

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Sehnenbiopaten gesunder Pferde und Patienten in unterschiedlichen Heilungsphasen einer Tendopathie

C. Buck¹, W. Drommer², R. Wagels¹ und P. Stadler¹

Klinik für Pferde¹ und Institut für Pathologie² der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Zusammenfassung

Es wurden Feinnadelbiopsien aus dem Beugesehnenbereich von 12 gesunden Sehnen und 40 Sehnen mit Tendopathien unterschiedlicher Heilungsstadien untersucht. Mittels eines federgespannten Biopsiegerätes wurden in vivo 0,9 mm starke und 1,6 cm lange Biopate gewonnen und rasterelektronenmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 1:5000 ausgewertet. Die Beurteilung der Architektur der Kollagenfibrillen erfolgte mit Scorewerten für jedes Biopat, welche die fibrilläre Architektur und die Fibrillenstärke repräsentierten (Texturzahl und Stärkezahl). Die Textur der erkrankten Sehnen (Texturzahl = 2,62) unterschied sich rasterelektronenmikroskopisch signifikant von der Textur der gesunden Sehnen (Texturzahl = 1,3). Sehnen nach Abschluss der Reifungsphase (>120 Tage) mit Symptomen einer Tendopathie (n=18) unterschieden sich von klinisch ausgeheilten Sehnen ohne Symptome einer Tendopathie (n=7) in ihrer Fibrillentextur signifikant und in ihrer Fibrillenstärke schwach signifikant. Weiterhin unterschieden sich die Texturwerte gesunder Sehnen (n=12) signifikant von Sehnen, die nach Abschluss der Reifungsphase keine klinischen Symptome einer Tendopathie aufwiesen (n=7). Das bedeutet, dass für das Reitpferd ein funktionell ausreichendes Remodelling kollagenen Narbengewebes vorliegt, auch wenn in der Phase der fortgeschrittenen Sehnenheilung mikromorphologisch noch nicht das Bild des gesunden Sehngewebes nachgewiesen wird. Übereinstimmend mit den Befunden der klinischen und sonographischen Voruntersuchung konnte in den Biopaten eine für das Heilungsstadium typische Fibrillenordnung dargestellt werden. Somit wurde die Beurteilung einer Sehnenläsion anhand ihrer Mikrostruktur in vivo möglich. Die Untersuchung von Feinnadelbiopaten aus den Beugesehnen könnte in Zukunft, vor allem bei fraglichen sonographischen Befunden, eine wertvolle Ergänzung zur herkömmlichen Diagnostik darstellen. Auf dieser Basis können eventuell weitere Fragestellungen in Bezug auf die Korrelation zwischen klinischen, sonographischen und mikrostrukturellen Befunden einerseits, sowie der Belastbarkeit einer Sehne nach einer Tendopathie andererseits, untersucht werden.

Schlüsselwörter: Pferd, Sehne, Heilung, Diagnostik, Biopsie, Rasterelektronenmikroskopie

Scanning electron microscopy examination of tendon biopsies in healthy horses and patients with different stages of tendon healing.

In this study core biopsies of 12 healthy flexor tendons and 40 flexor tendons at different stages of tendopathia (tendonitis) were investigated. The biopsy was taken in vivo with an automatic biopsy device and a 20 G (0,9 mm) needle. The harvested tissue was 1,6 cm long and was examined by scanning electron microscopy (SEM) at a 1:5000 magnification. The fibril architecture of each biopsy was objectively evaluated by a double score system that represented the fibril organisation and fibril diameter (texture-value and diameter-value). The healthy tendons had an average texture-value of 1,3; the tendopathia group had a significantly deviating average diameter value of 2,62. Tendons with completed maturing phase (>120 d), still having symptoms of tendopathia (n=18), had a significantly deviating texture-value and a low significantly deviating diameter-value to tendons with completed maturing-phase but without symptoms of tendopathia (n=7). Further there was a significant difference between the texture-value of healthy tendons (n=12) and matured tendons without symptoms of tendopathia (n=7). According to the results of clinical and sonographic pre-examination, the typical fibril organisation in the different stages of healing could be shown in the biopsy tissue. Thus a tendon lesion could be pathologically classified by the microstructure in vivo. In future the SEM examination of tendon biopsy could develop as an important addition to current diagnostic, especially in ambiguous sonographic cases. The described method could be an instrument, investigating clinical, sonographic and micromorphological findings in the tendon and their correlation to mechanical properties after tendon injury.

Keywords: Horse, tendon, healing, diagnostic, biopsy, scanning electron microscope

Einleitung

Erkrankungen der Beugesehnen stellen bei Sportpferden aufgrund des langwierigen Heilungsverlaufes und der hohen Rezidivneigung ein bedeutendes orthopädisches Problem dar. Dabei ist es häufig schwierig, mit Hilfe der klinischen und sonographischen Untersuchungen das Stadium des Heilungsverlaufes einer Tendopathie, bzw. die Struktur und damit

eventuell auch die Belastbarkeit der Sehne zu ermitteln. Deshalb stellte sich die Frage, ob die Sehnenstruktur elektronenmikroskopisch in verschiedenen Phasen der Heilung einer Tendopathie besser zu beurteilen ist, als mit anderen derzeit verfügbaren Diagnostika.

Mit Tendopathie wird eine Schädigung des zu über 95 % aus linearen Kollagenfibrillen des Typs I bestehenden, gebündel-

ten Fasergewebes bezeichnet (Mohr 1987), die durch übermäßige physikalische Belastung aber auch durch degenerative Veränderungen hervorgerufen werden kann (Dowling et al. 2000).

Die Sehnenheilung wird in drei Phasen eingeteilt (Stashak 1989). Sie beginnt mit einer ca. zehntägigen exsudativen Entzündungsphase. Es schließt sich eine ca. sechswöchige proliferative Phase an, die von Granulation und Resorption gekennzeichnet ist. Etwa um den 45. Tag liegt ein Gleichgewicht zwischen Abbau des geschädigten Kollagens und fibrillärer Neubildung vor. In der darauf folgenden Reifungsphase (ca. 45. – 120. Tag) richten sich die Fibroblasten und Kollagenfibrillen allmählich in Längsrichtung aus, der Anteil dicker, gut strukturierter Fibrillen steigt an (Watkins et al. 1985, Stashak 1989).

Im Anschluss an diese Reifungsphasen benötigt das fibröse Narbengewebe je nach Schwere der Verletzung und Heilungsverlauf bis zu 3 Jahre für die Reorganisation (Silver et al 1983, Stashak 1989). Dennoch seien die dichten Faserbündel des neugebildeten Kollagengewebes bereits nach 6 Monaten der Morphologie normalen Sehnenngewebes ähnlich (Watkins et al. 1983).

Im Verlauf der Sehnenheilung wird hauptsächlich Kollagen vom Typ I gebildet. Daneben entstehen aber auch weitere Kollagentypen, insbesondere vom Typ III (bis zu 30 %) (Williams et al. 1980). Die neugebildeten Fibrillen sind zunächst dünner als die vom Typ I und zeigen eine räumlich ungeordnete Ausrichtung, mit einer schwächeren Zugfestigkeit als der von originärem Sehnenngewebe (Dowling et al. 2000). Da für eine optimale Sehnenheilung sowohl eine vollständige Ruhigstellung als auch eine zu starke Belastung vermieden werden muss (Dowling et al. 2000), wäre eine Diagnostik wünschenswert, die zukünftig Hinweise für die Belastbarkeit einer Sehne liefert. Derzeit ist die Ultrasonographie die bildgebende Diagnostik der Wahl. Die Auflösung der sonographischen Bilder reicht allerdings auch mit hochauflösenden Schallköpfen (z.B. 10 Mhz), insbesondere im fortgeschrittenen Stadium einer Tendopathie, häufig nicht aus, die Heilungsphase exakt zu bestimmen. Deshalb wird die Mikromorphologie der Sehne untersucht. Dazu wurde von Wagels et al. (2001) zunächst gezeigt, dass eine Biopsie mit einer Feinnadel von 0,9 mm Durchmesser geeignet ist, routinediagnostisch Sehnenngewebe vom Pferd zu gewinnen, ohne die Sehne klinisch und funktionell zu beeinträchtigen.

In der vorliegenden Studie sollte ermittelt werden, welche diagnostischen Möglichkeiten die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen eines solchen Feinnadelbiopтатаes beinhalten. Dazu wurden 52 Sehnenproben untersucht und die Ergebnisse den klinischen und sonographischen Befunden zugeordnet.

Material und Methode

Bei 22 Patienten mit einer oder mehreren Tendopathien wurden 40 klinisch veränderte Sehnenstrukturen unterschiedlicher Erkrankungsgrade untersucht. Die Tiere gehörten den Rassen Deutsches Warmblut (n=14), Traber (n=6), Haflinger (n=1) und Andalusier (n=1) an, hatten ein Durchschnittsalter von $9,9 \pm 5$ Jahren und wurden vornehmlich als Reitpferde genutzt. Tabelle 1 zeigt die Lokalisationen, aus denen die Biopotate entnommen wurden. Als Kontrolle (n=12) dienten 6

Pferde der Rasse Deutsches Warmblut, 4 Traber sowie 2 Ponys mit klinisch unveränderten Sehnen. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe betrug 9,2 Jahre. Zunächst fand bei allen

Tab 1 Übersicht über die Lokalisationen der Biopotatenahme bei Sehnen mit Tendopathien. 1:OBS: oberflächliche Beugesehne, TBS: tiefe Beugesehne, UTB: Unterstützungsband der TBS, FT: Fesselträger, FTS: Fesselträgerschenkel

Biopsy locations at tendons with tendopathia. OBS: superficial digital flexor tendon, TBS: deep digital flexor tendon, UTB: inferior check ligament, FT: suspensory ligament, FTS: sesamoid part of suspensory ligament

Struktur:	vorne		hinten		Anzahl gesamt
	rechts	links	rechts	links	
OBS	16	10	1	0	27
TBS	0	1	2	1	4
UTB	2	3	0	0	5
FT	1	1	0	0	2
FTS	0	2	0	0	2
Summe:	19	17	3	1	40

erkrankten Pferden eine klinische Lahmheitsuntersuchung statt. Anschließend wurden die Sehnenläsionen ultrasonographisch bei einer Auflösung von 7,5 oder 10 Mhz mit einem Linearschallkopf im Transversal- und Longitudinalschnitt dargestellt. Es wurden je nach Standort der Patienten 3 Ultraschallsysteme eingesetzt: Scanner 100, 7,5 MHz, PIE-Electronics; Siemens Sonoline Elegra, 7,5 MHz; Ausonics Impact VFI, 10 MHz.

Außerdem wurden 12 Sehnen der klinisch unauffälligen Kontrolltiere makroskopisch und rasterelektronenmikroskopisch beurteilt. Die Biopotate wurden mit dem Biopsiegerät MANAN PRO MAG 2.2 und der dazugehörigen Hohnadel mit dem Durchmesser 0,9 mm gewonnen (Wagels et al. 2001). Das Biopotate wurde mit physiologischer Kochsalzlösung von der Nadel auf einen kleinen Filterpapierstreifen gespült und in toto in 2,5 % gepuffertes Glutardialdehyd überführt (Abb 1).



Abb 1 Fixiertes Biopotate einer gesunden Sehne (dicker Pfeil) mit Fragment von Ober- und Unterhaut (dünner Pfeil)
Fixed specimen of a healthy tendon (thick arrow) with fragments of epidermis and subcutis (thin arrow)

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM ; Zeiss DSM 940) wurden die Biopotate mit der Methode nach Ohtani präpariert und die Schichten der Haut, des Peritendineums und des Sehnenngewebes zunächst in einer Übersichtsvergrößerung von 1:200 identifiziert und anschließend bei einer Arbeitsvergrößerung von 1:5000 beurteilt. Die fibrilläre Morphologie wurde an fünf Lokalisationen in Bezug auf die Fibrillendichte, Fibrillenlinearität, Fibrillenparallelität und Stärke der Fibrillen untersucht und mit Hilfe eines Scoresystems klassifiziert. Dabei ergab sich aus den Texturparametern Dichte, Linearität und Parallelität die „Fibrillentexturzahl“, die für gesunde bis hochgradig erkrankte Sehnenabschnitte in einem Bereich von 1,0 bis 4,0 (Scorewert) lag. Außerdem wurde die Fibrillen-

stärke als relativer Anteil dünner Fibrillen (<80 nm) an der Summe der Fibrillen des Gesichtsfeldes des Rasterelektronenmikroskopes als „Fibrillenstärkezahl“ ermittelt und mit Punkten von 1,0 bis 5,0 (Scorewerte) bewertet. Dabei charakterisieren sowohl für die Fibrillentextur als auch für die Fibrillenstärke niedrige Scorewerte geringe und hohe Scorewerte hochgradige pathologische Veränderungen. Die rasterelektronenmikroskopischen Befunde der Biopate aus 40 pathologisch veränderten Sehnenlokalisationen wurden mit denen der gesunden Sehnen verglichen. Außerdem wurden verschiedene Heilungsphasen der erkrankten Sehnen in Bezug auf ihre rasterelektronenmikroskopische Architektur anhand von 34 Biopaten untersucht (Stashak 1989), zusätzlich wurde überprüft mit welchen klinischen und sonographischen Befunden sie einhergingen.

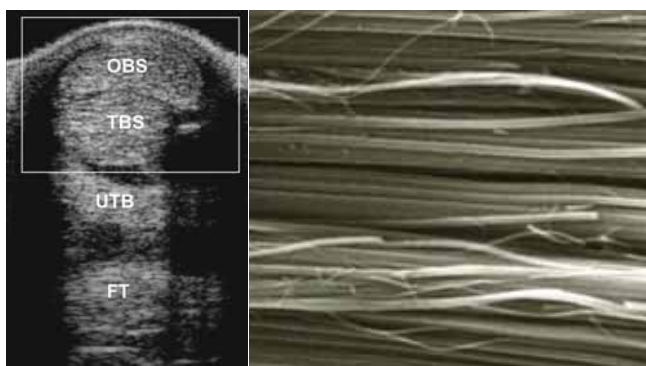


Abb 2 (links) Sonographischer Querschnitt der metakarpalen Beugesehnen. Es liegen homogene, echoreiche und deutlich konturierte Sehnenstrukturen vor. OBS: oberflächliche Beugesehne, TBS: tiefe Beugesehne, UTB: Unterstützungsband der TBS, FT: Fesselträger, Region 2a; Linearschallkopf: 7,5 MHz; Siemens Sonoline Elegra. Die sonographischen Darstellungen der oberflächlichen und tiefen Beugesehne der Abbildungen entsprechen dem hier gelb gekennzeichneten Bereich.

Transverse sonograph of healthy metacarpal flexor tendons with homogenous and echogenous structures. OBS: superficial digital flexor tendon TBS: deep digital flexor tendon UTB: inferior check ligament FT: suspensory ligament Area 2a, linear probe: 7,5 MHz; Siemens Sonoline Elegra

Abb 3 (rechts) Biopat einer gesunden TBS. Die Fibrillen liegen dicht, linear und parallel. Scorewerte Einzelbild: 1,0/1,2. REM Aufnahme 1:5000

Biopsy specimen of healthy DDFT. Fibril arrangement is dense, linear and parallel. Score values: 1,0/ 1,2 SEM 1:5000

Gruppe 1 umfasste alle Tendopathien (n=9), die sich in einem Heilungsstadium vor Abschluss der Reifungsphase befanden (vor dem 120. Tag der Tendopathie). Gruppe 2 enthielt 18 untersuchte Sehnen mit einer Tendopathie nach abgeschlossener Reifungsphase (Erkrankung älter als 120 Tage), die klinische Symptome einer Tendopathie aufwiesen. In Gruppe 3 wurden 7 Pferde mit einer Tendopathie nach abgeschlossener Reifungsphase (Erkrankung älter als 120 Tage) zusammengefasst, die bei mäßiger Belastung als Reitpferd keine klinischen Symptome einer Tendopathie mehr aufwiesen. Zusätzlich wurde die Mikrostruktur eines Biopats aus einer akut erkrankten Sehne in der Entzündungsphase sowie von fünf hochgradig metaplastisch veränderten Sehnen untersucht. Der statistische Vergleich der Scorewerte der Gruppen gesunder und erkrankter Sehnen, sowie der Gruppen 2 und 3 erfolgte mittels des Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

Ergebnisse

Alle rasterelektronenmikroskopisch untersuchten Sehnen wiesen mikromorphologisch dicke (> 80 nm) und weniger starke Fibrillen (< 80 nm) in unterschiedlichen Verteilungsmustern auf. Biopate aus gesunden Sehnen zeigten dicht und parallel angeordnete Fibrillen, die linear ausgerichtet und über 80 nm stark waren (s. Abb.3).

Bei der Objektivierung der rasterelektronenmikroskopischen Befunde ergaben sich signifikante Unterschiede sowohl in Bezug auf die Fibrillentextur als auch die Fibrillenstärke zwischen den Biopaten der gesunden und erkrankten Sehnen (Abb 4). Der mittlere Scorewert für die Fibrillentextur betrug

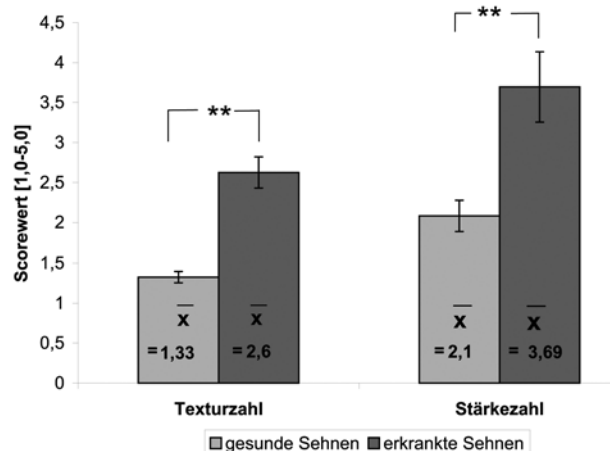


Abb 4 Rasterelektronenmikroskopisch ermittelte Unterschiede der Fibrillentextur und Fibrillenstärke (mittlere Scorewerte) von gesunden (n=12) und erkrankten (n=40) Sehnen

Different mean values of fibril texture and diameter in healthy (n=12) and damaged tendons (n=40), examined with REM

bei den gesunden Sehnen 1,33 und bei den kranken Sehnen 2,63 ($p < 0,01$, s. Tab. 2). Der mittlere Scorewert für die Fibrillenstärke betrug bei den gesunden Sehnen 2,1 und in der Gruppe der erkrankten Sehnen 3,7 ($p < 0,01$, s. Tab. 2). Obwohl bei den meisten der erkrankten Sehnen mehrere pathologische Erscheinungsformen in einem Biopat erkenn-

Tab 2 Fibrillentexturzahl und Fibrillenstärkezahl von gesunden und erkrankten im REM untersuchten Sehnen (Scorewerte, Minimum, Maximum und Standardabweichungen (Stabw.))

Texture- and diameter values of healthy tendons and damaged tendons, examined with SEM (average score-values, minimum, maximum and standard deviations (Stabw.))

	gesunde Sehnen (n=12)		erkrankte Sehnen (n=40)	
	Texturzahl	Stärkezahl	Texturzahl	Stärkezahl
Mittelwert \bar{x}	1,33	2,1	2,6	3,69
Stabw. \square	0,14	0,50	0,39	0,88
min	1,1	1,2	2	2
max	1,5	3,2	3,6	5

bar waren, konnte mit Hilfe der Scorewerte eine Bewertung des pathologischen Zustandes erfolgen (Abb. 5). Die in der Entzündungsphase untersuchte Tendopathie zeigte im rasterelektronenmikroskopischen Bild hochgradig verbreiterte Zwischenräume und geknickte Fibrillen (Abb. 6 b). Es lag zudem ein hoher Anteil starker Fibrillen mit einer bedingt vorhandenen Parallelität vor.

Biopate aus Sehnen mit Tendopathien vor dem Abschluss der Reifungsphase (< 120 Tage alte Tendopathien; Gruppe 1)

zeigten einen hohen Anteil dünner, gewundener Fibrillen (Stärkezahl 4,0), die eine deutlich reduzierte Parallelität und Linearität (Texturzahl 2,83) im Vergleich zu den gesunden Sehnen und Sehnen mit fortgeschrittener Heilung aufwiesen (Abb. 7). Sowohl Pferde mit (Gruppe 2) als auch ohne klinische Symptome (Gruppe 3) einer Tendopathie wiesen nach Abschluss der Reifungsphase (> 120 Tage alte Tendopathien) stets Sehnen mit einer mäßigen bis hohen Dichte des fibrillären Gewebes auf .

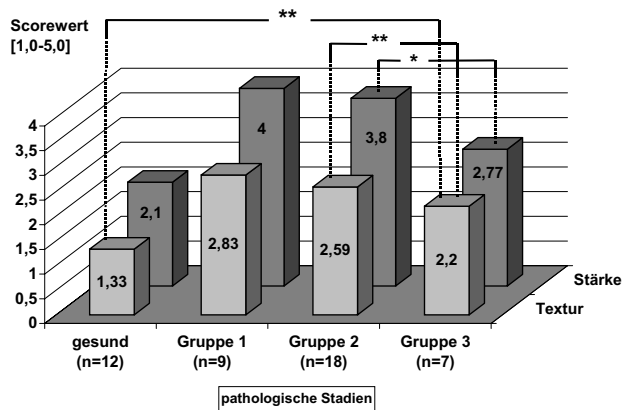


Abb. 5 Fibrillentextur () und Fibrillenstärke () in unterschiedlichen Heilungsphasen der Tendopathie Gruppe 1 (n=9): Tendopathien vor dem Abschluss der Reifungsphase (< 120. Tag). Gruppe 2 (n=18): Tendopathien nach Abschluss der Reifungsphase (> 120. Tag), die klinische Symptome aufwiesen. Gruppe 3 (n=7): Tendopathien nach Abschluss der Reifungsphase (> 120. Tag), die keine klinischen Symptome mehr aufwiesen.

Values of fibril texture () and fibril diameter () in different stages of tendon healing. Group 1 (n=9): Tendopathia with uncompleted maturing phase (< d. 120). Group 2 (n=18): Tendopathia with completed maturing phase (> d. 120), still showing clinical signs. Group 3 (n=7): Tendopathia with completed maturing phase (> d. 120), showing no clinical signs.

Nach Abschluss der Reifungsphase zeigten Biopotate von Pferden mit klinischen Symptomen einer Tendopathie (Gruppe 2) häufig eine angedeutete Parallelität und Linearität (Fibrillentexturzahl=2,59 Abb. 8). Dagegen zeigten rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Pferden ohne klinische Symptome einer Tendopathie (Gruppe 3) in dieser Phase eine signifikant deutlichere ($p < 0,01$) Parallelität und Linearität der Kollagenfibrillen (Fibrillentexturzahl=2,2 Abb. 9). Der Anteil dünner Fibrillen (< 80 nm) war bei Pferden mit klinischen Tendopathiesymptomen (Gruppe 2) nach Abschluss der Reifungsphase schwach signifikant größer ($p < 0,05$; Fibrillenstärkewert = 3,8) als in der Gruppe der Pferde ohne klinische Symptome einer Tendopathie (Gruppe 3) (Fibrillenstärkewert = 2,77). Auch die Fibrillentextur gesunder Sehnen (Texturwert = 1,33) unterschied sich rasterelektronenmikroskopisch von Sehnen nach Abschluss der Reifungsphase bei Pferden ohne klinische Tendopathiesymptome (Texturwert = 2,2) signifikant ($p < 0,01$).

Diskussion

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass mit Hilfe von in vivo entnommenen Sehnenbiopтатаen (Wagels et al., 2001) die Mikrostruktur des Gewebes rasterelektronenmikroskopisch

analysiert werden kann. Bis jetzt liegen lediglich rasterelektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen von Sehnenstrukturen vor, die an Präparaten toter Pferde durchgeführt wurden (Silver et al. 1983, Oberbeck 1992).

Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, Sehngewebe wiederholt im Rahmen von In-vivo-Studien histologisch zu untersuchen und Entwicklungen der Heilung mikromorphologisch bis zur vollständigen Ausheilung zu beobachten. Die vorliegende Arbeit zeigt die Tendenz auf, dass mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie aufgrund der Beurteilung von Fibrillentextur und -stärke die Heilungsphase und der Schweregrad einer Tendopathie auch bei unbekannter Dauer der Erkrankung erkennbar ist. Dieses zeigte sich in dem signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) der Sehmentextur in unterschiedlichen Heilungsphasen und wird durch die Scorewerte repräsentiert. Die mit einer vollständig anechogenen Zentralläsion einhergehende Entzündungsphase (Abb. 6) zeigte dagegen im Rasterelektronenmikroskop eine hochgradige Desintegration des Fasergewebes, das noch keine Neubildungen von Fibrillen aufwies. Derzeitig können in dem akuten Stadium der Erkrankung (Entzündungsphase) bis jetzt sonographisch vorrangig die Flüssigkeitsinfiltrationen und rasterelektronenmikroskopisch dagegen die noch verbliebenen strukturellen Anteile des Sehnendefektes dargestellt werden. Weitere Untersuchungen in der Entzündungsphase müssen zeigen, ob im akuten Stadium einer Tendopathie noch andere rasterelektronenmikroskopische Manifestationen möglich sind. Die Entzündungsphase war jedoch nicht Gegenstand dieser Untersuchung, da das langfristige Ziel in der Determination der frühestmöglichen Belastung liegt.

In dieser Studie wurden insbesondere Tendopathien vor und nach Abschluss der Reifungsphase auf rasterelektronenmikroskopische Unterschiede der fibrillären Parameter in der frühen und späten Heilung untersucht. Außerdem interessierte, ob und in welchem Ausmaß das Gewebe von symptomfreien Pferden nach Abschluss der Reifungsphase (Gruppe 3) der Mikromorphologie gesunder Sehnen ähnelt. Dabei wurde erstmalig in vivo bestätigt, dass bei einer fortgeschrittenen Reifung die Fibrillentextur von einer weitgehend parallelen Ausrichtung, fortgeschrittenen Linearität und Dichte geprägt war und die stärkeren Fibrillen häufiger vorkamen als bei erkrankten Sehnen in der frühen Reifung (Silver et al 1983, Rühmann 1992). In Bezug auf die Heilungsphasen konnten folgende sonographische und mikromorphologische Veränderungen dargestellt werden: Im Proliferationsstadium ist die Sehne sonographisch meistens zunehmend homogen, das heißt, die in der Entzündungsphase meistens deutlich abgegrenzten echolucenten Areale (Marr et al. 1993) werden in der Proliferationsphase nicht mehr festgestellt. Rasterelektronenmikroskopisch stellten sich die Fibrillen in der Proliferationsphase einer Sehnenkrankung vollständig ungeordnet, dünn und nicht parallel dar. Außerdem ist die sonographisch schon im Stadium der Proliferation erkennbare Erhöhung der Echogenität rasterelektronenmikroskopisch als Anstieg der Gewebedichte im Vergleich zur akuten Tendopathie nachweisbar. Einige Autoren halten diese dünne und gewundene Erscheinungsform der Fibrillen vorwiegend für Ersatzkollagen vom Typ III (Silver et al 1983, Dowling et al. 2000). In der Reifungsphase und darüber hinaus wiesen auch die Sehnenläsionen dieser Arbeit sonographisch eine weitergehende Tendenz zur Homogenität und höherer Echogenität auf und zeigten im sonographischen Längsbild bei guter Geräteauflö-

sung, wie auch in anderen Untersuchungen (Marr et al. 1993) bereits eine lineare, parallele Struktur. Rasterelektronenmikroskopisch wird nach Abschluss der Reifungsphase eine Zunahme dicker und organisierter Fibrillen erkannt. Die hier festgestellten Zusammenhänge zwischen Heilungsstadien und rasterelektronenmikroskopischem Bild bei in vivo ent-

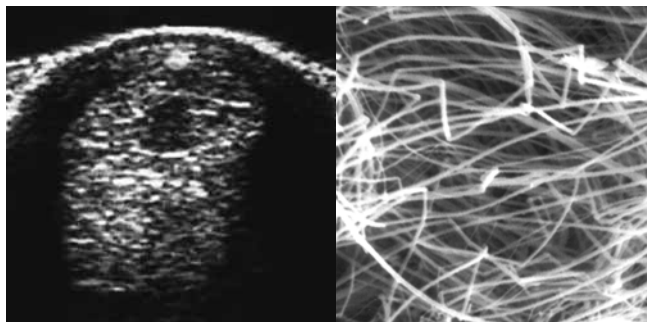


Abb 6a Sehne in der Entzündungsphase. Sonographischer Querschnitt der OBS und TBS an der Vordergliedmaße mit 5 Tage alter Tendopathie der oberflächlichen Beugesehne. Die Biopsie der Abbildung 6b wurde aus dem zentralen echolucenten Bereich der oberflächlichen Beugesehne (Pfeil) entnommen. Region 2a ; 10 MHz, Linearsonde, Ausonics Impact VFI

Transverse sonograph of superficial and deep flexor tendon with 5 days old tendopathia in SFT. Biopsy (fig. 6b) was taken from central echolucent area in SFT (arrow) area 2a , linear probe 10 MHz, Ausonics Impact VFI

Abb 6b REM-Aufnahme (1:5000) des Biopates der oberflächlichen Beugesehne mit 5 Tage alter Tendopathie (siehe Abb. 6a): Die originären Fibrillen sind hochgradig auseinandergewichen und zum Teil geknickt.

SEM - graph (1:5000), taken from biopsy specimen of 5 days old Tendopathia (fig. 6a): The fibrils have moved apart and some are broken.

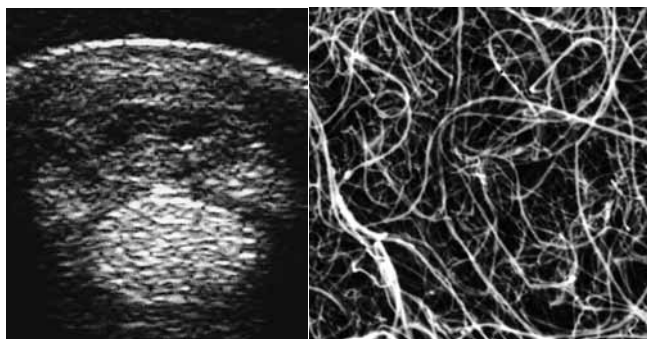


Abb 7a Sehne vor Abschluss der Reifungsphase (Gruppe 1; Tendopathie besteht seit circa vier Wochen). Sonographischer Querschnitt der oberflächlichen und tiefen Beugesehne. Der Querschnitt der oberflächlichen Beugesehne weist eine unklare Kontur auf und ist vergrößert, die Struktur ist inhomogen und multiple echolucente Arealen sind im Wechsel mit hyperechogenen Bereichen erkennbar. Region 3b ; 10 MHz, Linearsonde, Ausonics Ausonics Impact VFI

Transverse sonograph of superficial and deep flexor tendon . The SFT shows an unclear and increased outline. The structure is not homogenous and multiple echolucent areals alternate with hyperechogene areals. Area 3b , linear probe 10 MHz, Ausonics Impact VFI

Abb 7b Biopate der oberflächlichen Beugesehne mit Tendopathie vor Abschluß der Reifungsphase (siehe Abb. 7a) mit einem Scorewert für die Fibrillentextur von 3,3 und für die Fibrillenstärke von 5 (3,3/5). Der Befund weist auf die Neogenese ungeordneter Fibrillen hin. REM-Aufnahme 1:5000. *Biopsy specimen of Tendopathia before completing the maturing-phase (< 120 d.) Texture value: 3,3 Diameter value: 5,0. These findings refer to a neogenesis of non organised fibrils. SEM - graph 1:5000*

nommenen Sehnenbiopsien ähneln weitgehend den von Oberbeck (1992) an Schlachthofpräparaten erhobenen Befunden. Mit der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung dicker, linearer Fibrillen (>80 nm) erscheint indirekt Kollagen des Typs I im geheilten bzw. heilenden Gewebe nachweisbar. Dieses kann zukünftig eventuell durch einen Ver-

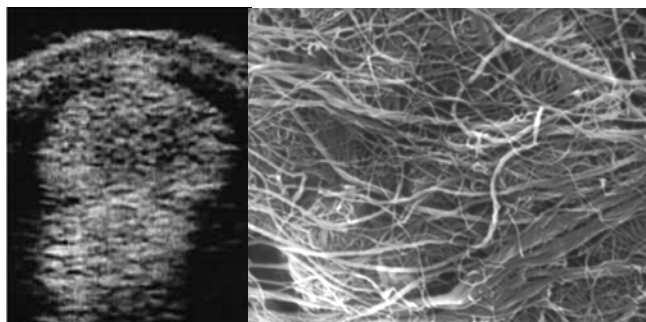


Abb 8a Sehne nach Abschluss der Reifungsphase mit klinischen Symptomen einer Tendopathie (>120 Tg. Gruppe 2). Sonographischer Querschnitt der oberflächlichen und tiefen Beugesehne. In der OBS liegt eine ggr. inhomogene Struktur mit zentral ggr. echoarmen Arealen vor. Region 2a ; 7,5 MHz, Linearsonde, PIE Scanner 100

Transverse sonograph of superficial and deep flexor tendon . The SFT shows an inhomogenous structure and some little echolucent areas in the center. Area 2a , linear probe 7,5 MHz, PIE Scanner 100

Abb 8b Biopate der oberflächlichen Beugesehne eines Pferdes mit klinischen Tendopathiesymptomen nach Abschluß der Reifungsphase (Abb. 8a), mit einem Scorewert für die Fibrillentextur von 2,6 und für die Fibrillenstärke von 4,0 (2,6 / 4,0). Die Textur ist nur mäßig parallel, besteht aus einem hohen Anteil dünner Fibrillen und weist auf eine nur mäßige Reife hin. REM-Aufnahme 1:5000

Biopsy specimen of Tendopathia with clinical signs after completing the maturing-phase (> 120 d.) Texture value: 2,6 and Diameter value: 4,0. As a sign of incomplete maturation the texture is moderate parallel and has a high content of thin fibrils. SEM - graph 1:5000

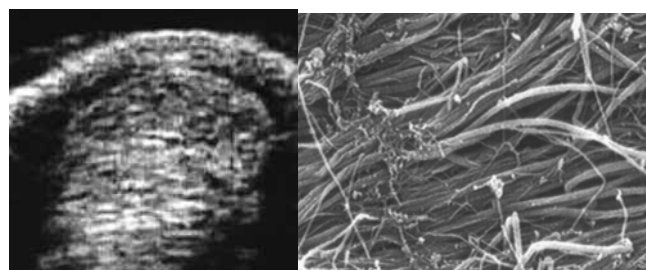


Abb 9a Sehne nach Abschluss der Reifungsphase ohne klinische Symptome (>120 Tg. , Gruppe 3). Sonographischer Querschnitt der oberflächlichen und tiefen Beugesehne. Es liegt eine inhomogene Struktur mit hypoechogenen Arealen vor. Region 2a ; 7,5 MHz, Linearsonde, PIE Scanner 100. *Transverse sonograph of superficial and deep flexor tendon . The SFT shows an inhomogenous structure and some little echolucent areas. Region 2a , linear probe 7,5 MHz, PIE Scanner 100*

Abb 9b Biopate der oberflächlichen Beugesehne ohne Tendopathiesymptome nach Abschluss der Reifungsphase (s. Abb. 9a). Der Scorewert für die Fibrillentextur ist 2,0; für die Fibrillenstärke 3,0 (2,0/3,0). Dieses Biopate weist eine Textur mit hohem Reifegrad auf, das heißt, eine Fibrillenstärke vorwiegend über 80 nm, weitgehend parallele Ausrichtung der Fibrillen und hohe Linearität im Vergleich zur Abb. 8b, REM-Aufnahme 1:5000. *Biopsy specimen of Tendon without clinical signs of tendopathia after completing the maturing-phase (> 120 d.) Texture value: 2,0 and Diameter value: 3,0. As a sign of progressing maturation the texture is quite parallel and has a higher content of linear and thick fibrils than the tendon in fig. 8b, SEM - graph 1:5000*

gleich der Fibrillenmorphologie mit einem z.B. immunhistochemischem direktem Nachweis des Kollagentypes der Einzelfibrille beim Pferd bestätigt werden. Mit Hilfe des hier verwendeten Scoresystems könnte dann eventuell nach weiteren Untersuchungen anhand der Stärke- und Texturzahl direkt nachgewiesen werden, wie hoch der Anteil des neu gebildeten Kollagens vom Typ I ist. Die Information über den Kollagentyp und die Architektur der Fibrillen könnte die Einschätzung der funktionellen Heilung und somit optimale Rehabilitationsmaßnahmen ermöglichen.

Auf der Grundlage der vorliegenden Studie könnten weiterführende Untersuchungen zur Belastbarkeit von Sehnen unterschiedlicher Heilungsstadien basieren. Insbesondere auch deshalb, weil sowohl beim Warmblüter (Lütke-Vestert, 1999) als auch beim Vollblüter (Stadtbaumer, 2001) Ergebnisse vorliegen, die zeigen, dass Pferde mit pathologischen Ultraschallbefunden nicht nur lahmfrei, sondern auch hochgradig belastbar sein können. Zusätzlich könnte mit dieser Methode geklärt werden, ob bei einer Tendopathie eine Restitutio ad integrum möglich ist. Die signifikant unterschiedlichen Textur-Scorewerte von Reitpferden mit gesunden und geheilten Sehnen zeigen, dass funktionell ausreichend regeneriertes Sehngewebe sich deutlich von der Mikromorphologie gesunden Gewebes unterscheidet. Ob das auch für eine starke Belastung des Reitpferdes oder des Rennpferdes gilt, muss noch erarbeitet werden. Da der Status der Fibrillenarchitektur die Belastbarkeit einer Sehne bedingt (Möller et al. 2000), erscheint die rasterelektronenmikroskopische der lichtmikroskopischen Untersuchung für die Diagnostik von Tendopathien überlegen. Dennoch können für spezielle Fragestellungen die nach der hier angewandten Methode gewonnen Biopate auch für eine lichtmikroskopische Untersuchung herangezogen werden (Wagels et al. 2001). Die lichtmikroskopische Untersuchung könnte z. B. eine Ergänzung der sonographischen und rasterelektronenmikroskopischen Diagnostik in der entzündlichen Phase einer Tendopathie liefern, in der eine Beurteilung zellulärer Bestandteile, von Entzündungsprodukten, Metaplasien oder Nekrosen der Sehne bedeutsam ist.

Mit der vorliegenden Arbeit werden somit erste Ergebnisse zur In vivo-Analyse der Feinstruktur bei Tendopathien dargestellt. Dabei gelingt eine weitergehende Differenzierung des erkrankten Gewebes als mit einer hochauflösenden sonographischen Technik. In Zukunft könnten sich beide Methoden ergänzen, um einerseits mit Hilfe der Sonographie die Größe einer Sehnenläsion einschätzen und die Lokalisation zur Biopatenentnahme festlegen zu können. Andererseits ist die Mikromorphologie, die das funktionelle Gerüst der Sehne darstellt, rasterelektronenmikroskopisch besser erkennbar.

Literatur

- Birch, H.L., J. Bailey und A.E. Goodship (1999): Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons. *Equine vet.J.* 31, 391-396
- Dowling, B.A., A.J. Dart, D.R. Hodgson und R.K.W. Smith (2000): Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine vet.J.* 32, 369-378
- Lütke-Vestert, A. (1999): Ultraschalluntersuchung an den Beugesehnen der Vordergliedmaße bei 100 lahmfreien Sport- und Freizeitpferden. *Vet-Med. Diss. TiHo Hannover* 1999
- Marr, C.M., I. McMillan, J.S. Boyd, N.G. Wright und M. Murray (1993): Ultrasonographic and histopathological findings in equine superficial flexor tendon injury. *Equine Vet. J.* 25, 23-9
- Möller, H.D., C.H. Evans und N. Maffulli (2000): Aktuelle Aspekte der Sehnenheilung. *Der Orthopäde*, 29, 182-187
- Mohr, W. (1987): Spezielle Patholog. Anatomie, Bd.19, Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, 59-275
- Oberbeck, K. (1992): Klinische und morphologische Untersuchungen von Tendopathien der Beugesehnen beim Pferd. *Vet-Med. Diss. TiHo Hannover* 1992
- Rühmann, K. (1999): Makroskopische, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung von Sehnenbiopäten und biopatierten Sehnen beim Pferd. *Vet-Med. Diss. TiHo Hannover* 1999
- Silver, I.A. und P.D. Rossdale (1983): A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine vet. J. Suppl.* 1, 1 – 43
- Stadtbaumer, G. (2001): Einsatz bildgebender Verfahren im Rahmen der Kaufuntersuchung beim Pferd, Diskussion zum Vortrag; BPT-Kongress, Hannover
- Stashak, T.S. (1989): Adam's Lahmheit bei Pferden, Verlag Schaper, Hannover, 447-478
- Wagels, R., K. Rühmann, P. Stadler und W. Drommer (2001): Feinnadelbiopsie aus den Beugesehnen des Pferdes. *Tierärztl. Praxis* 29 (G), 199-205
- Watkins, J.P., J.A. Auer, S. Gay und S.J. Morgan (1985): Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: collagen-type transformation and tissue morphologic reorganization. *Am. J. Vet. Res.* 46, 2091-2096
- Williams, I.F., A. Heaton und K.G. McCullagh (1980): Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. *Res. Vet. Sci.* 28, 302-310

Die Anfertigung der Untersuchungen wurde ermöglicht durch die freundliche Unterstützung der Klinik Dr. W. Jahn, Bargteheide, der Klinik Dr. P. Tilkorn, Gelsenkirchen und der Praxis Dr. F. Büscher in Coppenbrügge.

Carsten Buck
Klinik für Pferde
Tierärztliche Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
carsten.buck@tiho-hannover.de