wurde jeweils mit einem Geodreieck bestimmt. Es wurde insbesondere darauf geachtet, den Flüssigkeitsrückstrom in subkutan gelegenen Venen und oberflächlichen Lymphgefäßen nicht durch ein unsachgemäß enges Anmodellieren des Gipses zu behindern. Ferner wurde durch entfernen scharfer Ränder mit einer Schere Verletzungen des Oberschenkels und des Fußrückens vermieden.



Abb. 10: Immobilisation des Beines I:

Ein Baumwollstrumpf (TG-Baumwollschlauch) wurde um den behandelten rechten Hinterlauf gewickelt.

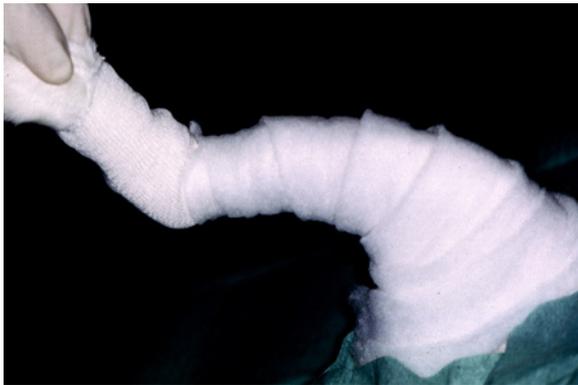


Abb. 11: Immobilisation des Beines II:

Zur suffizienten Polsterung wurde eine zirkuläre Watteschicht angelegt. Initial wurde der Rumpf mit eingewickelt, um ein Verrutschen der Watte zu verhindern.



Abb. 12: Immobilisation des Beines III:

Fertig angepasster Weißgips in 90° Beugstellung. Die Pfoten der immobilisierten Kaninchen wurden täglich mehrfach auf die Entwicklung von Ödem kontrolliert. Bei Bedarf wurden die Gipsschienen neu angepasst.

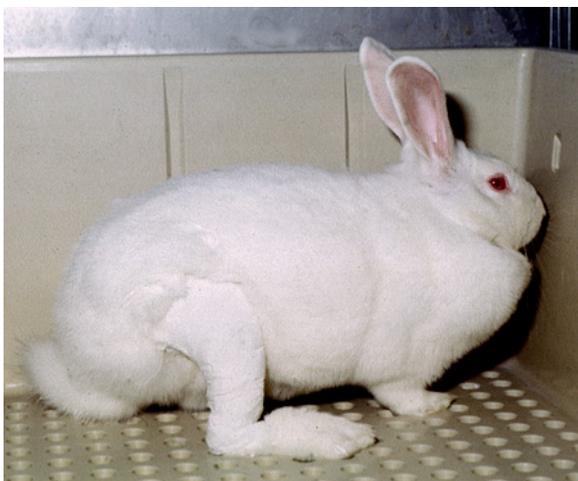


Abb. 13: Immobilisierter rechter Hinterlauf

Die Kaninchen waren durch die Weißgipsschiene zuverlässig immobilisiert.

bewegen (siehe Abb. 13). Entsprechend wurde mit den Tieren der Gruppen drei bis sechs verfahren (siehe Tab.: 1).

2.5 Postoperative Überwachung und Nachsorge

Postoperativ wurden vor allem Atmung, Vigilanz und Motorik der Tiere überwacht, bis sie wieder koordinierte Bewegungen zeigten. Zur postoperativen Analgesie erhielten sie drei Tage lang jeweils einmal pro Tag 10 ml / kg KG Metamizol-Natrium (Novalgin®) subkutan. Durch Palpation des Fußrückens wurde der Sitz der Gipsverbände überprüft. Fand sich eine ödematöse Schwellung als Indiz für einen zu engen Gips, wurde dieser in Narkose durch einen am distalen Ende gelockert anmodellierten Ersatz erneuert. Bei nicht immobilisierten Tieren fanden tägliche Verbandswechsel statt. Ferner wurde der Sitz der Halskrause sowie das Eß,- und Trinkverhalten kontrolliert. Postoperativ wurde die Entwicklung von Gewicht und Körpertemperatur dokumentiert.

2.6 Tötung der Tiere

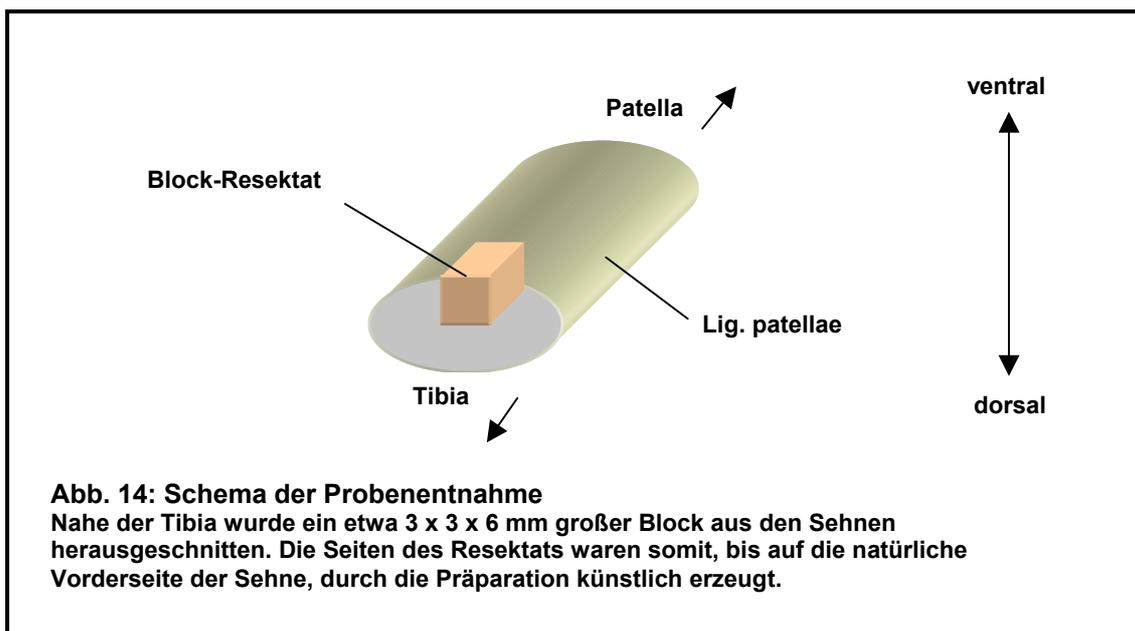
Zuerst wurde den Tieren mit einem massiven Eisenrohr ein starker Schlag im Bereich der oberen Halswirbelsäule zugefügt. Dadurch wurde ein spinaler Schock ausgelöst, an den sich unverzüglich die beidseitige Inzision der Aa. Carotides communes anschloss. So wurde der Körper rasch entblutet. Diese Methode entsprach, neben der Applikation von T61® oder Pentobarbital® intravenös der einzigen durch das Tierschutzgesetz erlaubten Tötungsmethode (§ 4 Tierschutzgesetz).

2.7 Explantation der Sehnen und Probengewinnung

Nach Tötung der Tiere wurden die Patellarsehnen beider Hinterläufe entnommen. Die linken Sehnen wurden dabei als unbehandelte Kontrollsehnen für die histologische Auswertung benutzt. Man positionierte den Körper in Rückenlage und stellte die hintere Extremität in leicht abduzierter und vollständig gestreckter Haltung ein. Danach wurde die Haut leicht medial der Operationsnaht über eine Länge von etwa 10 cm mit einem Skalpell durchtrennt und diversen Verschiebeschichten mit einer Schere stumpf abpräpariert. In

keinem Fall wurden die Sehne beschädigt. Wurde das Kniegelenk nun gebeugt, traten die freipräparierte Strukturen durch den Hautschnitt hervor und konnten komfortabel eingesehen werden. Der Übergang zur Gelenkkapsel sowie zum Reservestreckapparat wurden beidseitig der Patellarsehne mit einem Skalpell scharf abpräpariert. Proximal der Patella wurde der M. quadrizeps durchtrennt, so dass noch ein etwa 0,5 x 0,5 mm großer Muskelstumpf an der Patella verblieb. Danach wurde die Einheit, aus Muskel, Patella und Sehne bis zur tibialen Insertion sorgfältig abgelöst.

Mit Hilfe eines Skalpells wurde aus jeder Sehne ein etwa 6 x 3 x 3 mm großer Block herausgeschnitten. Dabei galt es bei der Präparation eine möglichst nah an der tibialen Insertion gelegene Stelle der Sehne zu wählen. Die Seiten des Resektats waren somit, bis auf die natürliche Vorderseite der Sehne, durch die Präparation künstlich erzeugt (siehe Abb. 14).



Dieses Procedere bzw. die Maße des Resektats wurden so gewählt, da durch die maximal zu verarbeitende Größe histologischer Präparate entsprechende Grenzen gesetzt waren. Ferner gab es Grund zu der Annahme, dass eine mögliche Reinnervation eher bzw. evidenter von tibialer, als von patellarer Seite aus erfolgt. Die Proben wurde in 7%igem Formalin fixiert.

2.8 Schnittherstellung

Die Einbettung der formalinfixierten Proben erfolgte mit Hilfe eines Einbettautomaten (Varistan 24-3, Fa. Shandon). Dieser Automat führt die Einbettung der Proben automatisch durch. Die Gewebeproben werden in Einbettkassetten gegeben, die maschinell automatisch durch die verschiedenen Alkohole geführt werden. Die Verweildauer wird per Timer eingestellt. Eine gleichmäßige und schnelle Durchtränkung des Materials mit den einzelnen Flüssigkeiten ist durch ständige Bewegung mittels einer automatischen Rotationsvorrichtung gewährleistet. Um die Proben für die histologische Aufarbeitung schneiden zu können, mussten diese noch mit Paraplast©Plus (Paraplast©Plus, Cat- Nr: 8889-502005: Sherwood medical Co., Mo. U.S.A) ausgegossen werden. Zu diesem Zweck nutzten wir eine Paraffin-Ausgießstation (Ausgießstation 2/3-AP-280 MICROM® International GmbH, Robert-Bosch-Str. 49, D-69190), im Modus „Paraffin 60 °C“. Alle Proben wurden so orientiert, dass der Faserverlauf in der Horizontalebene lag. Auf diese Weise entstanden beim Schneiden ausschließlich komplette Längsschnitte des Gewebes.

Die in Paraplast©Plus eingebetteten Proben wurden mit einem motorgetriebenen Mikrotom (Mikrotom Mod. 1140- Autocut, Fa. Reichert und Jung) geschnitten. Die Schnittdicke betrug 5 µm. Da es sich um außerordentlich hartes Gewebe handelte, kamen besonders geschliffene Einmalklingen (MicrotomBlade, Stainless Steel Typ S 35 und N 35 H, Feather Safety Razor Co., Ltd. Medical Division) zum Einsatz. Die verschiedenen Färbemethoden bedurften unterschiedlicher Objektträgertypen. So kamen für die im Folgenden beschriebene Färbungen 2.12.2, 2.12.3, 2.12.6 (siehe unten) Objektträger des Typs „SuperFrost®- Plus“, für 2.12.4 und 2.12.5 die des Typs „SuperFrost®- Plus mit Polysine™“ (beide Fa. R. Langenbrinck) zum Einsatz. Es wurde dabei vor allem darauf geachtet, die im folgenden Kapitel (siehe Kap. 2.12) detailliert vorgestellte Färbungen an unmittelbar aufeinanderfolgenden Schnitten vorzunehmen. So konnte die Kontinuität und Vergleichbarkeit der Gewebemorphologie zwischen den verschiedenen Färbungen bzw. Schnitten gewährleistet werden.

2.9 Färbungen

Alle Auswertungen wurden von zwei Untersuchern vorgenommen, von denen einer die Einteilung und Nachbehandlung der Versuchstiergruppen nicht kannte. Die Ergebnisse wurden anschließend verglichen und im Falle größerer Abweichungen von einem dritten Untersucher, dem die Einteilung und Nachbehandlung der Versuchstiergruppen ebenfalls unbekannt war, begutachtet. Auf diese Weise wurde mit allen histologischen Präparaten verfahren.

2.9.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) ist eine von allen vergleichbaren Studien^{56,57,61-63} eingesetzte Übersichtsfärbung. Nach der Färbung erscheinen Zellkerne und Knorpelsubstanz blau, Zytoplasma, Kollagenfasern und Bindegewebe hingegen in verschiedenen Rottönen.

Zusätzlich wurden an diesen Proben auch die lichtbrechenden Eigenschaften der Kollagenfasern mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie untersucht.

Die absteigende Alkoholreihe, beginnend mit Xylol, gewährleistete eine schonende Überführung der Paraffinschnitte zur wässrigen Farblösung. Nach spülen mit Aqua dest., ließ man „Hämalaun nach Mayer“ für zehn Minuten einwirken. Anschließend wurden die Schnitte etwa fünf Minuten unter fließendem Wasser gebläut und ebenso lange mit Eosin gegengefärbt. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe und die Eindeckung mit Eukitt®.

Auswertung

In Anlehnung der subjektiv-doppelblinden, Auswertungsmethode histologischer Gewebemerkmale von Hecht und Hayashi⁶³, wurden die im Folgenden dargestellten Auswertungsscores („Scores“) für die Bewertung von Kollagen-, und Fibroblastenqualität (siehe Tab. 4) festgelegt. Insgesamt werden je drei Hauptzustände unterschieden wobei deren prozentuale Zusammensetzung Werte zwischen eins und neun ergaben („Score“ 1-9). Analog zu Hecht et al.⁶³ wurde auch für die Beschreibung von Qualität und Quantität der Kapillaren eine Bewertungsskala („Score“) festgelegt. Diese ist allerdings nur in Werte von eins

bis drei unterteilt (siehe Tab. 3). Die Scores erfassen die morphologischen Gegebenheiten der einzelnen Schnitte. Diese wurden unabhängig von zwei Untersuchern begutachtet, wobei einer über die Zugehörigkeit der Tiere zu den verschiedenen Nachhandlungsmodi im Unklaren gelassen wurde.

Tab. 3: Auswertungsschema zur Bestimmung der Vaskularität HE-gefärbter Schnitte

Score: 1- 3	1	2	3
Kapillarenqualität	normale Gefäße/ normales Endothel	aussprossende Gefäße/ proliferierendes Endothel	verschlossene Gefäße/ pyknotisches Endothel
Kapillarenquantität	normale Zellzahl	erhöhte Zellzahl	erhöhte Zahl degenerierter Gefäße

Tab. 4: Auswertungsschema für Fibroblasten- und Kollagenqualität HE-gefärbter Schnitte

Fibroblastenqualität	Tote Zellen/ Kernpyknose	Sekretorisch aktive Zellen/ große, runde Form	Normale Zellen/ Spindelform
Kollagenqualität	Hyalinisierte Bereiche	Unorganisierte Bereiche	Laminar (normal) arrangierte Bereiche
Kollagenqualität (Polarisationsmikroskop)			
Score 1-9			
9	100 %	0 %	0 %
8	75 %	25 %	0 %
7	50 %	50 %	0 %
6	25 %	75 %	0 %
5	0 %	100 %	0 %
4	0 %	75 %	25 %
3	0 %	50 %	50 %
2	0 %	25 %	75 %
1	0 %	0 %	100 %

2.9.3 Polarisationsmikroskopie

Durch den Einsatz zweier Polarisationsfilter im Strahlengang können die lichtdrehenden Eigenschaften eines dazwischen platzierten Gewebes sichtbar gemacht werden. Da Kollagen stark lichtdrehende Eigenschaften besitzt, ist es für die Polarisationsmikroskopie besonders geeignet.

Anhand von Helligkeit und Morphologie des Bildes können Rückschlüsse auf den Ordnungszustand der Fasernstruktur gezogen werden. Die Proben wurden nach dem selben Schema wie auch die Kollagenqualität im HE-Score (siehe Tab. 3) bewertet.

2.9.4 Feulgen-Färbung

Mit der Feulgenfärbung wird Desoxyribonucleinsäure in einem violetten Ton gefärbt. Die Reaktion findet dabei sowohl mit intakter als auch defekter DNA statt, weshalb man sie zwar als unselektive, aber spezifische Kernfärbung bezeichnen kann. Zu Beginn führt man die Schnitte wie in 2.12.2 beschrieben durch die Alkoholreihe bis zum Aqua dest.. Danach inkubiert man die Objektträger für 8 Minuten in 1N HCl bei 60 °C. Anschließend werden die Schnitte für zwei Minuten mit Aqua dest. gespült und dann für 45 Minuten in ein Gefäß mit „Schiff's Reagenz“ (Leukoparafuchsin) gegeben. Nach fünfminütiger fließender Wässerung kann mit der aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 2.12.2) begonnen werden. Die Proben werden anschließend mit Kanadabalsam eingedeckt.

Auswertung

Die in der Feulgen Reaktion violett gefärbten Kerne wurden mit Hilfe von spezieller Software ausgezählt (siehe 2.13.2) und dokumentiert. Es wurden zwei repräsentative Bildausschnitte von je 30.000 μm^2 pro Schnitt angefertigt und analysiert. Dabei wurde der Mittelwert der Kernanzahl pro Präparat ermittelt.

2.9.5 Apoptose (TUNEL-Labeling)

Apoptose induziert eine Kaskade biochemischer Reaktionen, die unter anderem auch eine bekannte Fragmentierung der DNA Doppelhelix bewirkt. An die freien

endständigen 3'-OH Gruppen der neu entstandenen Fragmente bindet ein Fragment End Labeling Assay Biotin markierte Deoxynukleotide (TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Cat. No.: QIA33, Oncogene™ Research Products, Boston, MA 02118 USA). Es handelt sich dabei um die TUNEL-Methode des In-Situ-Labeling. Die biotin-markierten Deoxynukleotide können dann mit einer Streptavidin- Horseradish- Peroxidase (HRP) konjugiert, und anschließend mit DAB sichtbar gemacht werden. Prinzipiell sind sowohl die Intensität der Färbung, als auch die eingangs beschriebenen morphologischen Veränderungen bei der Auswertung zu berücksichtigen. Alle in 2.12.4.1 genannten Substanzen sind Bestandteil des FragEL™ -Kit.

Die Schnitte werden in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Danach werden sie mit TBS Puffer gespült (20 mM Tris bei pH 7,6 mit 140 mM NaCl). Die Proben wurden für 20 Minuten mit je 100 µl Proteinase K (1 ml Proteinase K Stammlösung mit 99 µl 10 mM Tris) inkubiert, und anschließend drei mal zwei Minuten gespült. So wird die Permeabilität des Gewebes erhöht. Eine Positivkontrolle die zusätzlich noch für zwanzig Minuten mit Dnase (1 µg/ µl DNase in 1 x TBS/ 1 mM MgSO₄) inkubiert, wird ständig mitgeführt.

Die Proben werden für fünf Minuten mit je 100 µl 3%igem, in Methanol verdünntem H₂O₂ inkubiert um die endogenen Peroxidase zu inaktivieren. Anschließend wurde drei mal zwei Minuten mit TBS gespült. Alle Schritte werden in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Zu Beginn der Äquilibrierungs- bzw. Markierungsreaktion wird die ganze Probe für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 100 µl 1 x TdT Puffer (20 µl 5x TdT Buffer mit 80 µl Aqua dest.) inkubiert. Anschließend werden 60 µl des Markierungs-Reaktions-Enzym-Gemisches (3µl TdT Enzym mit 57 µl TdT Labeling Reaction Mixture) je Probe aufgetragen und anschließend sofort mit Parafilm® -Folien in Probengröße abgedeckt. Diese schützen den Mix während der eineinhalbstündigen Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer vor dem Austrocknen. Anschließend werden die Folien sehr behutsam wieder von den Schnitten entfernt, und diese dann drei mal zwei Minuten mit TBS gespült. Die Markierungsreaktion wird durch fünfminütige Inkubation mit je 100 µl Stop

Solution bei Raumtemperatur beendet. Die Proben werden nochmals für drei mal zwei Minuten mit TBS gespült, und anschließend für 10 Minuten mit je 100 µl Blocking Buffer inkubiert.

Um das TUNEL-Labeling farblich sichtbar zu machen, werden die Schnitte zuerst für 30 Minuten mit 100 µl 1x Conjugat (2 µl 50x Conjugat + 98 µl Blocking Puffer) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit TBS gespült. Danach werden die Schnitte mit je 100 µl DAB (1 Tablette DAB + 1Tablette H₂O₂/ Urea in 1 ml Leitungswasser) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend werden die Proben mit Aqua dest. gespült, durch die aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol geführt und mit Eukitt® eingedeckt.

Auswertung

Es wurden zwei repräsentative Bildausschnitte von je 30.000 µm² pro Schnitt angefertigt und analysiert. Die selektiv angefärbten apoptotischen Kerne wurden mit Hilfe der Bildanalyse ausgezählt. Dabei wurde der Mittelwert der Kernanzahl pro Präparat ermittelt. Da die Ergebnisse mit der Kernzahl aus der Feulgen Reaktion verglichen werden sollten, wurden identische Analysebedingungen gewählt (siehe 2.12.3).

2.9.6 Neurofilament (Immunhistochemie)

Es wurde ein monoklonaler IgG1 Antikörper aus Maus gegen humanes Neurofilament eingesetzt (DAKO® Monoclonal Mouse, Anti-Human Neurofilament Protein, Clone 2F11, Code No. M0762, DAKO® Corporation, USA), der eine Kreuzreaktivität mit Neurofilament von Ratten und Kaninchen besitzt. Reaktionssubstrat ist vor allem die phosphorylierten Form der 70 kDA NF-L Untereinheit des neurofilamentären Tripletproteins. Dies ist eines der drei, überwiegend in Neurofilament vorhandenen, Polypeptide. Der Antikörper markiert somit den Hauptbestandteil des axonalen Zytoskeletts.

Um eine Demaskierung des Gewebes zu erreichen, wurde ein „Steamer“ (BRAUN Multigourmet plus) eingesetzt, der 70 Minuten bei 95 °C vorgeheizt

wurde. Anschließend inkubieren die Proben für 40 Minuten im erhitzten T-R-Puffer um die Färbung zu intensivieren.

Nach Abkühlung wird kurz mit Aqua dest gespült. Durch zwanzigminütige Inkubation mit Peroxidase Blocking Reagent (DAKO® Peroxidase Blocking Reagent, S2001) wurde die endogene Peroxidase deaktiviert. Die Proben werden wiederum mit Aqua dest. und anschließend mit TBS (DAKO® TBS (Tris-Buffered-Saline) Wash Buffer, S3001) gespült.

Nun wird der primäre Antikörper gegen Neurofilament mit einem Verdünnungsmedium (DAKO® Antibody Diluent, S2022) im Verhältnis 1:400 verdünnt, auf die Probe aufgebracht und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wird mit TBS gespült und für 60 Minuten ein gebrauchsfertiges Detektionssystem (DAKO® EnVision+™, Peroxidase, Mouse, Ready-to-use, Code No.:K4000) aufgebracht. Dabei handelt es sich um ein Immunglobulin (Ig) der Ziege. Anschließend werden die Proben gründlich mit TBS gespült .

Im folgenden Schritt wird ein an den sekundären Antikörper bindender Farbstoff zugesetzt, der somit eine Auswertung ermöglicht. Zu diesem Zweck werden die Proben für 60 Minuten mit AEC+ (DAKO® AEC+ Ready-To-Use, K 3461) inkubiert und danach mit Aqua dest. gespült.

Zur histologischen Übersicht wird mit Hämatoxin nach Mayer gegengefärbt. Die Präparate werden mit Glyceringelatine eingedeckt und zum Aushärten im Kühlschranks gelagert. In allen Färbeserien führten wir je einen Gehirnschnitt und eine native Sehne, beide vom Kaninchen, als positive Kontrolle mit.

Auswertung

Aus jeder entnommenen Sehne wurden drei Schnitte gewonnen und mittels Neurofilament-Antikörper angefärbt. Der Abstand zwischen diesen drei Schnitten betrug jeweils 40 - 60 µm. So wurde weitestgehend gewährleistet, dass neuronale Strukturen nur jeweils in einem der drei parallelen Schnittebenen angetroffen wurden. Mit dem Neurofilament-Antikörper sind färbe-technisch zwar keine korpuskulären, rezeptiven Endkörperchen, wohl

aber deren afferente Axonverbindungen, sowie vasomotorische, efferente Nervenfasern darstellbar. Anschließend wurde die Absolute Anzahl, Lokalisation und Orientierung der Axone ermittelt. Des weiteren erfolgte eine Unterscheidung zwischen einzeln und gruppiert gelegenen Nerven-Fasern. Letztgenannte wurden als Nerven-Bündel erfasst, wenn die beteiligten Axone eine gemeinsame, übergeordnete Struktur erkennen ließen. Es wurde untersucht, ob die Axone innerhalb der ECM oder in Assoziation mit Gefäßen gefunden wurden (siehe Tab. 5). Ferner wurde die Anzahl der Stellen im Präparat ermittelt, an denen sich Verdichtungen neuronaler Strukturen zeigten. Bestand ein eindeutiger morphologischer Zusammenhang zwischen ihnen, wurden die Areale als eine einzige, zusammenhängende Verdichtung („Spot“) gewertet.

Tab. 5: Auswertungsschema neuronaler Strukturen

Typ:	Nervenfaser (einzeln)		Nervenbündel	
Lokalisation:	perivaskulär	Innerhalb der ECM	perivaskulär	Innerhalb der ECM

2.10 Digitale Dokumentation und Bildanalyse

2.10.1 Fotodokumentation von histologischen Präparaten

Das Photomikroskop III (Fa. Carl ZEISS) verfügt außer den üblichen Einstellungen moderner Labormikroskope auch über die Möglichkeit zur Polarisationsmikroskopie. Um alle Färbungen digital archivieren zu können, wurde eine Digitalkamera (Cool SNAP-Pro Digital Kit™ Version 4.0, Media Cybernetics, L.P. 8484 GeorgiaAvenue, Silver Spring, MP 20910 USA) auf dem Mikroskop installiert und an einen Computer (Intel® Pentium III, Microsoft Windows NT©) angeschlossen . Mit Hilfe spezieller Software (Image-Pro® Plus – The Proven Solution™ Version 4.1 for Windows, Media Cybernetics) wurden von allen gefärbten Schnitten repräsentative Bilder zur vollständigen Dokumentation erstellt. Je nach Auswertungsverfahren (siehe 2.12) fand im Anschluss eine weiterführende Bildbearbeitung statt (siehe unten).

2.10.2 Computer-gestützte Bildanalyse

Alle Bilder die zur Ermittlung der jeweiligen Kernanzahl gespeichert wurden, hatten eine Größe von ca. 200 x 150 μm . Dies entspricht einer Fläche von 30.000 μm^2 . Die Software (Image-Pro® Plus – The Proven Solution™ Version 4.1 for Windows, Media Cybernetics) erkennt und zählt angefärbte Kerne. Nach der Reduzierung des Hintergrundes im Menüpunkt „count/ size“, wählte man mit der „Pipettenfunktion“ manuell einen Bereich eines gefärbten Kerns aus, der fortan als Referenzfarbspektrum für die Kerne der jeweilige Probe diente. Aufgrund dieser Referenz kreiste das Programm nun jeden in Frage kommenden Kern farbig ein. Zusätzlich wurde dem Programm eine Mindestgröße der zu zählenden Objekte von 100 Pixeln vorgegeben. So konnte die Zahl der gefärbten Kerne, unter Ausschluss von Artefakten und kontinuierlicher Sichtkontrolle des Untersuchers ausgezählt bzw. überprüft werden.

2.11 Statistik

Für die Statistischen Test stand ein Computerprogramm (Statistical Package for Social Science, Version 11.0, © by SPSS Inc. Chicago, Illinois) zur Verfügung. Die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen wurden mittels deskriptiver Statistik ermittelt. Da nicht von einer Normalverteilung der Daten auszugehen war, wurde als Test für nichtparameterische unverbundene Stichproben der Mann-Whitney-Test ausgewählt. Um Korrelationen zwischen den Parametern aufzudecken wurde der Spearman-Rho-Test durchgeführt. Als Grenzwert, der auf einen signifikanten Unterschied hinwies, wurde der Wert $p \leq 0,05$ gewählt. Für einen hochsignifikanten Unterschied musste $p \leq 0,01$ betragen. Wahrscheinlichkeitswerte von $p \leq 0,1$ wurden als Trend beschrieben. Die semiquantitativen Scores werden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Zell-counts in Kap 3.1.2 und 3.1.3 sind als Median und Inter-Quartil-Ranges angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Fibroblasten

3.1.1 Score an Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitten

3.1.1.1 Histologische Auswertung gemäß der Beobachtungszeitpunkte

Kontrollen

Die Fibroblasten in den Kontrollsehnen zeigen ein spindelförmiges Aussehen mit relativ dunkel angefärbten Kernen von etwa 10 - 20 μm Länge und ca. 1 – 2 μm Breite. Die Kerne sind zwischen den gewellten Kollagenfaserbündeln, in Längsrichtung der Sehne hintereinander angeordnet. Daraus resultiert ein ebenfalls gewelltes Streifenmuster mit einem Abstand von ca. 20 - 40 μm zwischen den Kernreihen. Die zytoplasmatischen Fortsätze sowie der perinukleäre Zytoplasmasaum der einzelnen Zellen sind aufgrund ihres eosinophilen Färbeverhaltens kaum von den umgebenden Kollagenfasern zu unterscheiden. Es findet sich keine nennenswerte Kernpolymorphie in den Kontrollsehnen. Das mikroskopische Bild ist insgesamt sehr homogen (siehe Abb. 16 A). Der Score für die Fibroblasten der Kontrollsehnen beträgt $1,08 \pm 0,19$ (im folgenden jeweils: Mittelwert \pm Standardabweichung) bei $n = 12$.

Postoperativ

Nach der Behandlung der Sehnen mit ETACS zeigen sich im Vergleich zu den Kontrollen deutliche Alterationen des histologischen Bildes. Die Ausrichtung der Kerne entlang der Faserverlaufsrichtung ist nicht verändert, wohingegen ihr Breitendurchmesser deutlich verringert ist. Dieser Strukturverlust geht mit welligen und unregelmäßigen Kernkonturen im Sinne einer Kernpyknose einher, die typischerweise im Rahmen von apoptotischen Mechanismen auftritt. Es finden sich auch gehäuft karyorrhektische Kerne (siehe Abb. 16 B, 17 A und B). Entsprechend hoch ist der postoperative Score von $6,75 \pm 0,69$ ($n = 6$).

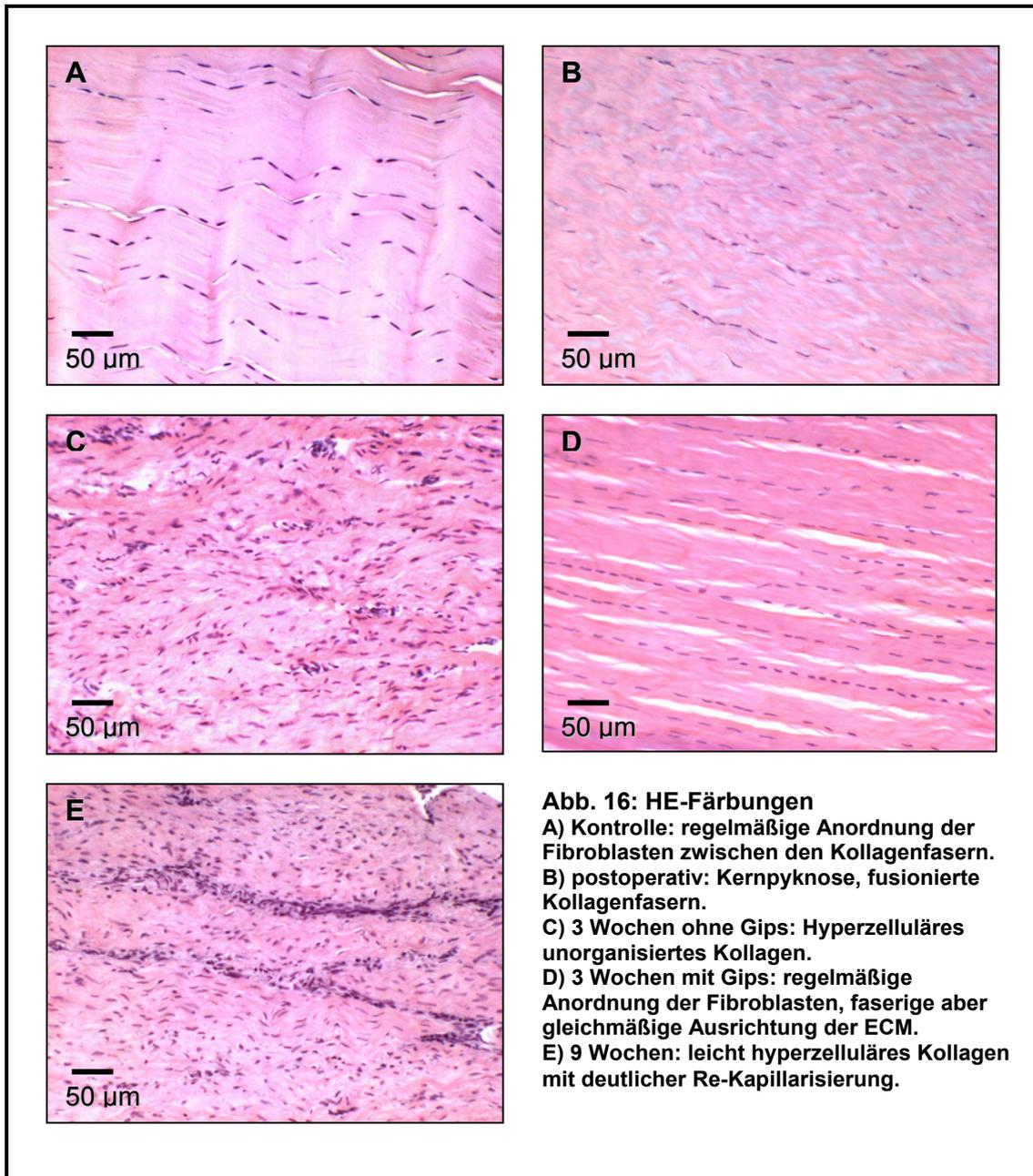
3 Wochen nach ETACS

3 Wochen nach der Behandlung zeigt sich in der mobilisierten wie in der nichtmobilisierten Gruppe eine deutliche Hyperzellularität gegenüber den Kontrollen. Es handelt sich bei den angefärbten Kernen nicht ausschließlich um immigrierende proliferierende Fibroblasten, sondern auch um Entzündungszellen als morphologisches Korrelat eines konsekutiven Gewebeumbaus. Letztere machen schätzungsweise weniger als 5 % der Gesamtzellzahl aus. Das normalerweise homogene Reihemuster der Fibroblasten ist fast nicht mehr zu erkennen. Die Fibroblastenkerne folgen keiner übergeordneten Ausrichtung mehr. Dabei ähnelt die Kernorientierung der immobilisierten Sehnen etwas stärker der ursprünglichen Ausrichtung entlang der Zugachse. Die Nuklei der Fibroblasten sind in beiden Gruppen im Aspekt sehr polymorph, was aber hauptsächlich auf die verschiedenen Anchnittswinkel der größtenteils ungeordnet liegenden Fibroblasten zurückzuführen ist. Dieser Eindruck wird durch die heterogene Anordnung des Karyoplasmas verstärkt. Basophilie randständiges Chromatin der funktionell angeschwollenen Nuclei erzeugt ferner eine unscharfe Projektion der Kerngrenzen auf das Okular, wodurch die Kernumrisse etwas verschwommen erscheinen. Im Vergleich der Nachbehandlungsmodi sind die Kerne der nicht mobilisierten Sehnen schmaler und weniger zahlreich als die der mobilisierten Sehnen (siehe Abb. 16 C und D). Die mobilisierte Gruppe verbessert sich im Score auf $3,55 \pm 1,21$ ($n = 10$), die nichtmobilisierte auf $2,813 \pm 1,51$ ($n = 8$). Die statistische Prüfung zeigt keine Signifikanz ($p = 0,37$) zwischen den Scores beider 3-Wochen-Gruppen.

6 Wochen nach ETACS

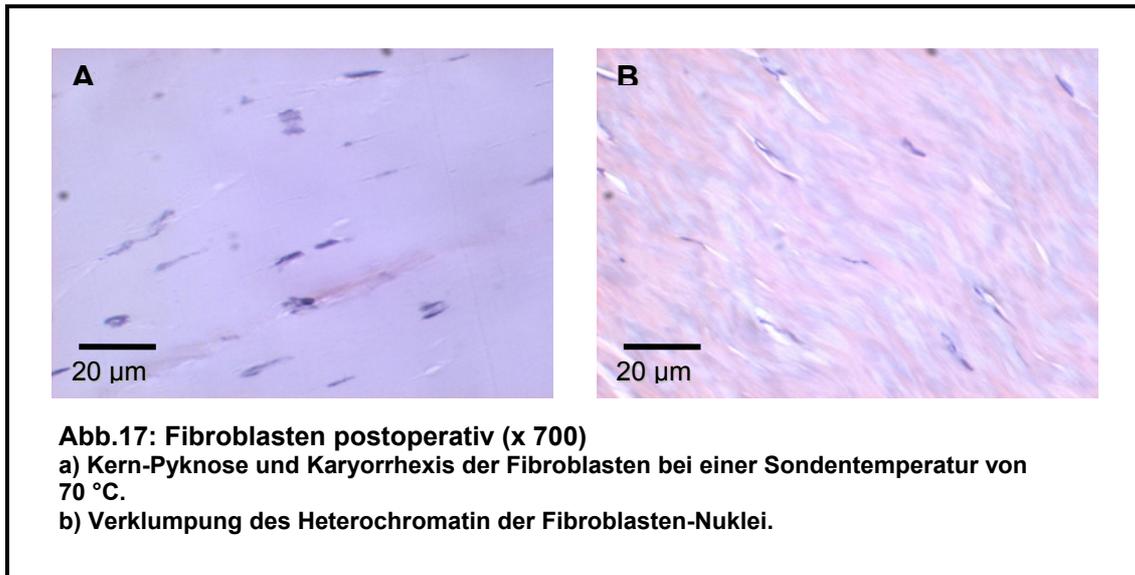
6 Wochen nach der Behandlung ist die Ausrichtung der Fibroblasten in beiden Gruppen wieder deutlich zu erkennen. Die aus den Kontrollen bekannte Orientierung der Kerne in Richtung des Faserverlaufs wird weitgehend erreicht. Auch die Form der Kerne hat sich der Gestalt der Kerne in der Kontrollgruppe weiter angenähert. Die Kerngrenzen (s.o.) sind jetzt schärfer abgrenzbar, bzw.

besser definierbar als nach 3 Wochen. 6 Wochen nach der Operation ist die Spindelform die dominierende Kernvariante. Die durchschnittliche Kernlänge beträgt in beiden Gruppen etwa 15 μm . Vergleicht man zu diesem Zeitpunkt die dauerhaft immobilisierte Gruppe mit der Gruppe, die nach 3 Wochen vom Gips



befreit wurde, fällt in letzterer eine verbreiteter Kerndurchmesser auf. Im Vergleich dazu sind die Kerne der dauerhaft immobilisierten Sehnen filigraner und erhalten einen Score von $2,4 \pm 1,07$ ($n = 10$). Der Score der temporär

immobilisierten Sehnen beträgt $2,85 \pm 0,7$ ($n = 10$). Damit besteht kein signifikanter Unterschied ($p = 0,22$) zwischen den Fibroblastenqualitäten beider 6-Wochen-Gruppen. Unabhängig vom Nachbehandlungsmodus fallen nach 6 Wochen keine Unregelmäßigkeiten der Kerngrenzen mehr auf. Die (temporär) mobilisierten Sehnen besitzen größere Kerne, was auf eine stärker stimulierte Proteinbiosynthese hinweist.



9 Wochen nach ETACS

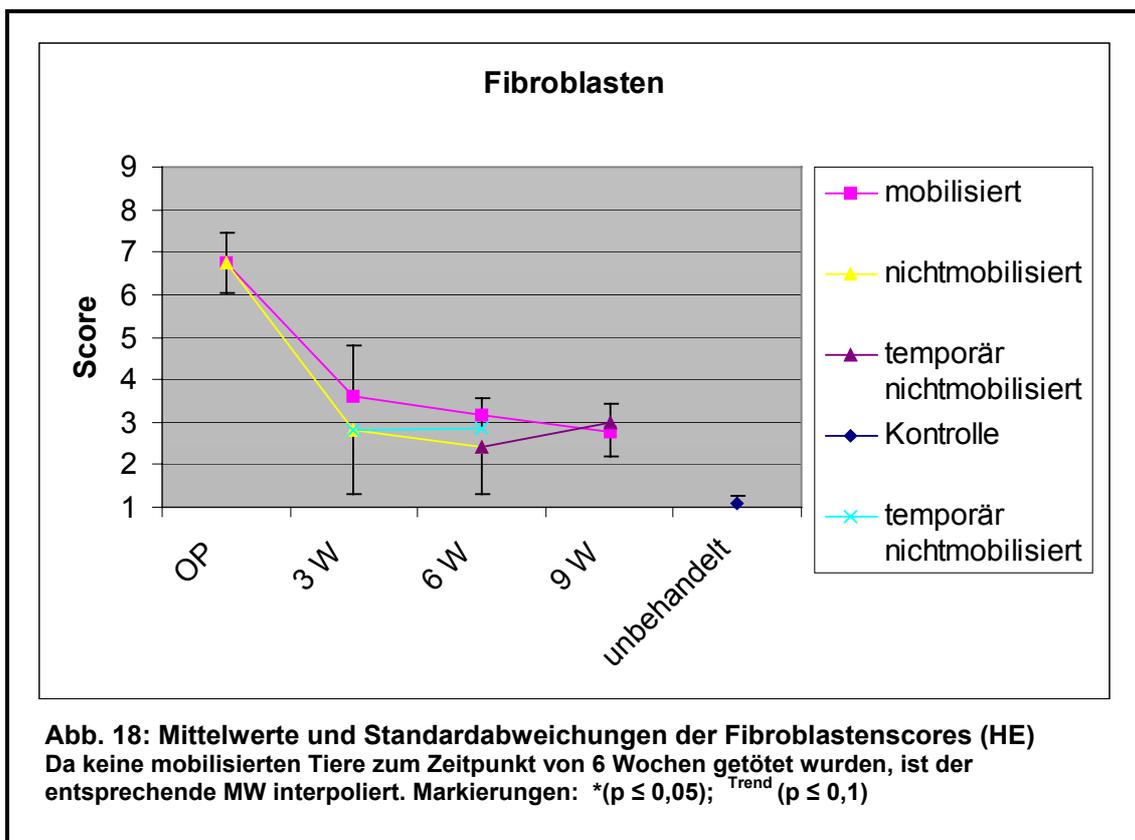
Nach 9 Wochen zeigt sich die deutlichste Annäherung der Kernmorphologie beider 9-Wochen-Gruppen an die Spindelform der Kontrollgruppe. Die Kerne sind gegenüber den Kontrollen insgesamt etwas heterogener, doch ist trotz fortbestehender Hyperzellularität die aus den Kontrollen bekannte lineare Kernorientierung in Reihen von je ca. 20 – 50 µm erkennbar (siehe Abb.16 E). Der Score der dauerhaft mobilisierten Sehnen beträgt $2,75 \pm 0,68$ ($n = 10$), während die temporär immobilisierten Sehnen mit einem Score von $3,00 \pm 0,82$ ($n = 10$) nicht signifikant unterschiedlich bewertet werden.

3.1.1.2 Histologische Auswertung im zeitlichen Verlauf

Die Morphologie der Fibroblasten wird durch ETACS im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen hochsignifikant verändert ($p \leq 0,001$). Von der relativ deutlichen Kernnekrose und dem daraus resultierenden hohen Score der

postoperativen Gruppe regenerieren und proliferieren die Fibroblasten im Zeitraum von 3 Wochen signifikant (beide $p = 0,002$). Zwischen 3 und 6 Wochen zeigt sich keine signifikante Änderung der Scores, unabhängig davon, ob die Tiere nach 3 Wochen von ihrem Gips befreit wurden oder ihn für weitere 3 Wochen behielten. Gleiches gilt für die temporär nichtmobilisierte 9-Wochen-Gruppe, die nur zwischen der 6. und 9. Woche mobilisiert wurde. Betrachtet man 9 Wochen nach der Operation die mobilisierte Gruppe, zeigt sich ebenfalls keine signifikante Verbesserung der histologischen Bewertung gegenüber der mobilen 3-Wochen-Gruppe.

Die einzige statistisch signifikante Verbesserung der Fibroblasten-Scores findet also in den ersten drei Wochen nach ETACS statt. Dabei gibt es keine statistischen Unterschiede zwischen den Nachbehandlungsmodi. Zu keinem Zeitpunkt wird die Qualität der Kontrollgruppe erreicht (alle $p < 0,01$) (siehe Abb.18).

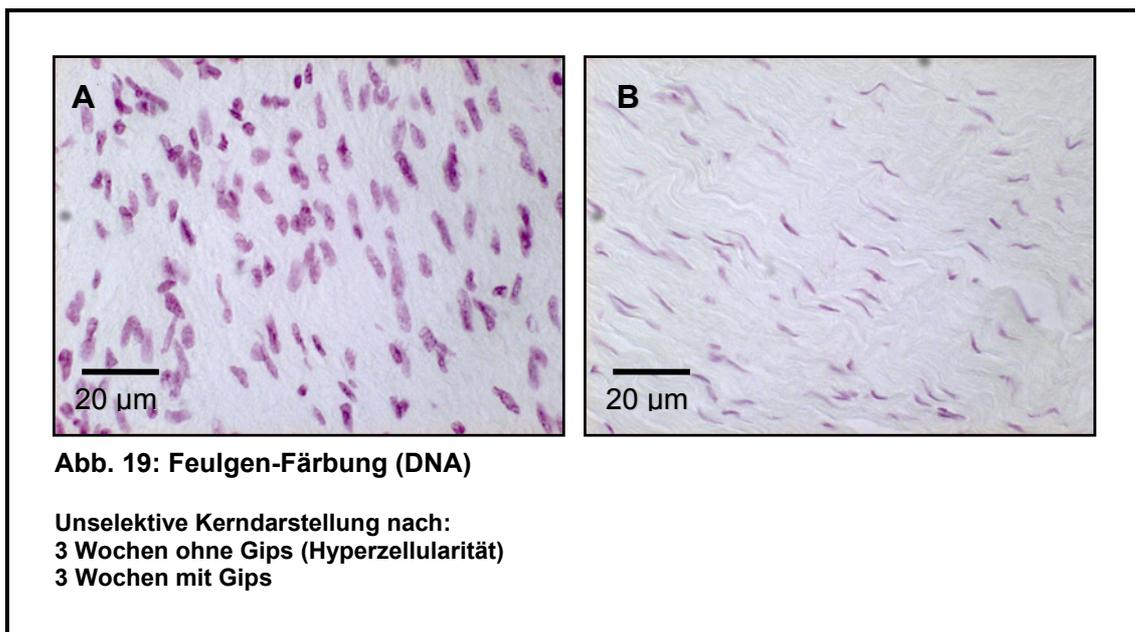


3.1.2 Kernanzahl ermittelt durch die Feulgen-Färbung

Postoperativ

Durch die Feulgen-Reaktion färbten sich alle Zellkerne violett. Die überwiegende Mehrzahl aller Nuklei zeigte ein fibroblasten-typisches Aussehen, unabhängig vom gewählten Untersuchungszeitpunkt. Die Fibroblasten der kontralateralen Kontrollsehnen zeigten die typische Spindelform, ohne Alterationen der Nuklei oder der Zellausrichtung (siehe Abb. 19).

Direkt postoperativ waren in den Nuklei deutliche Alterationen des Chromatin, im Sinne einer Chromatinkondensation, in allen Gewebeproben evident. Die Zellularität der postoperativen Gruppe (Median 43.0/ Inter Quartil Range (IR) 29.3) unterschied sich nicht signifikant ($p = 0.272$) von den unbehandelten Kontrollen (36.5/ IR 18.3) (siehe Abb. 20).

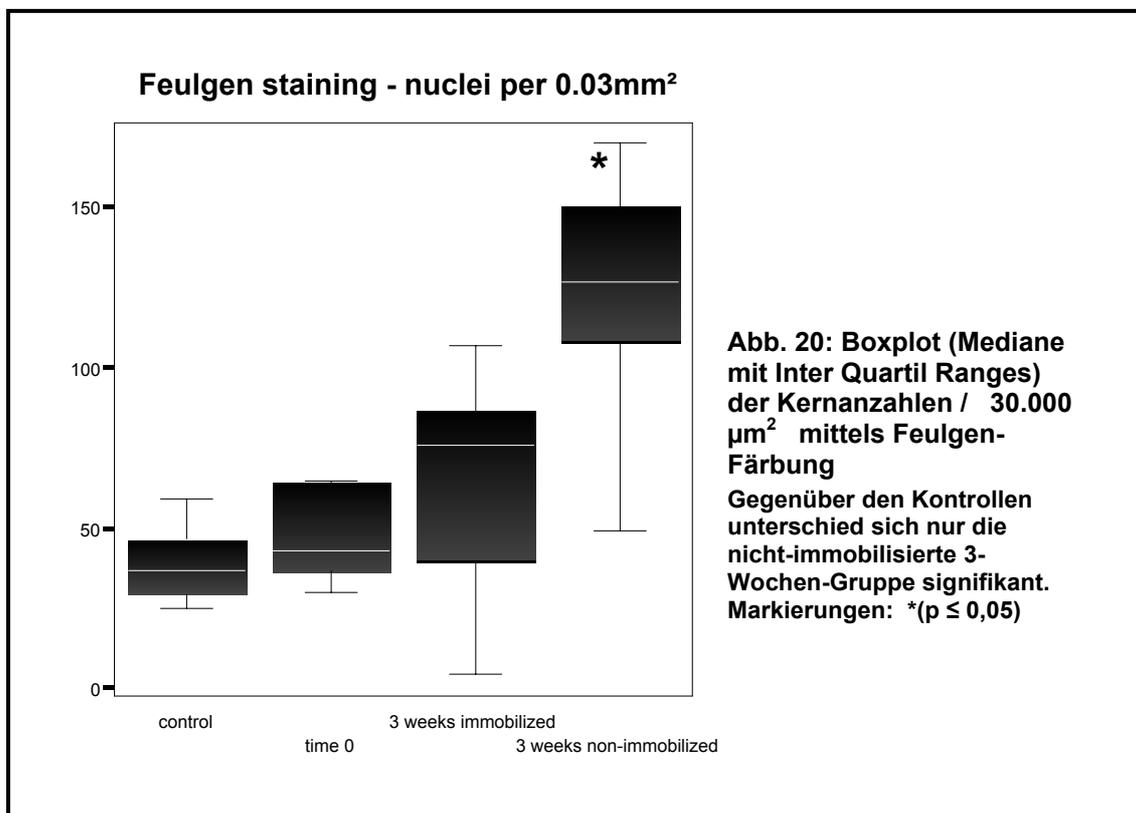


3 Wochen nach ETACS

Drei Wochen nach RF-Behandlung stieg die mediane Zellzahl durchschnittlich auf das 2.1 fache ($p = 0.118$) in den immobilisierten Sehnen (76.0/ IR 58.0), verglichen mit den Kontrollen. Die mediane Zellzahl der nicht-immobilisierten

Sehen (126.5/ IR 46.8) stieg auf das 3,5 fache ($p = 0.001$) im gleichen Zeitraum (siehe Abb. 20).

Der direkte Vergleich zwischen den immobilisierten und den nicht-immobilisierten Sehnen, zum Zeitpunkt 3 Wochen nach der Operation zeigte eine signifikant höhere Zellzahl, wenn keine Immobilisation durchgeführt wurde ($p = 0.006$) (siehe Abb. 20). Die Nuklei der nicht-immobilisierten Zellen hatten eine ovale bis runde Form und zeigten eine verstärkte Färbeintensität, wohingegen die Fibroblasten in immobilisiertem Gewebe spindelförmig waren und sich nur geringfügig stärker als die Kontrollen anfärbten (siehe Abb. 19).



3.1.3 Kernanzahl ermittelt durch Apoptose-Färbung (TUNEL-Labeling)

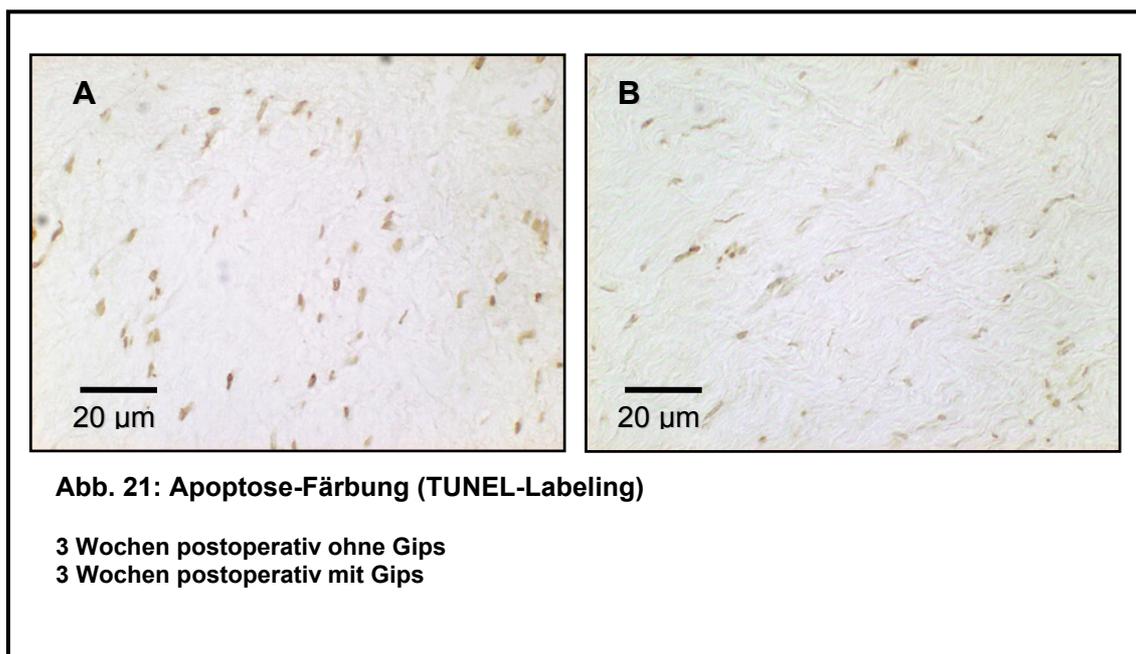
Postoperativ

Im TUNEL-Labeling färbten sich apoptotische Zellen dunkelbraun. Negative Zellen und Kollagenfaserbündel wurden schwach grünlich gefärbt. Die negativ Kontrolle (ohne TdT) zeigten keine braunen Nuklei und bestätigten damit, dass keine spezifischen Antikörper-bindungen in den Negativkontrollen vorlag.

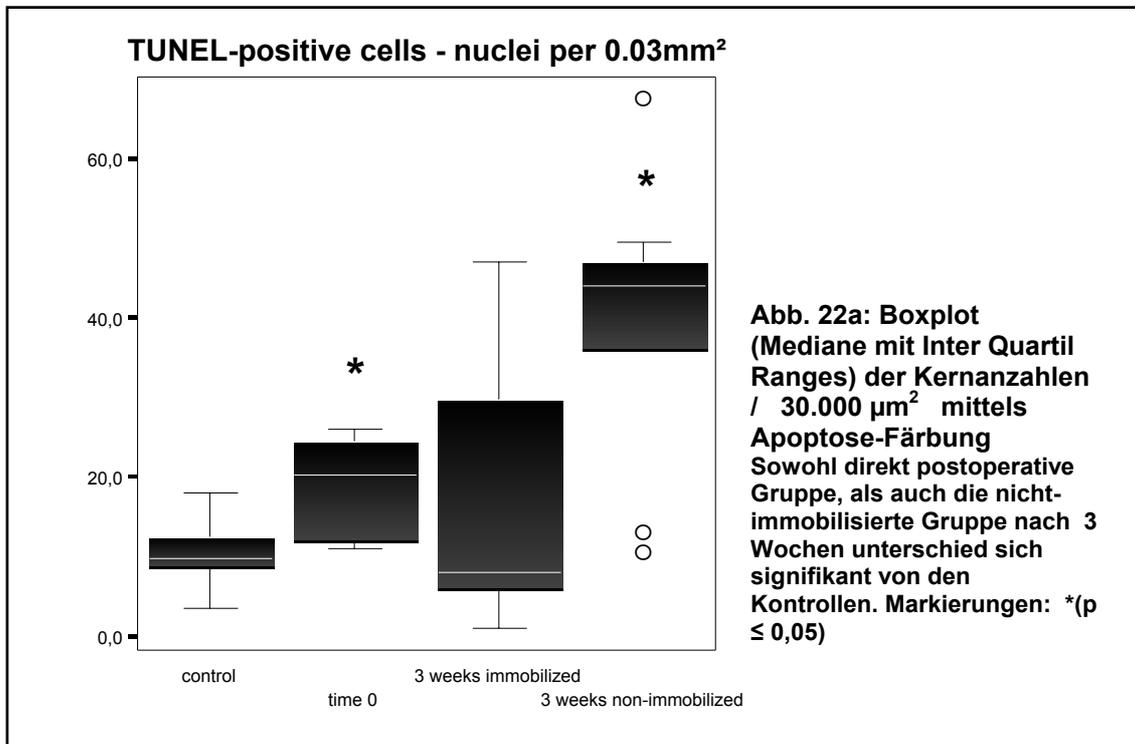
Die computer-assistierte Zellauswertung ergab eine mediane Zellzahl von 9.8/ IR 4.6 TUNEL-positiven Nuklei (pro 0.03mm²) in den Kontrollsehn (siehe Abb. 22 a). Unter Berücksichtigung der absoluten Zellzahl, erfasst durch die Feulgen-Methode, wurde eine Apoptoserate von 29.7 %, IR 14.5 % errechnet (siehe Abb. 22 b).

Die Zahl der positiv TUNEL-gefärbten Fibroblasten stieg statistisch signifikant ($p = 0.017$) von 9.8/ IR 4.6 auf 20.3/ IR 13.1 unmittelbar nach der Applikation von RF-Energie (siehe Abb. 22 a). Alterationen im Verteilungsmuster der TUNEL-gelabelten DNA, im Sinne eines inhomogenen und klumpigen Färbeverhaltens konnte in allen Proben nachgewiesen werden (siehe Abb. 21).

Die errechnete Apoptoserate betrug 40.2 %, IR 7.9 % direkt postoperativ (siehe Abb. 22 b).



Dieser Anstieg der Apoptoserate war statistisch signifikant ($p = 0.01$), verglichen mit den Kontrollen. Die Fibroblasten-ähnlichen Zellen waren gleichmäßig im Gewebe verteilt (siehe Abb. 21).



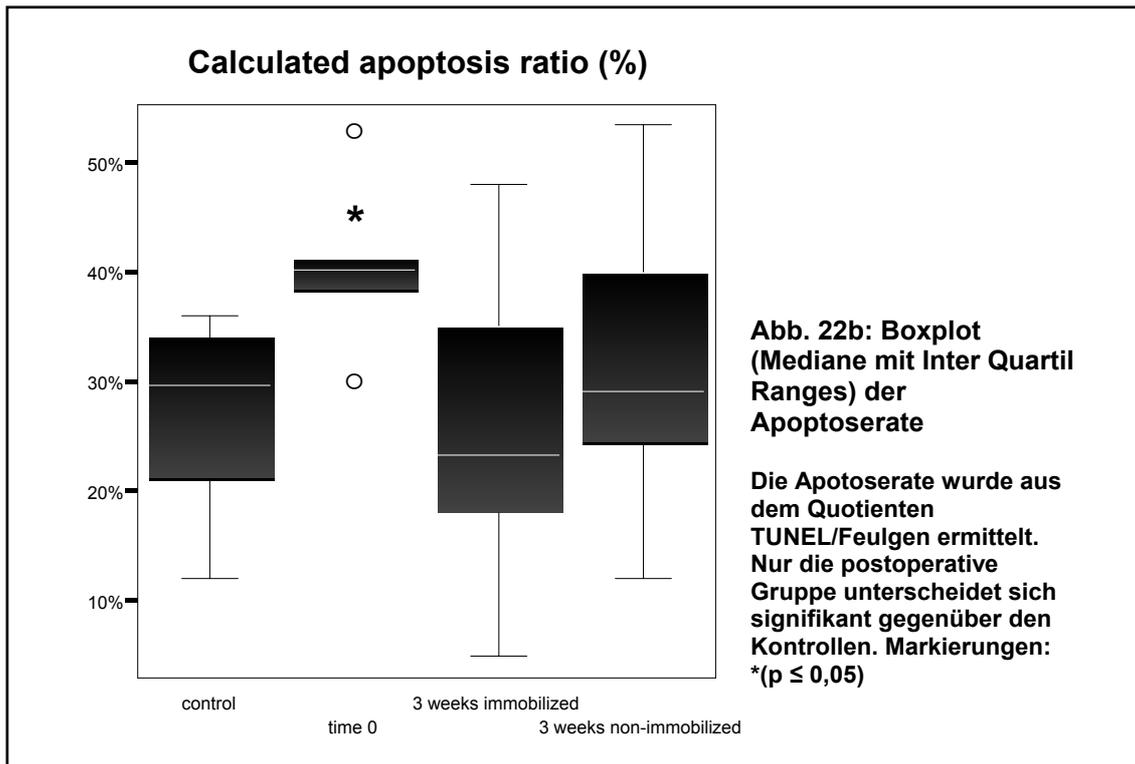
3 Wochen nach ETACS

3 Wochen postoperative stieg die Zahl der apoptotischen Nuklei um das 4,5 fache auf 44.0/ IR 23.8 Zellen pro 0.03 mm² in den nicht-immobilisierten Sehnen, verglichen mit den Kontrollen. Dieser Anstieg war statistisch signifikant ($p = 0.045$). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Kontrollen und den immobilisierten Sehnen (8.0/ IR 31.5) zum gleichen Untersuchungszeitpunkt (siehe Abb. 22 a).

Der direkte Vergleich der immobilisierten und nicht-immobilisierten Sehnen zeigte nach 3 Wochen ein signifikant höheres Level an apoptotischen Zellen wenn die Hinterläufe mobil belassen wurden ($p = 0.039$). Die berechnete Apoptoserate der immobilisierten Gruppe betrug (23.3 %, IR 27.8 %), und war

nicht unterschiedlich ($p = 0.368$), verglichen mit dem Median der nicht-immobilisierten Gruppe (29.2 %, IR \pm 20.5 %) (siehe Abb. 22 b).

In den nicht-immobilisierten Sehnen zeigte das TUNEL-Labeling eher rundliche Nuklei. Unter Immobilisation wurden überwiegend spindelförmige Nuklei gesehen (siehe Abb. 21).



3.2 Kollagen

3.2.1 Score an Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitten

3.2.1.1 Histologische Auswertung gemäß der Beobachtungszeitpunkte

Kontrollen

Die Kontrollsehnen zeigen eine lamellenartige Anordnung der Kollagenfasern in Längsrichtung der Sehnen. Die Faserbündel sind leicht gewellt. Alle Präparate weisen das gleiche homogene eosinophile Färbeverhalten auf (siehe Abb. 16 A).

Postoperativ

Unmittelbar nach ETACS ist die ursprüngliche Konfiguration der Kollagenstruktur nicht mehr nachzuvollziehen. Allein die Ausrichtung der Fibroblastenkerne lässt Rückschlüsse auf den Faserverlauf zu. Die Kollagenfasern sehen wächsern bzw. eingeschmolzen aus und zeigen das morphologische Korrelat einer Koagulationsnekrose. Es fällt eine starke Eosinophilie der extrazellulären Matrix auf, die jedoch unregelmäßiger ist als in den Kontrollen. Die histologische Struktur ist am treffendsten als „Hyalinisierung“ zu beschreiben. Diese Veränderungen betreffen nicht immer das gesamte Präparat, sind aber überwiegend als zusammenhängende Fläche anzutreffen. In vielen dieser hyalinisierten Areale findet man Substanzdefekte, die sich als klaffende Furchen darstellen (siehe Abb. 16 B). Der Score für die Kollagenstruktur der postoperativ gewonnenen Sehnen beträgt $6,917 \pm 0,58$ ($n = 6$) (siehe Abb. 23).

3 Wochen nach ETACS

3 Wochen nach der Behandlung sind die hyalinisierten Areale weitestgehend verschwunden. Allerdings finden sich weiterhin kleine Residuen, die nicht mehr so stark anfärben. Die übrigen Kollagenfasern sind überwiegend unorganisiert. In den Sehnen der immobilisierten 3-Wochen-Gruppe kommen häufiger Bereiche mit lamellenartig angeordneten Kollagenfaserbündeln vor (siehe Abb.

16 C und D). So ergibt sich auch der Score von $2,94 \pm 1,29$ ($n = 8$) im Vergleich zum Score der mobilen Tieren von $4,35 \pm 1,13$ ($n = 10$). Obwohl das Signifikanzniveau mit $p = 0,054$ nicht erreicht wird, liegt hier eine statistische Tendenz bezüglich der Unterschiede zwischen den Nachbehandlungsmodi vor.

6 Wochen nach ETACS

Nach 6 Wochen sind im Vergleich zum Zustand des Kollagen nach 3 Wochen keine wesentlichen Veränderungen festzustellen. Dabei scheint die Wahl der Nachbehandlung keinen Einfluss auf die histologische Bewertung zu haben. Denn mit einem Score von $2,85 \pm 1,4$ ($n = 10$) für die dauerhaft immobilisierten Sehnen im Vergleich zum Score der temporär mobilisierten $3,00 \pm 0,67$ ($n = 10$) besteht kein signifikanter Unterschied.

9 Wochen nach ETACS

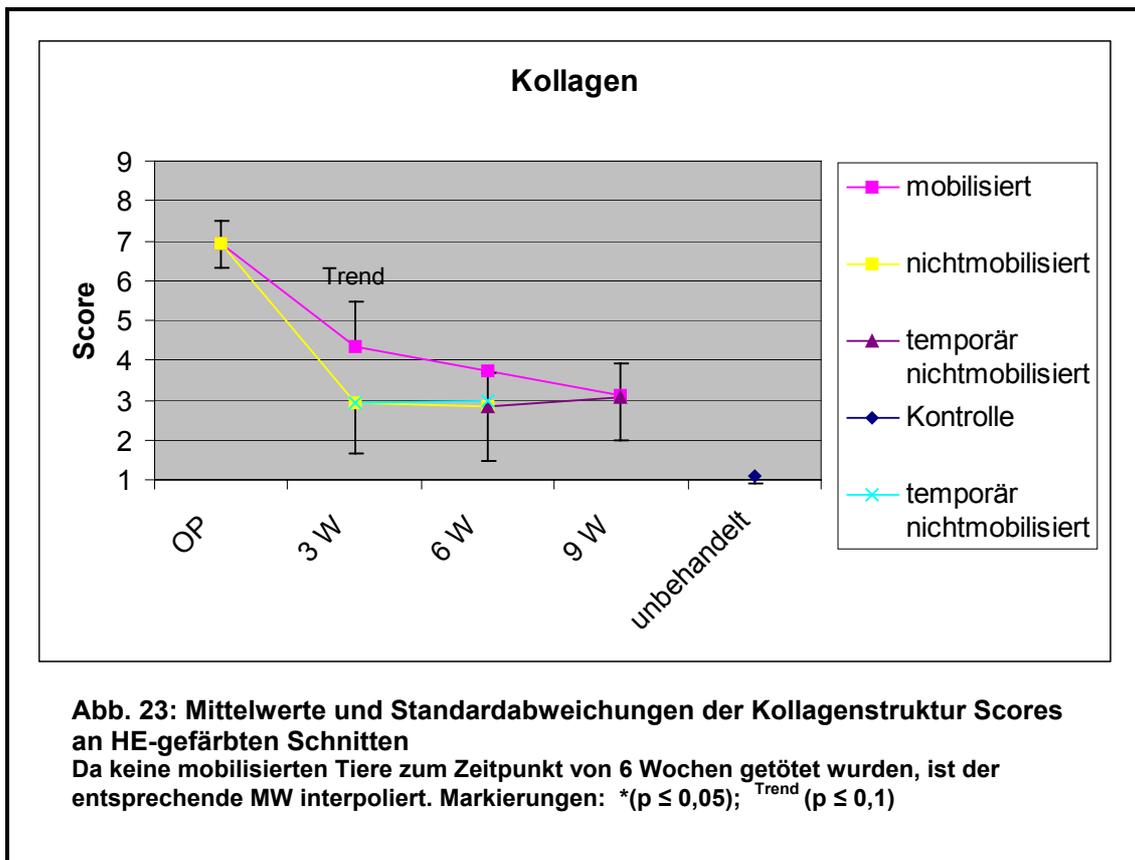
Es bestehen weiterhin sowohl unorganisierte als auch wellig-lamellär arrangierte Bereiche. Die einzelnen Faserbündel sind aber zunehmend schärfer voneinander abgrenzbar. Parallel zur sukzessiv sinkenden Zellularität gewinnt auch die Struktur des kollagenen Gewebes an struktureller Homogenität (siehe Abb. 16 E). Die dauerhaft mobilisierte 9-Wochen-Gruppe erreicht einen Score von $3,10 \pm 0,84$ ($n = 10$). Der Wert in der Gruppe der temporär mobilisierten Tiere beträgt $3,05 \pm 1,04$ ($n = 10$). Der Unterschied beider Gruppen erreicht kein signifikantes Niveau.

3.2.1.2 Histologische Auswertung im zeitlichen Verlauf

Die Kollagenfaserbündel werden durch die Behandlung mit thermischer Energie stark in ihrer fibrillären Architektur verändert. Diese Alterationen besitzen höchste Signifikanz ($p < 0,001$). Sowohl die mobilisierte als auch die nichtmobilisierte 3-Wochen-Gruppe kann sich zum postoperativen Score signifikant verbessern (siehe Abb. 23).

Zwischen 3 und 6 Wochen zeigt sich keine signifikante Änderung der Scores, unabhängig davon ob die Tiere nach 3 Wochen von ihrem Gips befreit wurden oder ihn für weitere 3 Wochen behielten. Betrachtet man die mobilisierte Gruppe 9 Wochen nach ETACS, zeigt sich eine signifikante ($p = 0,022$)

Verbesserung der Kollagenstruktur gegenüber der mobilen 3-Wochen-Gruppe, aber kein signifikanter Unterschied zur temporär nichtmobilisierten 9-Wochen-Gruppe. Zu keinem Zeitpunkt ergaben die statistischen Tests einen signifikanten Unterschied zwischen den Nachbehandlungsmodi. Allerdings existiert zwischen beiden 3-Wochen-Gruppen deutlicher Trend ($p = 0,054$). Zu keinem Zeitpunkt während der Nachbehandlung erreicht eine Tiergruppe die Kollagenqualität der Kontrollgruppe ($p \leq 0,001$).



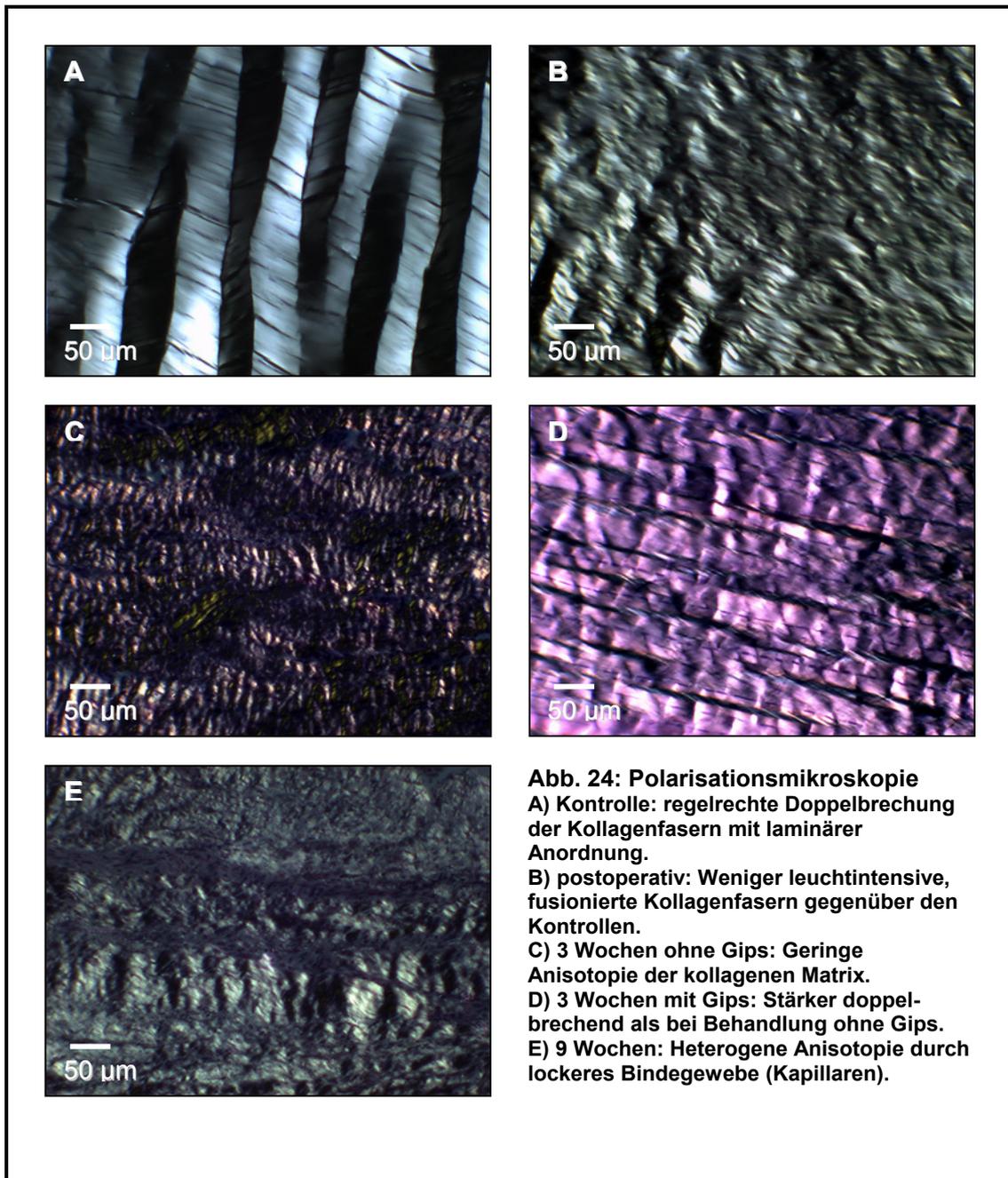
3.2.2 Score mittels Polarisationsmikroskopie

3.2.2.1 Histologische Auswertung gemäß der Beobachtungszeitpunkte

Kontrollen

Alle unbehandelten Sehnen zeigen eine wellenförmiges Doppelbrechungsmuster. Der direkte Vergleich mit den HE-gefärbten Präparaten bestätigt, dass es sich um die bereits beschriebene, wellig-lamelläre

Anordnung der Kollagenfasern handelt. Dabei sind besonders die extremen Umschlagsstellen (Richtungsänderung der kristallinen Matrix) scharf abgewinkelt. Diese stellen im Polarisationsmodus eine zweite, streng geordnete Orientierung dar, die zur Faserverlaufsrichtung exakt um 90° gedreht ist.



Die hell leuchtenden anisotropen Kollagenfasern werden im Abstand von 20 – 50 μm von ca. 2 – 5 μm breiten dunklen Streifen durchsetzt. Dabei handelt es

sich um lockeres Bindegewebe des Peritendineum internum (siehe Abb. 24 A). Ausnahmslos alle Kontrollen entsprechen dieser Beschreibung, so dass sich ein Score von $1,00 \pm 0,00$ ($n = 6$) ergibt (siehe Abb. 25).

Postoperativ

Nach der RF-Behandlung ist die ursprüngliche Architektur der Sehnen nicht mehr nachzuvollziehen. Auch die Ausrichtung der Faserbündel ist nur in Kombination mit den HE-Präparaten eindeutig zu klären. Die Fasern sind im Aspekt miteinander fusioniert. Auch die Leuchtintensität der Doppelbrechung ist stark abgeschwächt (siehe Abb. 24 B). Der Score der Kollagenstruktur unter polarisationsmikroskopischer Betrachtung beträgt $6,0 \pm 1,1$ ($n = 6$).

3 Wochen nach ETACS

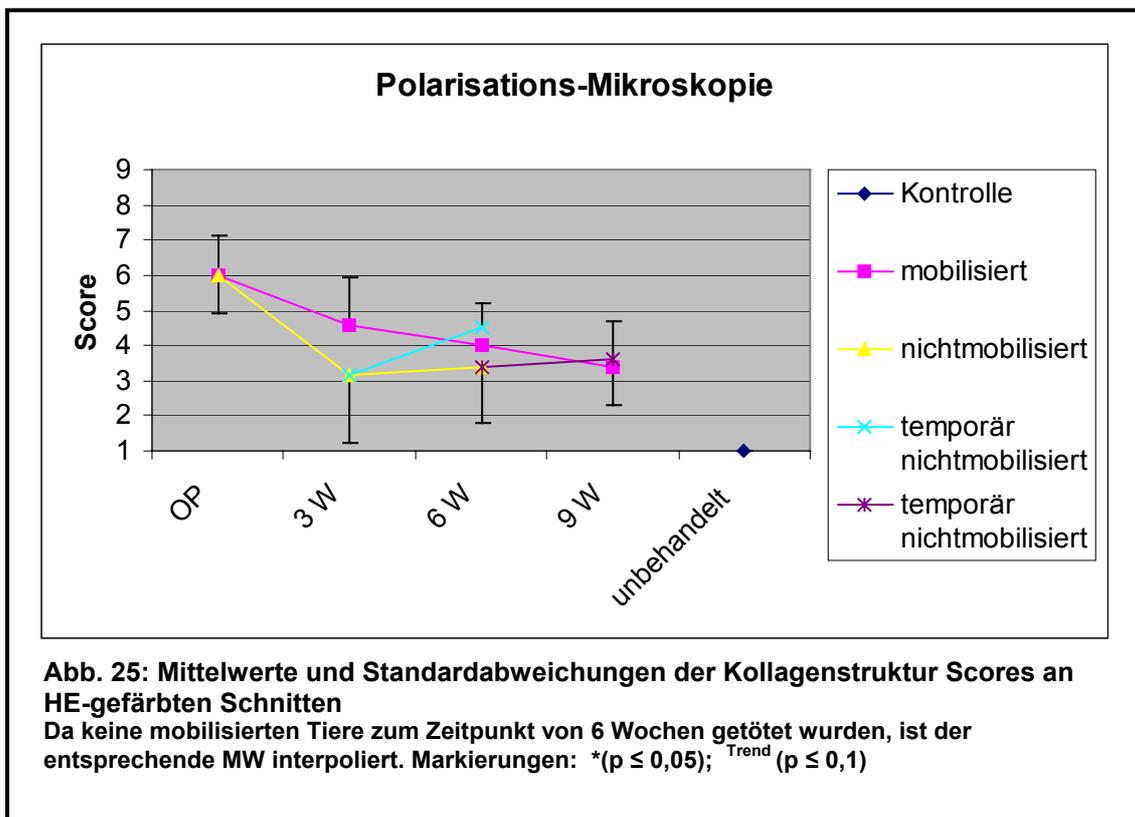
Nach 3 Wochen ist die anisotrope Leuchtintensität nochmals deutlich reduziert. Vereinzelt finden sich kleine Areale, an denen das Phänomen der Doppelbrechung noch sichtbar ist. Die Kollagenfasern verlaufen ungeordnet, oder befinden sich noch in der postoperativen Konfiguration (siehe Abb. 24 C und D). Der Score für doppelbrechende Kollageneigenschaften der mobilen Gruppe von $4,69 \pm 1,35$ ($n = 10$) ist vom Score der immobilen Gruppe nicht signifikant ($p = 0,117$) verschieden. Letztgenannte Gruppe wird mit $3,13 \pm 1,89$ ($n = 8$) bewertet.

6 Wochen nach ETACS

6 Wochen postoperativ zeigt die temporär nichtmobilisierte Gruppe das gleiche histologische Bild wie schon, unabhängig von der Nachbehandlung, 3 Wochen zuvor beschrieben. Der Score beträgt $4,5 \pm 0,71$ ($n = 10$). Die dauerhaft nichtmobilisierten Tiere wurden mit $3,4 \pm 1,58$ ($n = 10$) bewertet. Auffallend ist in dieser Gruppe vor allem eine deutliche Steigerung der anisotropen Leuchtintensität. Die Architektur der Kontrollen wird jedoch nicht erreicht. Auch im direkten Vergleich zur temporär nichtmobilisierten Gruppe ergeben die statistischen Tests kein signifikantes ($p = 0,12$) Niveau, obwohl der p-Wert einem Trend recht nahe kommt.

9 Wochen nach ETACS

Innerhalb beider 9-Wochen-Gruppen existieren größere qualitative Unterschiede, welche die großen Standardabweichungen erklären. Das Spektrum der vorgefundenen Kollagenqualitäten, charakterisiert durch die Leuchtstärke, reicht von mittel bis hell. Auch die Faserausrichtung ist größtenteils abgeschlossen. Der Score der mobilisierten Sehnen beträgt $3,40 \pm 1,27$ ($n = 10$), der Score der temporär nichtmobilisierten $3,60 \pm 1,265$ ($n = 10$). Es sind keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,69$) zwischen den Nachbehandlungsmodi vorhanden.



3.2.2.2 Histologische Auswertung im zeitlichen Verlauf

Die anisotropen Eigenschaften der Kontrollen wurden durch die RF-Behandlung höchstsignifikant ($p < 0,001$) verändert. 3 Wochen später sind sowohl die Scores der Kollagenstruktur mobilisierter als auch der nichtmobilisierten Gruppen signifikant ($p = 0,049$) bzw. hochsignifikant ($p = 0,005$) verbessert.

Zwischen 3 und 6 Wochen verschlechtern sich die Scores beider Nachbehandlungsgruppen rein optisch, jedoch besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Nachbehandlungsmodi. Es scheint statistisch gesehen also ohne Konsequenz zu sein ob die Tiere nach 3 Wochen von ihrem Gips befreit werden oder ihn für weitere 3 Wochen behalten. Beide Gruppen sind im Vergleich zu den postoperativen Sehnen höchstsignifikant ($p < 0,001$) verschieden, was auf einen deutlichen Regenerationsprozess der Sehnen hinweist. Im postoperativen Verlauf zwischen 6 und 9 Wochen ändert sich die Beurteilung der temporär nichtmobilisierten 9-Wochen-Gruppe nicht signifikant gegenüber dem Score der dauerhaft nichtmobilisierten 6-Wochen-Gruppe. Innerhalb der mobilisierten Gruppen zwischen 3 und 9 Wochen nach ETACS verbessern sich die polarisationsmikroskopischen Eigenschaften nicht signifikant, es zeigt sich jedoch ein deutlicher Trend ($p = 0,06$).

Zu keinem Zeitpunkt ist ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Nachbehandlungsmodi evident. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes von 9 Wochen erreicht keine Gruppe den Polarisationmikroskopischen Score der Kontrollen ($p \leq 0,001$).

3.3 Vaskularisierung

3.3.1 Kapillarenzustand

3.3.1.1 Score an Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitten

3.3.1.1.1 Histologische Auswertung gemäß der Beobachtungszeitpunkte

Kontrollen

Das kapilläre Endothel der Kontrollsehnen ist durch spindelförmige, schmale Kerne von ca. $0,5 \times 3 \mu\text{m}$ charakterisiert. Diese sind der Länge nach hintereinander angeordnet. Ausnahmslos alle Kapillaren (100 %) entsprechen dieser Beschreibung. Der Score (siehe Abb. 27) für die Bewertung des histologischen Kapillarenzustandes beträgt aufgrund deren Homogenität in den Kontrollsehnen $1,00 \pm 0,00$ ($n = 12$).

Postoperativ

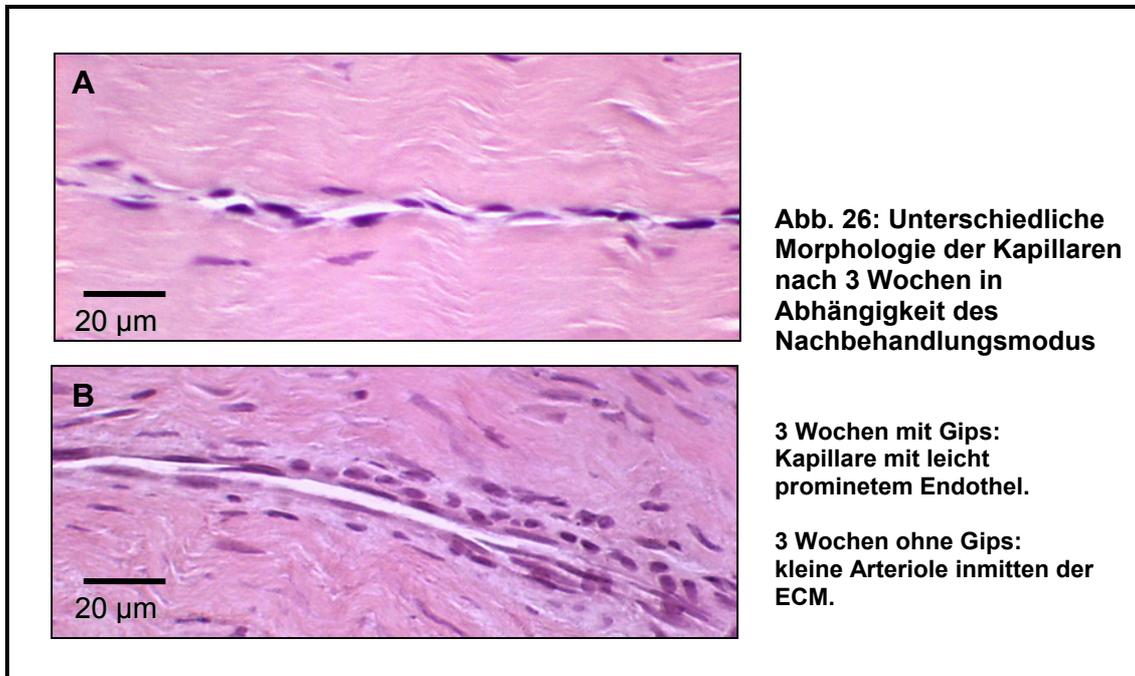
Nach der Behandlung mit ETACS zeigt sich eine Verschmälerung der endothelialen Kerne, die mit Alterationen deren Struktur bzw. Kerngrenzen einher gehen, und den morphologischen Veränderungen der Fibroblasten entsprechen. Das in den Kontrollen gut abgrenzbare Lumen ist nur noch teilweise zu identifizieren. Nahe der periostalen Insertionsstellen finden sich vollständig thrombosierte Arteriolen. Über 90 % der kapillären Endothelien erscheinen im Aspekt pyknotisch. Der Score für die postoperativ entnommenen Sehnen fällt mit $2,83 \pm 0,41$ ($n = 6$) entsprechend schlecht aus.

3 Wochen nach ETACS

3 Wochen nach der Operation sind keine pyknotischen Kerne mehr zu sehen. Die Endothelzell-Nuclei der mobilen Gruppe sind breiter und runder als die der immobilisierten Gruppe. Ferner findet man nicht ausschließlich Kapillaren, sondern auch vereinzelt kleine Arteriolen innerhalb der ECM (siehe Abb. 26).

Für die Gruppe der immobilisierten Sehnen ergibt sich ein Score von $1,38 \pm 0,44$ ($n = 8$). Der Großteil (63 %) der Präparate besitzt ein normal konfiguriertes Endothel (siehe Abb. 25).

Der Score der mobilen Gruppe beträgt $1,95 \pm 0,28$ ($n = 10$). Hier sind in etwa 85 % der Proben die Endothelzell-Nuklei vergrößert und nur ca. 6 % normal konfiguriert. Der statistische Test bestätigt einen signifikanten Unterschied ($p = 0,009$) zwischen den Nachbehandlungsmodi beider 3-Wochen-Gruppen.



6 Wochen nach ETACS

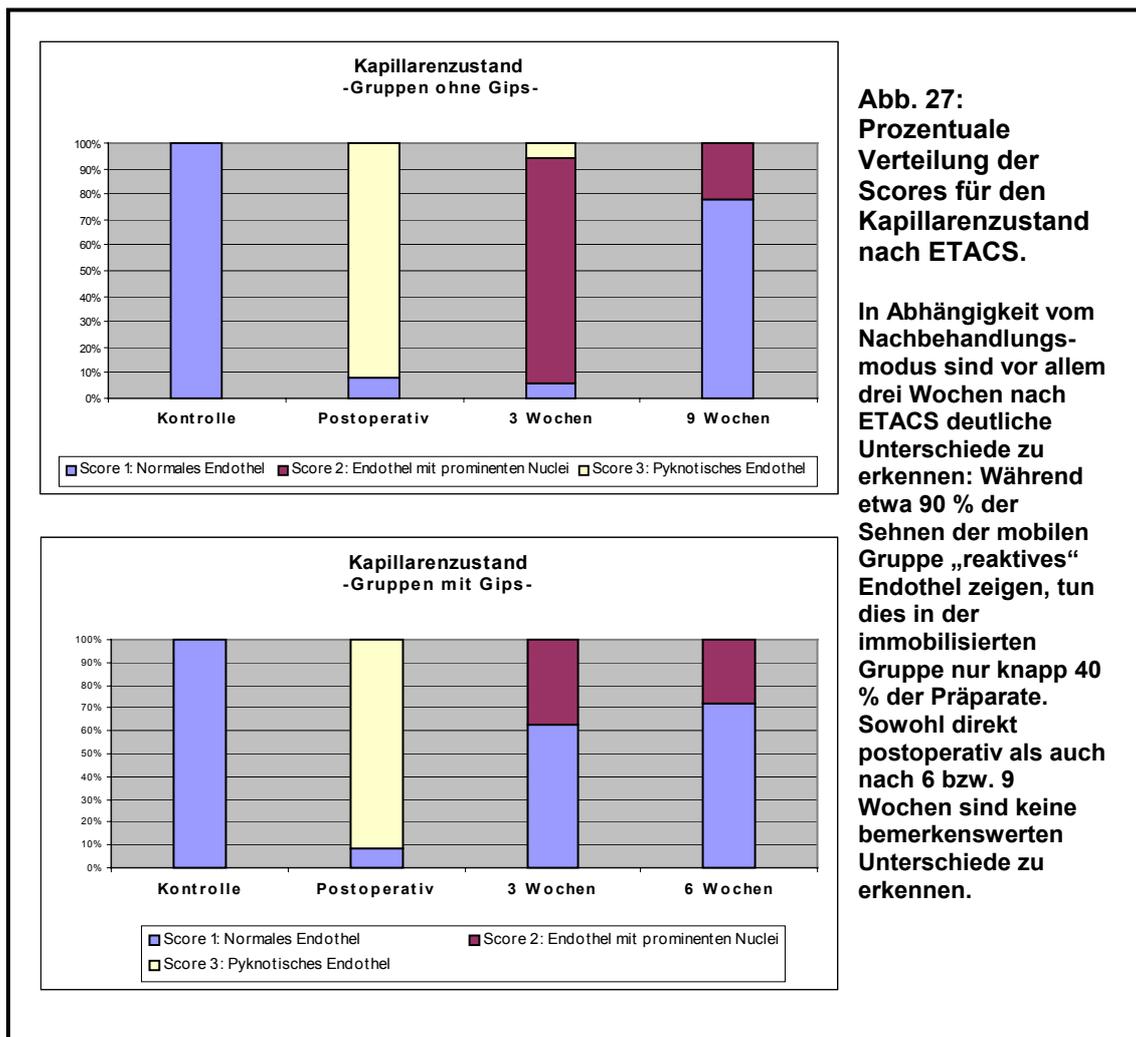
6 Wochen nach der RF-Behandlung entspricht das histologische Bild weitgehend den Charakteristika der immobilisierten 3-Wochen-Gruppe. Die immobilisierte 6-Wochen-Gruppe unterscheidet sich in den statistischen Tests mit dem Score von $1,5 \pm 0,41$ ($n = 10$) nicht signifikant von der temporär nichtmobilisierten Gruppe. Der Score letztgenannter Gruppe beträgt $1,45 \pm 0,37$ ($n = 10$).

9 Wochen nach ETACS

Die Lumina der Kapillaren sind einheitlich. Eine mehrschichtige Wandarchitektur ist nicht mehr feststellbar. Es zeigt sich jedoch nicht die einheitlich schmale Morphologie der endothelialen Zellkerne aus den Kontrollsehnen.

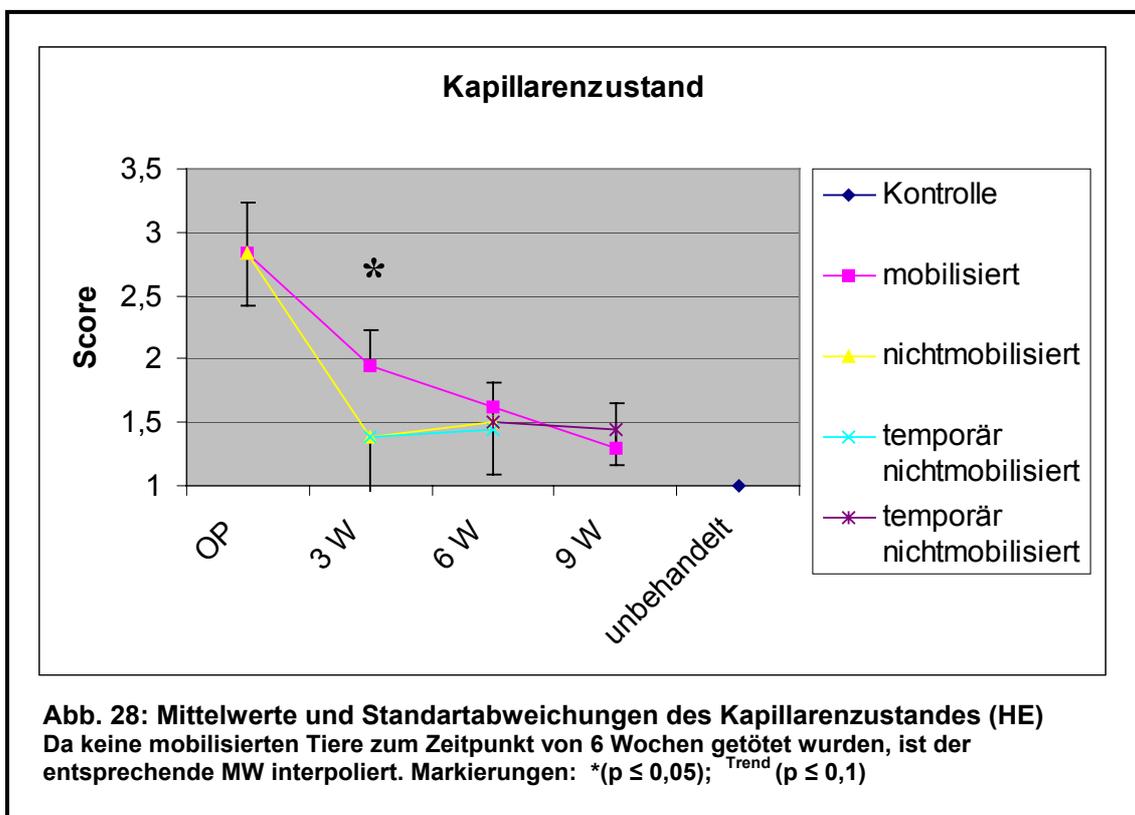
Die Nuclei des Endothels sind leicht verbreitert. Histologisch unterscheiden sich die dauerhaft mobilisierte Gruppe und die temporär nichtmobilisierte Gruppe nicht voneinander. Dementsprechend ergeben sich Scores von $1,3 \pm 0,35$ ($n = 10$) bzw. $1,45 \pm 0,28$ ($n = 10$).

3.3.1.1.2 Histologische Auswertung im zeitlichen Verlauf



Die Morphologie der Endothelien wird durch ETACS im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen hochsignifikant verändert ($p \leq 0,001$) (siehe Abb.27 und 28). Vom Zustand deutlicher Kernpyknose der Zellkerne ausgehend verändern sich die Endothelien des Gefäßsystems signifikant (beide $p = 0,002$) innerhalb der ersten 3 Wochen. Im Beobachtungszeitraum zwischen 3 und 6 Wochen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der nichtmobilisierten und den temporär nichtmobilisierten Tiere gegenüber der nichtmobilisierten 3-

Wochen-Gruppe. Es ist statistisch ohne Konsequenz ob die Tiere nach 3 Wochen von ihrem Gips befreit werden oder ihn für weitere 3 Wochen behalten. Im postoperativen Verlauf zwischen 6 und 9 Wochen ändert sich die Beurteilung der temporär nichtmobilisierten 9-Wochen-Gruppe nicht signifikant gegenüber dem Score der dauerhaft nichtmobilisierten 6-Wochen-Gruppe. Ferner ist der Kapillarenzustand der dauerhaft mobilen 9-Wochen-Gruppe gegenüber der mobilen 3-Wochen-Gruppe höchstsignifikant ($p = 0,001$) regeneriert.



Zu keinem Zeitpunkt der gesamten Beobachtungszeit erreicht der Kapillarenzustand der behandelten Sehnen die Morphologie der Kontrollsehnen. Der einzige signifikante Unterschied ($p = 0,009$) zwischen den Nachbehandlungsmodi findet sich zum Zeitpunkt von 3 Wochen. Die Größe der Endothelzell-Nuklei ist bei der Behandlung mit Gipsschiene geringer als bei der mobilen Nachbehandlung.

3.3.2 Kapillarendichte

3.3.2.1 Score an Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitten

3.3.2.1.1 Histologische Auswertung gemäß der Beobachtungszeitpunkte

Kontrollen

In den Sehnen der Kontrollgruppe sind die Kapillaren innerhalb Bindegewebssepten des Peritendineum internum lokalisiert. Die Kapillaren sind fast ausnahmslos längs angeschnitten. Ihr Verteilungsmuster in den Präparaten ist homogen. Die Kontrollsehnen sind mit einem Score von $1,00 \pm 0,00$ ($n = 12$) bewertet (siehe Abb. 30).

Postoperativ

Die Dichte der potentiell intakten Kapillaren, ist auf 25 % gesunken. Die Sehnen erreichen einen hohen Dichte-Score von $2,83 \pm 0,41$ ($n = 6$) (siehe Kap 2.12.2).

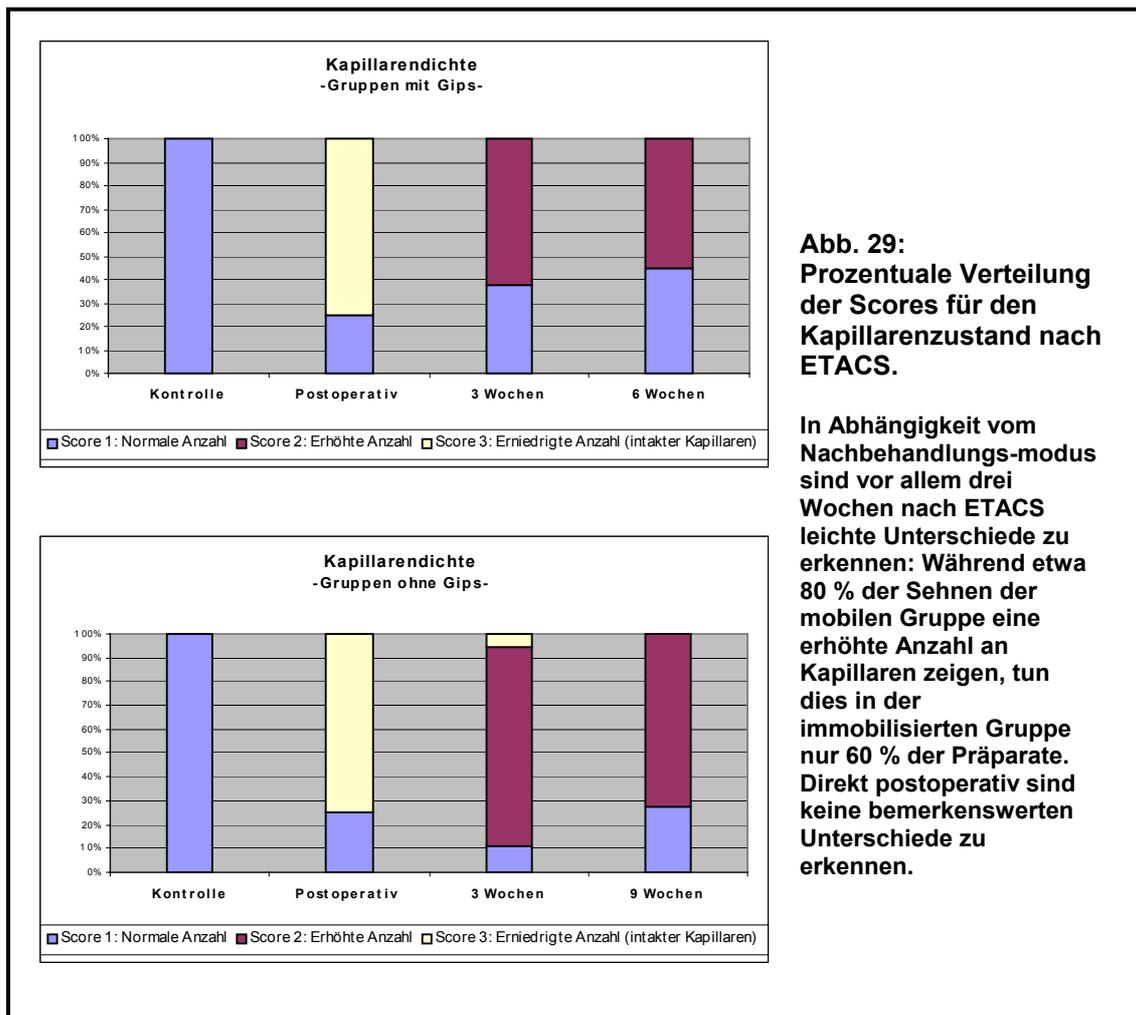
3 Wochen nach ETACS

3 Wochen nach der RF-Behandlung zeigt sich eine Hypervaskularisation der Sehnen. Dabei handelt es sich nicht ausschließlich um Kapillaren, sondern auch um kleine Arteriolen. Die Präparate der immobilisierten Tiere zeigen in ca. 60 % der Fälle eine erhöhte Anzahl an Kapillaren. In der mobilen Gruppe sind es hingegen etwas über 80 % (siehe Abb. 29). Dementsprechend gestalten sich auch die Scores der mobilen Gruppe von $1,95 \pm 0,37$ ($n = 10$) bzw. die der nichtmobilisierten Gruppe von $1,63 \pm 0,44$ ($n = 8$). Zwischen beiden Nachbehandlungsmodi besteht zwar kein signifikanter Unterschied, dennoch ist der p-Wert von 0,071 als Trend zu deuten.

6 Wochen nach ETACS

Die Kapillarendichte beider 6-Wochen-Gruppen ähnelt stark der Histologie der nichtmobilisierten 3-Wochen-Gruppe. Ferner besteht eine Hypervaskularisierung der Sehnen (siehe Abb. 30).

Der Score für die Kapillarendichte der nichtmobilisierten 6-Wochen-Gruppe beträgt $1,75 \pm 0,425$ ($n = 10$). Zum gleichen Zeitpunkt ist der Score der Gruppe, die nur für 3 Wochen immobilisiert war $1,6 \pm 0,316$ ($n = 10$). Der statistische Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Nachbehandlungsmodi zum Zeitpunkt von 6 Wochen.



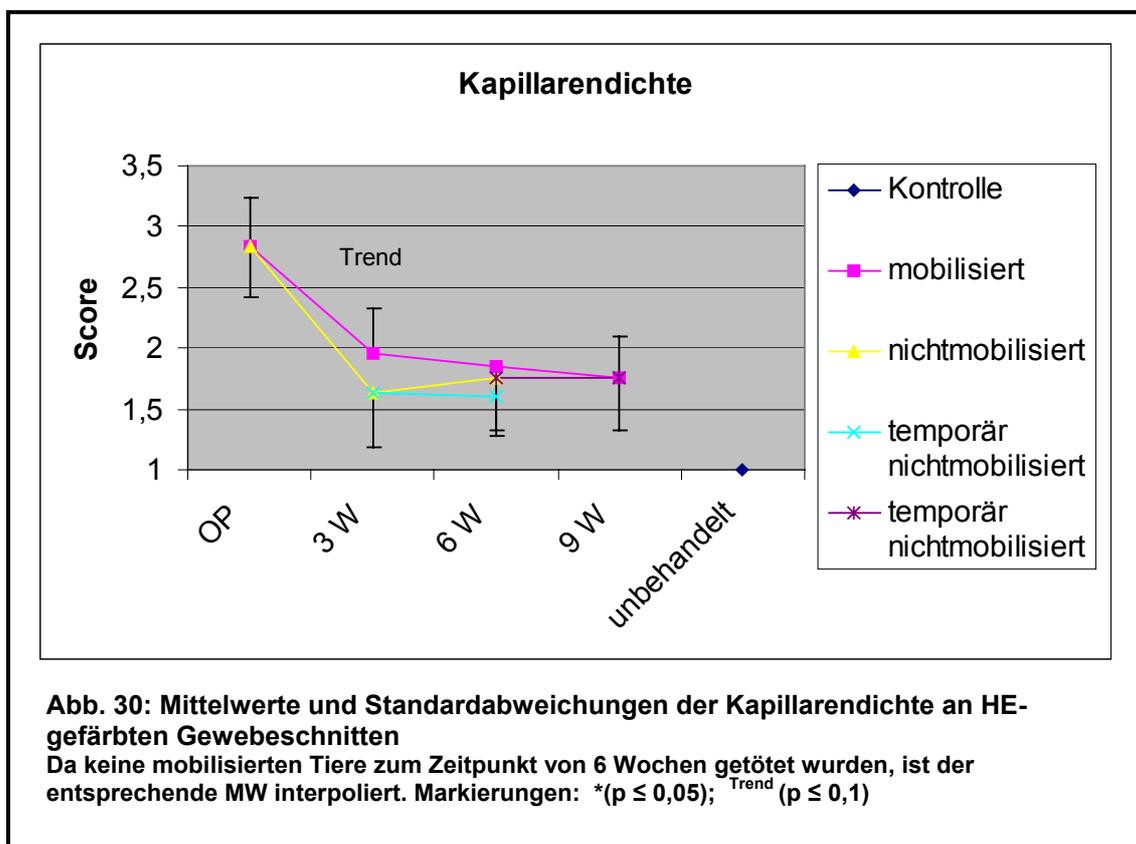
9 Wochen nach ETACS

Die Sehnen zeigen 9 Wochen nach der Behandlung weiterhin eine erhöhte Kapillarendichte. Allerdings ist die Kapillarenorientierung der temporär nichtmobilisierten Sehnen gegenüber den Sehnen der dauerhaft mobilen 9-Wochen-Gruppe homogener. Sonst zeigt sich kein histologischer Unterschied bezüglich der Kapillarendichte. Der Score der dauerhaft mobilen Gruppe beträgt

1,75 ± 0,354 (n = 10). Die Sehnen der temporär nichtmobilisierten Tiere erhalten einen Score von 1,75 ± 0,425 (n = 10).

3.3.2.1.2 Histologische Auswertung im zeitlichen Verlauf

Die Anzahl der Kapillaren mit morphologisch intaktem Endothel wird durch RF-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen höchstsignifikant verändert ($p \leq 0,001$). Innerhalb der ersten 3 Wochen nimmt die Kapillarendichte zu (siehe Abb.30). Vor allem die mobilisierten Tiere sind hiervon betroffen. Gegenüber dem postoperativen Zustand bestätigen die statistischen Testungen sowohl für die mobilisierte ($p = 0,002$) als auch für die immobilisierte ($p = 0,003$) 3-Wochen-Gruppe signifikante Unterschiede bezüglich der Kapillarendichte. Zwischen 3 und 6 Wochen zeigt sich keine signifikante Änderung der Scores, unabhängig davon ob die Tiere nach 3 Wochen von ihrem Gips befreit wurden oder ihn für weitere 3 Wochen behielten. Im postoperativen Verlauf zwischen 6 und 9 Wochen ändert sich die Beurteilung der temporär nichtmobilisierten 9-Wochen-Gruppe nicht signifikant



gegenüber dem Score der dauerhaft nichtmobilisierten 6-Wochen-Gruppe. Nach 9 Wochen erreicht die weiterhin erhöhte Kapillarendichte identische Mittelwerte.

Innerhalb der dauerhaft mobilisierten Gruppen, verändert sich die Kapillarendichte zwischen 3 und 9 Wochen nach ETACS nicht signifikant ($p = 0,123$).

Im Vergleich zu den Kontrollen bleibt die Kapillarendichte aller anderen Gruppen während des gesamten Beobachtungszeitraumes signifikant erhöht ($p \leq 0,001$). Allerdings zeigen die statistischen Tests zwischen beiden 3-Wochen-Gruppen einen deutlichen Trend ($p = 0,071$).

3.4 Nerven

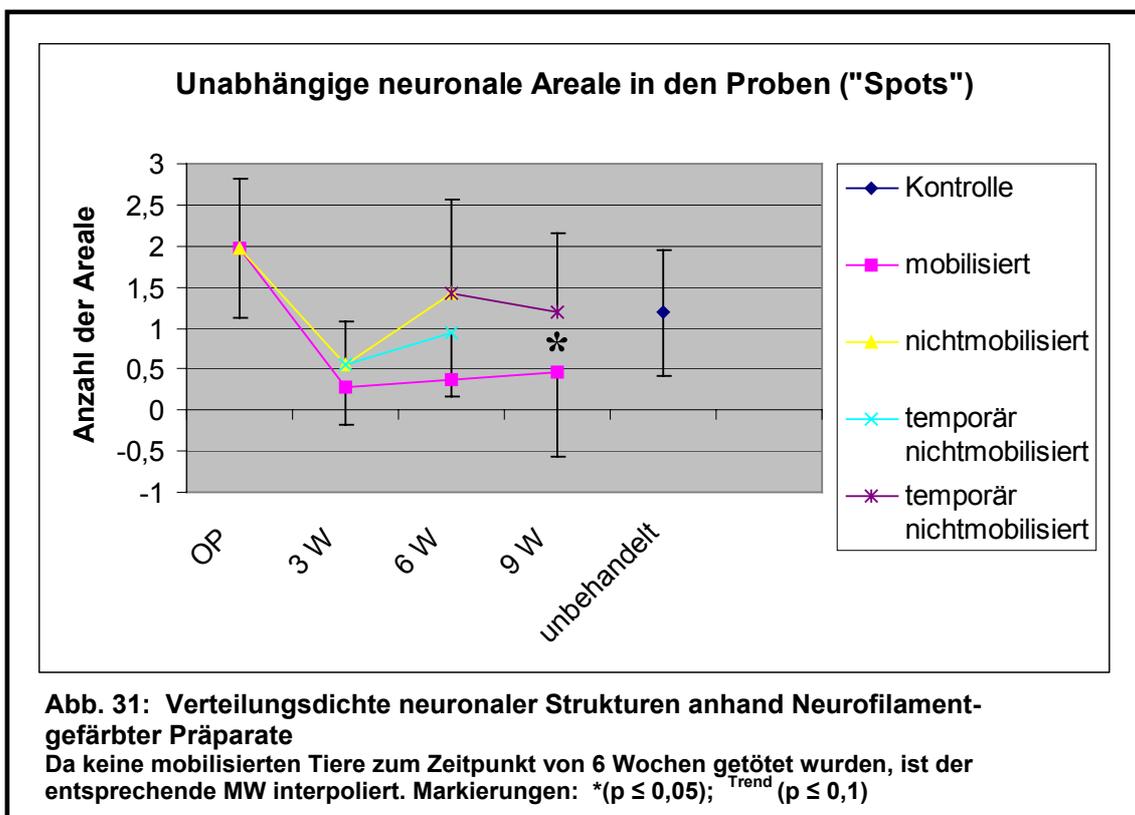
3.4.1 Verteilungsdichte neuronaler Areale („Spots“)

Der Mittelwert der unabhängigen neuronalen Areale („Spots“; Def. Siehe Kap. 2.12.6) der Kontrollen ändert sich von $1,19 \pm 0,77$ ($n = 9$) auf $1,97 \pm 0,84$ ($n=6$) im Rahmen der RF-Behandlung (siehe Abb. 31). Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant ($p = 0,136$) und lässt sich durch die großen Standardabweichung erklären. Nach drei Wochen ist die Zahl der „Spots“ der mobilisierten Gruppe auf $0,28 \pm 0,46$ ($n = 9$), die der immobilisierten auf $0,56 \pm 0,52$ ($n = 9$) gesunken. Ungeachtet der Nachbehandlung ($p = 0,165$) zeigt sich also bei beiden Gruppen eine hoch-signifikante ($p = 0,002$ bzw. $p = 0,004$) Abnahme der „Spots“ innerhalb der ersten drei Wochen.

Bei permanenter Immobilisation steigt ($p = 0,1$) die Anzahl der Spots auf einen Mittelwert von $1,42 \pm 1,153$ zum Zeitpunkt sechs Wochen nach der RF-Behandlung. Die statistischen Tests zeigen keinen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen. Befreit man jedoch nach dreiwöchiger Immobilisation die Tiere von ihrem Gips, ist nach insgesamt sechs Wochen keine signifikanter Anstieg der Innervationsdichte eingetreten. Gegenüber der Kontrollgruppe besteht kein signifikanter Unterschied ($p = 0,431$) mehr.

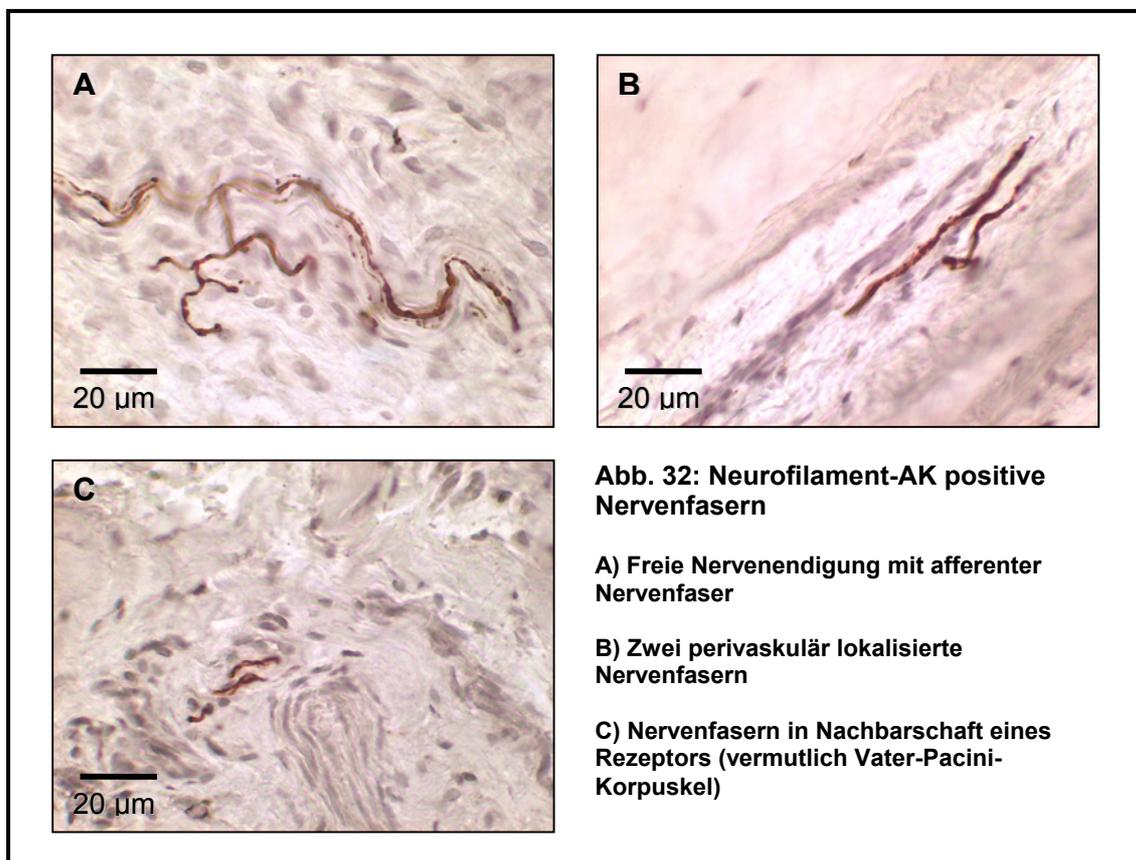
Werden die Tiere im Anschluss an eine sechswöchige Immobilisation von ihrem Gips befreit, ergibt sich nach insgesamt 9 Wochen ein Mittelwert von $1,20 \pm 0,96$ ($n = 10$). Auch diese Gruppe weicht statistisch nicht signifikant vom Level der Kontrollgruppe ab ($p = 0,803$).

Die dauerhaft mobilisierte Gruppe zeigt keinen signifikanten Zuwachs an „Spots“ zwischen 3 und 9 Wochen. Es wird weder der Mittelwert der Kontrollen ($p = 0,031$), noch der Level der temporär nichtmobilisierten 9-Wochen-Gruppe ($p = 0,023$) erreicht.



3.4.2 Nervenfasern

Die Nervenfasernzahl der RF-behandelten Sehnen unterscheidet sich nicht signifikant vom Mittelwert der Kontrollgruppe (siehe Abb. 32 und 33). Über die adäquate Funktion der Nervenfasern kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, da diesbezüglich Informationen über die gesamte Morphologie der Nervenzellen sowie der umhüllenden Schwann-Zellen notwendig wäre. Allerdings ist das neurofilamentäre Zytoskelett von postoperativ entnommenen Fasern oft gröber und diskontinuierlicher angefärbt als deren Pendant aus der Kontrollgruppe (siehe auch Nervenbündel: Abb. 34).

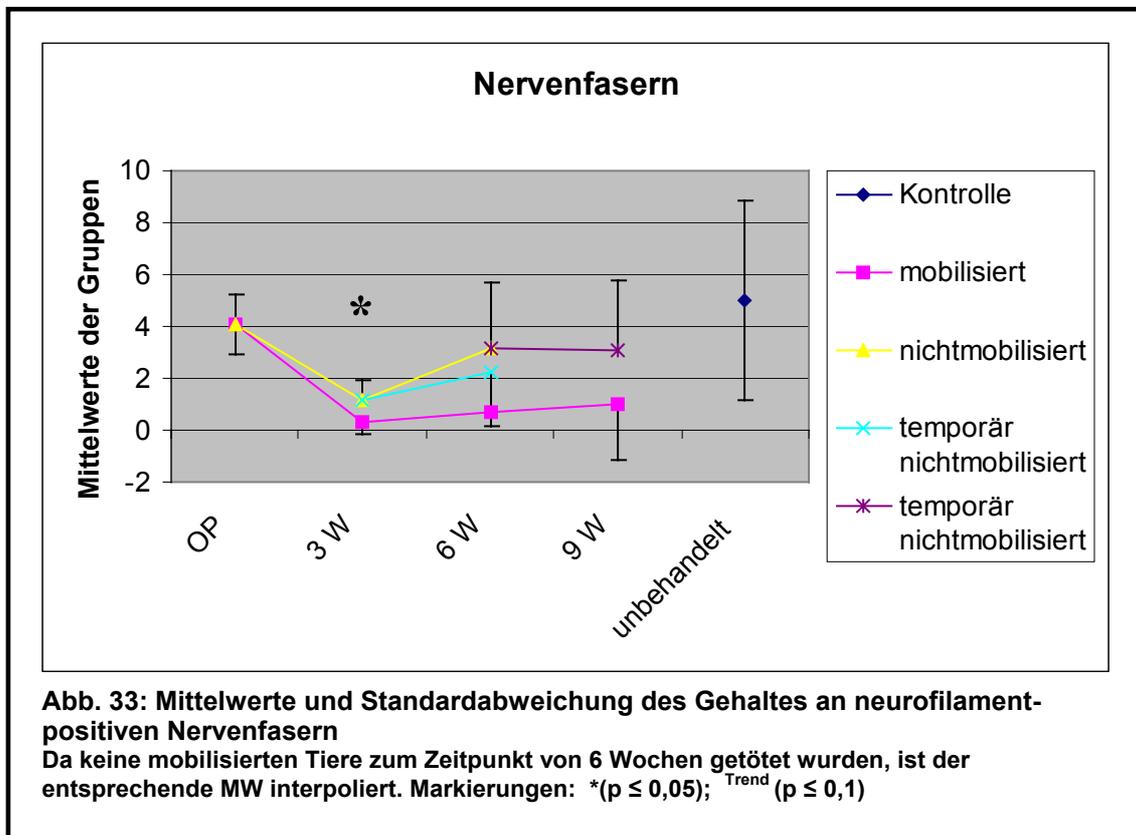


3 Wochen nach der RF-Behandlung sinken die Mittelwerte beider 3-Wochen-Gruppen hochsignifikant ab ($p = 0,001$). Dieser Verlust an Nervenfasern findet unabhängig von der jeweiligen Nachbehandlung statt. Bei einer Behandlung mittels Gipsschiene ist dieser Verlust von Nervenfasern allerdings signifikant

geringer ($p = 0,036$). Innerhalb der mobilen 3-Wochen-Gruppe sind fast keine Nervenfasern mehr nachweisbar ($0,33 \pm 0,46/ n = 9$).

6 Wochen nach ETACS liegt die Nervenfasernzahl der dauerhaft immobilisierten Tiere mit einem Mittelwert von $3,18 \pm 2,55$ ($n = 10$) gegenüber der immobilisierten 3-Wochen-Gruppe ($1,13 \pm 0,83$) nicht signifikant höher ($p = 0,06$). Statistisch ist kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen nachweisbar ($p = 0,41$). Werden die Tiere hingegen nach einer initialen Immobilisationsdauer von 3 Wochen für die folgenden 3 Wochen von der Gipsschiene befreit, ist weder ein signifikanter Niveauunterschied gegenüber der immobilisierten 3-Wochen-Gruppe noch eine Annäherung an den Nervenfasergehalt der Kontrollen erkennbar.

9 Wochen postoperativ ist der Nervenfasergehalt der Sehen bei dauerhafter Mobilisation gegenüber der 3-Wochen-Gruppe nicht signifikant verändert. Der Mittelwert steigt innerhalb dieses Zeitraumes von $0,33 \pm 0,45$ ($n = 9$) auf lediglich $1,02 \pm 2,16$ ($n = 10$) an. Damit wird im Gegensatz zur temporären nichtmobilisierten 9-Wochen-Gruppe ein signifikanter ($p = 0,026$)



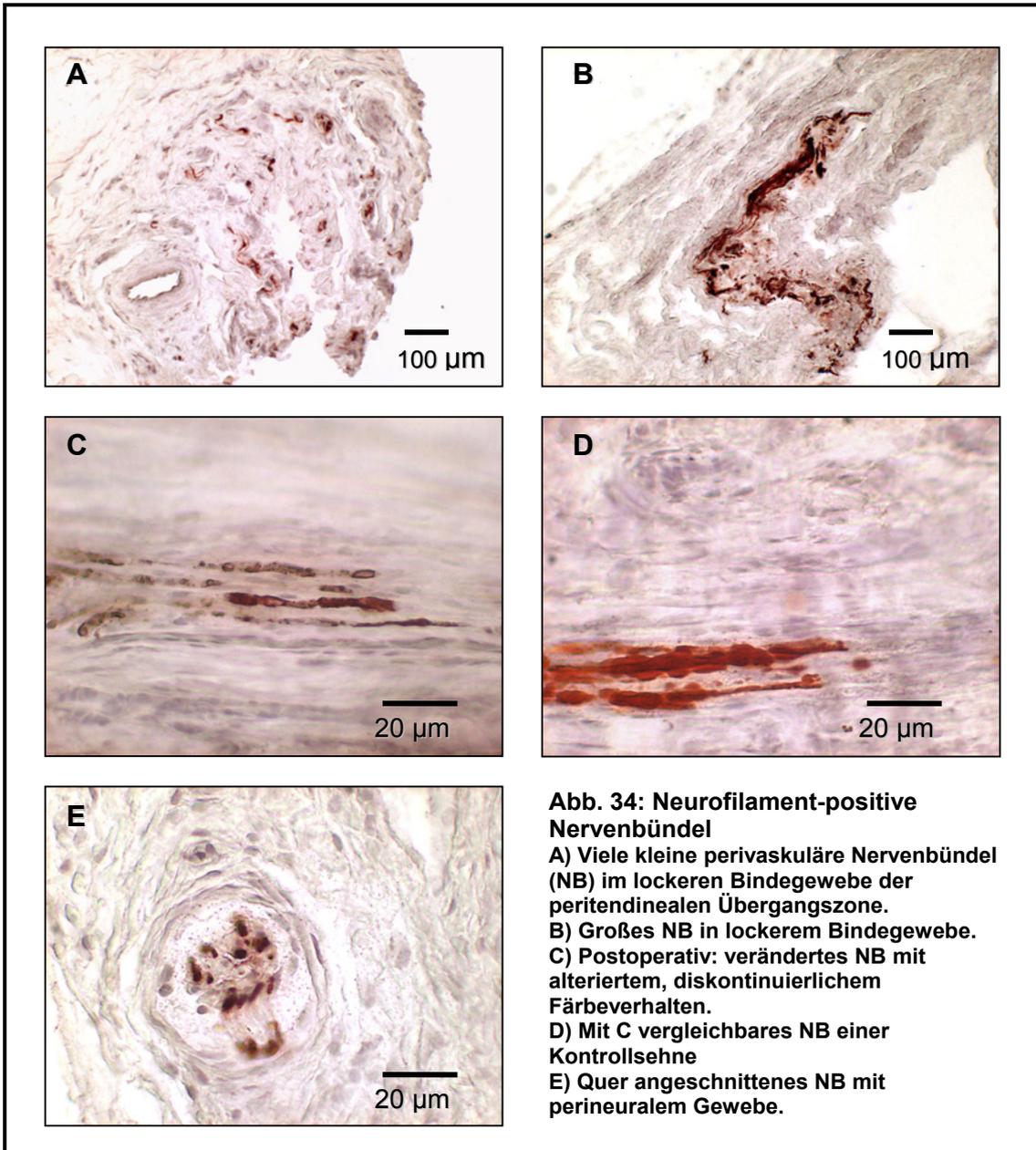
Niveauunterschied deutlich. Diese Feststellung wird von der signifikanten Differenz ($p = 0,012$) des Gehaltes an Nervenfasern verglichen mit den Kontrollen untermauert.

Lokalisation

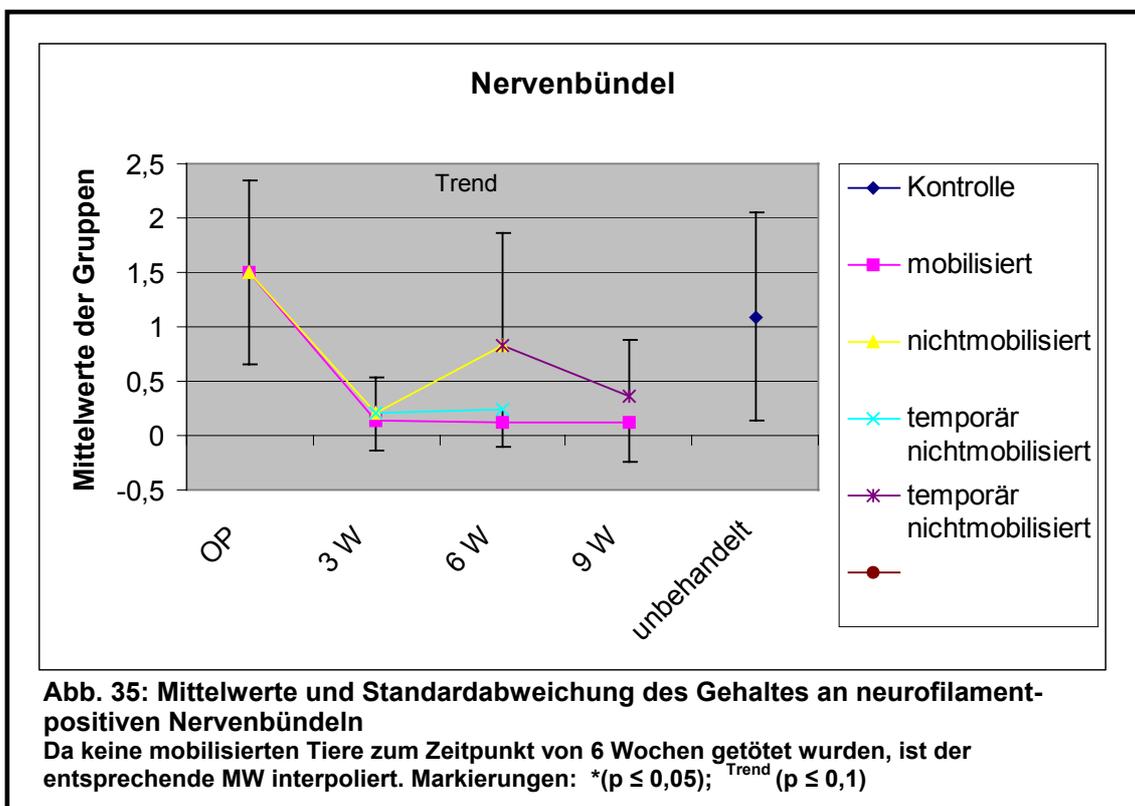
Der Anteil der Nervenfasern, die in Assoziation mit Blutgefäßen (siehe Abb. 32 B) vorgefunden werden beträgt für die Kontrollgruppe $19 \% \pm 17,8 \%$ ($n = 11$). Im Zuge der RF-Behandlung fällt der prozentuale Anteil der perivaskulären Fasern auf $12 \% \pm 11,8 \%$ ($n = 6$). Statistisch bedeutet dies jedoch keine signifikante Veränderung. Im weiteren Verlauf zeigen sich vor allem nach den ersten 3 Wochen grundsätzliche Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der perivaskulären Nervenfasern: Während in der immobilisierten Gruppe der relative Anteil in etwa auf dem Niveau der postoperativen Gruppe (ca. 14%) stagniert ($p = 0,824$), sinkt der relative Anteil in der mobilen Gruppe signifikant ($p = 0,011$) auf $3 \% \pm 7,9 \%$ ($n = 10$). Zwischen beiden Nachbehandlungsverfahren besteht zum Zeitpunkt von 3 Wochen ein statistischer Unterschied von $p = 0,069$, der als Trend gedeutet werden kann. Im weiteren Verlauf verbleiben die relativen Anteile an perivaskulären Nervenfasern in etwa auf dem Level der jeweiligen 3-Wochen Gruppen. Zwischen den beiden 9-Wochen-Gruppen besteht ebenso wie schon 3 Wochen nach RF-Behandlung ein Trend von $p = 0,082$. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigt die dauerhaft mobile Gruppe einen tendenziell ($p = 0,073$) geringeren relativen Gehalt an perivaskulären Nervenfasern.

3.4.3 Nervenbündel

Die Anzahl der Nervenfaserbündel (Definit. siehe Kap. 2.12.6) der Sehnen unterscheidet sich nicht signifikant von den Kontrollen (siehe Abb. 35). Bei der Untersuchung der Nervenbündel fällt in der postoperativen Gruppe ein teilweise bizarres Färbeverhalten, das dem der postoperativ erfassten Nervenfasern ähnelt, auf (siehe Kap. 3.4.2) (siehe Abb. 34 C und D). Innerhalb der ersten 3 Wochen nach RF-Behandlung sinkt die Anzahl der Nervenbündel ungeachtet der Nachbehandlung hochsignifikant. Gemessen an der postoperativen Gruppe



Zwischen 3 und 6 Wochen nach ETACS ist eine signifikante ($p = 0,048$) Zunahme der Nervenbündel auf einen Mittelwert von $0,82 \pm 1,04$ ($n=10$) bei dauerhafter Immobilisation erfolgt. In gleichen Zeitraum zeigt sich statistisch keine signifikante Veränderung der Nervenbündelanzahl für die temporär nichtmobilisierte Gruppe. Die Nervenbündelanzahl der dauerhaft immobilisierten Gruppe ist zum Zeitpunkt von 6 Wochen zwar nicht signifikant höher als die der mobilen Gruppe, doch ist der entsprechende p-Wert von 0,092 als Tendenz zu werten. Dies ist umso bedeutsamer, da die dauerhaft nichtmobilisierte 6-Wochen-Gruppe keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen aufweist. Diese Feststellung gilt auch für die temporär



nichtmobilisierte Gruppe im Zeitraum zwischen 6 und 9 Wochen nach der RF-Behandlung. Zwar sinkt der Mittelwert hier von $0,82 \pm 1,04$ ($n = 10$) auf $0,37 \pm 0,50$ ($n = 10$), jedoch ist diese Verringerung nicht signifikant ($p = 0,19$). Es ist kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe vorhanden ($p = 0,153$).

Betrachtet man die permanent mobilen Gruppen ist eine Stagnation des Gehaltes an Nervenbündeln im Zeitraum zwischen 3 und 9 Wochen mit

Mittelwerten von $0,13 \pm 0,361$ ($n = 9$) bzw. $0,12 \pm 0,369$ ($n = 10$) zu beobachten. Der Unterschied zwischen beiden 9-Wochen-Gruppen ist signifikant ($p = 0,041$). Außerdem ist ein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe vorhanden ($p = 0,012$).

Lokalisation

Der Anteil der Nervenbündel, die in Assoziation mit Blutgefäßen (siehe Abb. 34 A) vorgefunden werden, beträgt für die Kontrollgruppe $22 \% \pm 25,3 \%$ ($n = 11$). Im Zuge der RF-Behandlung fällt der prozentuale Anteil der perivaskulären Fasern auf $20 \% \pm 12,5 \%$ ($n = 6$). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist nicht signifikant. Analog zu den Beobachtungen bei den Nervenfasern innerhalb der ersten 3 Wochen nach RF-Behandlung zeigen auch die Nervenbündel, in Bezug auf ihre Lokalisation, eine erhebliche Differenz in Abhängigkeit vom Nachbehandlungsmodus. So nimmt der prozentuale Anteil der perivaskulär lokalisierten Nervenbündel bei dauerhafter Mobilisation von $20 \% \pm 12,5 \%$ ($n = 6$) auf $10 \% \pm 31,6\%$ signifikant ($p = 0,015$) ab. Im Gegensatz dazu steigt der Wert der immobilisierten 3-Wochen-Gruppe auf $27,3 \% \pm 43,9 \%$ ($n = 10$). Dieser Anstieg ist allerdings nicht signifikant. Im weiteren Verlauf verbleiben die relativen Anteile an perivaskulären Nervenbündeln in etwa auf dem Niveau der jeweiligen 3-Wochen Gruppen. Wird eine (temporäre) Immobilisation vorgenommen, weicht der relative Anteil perivaskulärer Nervenbündel zu keiner Zeit signifikant von den Werten der Kontrollgruppe ab. Umgekehrt erreichen die Werte der dauerhaft mobilen Gruppen nie das Niveau der Kontrollen. Zwischen beiden Nachbehandlungsmodi ist der Unterschied zum Zeitpunkt 9 Wochen nach der RF-Behandlung signifikant ($p = 0,026$).

4. Diskussion

Mit der Frage nach histologischen Gewebealterationen nach ETACS bzw. LACS haben sich seit 1996 zahlreiche Autoren beschäftigt.^{51,52,56-58,60-63,114,142} Während eine Vielzahl an in-vitro Experimenten^{52,58-61,80} zu diesem Thema veröffentlicht wurden, gibt es nur einige in-vivo Tierversuche^{51,57,62,63,114,120} und noch weniger klinische Mittel- bzw. Langzeitstudien.^{31,56,146} Die Autoren von Übersichtsartikeln zum Thema „capsular shrinkage“ betonen jedoch, dass die histologische Evaluation einer postoperativen Immobilisation noch aussteht. Dennoch ist bislang keine Studie zu diesem Thema publiziert worden.

Aufgrund fehlender histo-physiologischer Daten in Bezug auf die Immobilisation kollagenen Gewebes nach Shrinkage, sind die bisher veröffentlichten biomechanischen Befunde nur eingeschränkt interpretierbar. In dieser in-vivo-Studie wurden erstmals die Auswirkungen einer postoperativen Immobilisation nach radiofrequenz-induziertem „capsular shrinkage“ auf die histologische Beschaffenheit kollagenen Gewebes untersucht. Es wurden histologische und immunhistochemische Färbungen, sowie TUNEL-Labeling eingesetzt, um einen Überblick über wesentliche histologische Parameter von RF-behandeltem kollagenem Gewebe zu gewinnen.

Momentan erhalten Radiofrequenzenergie-Geräte in die Schulterchirurgie verstärkten Einzug, obwohl noch kein wissenschaftlich fundiertes Nachbehandlungskonzept (Immobilisation) vorliegt.

4.1 Zellularität und Apoptose

4.1.1 RF-Behandlung schädigt Fibroblasten und induziert Apoptose

Erste histologische Ausführungen zur arthroskopischen Kapselraffung mit Hilfe eines Lasers finden sich Ende der 90er Jahre bei Hayashi et al.⁶¹, wenig später gefolgt von Untersuchungen unter Einsatz radiochirurgischer Methoden.⁶² Hayashi et al.⁶¹ behandelten erstmals 1996 in einem in-vitro Experiment die Kniegelenkkapsel von Kaninchen mit dem Ho:YAG Laser (Holmium:Yttrium-Aluminium-Garnet). Neben deutlicher Kernpyknose und Karyorrhexis zeigte

sich eine signifikante Korrelation zwischen betroffener Gewebefläche und der gewählten Wattzahl des Lasers (5 W, 10 W oder 15 W).⁶¹ Den postulierten Zusammenhang zwischen applizierter RF-Energiedosis und dem Ausmaß an Gewebeschädigung untersuchten Lopez et al.⁸⁰: Bei jeder Temperatur zwischen 45 und 85 °C zeigte sich das identische Bild der Kernpyknose.

In der vorliegenden Studie zeigten ca. 50 % der Fibroblasten unmittelbar postoperativ einen deutlichen Verlust ihrer Membranintegrität. Diese Alterationen stehen in Einklang mit den Ergebnissen aller anderen Autoren: Karyorrhexis¹⁵² und Pyknose sind die dominierenden Zustände der Fibroblasten direkt nach LACS bzw. ETACS.^{51,56,57,60-63}

Viele histologische Studien beinhalten auch eine ultrastrukturelle Analyse der postoperativen Fibroblastenqualität mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM): Übereinstimmend wird vom Verlust der intakten Membranstruktur sowie von Kondensation des Zytoplasma berichtet.^{57,59,63,80}

Apoptose im Lig. patellae wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Yuan et al.¹⁵⁴ konnten in der Sehne des M. subscapularis eine basale Apoptoserate von 13 % identifizieren. Adams und Horton² fanden 3 – 10 % apoptotischer Zellen im Gelenkknorpel adulter Tiere, während Gruber und Hanley⁴⁹ etwa 73 % der Fibroblasten in menschlichen Bandscheiben als apoptotisch klassifizierten.

Apoptose in RF-behandeltem kollagenem Gewebe kann prinzipiell aufgrund von Ischämie, Hypoxie, Generierung freier Radikale, physikalischer Schädigung oder Kombinationen dieser Faktoren erfolgen.^{14,67,122,126} Das initiale Einsetzen der nukleären Fragmentierung nach dem Stimulus wird zwar mitunter recht zügig (1-3 h) angegeben, der Apoptosebeginn nach RF-Behandlung ist aber unklar.^{41,128}

Bis die Gewebeproben direkt postoperativ entnommen wurden, verblieben die Sehnen aus technischen Gründen (Narkose, Tötung, Präparation, etc.) mindestens 60 Minuten in situ. Wir fanden eine überraschend hohe Apoptoserate von 29,7% TUNEL-positiven Zellen in den Kontrollen. Der

postoperative Anstieg von TUNEL-positiven Zellen und Apoptoserate zeigt den schädigenden Effekt von RF-Energie in kollagenem Gewebe.

Die aktuelle Nomenklatur des Zelltodes definiert präzise die Beziehung und Reihenfolge von Apoptose und nachfolgender Nekrose.¹³⁷ Die Berichte von Nekrose, Karyorrhexis und Zellschrumpfung nach RF-Behandlung könnten demnach charakteristische post-apoptotische Befunde darstellen.^{58,62,114,120} Unsere Daten wurden den bisherigen Berichten somit entsprechen, und darüber hinaus zusätzliche Informationen bezüglich des prä-mortalen Schädigungsmechanismus von RF-Energie liefern.

Obwohl die Anzahl apoptotischer Zellen zum Zeitpunkt 3 Wochen in den nicht-immobilisierten Sehnen signifikant anstieg, war die relative Apoptoserate in beiden 3 Wochen-Gruppen gleich. Der Zellzyklus von Fibroblasten wird teilweise durch wenig verstandene Mechano-transduktions-Signalwege moduliert.^{12,19} Skutek et al. beschrieben, daß Apoptoseverhalten durch Dehnung moduliert werden kann.¹²⁵ Kurze Stretchperioden induzieren demnach Apoptose, wohingegen längere Stretchperioden die Apoptose eher reduzieren. Andererseits zeigten Smith et al., dass Immobilisation eines Hinterlaufes für 2 bis 6 Tage die Anzahl TUNEL-positiver Myonuklei im M. soleus erhöhte.¹²⁷ Unsere Daten könnten darauf hindeuten, dass sich die Zellhomöostase, 3 Wochen nach RF-Behandlung, bereits an das jeweilige mechanische Umfeld adaptiert hat, und dementsprechend keine Unterschiede in der Apoptoserate zu finden sind.

Allerdings könnte die größere Gesamtmenge an apoptotischen Nuklei (3 Wochen ohne Immobilisation) für eine stärkere Produktion von chemotaktischen Agenzien mit nachfolgender Phagozytose zeugen.⁹⁰ Diese Hypothese ist konsistent mit der gleichzeitig erhöhten absoluten Zellzahl. Zukünftige Studien sollten auf diesen Aspekt der Sehnenheilung fokussieren.

4.1.2 Immobilisation supprimiert die Zellzahl während der Sehnenheilung

Hayashi testete 1997 erstmals die histologischen Auswirkungen des Ho:YAG Lasers an Kaninchen in-vivo über einen längeren Zeitraum: 30 Tage nach der Behandlung war der Großteil der Fibroblastenkerne rundlich und vergrößert. Es

wurden keine pyknotischen Kerne mehr vorgefunden.⁵⁷ Hecht et al. fanden in einer in-vivo RF-Studie an den Kniegelenkkapseln von 24 Schafen eine gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte Zellzahl nach 14 Tagen. Große azelluläre Bereiche waren umgeben von sekretorisch hochaktiven Fibroblasten, in denen mittels TEM stark entwickeltes rauhes endoplasmatisches Retikulum nachgewiesen werden konnte.⁶²

Die zweite in-vivo Studie von Paul Hecht⁶³ ist mit der vorliegenden Studie gut vergleichbar, da jeweils ähnliche subjektive Score-Systeme bzw. Beobachtungszeiträume gewählt wurden. Hecht et al. fanden nach 14 Tagen immer noch durchschnittlich etwa 80 % tote, neben 20 % hochaktiven Fibroblasten. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Studie nach 21 Tagen keine pyknotischen Zellen oder azelluläre Bereiche mehr vorgefunden: Unabhängig von der Immobilisation betrug der Anteil sekretorisch aktiver Fibroblasten 75 – 100 % während bis zu 25 % der Zellen Spindelform besaßen.

Dass die Ergebnisse von Hecht schlechter ausgefallen sind als die eigenen, kann sowohl an der Zeitdifferenz von einer Woche, als auch an der Operationsmethode liegen: Während Hecht, wie auch ein Grossteil der übrigen Untersucher^{35,51,52,54-63,142} jeweils die gesamte Kapselinnenseite bzw. Patellarsehne mit der RF-Sonde behandelte (Paintbrush-Methode), wurden die Sehnen in der vorliegenden Studie entlang 5 mm auseinanderliegender Querstriche behandelt (Grid-Pattern-Methode; siehe 2.3.3). Lu et al.⁸² führten einen in-vivo Vergleich beider Behandlungsmuster durch und fanden 0, 2 und 6 Wochen nach ETACS signifikant mehr vitales Gewebe, wenn RF-Energie entlang eines Grid-Pattern (Strickleiter-Muster) appliziert worden war.

TEM-Bilder der histologisch als „aktiv“ klassifizierten Fibroblasten bestätigen die sekretorischen Höchstleistungen der Zellen. Hayashi fand bereits 7 Tage nach LACS aktive Fibroblasten mit intakten Membranen und reichhaltigen cytoplasmatischen Organellen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat und sekretorischen Vesikeln als ultrastrukturelle Beweise für eine früh einsetzende Geweberegeneration.⁵⁷ Zu vergleichbaren Befunden kommen auch Hecht et al. nach 14 Tagen.⁶³

Schaefer et al., deren Tiermodell dem eigenen stark ähnelt, beschrieben 4 und 8 Wochen nach dem Einsatz des Ho:YAG Lasers einen deutlichen Anstieg der Zellularität gegenüber den Kontrollen.¹²⁰ Nach einer Rekonvaleszenz von 30 Tagen fanden Hayashi et al. in einer Laser-Pilotstudie an 42 Patienten mit Hyperlaxität eine signifikant erhöhte Anzahl aktiver Fibroblasten.⁶⁰

Diese Ergebnisse stimmen mit denen der vorliegenden Studie überein: 3 Wochen nach ETACS befinden sich 50 – 75 % aller Fibroblasten in einer metabolisch hochaktiven Phase.

Im weiteren Verlauf zwischen 7 und 38 Monaten nach LACS an Patientenschultern fanden Hayashi et al. überwiegend sekretorisch inaktive Zellkerne, während die Zellzahl weiterhin signifikant erhöht blieb.⁵⁶ Zum gleichen Ergebnis kommen Hecht et al. bereits 90 Tage nach ETACS.⁶³ Hayashi berichtet ebenfalls von wiederhergestellten histologischen Parametern nach 90 Tagen.⁵³

Unsere histologischen Daten zeigen nach einer Rekonvaleszenz von 45 Tagen deutliche Heilungstendenzen, aber gegenüber den Kontrollen eine weiterhin signifikant erhöhte Zellularität, sowie bis zu 50 % „aktivierte“ Fibroblasten. In Anbetracht der erheblich längeren Nachbeobachtungszeiträume der genannten Studien, ist das Ergebnis der eigenen Studie als konsistent einzustufen.

Allerdings kombinierte keine der Arbeitsgruppen um Hayashi, Hecht oder Schaefer eine Immobilisation nach LACS bzw. ETACS mit einer histologischen oder biomechanischen Auswertung. Die eigenen Ergebnisse zeigen in Abhängigkeit vom Nachbehandlungsmodus 3 Wochen nach ETACS signifikante Unterschiede in Bezug auf die Zellularität: Immobilisation verzögert den Anstieg der Zellzahl signifikant ($p = 0,004$).

Eine Hypothese die den genauen Zusammenhang zwischen Immobilisation und Zellularität adressiert, orientiert sich zwangsläufig an der Physiologie der Sehnenheilung, und soll im folgenden aufgestellt werden.

4.1.3 Die postoperative Zellularität bestimmt die Biomechanik der Sehnen

Immobilisationsstudien an Tiermodellen adressieren fast ausschließlich die Heilung von künstlich herbeigeführten Achillessehnen- oder Aussenbandrupturen. Nur in wenigen in-vivo Studien wurden „gesunde“ Sehnen bezüglich ihrer histologischen Veränderungen auf gezielte Stressabschirmung untersucht.^{113,150,152}

Dabei macht es prinzipiell keinen Unterschied, ob man intaktes oder behandeltes Sehngewebe immobilisiert: Stressabschirmung intakter Sehnen versetzt den Metabolismus der Fibroblasten von einem anabolen in einen katabolen Zustand und reduziert die Kollagenmasse.⁵ Ferner geht eine starke Aktivierung intrinsischer und extrinsischer Fibroblasten¹⁵¹ mit einem entscheidenden ultrastrukturellen Umbau der Kollagenfibrillen einher: Das normalerweise bimodale Verteilungsmuster von 80 % großkalibrigen (100 - 250 nm) und 20 % kleinkalibrigen (< 100 nm) Kollagenfibrillen wechselt unter Immobilisation zu einem unimodalen Muster, das überwiegend aus kleinkalibrigen Kollagenfibrillen besteht.⁹¹

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Kollagenfibrillen mit kleinem Durchmesser überwiegend aus Typ III Kollagen bestehen.^{15,145} Diese unimodale Konfiguration von Kollagen Typ III ist aber biomechanisch viel weniger belastbar.⁸⁵

Einige in-vivo Studien zu LACS^{57,120} bzw. ETACS⁶³ ohne Immobilisation beinhalten ebenfalls ultrastrukturelle Analysen zum Arrangement der Kollagenfibrillen. Schon eine Woche nach LACS fanden Hayashi et al. sowohl neu synthetisierte kleine Kollagenfibrillen im Umfeld aktiver Fibroblasten, als auch geschwollene alte Kollagenfibrillen von normaler Größe (100 – 250 nm). Dieser Wechsel von einem bimodalen zu einem unimodalen Fibrillenarrangement setzte sich bis mindestens zum 30. postoperativen Tag fort.⁵⁷ Hecht et al. machten nach ETACS ähnliche Beobachtungen: Direkt postoperativ fanden sie das normale bimodale Verteilungsmuster mit deutlich geschwollenen Kollagenfibrillen als Indikator für deren Denaturierung. Nach 2 Wochen waren bereits die eingewanderten aktiven Fibroblasten von feinen

Fibrillen umgeben. Zum Zeitpunkt von 6 Wochen wurde ein unimodales Arrangement, ausschließlich aus kleinen Fibrillen (< 100 nm) bestehend, beobachtet. Nach 12 Wochen war das ursprüngliche bimodale Verteilungsmuster wieder hergestellt.⁶³ Die biomechanischen Daten der gleichen Arbeitsgruppe zeigen eine deutliche Schwächung nach 2 Wochen, wobei die Belastbarkeit der Sehnen nach 12 Wochen wieder den Kontrollen entspricht.⁶³

Es existieren also genug Daten, um eine starke Korrelation zwischen Zellularität bzw. sekretorischem Potential und Kollagenfibrillenarrangement bzw. biomechanischer Belastbarkeit zu formulieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass der Anstieg der Zellularität RF-behandelter Sehnen durch Immobilisation signifikant ($p = 0,004$) verzögert werden kann.

Immobilisation verhindert den physiologischen Anstieg der Durchblutung und eine angemessene Diffusion von Gewebsflüssigkeit.^{23,27,32} Entsprechend verzögert kommt die durch Mediatoren (PDGF, TGF- β 1-3, TNF- α und FGF) vermittelte frühe Phase der Wundheilung in Gang. Vermutlich ist dabei die chemotaktisch gestützte frühe Immigration von extrinsischen, sowie proliferierenden intrinsischen Fibroblasten behindert. Palmes et. al. beobachteten die Regenerationsprozesse an tenotomierten Achillessehnen in einem in-vivo Maus-Modell: Postoperative Immobilisation verlangsamte die Immigration inflammatorischer Zellen in der frühen Phase (8.Tag).⁹⁹

Ferner ist bekannt, dass Zugkräfte einen adäquaten Stimulus zur Proliferation und Orientierung von Fibroblasten entlang der einwirkenden Kraftvektoren darstellen.¹³ Durch eine nichtinvasive Immobilisation des Hinterlaufes kann ein großer Teil dieser Zugbelastungen auf die Ligg. patellae vermieden werden.

Der Einfluss vom Immobilisation auf Zellularität und Gewebe-remodelling wurde in verschiedenen Tiermodellen untersucht. Atkinson et al.¹⁰ berichteten, dass eine Augmentation der Patellarsehen, nach Entfernung ihres zentralen Drittels, zu einer signifikanten Reduktion von Zellproliferation und Remodelling, sowie zu positiven biomechanischen Ergebnissen führte.

Takahashi et al.¹³³ sind bislang die einzige Arbeitsgruppe, die Immobilisation nach einer thermischen Kapselschrumpfung (Laser) an der Patellarsehne untersucht haben. Sie beobachteten, dass sich 12 Monate nach LACS, die nicht-immobilisierten Sehnen signifikant gegenüber den Kontrollen verlängert hatten. Eine initiale Immobilisation hingegen verhinderte das "Ausleiern" der Sehnen. Gamble zeigte bereits 1984, dass Fibroblasten unter Immobilisation von einem anabolen in einen katabolen Zustand wechseln.⁴⁰

Immobilisation verringert also durch mindestens zwei verschiedene Mechanismen die Stimulation der Fibroblasten. Vermutlich setzt die Regeneration bei Immobilisation nicht nur später ein, sondern reduziert auch die Syntheseleistung der Fibroblasten, und damit den Matrix-Turnover ab (siehe Kap. 4.2).

Die Zellzahlen der Feulgen-Methode und die Scores zeigen, dass Immobilisation für 3 Wochen der exzessiven Proliferation und metabolischen Aktivität vorbeugen. Dieser Verlauf ist aus biomechanischer Sicht der eindeutig günstigere, wie ein Parallelversuch der eigenen Arbeitsgruppe zeigt (siehe auch 4.2 „Kollagen“).^{100,112}

Diese Daten stützen unsere These, dass unter Immobilisation, eine reduzierte Zellzahl mit dementsprechend geringerer Degradation und Synthese von Matrix, maßgeblich dazu beiträgt, das geschrumpfte Kollagengerüst initial zu stabilisieren.⁵⁸

4.2 Kollagen

4.2.1 Deutliche Alteration der kollagenen Mikroarchitektur nach ETACS

Bei seinen Studien an Kadaverschultern untersuchte Hayashi 1997 erstmalig histologische bzw. ultrastrukturelle Parameter kollagenen Gewebes in Abhängigkeit von der applizierten Wärmeenergie: Bei einer Temperatur von 65 bis 80 °C zeigten sich deutliche Alterationen der kollagenen Mikroarchitektur. Die ultrastrukturellen Untersuchungen zeigten, in Übereinstimmung mit später veröffentlichten Studien, einen deutlichen Verlust der kollagentypischen Querstreifung und der Abgrenzbarkeit der Fibrillenränder sowie eine

gleichzeitige Zunahme des Fibrillendurchmessers ab 70 °C.^{51,61,63,120} Hayashi et al. beschreiben in einer in-vivo LACS-Studie an Hasen die postoperative Histologie des Kollagen als „hyalinisiert“.⁵⁷ Naseef et al. berichteten von Verlust der optischen Doppelbrechung kollagenen Kapselgewebes bei Temperaturen von mehr als 60 °C.⁹³ Lopez et al. beschrieben eine positive Korrelation von der RF-Behandlungstemperatur mit dem Ausmaß der Kollagenfaserfusion für Temperaturen zwischen 45 und 85 °C in einem in-vitro Experiment: Bei Temperaturen von 65 bzw. 85 °C waren in Durchschnitt 30 – 50 % der Fläche betroffen.⁸⁰

Diese Befunde korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Die Kollagenfasern sind postoperativ fusioniert bzw. eingeschmolzen, und bilden das morphologische Korrelat einer Koagulationsnekrose. Eine Arbeitstemperatur von 70 °C schrumpft die Sehnen ausreichend, denaturiert aber nur bis zu 50 % des kollagenen Gewebes.

4.2.2 Shrinkage beruht auf einer Entspiralisierung der Tripelhelix

Der mittlerweile allseits akzeptierte Mechanismus des „capsular shrinkage“ wurde erstmalig Ende der fünfziger Jahre von Flory et al.^{36,37} formuliert: Der Verlust der Röntgendiffraktion (Beugung der Röntgenstrahlen an den Kristallen) und der optischen Doppelbrechung (Anisotropie) kollagenen Gewebes nach Erhitzung, sowie die resultierende Schrumpfung, wurde durch den Übergang von einem kristallinen in einen amorphen Zustand begründet.

Dieses Phänomen wurde in der vorliegenden Studie mittels Polarisationsmikroskopie überprüft: Eine deutliche Reduktion der anisotropen Leuchtintensität deutet auf eine Denaturierung der ECM von bis zu 50 % hin.

Aus den bis dato publizierten Ergebnissen zur Histologie bzw. Ultrastruktur von RF- oder Laser-behandeltem Kollagen und frühen Studien zu dessen Tertiärstruktur folgerte Hayashi im Jahre 2000, dass nur eine Entspiralisierung der Tripelhelix für die Längenreduktion des Kollagen verantwortlich sein kann.⁵⁸ Durch Gelelektrophorese nach Trypsininkubation konnte er zeigen, dass die Trypsin-Suszeptibilität von Laser-behandeltem kollagenen Gewebe signifikant über der von intaktem Kollagen lag.

Enzymatische Verdauung kann in dem Maße aber nur bei denaturierter bzw. entspiralisierter Tripelhelix stattfinden. Schon 1996 hatte dieselbe Arbeitsgruppe in einer in-vitro Studie an Kaninchen die Konzentrationen von Kollagen Typ I (Hydroxyprolin) und nichtreduzierbaren intermolekularen Bindungen (Hydroxylysylpyridinolin) nach LACS untersucht. Demnach wurden die Konzentrationen von HP und HYP weder durch LACS, noch durch Erhitzung im Wasserbad beeinflusst.⁵⁸

Diese Ergebnisse ließen folgenden Schluss zu: Nach Wärmeapplikation von über 45 °C kommt es durch Kollaps der hitzelabilen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zu einer Entspiralisierung der kollagenen Tripelhelix, wobei die α -Helices intakt bleiben und sich dank der hitzestabilen intermolekularen Bindungen verkürzt aggregieren.

4.2.4 Geschrumpftes Gewebe ist biomechanisch beeinträchtigt

Die Belastbarkeit von kollagenem Bindegewebe wird ausschließlich durch die extrazelluläre Matrix bestimmt. Gewebe, die einem Remodeling oder Matrixturnover unterliegen, sind prinzipiell schwächer und besitzen eine gesteigerte Anzahl hitzelabiler Brückenbindungen. Im Gegensatz dazu verfügen reife Gewebe über eine höhere Anzahl an hitzestabilen Brückenbindungen.^{34,38,39,96} Hecht et al. berichteten, dass zwar die Trypsin-Suszeptibilität direkt postoperativ sowie 2 Wochen nach ETACS signifikant reduziert war, sich jedoch 6 Wochen nach RF-Behandlung wieder normalisierte.⁶³

In Übereinstimmung mit Schaefer¹²⁰ und Wallace¹⁴² zeigen auch die biomechanischen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass Laser- bzw. RF-behandeltes Gewebe besonders in der frühen Phase über die präoperative Länge hinaus elongiert.¹¹² Pötzl et al. konnten zeigen, dass RF-behandelte Sehnen signifikant weniger elongierten und größeren Belastungen standhielten, solange sie durch eine Gipsschiene von mechanischem Stress abgeschirmt wurden.^{107,112}

Dieses Phänomen ist gemäß den bisherigen Ausführungen auf die fehlenden reifen Brückenbindungen in der frühen Regenerationsphase nach LACS oder

ETACS und die somit auf reduzierte biomechanische Stabilität zurückzuführen.¹¹⁸

Es wurde gezeigt, dass der Kollagenfibrillendurchmesser positiv mit der Zugfestigkeit des Gewebes korreliert (siehe auch 4.1).^{51,63,120,142} Diese Erkenntnisse werden durch die Tatsache ergänzt, dass die Größe von Kollagenfibrillen positiv mit der Anzahl der intramolekularen kovalenten Bindungen korreliert.

Die vorliegende Studie erläutert eine mögliche Beziehung zwischen Zellularität und Stärke des Matrix-turnover in Zusammenhang mit Immobilisation nach ETACS (siehe 4.1): Je milder der Remodeling-Prozess bzw. die Kollagen-Degradation und Neusynthese (Matrix-turnover) ausfallen, umso geringer sind auch die biomechanischen Einbußen der RF-behandelten Sehnen.

Aufgrund der geringen Gruppenstärke ist die Immobilisation mittels Gipsschiene (3 Wochen nach ETACS) allerdings nicht signifikant, sondern nur tendenziell ($p=0,054$) von Vorteil für den Heilungsverlauf, der durch dieses Verfahren in seiner Dynamik moduliert werden kann.

4.2.5 Ist der Heilungsverlauf der Sehnen unter Immobilisation günstiger?

Hayashi et al. berichten am 7. Tag nach LACS an Kaninchen von multifokalen Regionen azellulären und hyalinisierten Kollagens. Nach 30 Tagen waren die hyalinisierten Bereiche fast vollständig durch unorganisiertes Bindegewebe ersetzt.⁵⁷ Hecht et al. fanden 2 Wochen nach ETACS hyalinisierte Bereiche, deren Grenzen von proliferierenden Fibroblasten und Kapillaren infiltriert wurden. Nach einer Rekonvaleszenz von 6 Wochen waren die azellulären Matrixreste fast vollständig durch hyperzelluläres Bindegewebe ersetzt. Die normale wellig-lamelläre Anordnung der Kollagenfaserbündel zeigte sich nach 12 Wochen.⁶³

Bei der Nachuntersuchung von Patienten, die mit LACS behandelt wurden, fanden Hayashi et al. 3 Monate nach dem Eingriff kein hyalinisiertes Kollagen mehr. Im mittel- und langfristigen Follow-up (7 bis 38 Monate) wurde eine vollständige Gewebereifung nachgewiesen.⁵⁶

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass 3 Wochen nach ETACS sowohl in der Immobilisierten als auch in der mobilen Gruppe im Mittel keine hyalinisierten Bereiche mehr vorgefunden wurden. Die licht- und polarisationsmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass die Kollagenfasern ihre Orientierung bzw. doppelbrechenden Eigenschaften größtenteils verloren haben. Das ist ein deutliches Anzeichen dafür, dass die periodische Anordnung der Mikrofibrillen aufgehoben ist. Verantwortlich dafür ist vermutlich eine Neusynthese von initial gering vernetzten Kollagenvorläufermolekülen im Zuge des Matrix-turnover (siehe auch Kap. 1.3.2).

Allerdings wurde die lichtmikroskopisch untersuchte Faserorientierung der immobilisierten Sehnen tendenziell besser bewertet ($p = 0,054$) als die der mobilen Sehnen. Die doppelbrechenden Eigenschaften der entsprechenden Gruppe verfehlte in der statistischen Testung nur knapp einen Trend ($p = 0,117$). Das polarisationsmikroskopische Korrelat von neu synthetisierter ECM ist hierbei wie bereits erwähnt ist eine abgeschwächte anisotrope Leuchtintensität. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Dynamik des Matrix-Turnover durch Immobilisation, und damit eingeschränkter Mechanotransduktion und Mechanostimulation, begrenzt werden kann.

Neun Wochen nach ETACS präsentieren sowohl die (temporär) immobilisierte, als auch die dauerhaft mobile Gruppe eine nahezu identische Fibrillenorientierung. Diese Entwicklung zeigt, dass die Suffizienz des Remodeling-Prozesses von den verschiedenen Nachbehandlungsmodi nicht beeinflusst wird.

Zusätzlich schützt die Gipsschiene innerhalb der ersten 3 bzw. 6 Wochen nach ETACS, also für die biomechanisch schwächste Periode der Nachbeobachtungszeit, vor unerwünschter Elongation.¹¹² Unsere Ergebnisse zeigen nach 9 Wochen unabhängig vom Nachbehandlungsmodus allerdings noch immer kein vollständig ausgereiftes Kollagen. Trotz günstigerer Ausgangsbedingungen durch Anwendung der Grid-Pattern Methode (siehe 4.1) ist in der vorliegenden Studie kein zeitlicher Regenerationsvorsprung gegenüber anderen Studien evident. Offenbar benötigen die Kollagenfibrillen

eine längere Rekonvaleszenz als 9 Wochen, um zu ihrer ursprünglichen Anordnung zurückzufinden.

4.3 Vaskularisierung

4.3.1 Revaskularisierung wird durch Immobilisation beeinträchtigt

Hayashi et al. berichten nach LACS an der Schultergelenkkapsel von stark zusammengezogenen Gefäßen in der subsynovialen Schicht. Direkt postoperativ waren die Vaskularisierungs-Scores signifikant verschlechtert. Drei Monate später war der Großteil der Endothelzellen reaktiv vergrößert, und die Vaskularisierung gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Nach 6 Monaten konnten keine Unterschiede zu den Kontrollen mehr festgestellt werden. Insgesamt 6 Patienten erlitten eine milde temporäre Versteifung ihrer Schultern nach LACS. Bei diesem Kollektiv verblieb das Endothel auch über 6 Monate hinaus in einem reaktiven Zustand. Die tieferen intraligamentären Schichten wurden in ihrer Vaskularisierung zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant verändert.⁵⁶

Hecht et al. behandelten 24 Schafe am Femoro-Patellar-Gelenk mit RF-Energie. Unmittelbar postoperativ waren die Gefäße der subsynovialen sowie auch der intraligamentären Schichten thrombosiert und zusammengezogen. Ferner wurden deutliche Zeichen der endothelialen Nekrose vorgefunden. Nach 2 Wochen sind kapilläre Einsprossungen, charakterisiert durch reaktiv vergrößerte Endothelzell-Nuklei, an den Grenzen zwischen azellulärem und vitalem Gewebe zu sehen. 6 Wochen nach ETACS ist das Gewebe hochgradig vaskularisiert. Nach 12 Wochen ist die Morphologie des Endothels statistisch nicht mehr von den Kontrollen zu unterscheiden. Die Zahl der Gefäße bleibt allerdings weiterhin erhöht. In dieser Studie beziehen sich die Veränderungen nicht nur auf die subsynoviale, sondern auch auf die ligamentäre Schicht.⁶³

Die Ergebnisse von Hecht⁶³ und Hayashi⁵⁶ stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein. Im direktem Vergleich zu Hecht⁶³ zeigt die mobile Gruppe weitgehende Parallelen der Scores im zeitlichen Verlauf.

Die Ergebnisse zu Kollagenstruktur (Kap. 4.2) und Zellularität (Kap. 4.1) bei Immobilisation lassen auf einen reduzierten Stoffumsatz im Rahmen des gebremsten Matrix-Turnovers schließen. Im Einklang mit dieser Hypothese zeigen sich nach dreiwöchiger Immobilisation signifikant ($p = 0,009$) schmalere Endothelzell-Nuklei. Die Größenzunahme der Zellkerne in der mobilen Gruppe, geht dabei auf eine Steigerung der funktionellen Leistungsfähigkeit des Endothels zurück.⁶⁸ Dieses Prinzip liegt wahrscheinlich auch der von Hayashi⁵⁶ und Hecht⁶³ als „reaktiv“ beschriebenen endothelialen Kernmorphologie zu Grunde.

4.3.3 Revaskularisierung und Angiogenese in Sehnen

Viele in-vivo und in-vitro Studien behandeln die Rolle der Vaskularisierung im Rahmen verschiedener Sehnenpathologien.^{7,16,18,23,42-44,69,71,76,84,85,106,124}

RF-Energie bedingte eine akute Nekrose der Kapillaren, wobei nahezu die ganze Sehne betroffen war. Es ist zu vermuten, dass die endothelialen Transportvorgänge nicht in optimaler Weise stattfinden können. Außerdem muss davon ausgegangen werden, dass zusätzlich die kapilläre Basalmembran (Kollagen Typ IV) geschrumpft wurde, wodurch sich das Lumen der Gefäße zusätzlich verringert hat. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die Sehnendurchblutung und damit die nutritive Versorgung der Fibroblasten eingeschränkt ist.

In der vorliegenden Studie wird also eine primär „gesunde“ Sehne nahezu komplett geschädigt. Daher kommt eigentlich nur ein Vergleich mit dem Revaskularisierungsprozess eines Patellatransplantates zur Kreuzbandrekonstruktion in Frage. Alle anderen Revaskularisierungsmuster in kollagenem Gewebe gehen von primär chronisch geschädigten Sehnen aus, oder untersuchen streng lokal begrenzte Pathologien.

4.3.4 Revaskularisierung: Capsular shrinkage vs. Kreuzbandtransplantat

Die Neovaskularisierung von Sehnen-Transplantaten wurde bereits in vielen Tiermodellen und Patientenstudien erforscht. Das Lig. patellae wird dabei oft als

Autograft eingesetzt, um ein geschädigtes vorderes oder hinteres Kreuzband zu ersetzen.^{4,15,16,18,71} Es wird angenommen, dass das Langzeitüberleben eines Sehnentransplantates von dessen Revaskularisierung abhängt.⁴ Paulos et al. beschrieben 1983 eine modifizierte Operationsmethode, mit dem Ziel, patella-assoziierte Gefäße bei der Entnahme zu schonen und später im Kniegelenk zu re-anastomosieren.¹⁰¹

Die Phasen der Transplantatrevaskularisierung wurden von Bosch und Kasperczyk^{17,18,71} wie folgt beschrieben: Die erste Phase beginnt nach etwa zwei Wochen und ist geprägt von reich vaskularisiertem lockeren Bindegewebe, welches das Transplantat umgibt. Während der zweiten Phase (6. – 10. Woche) erfolgt eine zentripetal gerichtete Zellproliferation und Revaskularisierung ausgehend vom distalen und proximalen Drittel des Transplantates. Phase drei (10. – 20. Woche) zeigt die vollständige Revaskularisierung der Sehnen. Gleichzeitig steigt die Belastbarkeit des Transplantates an. In der vierten Phase (20. – 50. Woche) werden nach der 26. Woche keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle mehr festgestellt. Trotzdem bleiben die biomechanischen Fähigkeiten der Transplantate klar unter denen normaler Kreuzbänder.^{17,71}

Der Revaskularisierungsprozess der Implantate geht hauptsächlich von endostalen Gefäßen der knöchernen Implantationsstellen, dem infrapatellaren Fettkörper und von synovialen Gewebe aus.^{7,26}

In der vorliegenden Studie wurden nur die distalen Anteile der „geshrinkten“ Sehnen untersucht. Der postoperative Nachbeobachtungszeitraum war auf neun Wochen begrenzt. Trotzdem fallen deutliche Parallelen zwischen der Revaskularisierung der Kreuzbandimplantate und der RF-behandelten mobilen Sehnen auf.

Im Gegensatz zu den transplantierten Sehnen ist es jedoch möglich, dass trotz RF-Behandlung auf der Vorderseite der Sehnen noch funktionsfähige Kapillaren an deren Rückseiten existieren. Unabhängig davon ist es jedoch erwiesen, dass eine Verringerung der Blutversorgung den Reparationsprozess behindert.^{115,116} RF-Energie vermag also kollagenes Gewebe zu schrumpfen,

behindert aber gleichzeitig, durch Schädigung der Kapillaren, dessen Regeneration.

4.3.5 Immobilisation reduziert die Revaskularisierung

Yasuda et al. resumieren nach einem Experiment zur Achillessehnen-Regeneration bei gleichzeitiger Knieimmobilisation, dass eine adäquate Blutversorgung der Schlüsselfaktor der Sehnenheilung sei. Nur bei entsprechender Mobilisation kann der venöse Rückstrom durch die Muskelpumpe gewährleistet werden. Ist dies nicht der Fall, tritt ein chronischer Blutstau auf und behindert die Geweberegeneration.¹⁵³ Kvist et al. fanden eine 30%ige Abnahme ($p = 0.001$) der Kapillardichte im myotendinealen Übergang des M. gastrocnemius nach dreiwöchiger Immobilisation.⁷⁶ Bray et al. beschreiben eine positive Korrelation zwischen dem Heilungspotential einer Meniskusläsion und der Vaskularisierung des Gewebes. Unter Immobilisation war allerdings nur der Blutfluss, nicht aber die Angiogenese in den Menisci verringert.²³

Es wäre also durchaus denkbar, dass die biomechanisch ungünstige Hyperzellularität nach ETACS ohne Immobilisation auf das Konto einer stärkeren Revaskularisierung und Neoangiogenese geht. Gerade die frühe Invasion von Fibroblasten ist ja vermutlich vaskulär bedingt, während die zweite Proliferationsphase von den intrinsischen Fibroblasten ausgeht (siehe Kap. 1.5). Paradoxe Weise könnte sich die Immobilisation durch eine geringere Revaskularisierung günstig auf die Sehnenheilung nach ETACS auswirken.

4.4 Innervation

4.4.1 Immobilisation beschleunigt die Reinnervation der Sehnen

Takahashi et al. führten den bislang einzigen in-vivo Versuch zur Evaluation von Mechanorezeptoren nach LACS durch. Nach 14 Tagen war die Gesamtanzahl der Mechanorezeptoren in den laserbehandelten Sehnen signifikant gesunken ($p = 0,002$). Achtzehn Monate nach der Laser-Behandlung

konnten keine Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen mehr festgestellt werden ($p = 0,3$).¹³³

Auch die eigenen Ergebnisse zeigen einen signifikanten Rückgang aller neurofilamentären Strukturen. RF-Energie besitzt offenbar eine stark schädigende Potenz gegenüber Nervengewebe. Diese Erkenntnis deckt sich mit dem Auftreten von Läsionen des Nervus axillaris nach LACS und ETACS. Wong et al. berichten diesbezüglich in einer retrospektiven Multicenter-Studie über eine Komplikationsrate von durchschnittlich 1,37 %. Die sensorischen und motorischen Ausfallserscheinungen bestanden im Durchschnitt 3 Monate und waren in 95 % der Fälle reversibel.

Aune et al. untersuchten die Reinnervation eines Autotransplantates der Patellarsehne nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes in einem in-vivo Rattenmodell. Anhand verschiedener Antikörperfärbungen (Substanz P, CGRP, Protein 43/B-50) konnte gezeigt werden, dass eine sensorische Reinnervation der Transplantate erfolgte, die jedoch nicht vor der dritten postoperativen Woche einsetzte.¹¹

Wada et al. untersuchten die Anzahl an Mechanorezeptoren und freien Nervenendigungen eines Patellarsehnen-Autotransplantates nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes in einem in-vivo Kaninchenmodell. Dabei unterschied sich die Gesamtzahl der Rezeptoren und freien Nervenendigungen 10, 20 und 30 Wochen nach der Operation nicht von den Kontrollen.¹⁴⁰

Shimizu et al. vermuteten nach einem ähnlichen Versuch, dass die Regeneration von Mechanorezeptoren zwischen der zweiten und vierten postoperativen Woche beginnt.¹²³

Das bisher geschilderte Reinnervationszeitpunkte stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein. Wir konnten nach 6 Wochen unter Immobilisation keine signifikanten Unterschiede mehr gegenüber den Kontrollen feststellen. Ohne Immobilisation erfolgte interessanterweise überhaupt keine signifikante Reinnervation der Sehnen im gesamten Untersuchungszeitraum.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen unter Immobilisation signifikant bessere Reinnervationsergebnisse gegenüber der mobilen Nachbehandlung. Es ist unklar, inwiefern Schutz vor mechanischem Stress und Elongation oder Änderungen im Metabolismus der Sehnen eine Rolle spielen. Möglicherweise begünstigt mechanische Beanspruchung eine aggressive Degradation und Neusynthese von Kollagenfasern (Matrix-Turnover), und behindert somit das Wachstum neuer Axone.

Takahashi et al. konnten allerdings in einer Langzeitstudie zeigen, dass 18 Monate nach LACS auch ohne Immobilisation eine Reinnervation der behandelten Kaninchesehnen erfolgt war.¹³³ Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Sehnen auch ohne Immobilisation re-innerviert werden, der Prozess aber entsprechend später einsetzt.

Klinische Studien zur Propriozeption im Rahmen verschiedener Schulteroperationen konnten ebenfalls bestätigen, dass die sensorische Innervation von Schultergelenkkapseln, 6 bis 24 Monate nach „capsular shrinkage“ nicht beeinträchtigt war.⁷⁷

Die vorliegende Studie zeigt, dass es zu einer fast vollständigen Deafferenzierung nach ETACS kommt. Als Nebeneffekt bietet die RF-Behandlung der Schultergelenkkapsel somit die Möglichkeit einer „kausalen“ Schmerztherapie.⁶ So ist auch das auffallend gute Abschneiden von ETACS und LACS in Fragebögen bezüglich der postoperativen Schmerzen zu erklären.⁷⁷ Fehlende Schmerzen in der Rehabilitationsphase könnten jedoch zu ungünstig früher Mobilisation seitens der Patienten führen. Auch die Rehabilitationsverfahren die insbesondere auf eine propriozeptive Sensibilisierung aufbauen, sind möglicherweise ohne eine initiale Immobilisation nur begrenzt effektiv. Weiterführende klinische Studien zu dieser Fragestellung sind für ein sinnvolles Rehabilitationdesign notwendig.

4.4.2 Intakte Innervation leistet einen wichtigen Beitrag zur Wundheilung

Bisher ist wenig über den Beitrag der Innervation zur Heilung von Ligamenten und Sehnen bekannt, obwohl es Beweise für eine erhebliche Beteiligung des peripheren Nervensystems (PNS) im Rahmen der Wundheilung gibt.

Stelnicki et al. zeigten, dass die Haut kleiner Lämmer intakte Innervation benötigt, um nach verschiedenen Inzisionen ohne Vernarbungen abheilen zu können.¹³² Sympathische Denervation verschlechterte den Wundheilungsprozess der Haut von Ratten.⁷³ Auch die Frakturheilung von Knochen ist stark von intakter Innervation abhängig.^{8,9}

Ivie et al. durchtrennten die medialen Kollateralbänder von Kaninchen, wobei die Hälfte der Tiere zusätzlich durch eine Teilresektion des N. femoralis im Bereich des Kniegelenkes denerviert wurden. Nach einer sechswöchigen Rekonvaleszenz fielen die denervierten Tiere durch signifikant schlechtere biomechanische Parameter gegenüber den innervierten Tieren auf. Ivie et al. folgerten daraus, dass intakte Innervation einen kritischen Beitrag zur frühen Phase der Wundheilung leistet.⁶⁶

Der Mechanismus, über den sich die sympathische Innervation positiv auf die Wundheilung auswirkt, ist allerdings immer noch unklar. Zum einen verstärken viele Neuropeptide den Blutfluss²⁰ und die Vaskularität²⁰ verletzter Ligamente durch neurogene Mechanismen: Die Neuropeptide „calcitonin gene-related“ peptide (CGRP), „substance P“ sowie das „vasoactive intestinal polypeptide“ sind potente Vasodilatoren, und steigern somit den Blutfluss und Kapillarpermeabilität.⁶⁵ Zum anderen agiert CGRP darüber hinaus als Mitogen für Endothelzellen.⁵⁰ Es konnte gezeigt werden, dass PAR2 Rezeptoren peptiderger Neurone von mastzell-assoziiierter Tryptase aktiviert werden und dadurch die lokale Entzündung verstärken.¹³¹

In der vorliegenden Studie findet keine signifikante Regeneration der Nervenfasern bzw. Nervenbündel statt, wenn die Sehnen nicht immobilisiert wurden. Falls andere Untersucher zu ähnlichen Ergebnissen gelangen sollten, wäre eine Immobilisation, aufgrund des großen Heilungspotentials intakter Innervation anzuraten.

Auffallend ist auch, dass unter Immobilisation eine größere Anzahl von Nervenfasern im perivaskulären Bindegewebe lokalisiert ist (nach 3 Wochen: $p = 0,069$ / nach 9 Wochen: $p = 0,082$). Aus histo-morphologischer Sicht ist also

ein höherer Innervations-grad anzunehmen. Diese Hypothese ist aus den Daten der Studie jedoch nicht zu validieren.

4.5 Limitationen der Studie

Da jede Tierversuchsstudie einige methodische Limitationen besitzt, sollten die erzielten Ergebnisse mit entsprechender Vorsicht interpretiert werden. Das Lig. patellae ist nicht das ideale Referenzmodell zur menschlichen Schultergelenkkapsel. Vor allem die Unterschiede zwischen dem kapsuloligamentären Bindegewebe der Schulter und dem tendinösen Gewebe der Sehnen muss berücksichtigt werden. Ferner sind kleine Abweichungen der Ultrastruktur und des Kollagengehaltes zwischen den Ligamenten und Sehnen von Mensch und Tier vorhanden. Allerdings konnte nur in diesem Tiermodell ein reproduzierbares „shrinkage“ von 5 % der individuelle Sehnenlänge gewährleistet werden. In klinischen sowie tierexperimentellen Studien wurden darüber hinaus übereinstimmende Ergebnisse in Bezug auf das Verhalten kollagenen Gewebes auf Wärmeenergie erzielt.^{52,53}

Eine weiter wichtige Feststellung ist, dass der M. quadrizeps trotz Immobilisation imstande war sich isometrisch zu kontrahieren und somit Spannung auf die Sehne zu übertragen. Ungeachtet dessen ist dies das erste Tiermodell in dem eine histologische Untersuchung nach ETACS mit postoperativer Immobilisation verbunden wurde. Es ist schwierig die Immobilisation eines Kaninchenkniegelenkes per Gipsschiene mit der Ruhigstellung einer Patientenschulter mittels Gilchristverband zu vergleichen. Allerdings zeigen sowohl die histologischen als auch die biomechanischen Ergebnisse einen Unterschied zwischen den Nachbehandlungsmodi und somit die Effektivität der Immobilisationstechnik. Aus Gründen des Tierschutzes waren keine invasiveren Immobilisationstechniken vertretbar.

Ein weiteres methodisches Problem war, dass das kollagene Gewebe der Kaninchensehnen initial intakt war. Im klinischen Bereich würden jedoch vermutlich auch pathologisch veränderte Schultergelenkkapseln mit ETACS

behandelt.¹¹⁸ Auch die applizierte Energiemenge ließ sich nicht so exakt wie in einer in-vitro Studie bestimmen, obwohl eine bipolare Elektrode mit Temperaturanzeige verwandt wurde.⁶¹

Ferner führten wir keine arthroskopische, sondern eine offene Operation durch. Der Hautschnitt verlief über die gesamte Patellarsehnenlänge. Damit induzierten wir potentiell postoperative Verwachsungen im OP-Gebiet auf der Sehne. Bei einigen Tieren waren beginnende adhäsive Verwachsung der Sehne mit den subcutanen Gewebe der Haut während der Sehnenexplantation erkennbar.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Radiofrequenz (RF)-assistiertes „capsular shrinkage“ ist ein derzeit verstärkt eingesetztes arthroskopisches Verfahren zur Behandlung von Schulterinstabilität und hyperlaxen Ligamenten. Mit einer bipolaren RF-Elektrode wird dabei hochfrequenter Strom auf kollagenes Bindegewebe appliziert. Die Erhitzung bewirkt eine Verkürzung von Kollagenfasern, womit kurzfristig das Kapselvolumen bzw. die Länge von Ligamenten reduziert werden kann.^{35,45,60,88}

Allerdings induziert die starke thermische Schädigung des kollagenen Gewebes im Rahmen von Radiofrequenz-, oder Laser-Behandlungen einen umfangreichen Heilungsprozess.^{56,57,63,80,120} Dieser vermindert die biomechanische Belastbarkeit des kollagenen Gewebes in der postoperativen Phase.^{51,52,114,120} Aktuelle klinische Studien beziffern das Rezidivrisiko nach thermischer Kapselschrumpfung mit 8 - 20 %.^{35,146} In keiner dieser Studien erfolgte eine gezielte bzw. einheitliche postoperative Immobilisation der behandelten Schultergelenkkapseln. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss postoperativer Immobilisation nach RF-induzierter Kapselschrumpfung histologisch zu untersuchen.

In einem in-vivo Tiermodell wurden die Lig. patellae von 66 Kaninchen durch die Behandlung mit Radiofrequenz-Energie verkürzt und bis zu 9 Wochen immobilisiert. Die Regenerationsdynamik der Lig. patellae wurde anhand der Parameter Apoptose und Zellularität, Kollagenturnover, Reinnervation und Revaskularisierung evaluiert. Insbesondere wurden dabei histologische und immunhistochemische Färbemethoden, sowie TUNEL-Labeling und Polarisationsmikroskopie eingesetzt. Ein Vergleich der Nachbehandlungsmodi erfolgte durch semi-quantitativen Scores und durch computer-assistierte Bildanalyse.

Wir konnten feststellen, dass RF-Energie die Apoptose von Fibroblasten unmittelbar nach RF-Applikation induziert. Innerhalb der ersten 3 postoperativen Wochen existieren signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Immobilisations-Nachbehandlungen. Ohne Immobilisation

steigt die Zellzahl zum Zeitpunkt 3 Wochen signifikant an. Gleichsam steigt die absolute Zahl apoptotischer Zellen, nicht aber die relative Apoptoserate an.⁷⁵ Die immobilisierten Sehnen zeigen zum Zeitpunkt 3 Wochen für die Kollagen-, ($p = 0,054$) und Vaskularisierungs-Scores ($p = 0,009$) eine qualitativ bessere Regeneration, sowie eine geringere Zellularität ($p = 0,004$) gegenüber den mobilen Sehnen.^{75,110} Eine Reinnervation erfolgt ausschließlich nach mindestens dreiwöchiger Immobilisation.¹⁰⁹ Trotz signifikant verbesserter histologischer Parameter regenerieren die Sehnen bei keinem Behandlungs-Regime vollständig.

Wir konnten zeigen, dass Immobilisation während der frühen Phase der Sehnenheilung die reaktive Hyperzellularität des Gewebes supprimiert.^{75,110} Von einer konsekutiv reduzierten Degradation und Neusynthese der Kollagenfasern profitiert die Gewebereifung und damit auch die biomechanische Stabilität der Sehnen.^{108,112}

Alle in-vivo Tierversuchsmodelle zeigen auch nach Abschluss der Heilungsphase eine starke Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften behandelten Gewebes gegenüber den Kontrollen.

Die vorliegende Studie zeigt, dass radiofrequenz-behandeltes kollagenes Gewebe, unter histologischen Gesichtspunkten, von einer drei- bis sechswöchigen Immobilisation deutlich profitiert. Zu einem korrespondierenden Ergebnis kommen biomechanische Studien unserer Arbeitsgruppe.^{108,112}

Trotz der Limitationen dieses Tiermodells sind unter klinischen Bedingungen analoge Effekte bei konsequenter Immobilisation nach thermischer Kapselschrumpfung zu erwarten. Im Hinblick auf die postoperative Immobilisation nach ETACS sind weitere klinische Studien erforderlich, um die bisherigen Ergebnisse dieser neuen Technologie durch optimierte Nachbehandlung weiter zu verbessern.

6. Literaturverzeichnis

1. Adachi N, Ochi M, Uchio Y, Iwasa J, Ryoke K, Kuriwaka M (2002) Mechanoreceptors in the anterior cruciate ligament contribute to the joint position sense. *Acta Orthop Scand* 73: 330-334
2. Adams CS, Horton WE, Jr. (1998) Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec* 250: 418-425
3. Altchek DW, Warren RF, Skyhar MJ, Ortiz G (1991) T-plasty modification of the Bankart procedure for multidirectional instability of the anterior and inferior types. *J Bone Joint Surg Am* 73: 105-112
4. Amiel D, Kleiner JB, Akeson WH (1986) The natural history of the anterior cruciate ligament autograft of patellar tendon origin. *Am J Sports Med* 14: 449-462
5. Amiel D, Woo SL, Harwood FL, Akeson WH (1982) The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. *Acta Orthop Scand* 53: 325-332
6. Arnoczky SP, Aksan A (2000) Thermal modification of connective tissues: basic science considerations and clinical implications. *J Am Acad Orthop Surg* 8: 305-313
7. Arnoczky SP, Tarvin GB, Marshall JL (1982) Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog. *J Bone Joint Surg Am* 64: 217-224
8. Aro H, Eerola E, Aho AJ (1985) Development of nonunions in the rat fibula after removal of periosteal neural mechanoreceptors. *Clin Orthop* 292-299
9. Aro H, Eerola E, Aho AJ, Penttinen R (1981) Healing of experimental fractures in the denervated limbs of the rat. *Clin Orthop* 211-217

10. Atkinson PJ, Oyen-Tiesma M, Zukosky DK, DeCamp CE, Mackenzie CD, Haut RC (1999) Patellar tendon augmentation after removal of its central third limits joints tissue changes. *J Orthop Res* 17: 28-36
11. Aune AK, Hukkanen M, Madsen JE, Polak JM, Nordsletten L (1996) Nerve regeneration during patellar tendon autograft remodelling after anterior cruciate ligament reconstruction: an experimental and clinical study. *J Orthop Res* 14: 193-199
12. Banes AJ, Tsuzaki M, Yamamoto J, Fischer T, Brigman B, Brown T, Miller L (1995) Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol* 73: 349-365
13. Becker H, Graham MF, Cohen IK, Diegelmann RF (1981) Intrinsic tendon cell proliferation in tissue culture. *J Hand Surg [Am]* 6: 616-619
14. Biagas K (1999) Hypoxic-ischemic brain injury: advancements in the understanding of mechanisms and potential avenues for therapy. *Curr Opin Pediatr* 11: 223-228
15. Bosch U, Decker B, Kasperczyk W, Nerlich A, Oestern HJ, Tscherne H (1992) The relationship of mechanical properties to morphology in patellar tendon autografts after posterior cruciate ligament replacement in sheep. *J Biomech* 25: 821-830
16. Bosch U, Decker B, Kasperczyk W, Nerlich A, Oestern HJ, Tscherne H (1992) The relationship of mechanical properties to morphology in patellar tendon autografts after posterior cruciate ligament replacement in sheep. *J Biomech* 25: 821-830
17. Bosch U, Kasperczyk WJ (1992) Healing of the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction--a process of ligamentization? An experimental study in a sheep model. *Am J Sports Med* 20: 558-566

18. Bosch U, Kasperczyk WJ, Oestern HJ, Tscherne H (1990) [Healing phases in autogenous posterior cruciate ligament replacement. A decision aid for after-care. A biomechanical and histologic study]. Unfallchirurg 93: 187-196
19. Bosch U, Zeichen J, Skutnek M, Albers I, van Griensven M, Gassler N (2002) Effect of cyclical stretch on matrix synthesis of human patellar tendon cells. Unfallchirurg 105: 437-442
20. Bray RC, Butterwick DJ, Doschak MR, Tyberg JV (1996) Coloured microsphere assessment of blood flow to knee ligaments in adult rabbits: effects of injury. J Orthop Res 14: 618-625
21. Bray RC, Doschak MR, Gross TS, Zernicke RF (1997) Physiological and mechanical adaptations of rabbit medial collateral ligament after anterior cruciate ligament transection. J Orthop Res 15: 830-836
22. Bray RC, Fisher AW, Frank CB (1990) Fine vascular anatomy of adult rabbit knee ligaments. J Anat 172: 69-79
23. Bray RC, Smith JA, Eng MK, Leonard CA, Sutherland CA, Salo PT (2001) Vascular response of the meniscus to injury: effects of immobilization. J Orthop Res 19: 384-390
24. Burkhead WZ, Jr., Rockwood CA, Jr. (1992) Treatment of instability of the shoulder with an exercise program. J Bone Joint Surg Am 74: 890-896
25. Chowdhury P, Matyas JR, Frank CB (1991) The "epiligament" of the rabbit medial collateral ligament: a quantitative morphological study. Connect Tissue Res 27: 33-50
26. Clancy WG, Jr., Narechania RG, Rosenberg TD, Gmeiner JG, Wisnefske DD, Lange TA (1981) Anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in rhesus monkeys. J Bone Joint Surg Am 63: 1270-1284

27. Clark MG, Clerk LH, Newman JM, Rattigan S (2000) Interaction between metabolism and flow in tendon and muscle. *Scand J Med Sci Sports* 10: 338-345
28. Cleeman E, Flatow EL (2000) Shoulder dislocations in the young patient. *Orthop Clin North Am* 31: 217-229
29. Cobbold A, Lewis O (1956) The nervous control of joint blood vessels. *J Physiol* 133: 467-471
30. Cooper RA, Brems JJ (1992) The inferior capsular-shift procedure for multidirectional instability of the shoulder. *J Bone Joint Surg Am* 74: 1516-1521
31. D'Alessandro DF, Bradley JP, Fleischli JE, Connor PM (2004) Prospective evaluation of thermal capsulorrhaphy for shoulder instability: indications and results, two- to five-year follow-up. *Am J Sports Med* 32: 21-33
32. Date T (1986) The influence of exercise in the healing of the rabbit Achilles tendon. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 60: 449-454
33. Duncan R, Savoie FH, III (1993) Arthroscopic inferior capsular shift for multidirectional instability of the shoulder: a preliminary report. *Arthroscopy* 9: 24-27
34. Eyre DR, Paz MA, Gallop PM (1984) Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* 53: 717-748
35. Favorito PJ, Langenderfer MA, Colosimo AJ, Heidt RS, Jr., Carlonas RL (2002) Arthroscopic laser-assisted capsular shift in the treatment of patients with multidirectional shoulder instability. *Am J Sports Med* 30: 322-328
36. Flory PJ, Garrett RR (1958) Phase transition in collagen and gelatin systems. *J Am Chem Soc* 80: 4836-4845

37. Flory PJ, Spurr OK (1960) Melting equilibrium for collagen fibers under stress- Elasticity in the amorphous state. *J Am Chem Soc* 83: 1308-1316
38. Frank C, McDonald D, Shrive N (1997) Collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament scar: a longer term assessment. *Connect Tissue Res* 36: 261-269
39. Frank C, McDonald D, Wilson J, Eyre D, Shrive N (1995) Rabbit medial collateral ligament scar weakness is associated with decreased collagen pyridinoline crosslink density. *J Orthop Res* 13: 157-165
40. Gamble JG, Edwards CC, Max SR (1984) Enzymatic adaptation in ligaments during immobilization. *Am J Sports Med* 12: 221-228
41. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501
42. Gelberman RH (1985) Flexor tendon physiology: tendon nutrition and cellular activity in injury and repair. *Instr Course Lect* 34: 351-360
43. Gelberman RH, Amifl D, Gonsalves M, Woo S, Akeson WH (1981) The influence of protected passive mobilization on the healing of flexor tendons: a biochemical and microangiographic study. *Hand* 13: 120-128
44. Gelberman RH, Manske PR, Vande Berg JS, Lesker PA, Akeson WH (1984) Flexor tendon repair in vitro: a comparative histologic study of the rabbit, chicken, dog, and monkey. *J Orthop Res* 2: 39-48
45. Gerber A, Warner JJ (2002) Thermal capsulorrhaphy to treat shoulder instability. *Clin Orthop* 105-116
46. Gerber C, Ganz R (1984) Clinical assessment of instability of the shoulder. With special reference to anterior and posterior drawer tests. *J Bone Joint Surg Br* 66: 551-556

47. Gerber C, Nyffeler RW (2002) Classification of glenohumeral joint instability. Clin Orthop 65-76
48. Gohlke F, Janssen E, Leidel J, Heppelmann B, Eulert J (1998) [Histopathological findings in the proprioception of the shoulder joint]. Orthopade 27: 510-517
49. Gruber HE, Hanley EN, Jr. (1998) Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. Spine 23: 751-757
50. Haegerstrand A, Dalsgaard CJ, Jonzon B, Larsson O, Nilsson J (1990) Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 3299-3303
51. Hayashi K, Hecht P, Thabit G, III, Peters DM, Vanderby R, Jr., Cooley AJ, Fanton GS, Orwin JF, Markel MD (2000) The biologic response to laser thermal modification in an in vivo sheep model. Clin Orthop 265-276
52. Hayashi K, Markel MD (1998) Thermal modification of joint capsule and ligamentous tissues. Operative Techniques in Sports Medicine 6: 120-125
53. Hayashi K, Markel MD (2001) Thermal capsulorrhaphy treatment of shoulder instability: basic science. Clin Orthop 59-72
54. Hayashi K, Markel MD, Thabit G, Bogdanske JJ, Thielke RJ (1995) The Effect of Nonablative Laser Energy on Joint Capsular Properties - An In-Vitro Mechanical Study Using A Rabbit Model. American Journal of Sports Medicine 23: 482-487
55. Hayashi K, Markel MD, Thabit G, III, Bogdanske JJ, Thielke RJ (1995) The effect of nonablative laser energy on joint capsular properties. An in vitro mechanical study using a rabbit model. Am J Sports Med 23: 482-487

56. Hayashi K, Massa KL, Thabit G, III, Fanton GS, Dillingham MF, Gilchrist KW, Markel MD (1999) Histologic evaluation of the glenohumeral joint capsule after the laser-assisted capsular shift procedure for glenohumeral instability. *Am J Sports Med* 27: 162-167
57. Hayashi K, Nieckarz JA, Thabit G, III, Bogdanske JJ, Cooley AJ, Markel MD (1997) Effect of nonablative laser energy on the joint capsule: an in vivo rabbit study using a holmium:YAG laser. *Lasers Surg Med* 20: 164-171
58. Hayashi K, Peters DM, Thabit G, III, Hecht P, Vanderby R, Jr., Fanton GS, Markel MD (2000) The mechanism of joint capsule thermal modification in an in-vitro sheep model. *Clin Orthop* 236-249
59. Hayashi K, Thabit G, III, Bogdanske JJ, Mascio LN, Markel MD (1996) The effect of nonablative laser energy on the ultrastructure of joint capsular collagen. *Arthroscopy* 12: 474-481
60. Hayashi K, Thabit G, III, Massa KL, Bogdanske JJ, Cooley AJ, Orwin JF, Markel MD (1997) The effect of thermal heating on the length and histologic properties of the glenohumeral joint capsule. *Am J Sports Med* 25: 107-112
61. Hayashi K, Thabit G, III, Vailas AC, Bogdanske JJ, Cooley AJ, Markel MD (1996) The effect of nonablative laser energy on joint capsular properties. An in vitro histologic and biochemical study using a rabbit model. *Am J Sports Med* 24: 640-646
62. Hecht P, Hayashi K, Cooley AJ, Lu Y, Fanton GS, Thabit G, III, Markel MD (1998) The thermal effect of monopolar radiofrequency energy on the properties of joint capsule. An in vivo histologic study using a sheep model. *Am J Sports Med* 26: 808-814
63. Hecht P, Hayashi K, Lu Y, Fanton GS, Thabit G, III, Vanderby R, Jr., Markel MD (1999) Monopolar radiofrequency energy effects on joint

- capsular tissue: potential treatment for joint instability. An in vivo mechanical, morphological, and biochemical study using an ovine model. *Am J Sports Med* 27: 761-771
64. Hensel H (1973) Cutaneous thermorezeptors. In Iggo A (ed) *Handbook of Sensory Physiology and Somatosensory System*, pp. 79-110. Springer, Berlin-Heidelberg-New York
65. Holzer P (1988) Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24: 739-768
66. Ivie TJ, Bray RC, Salo PT (2002) Denervation impairs healing of the rabbit medial collateral ligament. *J Orthop Res* 20: 990-995
67. Jennings RB, Reimer KA (1991) The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 42: 225-246
68. Junqueira L, Carneiro J (1996) Bindegewebe, Knochen und Knochenverbindungen. In Schiebler TH (ed) *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, pp. 140-217. Springer, Berlin-Heidelberg-New York
69. Kannus P, Jozsa L (1991) Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am* 73: 1507-1525
70. Karas SG, Creighton RA, DeMorat GJ (2004) Glenohumeral volume reduction in arthroscopic shoulder reconstruction: a cadaveric analysis of suture plication and thermal capsulorrhaphy. *Arthroscopy* 20: 179-184
71. Kasperczyk WJ, Bosch U, Oestern HJ, Tscherné H (1993) Staging of patellar tendon autograft healing after posterior cruciate ligament reconstruction. A biomechanical and histological study in a sheep model. *Clin Orthop* 271-282

72. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257
73. Kim LR, Whelpdale K, Zurowski M, Pomeranz B (1998) Sympathetic denervation impairs epidermal healing in cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 6: 194-201
74. Kraus BL, Kirker-Head CA, Kraus KH, Jakowski RM, Steckel RR (1995) Vascular supply of the tendon of the equine deep digital flexor muscle within the digital sheath. *Vet Surg* 24: 102-111
75. Kumpers, P., Potzl, W., Heusner, T., Steinbeck, J., and Szuwart, T. Cellularity and apoptosis after radiofrequency induced shrinkage of collagenous tissue –assessment of postoperative immobilization using an in vivo rabbit model. *Acta Orthop.Scand.* in Druck. 2005.
76. Kvist M, Hurme T, Kannus P, Jarvinen T, Maunu VM, Jozsa L, Jarvinen M (1995) Vascular density at the myotendinous junction of the rat gastrocnemius muscle after immobilization and remobilization. *Am J Sports Med* 23: 359-364
77. Lephart SM, Myers JB, Bradley JP, Fu FH (2002) Shoulder proprioception and function following thermal capsulorrhaphy. *Arthroscopy* 18: 770-778
78. Lephart SM (1994) Proprioception of the shoulder joint in healthy, unstable and surgically repaired shoulders. *J Shoulder Elbow Surg* 3: 371-380
79. Levy O, Wilson M, Williams H, Bruguera JA, Dodenhoff R, Sforza G, Copeland S (2001) Thermal capsular shrinkage for shoulder instability - Mid-term longitudinal outcome study. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 83B: 640-645

80. Lopez MJ, Hayashi K, Fanton GS, Thabit G, III, Markel MD (1998) The effect of radiofrequency energy on the ultrastructure of joint capsular collagen. *Arthroscopy* 14: 495-501
81. Lopez MJ, Hayashi K, Vanderby R, Jr., Thabit G, III, Fanton GS, Markel MD (2000) Effects of monopolar radiofrequency energy on ovine joint capsular mechanical properties. *Clin Orthop* 286-297
82. Lu Y, Hayashi K, Edwards RB, III, Fanton GS, Thabit G, III, Markel MD (2000) The effect of monopolar radiofrequency treatment pattern on joint capsular healing. In vitro and in vivo studies using an ovine model. *Am J Sports Med* 28: 711-719
83. Luke TA, Rovner AD, Karas SG, Hawkins RJ, Plancher KD (2004) Volumetric change in the shoulder capsule after open inferior capsular shift versus arthroscopic thermal capsular shrinkage: a cadaveric model. *J Shoulder Elbow Surg* 13: 146-149
84. Mason ML, Allan HS (1941) The rate of healing of tendons: an experimental study of tensile strength. *Ann Surg* 113: 424-459
85. Matthew CA, Moore MJ (1991) Regeneration of rat extensor digitorum longus tendon: the effect of a sequential partial tenotomy on collagen fibril formation. *Matrix* 11: 259-268
86. McDougall JJ, Ferrell WR, Bray RC (1999) Neurogenic origin of articular hyperemia in early degenerative joint disease. *Am J Physiol* 276: R745-R752
87. McIntyre LF, Caspari RB, Savoie FH (1996) The arthroscopic treatment of anterior and multidirectional shoulder instability. *Instr Course Lect* 45: 47-56
88. Medvecky MJ, Ong BC, Rokito AS, Sherman OH (2001) Thermal capsular shrinkage: Basic science and clinical applications. *Arthroscopy* 17: 624-635

89. Moller HD, Evans CH, Maffulli N (2000) [Current aspects of tendon healing]. *Orthopade* 29: 182-187
90. Moodley Y, Rigby P, Bundell C, Bunt S, Hayashi H, Misso N, McAnulty R, Laurent G, Scaffidi A, Thompson P, Knight D (2003) Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 162: 771-779
91. Muellner T, Kwasny O, Loehnert V, Mallinger R, Unfried G, Schabus R, Plenk H, Jr. (2001) Light and electron microscopic study of stress-shielding effects on rat patellar tendon. *Arch Orthop Trauma Surg* 121: 561-565
92. Myers JB, Lephart SM (2002) Sensorimotor deficits contributing to glenohumeral instability. *Clin Orthop* 98-104
93. Naseef GS, Foster TE, Trauner K, Solhpour S, Anderson RR, Zarins B (1997) The thermal properties of bovine joint capsule - The basic science of laser- and radiofrequency-induced capsular shrinkage. *American Journal of Sports Medicine* 25: 670-674
94. Neer CS, Foster CR (1980) Inferior capsular shift for involuntary inferior and multidirectional instability of the shoulder. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 62: 897-908
95. Neer CS, Foster CR (2001) Inferior capsular shift for involuntary inferior and multidirectional instability of the shoulder: a preliminary report. 1980. *J Bone Joint Surg Am* 83-A: 1586
96. Ng GY, Deacon OW (1995) A three dy of hydroxypyridinium crosslink density with young's modulus of ACL-PT autograft in goats. *Trans Combined Orthop Res Soc* 98

97. Ochi M, Iwasa J, Uchio Y, Adachi N, Sumen Y (1999) The regeneration of sensory neurones in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Br* 81: 902-906
98. Osmond C, Hecht P, Hayashi K, Hansen S, Fanton GS, Thabit G, III, Markel MD (2000) Comparative effects of laser and radiofrequency energy on joint capsule. *Clin Orthop* 286-294
99. Palmes D, Spiegel HU, Schneider TO, Langer M, Stratmann U, Budny T, Probst A (2002) Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. *J Orthop Res* 20: 939-946
100. Parry, D., Barnes, G., and Craig, A: A comparison of the size distribution of collagen fibril in connective tissues as a function of age and a possible relationship between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc Roy Society London* . 2003.
101. Paulos LE, Butler DL, Noyes FR, Grood ES (1983) Intra-articular cruciate reconstruction. II: Replacement with vascularized patellar tendon. *Clin Orthop* 78-84
102. Petrides PE (1998) Binde- und Stützgewebe. In Löffler, Petrides (eds) *Biochemie und Pathobiochemie*, pp. 733-759. Springer, Berlin-Heidelberg-New York
103. Philippon MJ (2001) The role of arthroscopic thermal capsulorrhaphy in the hip. *Clin Sports Med* 20: 817-829
104. Pollock RG, Bigliani LU (1993) Glenohumeral Instability: Evaluation and Treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 1: 24-32
105. Pollock RG, Owens JM, Flatow EL, Bigliani LU (2000) Operative results of the inferior capsular shift procedure for multidirectional instability of the shoulder. *J Bone Joint Surg Am* 82-A: 919-928

106. Potenza AD (1962) Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog. *J Bone Joint Surg Am* 44: 49-64
107. Potzl W, Heusner T, Kumpers P, Marquardt B, Steinbeck J (2004) Does immobilization after RF induced shrinkage influence the biomechanical properties of collagenous tissue? An in vivo rabbit study. *Am J Sports Med* 32: 681-687
108. Potzl W, Heusner T, Kumpers P, Steinbeck J (2003) Does immobilization after RF induced shrinkage influence the biomechanical properties of collagenous tissue? An in vivo rabbit study. *Am J Sports Med In Press*:
109. Potzl W, Kumpers P, Szuwart T, Filler T, Marquardt B, Steinbeck J (2004) Neuronal regeneration after application of radiofrequency energy to collagenous tissue is affected by limb immobilization: an in vivo animal study. *J Orthop Res* 22: 1345-1350
110. Potzl W, Kumpers P, Szuwart T, Gotze C, Marquardt B, Steinbeck J (2004) Immobilisation after radiofrequency-induced shrinkage of tendon. A histological study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 86: 752-758
111. Potzl W, Thorwesten L, Gotze C, Garmann S, Steinbeck J (2004) Proprioception of the shoulder joint after surgical repair for Instability: a long-term follow-up study. *Am J Sports Med* 32: 425-430
112. Potzl W, Witt KA, Hackenberg L, Heusner T, Steinbeck J (2003) Influence of postoperative immobilization on tendon length after radiofrequency-induced shrinkage. An in vivo rabbit study. *Am J Sports Med* 31: 36-40
113. Provenzano PP, Martinez DA, Grindeland RE, Dwyer KW, Turner J, Vailas AC, Vanderby R, Jr. (2003) Hindlimb unloading alters ligament healing. *J Appl Physiol* 94: 314-324
114. Pullin JG, Collier MA, Johnson LL, DeBault LE, Walls RC (1997) Holmium: YAG laser-assisted capsular shift in a canine model:

- Intraarticular pressure and histologic observations. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* 6: 272-285
115. Richards HJ (1980) Factors affecting the healing and return of function on the repaired digital flexor tendon. *Aust N Z J Surg* 50: 258-263
116. Richards HJ (1980) Repair and healing of the divided digital flexor tendon. *Injury* 12: 1-12
117. Rockwood CAJr, Wirth KA (1996) Subluxations and dislocations about the glenohumeral joint. In Rockwood CAJr, Heckmann JD, Buchholtz RW (eds) *Rockwood and Green`s fractures in adults*, pp. 1194. Lippincott-Raven, Philadelphia
118. Rodeo SA, Suzuki K, Yamauchi M, Bhargava M, Warren RF (1998) Analysis of collagen and elastic fibers in shoulder capsule in patients with shoulder instability. *Am J Sports Med* 26: 634-643
119. Savoie FH, Field LD (2000) Thermal versus suture treatment of symptomatic capsular laxity. *Clinics in Sports Medicine* 19: 63-+
120. Schaefer SL, Ciarelli MJ, Arnoczky SP, Ross HE (1997) Tissue shrinkage with the holmium:yttrium aluminum garnet laser. A postoperative assessment of tissue length, stiffness, and structure. *Am J Sports Med* 25: 841-848
121. Schlaepfer WW (1987) Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 46: 117-129
122. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS (2000) Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 28: 1387-1404
123. Shimizu T, Takahashi T, Wada Y, Tanaka M, Morisawa Y, Yamamoto H (1999) Regeneration process of mechanoreceptors in the reconstructed anterior cruciate ligament. *Arch Orthop Trauma Surg* 119: 405-409

124. Singer DI, Morrison WA, Gumley GJ, O'Brien BM, Mitchell GM, Barton RM, Frykman GK (1989) Comparative study of vascularized and nonvascularized tendon grafts for reconstruction of flexor tendons in zone 2: an experimental study in primates. *J Hand Surg [Am]* 14: 55-63
125. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U (2003) Cyclic mechanical stretching of human patellar tendon fibroblasts: activation of JNK and modulation of apoptosis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 11: 122-129
126. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U (2003) Cyclic mechanical stretching of human patellar tendon fibroblasts: activation of JNK and modulation of apoptosis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 11: 122-129
127. Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ (2000) Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res* 302: 235-241
128. Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ (2000) Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res* 302: 235-241
129. Steinbeck J, Bruntrup J, Greshake O, Potzl W, Filler T, Liljenqvist U (2003) Neurohistological examination of the inferior glenohumeral ligament of the shoulder. *J Orthop Res* 21: 250-255
130. Steinbeck J, Jerosch J (1997) Surgery for atraumatic anterior-inferior shoulder instability. A modified capsular shift evaluated in 20 patients followed for 3 years. *Acta Orthop Scand* 68: 447-450
131. Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW (2000) Agonists of

- proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6: 151-158
132. Stelnicki EJ, Doolabh V, Lee S, Levis C, Baumann FG, Longaker MT, Mackinnon S (2000) Nerve dependency in scarless fetal wound healing. *Plast Reconstr Surg* 105: 140-147
133. Takahashi T, Wada Y, Tanaka M, Yamanaka N, Yamamoto H (2002) Mechanoreceptors and length of the patellar ligament after Ho-YAG laser treatment: a long-term follow-up in rabbits. *Acta Orthop Scand* 73: 653-657
134. Tauro JC (1998) Arthroscopic rotator cuff repair: analysis of technique and results at 2- and 3-year follow-up. *Arthroscopy* 14: 45-51
135. Tipton CM, James SL, Mergner W, Tcheng TK (1970) Influence of exercise on strength of medial collateral knee ligaments of dogs. *Am J Physiol* 218: 894-902
136. Tohyama H, Yasuda K (2000) Extrinsic cell infiltration and revascularization accelerate mechanical deterioration of the patellar tendon after fibroblast necrosis. *J Biomech Eng* 122: 594-599
137. Van Cruchten S, Van Den BW (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31: 214-223
138. Vangsness CT, Jr., Ennis M, Taylor JG, Atkinson R (1995) Neural anatomy of the glenohumeral ligaments, labrum, and subacromial bursa. *Arthroscopy* 11: 180-184
139. Victoroff BN, Deutsch A, Protomastro P, Barber JE, Davy DT (2004) The effect of radiofrequency thermal capsulorrhaphy on glenohumeral translation, rotation, and volume. *J Shoulder Elbow Surg* 13: 138-145

140. Wada Y, Takahashi T, Michinaka Y, Morisawa Y, Yamamoto H (1997) Mechanoreceptors of patellar tendon used for ACL reconstruction. Rabbit experiments. *Acta Orthop Scand* 68: 559-562
141. Wallace AL, Hollinshead RM, Frank CB (2000) The scientific basis of thermal capsular shrinkage. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* 9: 354-360
142. Wallace AL, Hollinshead RM, Frank CB (2002) Creep behavior of a rabbit model of ligament laxity after electrothermal shrinkage in vivo. *American Journal of Sports Medicine* 30: 98-102
143. Wichmann MT, Snyder SJ (1997) Arthroscopic capsular plication for multidirectional instability of the shoulder. *Oper Tech Sports Med* 5: 238-243
144. Wienecke H, Lobenhoffer P (2003) [Basic principles of radiosurgical systems and their applications in arthroscopy]. *Unfallchirurg* 106: 2-12
145. Williams IF, McCullagh KG, Silver IA (1984) The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. *Connect Tissue Res* 12: 211-227
146. Wong KL, Williams GR (2001) Complications of thermal capsulorrhaphy of the shoulder. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 2 Pt 2: 151-155
147. Woo SL, An KN, Arnozky SP, Wayne JS, Fithian DC, Myers BS (1994) Anatomy, biology and biomechanics of tendon, ligament and meniscus. In Simon SL (ed) *Orthopaedic basic science: American Academy of Orthopaedic Surgeons*, pp. 45-87. Chicago
148. Woo SL, Gomez MA, Amiel D, Ritter MA, Gelberman RH, Akeson WH (1981) The effects of exercise on the biomechanical and biochemical properties of swine digital flexor tendons. *J Biomech Eng* 103: 51-56

149. Woo SL, Ritter MA, Amiel D, Sanders TM, Gomez MA, Kuei SC, Garfin SR, Akeson WH (1980) The biomechanical and biochemical properties of swine tendons--long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect Tissue Res* 7: 177-183
150. Yamamoto E, Hayashi K, Yamamoto N (1999) Mechanical properties of collagen fascicles from stress-shielded patellar tendons in the rabbit. *Clin Biomech (Bristol , Avon)* 14: 418-425
151. Yamamoto E, Tokura S, Yamamoto N, Hayashi K (2000) Mechanical properties of collagen fascicles from in situ frozen and stress-shielded rabbit patellar tendons. *Clin Biomech (Bristol , Avon)* 15: 284-291
152. Yamamoto N, Ohno K, Hayashi K, Kuriyama H, Yasuda K, Kaneda K (1993) Effects of stress shielding on the mechanical properties of rabbit patellar tendon. *J Biomech Eng* 115: 23-28
153. Yasuda T, Kinoshita M, Abe M, Shibayama Y (2000) Unfavorable effect of knee immobilization on Achilles tendon healing in rabbits. *Acta Orthop Scand* 71: 69-73
154. Yuan J, Murrell GA, Wei AQ, Wang MX (2002) Apoptosis in rotator cuff tendonopathy. *J Orthop Res* 20: 1372-1379

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für allgemeine Orthopädie des Universitätsklinikums Münster unter der Anleitung von Herrn PD Dr. med. Wolfgang Pötzl angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank. Nicht nur für die Überlassung des interessanten Themas der Arbeit, sondern vor allem für die allzeit sehr engagierte, kompetente und persönliche Betreuung. Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. Thomas Szuwart und Herrn PD. Dr. med Tim J. Filler für die freundliche und sehr kompetente Betreuung meiner ersten wissenschaftlichen Schritte. Weiterhin danke ich Dr. Szuwart und PD Dr. Pötzl für die Korrektur des Manuskriptes und für die vielen Anregungen zu dieser Studie.

Herrn Till Heusner danke ich für die hervorragende Teamarbeit und für die Erkenntnis, dass zu allererst ein harmonisches Teamwork über die Freude an wissenschaftlichen Fragestellungen entscheidend ist. Weiterhin möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Claudia Kemming, Sabine Kupich und Gabriele Fritze für die liebevolle und ausdauernde Unterstützung im Labor des Institutes für Anatomie bedanken. Sie haben entscheidend zum Gelingen der Studie beigetragen. Herrn Dipl. SpWiss. Mirko Brandes danke ich für die hervorragende und sehr freundschaftliche Hilfe bei der Auswertung der unzähligen Präparate. Meiner Freundin Frau Dr. med. Ulrike Neuhaus danke ich von ganzem Herzen für ihre kreativen Vorschläge, für die Korrektur des Manuskriptes und für ihre Liebe.

Ich danke Herrn. Prof. Richter, Herrn Dr. Lücke und allen Tierpflegern in den Zentralen Tierexperimentellen Einrichtungen des Universitätsklinikums Münster für die Betreuung der Tiere. Des Weiteren danke ich dem Personal des Instituts für Diagnostische Radiologie für die freundliche Bereitstellung von Geräten, die der Entwicklung der Röntgenaufnahmen dienen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Az.: STE 1033 / 2-1) und der Firma MITEK™ (MITEK Division Ethicon, Norderstedt) danke ich für die Finanzierung der Studie.

8. Curriculum vitae

Philipp Franz Gerhard Kümpers

Kortumstrasse 6
30171 Hannover

geboren am 02.02.78 in Steinfurt/ Westfalen als erstes Kind von Dres. med. Hildburg und Rüdiger Kümpers (Fachärzte für Anästhesie bzw. Pädiatrie).

Bildungsweg:

- 1984-1988 Besuch der kath. Werner-Rolevink-Grundschule in Laer, NRW
1988-1997 Besuch des altsprachlich orientierten städt. Gymnasiums in Steinfurt
Mai 1997 Abitur; Schwerpunkte: Naturwissenschaften, Englisch und Sport

Ausbildung:

- 1997 - 1998 Zivildienst: Heilpädagogischen Sonderkindergarten „Morgenstern“ der Caritas Steinfurt
April 1998 Beginn des Studiums der Human-Medizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
März 2001 Physikum
April 2001 Beginn einer tierexperimentellen Dissertation am Institut für Allg. Orthopädie und am Institut für klinische Anatomie der Westfälischen Wilhelms-Universität zum Thema: Immobilisation nach elektrothermischem Schrumpfen kollagenhaltigen Gewebes - Histologische Auswertung einer in-vivo Tierversuchsstudie.
Doktorvater: PD Dr. Wolfgang Pötzl, OA der Abteilung für Allg. Orthopädie des UKM.
März 2002 Erstes Staatsexamen
März 2004 Zweites Staatsexamen

- April 2004 Student im Praktischen Jahr an der Medizinischen Hochschule Hannover, Tertiale: Innere Medizin, Neurologie und Chirurgie
- Aug. 2004 Wiss. Mitarbeiter der AG „TGF- β & Smad-Signaling“
Leitung: Dr. med. Mario Schiffer, Abteilung Nephrologie, Medizinische Hochschule Hannover, Direktor: Prof. Dr. H. Haller
- Juni 2005 Drittes Staatsexamen (Gesamtnote: sehr gut)
- Juni 2005 Approbation
- Sep 2005 Promotion
- Sep 2005 Assistenzarzt der Abteilung Nephrologie (Leiter: Prof. Haller), Medizinische Hochschule Hannover

Tätigkeiten neben dem Studium:

Studentischer Mitarbeiter als Nachtwache im Bereich Neurochirurgie und Radioonkologie, Clemenshospital Münster (1999 – 2003)

Studentische Hilfskraft im Institut für Anatomie - Betreuung der Studentenkurse der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie (1999-2002)

Studentische Hilfskraft im Institut für Ausbildung & Studienangelegenheiten (IfAS) – Tutor im Bereich des Kursus für allgemeine klinische Untersuchung (KAKU) (2002 – 2004)

9. Veröffentlichungen

9.1 Originalarbeiten

Veröffentlichungen

W. Pötzl, T. Heusner, **P. Kümpers**, B. Marquardt, J. Steinbeck: Does immobilization after RF induced shrinkage influence the biomechanical properties of collagenous tissue? An in vivo rabbit study. *Am J Sports Med.* 2004 Apr-May;32(3):681-7

W. Pötzl, **P. Kümpers**, T. Szuwart, C. Götze, B. Marquardt, J. Steinbeck: Immobilization after radiofrequency induced shrinkage of collagenous tissue. The influence on the histologic properties in an in vivo rabbit study. *J Bone Joint Surg (B)* 2004 Jul;86(5):752-8

W. Pötzl, **P. Kümpers**, T. Szuwart, F. Filler, B. Marquardt, J. Steinbeck: Neuronal regeneration after application of radiofrequency energy to collagenous tissue is affected by limb immobilization-An in vivo animal study. *J Orthop Res* 2004 Nov;22(6):1345-50

P. Kümpers, W. Pötzl, T. Heusner, J. Steinbeck, T. Szuwart: Cellularity and apoptosis after radiofrequency induced shrinkage of collagenous tissue – assessment of postoperative immobilization in an in vivo rabbit model. *Acta Orthop Scand* 2005 (im Druck)

P. Kümpers, L. Köhler, S. Pertschy, M. Krüger, H. Zeidler, J. Freise. Unilateral fasciitis of the lower leg – paraneoplastic manifestation of an occult pancreatic carcinoma. *Journal of Clinical Rheumatology* 2005 (im Druck)

P. Kümpers, A. Herrmann, J. Lotz, M. Mengel, A. Schwarz. “The blue kidney” - chronic renal failure as a consequence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria? *Journal of Clinical Nephrology* 2005 (eingereicht)

9.2 Abstracts (zitierfähig)

W.Pötzl, K.-A.Witt, **P.Kümpers**, J.Steinbeck: Die Rolle postoperativer Immobilisation nach elektrothermischem Shrinkage kollagenhaltigen Kapselbandgewebes – Ein in vivo Tierversuch. Z Orthop 140 S1 (2002) S119

P.Kümpers, W.Pötzl, G.Fritze, J.Steinbeck, F.Pera, T.Szuwart: The effect of immobilization after electrothermally-assisted capsular shrinkage procedure for joint instability –An in vivo histological study using a rabbit model. Annals of Anatomy 185 (2003): S277-78

W.Pötzl, T.Heusner, B.Marquardt, **P.Kümpers**, J.Steinbeck: Does immobilization after RF induced shrinkage influence the biomechanical and histologic properties of collagenous tissue? An in vivo rabbit study. J Shoulder Elbow Surg Suppl. (2003)

W.Pötzl, T.Heusner, **P.Kümpers**, B.Marquardt, J.Steinbeck: Beeinflusst die Immobilisation nach elektrothermischen Shrinkage die biomechanischen Parameter des behandelten kollagenhaltigen Kapsel-Band-Gewebes? Ein in vivo Tierversuch. Z Orthop 141 S1 (2003) S102

9.3 Vorträge und Poster

W.Pötzl, K.-A.Witt, **P.Kümpers**, T.Heusner, J.Steinbeck: Die Rolle postoperativer Immobilisation nach elektrothermischen Shrinkage kollagenhaltigen Kapsel-, Bandgewebes –ein in vivo Tierversuch. 50.Jahrestagung der Vereinigung Süddeutscher Orthopäden e.V.. 01.-04.05.2002, Baden-Baden

W.Pötzl, K.-A.Witt, **P.Kümpers**, J.Steinbeck: Die Rolle postoperativer Immobilisation nach elektrothermischer Schrumpfung kollagenhaltigen Kapsel-, Bandgewebes –ein in vivo Tierversuch. 9. Jahreskongreß der Deutschen Vereinigung für Schulter- und Ellenbogenchirurgie (DVSE). 31.05.-01.06.2002, Neuss

W.Pötzl, K.-A.Witt, T.Heusner, **P.Kümpers**, J.Steinbeck: Influence of postoperative immobilization on tendon length after RF-induced shrinkage –An in vivo rabbit study. 16. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Schulter- und Ellenbogenchirurgie (SECEC). 18.-21.09.2002, Budapest

W.Pötzl, K.-A.Witt, **P.Kümpers**, J.Steinbeck: Die Rolle postoperativer Immobilisation nach elektrothermischem Shrinkage kollagenhaltigen Kapselbandgewebes – Ein in vivo Tierversuch. Deutscher Orthopädenkongreß. 25.-28.09.2002, Berlin

W.Pötzl, K.-A.Witt, **P.Kümpers**, J.Steinbeck: Die Rolle postoperativer Immobilisation nach elektrothermischen Shrinkage kollagenhaltigen Kapsel-, Bandgewebes –ein in vivo Tierversuch. 19. Kongreß der deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie (AGA). 11.-12.10.2002, Innsbruck

P. Kümpers, Pötzl W, Heusner TA, Szuwart T, Steinbeck J (2003): Immobilisation nach elektrothermischem Shrinkage kollagenhaltigen Gewebes - Histologische Auswertung einer in-vitro Tierversuchsstudie. Science Day der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster

W.Pötzl, T.Heusner, **P.Kümpers**, B.Marquardt, J.Steinbeck: Beeinflusst die Immobilisation nach elektrothermischem Shrinkage die biomechanischen Parameter des behandelten kollagenhaltigen Kapsel-Bandgewebes? Ein in vivo

Tierversuch. 51.Jahrestagung der Vereinigung Süddeutscher Orthopäden e.V..
01.-04.05.2003, Baden-Baden

P. Kümpers, W. Pötzl, T. Heusner, T. Szuwart, J. Steinbeck: Immobilisation nach elektrothermischem Shrinkage kollagenhaltigen Gewebes. Histologische Auswertung einer in-vitro Tierversuchsstudie. 3.Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Biomechanik. 29.05.-01.06.2003, München

T. Heusner, **P.Kümpers**, W. Pötzl, J. Steinbeck: Biomechanische Eigenschaften und Längenentwicklung von Kapsel-Band-Gewebe nach elektrothermischer Schrumpfung. 3. Jahrestagung - Deutsche Gesellschaft für Biomechanik. 29.05.-01.06.2003, München

W.Pötzl, T.Heusner, B.Marquardt, **P.Kümpers**, J.Steinbeck: Does immobilization after RF induced shrinkage influence the biomechanical and histologic properties of collagenous tissue? An in vivo rabbit study. 17. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Schulter- und Ellenbogenchirurgie (SECEC). 24.-27.09.2003, Heidelberg

W.Pötzl, T.Heusner, **P.Kümpers**, B.Marquardt, J.Steinbeck: Beeinflusst die Immobilisation nach elektrothermischen Shrinkage die biomechanischen Parameter des behandelten kollagenhaltigen Kapsel-Band-Gewebes? Ein in vivo Tierversuch. Deutscher Orthopädenkongreß. 13. –16.11.2003, Berlin

Anhang

Bildverzeichnis

Abb. 1: Circulus vitiosus der Schulterinstabilität (modifiziert aus Myers ⁹²)	11
Abb. 2: Ultrastrukturelle Veränderungen nach thermal capsular shrinkage...	19
Abb. 3: Schema - Implantation der K-Drähte (modifiziert nach Schäfer ¹²⁰) ..	28
Abb. 4: Seitliches Röntgenbild vom rechten Hinterlauf eines Kaninchens.....	28
Abb. 5: OP-Situs, Sehne mit K-Drähten	30
Abb. 6: OP-Situs, Sehne nach Shrinkage	30
Abb. 7: OP-Situs, K-Drähte eingebracht, K3 gekürzt.....	30
Abb. 8: Plastikring mit Gummimembra	31
Abb. 9: Schemazeichnung zur RF-Sondenführung auf der Patella	31
Abb. 10: Immobilisation des Beines I	33
Abb. 11: Immobilisation des Beines II	33
Abb. 12: Immobilisation des Beines III	33
Abb. 13: Immobilisierter rechter Hinterlauf	33
Abb. 14: Schema der Probenentnahme	36
Abb. 16: HE-Färbungen	50
Abb. 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fibroblastenscores (HE-Färbung).....	52
Abb. 19: Feulgen-Färbung (DNA)	53
Abb. 20: Boxplot (Mediane mit Inter Quartil Ranges) der Kernanzahlen / 30.000 μm^2 mittels Feulgen-Färbung	54
Abb. 21: Apoptose-Färbung (TUNEL-Labeling).....	56

Abb. 22a: Boxplot (Mediane mit Inter Quartil Ranges) der Kernanzahlen / 30.000 μm^2 mittels Apoptose-Färbung.....	57
Abb. 22b: Boxplot (Mediane mit Inter Quartil Ranges) der Apoptoserate.....	58
Abb. 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der Kollagenstruktur Scores an HE-gefärbten Schnitten	60
Abb. 24: Polarisationsmikroskopie	61
Abb. 25: Mittelwerte und Standardabweichungen der Kollagenstruktur Scores an HE-gefärbten Schnitten	63
Abb. 26: Unterschiedliche Morphologie der Kapillaren nach 3 Wochen in Abhängigkeit des Nach-behandlungsmodus	66
Abb. 27:Prozentuale Verteilung der Scores für den Kapillarenzustand nach ETACS	67
Abb. 28: Mittelwerte und Standartabweichungen des Kapillarenzustandes an HE-gefärbten Schnitte	68
Abb. 29:Prozentuale Verteilung der Scores für den Kapillarenzustand nach ETACS	70
Abb. 30: Mittelwerte und Standardabweichungen der Kapillarendichte an HE-gefärbten Gewebeschnitten.....	71
Abb. 31: Verteilungsdichte neuronaler Strukturen anhand Neurofilament-gefärbter Präparate	73
Abb. 32: Neurofilament-AK positive Nervenfasern	74
Abb. 33: Mittelwerte und Standardabweichung des Gehaltes an neurofilament-positiven Nervenfasern.....	75
Abb. 34: Neurofilament-positive Nervenbündel	77
Abb. 35: Mittelwerte und Standardabweichung des Gehaltes an neurofilament-positiven Nervenbündeln	78

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Versuchstiergruppen	20
Tab. 3: Auswertungsschema zur Bestimmung der Vaskularität HE-gefärbter Schnitte	33
Tab. 4: Auswertungsschema für Fibroblasten- und Kollagenqualität HE- gefärbter Schnitte	33
Tab. 5: Auswertungsschema neuronaler Strukturen	38

Tierversuchsantrag



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis
Herrn
Prof. Dr. med. W. Winkelmann
Klinik und Poliklinik für
Allgemeine Orthopädie der
Westf. Wilhelms-Universität Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33
48129 Münster

Eingegangen

11. SEP. 2000

Weitergeleitet an
Skr. Prof. Winkelmann

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Telefax: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers

Aktenzeichen
23.9835.1.01 (G 61/2000) 1

6. September 2000

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 15.07.2000, hier eingegangen
am 01.08.2000

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d:

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Winkelmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

**Immobilisation nach Radio-Frequenz-Energie gestützter Schrumpfung von Kapsel- und Bandgewebe (Capsular Shrinkage).
Untersuchung der Auswirkungen von Radio-Frequenz-Energie auf Kapsel-Bandgewebe: Schrumpfungsverhalten, biomechanische Eigenschaften, histologische bzw. elektronenmikroskopische Veränderungen, Regenerationsverhalten des Kapsel-Bandgewebes unter verschiedenen, definierten Immobilisationsbedingungen.**

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr PD Dr. med. J. Steinbeck Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie der WWU Münster Albert-Schweitzer-Str. 33 48129 Münster	Herr Dr. med. W. Pötzl Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie der WWU Münster Albert-Schweitzer-Str. 33 48129 Münster.
---	---

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300
e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, E=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525
Konten der Regierungshauptkasse Münster:
Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520
Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster: BLZ: 400 500 00 Konto: 61 620
Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1, 5, 6, 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2, 10, 11, 14, 21, 54 bis Domplatz

Diese Genehmigung gilt bis zum 30. 09. 2002.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

60 weiße Neuseeländer-Kaninchen.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

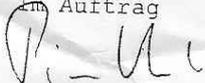
Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbescheinigungs.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



Dr. Piontkowski