

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinik für Pferdechirurgie

(Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Florian Jenner, Dipl. ACVS/ECVS)

Entwicklung eines 3D in vitro Sehnenmodells – eine Machbarkeitsstudie

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Michaela Lehmann

Wien, im Oktober 2020

Betreuerin: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Florian Jenner, Dipl.ACVS, Dipl.ECVS

Co-Betreuerin: Dr. med. vet. Iris Ribitsch, PhD, Priv.-Doz.

Klinische Abteilung für Pferdechirurgie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich in meinem Studium auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben:

Zu Beginn möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Frau Univ.-Prof. Dr. med. vet. Florian Jenner, Dipl.ACVS, Dipl.ECVS und meiner Co-Betreuerin Frau Dr. med. vet. Iris Ribitsch, PhD, Priv.-Doz. bedanken, die mir zu dieser Diplomarbeit verholfen und mir die nötigen Hilfestellungen gegeben haben.

Zudem gilt mein Dank:

Meinen Eltern Michael und Martina und meinem Bruder Maximilian, die mir dieses Studium ermöglicht und immer an mich geglaubt haben.

Meinem Partner Philip, der immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und stets motivierende Worte gefunden hat.

Meinen Freunden, mit denen das Studium zu einer unvergesslichen Zeit wurde.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Sehnen - Definition.....	3
2.2	Anatomie	3
2.2.1	Makroskopische Anatomie des <i>Musculus flexor digitorum superficialis</i>	3
2.2.2	Vaskularisation	5
2.2.3	Innervation	7
2.3	Morphologie.....	7
2.3.1	Struktureller Sehnenaufbau	7
2.3.2	Zelluläre Komponenten.....	8
2.3.3	Extrazelluläre Matrix	10
2.3.4	Kollagen.....	10
2.3.5	Nicht kollagene Komponenten.....	11
2.4	Biomechanik	13
2.4.1	Eigenschaften von equinen Sehnen	13
2.4.2	Stress Strain.....	14
2.5	Sehnenverletzungen.....	16
2.5.1	Arten der Sehnenverletzungen	16
2.5.2	Heilungsprozess.....	16
2.6	<i>In vitro</i> Verfahren	17
2.6.1	Gründe für die <i>in vitro</i> Forschung	17
2.6.2	<i>In vitro</i> Modelle (= Bioreaktoren) - Allgemein	18
2.6.3	Grundtypen von Bioreaktoren	19
2.6.4	Hydrogel.....	21
2.6.5	Ziele des 3D <i>in vitro</i> Sehnenmodells und zukünftiger Einsatz.....	22

3	Material und Methoden.....	24
3.1	Entnahme der Sehnen <i>post mortem</i> und Aufbereitung im Labor.....	24
3.2	Mediumwechsel	25
3.3	Zellernte	25
3.3.1	Zellzahlermittlung	27
3.4	Entwicklung und Herstellung des 3D Modells.....	28
3.5	Zielsetzung-3D Modell.....	31
3.6	Toxikologietest	32
3.7	Erster Versuch: Pilotstudie	32
3.7.1	Versuchsaufbau.....	33
3.7.2	Herstellung der Kollagen-Lösung	34
3.7.3	Herstellung der Zellsuspension ungelabelt (= ohne SPIO)	35
3.7.4	Herstellung der Zellsuspension gelabelt (= mit SPIO)	35
3.7.5	Beladung der 3D Modelle.....	35
3.7.6	Magnettraining.....	36
3.8	Zweiter Versuch: Vergleich zweier unterschiedlicher Eisennanopartikel-Präparate.....	36
3.8.1	Versuchsdurchführung.....	37
3.9	Dritter Versuch: Dynamischer Zug mittels Eisennanopartikeln und Magneten	37
3.9.1	Vorbereitung der Eisennanopartikel.....	38
3.9.2	Beladung der 3D Modelle.....	39
3.10	Vierter Versuch: Vergleich verschiedener Eisennanopartikel Konzentrationen.....	40
3.10.1	Versuchskonzentration für das 3D Modell:.....	41
3.11	Fünfter Versuch: Vergleich verschiedener Kollagen-Hydrogel Konzentrationen	41
3.11.1	Beladung der 3D Modelle.....	41
3.12	Histologische Bearbeitung.....	43
3.12.1	Fixierung der Gewebe und Befüllen der Gewebekassetten.....	43

3.12.2	Gewebeeinbettung.....	43
3.12.3	Ausgießen von Paraffinblöcken.....	43
3.12.4	Schnittherstellung	44
3.12.5	Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung.....	45
3.12.6	Berliner Blau Färbung.....	46
3.13	RNA Extraktion	47
3.14	Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)	48
4	Ergebnisse	51
4.1	Sehnenentnahme und Anzucht im Labor.....	51
4.2	3D Modell-Design	51
4.3	Toxizitätstest der Eisennanopartikel auf die Zellen (TOX-8)	52
4.4	Erster Versuch: Pilotstudie	54
4.4.1	3D+Pin+Magnet.....	54
4.4.2	3D+Pin	54
4.5	Zweiter Versuch: Vergleich zweier unterschiedlicher Eisennanopartikel-Präparate.....	56
4.6	Dritter Versuch: Dynamischer Zug mittels Eisennanopartikeln und Magneten	56
4.6.1	Starker Magnet.....	56
4.6.2	Schwacher Magnet-Quaderturm	57
4.6.3	Schwacher Magnet-4 Türmchen	58
4.7	Vierter Versuch: Vergleich verschiedener Eisennanopartikel Konzentrationen.....	59
4.8	Fünfter Versuch: Vergleich verschiedener Kollagen-Hydrogel Konzentrationen	59
4.8.1	5 mg/µl ohne SPIO.....	59
4.8.2	5 mg/µl mit SPIO	59
4.8.3	6,25 mg/µl ohne SPIO	59
4.8.4	6,25 mg/µl mit SPIO	59
4.9	Histologische Untersuchung.....	60

4.9.1	Erster Versuch: Pilotstudie	61
4.9.2	Zweiter Versuch: Vergleich zweier unterschiedlicher Eisennanopartikel-Präparate.....	63
4.9.3	Dritter Versuch: Dynamischer Zug mittels Eisennanopartikeln und Magneten	63
4.9.4	Vierter Versuch: Vergleich verschiedener Eisennanopartikel Konzentrationen.....	67
4.9.5	Fünfter Versuch: Vergleich verschiedener Kollagen-Hydrogel Konzentrationen	70
4.10	Versuchsauswahl für die Übertragung auf ein Tendon-on-a-chip Modell.....	71
4.11	Quantitative PCR	72
4.11.1	Auswertung 2D, 3D im Vergleich	73
4.11.2	3D Modell-Auswirkung der Kollagenkonzentrationen auf die Genexpression	74
4.11.3	3D Modell-Auswirkung der Eisennanopartikel auf die Genexpression.....	75
5	Diskussion.....	77
6	Zusammenfassung.....	87
7	Summary	88
8	Abkürzungsverzeichnis.....	89
9	Literatur.....	91
10	Abbildungsverzeichnis.....	101
11	Tabellenverzeichnis.....	103

1 Einleitung

Sehnenverletzungen beim Pferd stellen, vor allem bei Sportpferden, aber auch häufig bei Freizeitpferden ein großes Problem dar. Durch die extremen sportlichen Belastungen kommt es häufig zu Fasereintrissen, die insbesondere die oberflächliche Beugesehne (OBS) nachhaltig schädigen und in ihrer Funktion beeinträchtigen. Es folgen langwierige Behandlungen, die mit hohen Kosten verbunden sind und trotz allem keine Garantie dafür geben, dass die Sehne längerfristig wieder 100 % belastbar wird und bleibt. Häufig kommt es zu Rückfällen und Wiederverletzungen, da die Erfolgschancen auf eine vollständige Ausheilung schlecht sind (Thorpe et al. 2010). Da die OBS die Sehne mit dem höchsten Verletzungsrisiko (Fackelman 1973) bei gleichzeitig komplexester Funktion und folglich den höchsten Ansprüchen an ihre Regeneration ist, wird der Schwerpunkt der Literaturübersicht auf diese Struktur gelegt. Ist die OBS verletzt, kann mit den bisher verfügbaren Therapien keine „*regeneratio ad integrum*“ erzielt werden (Walden et al. 2017). Die Reparatur der Sehne erfolgt durch biomechanisch minderwertiges Narbengewebe (Andarawis-Puri et al. 2015). Dieses beeinträchtigt die Funktion einer Sehne auf Lebzeiten und bedingt eine hohe Anfälligkeit für Wiederverletzungen (Goodship et al. 1994). Die OBS ist durch die narbige Reparatur nurmehr teilweise in der Lage, die an sie gestellten funktionalen Anforderungen zu erfüllen, die sowohl Zugfestigkeit, aber vor allem unbeeinträchtigte Elastizität voraussetzen (Walden et al. 2017).

In der hier vorgestellten Arbeit handelt es sich um eine Machbarkeitsstudie mit der Fragestellung, ob *in vitro*-Organoide mit sehnenähnlicher Morphologie hergestellt werden können und ob gewünschte Analyseverfahren, wie Histologie und quantitative Polymerase-Chain-Reaction (qPCR), sich für die Auswertung eignen. *In vitro* Sehnenmodelle dienen unter anderem der Erforschung sehnenpathophysiologischer Vorgänge und sollen zur Verbesserung von Sehnentherapien eingesetzt werden. Sie bieten neue Methoden für die Forschung und Medikamentenscreenings und stellen zusätzlich eine Alternative zu Tierversuchen dar.

Dazu wurde zunächst ein dreidimensionales (3D) Sehnenmodell entwickelt, welches später auf ein „Tendon-on-a-chip“ Modell übertragen wurde. Ein 3D Modell bietet gegenüber einem zweidimensionalen (2D) Modell die Vorteile, dass nahezu gleiche Bedingungen geschaffen werden können, wie sie *in vivo* herrschen. Dazu wurde sowohl eine statische Zugspannung mittels Pins als auch eine dynamische Zugspannung mit Hilfe von Eisennanopartikeln in verschiedenen Konzentrationen und Magneten unterschiedlicher Stärke erzeugt. Die dynamische Komponente dient der Nachahmung der natürlichen Funktion einer Sehne,

nämlich der Dehnung und der Relaxation. Der Sinn ist nicht ein ganzes Organ zu konstruieren, sondern kleine Einheiten zu züchten, die die Funktionen eines Organs oder eines Gewebes wiedergeben. Das im Rahmen des Projektes entwickelte Sehnenmodell, zu welchem diese Arbeit beiträgt, soll in der regenerativmedizinischen Forschung eingesetzt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Sehnen - Definition

Eine Sehne ist ein zugfestes Band aus straffem, parallelfaserigem Bindegewebe, welches als Vermittler zwischen der Befestigung am Muskel auf der einen, und am Knochen auf der anderen Seite, agiert und die Kraft vom Muskel auf das Skelett überträgt (Goodrich 2011, Kümmerle et al. 2019).

2.2 Anatomie

2.2.1 Makroskopische Anatomie des *Musculus flexor digitorum superficialis*

Vorderextremität: Der *Musculus (M.) flexor digitorum superficialis*, wird umgangssprachlich als oberflächlicher Zehenbeuger bezeichnet (Salomon 2015). In der Regel ist er schwächer ausgebildet als der tiefe Zehenbeuger. Beim Pferd ist er meist stark sehnig durchsetzt und entspringt aus einem einheitlichen Muskelbauch (Seiferle und Frewein 2004). Er liegt kaudomedial am Unterarm und entspringt am *Epicondylus medialis humeri*. Auf der medialen Seite wird er fast vollständig vom *M. flexor carpi ulnaris* bedeckt. Erst im distalen Drittel des Unterarms entlässt der Muskel die OBS, wie in Abbildung (Abb.) 1 veranschaulicht. Dort vereint sich proximal des Karpus das *Ligamentum accessorium* mit der OBS. Die OBS und die tiefe Beugesehne (TBS) verlaufen gemeinsam in einer Karpalbeugesehnenscheide (Salomon 2015). Die OBS findet ihren Ansatz am proximalen Rand der *Phalanx media*. Im distalen Bereich des Metakarpus bildet die OBS eine ringförmige Manschette namens *Manica flexoria* um die TBS herum. Auch hier existiert eine Sehnenscheide, die so genannte Fesselbeugesehnenscheide (*Vagina synovialis tendinum digitorum manus*) (Liebich et al. 2019). Im Bereich der *Phalanx proximalis* tritt die TBS nach palmar ziehend zu Tage (Seiferle und Frewein 2004), da sich die OBS Y-förmig in zwei Schenkel aufspaltet. Die beiden Schenkel inserieren medial und lateral an der Kronbeinlehne (Salomon 2015), auch genannt Kronbeinbeuger (Liebich et al. 2019). Zum Zwecke der Lagestabilisierung der OBS und der TBS besitzt das Pferd zusätzliche Hilfseinrichtungen, nämlich das Fesselringband (*Ligamentum anulare palmare*), die vierzipfelige Fesselplatte und die Sohlenbinde (Salomon 2015, Liebich et al. 2019). Die Wirkung der OBS umfasst im Wesentlichen die Flexion der Stützzehe und des gesamten Vorder-, Hinterbeins. Des Weiteren fungiert sie als Stabilisator des Fesselgelenks (Liebich et al. 2019).

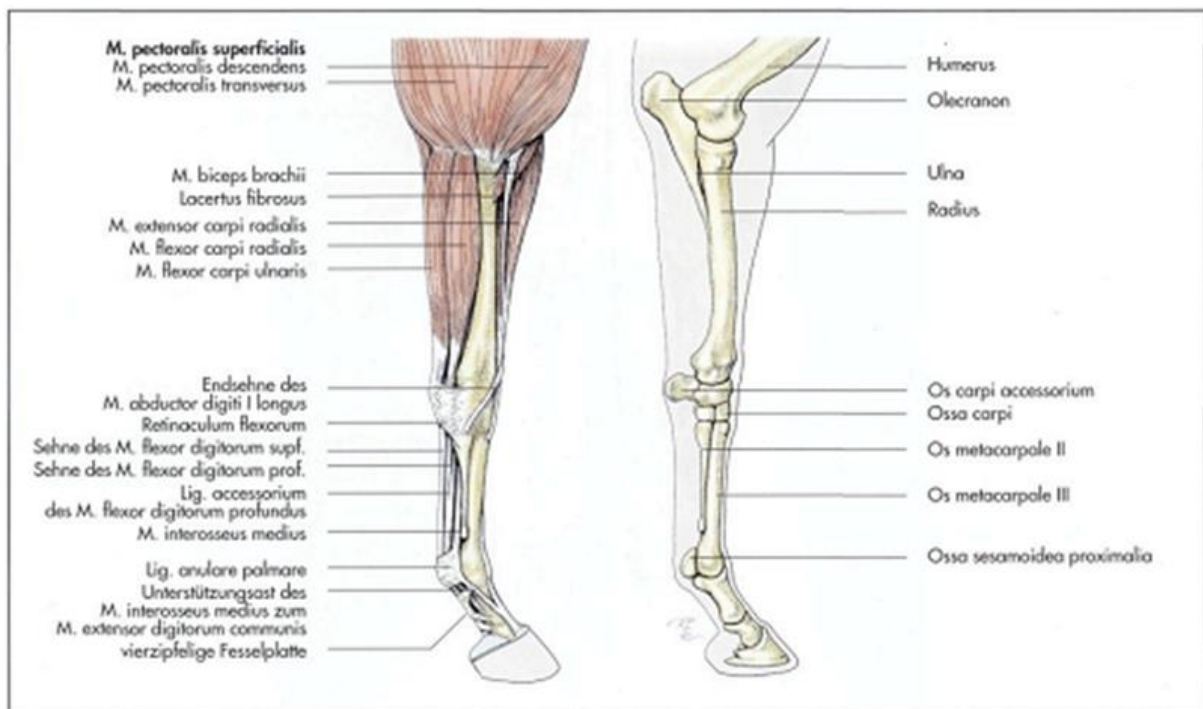


Abb. 1: Schematische Darstellung von Knochen, Muskeln und Sehnen der Vorderextremität eines Pferdes in Medialansicht (Liebich et al. 2019, S. 231).

Hinterextremität: Der *M. flexor digitorum superficialis* der Hinterextremität hat seinen Ursprung in der *Fossa supracondylaris ossis femoris*. Als einheitlicher Muskel entspringt er zwischen den zwei Köpfen des *M. gastrocnemius* und entlässt auf etwa der Mitte des Unterschenkels seine Sehne (Abb. 2) (Liebich et al. 2019). Die Sehne wird zunächst kaudal von der Achillessehne bedeckt. Im weiteren Verlauf windet sich der zuvor bedeckte Teil der Sehne über den medialen Rand der Achillessehne nach plantar und kommt schlussendlich auf der Achillessehne zu liegen (Salomon 2015). Wie in Abb. 2 veranschaulicht wird, verbreitert sich die Sehne proximal des Fersenbeins (*Tuber calcanei*) und bildet die Fersenbeinkappe (Seiferle und Frewein 2004), auch *Tendo plantaris* genannt (Budras 2014). Die verbreiterte Sehnenkappe wird stets mit einem lateralen und einem medialen Retinaculum in Position gehalten (Liebich et al. 2019). Weiter distal hat die OBS ihren Ansatz an der *Phalanx media* der dritten Zehe (Salomon 2015). Die Wirkungsweise umfasst zum einen die Flexion des Kniegelenks und der Zehe, zum anderen die Extension des Tarsus (Liebich et al. 2019).



Abb. 2: Schematische Darstellung von Knochen, Muskeln und Sehnen der Hinterextremität eines Pferdes in Medialansicht (Liebich et al. 2019, S. 305).

2.2.2 Vaskularisation

Sehnen sind im Wesentlichen gut vaskularisiert, mehr als Knorpel und weniger als Muskelgewebe (Kirkendall und Garrett 1997). Die Nährstoffversorgung erfolgt im Allgemeinen durch Diffusion und Perfusion (Smith 2011). Hinter der Blutversorgung einer Sehne verbirgt sich ein einfaches Blutgefäßsystem. Die Gefäße befinden sich rund um die Kollagenbündel in parallel ausgerichteter longitudinaler Anordnung und haben ein umfangreiches anastomosierendes Netzwerk (Kraus-Hansen et al. 1992). Die Durchflussrate des Blutes beträgt 1–2 ml/min/100 g Sehne. Bei Bewegung erhöht sich der Blutfluss um das Zweifache. Sehnenverletzungen veranlassen ebenso eine noch stärkere Durchblutung (Birch et al. 2013). Die Hauptblutversorgung der OBS wird aus drei unterschiedlichen Quellen gewährleistet (Smith 2011):

Musculotendinöse Blutversorgung: Die Insertionsstelle der Sehne an den *M. flexor digitalis superficialis* enthält zahlreiche Gefäße, die für eine ausreichende Blutversorgung der Sehne im proximalen Bereich benötigt werden. Dies wird durch Kreuzungen der Gefäße erreicht, die direkt aus dem Muskelbauch in die Sehne ziehen (Brockis 1953).

Osteotendinöse Blutversorgung: An der distalen Insertion am Knochen, spielt das Periost eine entscheidende Rolle für die ausreichende Blutversorgung. Die Blutversorgung über den Muskel bzw. das Periost übernimmt jedoch nur ca. 25 % der distalen Versorgung der Sehne (Kraus-Hansen et al. 1992).

Zwischen den beiden Insertionen wird die Sehne entweder durch intratendinöse oder extratendinöse Gefäße versorgt (Kümmerle et al. 2019).

Intratendinöse Blutversorgung: Die intratendinöse Blutversorgung erfolgt, wie bereits oben beschrieben über Gefäße, die in longitudinaler Ausrichtung an den Kollagenbündeln entlang ziehen und mit ihnen anastomosieren. Der mittlere Anteil der OBS wird überwiegend intratendinös ernährt (Kraus-Hansen et al. 1992).

Extratendinöse Blutversorgung: Die extratendinöse Blutversorgung wird durch das Paratenon und das Mesotenon gewährleistet (Smith 2011). Verläuft die Sehne innerhalb einer Sehnenscheide, erfolgt die Blutversorgung durch das Mesotenon oder *Vinculum tendineum manus* (Goodrich 2011). Das Mesotenon ist ein Aufhängeband, welches das innere und das äußere Blatt des *Stratum synoviale* der Sehnenscheide miteinander verbindet. Es beinhaltet Nerven und Gefäßbündel, die zur Blutversorgung der Sehne beitragen. Das *Vinculum tendineum manus* erfüllt denselben Zweck wie das Mesotenon. Es entlässt jedoch kleinere, brückenähnliche Verbindungen zum *Stratum synoviale* (Salomon 2015). Aus dem Paratenon erhält die OBS ihre Blutversorgung, wenn keine Sehnenscheide in diesem Bereich existiert (Smith 2011).

Nährstoffversorgung durch Diffusion/Synoviale Nährstoffversorgung: Die Diffusion von Nährstoffen findet in der Regel in avaskulären Sehnenabschnitten statt, welche eingeschlossen in einer Sehnenscheide verlaufen und über die Synovialflüssigkeit ernährt werden (Kirkendall und Garrett 1997).

Bei Fohlen ist der Blutfluss in der Sehne deutlich höher als bei erwachsenen Pferden. Eine sukzessive Reduzierung des Blutflusses findet bis zu einem Alter von drei Jahren statt (Smith 2011). Laut Fackelman 1973 gibt es drei physiologisch vorkommende ischämische Bereiche in den Beugesehnen eines Pferdes: Zum einen auf Höhe der Metakarpusmitte, wo die OBS auch häufig klinisch degenerative Veränderungen zeigt und die demzufolge auch die häufigste Region für Verletzungen darstellt. Zum anderen im zentralen Kern des untergeordneten Kontrollbandes und in der TBS auf Höhe des Fesselgelenks.

2.2.3 Innervation

Die Innervation der Sehne beschränkt sich auf die sensorische Funktion. Die Sehne erhält diese Informationen über propriozeptiven Input der Mechanorezeptoren des muskulotendinösen Übergangs. Sie hat aber selbst keine motorische Funktion inne, deshalb erhält sie auch an sich keine efferente Information (Kirkendall und Garrett 1997).

2.3 Morphologie

2.3.1 Struktureller Sehnenaufbau

Die Sehnen der Säugetiere bestehen aus strikt hierarchisch angeordneten, longitudinal verlaufenden, immer kleiner werdenden Untereinheiten. In der Reihenfolge von makroskopisch nach mikroskopisch ist eine Sehne unterteilt in Faszikel, Kollagen-Fasern, Kollagen-Fibrillen, Subfibrillen, Mikrofibrillen und Tropokollagen (Abb. 3) (Goodrich 2011). Die Faszikel werden von bindegewebigem Endotenon umhüllt, in welchem auch Blut-, Lymphgefäße und Nerven verlaufen. Das Endotenon steht in Kontakt mit der äußeren Hülle der Sehne, dem so genannten Epitenon. In Regionen ohne Sehnenscheide, bildet das Paratenon die schützende Hülle der Sehne. (Smith 2011).

Im Wesentlichen folgen die Fibrillen einer planaren Zick-Zack-Wellenform entlang der longitudinalen Achse der Sehne, auch genannt „Crimp“ (Abb. 3) (Dowling et al. 2000). Werden die Sehnen einer Zugkraft ausgesetzt durch z.B. die Kontraktion des Muskels, haben sie nur eine begrenzte Dehnbarkeit. Bei Zugbelastung wird die oben beschriebene Wellenform gestreckt und die Sehne ist in der Lage, sich um etwa 5 % zu verlängern (Schünke 2000).

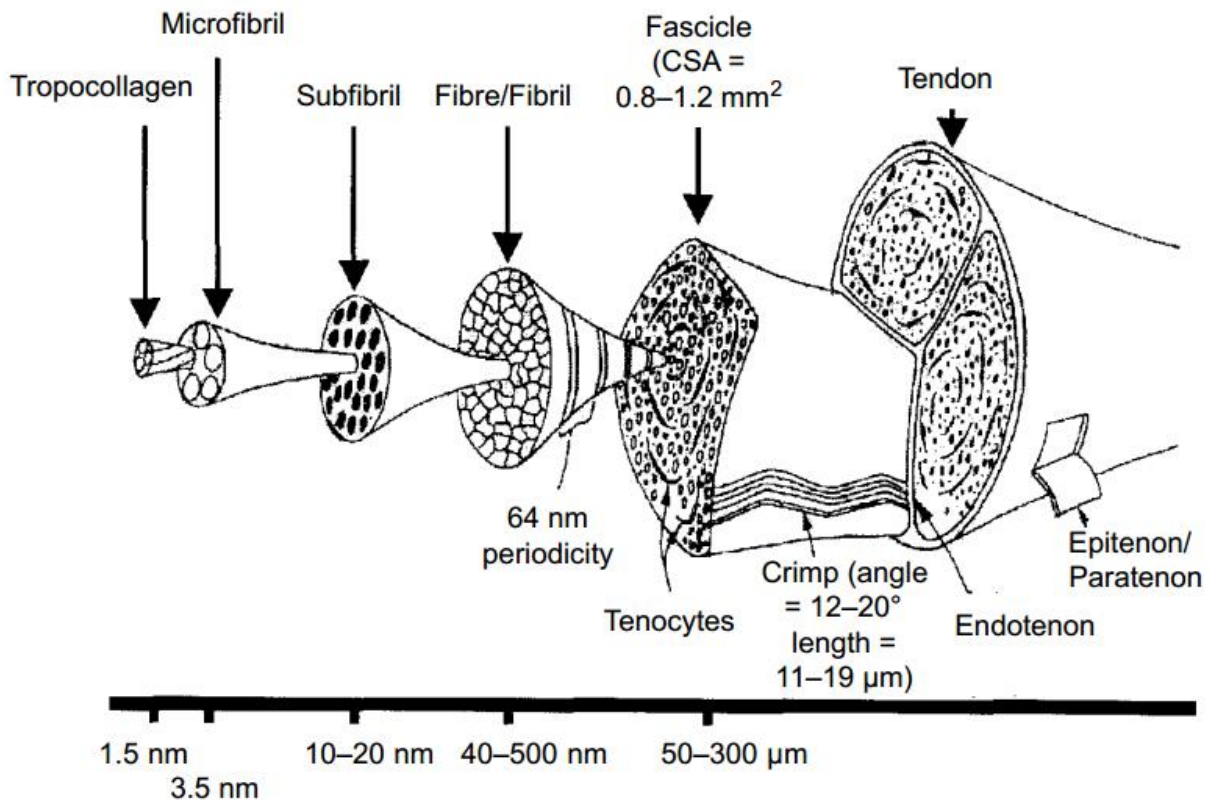


Abb. 3: Hierarchischer Aufbau einer Sehne (Dowling et al. 2000)

2.3.2 Zelluläre Komponenten

Auf zellulärer Ebene betrachtet besteht die Sehne aus Tenoblasten und Tenozyten, welche longitudinal angeordnet sind und zwischen den Kollagen-Fibrillen eingebettet liegen (Webbon 1978). Tenoblasten sind unreife Sehnenzellen. Mit fortschreitendem Alter transformieren sich die Tenoblasten zu Tenozyten und verändern ihre Form von spindelförmig zu länglich. Tenoblasten und Tenozyten machen etwa 90–95 % der zellulären Bestandteile einer Sehne aus. Die restlichen 5–10 % bilden Chondrozyten der Insertionsstellen, Synovialzellen und Endothelzellen (Sharma und Maffulli 2006). Tenozyten sind essenziell für die Bildung und den Erhalt von Sehnengewebe (Smith 2011). Sie synthetisieren sowohl Kollagen, als auch Bestandteile der extrazellulären Matrix, Metalloproteinasen und Cytokine (Sharma und Maffulli 2006, Hosaka et al. 2010) und unterliegen einem Feedback Loop (Abb. 4) bei dem die Zelle zunächst extrazelluläre Matrixbestandteile synthetisiert und diese Bestandteile wiederum mit der Zelle interagieren (Labat-Robert et al. 1990).

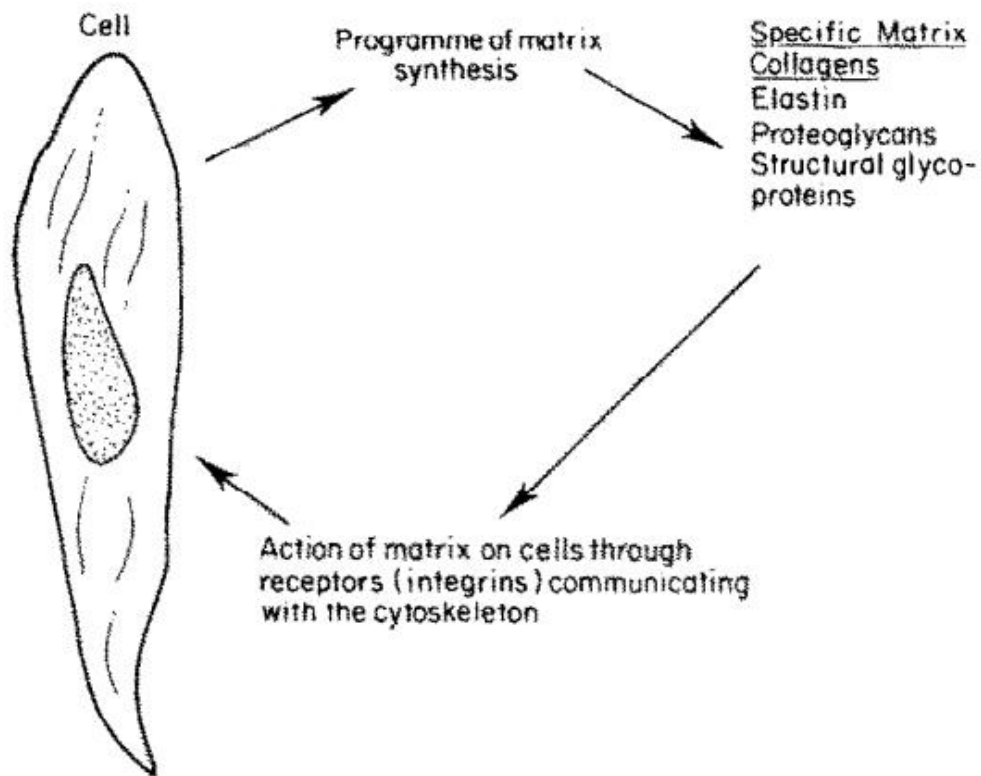


Abb. 4: Schematische Zeichnung des Feedback loops eines Tenozyten zur Synthese von extrazellulären Matrixbestandteilen (Labat-Robert et al. 1990)

Man kann mikroskopisch zwischen drei verschiedenen Tenozyten-Populationen unterscheiden.

Typ I: Zellen mit dünnen, spindelförmigen Kernen.

Typ II: Zellgruppen mit abgerundeten, dicken zigarrenförmigen Kernen.

Typ III: Chondrozytenartige Zellen mit runden Kernen und sichtbaren Nukleoli (Smith 2011).

Die Verteilung und die Dichte der Tenozyten in Bezug auf ihre Matrix unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Sehnen (Goodship et al. 1994). Junge Sehnen weisen einen beträchtlich höheren Anteil an Typ II Zellen auf. In fortgeschrittenem Alter herrschen die Typ I Zellen vor, während an Stellen mit besonders großer Druckbelastung die chondrozytenartigen Typ III Zellen identifiziert werden können (Stanley et al. 2008, Smith 2011).

2.3.3 Extrazelluläre Matrix

Sehnen bestehen überwiegend aus extrazellulärer Matrix, die mit einem dichten Bindegewebe vergleichbar ist. (Benjamin et al 2008). Die extrazelluläre Matrix setzt sich wie folgt zusammen: 55–70 % Wasser, 60–85 % Kollagen, außerdem 2 % Elastinfasern, 0,2 % anorganische Substanzen und 4,5 % verschiedene andere Proteine gemessen in Trockenmasse der Sehne (Kjær 2004).

2.3.4 Kollagen

Bekanntermaßen finden sich in unterschiedlichen Bereichen innerhalb einer Sehne verschiedene Kollagentypen wieder (O'Brien 1997). Man kann zwischen den fibrillären Kollagen Typen I, II, III, IV, V und XI unterscheiden. Kollagen Typ I ist mit 95 % der vorherrschende Kollagen Anteil in Sehnen, Knochen und Haut (Smith 2011, Canty und Kadler 2005). Zu einem geringeren Anteil beinhaltet eine Sehne aber ebenso Kollagen Typ III. Kollagene des Typs IV und V befinden sich in der Basalmembran, die zwischen Muskel- und Sehnenfasern angesiedelt ist (O'Brien 1997, Canty und Kadler 2005). Typ III Kollagen ist im Endotenon vorhanden und nimmt stetig zu, je älter das Pferd wird. Kollagen Typ II ist das vorherrschende Kollagen des Gelenkknorpels (Smith 2011).

Bildung von Kollagen-Fibrillen: Ausgangsprodukt sind drei Prokollagen Ketten, die im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden. Jede Kette trägt ein sich wiederholendes Gly-X-Y Triplett. Das C-, und das N-Propeptid, die sich jeweils am Anfang und am Ende einer Prokollagen Kette befinden, weisen diese Wiederholungsstruktur jedoch nicht auf. Am C-Propeptid kommt es zu einer Wechselwirkung und die drei Prokollagen Ketten fügen sich zu einem Prokollagen-Trimer (Abb. 5) zusammen (Canty und Kadler 2005). Um sich in diese einzigartige Tripelhelix winden zu können, benötigt das Molekül an jedem dritten Kettenende eine kleinste Aminosäure, nämlich Glycin. Jede der drei Ketten hat somit, wie bereits erwähnt, eine sich wiederholende Struktur: Gly-X-Y, wobei X und Y eine beliebige Aminosäure sein kann. Am häufigsten sind Prolin und Hydroxyprolin zu finden (Kadler et al. 1996). Am anderen Ende der Helix flankiert das N-Propeptid die Prokollagen-Helix. Im weiteren Verlauf entfernen die N-Proteinase und die C-Proteinase die Propeptide, während die Prokollagen-Helix den Golgi-Apparat passiert. Resultat, dieser auf molekularer Ebene stattfindenden Prozesse, ist

die Entstehung von Kollagenmolekülen, die sich durch kovalente Querverbindungen zu Kollagen-Fibrillen zusammensetzen (Abb. 5) (Canty und Kadler 2005).

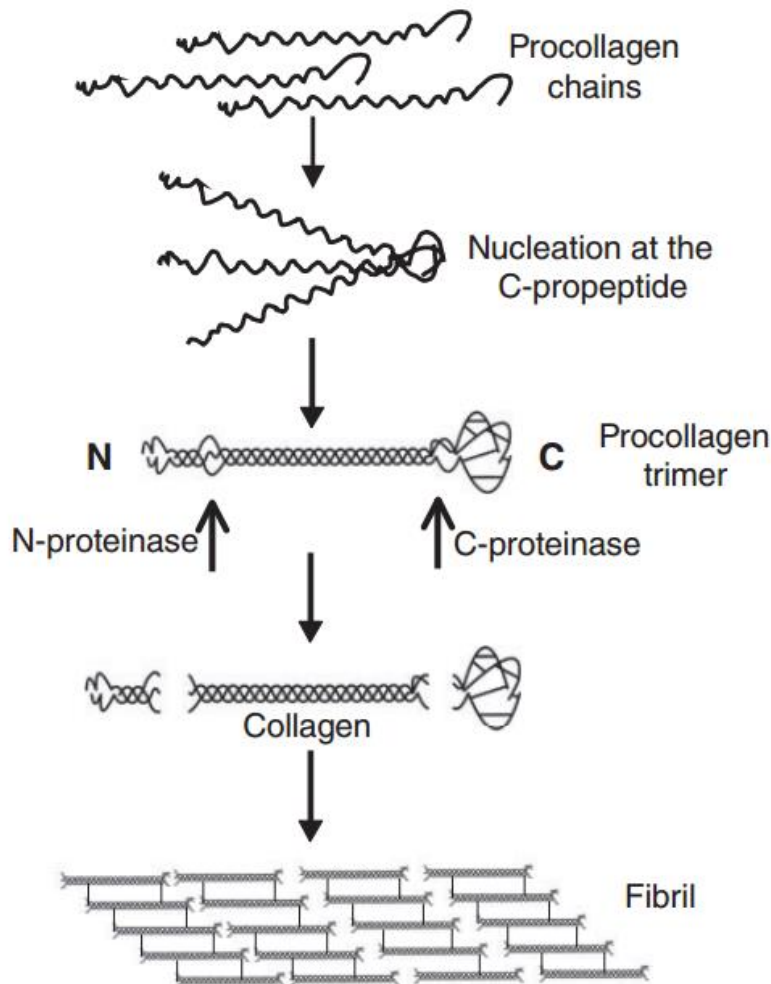


Abb. 5: Entstehung einer Kollagen-Fibrille auf molekularer Ebene (Canty und Kadler 2005)

2.3.5 Nicht kollagene Komponenten

Nicht kollagene Glycoproteine, wie Proteoglykane und Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) haben zur Aufgabe das Fibrillenwachstum zu beeinflussen und die Fibrillendicke zu regulieren, einfacher gesagt, sie regulieren den Stoffwechsel des Gewebes (Halász et al. 2007). Proteoglykane sind ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Sehnenmatrix (Rees et al. 2009).

Proteoglykane werden in zwei Hauptkategorien eingeteilt: Große Proteoglykane, darunter fallen Aggrecan und Versican und kleine Proteoglykane, wie Decorin, Biglycan, Fibromodulin

und Lumican. Strukturell unterscheiden sie sich aufgrund der Anzahl ihrer Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten. Große Proteoglykane weisen eine Vielzahl an GAG-Seitenketten auf, kleine Proteoglykane besitzen meist nur ein bis zwei GAG-Seitenketten (Smith 2011).

Das kleine leucinreiche Proteoglykan Decorin dominiert dabei die anderen Proteoglykane in einer Sehne (Rees et al. 2009). Decorin und Fibromodulin regulieren die Kollagen-Fibrillenbildung von Typ I Kollagen. Sie bestimmen außerdem den Fibrillendurchmesser und die Oberflächeneigenschaften der Kollagen-Fibrillen und demzufolge auch die physikalischen Eigenschaften der fertigen Fibrillen (Heinegård und Oldberg 1989, Hedbom et al. 1992). Aufgrund dessen sind die Verteilung und die Mengenverhältnisse des Decorin in der Sehne für eine korrekte Funktion der Sehne unerlässlich (Rees et al. 2009). Biglykan zeigt eine ähnliche Struktur wie Decorin und Fibromodulin (Hedbom und Heinegård 1993). Biglykan und Fibromodulin binden an fibrilläres Kollagen und regulieren ebenfalls die Fibrillogenese (Rees et al. 2009).

In Sehnenbereichen, die hohen Druckbelastungen ausgesetzt sind, findet man gehäuft die großen Proteoglykane (Smith 2011). Das große Proteoglykan Aggrecan ist bekannt für sein Vorkommen im Gelenkknorpel, wo es Druck- und Scherkräften, die bei kompressiven Gelenkbewegungen freigesetzt werden, widersteht (Rees et al. 2009). Das große Proteoglykan Versican trägt zu einer lockeren und hydratisierten extrazellulären Matrix bei, indem es sowohl direkt mit den Zellen als auch indirekt mit den Zellmolekülen interagiert und die Zellproliferation, Zelladhäsion und die Zellmigration reguliert (Wight 2002). Große Proteoglykane haben ein enormes Quellungspotenzial, was sie widerstandsfähiger gegenüber Kompressionen macht. Außerdem können sie Hyaluronsäureaggregate bilden (Smith 2011).

Ein weiteres nicht kollagenes Glykoprotein ist das COMP. Es ist ein großes Molekül, welches sich aus fünf Untereinheiten zusammensetzt, die über Disulfidbrücken an ihren N-Termini miteinander verbunden sind. Dadurch wird ein fünfarmiges Protein gebildet, dessen C-terminale Enden Interaktionen mit anderen Matrices ermöglichen (Abb. 6). COMP wurde überwiegend in Geweben nachgewiesen, die hohen Belastungen ausgesetzt waren. Des

Weiteren findet man die höchsten Konzentrationen von COMP in jungen Sehnen bis zu einem Alter von 2 Jahren (Smith et al. 1997, Smith et al. 2002).

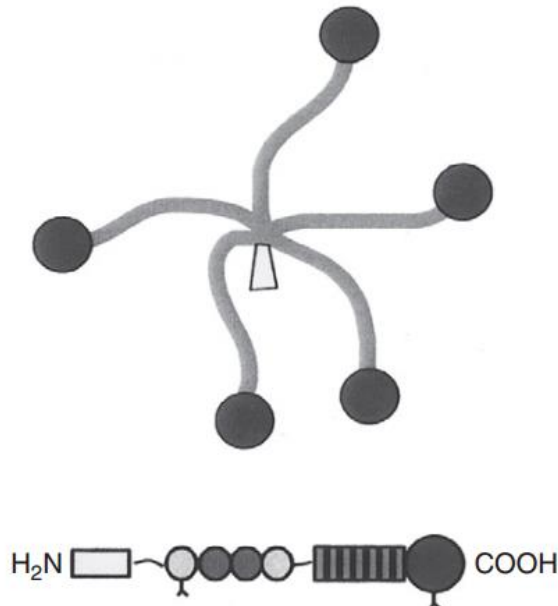


Abb. 6: Schematische Darstellung des Cartilage Oligomeric Matrix Proteins (Smith 2011)

2.4 Biomechanik

2.4.1 Eigenschaften von equinen Sehnen

Sehnen haben eine Vielfalt von Funktionen inne. Sie dienen unter anderem der Kraftübertragung von einem Muskel auf einen Knochen, um so die Bewegung eines Gelenkes und letztlich des Skeletts zu erreichen. In Kombination mit diversen Bändern halten sie die Lage des Körpers im Raum aufrecht (Kümmerle et al. 2019). Man kann zwischen Positionssehnen und Energiespeichersehnen unterscheiden. Ihre unterschiedliche morphologische Zusammensetzung, resultiert aus der unterschiedlichen Funktion. Positionssehnen haben zur Aufgabe die Kraft auf einen Knochen zu übertragen, um eine Bewegung im Gelenk zu erreichen. Ihre Struktur sollte unter physiologischen Belastungen deshalb nicht dehnbar sein. Im Gegensatz dazu müssen Energiespeichersehnen unter physiologischen Belastungen dehnbar sein, da sie der Speicherung und der Freisetzung elastischer Dehnungsenergie dienen. Das hat eine effizientere Fortbewegung zur Folge, jedoch sind sie gleichzeitig auch höheren Belastungen ausgesetzt (Birch 2007).

Speziell das Pferd hat im unteren Drittel des distopalmaren beziehungsweise distoplantaren Bereichs der Extremität digitale Flexorsehnen, wie die OBS, TBS und den Fesselträger entwickelt, um eine gewisse Hyperextension der Zehe während der Stützbeinphase zu gewährleisten (Smith 2011). In der Phase der Hyperextension sind die Flexorsehnen sehr hohen Zugbelastungen ausgesetzt (Goodship et al. 1994). Dabei fungieren sie als eine Art Feder, um die Energie für die nachfolgenden Bewegungsschritte zu speichern. Die elastische Energie wird dann im weiteren Bewegungsablauf effizient genutzt, um den Energieaufwand zu senken (Kümmerle et al. 2019, Goodship et al. 1994). In der Stützbeinphase wird durch die Extension des Metakarpophalangealgelenks Spannung auf die OBS ausgeübt. Die palmare Position der OBS lässt eine Bewegung nach distal zu, wobei das *Ligamentum accessorium* eine Überdehnung verhindert. In der Hangbeinphase entspannt sich die OBS durch die Kontraktion des proximal gelegenen Muskelbauchs, begleitet durch eine Lageveränderung der OBS nach proximal (Denoix 1994). Dadurch wird die distale Extremität gebeugt (Goodship et al. 1994). Die OBS erreicht ihre maximale Zugbelastung bei 1 t Gewicht *in vivo* und rupturiert bei einem Gewicht von 1,2–2 t, wenn sie *ex vivo* in einem Prüfgerät getestet wird. In externen *in vitro* Tests hat sich gezeigt, dass sich die OBS in der Regel um 10–12 % der ursprünglichen Länge dehnen kann, bevor sie rupturiert. Die OBS hat lediglich einen Querschnitt von 1 cm², sodass die ultimative Zugspannung (Kraft pro Flächenquadrat) beim Pferd nahezu 100 MPa beträgt (Smith 2011).

2.4.2 Stress Strain

Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Sehnen manifestieren sich aus der unterschiedlichen Funktion. Jede Sehne weist verschiedene Zonen auf, in denen sich die Zusammensetzung ändert und dementsprechend auch ihre Eigenschaften (Mienaltowski und Birk 2014).

Sehnen weisen eine charakteristische nicht-lineare Stress Strain Kurve auf (Abb. 7) (Goodship et al. 1994).

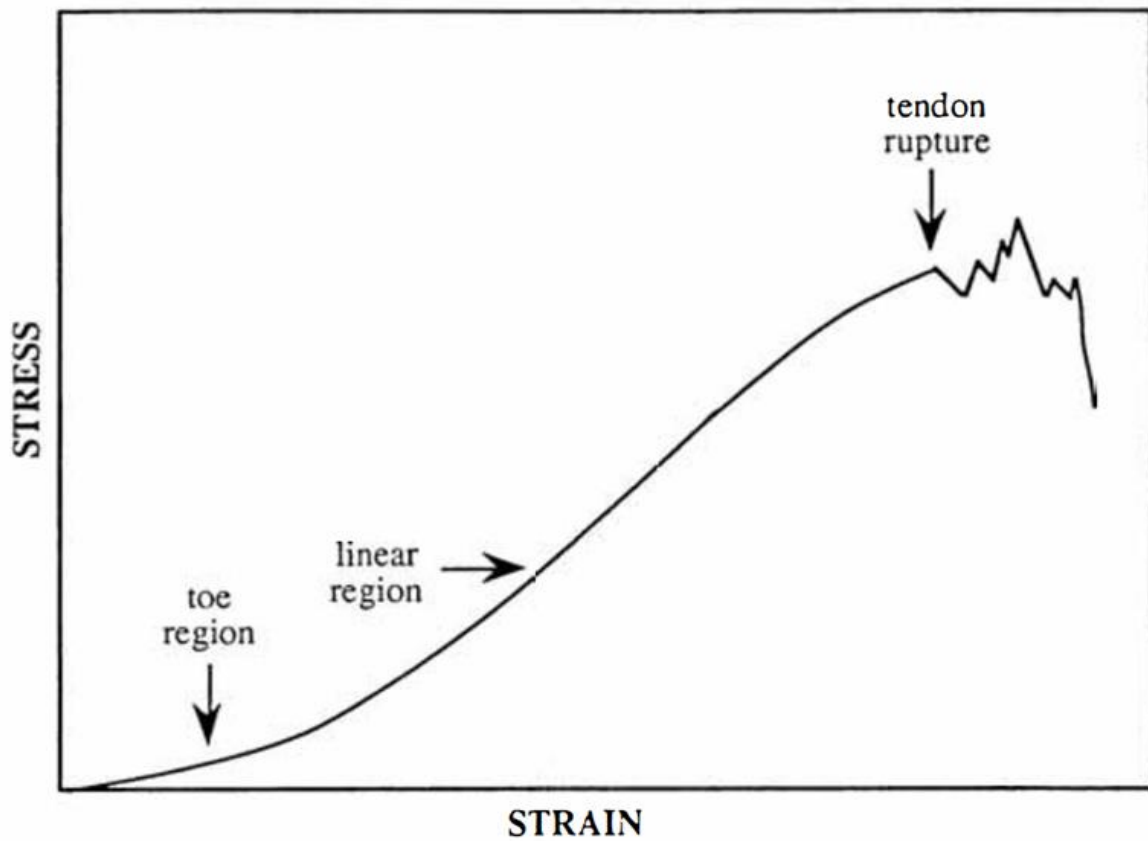


Abb. 7: Stress Strain Kurve (Lastdeformationsdiagramm) (Goodship et al. 1994)

Es werden drei verschiedene Bereiche in der Kurve unterschieden: Die Zehenregion (= toe region), die Linearregion (= linear region) und die Region, in der die Last ihr Maximum erreicht hat und die Sehne rupturiert (= tendon rupture). Bei geringen Belastungen sind die Sehnen nachgiebig. In der Zehenregion strecken sich zu Beginn der Belastung zunächst die gekräuselten Kollagenfasern (Crimp) entlang der Zugachse. Mit zunehmender Belastung werden die Sehnen immer steifer. Ab einem bestimmten Punkt folgt die Steifheit einer nahezu linearen Steigung bis zu einem Punkt, an dem die Sehne der Last nicht mehr standhalten kann und rupturiert (Mienaltowski und Birk 2014). Die am stärksten beanspruchten Sehnen sind die Zehenbeuger (Ker 2002). Sie halten Zugspannungen bis zu 12.000 Newton stand (entspricht 1,2 t) (Crevier-Denoix et al. 1997), das macht vor allem die OBS zu einem effektiven Lastenträger (Kümmerle et al. 2019). Die maximale Zugkraft ist abhängig von dem Verhältnis der Querschnittsfläche der Sehne zu der des Muskels (Ker 2002). In Zahlen ausgedrückt besitzt die OBS eine Elastizität von 1096,5 Megapascal und eine relativ hohe Bruchfestigkeit von durchschnittlich 1243 Dekanewton. Die Sehne rupturiert bei etwa 12,3 % Dehnung

(Denoix 1994). Die normale Dehnung der OBS *in vivo*, gemessen bei Ponys, beträgt etwa 2–4 % in der Gangart Schritt und 4–6 % in der Gangart Trab. Im Galopp wurde bei Rennpferden sogar eine maximale Dehnungsbelastung von bis zu 16 % erreicht. Solche Belastungen sind weitaus größer als in den meisten Sehnen anderer Tierarten und reflektieren die hohe Spezialisierung der equinen OBS. Die Zugfestigkeit *in vitro* variiert über die Länge der OBS. Die höchste Zugfestigkeit bei gleichzeitig höchster Beanspruchung besteht in der Metakarpalregion, dort treten gleichzeitig auch die häufigsten Sehnenverletzungen auf (Smith 2011, Riemersma et al. 1996).

2.5 Sehnenverletzungen

2.5.1 Arten der Sehnenverletzungen

Überbeanspruchung, Verschleiß und heftige abrupte Krafteinwirkungen sind häufige Faktoren, die zu Sehnenverletzungen führen können. Dabei entstehen in der Sehne Rupturen oder Avulsionen (Mienaltowski und Birk 2014).

Man kann Sehnenverletzungen im Allgemeinen in akut oder chronisch unterteilen. Dabei spielen die intrinsischen und die extrinsischen Faktoren eine wichtige Rolle. Bei einem akuten Trauma überwiegen die extrinsischen Faktoren, bei chronischen Fällen hingegen vermehrt die intrinsischen Faktoren (Sharma und Maffulli 2006). Extrinsische Risikofaktoren beziehen sich im Wesentlichen auf die Umstände, unter denen eine Verletzung eintritt. Dazu zählen unter anderem Trainingsfehler, Umweltbedingungen, wie ungeeignetes Gelände, Klimafaktoren und minderwertige Ausrüstung. Intrinsische Risikofaktoren umfassen biologische Faktoren, wie z.B. Alter, Geschlecht, Körpergewicht, bisherige Verletzungen und Fitness (Taimela et al. 1990). Die häufigste Verletzung beim Pferd ist eine intrinsisch getriggerte Verletzung der OBS im Bereich des Metakarpus (Smith 2011).

2.5.2 Heilungsprozess

Der Heilungsprozess einer Sehne kann in drei sich überlappende Phasen unterteilt werden. Entzündliche Phase: Zu Beginn einer Sehnenverletzung setzt die entzündliche Phase ein. Charakteristisch für diese Phase ist das Einwandern von Erythrozyten und Entzündungszellen, allen voran neutrophile Granulozyten. Monozyten und Makrophagen sorgen in den ersten 24 Stunden für eine Phagozytose des nekrotischen Gewebes. Die Gefäßpermeabilität wird

gesteigert und die Synthese von Kollagen Typ III wird in Gang gesetzt (Sharma und Maffulli 2005).

Proliferative Phase: Sie beginnt einige Tage nach der entzündlichen Phase. Es kommt zu einer Zunahme der Myofibroblasten. Der Wassergehalt und der Glykosaminoglykanspiegel bleiben ebenfalls erhöht. Die Synthese des Kollagen Typ III hat ihr Maximum erreicht. Diese Phase dauert bis zu sechs Wochen an (Walden et al. 2017, Sharma und Maffulli 2005).

Reifungs- und Remodellierungsphase: Diese finale Phase beginnt ab der sechsten Woche und kann bis zu einem Jahr andauern. In dieser Phase wird nun auch vermehrt Kollagen Typ I synthetisiert. Ab der zehnten Woche beginnt das bereits vorhandene Reparaturgewebe sich in faseriges Narbengewebe umzubauen (Sharma und Maffulli 2005).

All diese Prozesse lassen schlussendlich jedoch nur ein strukturell und biomechanisch minderwertiges Narbengewebe entstehen, welches in seiner Funktion und Belastbarkeit bei weitem unter der einer intakten Sehne liegt (Walden et al. 2017).

2.6 *In vitro* Verfahren

2.6.1 Gründe für die *in vitro* Forschung

Der *in vitro* Forschung und dem darauf basierenden Tissue Engineering liegt die Motivation zugrunde Methoden zu entwickeln, welche die Reparatur und die Regeneration von körpereigenem Gewebe verbessern. Dabei wird zunächst funktionelles Gewebe *in vitro* angezüchtet und *in vivo* implantiert, um ein *de novo* Gewebe zu erhalten (Walden et al. 2017).

Basierend auf diesen Zell- und Gewebekulturen, sind zahlreiche *in vitro* Modellsysteme entwickelt worden (Huh et al. 2011). Einen großen Vorteil bieten die *in vitro* Modelle im Hinblick auf die 3R-Regel. Der Grundgedanke hierbei ist: Die Verwendung von Tieren zu Forschungszwecken durch alternative Verfahren zu ersetzen (Replacement), die Anzahl der Tiere zu reduzieren (Reduction) und die verwendeten Methoden zu optimieren (Refinement). Die *in vitro* Forschung ermöglicht es Fragestellungen zunächst außerhalb eines lebenden Organismus zu beantworten, bevor sie in einen lebenden Organismus übertragen werden. Eine gänzliche Abschaffung von Tierversuchen ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht denkbar, jedoch ermöglicht die *in vitro* Forschung einen großen Schritt in Richtung alternativer Methoden und verbesserten Tierschutzes (Hubrecht und Carter 2019). Des Weiteren haben *in vitro* Modelle den Vorteil, dass sie reproduzierbar sind und definierte Versuchsbedingungen ermöglichen. Sie sparen zeitlichen und personellen Aufwand und sind zudem noch kostengünstig (Weber et al. 2000).

2.6.2 *In vitro* Modelle (= Bioreaktoren) - Allgemein

Die *in vitro* Modelle sollen idealerweise die Funktion von Geweben und Organen bzw. deren funktionelle Einheiten möglichst genau widerspiegeln (Huh et al. 2011). Bereits eine Studie von Elsdale und Bard 1972 beschreibt das Anzüchten von Zellen sowohl in einer zweidimensionalen als auch in einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix, zur Durchführung von Zellverhaltensstudien. 3D Modelle sind den Verhältnissen *in vivo* am ähnlichsten. Die dreidimensionale Architektur und biomechanische Stimulation ist wichtig, weil sie die rezeptorvermittelte biomechanische Signalübertragung in Gang setzt, im Gegensatz zu einem 2D Modell, bei dem sich die Zellen lediglich an eine 2D ligandenbeschichtete Oberfläche heften (Friedl und Bröcker 2000). Außerdem behalten die Zellen in 2D Modellen ihre Differenzierung nicht bei, weil die Mikroumgebung in solch einem Modell nicht der einer *in vivo* Umgebung entspricht und nicht ausreichend nachgeahmt wird. Zur Nachahmung von hochstrukturierten Zellmikroumgebungen wurden die so genannten Bioreaktoren entwickelt. (Huh et al. 2011).

Bioreaktoren werden definiert als Gerätschaften, in denen biologische oder biochemische Prozesse unter streng kontrollierten Bedingungen ablaufen. Sie stimulieren die Zellen und regen diese an extrazelluläre Matrix zu bilden (Plunkett und O'Brien 2011). Im weiteren Verlauf sollen die Bioreaktoren die Zellen dazu anregen, 3D Strukturen zu formen, um ein Gewebe zu bilden (Beldjilali-Labro et al. 2018).

Damit die Entwicklung von Zellen *in vitro*, dem Verhalten der Zellen in einer *in vivo* Umgebung naturgetreu nachgeahmt werden kann, muss das Zellwachstum durch mechanische Signale aus der Zellmikroumgebung stimuliert werden. Das Zellgerüst wird zunächst durch mechanische Reize angeregt. Die Reize werden dann im Folgenden über Transmembranmoleküle, wie z.B. Integrine in die Zelle übertragen und regen diese an Migration, Proliferation und Differenzierung zu betreiben (Huang et al. 2012).

Bioreaktoren müssen, speziell für die Sehnenforschung, bestimmte Grundanforderungen erfüllen: Eine gleichmäßige Zellverteilung, Aufrechterhaltung der Mediumzusammensetzung und Konzentration, genügend Nährstoffbereitstellung für die Zellen, physikalische Reize, sowie die Möglichkeit der Zellen, ein 3D Gewebe bilden zu können (Plunkett und O'Brien 2011). Um diese 3D Gewebe bilden zu können, stützt sich die Sehnengewebe-Forschung auf drei Säulen, die alle miteinander agieren: Zellen, Biomaterialgerüst und chemische bzw. physikalische Faktoren (Abb. 8). Ein Bioreaktor sollte alle drei Säulen berücksichtigen (Beldjilali-Labro et al. 2018).

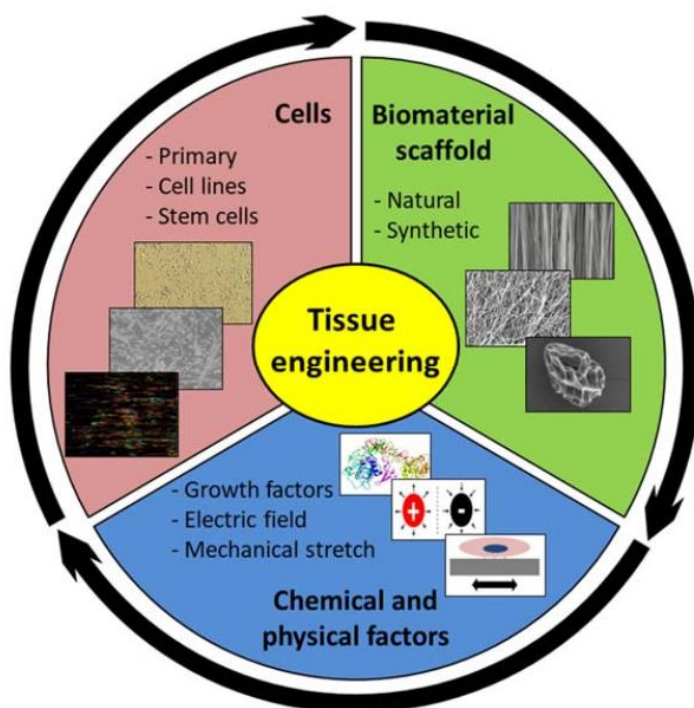


Abb. 8: Die drei Säulen der Gewebeanzucht (Beldjilali-Labro et al. 2018)

2.6.3 Grundtypen von Bioreaktoren

Es können fünf Grundtypen für die dynamische Kultivierung von Gewebezellen unterschieden werden (Martin et al. 2004, Chmiel 2011).

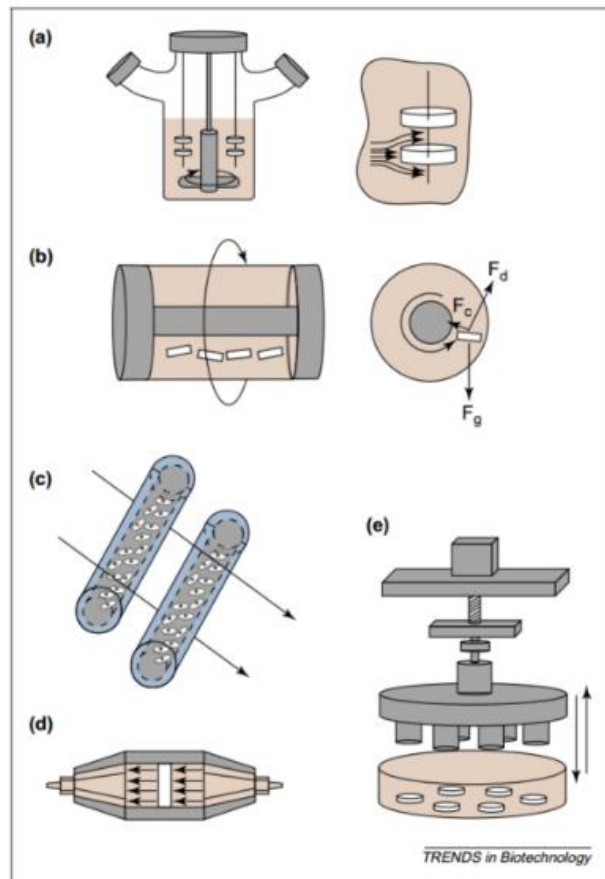


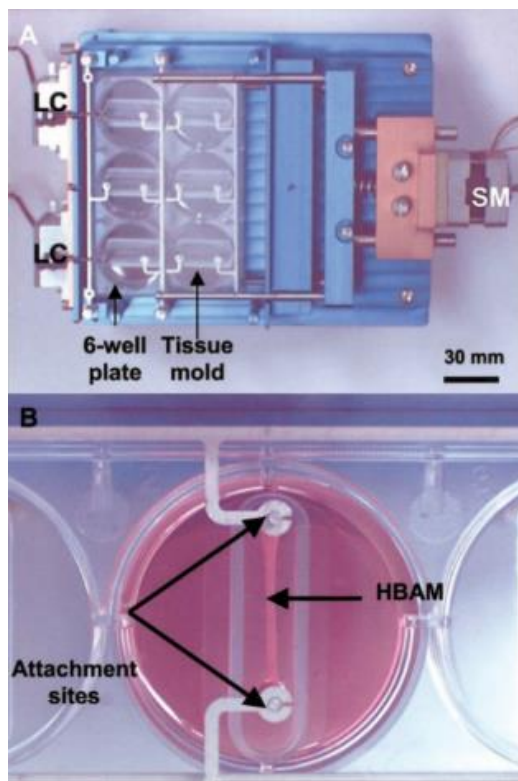
Abb. 9: Grundtypen von Bioreaktoren (Martin et al. 2004)

Spinnerflaschenbioreaktor: Dieser Reaktor wird hauptsächlich für die Kultivierung von Knorpelgewebe verwendet. Die dynamische Komponente wird erzeugt, indem ein magnetbetriebener Rührer, der sich am Boden der Flasche befindet, einen permanenten Strömungswirbel des Kulturmediums erzeugt. Die mit Zellen besiedelten Matrizen hängen, wie in Abb. 9(a) dargestellt, an Nadeln vom Flaschendeckel herab und werden durch die Durchmischung des Kulturmediums ständig mit frischen Nährstoffen versorgt (Vunjak-Novakovic et al. 1996).

Rotierender Bioreaktor: Dieser Reaktor findet überwiegend Verwendung für die Differenzierung von Knorpel-, Herz- und Nervenzellen (Unsworth und Lelkes 1998). Ein rotierender Zylinder, in dem sich ein ebenso rotierendes Kulturgefäß in horizontaler Ausrichtung befindet (Abb. 9(b)), erzeugt eine laminare Strömung. Dementsprechend wird auch eine Mikrogravitation simuliert (Chmiel 2011).

Perfusionsbioreaktor: Das Kulturmedium durchströmt, wie in Abb. 9(d) gezeigt, direkt das mit Poren durchlöcherter permeable Membrangerüst. Bei der Aussaat der Zellen heften sich diese an die Poren und adhären dort mit dem Gerüst. Da diese Art von Bioreaktoren viele unterschiedliche Designs ermöglicht, können dementsprechend auch viele verschiedene Zelldifferenzierungen untersucht werden, wie z.B. Osteozyten, Keratinozyten oder Hepatozyten. Die Abb. 9(c) zeigt ein Perfusionsbioreaktor-Design mit semipermeablen Hohlfasern (Martin et al. 2004).

Kompressionsbioreaktor: Ziel dieser Art von Bioreaktor ist es, eine dynamische Kompression auf das Zellgerüst auszuüben. Schwerpunktmäßig werden sie bei Chondrozyten (Démartean et al. 2003) und bei Osteozyten eingesetzt (Chmiel 2011). Laut Démartean et al. 2003 stimuliert die Kompression, die auf die Zellen ausgeübt wird, die Synthese von Proteoglykanen, was der Funktion *in vivo* sehr nahe kommt. Abb. 9(e) zeigt folgendes Kompressionsbioreaktor-Design: Die Zell-Polymer Konstruktionen werden in Vertiefungen eingelassen. Darüber wird pro Vertiefung je ein Kolben befestigt. Mittels einer Mikrometerschraube kann der Druck, der auf das Zell-Polymer Konstrukt einwirkt, gemessen werden (Démartean et al. 2003).



Dehnungsbioreaktor: Der Grundgedanke bei dieser Art von Modell ist es, eine dynamische Dehnung auf das Zellgerüst auszuüben. Hierbei wird das Zellgerüst mit Pins auf beiden Seiten des Wells fixiert (Abb. 10 „Attachment sites“). Ein Pin bleibt dabei beweglich, damit dieser während des Versuchs, mit Hilfe eines z.B. Motors oder wahlweise auch mit einer beweglichen Gummimembran, unidirektional gezogen werden kann und somit das Zellgerüst amplitudenweise gedehnt wird (Powell et al. 2002). Dieses Modell wird hauptsächlich für Sehnenzellen verwendet (Plunkett und O'Brien 2011). Ein ähnlicher Versuchsaufbau wurde auch in dieser Diplomarbeit verwendet.

Abb. 10: Dehnungsbioreaktor (Powell et al. 2002)

2.6.4 Hydrogel

Hydrogele sind 3D Polymernetzwerke mit einem hohen Wassergehalt, der dem der extrazellulären Matrix ähnelt (Geckil et al. 2010). Ihre Aufgabe ist es, die Eigenschaften der extrazellulären Matrix so gut es geht nachzuahmen, um den Zellen im Bioreaktor als eine Art Gerüst zu dienen (Slaughter et al. 2009). Basierend auf der Wechselwirkung zwischen Zelle

und Kollagenmatrix werden die Bildung und die Organisation von Gewebestrukturen gesteuert (Abraham et al. 2012). Man kann zwischen natürlichen und synthetischen Hydrogelen unterscheiden (Youngstrom und Barrett 2016). Die natürlichen Hydrogele bestehen meist aus Kollagen, Hyaluronsäure oder Fibrin. In der Sehnenzellforschung werden Hydrogele mit Kollagengrundlage verwendet. Diese sind jedoch mechanisch schwächer als die synthetisch hergestellten Hydrogele. Daher werden ihnen oftmals weitere Bestandteile, wie Acrylat, Thiolat, Tryamin, Kollagenalginat oder Agarose-Polyethylenglykol beigemischt, um die mechanischen Eigenschaften zu verbessern (Huang et al 2012). Synthetische Hydrogele beinhalten Polyethylenglykol oder Polyacrylamide, was ihnen einen Vorteil im Hinblick auf bessere mechanische Steuerbarkeit verschafft. Sie sind zudem auch noch biokompatibel, biologisch abbaubar (Alexander et al. 2014) und sie halten Dehnungen bis zu 10 % bei einer Frequenz von 1 Hz stand (Youngstrom und Barrett 2016). Hydrogele vermitteln ihre mechanischen Eigenschaften durch zwei Funktionen, zum einen durch die Steifheit, die je nach Bedarf von 0,1 kPa bis zu 40 kPa reichen kann, zum anderen durch die Dehnungskapazität. Die Steifheit des Hydrogels kann durch Änderung der Polymerkonzentration angepasst werden (Huang et al. 2012). Die zyklische Dehnung der Sehnenzellen im Bioreaktor verhindert eine Atrophie und wirkt sich positiv auf die Zelldifferenzierung, DNA Synthese und Mitose aus (Arnoczky et al. 2002). Sie sorgt dafür, dass die Zellen ins Kollagen migrieren und sie sich entlang der mechanischen Dehnungsachse ausrichten. (Huang et al. 2012).

2.6.5 Ziele des 3D *in vitro* Sehnenmodells und zukünftiger Einsatz

Das Ziel dieser Machbarkeitsstudie war zum Einen die Möglichkeit der *in vitro* Herstellung von 3D Organoiden mit sehnenähnlicher Morphologie zu prüfen und zum Anderen die Durchführbarkeit, der geplanten Analysen wie Histologie und qPCR zu testen. Es wurde die Entwicklung einer möglichst originalgetreuen Nachbildung einer Sehne und der auf sie einwirkenden Einflüsse in einer Art „Miniformat“ angestrebt. Um die *in vivo* Verhältnisse so lebensecht wie möglich zu gestalten, wurde Kollagengel (Kollagen Typ 1) beladen mit Sehnenzellen in eine speziell dafür hergestellte, länglich-ovale Kulturkammer ausgebracht. Das Kollagengel wurde an beiden Enden der Kammern mit Minutien-Pins (winzige Edelstahlpins) befestigt. Es wurde sowohl eine statische Dehnung mittels Pins als auch eine dynamische Dehnung mit Hilfe von superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO) (= Eisennanopartikel) und Anlegen eines externen Magnetfeldes kreiert. Die Fixierung der

Pins erfolgte so, dass die Sehnen-Organoiden und die darin enthaltenen Sehnenzellen, mit zunehmender Schrumpfung des Gels durch die Zugkräfte der Zellen, einem statischen Zug entlang der Achse zwischen den Pins ausgesetzt waren. Aus der Kontraktion der Sehnen-Organoiden resultierte weiters eine uniaxiale Ausrichtung der Zellen. Die dynamische Dehnungskomponente wurde erreicht, indem die mit Eisennanopartikeln versetzten Sehnenzellen, mit Hilfe eines exogen angelegten Magnetfeldes „trainiert“ wurden. Die Magnete befanden sich außerhalb der Kulturkammer und erzeugten ein in Längsrichtung der Sehnen positioniertes Magnetfeld. Die Magnete wurden im Intervall an die Sehnen-Organoiden angelegt, um eine dynamische Zugspannung zu erzeugen. Das 3D Modell wurde als Vorstufe für eine spätere Übertragung auf ein Tendon-on-a-chip-Modell genutzt. Bei der Organ-on-a-chip Technologie handelt es sich um eine der modernsten Technologien auf dem Gebiet der *in vitro* Modelle. Es handelt sich sowohl bei den 3D Modellen, als auch bei den Chipmodellen um eine Alternative zu Tierversuchen, die ganz neue Beziehungen zwischen Zellbiologie und Biotechnik schafft. Organs-on-a-chip sind mikrofluidische Zellkulturen. Im Gegensatz zu herkömmlichen 2D Zellkulturen können 3D Modelle und Organs-on-chips für die Zellen ähnliche Bedingungen wie *in vivo* simulieren, wenn sie ständig mit Medium durchflutet werden, Dehnungskomponenten hinzugefügt werden und Interaktion mit anderen Zellen stattfindet. Der Sinn ist nicht ein ganzes Organ zu konstruieren, sondern kleine Einheiten zu züchten, die die Funktionen eines Organs oder eines Gewebes wiedergeben (Huh et al. 2011). Die Organ-on-a-chip Technik wird ausführlich in der Diplomarbeit „Pferdesehnen als organ on a chip model“ - Die Übertragung eines 3D *in vitro* Sehnenmodells auf einen Mikrochip zur Etablierung neuer Methoden für Forschung und Medikamentenscreenings“ von Mag. med. vet. Lisa Julie Zeiger beschrieben.

Langfristig sollen die *in vitro* Modelle, die *in vivo* Modelle ersetzen. Das Sehnenmodell lässt Medikamentenscreenings zu, und ist auch für die Untersuchung verschiedener Therapiemöglichkeiten einsetzbar.

3 Material und Methoden

3.1 Entnahme der Sehnen *post mortem* und Aufbereitung im Labor

Aus der oberflächlichen Beugesehne von Pferden, die aus Gründen, die nichts mit der hier vorgestellten Machbarkeitsstudie zu tun hatten, euthanasiert wurden, wurden Sehnenzellen gewonnen und angezüchtet.

Die Entnahme der oberflächlichen Beugesehne erfolgte *post mortem* und unter Einhaltung steriler Kautelen.

Um ein Austrocknen der Sehne zu verhindern, wurde diese nach Entnahme sofort in einen sterilen mit phosphat buffered saline (PBS) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich®, USA) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Penicillin-Streptomycin, Sigma Aldrich, USA) befüllten Behälter verbracht. Die weitere Aufbereitung der Sehne im Labor, wurde unter einer laminar air flow Sicherheitswerkbank (Laminar US18, ThermoFisher Scientific, USA) durchgeführt. Es wurden sterile 6-Well-Platten (VWR® Tissue Culture Plates 6 well sterile, VWR International bvba, Belgien), Skalpellhalter, Skalpellklingen, Pinzetten, PBS, Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich®, USA) und Petrischalen bereit gestellt.

Für die Herstellung von 500 ml Kulturmedium wurden folgende Materialien benötigt:

- 50 ml hitzeinaktiviertes Fetal calf serum (FCS) (Fetal calf serum, Sigma Aldrich®, USA)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Penicillin-Streptomycin, Sigma Aldrich, USA)
- 5 ml Amphotericin B (Amphotericin B, Biochrom, England)
- 5 ml L-Glutamin (L-Glutamin, Biochrom, England)
- 435 ml DMEM low glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium with 1,0 g/L glucose and without L-Glutamin, Lonza, Schweiz)

In jede Vertiefung einer 6-Well-Platte wurden 2–3 ml Kulturmedium vorgelegt. Mit einer Pinzette wurden die Sehnen auf eine Petrischale gelegt und mit dem Skalpell zunächst in grobe Stücke zerschnitten. Für das weitere Zerkleinern wurden die groben Stücke in eine zweite Petrischale überführt. Sie wurden mit PBS angefeuchtet und mit dem Skalpell in ca. 3–4 mm³ kleine Stücke zerkleinert. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Sehnenstücke nicht im PBS "schwimmen", da sonst das Zerschneiden erschwert wurde. Sechs bis sieben der 3–4 mm³ großen Stücke wurden jeweils in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben. Alle sechs Vertiefungen einer Well-Platte wurden auf diese Art und Weise bestückt. Am Ende enthielten insgesamt drei 6-Well-Platten die Sehnenstücke, auch Explants genannt. Das Kulturmedium bedeckte die Sehnenstücke zu Zweidrittel. Zu viel Medium erwies

sich als kontraproduktiv, da die Sehnenstücke dann nicht ausreichend absinken konnten und so ein Auswandern der Sehnenzellen verhindert wurde. Die Well-Platten wurden zu Dokumentationszwecken mit dem Namen des Pferdes, Probenart, und Datum beschriftet. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Well-Platten im Brutschrank (HERAcell 240i, Thermo Scientific®, USA) bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt.

Das Medium wurde 2x/Woche gewechselt, wobei entweder 5 ml Pipetten (Serological pipette 5 ml, Sarstedt, Deutschland) oder 1000 µl Pipetten (Pipette Reference, Eppendorf AG, Deutschland) zum vorsichtigen Absaugen des Mediums verwendet wurden.

Sobald eine Koloniekonfluenz von 40–50 % erreicht wurde, wurden die Explants, entweder durch Absaugen mit einer 25 ml Pipette (Serological pipette 25 ml, Sarstedt, Deutschland) oder einzeln mit einer Pinzette entfernt. Durch das Absaugen der Explants wurde häufig eine leichte Zerstörung des Zellrasens verursacht. Zur Steigerung der Sehnenzellkonfluenz wurde die Kultur daher für ein bis zwei Tage ruhen gelassen. Zweimal pro Woche wurde eine Kontrolle des Zellwachstums mit einem Mikroskop (CKX41, Olympus®, Japan) durchgeführt.

3.2 Mediumwechsel

Der Mediumwechsel erfolgte 2x/Woche. Das Zellkulturmedium wurde vor Benutzung im Wasserbad (Wasserbad 1004, GFL, Deutschland) bei 37 °C erwärmt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten mit Hilfe einer laminar air flow Sicherheitswerkbank. Hierbei wurde gründlich auf die Einhaltung der Sterilität Acht gegeben, um eine Kontamination der Kultur zu vermeiden. Zunächst wurde das alte Medium aus der 6-Well-Platte mit einer 1000 µl Pipette abgesaugt. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit PBS. Pro Waschschritt wurden je Vertiefung 2–3 ml PBS verwendet. Die mit PBS befüllte Well-Platte wurde vorsichtig geschwenkt und das PBS im darauffolgenden Arbeitsschritt wieder abgesaugt. Ein Befüllen der Well-Platten mit 2–3 ml Medium pro Vertiefung fand unmittelbar nach den Waschschriffen statt. Nach jedem Arbeitsschritt erfolgte ein Wechsel der Pipettenspitze.

3.3 Zellernte

Eine Zellernte wurde bei einer Zellkonfluenz von ca. 80–90 % durchgeführt. Dafür benötigte man die zu erntende Zellkultur, PBS und Trypsin EDTA (Trypsin/EDTA® 0.05 %, Biochrom, England). Nach dem Absaugen des Mediums, erfolgten zwei Waschschriffe mit PBS. Nach dem zweiten Waschschritt wurde Trypsin EDTA der Kultur zugesetzt. Je nach Größe des Kulturgefäßes, wurden unterschiedliche Mengen an Trypsin EDTA verwendet (Tab. 1):

Tab. 1: Trypsinmenge in Abhängigkeit zur Kulturgröße

Kulturgröße	Trypsinmenge
12,5 cm ² Zellkulturflasche	0,5 ml Trypsin
25 cm ² Zellkulturflasche	1 ml Trypsin
75 cm ² Zellkulturflasche	3 ml Trypsin
125 cm ² Zellkulturflasche	6 ml Trypsin
60 mm Petrischale (28,3 cm ²)	1,5 ml Trypsin
6-Well-Platte	0,5 ml Trypsin

Durch gleichmäßiges Schwenken wurde der gesamte Zellrasen bzw. der Boden des Gefäßes mit Trypsin bedeckt. Danach erfolgte eine fünf minütige Inkubation im Brutschrank wobei darauf geachtet wurde, diese nicht zu überschreiten, da ein zu langes Verbleiben des Trypsins auf der Kultur die Zellen schädigt. Nach Ablauf der fünf Minuten wurde die Kultur ein weiteres Mal geschwenkt, um den Ablösungsprozess der Zellen vom Boden zu beschleunigen. Bei unzureichender Ablösung der Zellen vom Boden bediente man sich eines Zellschabers, mit dem man vorsichtig die Zellen vom Boden kratzte. Danach wurde die Zellablösung sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch kontrolliert. Hatten sich die Zellen ausreichend vom Boden gelöst, wurde durch die Zugabe von Medium mit FCS die Wirkung des Trypsins inaktiviert. Folgende Mengen des Mediums wurden je nach Größe der Kulturflasche hinzugegeben (Tab. 2):

Tab. 2: Mediummenge in Abhängigkeit zur Kulturgröße

Kulturgröße	Mediummenge
12,5 cm ² Zellkulturflasche	1,5 ml Medium
25 cm ² Zellkulturflasche	3 ml Medium
75 cm ² Zellkulturflasche	9 ml Medium
175 cm ² Zellkulturflasche	18 ml Medium
60 mm Petrischale (28,3 cm ²)	4 ml Medium

Es erfolgte ein Überführen der Zellsuspension aus dem Kulturgefäß in ein 15 ml Falcon Tube (Screw cap tube 15 ml, Sarstedt, Deutschland). Um die Zellausbeute zu steigern, wurde der

Boden des Kulturgefäßes mit PBS ausgespült. Die Menge des PBS entsprach dabei der des Mediums.

Das PBS mit den abgespülten Zellen wurde ebenfalls in das Falcon Tube gegeben und das Volumen auf 14 ml mit PBS aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Falcon Tubes bei 2.000 revolutions per minute (rpm) für fünf Minuten in einer Zentrifuge (ROTANTA 460 R, Hettich Zentrifugen®, Deutschland). Die schweren Zellen sammelten sich durch das Zentrifugieren als Pellet am Falconboden. Der Überstand (Medium und PBS) wurde mittels Pipette abgesaugt und verworfen, das Zellpellet im Falcon Tube zurückbehalten.

3.3.1 Zellzahlermittlung

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde zunächst das bei der Zellernte entstandene Zellpellet mit PBS resuspendiert. Die Menge an PBS richtete sich nach der Größe der verwendeten Zellkulturflasche. Als Richtwerte galten folgende PBS Mengen (Tab. 3):

Tab. 3: PBS-Menge in Abhängigkeit zur Kulturgröße

Kulturgröße	PBS-Menge
Passage T 12,5 Zellkulturflasche	0,5 ml PBS
Passage T 25 Zellkulturflasche	1 ml PBS
Passage T 75 Zellkulturflasche	2 ml PBS
Passage T 175 Zellkulturflasche	4 ml PBS
Passage von mehreren Zellkulturflaschen	5 ml PBS, bei Bedarf weiter verdünnen

Die Zellsuspension wurde gut durchmischt und ein Tropfen dieser Suspension in ein Eppendorf Gefäß (SafeSeal tube 1,5 ml, Sarstedt, Deutschland) gegeben. Aus diesem Eppendorf Gefäß wurden wiederum 10 µl Zellsuspension entnommen, in ein zweites Eppendorf Gefäß überführt und 10 µl Trypanblau (Trypan Blue Stain 0,4%, GIBCO®, USA) hinzu pipettiert. Nach intensivem Mischen der Zellsuspension mit dem Trypanblau wurden 10 µl des Gemisches mit einer Pipette entnommen und damit eine Seite der Countess Zählkammer (Countess™ cell counting chamber slides, Invitrogen™, USA) befüllt. Anschließend wurde die Countess Zählkammer in den dafür vorgesehenen Slot des Countess Zählgerätes (Countess II FL Automated Cell Counter, Thermo Fischer Scientific®, USA) eingeführt. Mit der Funktion „Zoom in“ wurde ein Bereich festgelegt, der von dem Zählgerät

ausgezählt werden sollte. Mit der Funktion „Zoom out“ wurde der zu zählende Bereich final festgelegt. Mit der Funktion „Count cells“ wurden die Zellen gezählt. Die Zellzahl und die Viabilität (Angabe des Gerätes pro ml) wurden nach erfolgter Messung dokumentiert und der Vorgang wiederholt. Dabei wurde in gleicher Weise, wie oben beschrieben, die andere Seite der Zählkammer befüllt und ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde berechnet, indem der Durchschnitt aus den zwei ermittelten Zählungen mit der Menge des zur Resuspension verwendeten PBS (in ml) multipliziert wurde.

3.4 Entwicklung und Herstellung des 3D Modells

Die für die Versuche verwendeten speziell angefertigten Zellkulturkammern wurden unter Zuhilfenahme des Programms AutoCad (Version 2017) in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Wien und Frau Dipl. Ing. Barbara Eva Maria Bachmann entwickelt. Dabei wurden als Basis für das 3D Modell die Kulturkammern einer 6-Well-Platte als Grundgerüst verwendet. Dieses wurde maßstabsgetreu vermessen und in das AutoCad Programm eingepflegt (Abb. 11). Die Maße betrugen 127,5 mm in der Länge, 85,3 mm in der

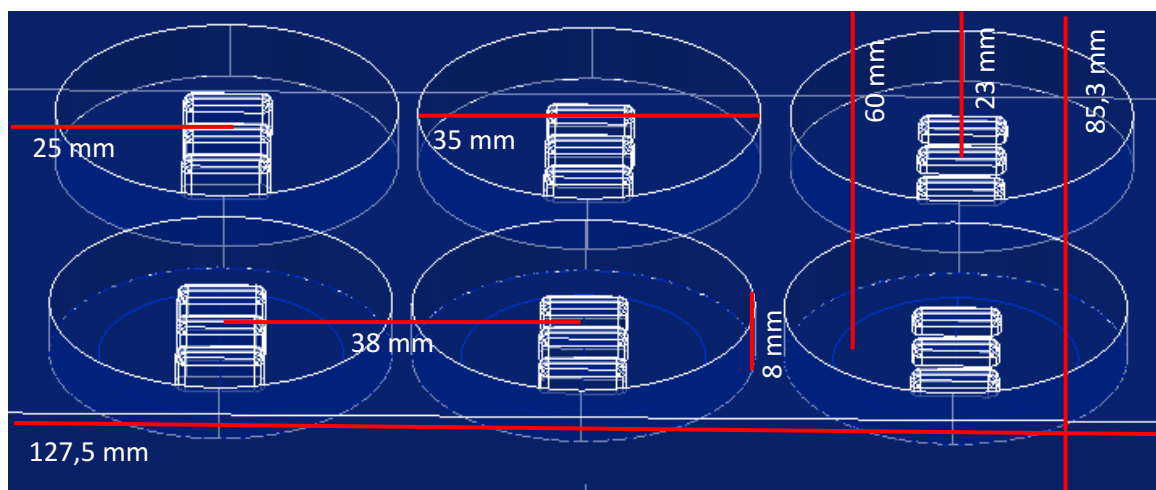


Abb. 11: 3D Modell, erstellt mit Hilfe von AutoCad 2017 (Dipl. Ing. Barbara Eva Maria Bachmann, TU Wien)

Breite und 8 mm in der Höhe, wodurch ein dreidimensionales Rechteck entstand. Im Anschluss wurden die sechs Wells, je drei pro Längsseite, eingezeichnet. Diese hatten die Maße: 35 mm im Durchmesser, Strecke vom Rand der kurzen Grundgerüstseite zur Mitte des ersten Wells 25 mm, Strecke vom Rand der langen Grundgerüstseite zur Mitte der oberen Wellreihe 23 mm, Strecke vom Rand der langen Grundgerüstseite zur Mitte der unteren

Wellreihe 60 mm, Strecke zwischen der Mitte des einen Wells zur Mitte des anderen Wells waagrecht gemessen 38 mm.

Basierend auf den AutoCad Zeichnungen wurde eine Negativ Silikonform entwickelt, die dem Polydimethylsiloxane (PDMS)-Gel (PDMS, Sylgard®184 Silicone Elastomer, Dow Chemical Company, USA) später seine Form gab (Abb. 12). Die Silikonform wurde mit Hilfe eines 3D Druckverfahrens in einem Fremdlabor der Technischen Universität Wien produziert.

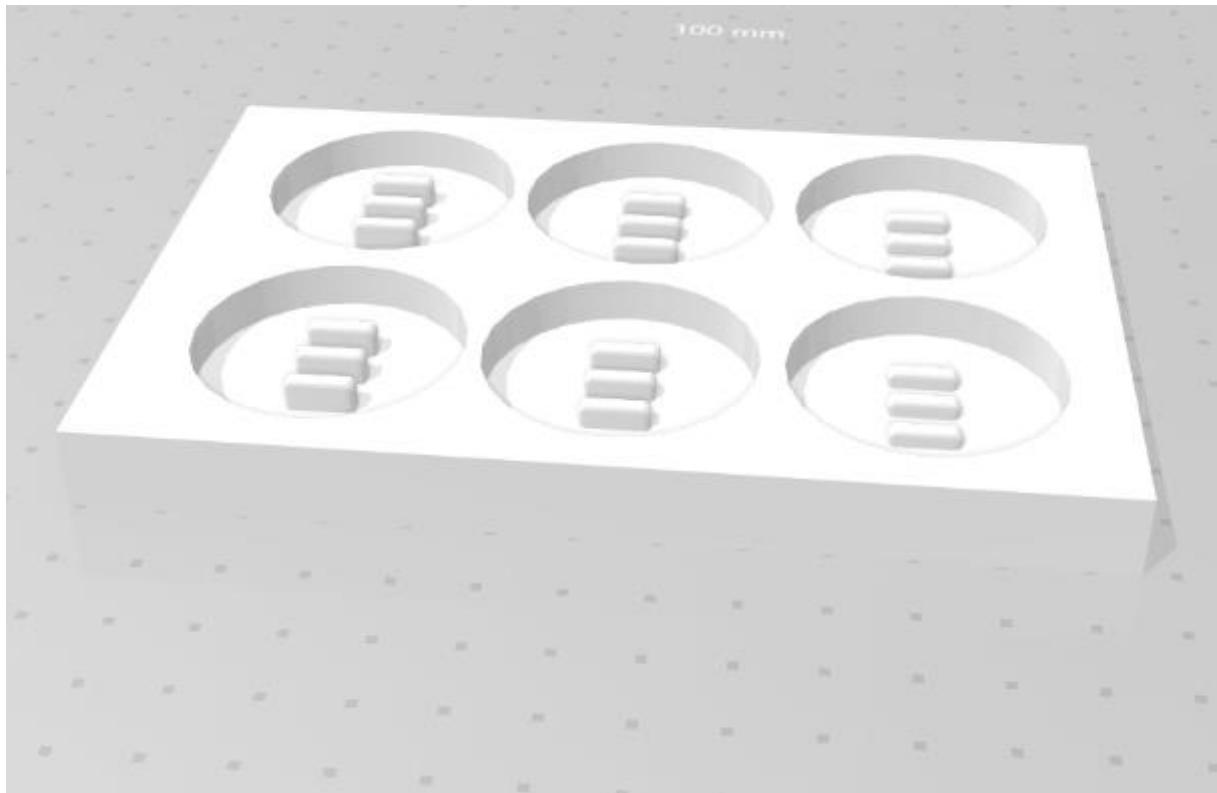


Abb. 12: Negativ-Silikonform (Dipl. Ing. Barbara Eva Maria Bachmann, TU Wien)

Mit Hilfe dieser Silikonform wurde ein PDMS Gel gegossen, welches ein rundes Grundgerüst mit einer Dicke von 3 mm aufwies. Das Grundgerüst wurde mit einem Durchmesser von 25 mm designt, um einen 5 mm breiten Rand zwischen PDMS-Gel und Well zu erzielen. Des Weiteren enthielt das PDMS drei ovale Vertiefungen mit je 3 mm Tiefe, einer Länge von 9 mm und einer Breite von 3 mm. Die Abstände der Vertiefungen zueinander betrugen 6,25 mm. Diese Vertiefungen dienten im 3D Modell als Kulturkammern.

Zur Herstellung des PDMS-Gels wurde PDMS Härtungsmittel (Sylgard®184 Silicone Elastomer Curing Agent, Dow Chemical Company, USA) zur Basis (Sylgard®184 Silicone Elastomer Base, Dow Chemical Company, USA) im Verhältnis 1:10 für mindestens fünf Minuten mit einer Plastikpipette gemischt. Anschließend wurde die PDMS Mischung in die Silikonform gegossen und für fünf Minuten bei 70 °C inkubiert. Auftretende Bläschen wurden durch hartes Klopfen der Silikonform auf die Tischoberfläche beseitigt. Es folgte eine weitere Polymerisation des PDMS für mindestens zwölf Stunden bei Raumtemperatur. Nach vollständiger Aushärtung wurde das PDMS-Gel aus der Silikonform entfernt und zunächst mit Wasser und Seife, danach mit 99 % Isopropanol und schlussendlich mit destilliertem Wasser gereinigt und mit sauberer Druckluft aus einer Druckluftpistole (Bahco BP218 Air Blow Gun BAHBP218) getrocknet. Aufgrund der zeitaufwendigen Entwicklung und Herstellung der Negativ-Silikonform, wurden in vorherigen Herstellungsprozessen die Kulturkammern mit einer herkömmlichen Biopsie-Stanze (Kai Biopsy Punches #48115, Kai medical, Japan) ausgestanzt (Abb. 13). Sie dienten als Prototypen für die ersten Sehnervenversuche, wurden aber zeitnah von den weiterentwickelten silikonformbasierten PDMS Gelen abgelöst. Dies vereinfachte die Produktion der PDMS Gele enorm, da die Silikonformen ein Gießen der Gele mit bereits integrierten Kulturkammern ermöglichten.

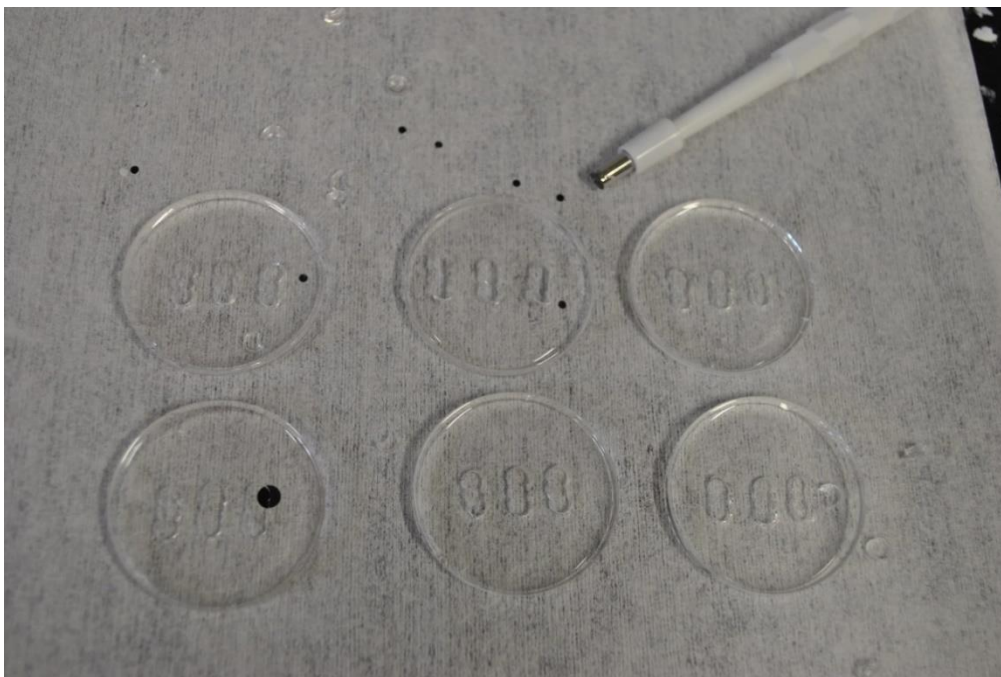


Abb. 13: Prototypen für die ersten Sehnervenversuche

Im Anschluss wurden die 6-Well-Platten mit dem PDMS-Gel bestückt. Dabei wurde am Boden des Wells zunächst ein PDMS Gel ohne Kammern befestigt und darüber wurde in einem weiteren Arbeitsschritt das PDMS-Gel mit den ausgestanzten Kulturkammern positioniert und fixiert (Abb. 14). Nach Beladen der Kulturkammern mit der SPIO-Zell Mischung wurden je zwei Pins (Austerlitz Insect Pins ® Minutiens Ø 0,20 mm, Entomoravia, Tschechien) aus rostfreiem Stahl mit einer Pinzette unter Einhaltung steriler Kautelen senkrecht in die Kulturkammern gesteckt. Jeweils ein Pin flankierte dabei das obere Ende der Kulturkammer und jeweils ein Pin wurde in das untere Ende der Kammer positioniert. Die Pins wurden in das darunter liegende PDMS-Gel gesteckt und fanden so ihren Halt.



Abb. 14: Beschickung der Wells mit PDMS Gelen

3.5 Zielsetzung-3D Modell

Das 3D Sehnenmodell wurde entwickelt, um es in zukünftigen *in vitro* Versuchen z.B. für das Studium der Pathophysiologie von Sehnenverletzungen, oder Medikamentenscreenings einzusetzen. Die Fragestellung der hier vorgestellten Arbeit bezog sich insbesondere auf die Machbarkeit: Erfolgreiche *in vitro* Anzucht von Sehnenkonstrukten mit sehnenähnlicher Morphologie und die Auswertbarkeit gewünschter Analysen, wie Histologie und qPCR. Dabei wurden Sehnenzellen in Kollagengel eingebracht und an beiden Enden mit Pins fixiert. Aus dem statischen Zug der Pins resultierte die Bildung sehnenähnlicher Organoidstrukturen und

eine uniaxiale Ausrichtung der Sehnenzellen. Die Ausrichtung der Zellen erfolgte, wie bei echten Sehnen, in Zugrichtung. Um die Situation *in vivo* möglichst lebensecht in den 3D Modellen simulieren zu können, wurde die statische Zugspannung durch eine dynamische Zugspannung ergänzt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit SPIO versetzt und mit Hilfe eines Magnetfeldes trainiert, das in Längsrichtung der Sehnen positioniert war. Es wurde auf diese Weise ein Zug erzeugt, der auf der magnetischen Anziehung der SPIO beruht.

3.6 Toxikologietest

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde ein *in vitro* Toxikologietest mit Hilfe von 2D Kulturen durchgeführt. Der so genannte TOX-8 (In vitro toxicology assay kit Resazurin Based, Sigma-Aldrich, USA) ist ein Kit und dient der fluorometrischen oder spektrophotometrischen Bestimmung der Lebend-Zellzahl, zur Ermittlung der metabolischen Aktivität basierend auf dem Vitalfarbstoff Resazurin, um die Toxizität der verwendeten Eisennanopartikel zu testen. Das System misst die Stoffwechselaktivität der lebenden Zellen durch den Oxidoreduktionsindikator-Farbstoff Resazurin, welcher eine dunkelblaue Färbung aufweist. Kommt es zu einer Bio-reduktion des Farbstoffs durch lebensfähige Zellen, reduziert sich die Menge seiner oxidierten Form (blaue Färbung) und es erhöht sich gleichzeitig die Menge seines fluoreszierenden Zwischenprodukts (rote Färbung). Die Menge der Farbstoffumwandlung in Lösung gibt somit indirekt den Grad der Zytotoxizität des Testmaterials an und wird fluorometrisch oder spektrophotometrisch bestimmt.

Durchführung: Zunächst wurden die Kulturen aus dem Inkubator in die laminar air flow Sicherheitswerkbank verbracht. Danach wurde den Zellen etwa 10 % der Menge des Zellkulturmediums in Form der Resazurin Farbstofflösung zugegeben. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation der Kulturen bei 37 °C. Die Auswertung wurde fluorometrisch durchgeführt, indem man den Anstieg der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 590 nm unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 560 nm überwachte.

3.7 Erster Versuch: Pilotstudie

Die Kulturzeit des ersten Versuchs betrug dreizehn Tage. Der erste Versuch (Versuchsparameter Tab. 4) wurde anhand von 2D (Tab. 5) und 3D Modellen (Tab. 6) durchgeführt. Dabei wurde sich verschiedenster Versuchskombinationen bedient, um schrittweise ein Gefühl für das bestmögliche Arrangement von Pins, Magneten, SPIO und

Zellzahl zu erhalten. Die Ergebnisse dieses Versuchs wurden als Grundlage und als Vorbereitung für die späteren 3D und Tendon-on-a-chip Versuche verwendet.

3.7.1 Versuchsaufbau

Tab. 4: Versuchsparameter des ersten Versuchs allgemein

Art der Konzentration	Konzentration
Kollagengel Konzentration	3 mg/ml
SPIO Dichte in Medium	5000 µg/ml
Medium Konzentration	50 µg/ml

2D Modell:

Tab. 5: Versuchsparameter des 2D Modells

Eisennanopartikel (SPIO)	Ohne SPIO	Mit SPIO (gelabelt)
Art der Kultur	6-Wellplate	6-Wellplate
Anzahl der Kultur	3	3
Zellzahl/Well	8.000	8.000
Zellzahl/Wellplate	48.000	48.000

3D Modell:

Tab. 6: Versuchsparameter des 3D Modells

	3D+Pin	3D+Pin+Magnet
SPIO gelabelt	420 Zellen/µl	840 Zellen/µl
	840 Zellen/µl	
Ohne SPIO	420 Zellen/µl	840 Zellen/µl
	840 Zellen/µl	

Für den 3D Versuch wurde bovines Kollagen (PureCol® Type I Collagen Solution, 3 mg/ml (Bovine) #5005, Advanced BioMatrix, USA) verwendet. Die Eisennanopartikel (chemicell

GmbH, nano-screenMag DEAE, Deutschland) wurden sowohl im 2D Modell als auch im 3D Modell verwendet.

3.7.2 Herstellung der Kollagen-Lösung

Für die Herstellung der Kollagen-Lösung wurde zunächst die Fläche einer einzelnen Kulturkammer ermittelt. Eine Kulturkammer bestand jeweils aus drei aneinandergereihten Ausstanzungen einer Biopsie-Stanze, die in das PDMS-Gel eingebracht wurden. Die Fläche der Biopsie-Stanze wurde mit der Formel $A = \pi r^2$ berechnet. Da drei Ausstanzungen jeweils eine Kulturkammer ergaben, wurde die Formel wie folgt ergänzt:

Fläche der Kulturkammer/drei Biopsieausstanzungen: $A = \pi * 1,5mm^2 * 3 = 21,2 \text{ mm}^2$

Volumen der Kulturkammer: $V = \pi r^2 h = 21,2 \text{ mm}^2 * 3mm = 63,6 \text{ mm}^3$

Aufgrund der geringfügigen Überlappungen der Ausstanzungen wurde das theoretisch ermittelte Gesamtvolumen von 63,6 µl auf 60 µl Kollagen-Zelllösungsgemisch pro Kulturkammer korrigiert.

Für die Herstellung von 1 ml Kollagengel wurden 800 µl bovines Kollagen (PureCol® Type I Collagen Solution, 3 mg/ml (Bovine) #5005, Advanced BioMatrix, USA), 100 µl DMEM, 40 µl 0,5 Normalität (N) Natriumhydroxid (NaOH) und 60 µl Zelllösung verwendet. Für diesen Vorgang wurden zunächst 1 N NaOH (Sodium hydroxide solution #S2770, Sigma-Aldrich, USA) in einer Verdünnung 1:2 in 10-fach konzentriertem DMEM vermischt. Danach wurden 800 µl Kollagen mit 100 µl DMEM gemischt. Auf das langsame Pipettieren der Kollagen-Lösung wurde großen Wert gelegt. Die Lösung wurde so lange vermischt, bis die Indikatorfarbe, die Aufschluss über den pH Wert gibt, rosa war. Anschließend wurden 40 µl des zuvor hergestellten NaOH/DMEM-Mixes in die Kollagen/DMEM Lösung hinzugefügt. Die Lösung sollte nach dem Vermengen eine rot/violette Farbe annehmen. Wies die Lösung eine Gelbfärbung auf, wurde schrittweise mehr NaOH beigemischt. Sobald die Lösung eine Rosafärbung angenommen hatte, wurde der pH Wert mit einem pH Indikatorpapier (Universal-Indikatorpapier pH 1–14, JHB-LABTECH, Deutschland) ermittelt, dieser sollte bei 7,2–7,6 (= neutral. Der Teststreifen stellt sich grün dar) liegen. Ein gründliches und sorgfältiges Mischen wurde zu jedem Zeitpunkt sichergestellt. Die gesamte Lösung sollte am Ende eine homogene Rosafärbung aufweisen. Für das Beladen mit Zellen wurden anschließend noch 60 µl Zelllösung hinzugefügt.

3.7.3 Herstellung der Zellsuspension ungelabelt (= ohne SPIO)

Um eine Zellsuspension zu erhalten, die 30.000 Zellen pro Kulturkammer ergab, wurden zunächst 94 µl des vorgemischten und angepassten Kollagengels mit 6 µl Zelllösung ohne SPIO vermischt. Diese enthielt eine Zellzahl von 14×10^6 Zellen/ml und konnte schlussendlich auf 30.000 Zellen pro 60 µl herunter verdünnt werden.

3.7.4 Herstellung der Zellsuspension gelabelt (= mit SPIO)

Für die Herstellung einer Zellsuspension mit SPIO gelabelt für zwei T75 Kulturflaschen, wurden 100 µl SPIO mit 10 ml Medium vermischt und nachfolgend sterilisiert. Im Anschluss wurde das alte Medium von den Zellen entfernt. Pro T75 Kulturflasche wurden 4,5 ml von dem neuen SPIO/Medium Gemisch in die Kulturen gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation für vier Stunden bei 37 °C.

3.7.5 Beladung der 3D Modelle

Um herauszufinden, welche Versuchsanordnung am besten funktioniert, wurde zu Beginn mit zwei Kulturkammern pro Well (Abb. 15) und später mit vier Kulturkammern pro Well gearbeitet (Abb. 16).

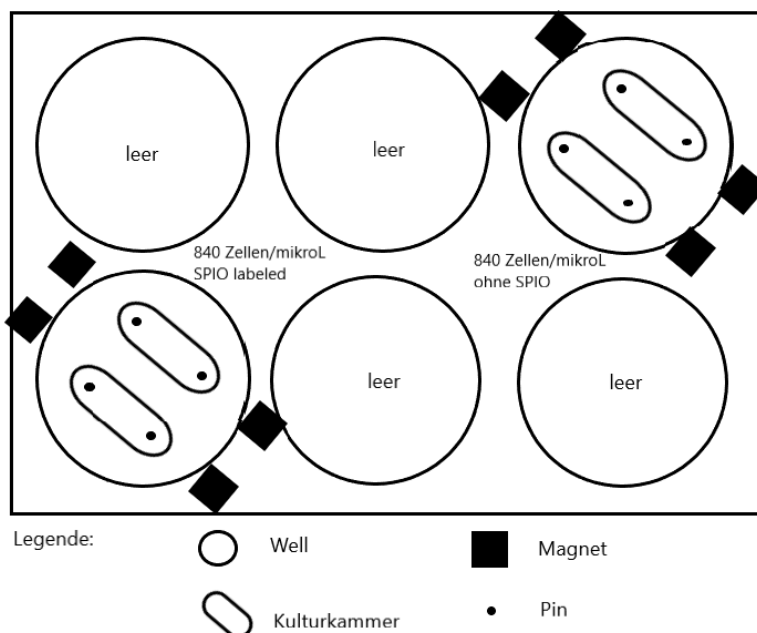


Abb. 15: Versuchsaufbau 3D+Pin+Magnet des ersten Versuchs

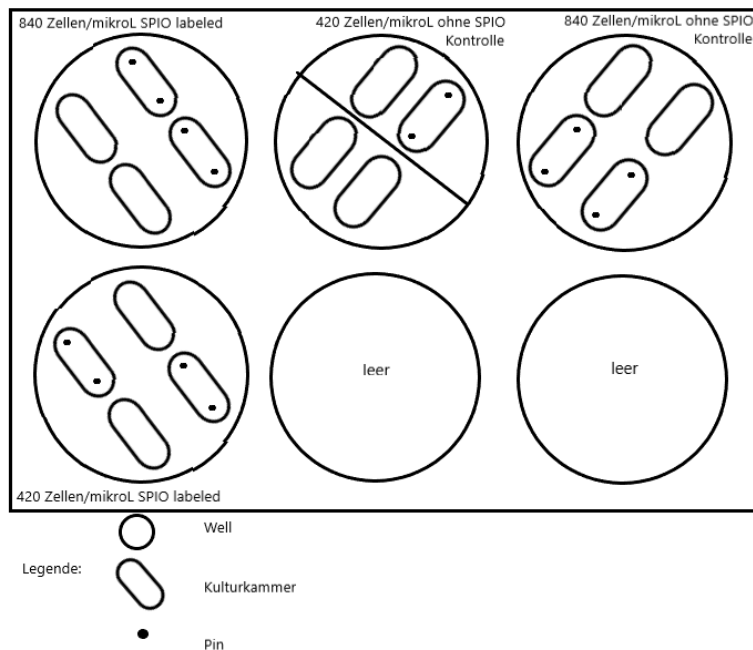


Abb. 16: Versuchsaufbau 3D+Pin des ersten Versuchs

3.7.6 Magnettraining

Um eine dynamische Zugspannung auf die Sehnen ausüben zu können, wurde eine 6-Well-Platte mit je zwei gegenüberliegenden Magnetwürfeln pro Sehne außerhalb des Wells versehen (Abb.15). Die Sehnen wurden mit einer Frequenz von 1 Hz eine Stunde lang pro Tag über die Dauer einer Woche mit dem Magneten trainiert. Der Magnet wies eine magnetische Flussdichte von 1,32 Tesla (T) auf.

3.8 Zweiter Versuch: Vergleich zweier unterschiedlicher Eisennanopartikel-Präparate

Zur Testung zweier unterschiedlicher SPIO Hersteller, wurde eine zweite Versuchsreihe durchgeführt. Dazu wurden zwei 6-Well-Platten einer Tenozyten-Generation der fünften Passage mit SPIO versetzt. Folgende SPIO Konzentrationen (Tab. 7) wurden dafür verwendet:

Tab. 7: SPIO Hersteller mit verwendeter Konzentration

Eisennanopartikel	Konzentration (mg/ml)
Magnetic iron oxide nanoparticles, Hisents	5,8 mg/ml
Magnetic iron oxide nanoparticles solution # 51238 (0.3-0.7% Fe basis, 2.5-3.5% solids basis) Sigma, USA	5 mg/ml

3.8.1 Versuchsdurchführung

Um die Zellen mit den SPIO beschicken zu können, wurden zunächst die SPIO der Firma Hisents (5,8 mg/ml) mit einem Verdünnungsfaktor 1:10 in FCS auf 0,58 mg/ml bzw. 580 µg/ml verdünnt. Danach wurde das SPIO-FCS-Gemisch mit einem Verdünnungsfaktor von 1:10 in Medium auf 58 µg/ml verdünnt. Dieselbe Vorgehensweise wurde bei der Zubereitung der SPIO von der Firma Sigma angewandt. Jedes Well wurde mit je 1 ml SPIO-Lösung befüllt. Die Kontrollgruppe erhielt keine SPIO, bekam aber das gleiche Medium, wie die SPIO Gruppen. Es wurden zwei unterschiedliche Inkubationszeiten festgelegt. Die eine Wellgruppe, bestehend aus Sigma Nanopartikeln, Hisents Nanopartikeln und Kontrolle, wurde vier Stunden bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert und die andere Wellgruppe, identisch der ersten Wellgruppe, wurde über Nacht (ca. 17,5 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Während der gesamten Versuchsreihe wurden jeweils drei TOX-8 Assays durchgeführt. Zu Beginn mit frisch gelabelten Zellen, später mit Zellen die eine Woche alt waren und zuvor gesplittet wurden und ein Verhältnis von 1:2 aufwiesen, und zum Schluss nach neunzehn Tagen mit Zellen, die ein Verhältnis von 1:8 aufwiesen.

3.9 Dritter Versuch: Dynamischer Zug mittels Eisennanopartikeln und Magneten

Folgende vier Versuchskombinationen wurden im dritten Versuch eingesetzt: Zum einen wurden in einer Versuchsgruppe, ausschließlich die Zellen mit Eisennanopartikeln gelabelt (Z). Zum anderen gab es diesmal auch eine Versuchsgruppe, bei der ausschließlich die Matrix (Matrix=Kollagengel) mit Eisennanopartikeln gelabelt wurde (M). In der dritten Versuchsgruppe enthielten sowohl die Zellen als auch die Matrix Eisennanopartikel (Z+M). In

der Kontrollgruppe (K) wurden weder die Zellen noch die Matrix mit SPIO gelabelt. Ziel war es herauszufinden, ob auch durch gelabeltes Kollagengel ein Dehnungseffekt auf die Zellen erzielt werden kann. Darüber hinaus wurden unterschiedlich starke Magneten verwendet, die entweder eine starke oder eine schwache magnetische Flussdichte erzeugten. Bei den schwachen Magneten wurden zwei unterschiedliche Magnet-Konstellationen verwendet. Bei der einen Konstellation, genannt „4 Türmchen“, wurden vier kleine Magnetwürfel zu einem Türmchen aufeinander gestapelt, die sich jeweils an den Enden der Minisehnen außerhalb des Wells befanden. Bei der anderen Konstellation, genannt „Quaderturm“, wurden mehrere quaderförmige Magneten mit schwacher Flussdichte übereinander gestapelt. Die dritte Konstellation wurde mit Magneten starker Flussdichte angefertigt.

3.9.1 Vorbereitung der Eisennanopartikel

Zur Vorbereitung der SPIO wurden 40 µl der Eisennanopartikel (Magnetic iron oxide nanoparticles solution # 51238, Sigma, USA) in 360 µl FCS gemischt. Diese Mischung wurde daraufhin in 3,6 ml Medium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde in diesem Versuch ein Sulfate transport system substrate-binding protein (SbpA) verwendet. Das SbpA, auch Surface-Layer genannt, ist ein selbstorganisiertes kristallines Protein der Bakterienzelloberfläche und stellt den äußersten Zellwandbestandteil dar. Es hat die Fähigkeit an Monomere anzubinden und eine Oberflächenschicht zu bilden. Die Oberflächenschicht besitzt dabei aber keine definierte Innen-, oder Außenseite, sondern kann nur anhand der Lokalisation ihrer Oberflächenreste sowohl zytophil (zellanziehend), als auch zytophob (zellabweisend) sein. Im Fall der 3D Modelle machte man sich die zytophobe Eigenschaft zunutze. Dabei beschichtete das SbpA Protein die Oberfläche der Kulturkammern, um ein Auswandern der Zellen aus dem Kollagengel auf die PDMS Oberfläche zu verhindern und eine Adhäsion der Zellen an der Wand der Kulturkammer zu unterbinden. 1 mg/ml der Protein-Lösung wurde in einer 1:10 Verdünnung mit PBS Puffer vermischt. Jedes Well wurde mit 50 µl des Protein-Puffer-Gemisches versehen. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur.

3.9.2 Beladung der 3D Modelle

Zum Beladen der 3D Modelle wurden vier verschiedene Zusammensetzungen verwendet:

Kontrolle (K):

- 800 µl Kollagen
- 120 µl DMEM
- 40 µl NaOH 0,5 N
- 40 µl Zellen (nicht gelabelt). Diese wurden zuvor in 150 µl Medium resuspendiert.

Ungelabelte Zellen + gelabelte Matrix (Matrix=Kollagen) (M):

- 800 µl Kollagen
- 100 µl DMEM
- 40 µl NaOH 0,5 N
- 40 µl Zellen (nicht gelabelt)
- 20 µl SPIO-Lösung

Gelabelte Zellen + ungelabelte Matrix (Z):

- 800 µl Kollagen
- 120 µl DMEM
- 40 µl NaOH 0,5 N
- 40 µl Zellen (gelabelt)

Gelabelte Zellen + gelabelte Matrix (Z+M):

- 800 µl Kollagen
- 100 µl DMEM
- 40 µl NaOH 0,5 N
- 40 µl Zellen (gelabelt)
- 20 µl SPIO-Lösung

Es wurden 80 µl eines jeden Gemisches für je eine Kulturkammer verwendet. Jedes Gemisch füllte später insgesamt vier Kulturkammern (Abb. 17). Nach dem Befüllen der Kulturkammern

wurden die Pins eingesetzt. Des Weiteren wurde bei einer Frequenz von 1 Hz täglich eine Stunde lang ein Magnettraining der Sehnen durchgeführt. Die Magneten (magnets4you GmbH, Deutschland) hatten eine magnetische Flussdichte von 1,32–1,37 T.

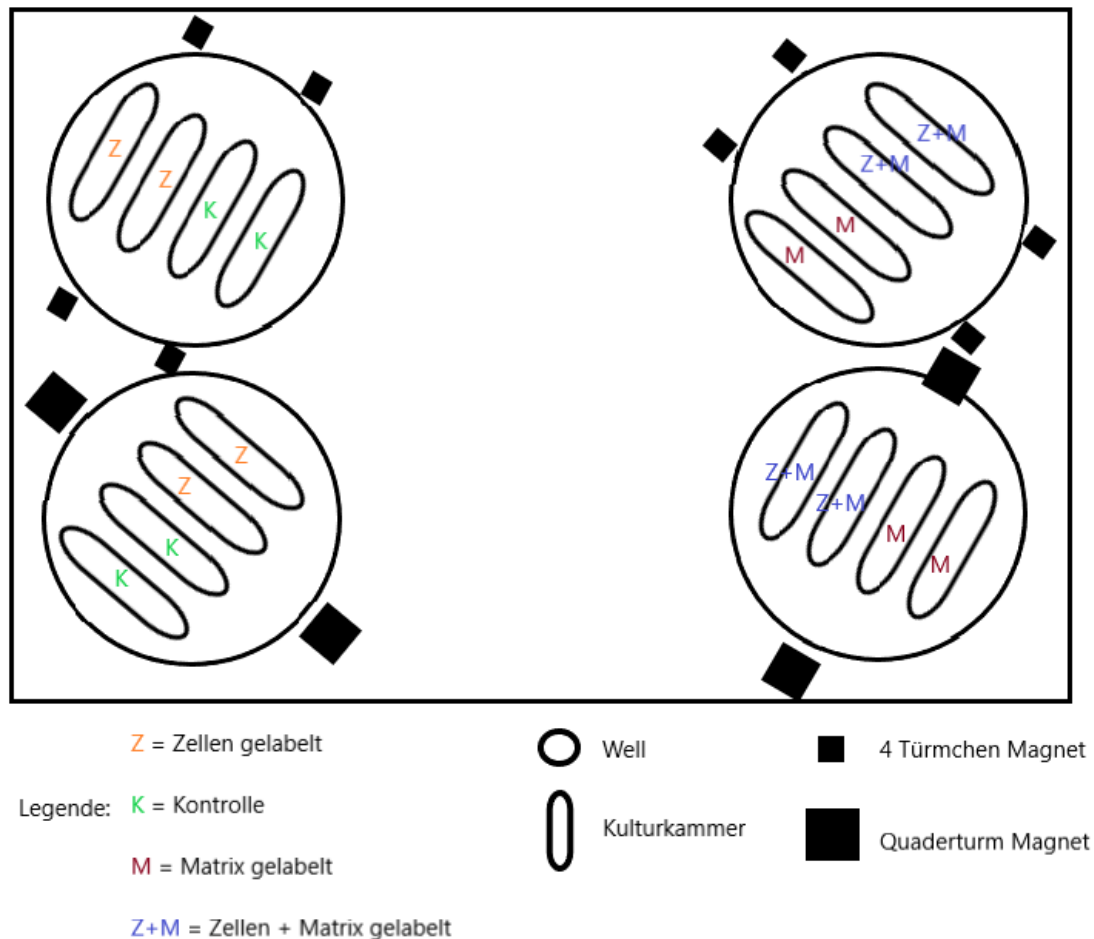


Abb. 17: Versuchsaufbau der schwachen Magnete (4 Türmchen und Quaderturm) des dritten Versuchs

3.10 Vierter Versuch: Vergleich verschiedener Eisennanopartikel Konzentrationen

Im vierten Versuch wurde mit einem anderen Eisennanopartikel-Produkt (fluidMAG UC/C Nr. 4130-1 25mg/ml, chemicell GmbH, Deutschland) gearbeitet. Es wurden unterschiedliche SPIO-Konzentrationen (Tab. 8) zur Bestimmung der optimalen Konzentration getestet. Dabei wurde dieses Mal gänzlich auf die Benutzung von Magneten verzichtet.

3.10.1 Versuchskonzentration für das 3D Modell:

Tab. 8: SPIO-Konzentration und Zellzahl

Konzentration der SPIO	Zellzahl
1. 0,05 mg/ml	500 Zellen/ μ l
2. 0,005 mg/ml	660 Zellen/ μ l
3. 0,0005 mg/ml	800 Zellen/ μ l
4. 0,00005 mg/ml	1000 Zellen/ μ l

3.11 Fünfter Versuch: Vergleich verschiedener Kollagen-Hydrogel Konzentrationen

Versuch fünf konzentrierte sich auf die Verwendung eines neuen Kollagengels (FibriCol Type I Collagen Solution 10 mg/ml bovine, Nr. 5133, Advanced BioMatrix, USA) mit einer höheren Kollagen-Grundkonzentration von 10 mg/ml, welche schlussendlich auf eine Kollagenkonzentration von 5 mg/ml bzw. 6,25 mg/ml verdünnt wurde. Dabei wurden je eine Gruppe der 5 mg/ml und der 6,25 mg/ml Kollagenkonzentration mit SPIO (fluidMAG UC/C Nr. 4130-1 25 mg/ml, chemicell GmbH, Deutschland) versetzt, während die anderen Gruppen der 5 mg/ml und 6,25 mg/ml Kollagenkonzentration keine SPIO erhielten (Abb. 18). Die Herstellung der Versuchsgemische sind in Tab. 9 aufgeführt. Die SPIO Endkonzentration im Gel betrug 1,5 μ g/ml. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt. Nach zwei Wochen wurden die Sehnen-Organoiden geerntet.

3.11.1 Beladung der 3D Modelle

Tab. 9: Anweisung zur Herstellung der Versuchsgemische mit unterschiedlichen Kollagen-Konzentrationen

Beladung	Kollagen Konzentration 5mg/ml	Kollagen Konzentration 6,25 mg/ml
Ohne SPIO	480 μ l Kollagengel 320 μ l Medium normal 20 μ l NaOH 0,5 N (verdünnt in 10fach)	600 μ l Kollagengel 195 μ l Medium normal 25 μ l NaOH 100 μ l 10x DMEM

	konzentriertem Medium) 100 µl 10x DMEM 80 µl Zellsuspension	80 µl Zellsuspension
Mit SPIO	480 µl Kollagengel 300 µl Medium normal 22,5 µl NaOH 0,5 N 100 µl 10x DMEM 80 µl Zellsuspension 20 µl SPIO	600 µl Kollagengel 175 µl Medium normal 27,5 µl NaOH 100 µl 10x DMEM 80 µl Zellsuspension 20 µl SPIO

Die Wells wurden auf folgende Art befüllt:

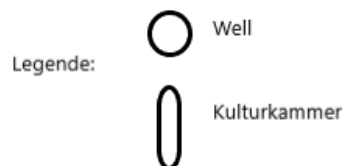
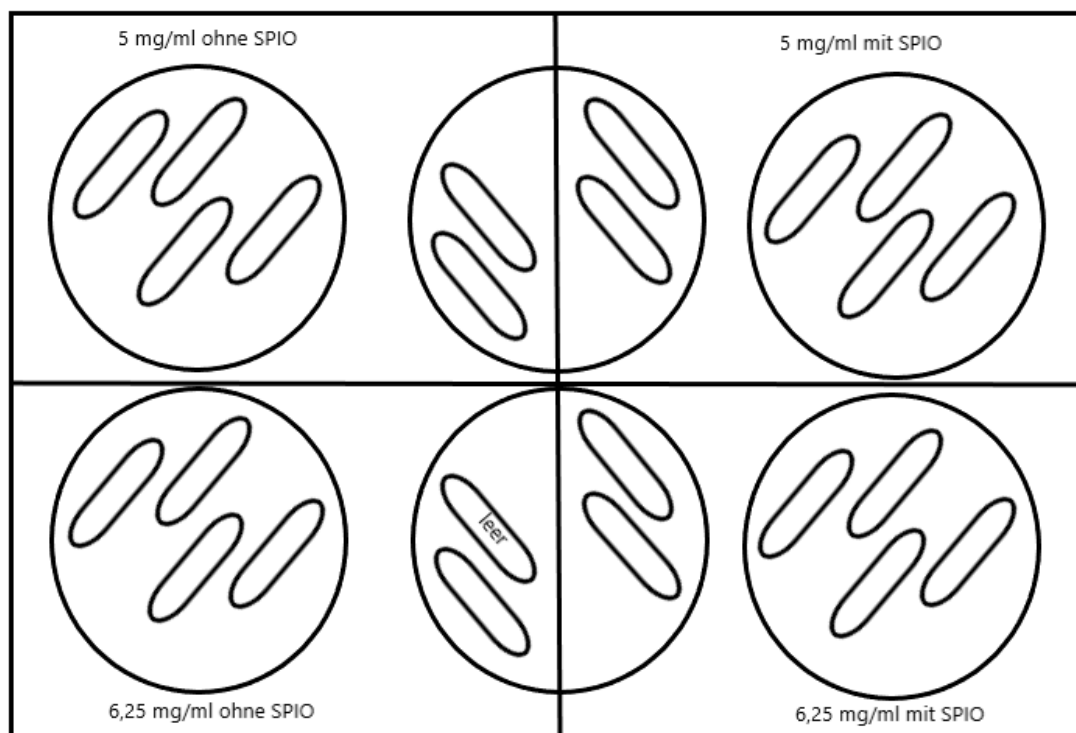


Abb. 18: Versuchsaufbau des fünften Versuchs

3.12 Histologische Bearbeitung

3.12.1 Fixierung der Gewebe und Befüllen der Gewebekassetten

Aus jedem Versuch wurde je Gruppe eine Minisehne für die Histologie verwendet. Für die Fixierung der Minisehnen wurde eine 4 % Formaldehydlösung verwendet. Die Gewebe wurden für mindestens zwölf Stunden in der Fixierlösung belassen. Nach ausreichend langer Fixierung wurden sie in Gewebekassetten überführt und in Paraffin eingebettet.

3.12.2 Gewebeeinbettung

Mit Hilfe eines Tissue-Tek VIP6 Vakuuminfiltrationsautomaten (TISSUE-TEK® VIP® 6 AI Vakuuminfiltrationsautomat, Sakura Finetek, Niederlande) wurden die Gewebe eingebettet. Dabei wurde Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 56 °C verwendet. Folgendes Programm (Tab. 10), wurde für die Einbettung angewandt:

Tab. 10: Arbeitsschritte zur Einbettung von histologischen Geweben

Schritt	Reagenz	Temperatur	Einwirkzeit
1.	70 % Ethanol	40 °C	1 Stunde
2.	80 % Ethanol	40 °C	1 Stunde
3.	96 % Ethanol	40 °C	1 Stunde
4.	96 % Ethanol	40 °C	1 Stunde
5.	100 % Ethanol	40 °C	1 Stunde
6.	100 % Ethanol	40 °C	1 Stunde
7.	Xylol reinst	40 °C	40 Minuten
8.	Xylol reinst	40 °C	40 Minuten
9.	Xylol reinst	40 °C	40 Minuten
10.	Paraffin	60 °C	1 Stunde
11.	Paraffin	60 °C	1 Stunde
12.	Paraffin	60 °C	1 Stunde
13.	Paraffin	60 °C	1 Stunde

3.12.3 Ausgießen von Paraffinblöcken

Die Herstellung der Paraffinblöcke erfolgte mit Hilfe des Sakura Tissue-Tek III (Tissue-Tek® III Uni-Cassette® Einbettkassetten, Sakura Finetek, Niederlande). Zu Beginn wurden die

Einbetterschälchen und die Gewebekassetten in die entsprechenden Aufbewahrungsladen gefüllt. Danach wurden die Gewebekassetten aus der aufgewärmten Aufbewahrungslade entnommen und auf eine warme Arbeitsplatte verbracht. Die Kassette wurde geöffnet und der Deckel verworfen. Anschließend entnahm man aus der entsprechenden Aufbewahrungslade eine Ausgießschale passender Größe und verbrachte diese ebenfalls auf die warme Arbeitsplatte. Das Einbetterschälchen wurde darauffolgend mit Paraffin befüllt. Der Boden stellte bei der späteren Schnittherstellung die Oberseite des Blocks dar, die als erste Schicht geschnitten wurde. Um die Probe auf dem Boden in der richtigen Ausrichtung zu fixieren, wurde diese zunächst mit einer angewärmten Pinzette ausgerichtet und das Einbetterschälchen währenddessen auf eine kleine Abkühlplatte gestellt. Das Paraffin am Boden des Schälchens härtete durch die niedrige Temperatur schneller aus und die Probe wurde fixiert. Anschließend wurde der beschriftete Kassettenboden auf das Einbetterschälchen gesetzt. Das Ausgießschälchen wurde mit Paraffin aufgefüllt, bis der Kassettenboden vollständig befüllt war und zum Aushärten auf eine Kühlplatte gelegt. Nach ausreichender Abkühlung und Aushärtung des Paraffins wurden die Blöcke aus den Ausgießschälchen gehoben.

3.12.4 Schnittherstellung

Vor dem Schneiden wurden die Paraffinblöcke bei einer Temperatur von 4 °C im Kühlschrank gelagert und unmittelbar vor dem Schneiden noch einmal fünfzehn Minuten auf einer Kühlplatte (Kühlplatte COP30, Medite, Schweiz) mit einer Temperatureinstellung von -9 °C herunter gekühlt, um sie leichter schneidbar zu machen. Danach erfolgte die Schnittanfertigung mit dem Mikrotom (Microm HM355S, Thermo Scientific, USA) auf eine Schnittdicke von 2–3 µm. Die fertigen Schnitte wurden mit Hilfe eines befeuchteten Pinsels in ein mit 35–42 °C warmes WEK-Wasser gefülltes Wasserbad (slidetec WATER, Slee medical, Deutschland) überführt, um sie zu glätten. Das Glätten wurde unter Sichtkontrolle durchgeführt und nahm, je nach Gewebetyp, zwischen einer bis zehn Minuten in Anspruch. Im Anschluss wurden die Schnitte auf die Objektträger aufgezogen und über Nacht im Trocknungsschrank bei einer Temperatur von 37–45 °C getrocknet. Die Präparate konnten nun histologisch untersucht werden.

3.12.5 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Mit dem Hämatoxylin Farbstoff wurden die basophilen Zellkerne blau/violett angefärbt, während der Eosin Farbstoff das eosinophile Zytoplasma, Bindegewebsfasern, Kollagenfasern und Granula rötlich anfärbte.

Folgende Arbeitsschritte wurden zum Anfärben der Präparate durchgeführt:

- Schritt 1+2: Der Objektträger wurde zweimal nacheinander für fünf Minuten in das Reagenz Xylol getaucht.
- Schritt 3+4: Der Objektträger wurde zweimal nacheinander für zwei Minuten in 100 % Ethanol (EtOH) getaucht.
- Schritt 5+6: Danach erfolgte das Eintauchen des Objektträgers für zwei Minuten in 96 % EtOH und darauffolgend für zwei Minuten in 70 % EtOH.
- Schritt 7: Der Objektträger wurde für zwei Minuten in WEK-Wasser getaucht.
- Schritt 8: Anschließend tauchte man den Objektträger in die Hämatoxylin Färbelösung, wo sich das Präparat für vier bis sechs Minuten anfärbte.
- Schritt 9: Der Objektträgerhalter wurde in eine Küvette überführt und es wurde drei bis viermal eine kurze Schüttspülung mit WEK-Wasser durchgeführt.
- Schritt 10: Das Präparat wurde unter fließendem Leitungswasser für zehn Minuten abgespült. Dabei galt es zu beachten, dass der Wasserstrahl nicht direkt auf den Objektträger auftraf. Wahlweise konnte man auch den Objektträgerhalter in eine mit Leitungswasser gefüllte Küvette einbringen und das Wasser alle fünf Minuten austauschen.
- Schritt 11: Im nächsten Schritt wurde der Objektträger in die Eosin Färbelösung gegeben und für fünf Minuten angefärbt.
- Schritt 12: Darauf folgte ein Abspülen des Objektträgers mit WEK-Wasser. Das Präparat wurde nur kurz zwei bis dreimal abgespült.
- Schritt 13: Für zwei Minuten wurde der Objektträger in 96 % EtOH gebadet.
- Schritt 14+15: Der Objektträger wurde zweimal nacheinander für zwei Minuten in 100 % EtOH getaucht.
- Schritt 16+17: Zu guter Letzt wurde das Präparat noch zweimal nacheinander für zwei Minuten in das Reagenz Xylol getaucht.

Für das Eindecken der histologischen Schnitte mit einem Deckglas wurde das nicht-wässrige Eindeckmedium distyrene, plasticizer, xylene (DPX) (DPX Neu, Sigma Aldrich, USA) verwendet. Anschließend wurde das Präparat fixiert.

3.12.6 Berliner Blau Färbung

Für den histochemischen Nachweis der Eisen-III-Ionen, die durch die Anreicherung mit SPIO in die Sehnervenzellen gelangten, bediente man sich der Berliner Blau Färbemethode. Durch die Anwendung dieser Spezialfärbemethode wurden die Eisen-III-Ionen als blaue Körnchen oder Schollen sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung mit Kernechtrot färbte die Zellkerne rötlich und das Zytoplasma hell rötlich ein.

Folgende Arbeitsschritte wurden zum Anfärben der Präparate durchgeführt:

- Schritt 1+2: Der Objektträger wurde zweimal nacheinander für fünf Minuten in das Reagenz Xylol getaucht.
- Schritt 3+4+5+6: Der Objektträger wurde in eine absteigende Alkoholreihe überführt. Nacheinander wurde er für jeweils zwei Minuten in 96 % EtOH, danach 80 %, 70 % und 60 % EtOH getaucht.
- Schritt 7: Es wurde eine Waschung mit WEK-Wasser für zwei Minuten durchgeführt.
- Schritt 8: Der Objektträger wurde fünf Minuten lang in 10 % wässriger Lösung von Kaliumferrozyanid eingelegt.
- Schritt 9: Danach stellte man den Objektträger 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur in eine Mischung aus gleichen Teilen 20 % HCL und 10 % Kaliumferrozyanidlösung. Das Reagenz wurde erst unmittelbar vor Gebrauch gemischt.
- Schritt 10: Es erfolgte ein dreimaliges Auswaschen des Objektträgers mit WEK-Wasser.
- Schritt 11: Danach wurde für fünf Minuten eine Gegenfärbung mit Kernechtrot durchgeführt.
- Schritt 12: Es folgte ein dreimaliges Auswaschen des Objektträgers mit WEK-Wasser.
- Schritt 13+14+15: Der Objektträger wurde nun in eine aufsteigende Alkoholreihe überführt. Dabei wurde er nacheinander für jeweils zwei Minuten zunächst in 70 % EtOH und danach zweimal in 96 % EtOH getaucht.
- Schritt 16+17: Zum Schluss wurde der Objektträger zweimal hintereinander für jeweils fünf Minuten in Xylol getaucht.

Für das Eindecken wurde das nicht-wässrige Eindeckmedium DPX (DPX Neu, Sigma Aldrich, USA) verwendet. Abschließend wurde das Präparat mit einem Deckglas abgedeckt und fixiert.

3.13 RNA Extraktion

Das Sehnen-Organoid wurde zunächst bei -80 °C tiefgekühlt. Danach wurden 10 mg des gefrorenen Sehnen-Organoids in eine Vertiefung eines Biopulverizers (BioPulverizer, Biospec, USA) gegeben, der zuvor eine Minute lang in flüssigem Stickstoff heruntergekühlt wurde. Das in der Vertiefung befindliche Sehnen-Organoid wurde mit einem passenden Kolben zerkleinert. Dabei wurde dem spröden Gewebe mit dem Kolben ein Schlag versetzt und das Gewebe dadurch zu Pulver reduziert. Das Gewebepulver wurde im Anschluss in ein Eppendorf Gefäß überführt. Zu den 10 mg Gewebepulver wurden 500 µl PureZOL™ (PureZOL™ RNA Isolation Reagent, Bio Rad, USA) hinzugegeben, die Mischung für fünf Minuten gevortext und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 18.000 relative centrifugal force (rcf) für zehn Minuten bei einer Temperatur von 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß pipettiert, mit 100 µl Chloroform (Chloroform, Sigma Aldrich, USA) vermischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für fünfzehn Minuten mit 18.000 rcf bei einer Temperatur von 4 °C bildeten sich drei Phasen, eine obere, die RNA enthaltende wässrige Phase, gefolgt von einer mittleren, die DNA enthaltende Interphase und einer unteren organischen Phase, bestehend aus Proteinen und Lipiden. Die obere wässrige Phase wurde abpipettiert, in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und mit 250 µl Isopropylalkohol (Isopropyl alcohol, Sigma Aldrich, USA) sowie Glycerin (Thermo Scientific, USA) vermengt. Nach weiteren zwanzig Minuten Inkubation auf Eis und einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 Minuten bei 18.000 rcf bei 4 °C) wurde ein weißes, RNA Pellet, am Boden des Eppendorf Gefäßes sichtbar. Nach dekantieren des Überstandes wurde das RNA-Pellet anschließend mit 500 µl 75 % EtOH zentrifugiert und in 45 µl 0,1 % RNase freiem Wasser solubilisiert. Die Verdauung eventueller Rückstände genomischer DNA wurde laut Anleitung mit dem Ambion™ DNA-free™ DNA-Entfernungskit (Ambion® DNA-free™ Kit, Lifetechnologies, USA) 30 Minuten lang bei 37 °C durchgeführt.

3.14 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Für die qPCR wurden Sehnen Organoide der 3D Modelle aus Versuch 5 mit unterschiedlicher Kollagenkonzentration und SPIO Beladung verwendet wobei jeweils ein Organoid pro Ansatz analysiert wurde (n=1 pro Kollagen- bzw. SPIO-Konzentration). Alle Primer außer Scleraxis (Scx) und COMP wurden mit der Primer3-Software entworfen. Zur Analyse der Spezifität der Primer wurde das National Center for Biotechnology Information Primer Blast Tool und das In-Silico polymerase chain reaction Tool zusammen mit dem University of California, Santa Cruz Genombrowser verwendet. Das Primerdesign für Scx und COMP wurde nach den Vorgaben von Taylor et al. 2009 ausgesucht. Die Primersequenzen, die Produktlänge und die Zyklen sind in Tab. 11 aufgeführt. Von jeder Probe wurden 25 ng RNA für die qPCR Reaktion verwendet. Für die PCR-Reaktion, die complementary DNA (cDNA)-Synthese und anschließend für die qPCR-Reaktion wurde der RevTrans-QPCR One-Step EvaGreen-Kit (RevTrans QPCR One-Step EvaGreen® Rox, Bio&Sell, Deutschland) unter strikter Einhaltung der Gebrauchsanweisung verwendet.

Zur Erzeugung der cDNA wurde folgender Schritt durchgeführt:

Schritt 1: Reverse Transkription: Inkubation des RNA/Primer/Enzym-Reaktionsgemisches für fünfzehn Minuten bei 50 °C.

Anschließend wurden folgende Schritte für die qPCR Reaktion durchgeführt:

Schritt 2: Initiale Denaturierung: Inkubation des Reaktionsgemisches für fünf Minuten bei 95 °C.

Schritt 3: Denaturierung: Inkubation des Reaktionsgemisches für fünfzehn Sekunden bei 95 °C. Anzahl der Zyklen 35–45.

Schritt 4: Annealing: Inkubation des Reaktionsgemisches für zwanzig Sekunden bei 55 °C. Zwischen 35 und 45 Zykluswiederholungen.

Schritt 5: Elongation: Inkubation des Reaktionsgemisches für 30 Sekunden bei 72 °C. Anzahl der Zykluswiederholungen 35–45.

Des Weiteren wurde für jedes Gen eine Reaktionsmischung ohne RNA Probe als Negativkontrolle hinzugezogen. Zur Analyse der Transkriptdaten wurde die Agilent AriaMx 1.1 Software (Agilent Technologies, USA) verwendet. Die Transkriptionsebene für die Gene von Interesse wurden auf die Transkriptionsebene von glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (GAPDH) normalisiert und als relative Transkription zu GAPDH dargestellt. Aufgrund der Tatsache, dass es sich um eine Machbarkeitsstudie handelt bei der die Stichprobengröße für die qPCR n=1 pro Ansatz betrug, konnte keine statistische Auswertung vorgenommen werden. Die Ergebnisse der qPCR Analyse wurden zum Teil mit jenen der “tendon on a chip“ Modelle von Mag. med. vet. Lisa Julie Zeiger verglichen.

Tab. 11: Verwendete Primersequenzen, Produktlänge und Zyklen der qPCR

Gen- Bezeichnung	Vorwärts Primer Sequenzen	Rückwärts Primer Sequenzen	PCR Zyklen
Kollagen Typ 1, alpha 2 (Col1a2)	TCCATCTGGAGAGCCTGG TA	CACCTGGTAGACCACGTT CA	40
(Kollagen Typ 2, alpha 1 (Col2a1)	TGGAGCTCCTGGACTGAT AG	CCATTCTTACCAGGCTCA CC	40
Tenascin C (Tnc)	ACCTCAGAGAAGGGCAGA CA	CACCGTGAGGTTTTCCAG TT	40
Decorin (Dcn)	ACATAACCACCATCCCTC CA	CTCAGGCTAGCTGCATCA AC	40
Tenomodulin (Tnmd)	CGCCAGACAAGCAAGTGA AG	CATCCAGCATGGGGTCAA AT	40
Versican (Vcan)	GTGTGGGCCATGACTATC AG	TCTCATATTGCAGGGTGC TG	40
Scleraxis (Scx)	TCTGCCTCAGCAACCAGA GA	TCCGAATCGCCGTCTTTC	40
COMP	GGTGCGGCTGCTATGGAA	CCAGCTCAGGGCCCTCAT	40
Interleukin 6 (IL 6)	ATGGCAGAAAAAGACGGA TG	GGGTCAGGGGTGGTTACT TC	40
Glyceraldehyde- 3-Phosphate Dehydrogenase (Gapdh)	GTTTGTGATGGGCGTGAA C	GATGCCAAAGTGGTCATG G	40

Gen- Bezeichnung	Vorwärts Primer Sequenzen	Rückwärts Primer Sequenzen	PCR Zyklen
Matrix- Metalloproteinase-1 (MMP1)	CAGTGCCTTCAGAAACAC GA	GCTTCCCAGTCACTTTCA GC	40
Matrix- Metalloproteinase-13(MMP13)	TGGTCCAGGAGATGAAGA CC	GATGGCATCAAGGGATAA GG	40

4 Ergebnisse

Die Fragestellung, ob Sehnenkonstrukte mit sehnenähnlicher Morphologie *in vitro* hergestellt werden können, konnte in der hier vorgestellten Machbarkeitsstudie mit ja beantwortet werden.

4.1 Sehnenentnahme und Anzucht im Labor

Das Ziel der Entnahme der Pferdesehne war die Anzucht von Sehnenzellen *in vitro*. Die Anzucht der Sehnenzellen gelang ausnahmslos nach jeder Entnahme. Ein Mediumwechsel, der alle zwei Tage stattfand, schuf angemessene Wachstums- und Nährstoffbedingungen für die Zellen.

4.2 3D Modell-Design

Das 3D Modell, welches einem pragmatischen und zweckmäßigen Design entsprach, wurde als Vorstufe für ein "tendon on a chip" Modell entwickelt, welches ausführlich in der Diplomarbeit „Pferdesehnen als organ on a chip model“ - Die Übertragung eines 3D *in vitro* Sehnenmodells auf einen Mikrochip zur Etablierung neuer Methoden für Forschung und Medikamentenscreenings“ von Mag. med. vet. Lisa Julie Zeiger thematisiert wird.

Das PDMS-Gel erwies sich als zellverträglich und eignete sich optimal zur Herstellung der Kulturkammern. In den ersten Versuchen wurde das 3D Modell mit zwei bis drei Kulturkammern pro Well ausgestattet. Die ersten Kulturkammern wurden mit Hilfe einer Biopsie-Stanze in das PDMS-Gel gestanzt. Diese Kulturkammern hatten aber den Nachteil, dass sie nicht regelmäßig oval geformt waren, sondern „Gelspitzen“ in die Kulturkammern hineinragten. Dies stellte zwar keine Probleme beim Befüllen der Kammern dar, ließ die Kulturkammern aber deutlich kleiner ausfallen, als die späteren Kulturkammern, die mit Hilfe der Silikonformen hergestellt wurden. Teilweise berührten die Minisehnen die „Gelspitzen“ wie in Abb. 19a (schwarze Pfeile) ersichtlich wird. Dies provozierte unter Umständen ein Ablösen der Minisehnen im weiteren Verlauf. Um eine Kontaktstelle zwischen Minisehne und PDMS-Gel zu verhindern, wurde in späteren Modellen eine vorher designte Silikonausgussform verwendet. Sie erleichterte zum einen die Produktion der PDMS-Inlays, zum anderen schuf sie eine regelmäßig geformte ovale Kulturkammer, die ein ungestörtes Wachstum der Sehnen ermöglichte (Abb. 19b). Mit den gegossenen PDMS-Inlays war außerdem eine doppelagige Schichtung der Gele, bei welcher eine Gellage ohne Ausstanzungen als Boden für die

Kulturkammern funktionierte nicht mehr notwendig, da sie als Ganzes direkt im Well platziert und fixiert werden konnten, wodurch eine bessere Stabilität erzielt wurde. Außerdem konnte auf eine Verbindung der zwei PDMS Lagen mittels Pins, wie es bei der doppelagigen Schichtung der Fall war, verzichtet werden. Um eine statische Zugspannung der Sehnen-Organoiden zu erzielen, wurden in jede Kulturkammer zwei Pins eingesetzt, welche die beiden Enden der Sehnen-Organoiden fixierten, wodurch sich diese an deren Zugrichtung orientieren konnten. In den ersten Versuchen wurden die Pins noch vor dem Befüllen der Kulturkammern mit Zellsuspension eingesetzt. Infolgedessen war aber eine homogene Verteilung der Zellsuspension

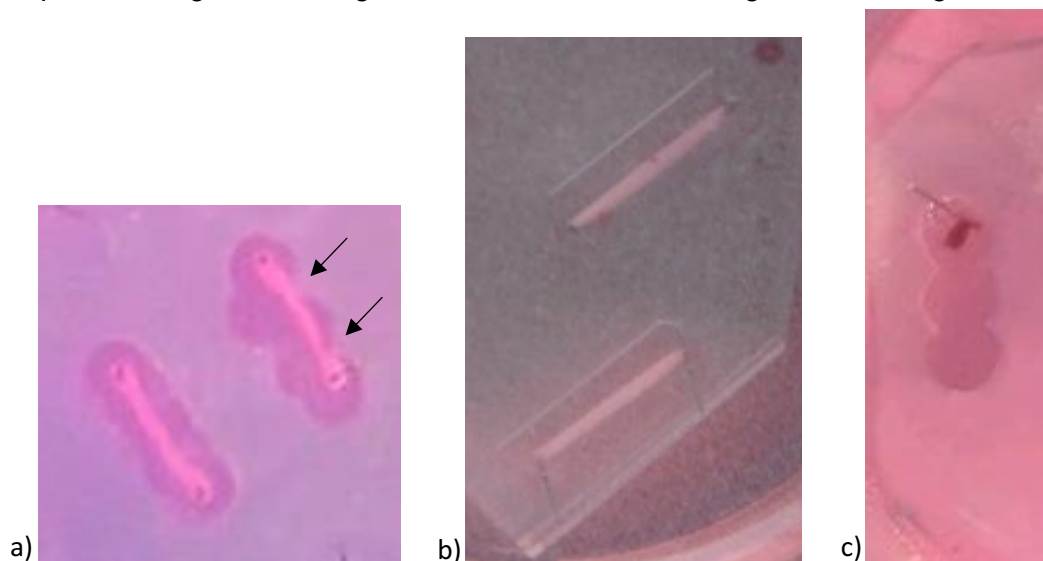


Abb. 19: a) Durch das Ausstanzen entstandene Gelspitzen im PDMS Gel (schwarze Pfeile), b) PDMS-Inlays, entstanden aus den Silikonabgussformen mit ovaler Kulturkammer, c) Losgelöste Minisehne

in der Kulturkammer nicht mehr realisierbar. Später bediente man sich der Methode die Pins erst nach dem Befüllen der Kulturkammern einzusetzen, was eine homogene Zellverteilung ermöglichte. Ein Lösen der chirurgischen Pins wurde nicht beobachtet, da sie durch die Fixierung im PDMS-Gel ein stabiles Widerlager hatten. Allerdings konnte ein unerwünschtes Lösen der Sehne von den chirurgischen Pins regelmäßig (ca 1/4 der Sehnen) beobachtet werden (Abb. 19c). Der Mediumwechsel konnte problemlos durchgeführt werden.

4.3 Toxizitätstest der Eisennanopartikel auf die Zellen (TOX-8)

Für die Testung der Toxizität der Eisennanopartikel auf die Zellen wurde zu Beginn der Versuchsreihen eine 2D Kultur angelegt, an der man den Toxizitätsnachweis durchführte. Dies hatte den Sinn, dass schon vor Beginn der Folgeversuche feststand, ob die SPIO (un)giftig für die Zellen waren. Die Auswertung, ob die Eisennanopartikel toxisch für die Zellen waren,

wurde fluorometrisch bestimmt. Dabei bediente man sich eines TOX-8 Assays, welcher mit dem Vitalfarbstoff Resazurin arbeitet. Werden die Zellen mit zytotoxischen Stoffen konfrontiert, senkt sich die metabolische Aktivität und das Redoxpotenzial der Zellen. Dadurch wird die Reduktion des Resazurin verlangsamt oder sogar beendet und eine Fluoreszenz bleibt aus. Zur Beurteilung der Toxizität wurden die dimensionslosen Werte (AU=arbitrary units) der Fluorescence Intensity der Kontrollen mit den SPIO-beschickten Zellen verglichen.

Folgendes Säulendiagramm (Abb. 20) zeigt, dass die SPIO keinen toxischen Einfluss auf die Zellen ausübten, da die Fluoreszenz-Intensität sowohl bei den Kontrollen, als auch bei den mit SPIO beladenen Zellen, eine Höhe zwischen 3.000 und 4.500 Fluorescence Intensity aufwiesen, was auf eine hohe metabolische Aktivität hinweist. Getestet wurden die Kulturen nach einem Tag, nach sieben Tagen und nach neunzehntägiger Kultivierung.

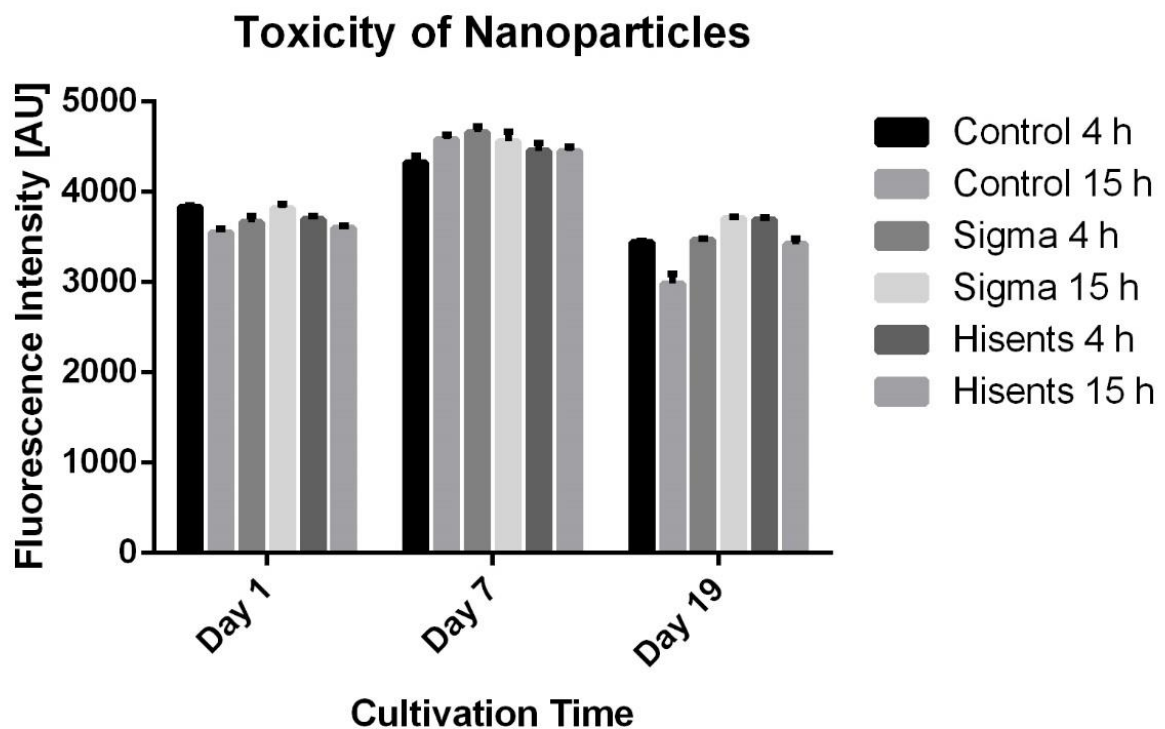


Abb. 20: Toxizitätstestung der Eisennanopartikel auf die Zellen nach einer Kultivierungsdauer von einem, sieben und neunzehn Tagen

4.4 Erster Versuch: Pilotstudie

4.4.1 3D+Pin+Magnet

Dreizehn Tage nach dem Beladen der Kulturkammern wurde der Versuch beendet und eine Bestandsaufnahme der Ergebnisse durchgeführt. Bei näherer Betrachtung fiel auf, dass eine Sehne der Kontrolle (ohne SPIO) sich vom Pin gelöst hatte (Abb. 21a). Zwei intakte Sehnen konnten bei den Zellen, die mit SPIO versetzt waren, beobachtet werden (Abb. 21b). Eine weitere intakte Sehne konnte der Kontrolle (ohne SPIO) zugeordnet werden.

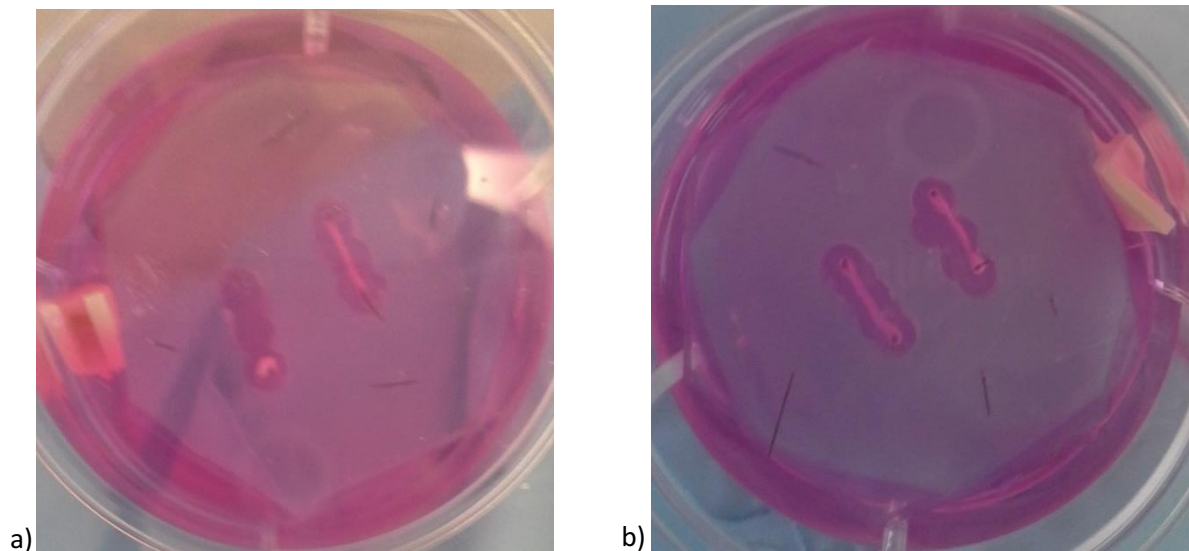


Abb. 21: Versuchsgruppe 3D+Pin+Magnet a) ohne SPIO, b) mit SPIO

4.4.2 3D+Pin

Die Versuchskombination 3D+Pin mit einer Konzentration von 420 Zellen/ μ l mit SPIO versetzt, zeigte bei der Auswertung dreizehn Tage nach dem Beladen der Kulturkammern, dass die Sehnen intakt waren (Abb. 22a, schwarze Pfeile). Bei der höheren Konzentration von 840 Zellen/ μ l inklusive SPIO Beladung, hatten sich zum selben Zeitpunkt beide Sehnen von den Pins gelöst (Abb. 22b, schwarze Pfeile).

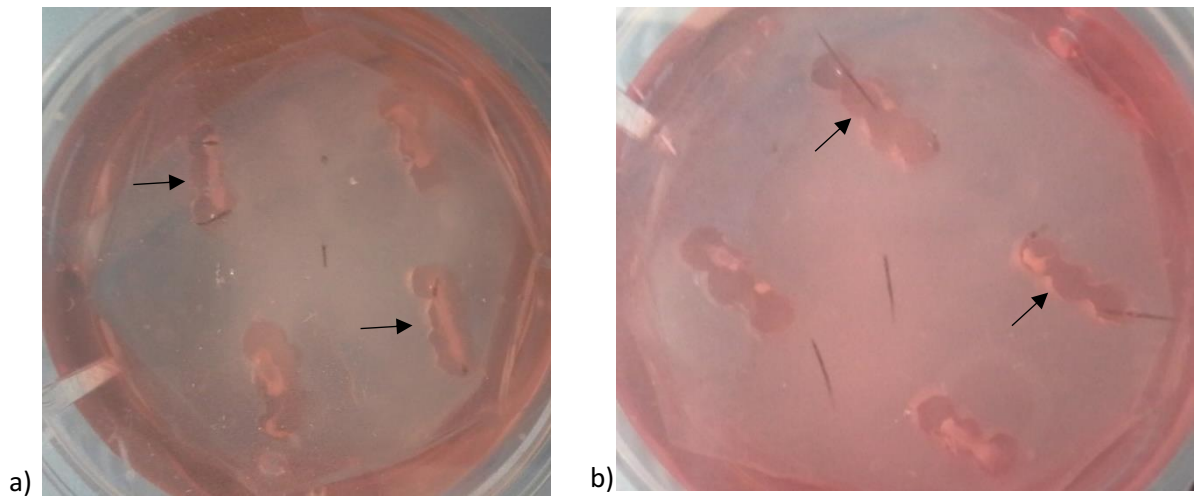


Abb. 22: Versuchsgruppe 3D+Pin a) 420 Zellen/ μ l mit SPIO+Pin (schwarze Pfeile), b) 840 Zellen/ μ l mit SPIO+Pin (schwarze Pfeile)

Bei der 3D+Pin Gruppe mit der Konzentration 420 Zellen/ μ l ohne SPIO fiel auf, dass beim Beladen ein Fehler unterlaufen war. Planmäßig sollten für diese Gruppe vier Kulturkammern beladen werden. Stattdessen wurden nur zwei Kulturkammern beladen. Die Sehnen zeigten kein gerichtetes Wachstum, sondern hatten sich von den Pins gelöst und blieben als klumpenähnliche Strukturen zurück (Abb. 23a). Bei der Sehnen Gruppe mit der Konzentration 840 Zellen/ μ l ohne SPIO mit Pinfixierung hatte sich eine Sehne vom Pin gelöst, die andere Sehne war vollkommen intakt und zeigte ein uniaxiales Wachstum zwischen den Pins (Abb. 23b, schwarze Pfeile).

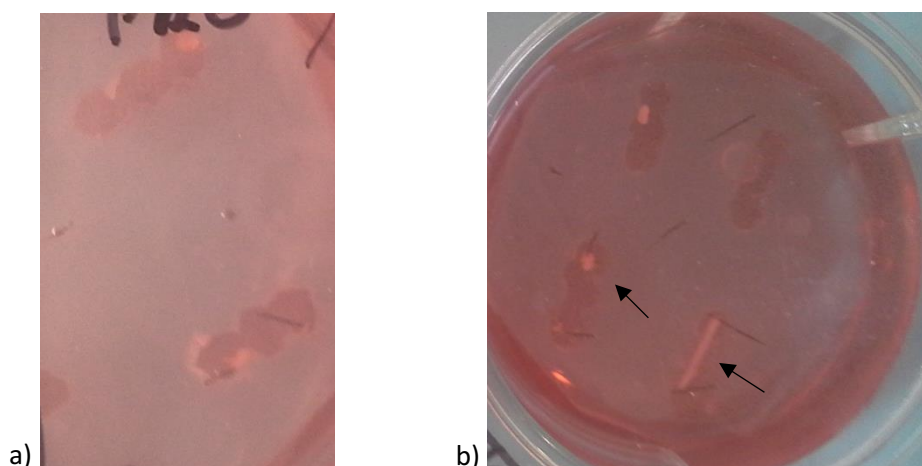


Abb. 23: Versuchsgruppe 3D+Pin a) 420 Zellen/ μ l ohne SPIO, b) 840 Zellen/ μ l ohne SPIO (schwarze Pfeile)

4.5 Zweiter Versuch: Vergleich zweier unterschiedlicher Eisennanopartikel-Präparate

Da das verwendete Material nicht den Anforderungen entsprach (Sehnen ausgerissen vor Erreichen des Endes der Kultivierungsperiode) konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

4.6 Dritter Versuch: Dynamischer Zug mittels Eisennanopartikeln und Magneten

4.6.1 Starker Magnet

Bereits sieben Tage nach dem Beladen der Kulturkammern wurden in der mit Eisennanopartikeln versetzten Zellen-und-Matrix (Z+M) Gruppe und in der mit Eisennanopartikeln versetzten Matrix (M) Gruppe sehnenähnliche Organoidstrukturen sichtbar. Sie zeigten ein uniaxiales Wachstum zwischen den Pins und waren bereits teilweise zu einem Sehnen-Organoid organisiert. Ihre dunkle Färbung war auf die sich in der Matrix bzw. in den Zellen und der Matrix befindlichen Eisennanopartikeln zurückzuführen. In der mit SPIO versetzten Zellen (Z) Gruppe waren ebenfalls sehnenähnliche Organoidstrukturen erkennbar. Im Vergleich zu den zwei vorher beschriebenen Gruppen waren sie jedoch noch ungenügend organisiert und zu wenig verdichtet. Die Kontroll (K) Gruppe wies keinerlei sehnenähnliche Organoidstruktur auf. Zwölf Tage nach dem Beschicken der Wells wurde der Versuch mit der Versuchsgruppe „starke Magneten“ beendet. Bei der Auswertung der Ergebnisse war auffällig, dass sowohl beide Sehnen der Z+M Gruppe, als auch die beiden Sehnen der Z Gruppe intakt waren (Abb. 24 a+b). Die Z Gruppe hatte auch eine sehnenähnliche Organoidstruktur

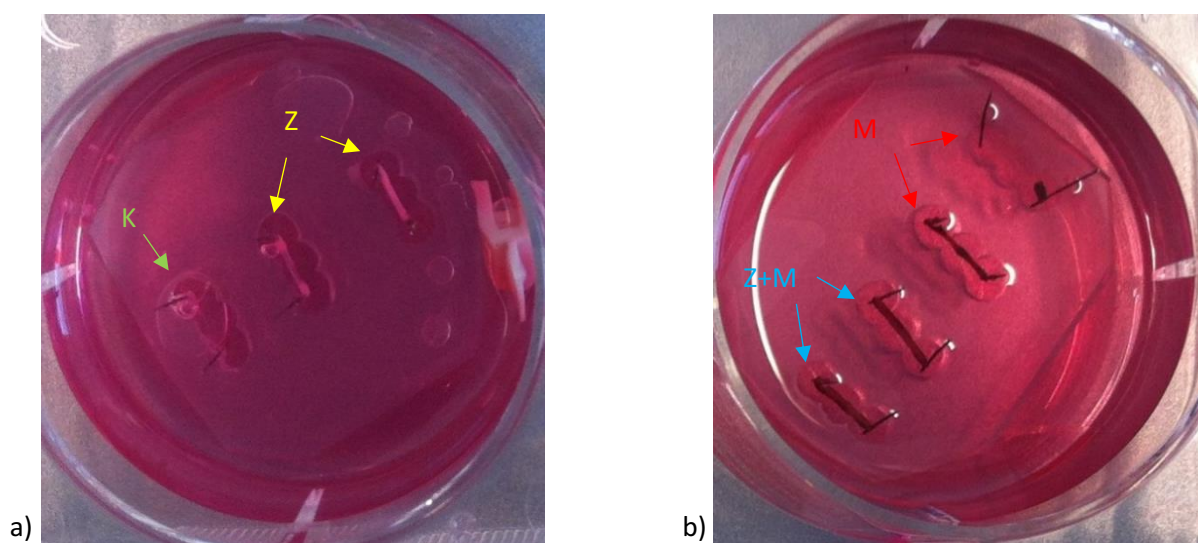


Abb. 24: Versuchsgruppe starker Magnet. a) K, Z Gruppe, b) Z+M, M Gruppe

ausgebildet (Abb. 24a, gelbe Pfeile). Alle vier Sehnen der beiden Gruppen zeigten eine ausgeprägte Ausrichtung entlang

der Zugspannung zwischen den Pins. Die M Gruppe wies eine intakte Sehne und eine vom Pin abgelöste Sehne auf (Abb. 24b, rote Pfeile). In der K Gruppe, bei der weder die Zellen, noch die Matrix mit SPIO gelabelt waren, wurden keine sehnenähnlichen Strukturen sichtbar.

4.6.2 Schwacher Magnet-Quaderturm

Die Z Gruppe zeigte nach fünf Tagen eine Tendenz, sich zu einer sehnenähnlichen Mikrostruktur zusammen zu ziehen und wies an Tag zwölf optisch eine hohe Dehnung auf. Beide Sehnen blieben bis Tag zwölf intakt. Ihre Färbung war hellbeige. Auffällig war, dass bei beiden Sehnen Luftblasen an jeweils einem Pin angelagert waren, was die Sehnen jedoch nicht in ihrem Wachstum beeinträchtigte (Abb 25 a, weiße Pfeile). In der K Gruppe konnte weder zu Beginn noch am Ende des Versuchs ein Sehnen-Organoid festgestellt werden (Abb. 25a, grüne Pfeile). In der Verlaufskontrolle der Z+M Gruppe wurde festgestellt, dass bereits ab Tag fünf nach dem Bestücken der Wells teilweise ein gerichtetes Gewebewachstum zwischen den Pins stattfand. Bis zum Tag sieben nach dem Beladen der Wells verdichtete sich das Gewebe stetig und es konnte eine sehnenähnliche Struktur identifiziert werden. In der Zeitspanne von Tag sieben bis Tag zwölf machte sich die statische (durch die Pins) und die dynamische Zugspannung (trainiert durch den Magnet-Quaderturm) bemerkbar und es konnte ein „Stretching“ der Sehnen beobachtet werden. Bis zum Ende des Versuchs, der mit Tag zwölf nach dem Beladen beendet wurde, blieben beide Sehnen intakt (Abb. 25b, blaue Pfeile). Dieselben Ergebnisse konnten auch für die M Gruppe ermittelt werden (Abb. 25b, rote Pfeile).

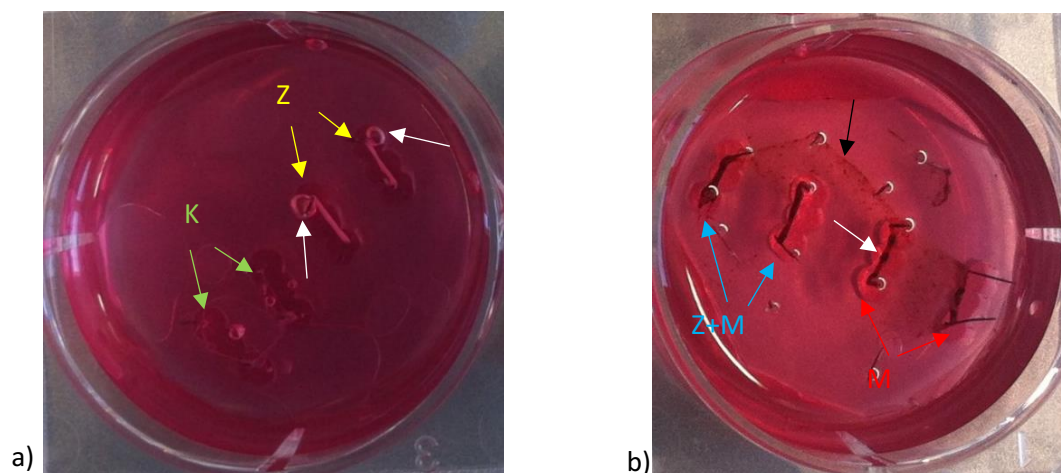


Abb. 25: Versuchsgruppe schwacher Magnet „Quaderturm“. a) K, Z Gruppe, b) Z+M, M Gruppe

Pfeile). Bei makroskopischer Betrachtung der M Gruppe konnten perlschnurartige Ansammlungen von Eisennanopartikeln in der Sehnenmatrix festgestellt werden (Abb 25b, weißer Pfeil). Des Weiteren konnten lokal konzentrierte Ansammlungen dunkler Punkte im Medium ermittelt werden, die wahrscheinlich auf ein Ausschwemmen der Eisennanopartikel aus den Kulturkammern in das Medium zurückzuführen waren (Abb 25b, schwarzer Pfeil).

4.6.3 Schwacher Magnet-4 Türmchen

Die Z Gruppe enthielt bei der Ernte zwei intakte Sehnen. Diese zeigten eine deutlich hellere Färbung, da nur die Zellen mit SPIO gelabelt waren. Eine dunkle Färbung wurde vermutlich aufgrund der zu geringen Eisennanopartikel Konzentration nicht erzielt. Die K Gruppe bildete keine Sehnen aus (Abb. 26a). Bei der Auswertung des Wachstumsverhaltens der M Gruppe, war zu erkennen, dass das Sehnen-Organoid bereits am Tag fünf eine sehr starke Ausrichtung zwischen den Pins erreicht hatte. In der Z+M Gruppe wurde dieses Phänomen erst ab Tag sieben beobachtet. Die statische und dynamische Zugspannung verhalf allen vier Sehnen bis zum Ende des Versuchs zu einer uniaxialen Ausrichtung. Die Sehnen blieben bis zum Zeitpunkt der Ernte intakt. Auffällig bei der Z+M Gruppe war jedoch die ungleichmäßige, scheckige Färbung der Sehnen (Abb. 26b, weißer Pfeil), die vermutlich eine Folge der inhomogenen Verteilung der Eisennanopartikel war.

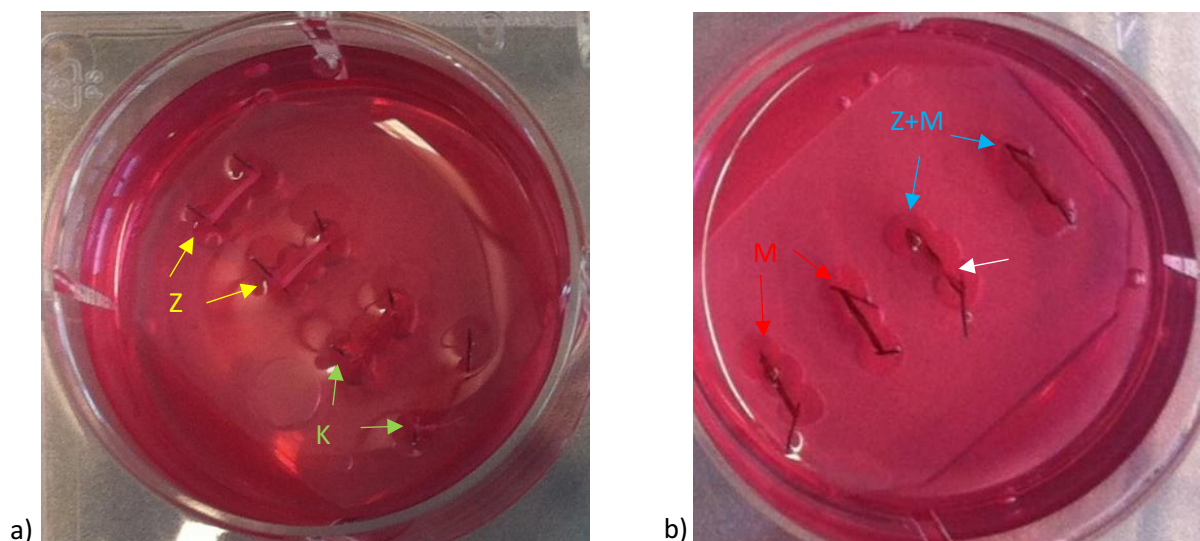


Abb. 26: Versuchsgruppe schwacher Magnet „4 Türmchen“, a) K, Z Gruppe, b) Z+M, M Gruppe

4.7 Vierter Versuch: Vergleich verschiedener Eisennanopartikel Konzentrationen

Der Vierte Versuch wurde ausschließlich histologisch ausgewertet und wird demzufolge im Ergebnisteil unter der Rubrik histologische Untersuchung besprochen.

4.8 Fünfter Versuch: Vergleich verschiedener Kollagen-Hydrogel Konzentrationen

4.8.1 5 mg/μl ohne SPIO

Die Versuchsgruppe mit einer Kollagenkonzentration von 5 mg/μl ohne SPIO Beladung zeigte bereits am Tag sieben nach dem Bestücken der Wells, eine abgerissene Sehne. Die Sehne hatte offensichtlich der statischen Zugspannung durch die Pins nicht standgehalten. Die restlichen fünf Sehnen waren unversehrt. Eine weitere Sehne riss zwölf Tage nach dem Beladen (Abb. 27). Zum Zeitpunkt der Ernte, am Tag vierzehn nach dem Beladen der Wells, konnten vier intakte Sehnen geerntet werden.

4.8.2 5 mg/μl mit SPIO

Die Versuchsgruppe mit einer Kollagenkonzentration von 5 mg/μl mit SPIO versetzt, wies den gesamten Versuch über sechs intakte Sehnen auf, die am Tag vierzehn nach Versuchsende erfolgreich geerntet werden konnten.

4.8.3 6,25 mg/μl ohne SPIO

Für die Versuchsgruppe mit einer Kollagenkonzentration von 6,25 mg/μl ohne SPIO Beladung, wurden lediglich fünf der sechs Kulturkammern befüllt. Die fünf Sehnen blieben über die gesamte Versuchsdauer intakt und konnten nach vierzehn Tagen geerntet werden.

4.8.4 6,25 mg/μl mit SPIO

In der Versuchsgruppe mit einer Kollagenkonzentration von 6,25 mg/μl mit SPIO versetzt, zeigten sich den gesamten Versuch über sechs intakte Sehnen, die am Tag vierzehn ebenfalls erfolgreich geerntet werden konnten.

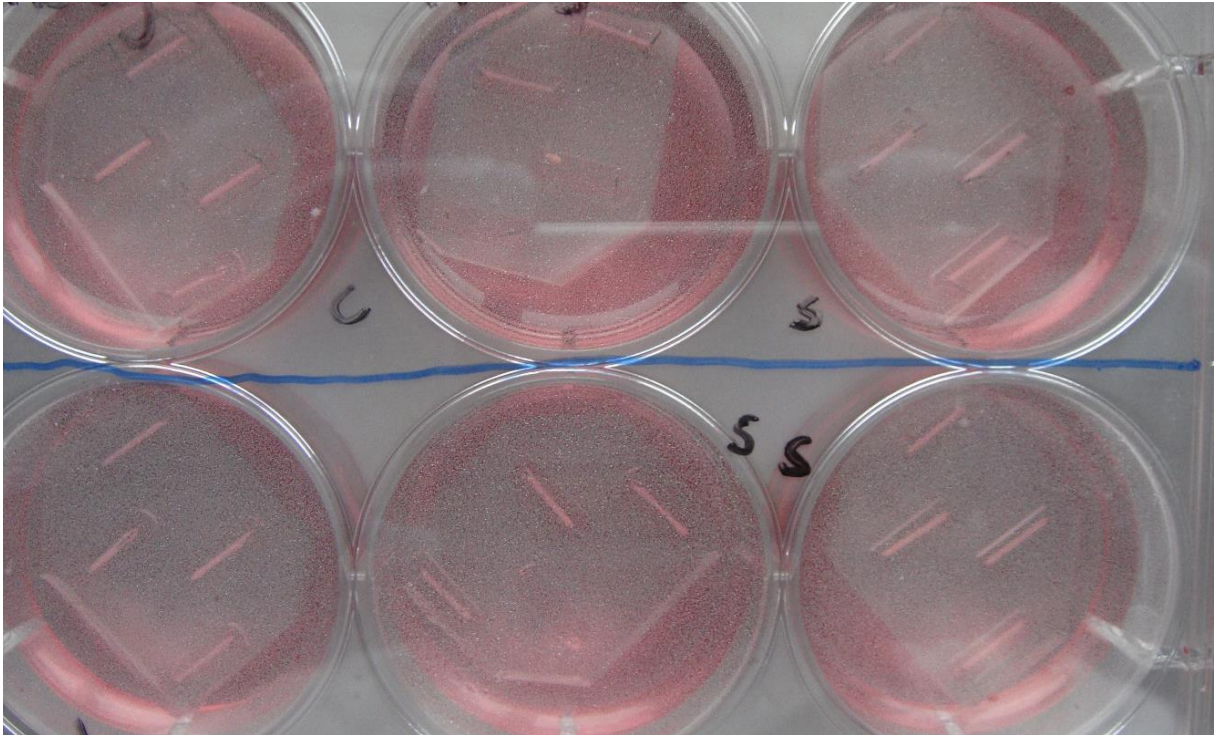


Abb. 27: Versuchsgruppe mit den Kollagenkonzentrationen 5 mg/μl und 6,25 mg/μl

4.9 Histologische Untersuchung

Ein Teil der Fragestellung dieser Machbarkeitsstudie zielte darauf ab herauszufinden, ob sich die Sehnen-Organoiden für die Auswertung mittels histologischer Analyse eignen. Für die histologische Auswertung der 3D Sehnen-Organoiden wurde daher auf drei Beurteilungskriterien Wert gelegt. Zum einen wurden die histologischen Präparate hinsichtlich ihrer Tenozyten-Typen untersucht.

Typ I: Zellen mit dünnen, spindelförmigen Kernen.

Typ II: Zellgruppen mit abgerundeten, dicken zigarrenförmigen Kernen.

Typ III: Chondrozytenartige Zellen mit runden Kernen und sichtbaren Nukleoli (Smith 2011).

Zum anderen wurde die Ausrichtung der Kollagenfasern, zwischen welchen die Tenozyten eingebettet waren, beurteilt. Darüber hinaus wurde die Verteilung der Eisennanopartikel begutachtet.

4.9.1 Erster Versuch: Pilotstudie

Die Versuchsgruppe 3D+Pin+Magnet (Verweis Abb. 15 bei Material und Methode) mit einer Zellkonzentration von 840 Zellen/ μl ohne SPIO versetzt, zeigte kein gerichtetes Kollagengerüst und Zellwachstum in Richtung der wirkenden Kraft. Es waren hauptsächlich Typ II Zellen enthalten, die jedoch inhomogen verteilt und grüppchenweise auftraten, wie Abb. 28 zeigt. Die andere Gruppe desselben Versuchs, jedoch mit SPIO versetzt, wies zumindest eine nahezu wellenförmige Ausrichtung des Kollagens in Richtung der Zugspannung auf. Auffällig war jedoch, dass in diesem Präparat kaum noch intakte Zellen erkennbar waren. Das Sehnenpräparat war übersät mit Kernresten zerstörter Sehnenzellen (Abb. 29), was eventuell der enormen Zugkraft des Magneten in Kombination mit den Eisennanopartikeln zugeschrieben werden könnte. Eine dynamische Aktivierung der Sehnen-Organoiden mit Hilfe von Magneten war demnach nicht möglich, da die Zellen zerrissen wurden. Die Versuchsgruppe 3D+Pin mit SPIO wies deutlich weniger Kernreste auf (Abb. 30) als in der Versuchsgruppe mit dem Magneten. Es konnte ein gerichtetes uniaxiales Kollagenwachstum beobachtet werden. Das Präparat der Versuchsgruppe 3D+Pin ohne SPIO zeigte einbettungsbedingte Artefakte, weshalb nur ausschnittsweise eine Bewertung erfolgen konnte. Die Ausschnitte, die bewertet werden konnten, zeigten ein gerichtetes Kollagenwachstum und homogen verteilte Zellen im Kollagen.

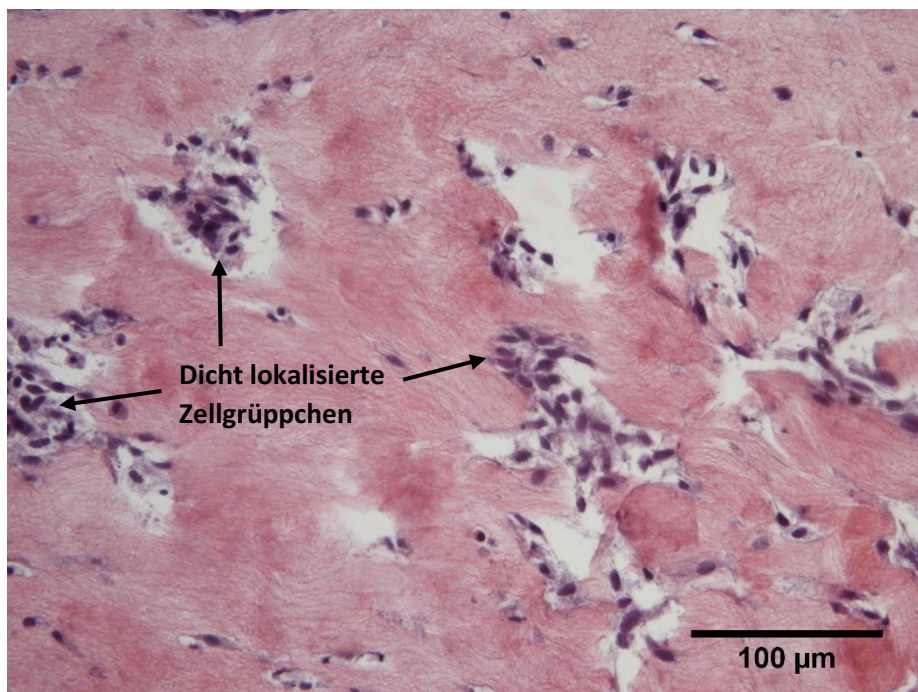


Abb. 28: Versuchsgruppe 3D+Pin+Magnet, ohne SPIO (840 Zellen/ μl), viele dicht lokalisierte Zellgrüppchen



Abb. 29: Versuchsgruppe 3D+Pin+Magnet mit SPIO (840 Zellen/ μ l), übersät mit Zelldebris

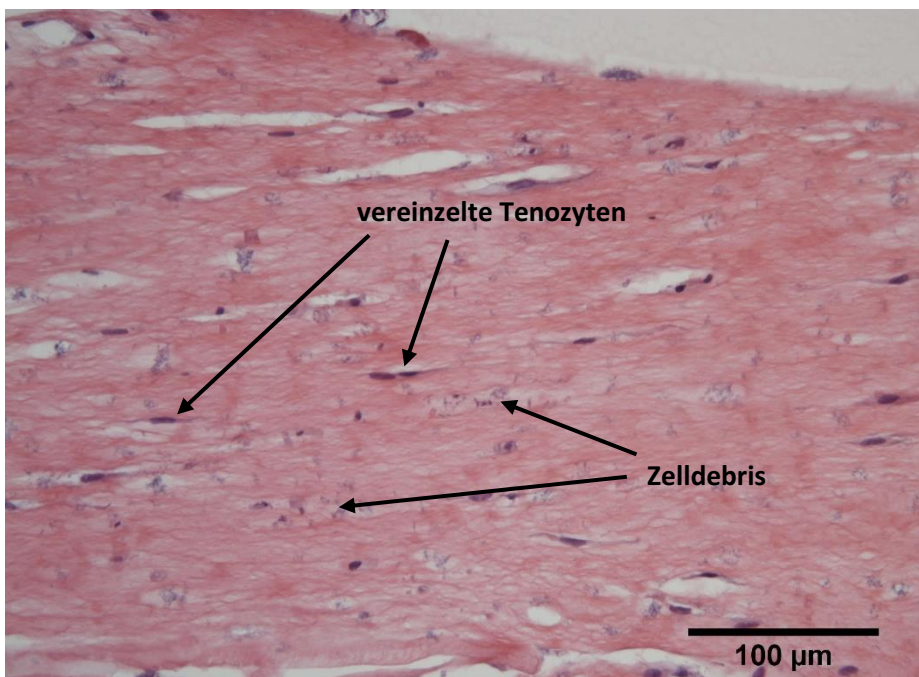


Abb. 30: Versuchsgruppe 3D+Pin mit SPIO (420 Zellen/ μ l), Zelldebris und vereinzelte Tenozyten

4.9.2 Zweiter Versuch: Vergleich zweier unterschiedlicher Eisennanopartikel-Präparate

Der zweite Versuch wurde keiner histologischen Analyse unterzogen. Aufgrund dieser fehlenden auswertbaren Ergebnisse des zweiten Versuchs, wird dieser nicht näher in den Ergebnissen erläutert.

4.9.3 Dritter Versuch: Dynamischer Zug mittels Eisennanopartikeln und Magneten

In diesem Versuch wurden insgesamt neun Sehnen geerntet und für die histologische Untersuchung fixiert. Da zum Zeitpunkt der Auswertung das histologische Präparat der Z Gruppe des starken Magneten nicht auffindbar war, werden im Folgenden die acht verbliebenen histologischen Präparate besprochen.

Das Präparat der Z Gruppe des Magnetaufbaus „4 Türmchen“ (Verweis Abb. 17 Material und Methode, S. 40) zeigte, dass die SPIO überwiegend in den Zellen zu finden waren. Dabei stellten sich die Eisennanopartikel in der HE-Färbung braun dar und in der Berlin-Blau Färbung blau. Auffällig in diesem Präparat war, dass die gesamte Sehne mit Kernresten übersät war, die sich im Kollagen verstreut befanden. Es waren nur noch wenige intakte Sehnenzellen sichtbar, hauptsächlich des Typs II. Die Sehne der Versuchsgruppe M, „4 Türmchen“, zeigte sich in der HE-Färbung makroskopisch betrachtet stark braun gefärbt. In der mikroskopischen Beurteilung war auffallend, dass die SPIO als kleine Grüppchen über die gesamte Sehne im Kollagen verteilt lagen (Abb. 31). Vereinzelt konnten Kernreste gefunden werden, die die Überreste zerstörter Sehnenzellen darstellten. Die Faserausrichtung und die Zellausrichtung verlief linear zur Zugachse. Der vorherrschende Zelltyp war Typ II. In der Versuchsgruppe Z+M „4 Türmchen“, waren die SPIO sowohl in den Zellen als auch im Kollagen zu finden (Abb. 32). In diesem Präparat konnten keine Kernreste gefunden werden, was darauf hinwies, dass die Konzentration und Verteilung der SPIO und der Magneten brauchbarer war im Vergleich zur Z, „4 Türmchen“ Gruppe. Die SPIO waren sehr randständig positioniert. Dies konnte vor allem in der Berlin-Blau Färbung deutlich beobachtet werden. Die Sehne wies hauptsächlich Typ II Zellen auf.

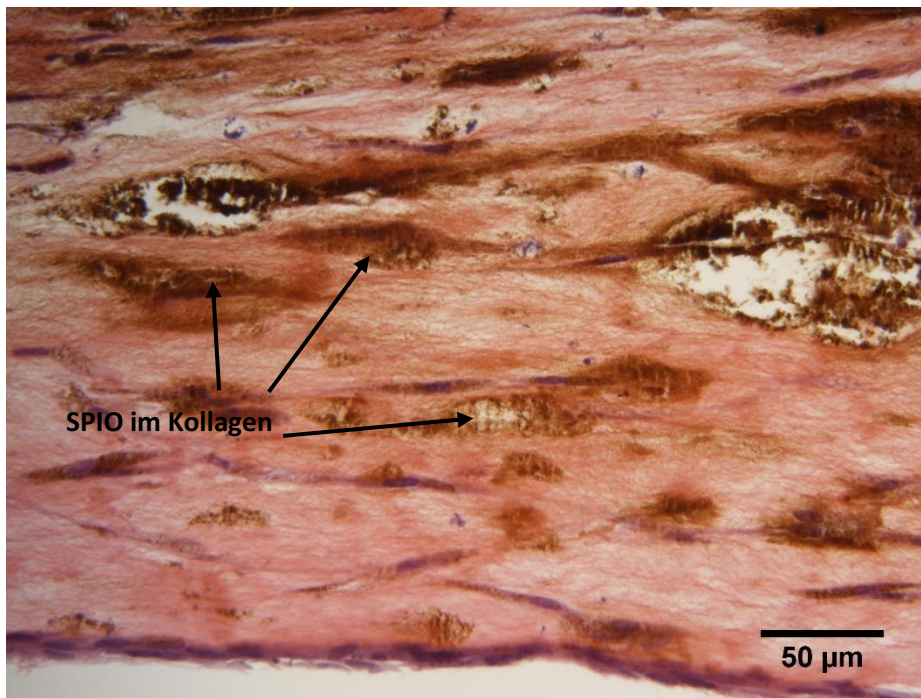


Abb. 31: Versuchsgruppe M, schwacher Magnet „4 Türmchen“

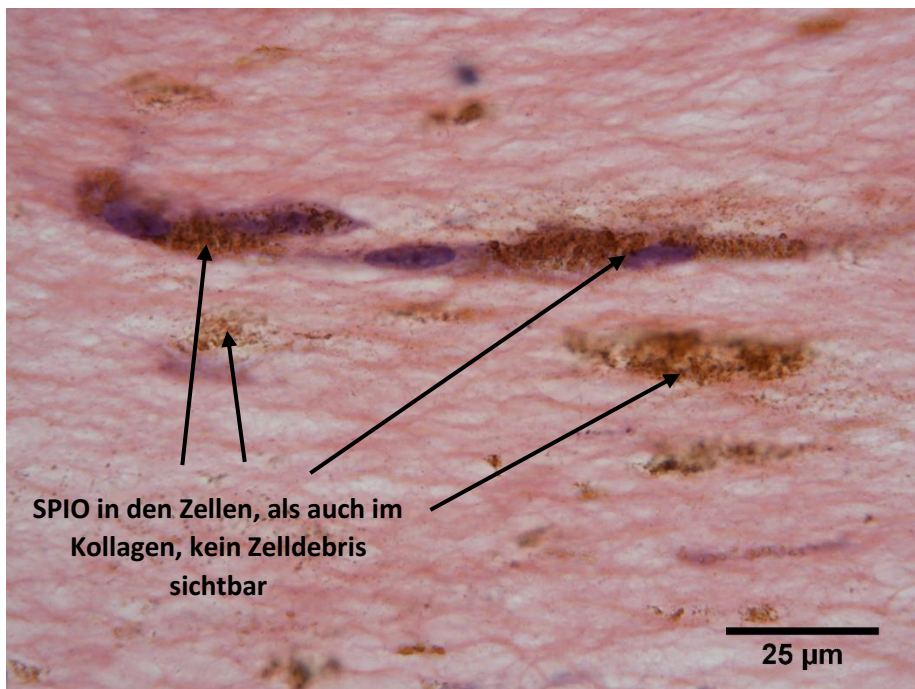


Abb. 32: Versuchsgruppe Z+M, schwacher Magnet „4 Türmchen“

Um einen Vergleich ziehen zu können, wurden drei weitere Sehnen mit etwas unterschiedlicheren Magnetaufbauten in Form von Quadertürmen (Verweis Abb. 17 Material und Methode, S. 40) trainiert. Das histologische Präparat Z, „Quaderturm“ in der Spezialfärbung Berlin-Blau, wies eine wellenförmige Kollagenausrichtung auf, in der sich überwiegend Kernreste befanden. Die wenigen SPIO die gefunden wurden, konnten in den Zellen lokalisiert werden (Abb. 33). Die Eisennanopartikel stellten sich in der Berlin-Blau Färbung blau dar, die Zellen hingegen stellten sich rosafarben dar. In dem Präparat M, „Quaderturm“, konnten Eisennanopartikel ausfindig gemacht werden, die sich hauptsächlich im Kollagen abgelagert hatten. Sie erschienen eher inhomogen verteilt mit nahezu klumpenartiger Gestalt, ähnlich dem Präparat der Versuchsgruppe M, „4 Türmchen“ (Abb. 31). Die Zellkonzentration mit überwiegend Typ II Zellen war gering, es wurden einige wenige Kernreste aufgefunden. In der letzten Versuchsgruppe Z+M, „Quaderturm“, konnten Ansammlungen von Eisennanopartikeln sowohl in den Zellen als auch im Kollagengel beobachtet werden. Es waren größtenteils Typ II Zellen sichtbar (Abb. 34).

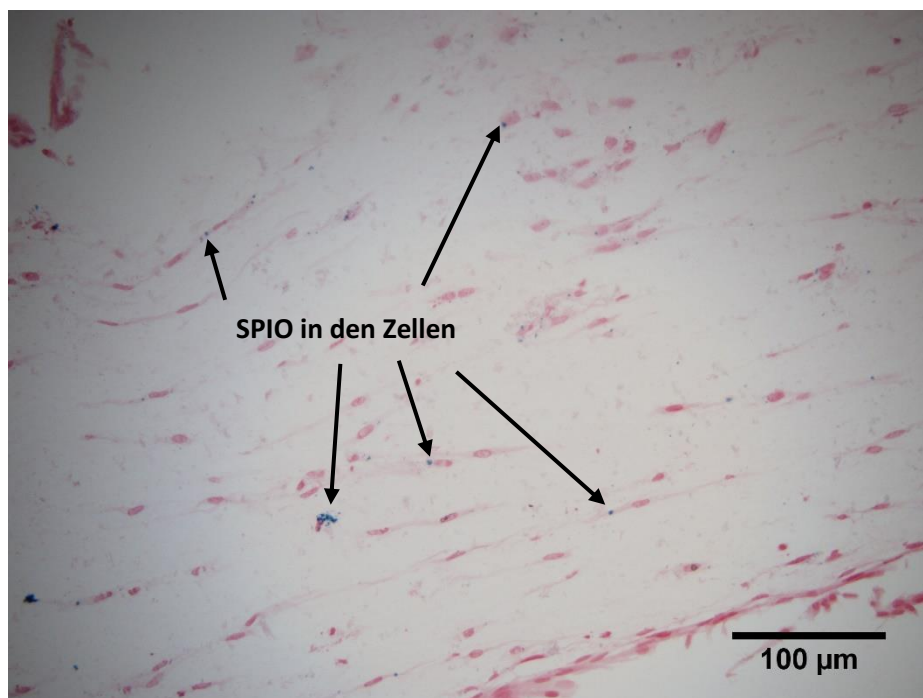


Abb. 33: Versuchsaufbau Z, schwacher Magnet „Quaderturm“, Berlin-Blau Färbung

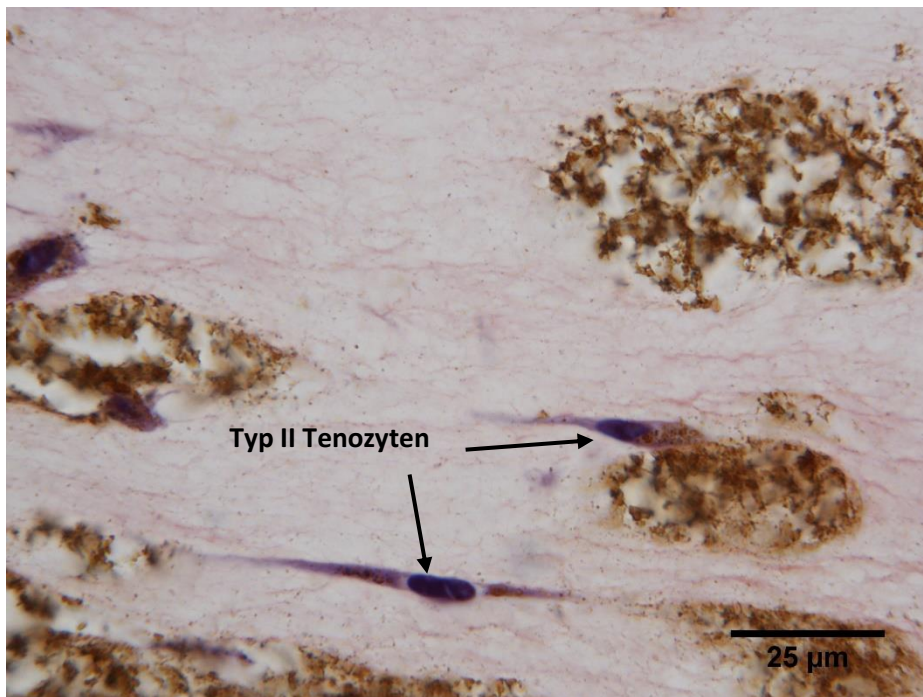


Abb. 34: Versuchsgruppe Z+M, schwacher Magnet "Quaderturm"

Von den drei Präparaten des Versuchsaufbaus starker Magnet wurden nur zwei ausgewertet, da das Präparat Z, starker Magnet zum Zeitpunkt der Auswertungen nicht auffindbar war. Bei dem Präparat M, starker Magnet konnten die Eisennanopartikel im Kollagen nachgewiesen werden. Diese hatten sich auch teilweise um die Zellen herum angelagert (Abb. 35). Die Zell- und die Faserausrichtung präsentierte sich in Richtung der wirkenden Kraft. Es waren hauptsächlich Typ II und III Zellen vorzufinden. In dem Sehnenpräparat Z+M, starker Magnet zeigte sich die Faserausrichtung hingegen weniger gerichtet. Die SPIO befanden sich in den Zellen und im Kollagen.

Ausgehend von den Ergebnissen des ersten und des dritten Versuchs, war eine dynamische Aktivierung der Sehnen-Organoiden mit Magneten nicht möglich, da sie ein Zerreißen der Zellen herbeiführten.

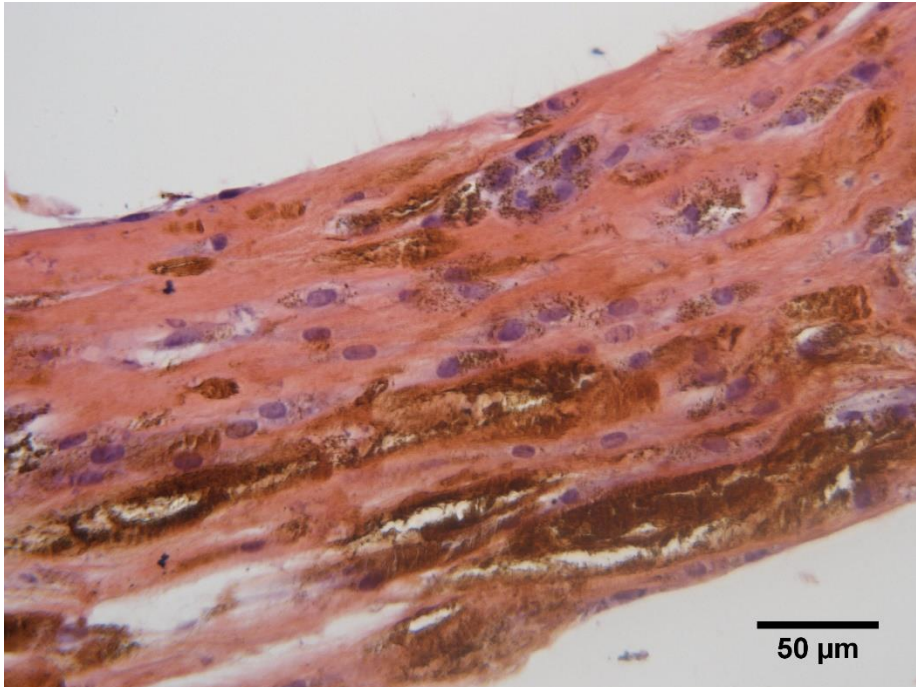


Abb. 35: Versuchsaufbau M, starker Magnet

4.9.4 Vierter Versuch: Vergleich verschiedener Eisennanopartikel Konzentrationen

Bei den histologischen Präparaten mit einer SPIO Konzentration von 2,5 mg/ml konnte ein gerichtetes Wachstum entlang der statischen Zugspannung beobachtet werden. Es waren vor allem Typ I Tenozyten vorherrschend. Die Eisennanopartikel traten in großen Mengen auf, sowohl in den Tenozyten, als auch in den Kollagenfasern (Abb. 36+37a). Die Berlin-Blau Färbung zeigte eine dichte SPIO Konzentration (Abb. 36a). Die nächstkleinere SPIO Konzentration mit 0,25 mg/ml führte zu Ansammlungen von Eisennanopartikeln in den Tenozyten (Abb. 36+37b). Die Berlin-Blau Färbung zeigte eine deutlich niedrigere SPIO Konzentration (Abb. 36b). Das Präparat mit einer SPIO Konzentration von 0,025 mg/ml konnte bereits einen wellenförmigen bis parallelen Verlauf der Kollagenfasern vorweisen, der in Richtung der wirkenden statischen Zugkraft nachvollzogen werden konnte. Der vorherrschende Zelltyp waren Typ I und II Tenozyten. Die Eisennanopartikel konnten nur vereinzelt in den Tenozyten aufgefunden werden (Abb. 36+37c). Die Sehne mit der niedrigsten SPIO Konzentration von 0,0025 mg/ml zeigte einen typischen parallelfaserigen Verlauf des

Kollagens mit longitudinal ausgerichteten Typ II Tenozyten, die vor allem randständig und mehrlagig auftraten (Abb. 36+37d). Bei der Kontrollsehne, die nicht mit SPIO versetzt war, präsentierten sich die Kollagenfasern noch sehr unstrukturiert (Abb. 36+37e) im Gegensatz zu den Sehnen, die mit Eisennanopartikeln versetzt waren.

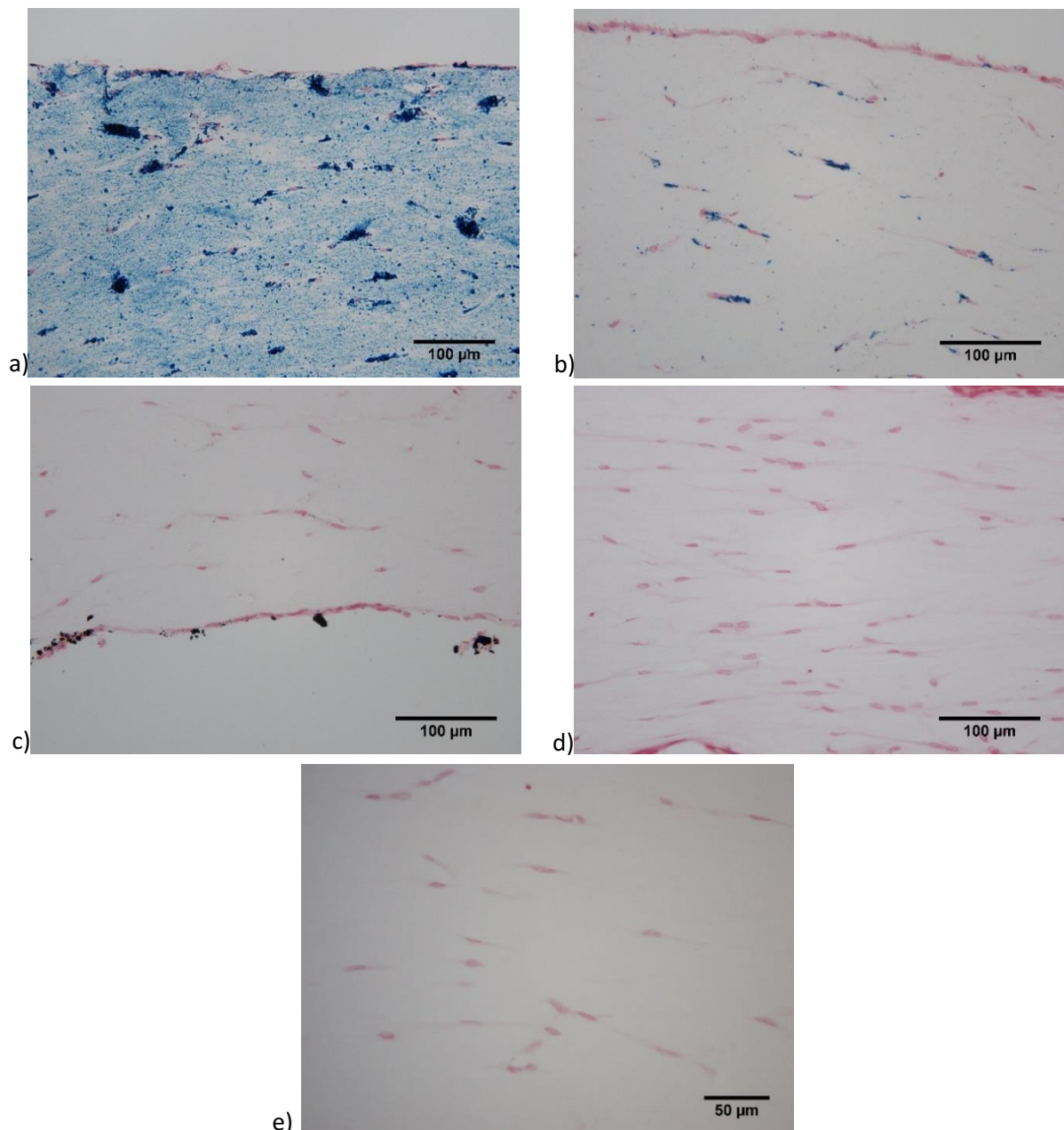


Abb. 36: Versuchsaufbau mit unterschiedlichen SPIO Konzentrationen in Berlin-Blau Färbung. a) 2,5 mg/ml, b) 0,25 mg/ml, c) 0,025 mg/ml, d) 0,0025 mg/ml, e) Kontrolle ohne SPIO

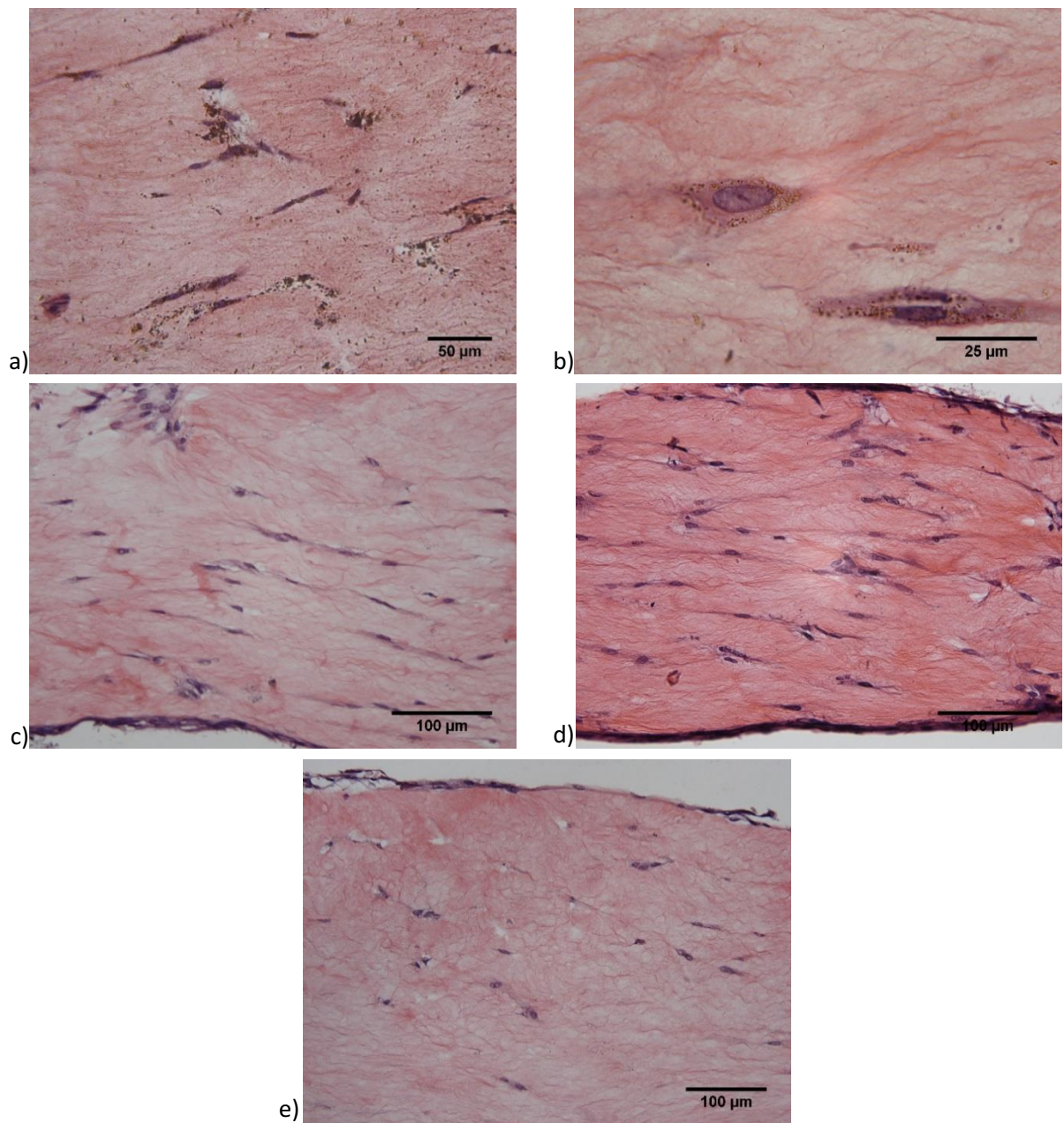


Abb. 37: Versuchsaufbau mit unterschiedlicher SPIO Konzentration in HE Färbung. a) 2,5 mg/ml, b) 0,25 mg/ml, c) 0,025 mg/ml, d) 0,0025 mg/ml, e) Kontrolle ohne SPIO

4.9.5 Fünfter Versuch: Vergleich verschiedener Kollagen-Hydrogel Konzentrationen

Die SPIO Konzentration betrug für jede Versuchsgruppe 0,075 mg/ml, die Kollagenkonzentrationen variierten zwischen 5 mg/ml und 6,25 mg/ml. Das histologische Präparat mit einer Kollagenkonzentration von 5 mg/ml ohne SPIO zeigte eine parallele Faser- und Zellausrichtung (Abb. 38a), wobei vor allem der Zelltyp II dominierte. Des Weiteren konnte man Zellanlagerungen am Rand der Sehne beobachten. Das Sehnenpräparat mit derselben Kollagenkonzentration und SPIO gelabelt wies ebenfalls eine parallele Faser- und Zellausrichtung auf, wobei vor allem Tenozyten des Typ I und II sichtbar waren. Die wenigen SPIO, die gefunden werden konnten, waren hauptsächlich um die Zellkerne herum organisiert (Abb. 38b).

In dem Präparat mit einer Kollagenkonzentration von 6,25 mg/ml ohne SPIO zeigten sich die Faser und Zellausrichtung stellenweise nicht parallel verlaufend. Vor allem um die ehemaligen Pin-Löcher herum fanden sich ungeordnete Kollagenfasern und Zellen. Um die Pin-Löcher herum konnten vermehrt Typ II Tenozyten ausgemacht werden, wohingegen in der Mitte der Sehne häufiger Typ I Tenozyten vertreten waren. Dieses Sehnenpräparat stellte ein Negativbeispiel (Abb. 38c) dar, aufgrund der unzureichenden Zell- und Faserausrichtung. Das Gewebe in diesem Präparat schien unorganisiert zu sein. Das histologische Präparat mit einer Kollagenkonzentration von 6,25 mg/ml mit SPIO zeigte mittig in der Sehne eine parallele Faser- und Zellausrichtung entlang der wirkenden Kraft. Die Region, wo sich ehemals die Pins befunden hatten, wies ungeordnete Kollagenfasern auf. Eisennanopartikel waren kaum auffindbar, die wenigen Eisennanopartikel, die eindeutig identifiziert werden konnten, hatten sich um die Zellkerne herum angelagert (Abb. 38d). In dieser Sehne herrschten vor allem Typ II Tenozyten vor.

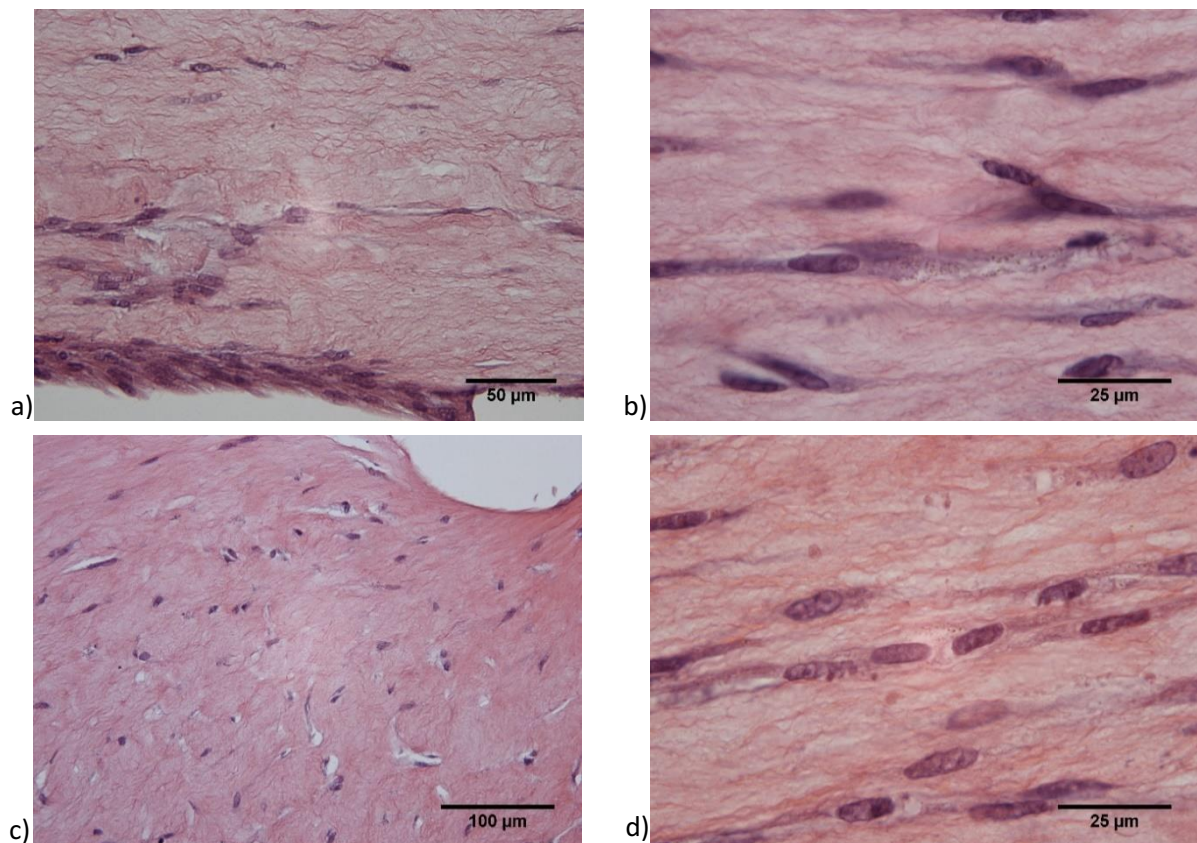


Abb. 38: Versuchsaufbau mit unterschiedlicher Kollagenkonzentration in HE Färbung. a) 5 mg/ml ohne SPIO, b) 5 mg/ml mit SPIO, c) 6,25 mg/ml ohne SPIO, d) 6,25 mg/ml mit SPIO

Die Fragestellung dieser Machbarkeitsstudie, ob sich die Sehnen-Organoiden für die Auswertung mittels histologischer Analyse eignen, kann mit ja beantwortet werden. Die Sehnen-Organoiden zeigten in den zwei relevanten Kategorien (Tenozyten-Typen, Ausrichtung der Kollagenfasern) eine sehnenähnliche Morphologie.

4.10 Versuchsauswahl für die Übertragung auf ein Tendon-on-a-chip Modell

Für die bevorstehende Übertragung der Versuche auf ein Tendon-on-a-chip Modell, was ausführlich in der Diplomarbeit „Pferdesehnen als organ on a chip model“ - Die Übertragung eines 3D in vitro Sehnenmodells auf einen Mikrochip zur Etablierung neuer Methoden für Forschung und Medikamentenscreenings“ von Mag. med. vet. Lisa Julie Zeiger beschrieben wird, wurden nachfolgend die besten Ergebnisse der zuvor vorgestellten Versuchsreihen ermittelt. Für das Kollagen wurden die besten Ergebnisse mit einer Konzentration von 5 mg/ml und 6,25 mg/ml erzielt (siehe Versuch 5). Aufgrund folgender Eigenschaften wurden die beiden Kollagen Konzentrationen für die Chipmodelle ausgewählt:

Makroskopisch konnte ein Wachstum der Minisehnen entlang der Zugrichtung festgestellt werden und sie entsprachen auch optisch den Kriterien einer normalen Sehne. Sehnenabrisse von den fixierten Pins wurden lediglich bei zwei von insgesamt vierundzwanzig Minisehnen beobachtet. Des Weiteren zeigten sie histologisch eine parallele Faser- und Zellausrichtung in denen Typ II Zellen dominierten.

4.11 Quantitative PCR

Ein Teil der Fragestellung dieser Machbarkeitsstudie zielte darauf ab herauszufinden, ob sich die Sehnen-Organoiden für die Auswertung mittels qPCR eignen. Es konnte genug RNA in ausreichender Menge aus der Minisehne extrahiert werden, um das gewünschte Primersetz zu analysieren. Hierfür wurden die Sehnen-Organoiden der 3D Modelle aus Versuch 5 verwendet, die sich in der Kollagenkonzentration und in der SPIO Beladung unterschieden. Die Machbarkeit der Auswertung der qPCR für die Sehnen-Organoiden konnte bestätigt werden.

Bei dieser Machbarkeitsstudie betrug die Stichprobengröße $n=1$, sodass keine statistische Auswertung durchgeführt werden konnte. Folgende Trends (Tab. 12) ließen sich aber aus der qPCR ablesen:

Tab. 12: qPCR Werte der 2D und 3D Modelle mRNA level relativ zu GAPDH

Primer	2D	3D 5 mg/ml - SPIO	3D 5 mg/ml + SPIO	3D 6,5 mg/ml - SPIO	3D 6,5 mg/ml + SPIO
Col 1a	0,015	0,02	0,03	0,045	0,065
Col 2a1	0,007	0,017	0,007	0,014	0,012
Tnc	0,01	0,14	0,13	0,27	0,27
Dcn	0,15	0,5	0,45	0,55	0,48
Tnmd	0,00002	0	0,00013	0,00007	0,00003
Vcan	0,2	0,4	0,5	0,7	0,8
COMP	< 0,1	0,1	0,1	0,3	0,5
Scx	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
IL-6	0,01	0,17	0,13	0,17	0,19

Primer	2D	3D 5 mg/ml - SPIO	3D 5 mg/ml + SPIO	3D 6,5 mg/ml - SPIO	3D 6,5 mg/ml + SPIO
MMP 1	0,001	0,014	0,008	0,011	0,014
MMP 13	0	2,2	1,8	3,5	3,5

4.11.1 Auswertung 2D, 3D im Vergleich

Für die Auswertung der qPCR wurden nachfolgende Säulendiagramme erstellt (Abb. 39). Jedes dieser Säulendiagramme zeigt das Verhältnis des messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Levels, der Gene, die sehnenpezifisch sind, relativ zu GAPDH. Ausgewertet wurden die 2D Kultur und die 3D Modelle (5 mg/ml Kollagen mit und ohne SPIO und 6,5 mg/ml Kollagen mit und ohne SPIO). Der Vollständigkeit halber wurden die Ergebnisse mit jenen der Chipmodelle verglichen. Eine detaillierte Beschreibung der Chipmodelle wird in der Diplomarbeit „Pferdesehnen als organ on a chip model“-Die Übertragung eines 3D in vitro Sehnenmodells auf einen Mikrochip zur Etablierung neuer Methoden für Forschung und Medikamentenscreenings“ von Mag. med. vet. Lisa Julie Zeiger thematisiert. Die Genexpression zeigt, ob die Sehnen-Organoiden genetisch einer „normalen“ Sehne entsprechen und mit *in vivo* Sehnen quantitativ vergleichbar sind.

Die wesentlichsten Unterschiede zwischen 2D Modell, 3D Modell und Chips zeigten sich in der Genexpression von Decorin, COMP und Skleraxis. Die Genexpression von Decorin war bei den 3D Modellen zwei- bis dreimal so hoch, wie die Genexpressionswerte von dem 2D Modell und den Chipmodellen. Bei dem Gen COMP zeigten die 3D Modelle mit einer Kollagenkonzentration von 5 mg/ml mit und ohne SPIO, Werte von 0,1 mRNA level relativ zu GAPDH, während die Modelle mit einer Kollagenkonzentration von 6,5 mg/ml mit und ohne SPIO zwischen 0,3–0,5 mRNA level relativ zu GAPDH lagen. Die niedrigste Expression von < 0,1 mRNA level relativ zu GAPDH konnte bei dem 2D Modell festgestellt werden. Die 2D Kultur wurde als Negativkontrolle in die qPCR Auswertung miteinbezogen. Der Verlust der Differenzierung der somatischen Zellen ist in der 2D Kultur ausgeprägter als in den 3D und Chipmodellen. Demnach sollte die Negativkontrolle immer eine geringere Genexpression aufweisen als die 3D und die Chipmodelle. Das Gen Skleraxis wies, sowohl bei den 3D Modellen, als auch beim 2D Modell Expressionswerte von ca. 0,01–0,02 mRNA level relativ zu GAPDH auf. Die Chipmodelle hingegen zeigten bis zu viermal höhere Expressionswerte

von ca. 0,08–0,10 mRNA level relativ zu GAPDH. Das Gen Col 1a wurde, verglichen mit der 2D Negativkontrolle, am höchsten von dem 3D Modell mit einer Kollagenkonzentration von 6,5 mg/ml mit SPIO exprimiert. Tendenziell wiesen sowohl die 3D Modelle als auch die Chipmodelle eine höhere Expression auf als die 2D Negativkontrolle. Das mRNA-Level des Gens Tenascin C der 3D Modelle mit einer Kollagenkonzentration von 5 mg/ml mit und ohne SPIO ließen ein um ca. die Hälfte niedrigeres Expressionslevel mit 0,14 mRNA level relativ zu GAPDH erkennen. Ein Vergleich der Expressionslevel innerhalb des Gens Tenomodulin ließ keine aussagekräftigen Unterschiede zwischen den Modellen erkennen. Im Vergleich von Tenomodulin zu den Expressionsleveln der anderen Genmarker, zeigte Tenomodulin nahezu keine Expression, da die Werte verschwindend gering waren. Das mRNA-Level von Versican zeigte sich sowohl in den Chipmodellen als auch in den 3D Modellen, verglichen mit sämtlichen anderen Genmarkern, hoch. Das Gen MMP13 wies stark erhöhte Expressionslevel in den 3D Modellen und in den Chipmodellen auf. Das Gen MMP1, wurde von beiden Modellen niedrig exprimiert, verglichen mit den anderen Genmarkern. IL6 zeigte eine mittelstarke Expression der Modelle im Vergleich zu den anderen Genmarkern.

4.11.2 3D Modell-Auswirkung der Kollagenkonzentrationen auf die Genexpression

Um herauszufinden, ob die unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen der Sehnen-Organoiden einen Einfluss auf die Genexpression hatten, wurden im Folgenden ausschließlich die 3D Modelle miteinander verglichen. Das Gen MMP13 wies bei den 3D Modellen mit einer Kollagenkonzentration von 6,5 mg/ml die höchste Expression mit ca. 3,5 mRNA level relativ zu GAPDH auf. Die Expressionslevel von ca. 0,3–0,8 mRNA level relativ zu GAPDH der Gene Decorin, Versican und COMP, konnten bei den 3D Modellen mit einer Kollagenkonzentration von 6,5 mg/ml beobachtet werden, was einem hohen Expressionslevel entspricht, verglichen mit den anderen Genmarkern. Tendenziell zeigten die 3D Modelle mit einer Kollagenkonzentration von 5 mg/ml innerhalb der Gene COMP, Versican und Decorin eine niedrigere Expression. Die Gene Tenascin C und IL6 wiesen bei den 3D Modellen Expressionslevel von ca. 0,13–0,27 mRNA level relativ zu GAPDH auf. Darüber hinaus wurden die Gene Skleraxis, MMP1, Col 1a und Col 2a1 wenig exprimiert, verglichen mit den gesamten Genmarkern. Das Gen Tenomodulin zeigte im Vergleich mit allen anderen Genmarkern die niedrigsten Expressionslevel.

4.11.3 3D Modell-Auswirkung der Eisennanopartikel auf die Genexpression

Um im Folgenden festzustellen, ob das Markieren mit Eisennanopartikeln einen Einfluss auf die Genexpression hat, wurde das 3D Modell unter Beachtung speziell dieser Kriterien ausgewertet. Die Gene MMP13, MMP1, Tenomodulin, COMP und Tenascin C zeigten im Hinblick auf das Kriterium mit SPIO und ohne SPIO keine relevanten Expressionslevelunterschiede. Das Gen Versican wies tendenziell höhere Expressionswerte bei den Gruppen mit SPIO auf. IL6 ließ eine nahezu identische mittelstarke Expression von ca. 0,13–0,19 mRNA level relativ zu GAPDH bei den 3D Modellen mit und ohne SPIO erkennen, verglichen mit den gesamten Genmarkern. Die 3D Modelle ohne SPIO exprimierten das Gen Decorin tendenziell höher. Col 2a1 wies ebenfalls eine tendenziell höhere Expression bei den 3D Modellen ohne SPIO auf. Im Vergleich zu den anderen Genmarkern wurde Col 2a1 mit ca. 0,007–0,017 mRNA level relativ zu GAPDH aber nur schwach exprimiert. Bei dem Gen Skleraxis zeigten sowohl die 3D Modelle mit SPIO als auch die 3D Modelle ohne SPIO eine nahezu identisch niedrige Expression von ca. 0,01–0,02 mRNA level relativ zu GAPDH. Col 1a wurde bei den 3D Modellen mit SPIO tendenziell höher exprimiert.

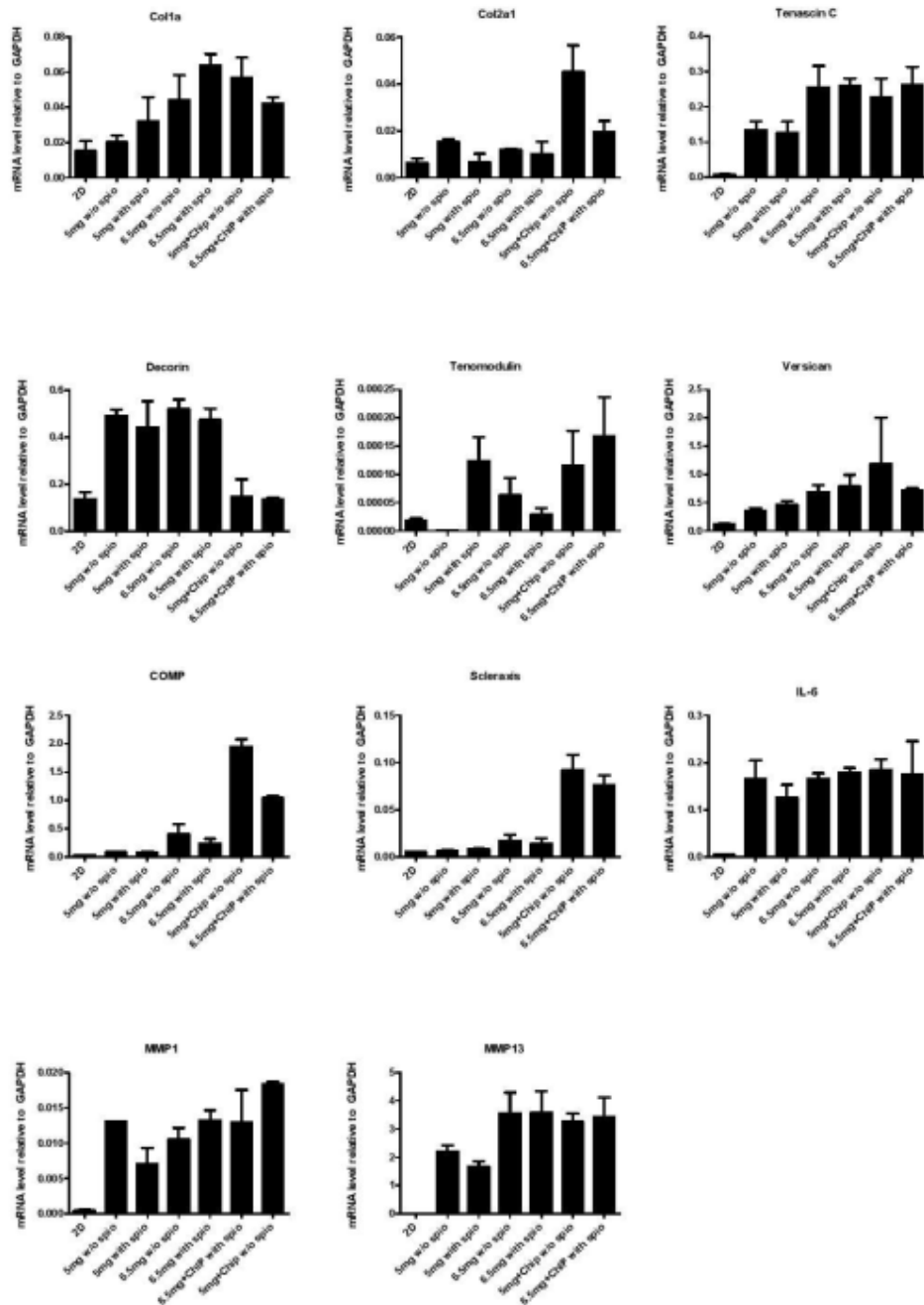


Abb. 39: Gen Expressionsmuster der Quantitativen PCR des 2D, 3D und Chipmodells

5 Diskussion

In der hier vorgestellten Machbarkeitsstudie wurden insbesondere zwei Fragestellungen verfolgt. Zum einen stellte sich die Frage, ob Sehnenkonstrukte mit sehnähnlicher Morphologie hergestellt werden können, zum anderen sollte die Durchführbarkeit von gewünschten Analyseverfahren, wie Histologie und qPCR untersucht werden. Dazu wurde ein 3D Sehnenmodell entwickelt, welches einen Teil des Gesamtprojektes zur Entwicklung eines Tendon-on-a-chip-Modells darstellt. Das 3D Modell wurde dafür verwendet equine Sehnen-Organoiden zu kultivieren. Es wurden länglich-ovale auf PDMS Gel basierende Miniatur-Kulturkammern entwickelt, von denen jeweils 3–4 in einem Well einer 6-Wellplatte Platz fanden. An beiden Enden der Kulturkammern wurden die Sehnen-Organoiden mit chirurgischen Pins fixiert, was durch die Kontraktion der Gele in einem statischen Zug resultierte, die die Sehnenzellen zu einer Orientierung in uniaxialer Ausrichtung veranlasste. Die optimale Zellzahl betrug hierbei zwischen 660–800 Zellen/ μ l. Es ist bekannt, dass Sehnen mechanisch getriggerte Gewebe sind, die *in vivo* täglich mechanischen Kräften ausgesetzt sind. Die mechanischen Kräfte koordinieren die Gewebestruktur und -funktion auf zellulärer, molekularer und genetischer Ebene (Pesqueira et al. 2017). Mit Hilfe von Eisennanopartikeln und einem darauf wirkenden Magnetfeld, das zyklisch angelegt wurde, imitierte man eine dynamische Spannung und Entlastung einer Sehne, um möglichst natürliche Bedingungen gleich einer Sehne *in vivo* zu schaffen. Die Entwicklung des *in vitro* Sehnenmodells diente dem Studium der Sehnenphysiologie und -pathophysiologie von Tendinopathien und der Testung neuer Therapiemethoden.

Bezüglich der Entwicklung des 3D Modells lässt sich sagen, dass der erste Vorversuch nicht den Vorstellungen eines optimalen Modells entsprach. Als nachteilig stellten sich die Kulturkammern heraus, die mittels einer Biopsiestanze ausgestanzt worden waren. Sie waren ungleichmäßig geformt und wiesen Gelspitzen auf, die zum Kammerinneren hineinragten und teilweise sogar die Minisehne berührten. Des Weiteren unterschieden sich die Kammern erheblich in ihren Maßen, da sie händisch ausgestanzt wurden, was einen soliden Vergleich untereinander unmöglich machte. Die Berechnung des Volumens für die Kammern war ungenau, da die Ausstanzungen sich teilweise überlappten und das Volumen somit kleiner war als ursprünglich berechnet. Um Platz zu sparen, wurden die anfangs mit drei Kulturkammern ausgestatteten Wells auf vier Kulturkammern erweitert. Die im späteren Verlauf mit Hilfe einer Silikonform gegossenen PDMS Gele waren schnell zu produzieren,

wiesen einheitliche Kammergrößen auf und ließen sich leicht im Well platzieren. Sie hatten den Vorteil, dass sie in einem Stück gegossen werden konnten. Der einzige Nachteil der Silikonformen war die zeitaufwendige Herstellung, aufgrund derer wir zu Beginn auf ein händisches Ausstanzen zurückgriffen. Die Methode der Silikonausgussformen erwies sich letztendlich als praktikabel und reproduzierbar für das Anzüchten von *in vitro* Sehnen-Organoiden.

Aufgrund der Verwendung von Eisennanopartikeln wurde ein Toxizitätsnachweis zur Bestimmung der Zellviabilität durchgeführt. Dabei wurde die Lebend-Zellzahl mit Hilfe eines fluorometrischen Verfahrens, basierend auf dem Vitalfarbstoff Resazurin, bestimmt und die Stoffwechselaktivität der Zellen gemessen. Die Ergebnisse des Toxizitätsnachweises zeigten, dass die Eisennanopartikel keinen Einfluss auf die Zellviabilität hatten. Da der Hersteller empfiehlt, mehrere Assays für die gleichen Proben durchzuführen, wurde der Test nach einem Tag, nach sieben Tagen und nach neunzehn Tagen Kulturdauer mit derselben 2D Kultur durchgeführt, sodass die Aussage getroffen werden konnte, dass an keiner der drei Testungen die Eisennanopartikel eine toxische Wirkung auf die Zellen hatten. Alternative Methoden umfassen die Messung der DNA-Synthese durch Radioisotopeneinbau, Zellzählung oder andere Tests, die auf Vitalfarbstoffe zurückgreifen. Da die TOX-8 Ergebnisse präzise und aussagekräftig waren, wurde auf einen weiteren Test verzichtet. Der TOX-8 Assay hatte zudem den Vorteil, dass er einfach, genau und reproduzierbar war.

Das Augenmerk der Versuche lag in der Entwicklung einer 3D Sehnenzellorganisation, die über magnetische nanopartikel-vermittelte physikalische Stimuli optimiert werden sollte. Dabei bediente man sich sowohl statischer als auch dynamischer Zugkräfte. Zunächst wurden Magnetfelder genutzt, um eine zyklische Dehnung zu ermöglichen. Voraussetzung dafür war das Versetzen der Sehnenzellen mit Eisennanopartikeln. Die Sehnenzellen sollten mechanischen Reizen ausgesetzt werden, die durch magnetische Kräfte hervorgerufen wurden, um eine funktionelle Minisehne zu entwickeln. Es konnte histologisch nachgewiesen werden, dass die Eisennanopartikel effizient in die Zellen aufgenommen wurden. Die Aufnahme der Eisennanopartikel in die Zelle kann über zwei Mechanismen erklärt werden. Zum einen über die endozytische Aufnahme, zum anderen über Membranfusion (Son et al. 2015). Eine mögliche Erklärung der SPIO Aufnahme wäre, dass die Eisennanopartikel über elektrostatische Wechselwirkungen der positiv geladenen Teilchen (kationische Lipide und Polymere) mit der negativ geladenen Zellmembran ins Innere der Zelle gelangen (Li et al. 2013), einer Endozytose gleichend (Arbab et al. 2005). Die Eisennanopartikel wurden nach

Aufnahme in die Zelle dazu verwendet, mechanische Kräfte auf die Zellen auszuüben. Dabei wurden die mit SPIO versetzten Zellen *in vitro* einer zyklischen Spannung und Entlastung ausgesetzt. Das Magnetfeld wurde durch Magnete erzeugt, die sich außerhalb des Kulturgefäßes befanden. Dadurch wurde eine Dehnung der Zellen bewirkt, deren Ausmaß abhängig von der Menge der Eisennanopartikel pro Zelle, der Kraft der Magnete und der Distanz der Magnete zu den Zellen war (Hughes et al. 2008).

In der Versuchsreihe, in der lediglich die Zellen (Z Gruppe) mit Eisennanopartikeln versetzt waren und täglich mit einem exogen zugeführten Magnetfeld eine Stunde lang bei einer Frequenz von 1 Hz und einer magnetischen Feldstärke von 1,32–1,37 T „trainiert“ wurden, konnte histologisch eine Zellzerstörung nachgewiesen werden. Denkbar wäre, dass die im Versuch ausgeübte Kraft des Magnetfeldes ein zu hohes Stresslevel auf die Zellen ausgeübt hat und für eine Zellzerstörung gesorgt hat. Eine dynamische Aktivierung der Sehnen-Organoiden mit Magneten war schlussendlich nicht möglich, da dies die Zellen zum Platzen brachte.

Eine gute Faserausrichtung wurde bei jenem Versuch erzielt, wo ausschließlich die Matrix (M Gruppe) mit Eisennanopartikeln versetzt war. Dies entspricht dem Ergebnis einer Studie von Antman-Passig und Shefi 2016, bei der ebenfalls ausschließlich die Kollagen-Matrix mit Eisennanopartikeln versetzt war. Es wurde ein externes Magnetfeld angelegt, welches zur Ausrichtung der Kollagenfasern beitrug. Die Ausrichtung der Fasern resultierte aus der Kraft des äußeren Magnetfeldes, welches die Eisennanopartikel zu Strängen anordnete, an welchen sich das partikelhaltige Kollagengel orientierte (Antman-Passig und Shefi 2016). Diese Erklärung lässt sich auf die M Gruppe übertragen.

Anders als bei Antman-Passig und Shefi 2016 wurden in der hier vorgestellten Arbeit zusätzlich noch Kombinationen aus intrazellulär und sich im Kollagengel befindlichen Eisennanopartikeln verwendet (Z+M Gruppe). Die gute Faserausrichtung und die intakten Zellen der Z+M Gruppe lassen vermuten, dass durch die Kombination aus gleichzeitiger Zell- und Matrixdehnung, mittels Magnetfeld, einer Zellzerstörung vorgebeugt wurde.

Vor dem Magnettraining wurde zunächst die bestmögliche SPIO Konzentration ermittelt. Die besten Ergebnisse wurden mit einer SPIO Konzentration zwischen 0,005 mg/ml und 0,0005 mg/ml erzielt. Ausschlaggebend für die Ermittlung der Idealkonzentration waren die histologischen Ergebnisse. Die Sehnen-Organoiden zeigten hierbei eine wellenförmige,

parallele Faserausrichtung, die dem sehnentypischen „Crimp“ ähnelte und somit strukturell sehr nahe an eine *in vivo* Sehne herankamen.

Wie Lee und Martin 2004 beschreiben, benötigen Zellen eine Reihe von biochemischen und biophysikalischen Reizen, um ein angemessenes Zellwachstum, Biosynthese und Gewebeumbau zu induzieren. Daher wurde in den hier vorgestellten Versuchen mit statischer und dynamischer Zugkraft gearbeitet. Nach mehrfacher Optimierung der Magnetstärke von 1,32 T–1,37 T und unterschiedlicher Anordnung der Magnetwürfel (4-Türmchen, Quaderturm), kam es trotzdem überwiegend zu Zellzerstörungen, sodass eine Aussage über die optimale Feldstärke nicht getroffen werden konnte. Die nachfolgenden Versuche wurden deshalb ohne Magnettraining fortgeführt. Nachdem die dynamische Dehnungskomponente durch das Bewegen der Magnete wegfiel, wurde lediglich mit einer statischen Zugspannung über feststehende Pins gearbeitet.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen fiel auf, dass weder bei der Konzentration von 3 mg/ml, noch bei der Konzentration von 5 mg/ml ein spontaner Abriss der Sehnen-Organoiden im Versuchszeitraum verhindert werden konnte. Lediglich die Kollagenkonzentration von 6,25 mg/ml schien einem Abriss vorzubeugen. Wobei erwähnt werden muss, dass die meisten Abrisse bei einer Kollagenkonzentration von 3 mg/ml stattfanden. Aufgrund dessen schienen die Kollagenkonzentrationen von 5 mg/ml und 6,25 mg/ml geeignet zu sein und wurden später auf das Tendon-on-a-chip Modell übertragen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Kollagenkonzentration von 3 mg/ml zu niedrig war, um der statischen Zugkraft standzuhalten. Alles in allem konnten die Ergebnisse jedoch nur unzureichend miteinander verglichen werden, da sich nie nur die Kollagenkonzentration veränderte, sondern auch andere Faktoren eine Rolle spielten, wie zum Beispiel die SPIO Konzentration und die Art der mechanischen Stimulation. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kollagenkonzentrationen von 5 mg/ml und 6,25 mg/ml sowohl in Kultur, als auch histologisch betrachtet die besten und die einer Sehne am nächsten kommenden Ergebnisse erzielt haben.

Das gewählte Analyseverfahren der qPCR konnte erfolgreich angewandt werden, da genügend RNA in ausreichender Menge aus der Minisehne extrahiert werden konnte, um die gewünschten elf Primer zu analysieren. Hierfür wurden die Sehnen-Organoiden der 3D Modelle aus Versuch 5 mit unterschiedlicher Kollagenkonzentration und SPIO Beladung verwendet. Um herauszufinden, ob die in den Sehnen-Organoiden enthaltenen Tenozyten auch genetisch

ihre Eigenschaften behalten haben (Synthese von Kollagen, Bestandteilen der ECM, Metalloproteinasen und Zytokinen) (Sharma und Maffulli 2006) bzw. aktiv an der Bildung der Sehnen-Organoiden (Smith 2011) beteiligt waren, wurde die Expression der sehnentypischen Gene (Expression von ECM-Genen) und MMP's als Marker für das ECM Remodelling ermittelt. Die Genexpressionsanalyse wurde nur für die statischen Versuche durchgeführt. Laut einer Studie von Taylor et al. 2009 ist es sinnvoll, mehrere Sehnenmarker anstatt einzelner zu verwenden, da es keinen spezifischen Marker gibt, der allein das Sehnengewebe eindeutig von Knochen- und Knorpelgewebe unterscheiden könnte. Aufgrund dessen wurden für die qPCR elf Genmarker verwendet.

Das Gen Skleraxis wurde von den 3D Modellen mit ca. 0,01–0,02 mRNA level relativ zu GAPDH verglichen mit den anderen Genmarkern niedrig exprimiert. Skleraxis ist für die Sehnenentwicklung erforderlich und wird bei der embryonalen Stammzelldifferenzierung hochreguliert (Bavin et al. 2017). Laut Scott et al. 2011 ist Skleraxis am höchsten in stark beanspruchten Kollagenfaserbündeln exprimiert. Eine verringerte Skleraxis Expression ist vor allem in bioartifiziellen Sehnen mit verringerter Kollagendichte zu beobachten. Dies wiederum bestätigt die Annahme, dass Skleraxis eine wichtige Funktion für die Erhaltung des Sehnenphänotyps inne hat und der extrazelluläre Matrixumbau vermindert wird, sobald sich die Skleraxis Expression verringert. (Scott et al. 2011). Schlussfolgernd aus der niedrigen Skleraxis Expression, kann vermutet werden, dass in den 3D Modellen kein Prozess im Sinne der Sehnenreifung und -entwicklung stattgefunden hat, sondern eine Art Remodellingprozess, was ebenso durch die erhöhte Versican Expression erklärbar wäre, die zwischen 0,4–0,8 mRNA level relativ zu GAPDH lag.

Das Gen COMP ist ebenfalls während des Wachstums der Sehne vertreten und spielt bei der Bildung von Kollagenmatrizen eine entscheidende Rolle, da es sich an fibrilläres Kollagen anheften kann. Die höchste Konzentration erreicht COMP in jungen Sehnen bis zu einem Alter von 2 Jahren. Es tritt außerdem vorwiegend in Regionen auf, in denen hohe dynamische Zugbelastungen herrschen und die Sehnen starker Beanspruchung ausgesetzt sind (Smith et al. 2002, Scott et al. 2011). Es konnte in der hier vorgestellten Arbeit eine hohe COMP Expression in den 3D Modellen, verglichen mit den restlichen Genmarkern, beobachtet werden, wobei die 3D Modelle mit einer Kollagenkonzentration von 6,5 mg/ml COMP höher exprimierten, als die 3D Modelle mit einer Kollagenkonzentration von 5 mg/ml. Die hohe Expression der 3D Modelle mit einer Kollagenkonzentration von 6,5 mg/ml könnte durch die hohe statische Zugkraft der Pins, die zur Stimulation der Sehnen-Organoiden verwendet wurde

erklärt werden. Ob es sich genetisch betrachtet hierbei um junge Sehnen handelt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beurteilt werden, da zum einen die Expressionen von COMP in den 3D Modellen zu unterschiedlich ausfielen um eine valide Aussage zu tätigen, zum anderen weil die Decorin Expression in den 3D Modellen ähnlich hoch verglichen zu COMP ausfiel, was auf einen Alterungsprozess der Sehnen hinweist.

Das kleine leucinreiche Proteoglykan Decorin zeigte im 3D Modell verglichen mit den restlichen Genmarkern eine hohe Expression von ca. 0,5 mRNA level relativ zu GAPDH. Decorin hat drei Hauptfunktionen, die zur Regulation der Sehnenstruktur beitragen. Zum einen trägt Decorin zur Stabilisierung und Ausrichtung der Kollagenfibrillen bei. Außerdem bestimmt Decorin den Fibrillendurchmesser und die Oberflächenbeschaffenheit der Kollagenfibrillen. Zum anderen wird durch Decorin die Zellproliferation reguliert und die Immunantwort stimuliert (Yoon und Halper 2005; Heinegård und Oldberg 1989). Wenn Sehnen in ein adultes Stadium kommen ist bekannt, dass die Decorinexpression ansteigt und auf einem gleich hohen Level bleibt (Zhang et al. 2006). In der Studie von Dunkman et al. 2013 wurden die strukturellen und funktionellen Merkmale der Sehnenalterung im Hinblick auf die Rolle von Decorin im Alterungsprozess von Sehnen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Sehnen mit gesteigerter Decorinexpression altersabhängige Veränderungen im Sinne einer verminderten Ausrichtung der Kollagenfasern und Zunahme des Fibrillendurchmessers zeigten (=das heißt eine hohe Decorinexpression ist ein Anzeichen für ältere Sehnen) (Ribitsch et al. 2020). Dies würde jedoch im Gegensatz zu den vielen im 3D Modell aufgefundenen Typ II Tenozyten stehen, denn diese sind in der Regel in jungen Sehnen zu finden (Smith 2011). Eine Langzeitstudie von Stanley et al. 2008 beschreibt aber, dass es zu einer Verlangsamung der Umwandlung von Typ II zu Typ I Tenozyten kommen könnte, wenn die Sehnen einem „Training“ unterzogen wurden. Dies könnte auch die hohe Typ II Tenozytendichte im 3D Modell erklären.

Die Genexpression von Versican zeigte in den 3D Modellen verglichen mit den restlichen Genmarkern hohe Werte von ca. 0,4–0,8 mRNA level relativ zu GAPDH. Dabei exprimierten die 3D Modelle mit 6,25 mg/ml verhältnismäßig mehr Versican als die 3D Modelle mit der niedrigeren Kollagenkonzentration von 5 mg/ml. Versican ist ein Chondroitinsulfat-Proteoglykan, welche eine der Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix darstellen (Rahmani et al. 2006). Es erhöht die Viskoelastizität der Sehne (Yoon und Halper 2005) und ist ebenso für die Gewebeentwicklung und -erhaltung zuständig. Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei sehnen-pathologischen Vorgängen (Rahmani et al. 2006). Laut der Studie

von Scott et al. 2008 konnte ein Zusammenhang zwischen Patellar-Tendinopathien und einem erhöhten Versican-Gehalt festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Sehnen des 3D Modells, welche durchwegs eine höhere Versican Expression zeigten, zum Zeitpunkt der qPCR möglicherweise einen Remodellierungsprozess durchlaufen hatten.

Das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin C wies in den 3D Modellen verglichen mit den restlichen Genmarkern eine mittelstarke Expression von 0,14–0,27 mRNA level relativ zu GAPDH auf. Tendenziell zeigte das 3D Modell mit einer Kollagenkonzentration von 6,5 mg/ml eine höhere Tenascin C Expression, als das 3D Modell mit einer Kollagenkonzentration von 5 mg/ml. Laut Nemoto et al. 2013 reguliert die mechanische Belastung die Expression von Tenascin C. Außerdem fördert Tenascin C die Elastizität der Sehnen bei starker Zugbelastung (Nemoto et al. 2013). Diese Aussage deckt sich zum Teil mit den Ergebnissen der hier vorgestellten 3D Modelle, bei denen eine Regulation der Expression von Tenascin C durch die statisch wirkende uniaxiale Zugkraft ebenfalls denkbar wäre. Warum jedoch die niedrigere Kollagenkonzentration im Gegensatz zur höheren Kollagenkonzentration eine verringerte Expression bedingt bleibt unklar.

Tenomodulin, ein Transmembranglykoprotein vom Typ II (Taylor et al. 2009), wurde im Vergleich zu den anderen Genmarkern bei den 3D Modellen nur sehr gering exprimiert. Tenomodulin wird mit der Reifung der Kollagenfibrillen und der Tenozytenproliferation in Verbindung gebracht (Taylor et al. 2009). Laut einer Studie von Docheva et al. 2005 zeigten genmanipulierte Mäuse mit einer verringerten Tenomodulinexpression auch eine verringerte Tenozytenproliferation, was wiederum zu einer verminderten Tenozytendichte führte. Des Weiteren wiesen die Sehnen bei Tenomodulinmangel einen vergrößerten Kollagenfibrillendurchmesser auf, was laut Dunkman et al. 2013 altersabhängigen Veränderungen entspricht. Die niedrige Tenomodulin Expression verstärkt die Annahme es handele sich bei den 3D Modellen um ältere Sehnen (Dex et al. 2016). Die Expression ist absolut gesehen gering ausgeprägt, deutet aber dennoch auf ein Sehnen-Organoid hin, weil die Expression innerhalb des Gens, verglichen mit der 2D Negativkontrolle, geringgradig erhöht ist. Die hohe Standardabweichung darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, was auf eine größere Streubreite hinweist und die Ergebnisse ungenau macht.

Kollagen Typ I macht den Hauptbestandteil der Extrazellulären Matrix einer Sehne aus (Smith 2011). Studien von Heinemeier et al. 2007 haben gezeigt, dass als Reaktion auf Belastungen die Col1a Synthese in der Sehne ansteigt. Im Hinblick auf die qPCR Werte der 3D Modelle

lassen sich die Aussagen der Studie von Heinemeier et al. 2007 auf die Versuche dieser Arbeit übertragen. Die Col1a Werte sind verglichen mit der 2D Negativkontrolle vor allem in den 3D Modellen mit einer Kollagenkonzentration von 6,25 mg/ml erhöht, welche die geringsten Ausrisse während der Kulturdauer verzeichneten und somit am längsten und effektivsten der Zugkraft ausgesetzt waren. Daraus kann man schließen, dass in den Sehnen-Organoiden eine Art Belastung durch die statische Zugkraft ausgeübt wurde, was zu einer erhöhten Col1a Expression geführt hat. Kollagen Typ II wird hauptsächlich in Sehnenregionen aufgefunden, die chondrogene Eigenschaften besitzen (Taylor et al. 2009), beispielsweise an Insertionsstellen. Col1a hingegen kann in der gesamten Sehne nachgewiesen werden (Buckley et al. 2013). Die Genexpression von Col2a1 zeigte in allen 3D Modellen verglichen mit den restlichen Genmarkern niedrige Werte. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den Sehnen-Organoiden nicht um einen chondrogen geprägten Phänotyp handelt, sondern dass die Sehnen-Organoiden eher einem Spannungssehnen-Phänotypen entsprechen.

Andersen et al. 2011 beschreiben in einer Studie, dass IL6 ein Zytokin ist, das die Kollagensynthese der Sehne stimuliert. Dabei stimuliert die mechanische Belastung die IL6 Expression, woraus eine gesteigerte Kollagensynthese resultiert. Zu diesem Zweck wurden in der Studie menschliche Achillessehnen trainiert und die IL6 Expression nach einer Trainingseinheit ermittelt. Es wurde vermutet, dass die gesteigerte IL6 Expression während der Belastung zur Regulation des Sehnenstoffwechsels beiträgt. Des Weiteren berichten Andersen et al. 2011 in ihrer Studie, dass die IL6 Expression in direktem Zusammenhang mit der Dauer der Belastung steht. Die in der qPCR ermittelte mittelstarke IL6 Expression der Sehnen-Organoiden von ca. 0,13–0,19 mRNA level relativ zu GAPDH verglichen mit den anderen Genmarkern präsentierte sich in allen Modellen nahezu gleich hoch, lediglich die 2D Negativkontrolle zeigte nahezu keine Expression. Das lässt die Vermutung zu, dass die Belastung und deren Dauer eine mittelstarke IL6 Expression bewirkt hat. IL6 funktioniert ebenso als Entzündungsmarker (Legerlotz et al. 2012). Da die Genexpression bei den Sehnen mit Eisennanopartikeln und ohne Eisennanopartikel nahezu identisch ausfielen, kann die Vermutung angestellt werden, dass die Eisennanopartikel keine entzündlichen Reaktionen in den Sehnen ausgelöst haben. Auch die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 1 und 13 zeigten laut einer Studie von Thorpe et al. 2015 eine gesteigerte Expression nach Belastung. Des Weiteren wurde berichtet, dass die Expression von MMP1 nur bei statischer Belastung gesteigert ist. Eine zu hohe Expression von MMPs wirkt sich jedoch negativ auf die Sehne aus, da sie kollagenabbauend wirken können. MMP 13 wird in Sehnen mit akuten und

chronischen Sehnenpathologien hochreguliert. MMP 1 hingegen wurde nur in akuten Verletzungen bis zu zehnmal höher exprimiert (Thorpe et al. 2015). Die Sehnen-Organoiden zeigten eine sehr hohe MMP13 Expression, verglichen mit sämtlichen Genmarkern der qPCR. Die Vermutung, dass sich eine hohe MMP13 Expression möglicherweise kollagenabbauend auf die Sehnen-Organoiden ausgewirkt hat, korreliert mit den hohen Decorin Werten, die sich ebenfalls negativ auf die Sehnenbeschaffenheit auswirken können. Des Weiteren wird Versican auch hoch exprimiert, was den Verdacht auf einen in den Sehnen-Organoiden stattfindenden Umbauprozess erhärtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich in der hier vorgestellten Machbarkeitsstudie die beiden Kern-Fragen bestätigt haben. Zum einen ist die Herstellung von Sehnen-Organoiden mit sehnähnlicher Morphologie geglückt, zum anderen waren geplante Analysen, wie Histologie und qPCR machbar. Die Histologie zeigte Strukturen, die sehnähnlicher Morphologie entsprachen, und in der qPCR konnte genügend RNA mit ausreichender Menge aus den Sehnen-Organoiden extrahiert werden, um die gewünschten elf Primer zu analysieren. Dementsprechend können die 3D Sehnenkonstrukte im Hinblick auf die Histologie und die qPCR Untersuchung als Sehnen-Organoiden angesprochen werden. Ob es sich bei den Sehnen im 3D Modell um adultes Gewebe handelt, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Aufgrund der zu kleinen Stichprobengröße in der qPCR von $n=1$ liegt keine valide Grundlage für eine statistische Auswertung vor. Es können hier aber Trends aus der qPCR abgelesen werden. Die Genexpression zeigt Auffälligkeiten, die aufgrund der erhöhten Genexpression von Decorin und der erniedrigten Genexpression von Tenomodulin, für eine Art Alterungsprozess bzw. (Um)bauprozess des Sehnen-Organoids sprechen könnten. Studien, wie die von Dunkman et al. 2013 beschreiben eine Korrelation zwischen Tenomodulinmangel und einem vergrößerten Kollagenfibrillendurchmesser, der auf die Beschaffenheit einer älteren Sehne hindeutet. Hohe Decorinexpressionen deuten ebenfalls auf Sehnenalterung hin (Ribitsch et al. 2020). Die Chipmodelle zeigten eher eine Genexpression, die juvenilen Sehnen ähnlich ist, erkennbar an der hohen Expression von Skleraxis und COMP die besonders an der Reifung junger Sehnen beteiligt sind. Des Weiteren konnte eine klare Struktur in der Expression von Genen beobachtet werden, die bei Belastung vermehrt exprimiert werden. Daraus konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die statische uniaxiale Krafteinwirkung einen gewissen mechanischen Effekt auf die Sehnen ausgeübt hat. Warum die Genexpression von insbesondere COMP, Skleraxis und Decorin in den 3D Modellen teils komplett unterschiedlich zu den

Chipmodellen ausfiel, ist vermutlich auf die unterschiedlichen Kulturbedingungen zurückzuführen. Die Chipmodelle werden in der Diplomarbeit „Pferdesehnen als organ on a chip model“-Die Übertragung eines 3D in vitro Sehnenmodells auf einen Mikrochip zur Etablierung neuer Methoden für Forschung und Medikamentenscreenings“ von Mag. med. vet. Lisa Julie Zeiger näher erläutert. Traditionelle Zellkulturmethoden, wie die der 3D Modelle, werden unter Umgebungsluft mit einer Sauerstoffmenge von 21 % durchgeführt. Eine ausreichende Sauerstoffzirkulation ist demnach vorhanden. Fehrer et al. 2007 fand heraus, dass bei einer Sauerstoffmenge von 3 %, welche einer mittleren Sauerstoffkonzentration im Gewebe entspricht, dass Differenzierungspotenzial von Zellen zunahm und es zu erhöhten Proliferationsraten kam. In den Chipmodellen herrschten ebenfalls hypoxische Bedingungen (=weniger Sauerstoff), sowie Nährstoffarmut. Dieser Zustand ist mit nativem Sehngewebe vergleichbar. Fehrer et al. 2007 bestätigt damit, dass weniger Sauerstoff die zelluläre Lebensdauer positiv beeinflusst. In den 3D Modellen hingegen herrschten normoxische Bedingungen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sie in dieser Beziehung einen Nachteil aufwiesen.

Prospektiv wäre zu empfehlen, weitere Versuche mit größerem Stichprobenumfang durchzuführen.

6 Zusammenfassung

Sehnenpathologien sind sowohl in der Humanmedizin, als auch in der Veterinärmedizin Gegenstand vieler Forschungsprojekte, da der Heilungsprozess und die Genesung von Sehnenewebe langwierig ist. Zur Erforschung solcher Fragestellungen kommen immer häufiger Bioreaktoren zum Einsatz, deren Aufgabe es ist, Kulturbedingungen so naturgetreu wie möglich nachzuahmen. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen des Studienprojektes „Entwicklung eines 3D *in vitro* Sehnenmodells“ - eine Machbarkeitsstudie Sehnenzellen *in vitro* kultiviert und in ein speziell für dieses Projekt designtes 3D Modell übertragen. Ziel der hier vorgestellten Machbarkeitsstudie war zum einen die erfolgreiche Herstellung von Sehnenkonstrukten mit sehnenähnlicher Morphologie, zum anderen die Durchführbarkeit geeigneter Analyseverfahren, wie Histologie und qPCR, um die *in vitro* Versuche überprüfen zu können zu testen.

Es wurden fünf verschiedene Versuche mit Hilfe des 3D Modells durchgeführt. Das Hauptaugenmerk der Versuche lag auf der Ermittlung der am besten geeigneten Kollagen-, Eisennanopartikel- und Zell-Konzentration, um die besten Bedingungen für die Nachahmung sehnenartigen Gewebes zu schaffen. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Kollagenkonzentration von 5 mg/ml und 6,5 mg/ml, einer SPIO-Konzentration zwischen 0,005–0,0005 mg/ml und einer optimalen Zellzahl von 660–800 Zellen/ μ l erzielt. Da das Wachstum einer Sehne *in vivo* von statischen und dynamischen Zugspannungen beeinflusst wird, wurden diese Faktoren im 3D Modell ebenfalls berücksichtigt. Die statische Zugspannung wurde mit Hilfe von feststehenden Pins erzeugt. Die dynamische Zugspannung wurde mittels Magnetwürfeln erzeugt, welche die mit Eisennanopartikeln beladenen Zellen in longitudinaler Richtung uniaxial dehnen sollten. Die dynamische Aktivierung der Sehnen-Organoiden mit Hilfe von Magneten war nicht möglich, da sie die Zellen zum Platzen brachten. Es wurde deshalb ausschließlich mit der statischen Zugspannung weitergearbeitet. Die Auswertung erfolgte makroskopisch, mittels Histologie und qPCR. Die Sehnen-Organoiden der 3D Modelle zeigten eine Genexpression, die mit einem Remodellierungsprozess in Verbindung gebracht werden könnten.

Zusammenfassend demonstrierte die hier vorgestellte Machbarkeitsstudie, dass eine Anzucht von Sehnen-Organoiden mit sehnenähnlicher Morphologie gelang und dass sie sich zur Analyse mittels Histologie und qPCR eignen.

7 Summary

Tendon pathologies are subject of many research projects in both human and veterinary medicine, because the healing process and recovery of tendon tissue is a long process. Bioreactors are increasingly being used to investigate such issues. Goal is to provide with unsatisfying outcome culture conditions closely mimicking the natural cell environment. For this purpose, tendon cells were cultivated *in vitro* and transferred into a 3D model specially designed for this project within the scope of this study “Development of a 3D in vitro tendon model” – a feasibility study. The aim of the feasibility study presented here, was on the one hand, the successful production of tendon constructs with tendon-like morphology and, on the other hand, to test the feasibility of suitable analytical procedures, such as histology and qPCR performed on the developed tendon organoids.

Five different experiments were performed using the 3D model. The main focus of the experiments was to determine the most suitable collagen, iron nanoparticle and cell concentration to create the best conditions for imitating tendon-like tissue. The best results were achieved with collagen concentrations between 5 mg/ml and 6.5 mg/ml, SPIO concentrations between 0.005-0.0005 mg/ml and an optimal cell count of 660-800 cells/μl.

Since the growth of a tendon *in vivo* is influenced by static and dynamic tensile stresses, these factors were also considered in the 3D model. The static tensile stress was generated using fixed pins. The dynamic tensile stress was generated by magnetic cubes which exerted uniaxial directed magnetic forces onto the cells loaded with iron nanoparticles to stretch the cells uniaxially in longitudinal direction. The dynamic activation of the tendon organoids with magnets and SPIO particles was not possible because they caused the cells to burst. Therefore, only the static tensile stress was successful. The resulting tendon organoids were evaluated macroscopically, histologically and by qPCR. The tendon organoids of the 3D models showed gene expression that could be indicative of a remodeling process.

In summary, the feasibility study demonstrated that a cultivation of tendon organoids with tendon-like morphology was successful and that the tendon organoids can be analyzed by histology and qPCR.

8 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
Col1a2	Kollagen Typ 1, alpha 2
Col2a1	Kollagen Typ 2, alpha 1
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
Dcn	Decorin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPX	distyrene, plasticizer, xylene
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL6	Interleukin 6
K	Kontrolle
M	Matrix gelabelt
M.	Musculus
MMP1	Matrix-Metalloproteinase-1
MMP13	Matrix-Metalloproteinase-13
mRNA	messenger Ribonucleic acid

N	Normalität
NaOH	Natriumhydroxid
OBS	oberflächliche Beugesehne
PBS	phosphate buffered saline
PDMS	Polydimethylsiloxane
qPCR	quantitative polymerase-chain-reaction
rcf	relative centrifugal force
rpm	revolutions per minute
SbpA	Sulfate transport system substrate-binding protein
ScxB	Scleraxis
SPIO	super paramagnetic iron oxide nanoparticles
T	Tesla
TBS	tiefe Beugesehne
Tnc	Tenascin C
Tnmd	Tenomodulin
Vcan	Versican
WEK Wasser	Entionisiertes Wasser
Z	Zellen gelabelt
Z+M	Zellen und Matrix gelabelt

9 Literatur

Abraham T, Kayra D, McManus B, Scott A. 2012. Quantitative assessment of forward and backward second harmonic three dimensional images of collagen type I matrix remodeling in a stimulated cellular environment. *Journal of Structural Biology*, 180 (1): 17–25. DOI 10.1016/j.jsb.2012.05.004.

Alexander A, Ajazuddin, Khan J, Saraf S, Saraf S. 2014. Polyethylene glycol (PEG)-Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 88 (3): 575–585. DOI 10.1016/j.ejpb.2014.07.005.

Andarawis-Puri N, Flatow EL, Soslowsky LJ. 2015. Tendon basic science. Development, repair, regeneration, and healing. *Journal of Orthopaedic Research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 33 (6): 780–784. DOI 10.1002/jor.22869.

Andersen MB, Pingel J, Kjær M, Langberg H. 2011. Interleukin-6: a growth factor stimulating collagen synthesis in human tendon. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 110 (6): 1549–1554. DOI 10.1152/japplphysiol.00037.2010.

Antman-Passig M, Shefi O. 2016. Remote Magnetic Orientation of 3D Collagen Hydrogels for Directed Neuronal Regeneration. *Nano Letters*, 16 (4): 2567–2573. DOI 10.1021/acs.nanolett.6b00131.

Arbab AS, Wilson LB, Ashari P, Jordan EK, Lewis BK, Frank JA. 2005. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles. Implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in Biomedicine*, 18 (6): 383–389. DOI 10.1002/nbm.970.

Arnoczky SP, Tian T, Lavagnino M, Gardner K, Schuler P, Morse P. 2002. Activation of stress-activated protein kinases (SAPK) in tendon cells following cyclic strain. The effects of strain frequency, strain magnitude, and cytosolic calcium. *Journal of Orthopaedic Research*, 20 (5): 947–952. DOI 10.1016/S0736-0266(02)00038-4.

- Bavin EP, Atkinson F, Barsby T, Guest DJ. 2017. Scleraxis is essential for Tendon Differentiation by Equine Embryonic stem cells and in Equine fetal Tenocytes. *Stem Cells and Development*, 26 (6): 441–450. DOI 10.1089/scd.2016.0279.
- Beldjilali-Labro M, Garcia Garcia A, Farhat F, Bedoui F, Grosset J-F, Dufresne M, Legallais C. 2018. Biomaterials in Tendon and Skeletal Muscle Tissue Engineering. *Current Trends and Challenges. Materials (Basel, Switzerland)*, 11 (7). DOI 10.3390/ma11071116.
- Benjamin M, Kaiser E, Milz S. 2008. Structure-function relationships in tendons. A review. *Journal of Anatomy*, 212 (3): 211–228. DOI 10.1111/j.1469-7580.2008.00864.x.
- Birch HL. 2007. Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. *International Journal of Experimental Pathology*, 88 (4): 241–248. DOI 10.1111/j.1365-2613.2007.00552.x.
- Birch HL, Sinclair C, Goodship AE, Smith RKW. 2013. Tendon and ligament physiology. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, Hrsg. *Equine Sports Medicine & Surgery Basic and Clinical Sciences of the Equine Athlete. Zweite Aufl. Edinburgh: Saunders Elsevier*, 167–188.
- Brockis JG. 1953. The blood supply of the flexor and extensor tendons of the fingers in man. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 35-B (1): 131–138.
- Buckley MR, Evans EB, Matuszewski PE, Chen Y-L, Satchel LN, Elliott DM, Soslowsky LJ, Dodge GR. 2013. Distributions of types I, II and III collagen by region in the human supraspinatus tendon. *Connective Tissue Research*, 54 (6): 374–379. DOI 10.3109/03008207.2013.847096.
- Budras KD. 2014. Beckengliedmaße. In: Mülling C, Pfarrer C, Reese S, Kölle S, Budras KD, Hrsg. *Atlas der Anatomie des Pferdes. Siebte Aufl. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft*, 56–83.
- Canty EG, Kadler KE. 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Science*, 118 (Pt 7): 1341–1353. DOI 10.1242/jcs.01731.
- Chmiel H. 2011. In: Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D, Hrsg. *Bioprozesstechnik. Dritte Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag*.
- Crevier-Denoix N, Collobert C, Pourcelot P, Denoix JM, Sanaa M, Geiger D, Bernard N, Ribot X, Bortolussi C, Bousseau B. 1997. Mechanical properties of pathological equine superficial

digital flexor tendons. *Equine Veterinary Journal*, 29 (S23): 23–26. DOI 10.1111/j.2042-3306.1997.tb05046.x.

Démarteau O, Wendt D, Braccini A, Jakob M, Schäfer D, Heberer M, Martin I. 2003. Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310 (2): 580–588. DOI 10.1016/j.bbrc.2003.09.099.

Denoix JM. 1994. Functional Anatomy of Tendons and Ligaments in the Distal Limbs (Manus and Pes). *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 10 (2): 273–322. DOI 10.1016/S0749-0739(17)30358-9.

Dex S, Lin D, Shukunami C, Docheva D. 2016. Tenogenic modulating insider factor: systematic assessment on the functions of tenomodulin gene. *Gene*, 587 (1): 1–17. DOI 10.1016/j.gene.2016.04.051.

Docheva D, Hunziker EB, Fässler R, Brandau O. 2005. Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (2): 699–705. DOI 10.1128/MCB.25.2.699-705.2005.

Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Smith RKW. 2000. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 32 (5): 369–378. DOI 10.2746/042516400777591138.

Dunkman AA, Buckley MR, Mienaltowski MJ, Adams SM, Thomas SJ, Satchell L, Kumar A, Pathmanathan L, Beason DP, Iozzo RV, Birk DE, Soslowsky LJ. 2013. Decorin expression is important for age-related changes in tendon structure and mechanical properties. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 32 (1): 3–13. DOI 10.1016/j.matbio.2012.11.005.

Elsdale T, Bard J. 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *The Journal of Cell Biology*, 54 (3): 626–637. DOI 10.1083/jcb.54.3.626.

Fackelman GE. 1973. The nature of tendon damage and its repair. *Equine Veterinary Journal*, 5 (4): 141–149.

Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitering S, Kloss F, Güllly C, Gassner R, Lepperdinger G. 2007. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*, 6 (6): 745–757. DOI 10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x.

- Friedl P, Bröcker EB. 2000. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 57 (1): 41–64. DOI 10.1007/s000180050498.
- Geckil H, Xu F, Zhang X, Moon S, Demirci U. 2010. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (London, England)*, 5 (3): 469–484. DOI 10.2217/nnm.10.12.
- Goodrich LR. 2011. Tendon and Ligament injuries and Disease. In: Baxter GM, Hrsg. Adams and Stashak's Lameness in Horses. Sechste Aufl. Hoboken: John Wiley & Sons, 927–938
- Goodship AE, Birch HL, Wilson AM. 1994. The Pathobiology and Repair of Tendon and Ligament Injury. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 10 (2): 323–349. DOI 10.1016/S0749-0739(17)30359-0.
- Halász K, Kassner A, Mörgelin M, Heinegård D. 2007. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (43): 31166–31173. DOI 10.1074/jbc.M705735200.
- Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A, Heinegård D. 1992. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (9): 6132–6136.
- Hedbom E, Heinegård D. 1993. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (36): 27307–27312.
- Heinegård D, Oldberg A. 1989. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 3 (9): 2042–2051. DOI 10.1096/fasebj.3.9.2663581.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Langberg H, Kjaer M, Baldwin KM, Schjerling P. 2007. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *The Journal of Physiology*, 582 (Pt 3): 1303–1316. DOI 10.1113/jphysiol.2007.127639.
- Hosaka YZ, Takahashi H, Uratsuji T, Tangkawattana P, Ueda H, Takehana K. 2010. Comparative study of the characteristics and properties of tendinocytes derived from three tendons in the equine forelimb. *Tissue & Cell*, 42 (1): 9–17. DOI 10.1016/j.tice.2009.06.002.

- Huang G, Wang L, Wang S, Han Y, Wu J, Zhang Q, Xu F, Lu TJ. 2012. Engineering three-dimensional cell mechanical microenvironment with hydrogels. *Biofabrication*, 4 (4): 42001. DOI 10.1088/1758-5082/4/4/042001.
- Hubrecht RC, Carter E. 2019. The 3Rs and Humane Experimental Technique. Implementing Change. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 9 (10). DOI 10.3390/ani9100754.
- Hughes S, McBain S, Dobson J, El Haj AJ. 2008. Selective activation of mechanosensitive ion channels using magnetic particles. *Journal of the Royal Society, Interface*, 5 (25): 855–863. DOI 10.1098/rsif.2007.1274.
- Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. 2011. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*, 21 (12): 745–754. DOI 10.1016/j.tcb.2011.09.005.
- Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. 1996. Collagen fibril formation. *The Biochemical Journal*, 316 (Pt 1): 1–11.
- Ker RF. 2002. The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 133 (4): 987–1000.
- Kirkendall DT, Garrett WE. 1997. Function and biomechanics of tendons. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 7 (2): 62–66.
- Kjær M. 2004. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological Reviews*, 84 (2): 649–698. DOI 10.1152/physrev.00031.2003.
- Kraus-Hansen AE, Fackelman GE, Becker C, Williams RM, Pipers FS. 1992. Preliminary studies on the vascular anatomy of the equine superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*, 24 (1): 46–51.
- Kümmerle JM, Theiss F, Smith RKW. 2019. Diagnosis and Management of Tendon and Ligament Disorders. In: Auer JA, Stick JA, Kümmerle JM, Prange T, Hrsg. *Equine Surgery*. Fünfte Aufl. St. Louis Mo.: Elsevier Saunders, 1411–1445.
- Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. 1990. Extracellular matrix. *FEBS Letters*, 268 (2): 386–393.

- Lee DA, Martin I. 2004. Bioreactor Culture Techniques for Cartilage-Tissue Engineering. In: Hollander AP, Hatton PV (eds) *Biopolymer Methods in Tissue Engineering. Methods in Molecular Biology™*, vol 238. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-428-X:159>.
- Legerlotz K, Jones ER, Screen HRC, Riley GP. 2012. Increased expression of IL-6 family members in tendon pathology. *Rheumatology (Oxford, England)*, 51 (7): 1161–1165. DOI 10.1093/rheumatology/kes002.
- Li L, Jiang W, Luo K, Song H, Lan F, Wu Y, Gu Z. 2013. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking. *Theranostics*, 3 (8): 595–615. DOI 10.7150/thno.5366.
- Liebich HG, Maierl J, König HE. 2019. Vorder- oder Schultergliedmaßen (Membra thoracica), Hinter- oder Beckengliedmaßen (Membra pelvina). In: König HE, Liebich HG, Hrsg. *Anatomie der Haustiere*. Siebte Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag, 167–239, 241–307.
- Martin I, Wendt D, Heberer M. 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 22 (2): 80–86. DOI 10.1016/j.tibtech.2003.12.001.
- Mienaltowski MJ, Birk DE. 2014. Structure, physiology, and biochemistry of collagens. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 802: 5–29. DOI 10.1007/978-94-007-7893-1_2.
- Nemoto M, Kilaki K, Yamamoto Y, Oonuma T, Hashizume K. 2013. Tenascin-C Expression in Equine tendon-derived cells during proliferation and migration. *Journal of Equine Science*, 24 (2): 17–24. DOI 10.1294/jes.24.17.
- O'Brien M. 1997. Structure and metabolism of tendons. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 7 (2): 55–61. DOI 10.1111/j.1600-0838.1997.tb00119.x.
- Pesqueira T, Costa-Almeida R, Gomes ME. 2017. Uncovering the effect of low-frequency static magnetic field on tendon-derived cells: from mechanosensing to tendogenesis. *Scientific Report*, 7 (1): 10948. DOI 10.1038/s41598-017-11253-6.
- Plunkett N, O'Brien FJ. 2011. Bioreactors in tissue engineering. *Technology and health care: Official Journal of the European Society for Engineering and Medicine*, 19 (1): 55–69. DOI 10.3233/THC-2011-0605.

- Powell CA, Smiley BL, Mills J, Vandeburgh HH. 2002. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 283 (5): C1557-65. DOI 10.1152/ajpcell.00595.2001.
- Rahmani M, Wong BW, Ang L, Cheung CC, Carthy JM, Walinski H, McManus BM. 2006. Versican: signaling to transcriptional control pathways. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84 (1): 77–92. DOI 10.1139/y05-154.
- Rees SG, Dent CM, Caterson B. 2009. Metabolism of proteoglycans in tendon. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 19 (4): 470–478. DOI 10.1111/j.1600-0838.2009.00938.x.
- Ribitsch I, Gueltekin S, Keith MF, Minichmair K, Peham C, Jenner F, Egerbacher M. 2020. Age-related changes of tendon fibril micro-morphology and gene expression. *Journal of Anatomy*, 236 (4): 688–700. DOI 10.1111/joa.13125.
- Riemersma DJ, Bogert AJ, Jansen MO, Schamhardt HC. 1996. Tendon strain in the forelimbs as a function of gait and ground characteristics and in vitro limb loading in ponies. *Equine Veterinary Journal*, 28 (2): 133–138. DOI 10.1111/j.2042-3306.1996.tb01605.x.
- Salomon F-V. 2015. Bewegungsapparat. In: Salomon F-V, Geyer H, Gille U, Hrsg. *Anatomie für die Tiermedizin*. Dritte Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 36–248.
- Schünke M. 2000. In: Schünke M, Hrsg. *Funktionelle Anatomie. Topographie und Funktion des Bewegungssystems*. Stuttgart: Thieme. 478.
- Scott A, Danielson P, Abraham T, Fong G, Sampaio AV, Underhill TM. 2011. Mechanical force modulates scleraxis expression in bioartificial tendons. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 11 (2): 124–132.
- Scott A, Lian Ø, Roberts CR, Cook JL, Handley CJ, Bahr R, Samiric T, Ilic MZ, Parkinson J, Hart DA, Duronio V, Khan KM. 2008. Increased versican content is associated with tendinosis pathology in the patellar tendon of athletes with jumper's knee. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 18 (4): 427–435. DOI 10.1111/j.1600-0838.2007.00735.x.
- Seiferle E, Frewein J. 2004. Aktiver Bewegungsapparat, Muskelsystem, Myologia. In: Frewein J, Wille K-H, Wilkens H, Hrsg. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band I Bewegungsapparat*. Achte Aufl. Berlin: Parey Verlag, 273–585.

- Sharma P, Maffulli N. 2005. Tendon injury and tendinopathy. Healing and repair. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*, 87 (1): 187–202. DOI 10.2106/JBJS.D.01850.
- Sharma P, Maffulli N. 2006. Biology of tendon injury. Healing, modeling and remodeling. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 6 (2): 181–190.
- Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. 2009. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 21 (32-33): 3307–3329. DOI 10.1002/adma.200802106.
- Smith RK, Zunino L, Webbon PM, Heinegård D. 1997. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, 16 (5): 255–271.
- Smith RKW. 2011. Pathophysiology of Tendon Injury. In: Ross MW, Dyson SJ, Hrsg. *Diagnosis and management of lameness in the horse*. Zweite Aufl. St. Louis Mo.: Elsevier Saunders, 694–706.
- Smith RKW, Gerard M, Dowling B, Dart AJ, Birch HL, Goodship AE. 2002. Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: a proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons. *Equine Veterinary Journal. Supplement*, (34): 241–244. DOI 10.1111/j.2042-3306.2002.tb05426.x.
- Son B, Kim HD, Kim M, Kim JA, Lee J, Shin H, Huang NS, Park TH. 2015. Physical Stimuli-Induced Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal stem cells using Magnetic Nanoparticles. *Advanced Healthcare Materials*, 4 (9): 1339–1347. DOI 10.1002/adhm.201400835.
- Stanley RL, Goodship AE, Edwards B, Firth EC, Patterson-Kane JC. 2008. Effects of exercise on tenocyte cellularity and tenocyte nuclear morphology in immature and mature equine digital tendons. *Equine Veterinary Journal*, 40 (2): 141–146. DOI 10.2746/042516408X266097.
- Taimela S, Kujala UM, Osterman K. 1990. Intrinsic risk factors and athletic injuries. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 9 (4): 205–215. DOI 10.2165/00007256-199009040-00002.
- Taylor SE, Vaughan-Thomas A, Clements DN, Pinchbeck G, Macrory LC, Smith RK, Clegg PD. 2009. Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue

compared to monolayer and three dimensional culture systems, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 10: 27. DOI 10.1186/1471-2474-10-27.

Thorpe CT, Chaudhry S, Lei II, Varone A, Riley GP, Birch HL, Clegg PD, Screen HRC. 2015. Tendon overload results in alterations in cell shape and increased markers of inflammation and matrix degradation. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 25 (4): e381–91. DOI 10.1111/sms.12333.

Thorpe CT, Clegg PD, Birch HL. 2010. A review of tendon injury. Why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine Veterinary Journal*, 42 (2): 174–180. DOI 10.2746/042516409X480395.

Unsworth BR, Lelkes PI. 1998. Growing tissues in microgravity. *Nature Medicine*, 4 (8): 901–907. DOI 10.1038/nm0898-901.

Vunjak-Novakovic G, Freed LE, Biron RJ, Langer R. 1996. Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage. *AIChE Journal*, 42 (3): 850–860. DOI 10.1002/aic.690420323.

Walden G, Liao X, Donell S, Raxworthy MJ, Riley GP, Saeed A. 2017. A Clinical, Biological, and Biomaterials Perspective into Tendon Injuries and Regeneration. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 23 (1): 44–58. DOI 10.1089/ten.TEB.2016.0181.

Webbon PM. 1978. A histological study of macroscopically normal equine digital flexor tendons. *Equine Veterinary Journal*, 10 (4): 253–259.

Weber S, Birkner S, Föllmann W. 2000. Etablierung von Zellkulturmodellen des Rinder-und Schafcolonepithels. In: Schöffl H, Spielmann H, Tritthart H.A, Hrsg. *Forschung ohne Tierversuche. Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen*. Erste Aufl. Vienna: Springer, 50–60.

Wight TN. 2002. Versican. A versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Current Opinion in Cell Biology*, 14 (5): 617–623.

Yoon JH, Halper J. 2005. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 5 (1): 22–34.

Youngstrom DW, Barrett JG. 2016. Engineering Tendon. Scaffolds, Bioreactors, and Models of Regeneration. *Stem Cells International*, 2016: 3919030. DOI 10.1155/2016/3919030.

Zhang G, Ezura Y, Chervoneva I, Robinson PS, Beason DP, Carine ET, Soslowsky LJ, Iozzo RV, Birk DE. 2006. Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98 (6): 1436–1449. DOI 10.1002/jcb.20776.

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung von Knochen, Muskeln und Sehnen der Vorderextremität eines Pferdes in Medialansicht (Liebich et al. 2019, S. 231).....	4
Abb. 2: Schematische Darstellung von Knochen, Muskeln und Sehnen der Hinterextremität eines Pferdes in Medialansicht (Liebich et al. 2019, S. 305).....	5
Abb. 3: Hierarchischer Aufbau einer Sehne (Dowling et al. 2000).....	8
Abb. 4: Schematische Zeichnung des Feedback loops eines Tenozyten zur Synthese von extrazellulären Matrixbestandteilen (Labat-Robert et al. 1990).....	9
Abb. 5: Entstehung einer Kollagen-Fibrille auf molekularer Ebene (Canty und Kadler 2005).....	11
Abb. 6: Schematische Darstellung des Cartilage Oligomeric Matrix Proteins (Smith 2011).....	13
Abb. 7: Stress Strain Kurve (Lastdeformationsdiagramm) (Goodship et al. 1994).....	15
Abb. 8: Die drei Säulen der Gewebeanzucht (Beldjilali-Labro et al. 2018).....	19
Abb. 9: Grundtypen von Bioreaktoren (Martin et al. 2004)	20
Abb. 10: Dehnungsbioreaktor (Powell et al. 2002)	21
Abb. 11: 3D Modell, erstellt mit Hilfe von AutoCad 2017 (Dipl. Ing. Barbara Eva Maria Bachmann, TU Wien).....	28
Abb. 12: Negativ-Silikonform (Dipl. Ing. Barbara Eva Maria Bachmann, TU Wien)	29
Abb. 13: Prototypen für die ersten Sehnenversuche	30
Abb. 14: Beschickung der Wells mit PDMS Gelen	31
Abb. 15: Versuchsaufbau 3D+Pin+Magnet des ersten Versuchs	35
Abb. 16: Versuchsaufbau 3D+Pin des ersten Versuchs	36
Abb. 17: Versuchsaufbau der schwachen Magnete (4 Türmchen und Quaderturm) des dritten Versuchs.....	40
Abb. 18: Versuchsaufbau des fünften Versuchs.....	42
Abb. 19: a) Durch das Ausstanzen entstandene Gelspitzen im PDMS Gel (schwarze Pfeile), b) PDMS-Inlays, entstanden aus den Silikonausgussformen mit ovaler Kulturkammer, c) Losgelöste Minisehne	52
Abb. 20: Toxizitätstestung der Eisennanopartikel auf die Zellen nach einer Kultivierungsdauer von einem, sieben und neunzehn Tagen	53
Abb. 21: Versuchsgruppe 3D+Pin+Magnet a) ohne SPIO, b) mit SPIO	54
Abb. 22: Versuchsgruppe 3D+Pin a) 420 Zellen/µl mit SPIO+Pin (schwarze Pfeile), b) 840 Zellen/µl mit SPIO+Pin (schwarze Pfeile).....	55

Abb. 23: Versuchsgruppe 3D+Pin a) 420 Zellen/µl ohne SPIO, b) 840 Zellen/µl ohne SPIO (schwarze Pfeile)	55
Abb. 24: Versuchsgruppe starker Magnet. a) K, Z Gruppe, b) Z+M, M Gruppe	56
Abb. 25: Versuchsgruppe schwacher Magnet „Quaderturm“. a) K, Z Gruppe, b) Z+M, M Gruppe	57
Abb. 26: Versuchsgruppe schwacher Magnet „4 Türmchen“, a) K, Z Gruppe, b) Z+M, M Gruppe	58
Abb. 27: Versuchsgruppe mit den Kollagenkonzentrationen 5 mg/µl und 6,25 mg/µl	60
Abb. 28: Versuchsgruppe 3D+Pin+Magnet, ohne SPIO (840 Zellen/µl), viele dicht lokalisierte Zellgrüppchen	61
Abb. 29: Versuchsgruppe 3D+Pin+Magnet mit SPIO (840 Zellen/µl), übersät mit Zelldebris	62
Abb. 30: Versuchsgruppe 3D+Pin mit SPIO (420 Zellen/µl), Zelldebris Kerngranula und vereinzelt Tenozyten	62
Abb. 31: Versuchsgruppe M, schwacher Magnet „4 Türmchen“	64
Abb. 32: Versuchsgruppe Z+M, schwacher Magnet „4 Türmchen“	64
Abb. 33: Versuchsaufbau Z, schwacher Magnet „Quaderturm“, Berlin-Blau Färbung	65
Abb. 34: Versuchsgruppe Z+M, schwacher Magnet "Quaderturm"	66
Abb. 35: Versuchsaufbau M, starker Magnet	67
Abb. 36: Versuchsaufbau mit unterschiedlichen SPIO Konzentrationen in Berlin-Blau Färbung. a) 2,5 mg/ml, b) 0,25 mg/ml, c) 0,025 mg/ml, d) 0,0025 mg/ml, e) Kontrolle ohne SPIO	68
Abb. 37: Versuchsaufbau mit unterschiedlicher SPIO Konzentration in HE Färbung. a) 2,5 mg/ml, b) 0,25 mg/ml, c) 0,025 mg/ml, d) 0,0025 mg/ml, e) Kontrolle ohne SPIO	69
Abb. 38: Versuchsaufbau mit unterschiedlicher Kollagenkonzentration in HE Färbung. a) 5 mg/ml ohne SPIO, b) 5 mg/ml mit SPIO, c) 6,25 mg/ml ohne SPIO, d) 6,25 mg/ml mit SPIO	71
Abb. 39: Gen Expressionsmuster der Quantitativen PCR des 2D, 3D und Chipmodells	76

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Trypsinmenge in Abhängigkeit zur Kulturgröße.....	26
Tab. 2: Mediummenge in Abhängigkeit zur Kulturgröße.....	26
Tab. 3: PBS-Menge in Abhängigkeit zur Kulturgröße	27
Tab. 4: Versuchsparameter des ersten Versuchs allgemein	33
Tab. 5: Versuchsparameter des 2D Modells	33
Tab. 6: Versuchsparameter des 3D Modells	33
Tab. 7: SPIO Hersteller mit verwendeter Konzentration	37
Tab. 8: SPIO-Konzentration und Zellzahl.....	41
Tab. 9: Anweisung zur Herstellung der Versuchsgemische mit unterschiedlichen Kollagen-Konzentrationen.....	41
Tab. 10: Arbeitsschritte zur Einbettung von histologischen Geweben	43
Tab. 11: Verwendete Primersequenzen, Produktlänge und Zyklen der qPCR	49
Tab. 12: qPCR Werte der 2D und 3D Modelle mRNA level relativ zu GAPDH	72