

Histologische Quantifizierung der Vaskularisation der oberflächlichen Beugesehnen an Gliedmaßenpräparaten von Warmblutpferden

Elena L. Siegenthaler¹, Christian Fricker¹, Jasmin Kuratli², Anton Fürst³ and Nicole Borel²

¹ Tierklinik Rossweid, Gockhausen

² Institut für Veterinärpathologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

³ Klinik für Pferdechirurgie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

Zusammenfassung: Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne (OBS) gehören zu den häufigsten Verletzungen der Sportpferde. Das Ziel dieser Studie war es, die Blutgefäßversorgung der oberflächlichen Beugesehne (OBS) bei gesunden Pferden zu quantifizieren und Unterschiede zwischen Vorder- und Hintergliedmaßen sowie verschiedener Abschnitte der Sehne zu untersuchen. Es wurde die OBS von 6 Pferden entnommen und histologische Schnitte von proximalen, mittleren und distalen Abschnitten angefertigt. Mittels Immunhistochemie für alpha smooth muscle actin wurden die Gefäße markiert und anschließend ausgezählt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Gefäßdichte im mittleren Drittel der OBS signifikant geringer war als im proximalen ($p = 0,015$) und distalen ($p = 0,015$) Bereich. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Gefäßdichte zwischen Vorder- und Hintergliedmaßen festgestellt ($p = 0,3508$). Die verwendeten Methoden der Histologie und Immunhistochemie erwiesen sich als geeignet, um die Blutgefäßversorgung zu quantifizieren. Die Korrelation zwischen der geringen Gefäßdichte im mittleren Abschnitt der OBS und der Anfälligkeit für Verletzungen in diesem Sehnenbereich zeigt die Bedeutung der Blutversorgung in der Pathogenese der Tendopathie. Weitere Forschung ist erforderlich, um die Pathophysiologie von Tendopathien besser zu verstehen und mögliche therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Schlüsselwörter: Pferd, Tendopathie, Blutgefäßversorgung, oberflächliche Beugesehne, Histologie, Immunhistochemie

Historical quantification of the vascularization of the superficial digital flexor tendons in limb preparations from Warmblood horses

Tendinopathies of the superficial digital flexor tendon (SDFT) are among the most common injuries in sport horses. The aim of this study was to quantify the blood vessel supply of the SDFT in healthy horses and to investigate differences between forelimb and hindlimb vessel density and to compare different anatomical regions of the tendon. The SDFT of six horses were collected and histological cross-sections of them were prepared at three different levels (proximal, middle, distal). Immunohistochemistry for alpha smooth muscle actin was used to label the vessels and count them. The results showed that the vessel density was significantly lower in the middle third of the SDFT than in the proximal ($p = 0.015$) and distal ($p = 0.015$) regions. However, no significant differences in vascular density were observed between forelimb and hindlimb vessel quantities ($p = 0.3508$). The histology and immunohistochemistry methods used were found to be adequate to quantify blood vessel supply. Vascular density was shown to be lowest in the middle third of the SDFT, where tendinopathies are most common. Blood vessel supply to the SDFT plays a role in the development of tendinopathies and a lower vessel density could lead to increased susceptibility to injury. This study provides new results on the quantity of blood vessel supply to the SDFT in healthy horses and suggests that further research is needed to better understand the pathophysiology of tendinopathies and to develop potential therapeutic approaches.

Keywords: horse, tendinopathy, blood supply, superficial flexor tendon, histology, immunohistochemistry

Zitation: Siegenthaler EL, Fricker C, Kuratli J, Fürst A, Borel N (2024) Histologische Quantifizierung der Vaskularisation der oberflächlichen Beugesehnen an Gliedmaßenpräparaten von Warmblutpferden. *Pferdehik Equine Med* 40, 4–9, DOI 10.21836/PEM20240101

Korrespondenz: Elena Laura Siegenthaler, Tierklinik Rossweid, Rossweidstrasse 1, 8044 Gockhausen, Switzerland, elena@tierklinikrossweid.ch

Eingereicht: 25. August 2023 | **Angenommen:** 11. November, 2023

Einleitung

Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne (OBS) gehören zu den häufigsten Verletzungen der Sportpferde verschiedener Disziplinen [1–5]. Sehnenverletzungen treten bei Rennpferden besonders häufig auf. Deshalb werden Tendopathien bei Vollblutpferden in der Literatur am häufigs-

ten erwähnt [6]. Die OBS der Vordergliedmaßen ist deutlich häufiger betroffen als die der Hintergliedmaßen [1–5]. Verschiedene prädisponierende Faktoren wie Alter, Geschlecht, Mangel an Fitness, Beschlag, Bodenbeschaffenheit, Rennstanz, chronische Überbelastung und Müdigkeit werden in der Literatur beschrieben [2, 5, 7–10]. Auch erbliche Risikofaktoren für Tendopathien der OBS scheinen von Bedeu-

tung zu sein [11]. Als diagnostisches Hilfsmittel wird nebst der klinischen Untersuchung am häufigsten die ultrasonographische Untersuchung der OBS durchgeführt, welche auch eine Beurteilung des Heilungsverlaufes ermöglicht [12–14]. Die Therapiemöglichkeiten sind sehr vielfältig und beinhalten die Gabe von NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs), kontrollierte Bewegung, Schockwellen-Therapie, Chirurgie, verschiedene intraläsionale Injektionen oder eine Kombination aus diesen [15, 16]. Häufig heilen die Schäden in der Sehne aber nicht komplett aus und es treten bei vielen Pferden Rezidive auf [17–19]. Die Pathophysiologie der Tendopathie der OBS ist bisher nicht genau geklärt. Einmalige mechanische Überbelastung der Sehne aber auch repetitive Belastungen, welche zu einer Degeneration der zentralen Sehnenanteile führt, werden diskutiert [20–22]. Der klinischen Tendopathie geht somit oftmals eine Phase der subklinischen Degeneration voraus. Diese konnte durch makroskopische und histologische Veränderungen an Sehnen von klinisch unauffälligen Pferden nachgewiesen werden [22, 23]. Der genaue Mechanismus der Degeneration ist jedoch unbekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass exzessive Bewegung, die mit dem Alter natürlich auftretenden Degenerationsprozesse beschleunigt, indem sich die Wellenstruktur und die Kollagenfaserlänge im Zentrum der Sehne reduzieren [24–27]. Die Temperaturunterschiede der verschiedenen Bereiche der OBS scheinen ebenfalls einen Einfluss auf die Entstehung der sogenannten Core Lesions (Degeneration im Zentrum der Sehne) zu haben. Durch eine starke Bewegung kommt es zur Freisetzung von Wärme in der Sehne und damit zur Erwärmung des Sehnenkerns auf bis zu 45 °C, was zu einer Schädigung von Matrixproteinen führen kann [28, 29]. Die Blutgefäßversorgung der oberflächlichen Beugesehne ist durch Gefäße unterschiedlichen Ursprunges sichergestellt. Zum einen erfolgt sie über den Muskel, aus dem die Sehne hervor geht, aber auch über die Insertion am Knochen und durch Gefäße aus dem Peritendineum sowie innerhalb der Sehnencheiden aus dem Mesotendineum [30]. Die Rolle der Sehnedurchblutung bei der Entstehung von Tendopathien ist jedoch noch nicht genau geklärt. Durch mechanische Kompression der Blutgefäße und die Vasokonstriktion durch Adrenalin unter Belastungsstress kommt es zu einer relativen Hypoxie, zur Ansammlung toxischer Stoffwechselprodukte und zur Zelldegeneration [18]. Diese degenerativen Prozesse im Kern der Sehne führen zu einer Schwächung des Gewebes und könnten somit zu einer erhöhten Anfälligkeit für Verletzungen der Sehne führen. Zudem konnte in mikroangiographischen Studien gezeigt werden, dass die besonders häufig von Sehnenbeschädigungen betroffenen zentralen Bereiche der OBS schlechter vaskularisiert sind als andere Anteile der Sehne [31–33].

Ziel dieser Pilotstudie war die quantitative Erfassung der Blutgefäßversorgung von gesunden oberflächlichen Beugesehnen an der Vorder- und Hintergliedmaße vergleichend im proximalen, mittleren und distalen Abschnitt der entnommenen Anteile der Sehne. Insbesondere sollte untersucht werden, ob im mittleren Bereich die Vaskularisation geringer ist als im proximalen und distalen Bereich und ob Unterschiede zwischen der Vorder- und Hintergliedmaße bestehen. Diese Untersuchungen erfolgten mittels Histologie und Immunhistochemie an Sehnen von Schlachtpferden, die keine Veränderungen an den Sehnen gezeigt haben.

Material und Methoden

Entnahme und Vorbereitung der Sehnenbestücke

Für diese Untersuchung wurden die oberflächlichen Beugesehnen (OBS) der linken Vorder- und Hintergliedmaße von 6 Pferden nach der Schlachtung entnommen. Die frisch entnommenen Sehnenpräparate reichten proximal vom mittleren Karpal- bzw. mittleren Tarsalgelenk bis distal zum proximalen Rand des Fesselringbandes. Nach der Entnahme wurden sie unmittelbar in eine 10% gepufferte Formalinlösung verbracht, wo sie für 10 Tage fixiert wurden. Die Markierung der Sehnen erfolgte durch eine Fadenschleife jeweils am distalen Sehnenende (1 Schleife für die OBS der Vordergliedmaße, 2 Schleifen für die OBS der Hintergliedmaße). Nach der Formalinfixation wurden die Sehnen mit einem Skalpell proximal, in der Mitte und distal zugeschnitten. Die proximale und distale Lokalisation wurde jeweils 4 cm (± 1 cm) von den jeweiligen Sehnenenden entfernt definiert, die mittlere Lokalisation lag in der Mitte davon (± 1 cm). Pro Pferd wurde von allen 6 definierten Lokalisationen jeweils ein 0,5–0,7 mm dicker Sehnenquerschnitt entnommen und in 2 Hälften quer geteilt. Die daraus resultierenden 12 Sehnenproben pro Pferd wurden einzeln in Histologie-Kassetten (Firma Sakura, Horgen, Schweiz) verbracht. Im Labor wurde das Gewebe gemäß Standardverfahren in Paraffinblöcke eingebettet (Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet, FFPE). Anschließend wurden mit dem Mikrotom 2 μ m dicke histologische Schnitte angefertigt und nach Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Um eine optimale Schneidbarkeit der Sehnenblöcke zu erreichen, wurden diese vorher auf Eiswasser gelegt. Die HE-gefärbten Schnitte wurden auf Vollständigkeit des Sehnenquerschnittes und auf pathologische Veränderungen, welche zum Ausschluss aus der Studie führen würden, untersucht. Dabei wurde jeder Querschnitt (12 Proben pro Pferd, total 72 HE-Schnitte) durch einen Board-certified Pathologen (NB) mit einem Lichtmikroskop (Leitz SM Lux, Stuttgart, Deutschland) in einer 200-fachen Vergrößerung mäanderförmig untersucht, um Veränderungen auszuschließen.

Immunhistochemie für alpha smooth muscle actin

Die Gefäße aller Sehnenquerschnitte ($n = 72$) wurden mittels Immunhistochemie (IHC) untersucht. Zur Gefäßmarkierung wurde ein primärer monoklonaler Antikörper, der gegen human alpha smooth muscle actin (anti-SMA, Verdünnung 1:400, M0851, Dako, Baar, ZG, Schweiz) gerichtet ist, verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Dako RealKit (Dako). Für die IHC wurden 2 μ m dicke FFPE-Gewebe-Schnitte auf positiv-geladene Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert (4 \times für 5 Min.) und über eine absteigende Ethanolreihe (100%, 95%, 70%) bis hin zu Wasser (Aqua Dest) rehydriert. Danach wurden die Schnitte in den Autostainer (Dako-Autostainer Universal Staining System Nr. S3400, Dako) transferiert. Der primäre Antikörper (anti-SMA) wurde im Verhältnis 1:400 mit Dilutionspuffer (Nr. S2022, Dako) verdünnt und die Schnitte wurden damit für 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit TBS-Waschpuffer (Tris-buffered saline) gewaschen, für 10 Minuten bei RT in Peroxidase-Blocking-Puffer (Nr. S2023, Dako) eingetaucht und nochmals mit TBS-Waschpuffer gespült. Danach wurden

die Schnitte mit dem sekundären Antikörper (Dako RealKit) für 30 Minuten bei RT inkubiert und mit TBS-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Substrat Diaminobenzidine (DAB, Dako) für 10 Minuten bei RT eingefärbt, aus dem Dako-Autostainer genommen und mit Aqua Dest gewaschen. Für die Kontrastfärbung wurden die Schnitte für 2 Sekunden in Hämatoxylin getaucht und mit Leitungswasser gespült. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 100%) und mit Xylol wurden die Schnitte dehydriert und mit einem Deckglas versehen.

Auszählung der Gefäße pro Sehnenquerschnitt

Alle Schnitte wurden mit dem Hamamatsu Photonics's NanoZoomer HT2,0 Schnittscanner (Hamamatsu, Japan) eingescannt. Die digitalen Schnitte wurden in die Bildanalyse-Software Visiopharm (Visiopharm Integrator System [VIS], Version 6.7.0.2590, Visiopharm, Hoersholm, Denmark) importiert, um die Sehnenquerschnitte (in mm²) zu berechnen. Die Querschnitte der jeweils zusammengehörigen Hälften wurden addiert.

Für die Auszählung der Gefäße wurde die Betrachtungs-Software NDP.view2 (NanoZoomer Digital Pathology, Hamamatsu, Japan) verwendet. Dabei wurde jeder Querschnitt (72 Schnitte) in einer 25-fachen Vergrößerung mäanderrförmig untersucht und die Gefäße mit einem mechanischen Handzähler gezählt. Die Anzahl Gefäße der jeweils zusammengehörenden Hälften wurden wiederum addiert. Der Gesamtquerschnitt der jeweiligen Sehnen in mm² wurde ebenfalls ermittelt, um die Anzahl Gefäße pro mm² auszuwerten.

Statistische Analyse

Die Rohdaten (gezählte Gefäße und Gesamtquerschnitte der Sehnen) wurden in Excel eingetragen und die Anzahl Gefäße pro mm² berechnet (Formel: gezählte Gefäße/Gesamt-

querschnitte der Sehnen). Die statistische Analyse fokussierte dabei auf die beiden Haupthypothesen, namentlich: 1. Es besteht ein Unterschied in der Gefäßdichte zwischen Vorder- und Hintergliedmaßen und 2. Die Gefäßdichte der verschiedenen Lokalisationen (distal, mitte, proximal) unterscheidet sich. Die Daten der Gefäßdichte wurden in R Studio (<https://cran.r-project.org/>) importiert. Für Hypothese 1 wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt (nach Prüfung der Paardifferenzen auf Normalverteilung mittels Shapiro Wilk Test). Für Hypothese 2 wurde eine Varianzanalyse für wiederholte Werte (repeated measure ANOVA) durchgeführt, die Modellbedingungen getestet und eine Bonferroni Korrektur angewendet.

Resultate

Bei den untersuchten Pferden handelte es sich um fünf Wallache und einen Hengst. Das durchschnittliche Alter der Pferde zum Zeitpunkt der Schlachtung betrug 10,66 Jahre, wobei das jüngste Pferd sieben und das älteste Pferd 14 Jahre alt war. Es handelte sich bei allen sechs Pferden um Warmblüter (Tab. 1).

Die Gefäßdichte von insgesamt 36 Querschnitten der oberflächlichen Beugesehne (OBS), bestehend aus jeweils drei Querschnitten (proximal, mitte, distal) der Vorder- und der Hintergliedmaße wurde mittels alpha smooth muscle actin Immunhistochemie (Abb. 1) ausgezählt (Tab. 2). Die Mittelwerte der Gefäßdichte der drei Lokalisationen (proximal, mitte, distal) unterschieden sich deutlich, während der Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gefäßdichte der beiden Gruppen (Vorder- und Hintergliedmaße) nicht sehr ausgeprägt war (Abb. 2). Allerdings war die Streuung der einzelnen Werte groß. Abb. 3 und 4 zeigen, dass die Gefäßdichte der Vordergliedmaße bei den meisten Pferden in der Mitte kleiner ist als proximal und distal. In Abb. 3 wird deutlich, dass Pferd 1 bei beiden Gliedmaßen ein abweichendes Verteilungsmuster der Messdaten zeigt (rote Linie), während Pferd

Tab. 1 Beschreibung der Pferde. | Description of the horses.

	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4	Pferd 5	Pferd 6
Alter	8	14	13	12	7	10
Geschlecht	Wallach	Wallach	Wallach	Wallach	Hengst	Wallach
Rasse	Schweizer WB	Irländer	Hannoveraner	Schweizer WB	Schweizer WB	Warmblut

WB = Warmblut

Tab. 2 Anzahl Gefäße pro mm² Sehnenfläche. | Number of vessels per mm² tendon cross-section.

	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4	Pferd 5	Pferd 6
Vordergliedmaße proximal	30,72	28,88	17,81	20,40	26,15	20,22
Vordergliedmaße mitte	30,94	24,12	15,64	19,97	19,36	14,39
Vordergliedmaße distal	30,05	26,86	19,99	25,34	21,94	22,27
Hintergliedmaße proximal	35,91	20,08	12,21	24,07	21,13	19,28
Hintergliedmaße mitte	33,12	28,99	21,54	28,87	25,38	14,59
Hintergliedmaße distal	30,53	26,66	21,49	27,60	23,70	18,60

6 nur bei der Hintergliedmaße abweicht. In der Hintergliedmaße war die Gefäßdichte meist proximal am kleinsten, mit Ausnahme von Pferd 1 und 6. Fasst man die Messwerte aller Pferde zusammen (Abb. 4), bestätigt sich das Muster, dass die Gefäßdichte mittig der Vordergliedmaße von der proximalen und distalen Lokalisation abweicht, während dieser Trend an der Hintergliedmaße nicht erkennbar ist. Mit einem gepaarten t-Test konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied ($p = 0,3508$) der mittleren Gefäßdichte in den OBS zwischen Vorder- und Hintergliedmaßen besteht. Die Gefäßdichte der Beugesehnen der Vordergliedmaße war in der Mitte jedoch signifikant kleiner als proximal ($p = 0,015$), als distal ($p = 0,015$) und auch als der Mittelwert von proximal und distal ($p = 0,014$). An der Hintergliedmaße hingegen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Lokalisationen ($p > 0,05$) festgestellt werden.

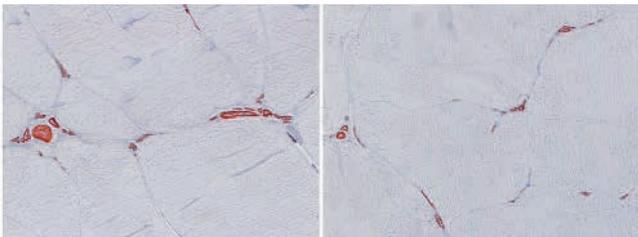


Abb. 1 Alpha smooth muscle actin Immunhistochemie von zwei repräsentativen Sehnenquerschnitten. Der linke Ausschnitt weist eine deutlich höhere Gefäßdichte auf als der rechte Ausschnitt. | *Alpha smooth muscle actin immunohistochemistry of two representative tendon cross-sections. The left panel shows a significantly higher vascular density compared to the right panel.*

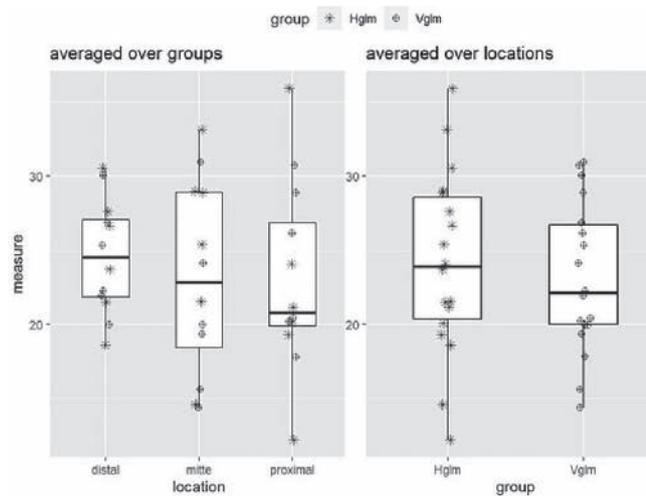


Abb. 2 Linke Bildhälfte: Mittelwerte der gemessenen Gefäßdichten aller Sehnenquerschnitte (Vorder- und Hintergliedmaße) gruppiert nach Lokalisation (proximal, mitte, distal). Rechte Bildhälfte: Mittelwerte der gemessenen Gefäßdichten gruppiert nach Vorder- und Hintergliedmaße. Die Box-Plots fassen die Streuung der Werte zusammen (25er, 50er, 75er Perzentile mit Ausläufern bis 10er und 90er Perzentile), währenddem die Mittelwerte der Hintergliedmaßen als Sterne und die der Vordergliedmaßen als Diamanten dargestellt sind. | *Left panel: Mean values of the measured vascular densities of all tendon cross-sections (forelimbs and hindlimbs) grouped by locations (proximal, middle, distal). Right panel: Mean values of the measured vascular densities grouped by forelimb and hindlimb. The box plots summarize deviation of values (25, 50, 75 percentiles with whiskers down to 10 and up to 90 percentiles), while mean values of the hindlimbs are depicted as asterisks and those of the forelimbs as diamonds.*

Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte anhand von 6 Pferden gezeigt werden, dass die Gefäßdichte der oberflächlichen Beugesehne der Vordergliedmaße in der Mitte signifikant

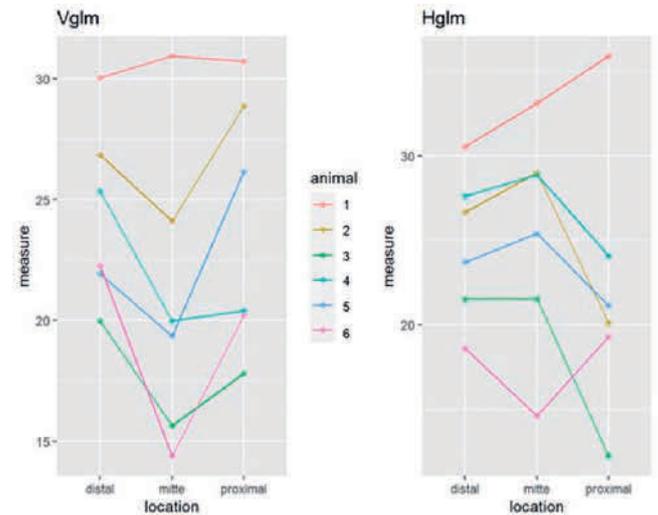


Abb. 3 Wechselwirkungsdiagramme gegliedert nach Vordergliedmaße (Vglim, links) und Hintergliedmaße (Hglim, rechts). Die gemessenen Werte der Gefäßdichten der sechs Pferde wurden aufgeschlüsselt nach Lokalisation. Die Messwerte, die vom gleichen Pferd stammen, sind mittels gleichfarbiger Punkte dargestellt und mit Linien verbunden. | *Interaction diagrams categorized by forelimb (FL, left) and hindlimb (HL, right). The measured values of vascular densities of all six horses are categorized by localization. The data collected from the same horse are represented by dots of the same color and connected by lines.*

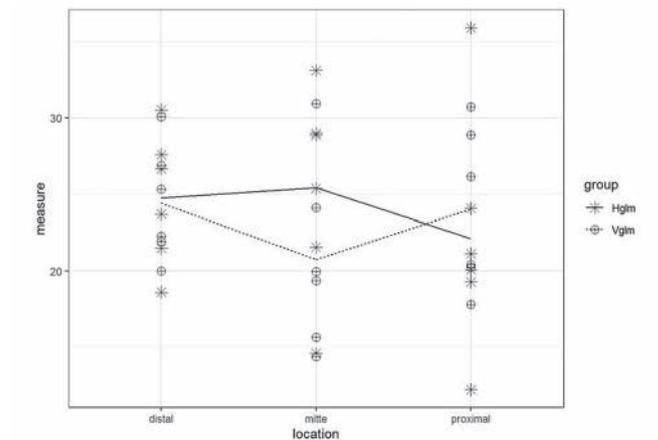


Abb. 4 Das Wechselwirkungsdiagramm zeigt die Mittelwerte der Gefäßdichten aller Pferde gruppiert nach Lokalisation und Gliedmaße. Von jeder Kombination aus «Gruppe und Lokalisation» wurde der Mittelwert der gemessenen Gefäßdichten berechnet. Die Mittelwerte aus derselben Gruppe (Vglim vs. Hglim) für die entsprechenden Lokalisationen sind mit Linien verbunden (durchgezogene Linien: Hglim, gestrichelte Linien: Vglim) und die Messpunkte der einzelnen Pferde sind mit Sternen (Hglim) oder Zielkreuzen (Vglim) dargestellt. | *This interaction diagram shows the mean values of vascular densities for all horses grouped by location and limb. For each combination of „group and location,” the mean value of the measured vascular density was calculated. The mean values from the same group (forelimb vs. hindlimb) for the corresponding locations are connected by lines (solid lines: hindlimb, dashed lines: forelimb), and the data points of individual horses are represented by asterisks (hindlimb) or crosses (forelimb).*

geringer war als auf proximaler und distaler Ebene. Dies könnte bedeuten, dass dieser Bereich empfindlicher auf hypoxische Zustände reagiert und deshalb anfälliger für Tendopathien ist. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne am häufigsten in der mittleren Region des Metacarpus auftreten [12, 19, 34]. Die Gefäßdichte pro Lokalisation unterschied sich jedoch nur bei der Vordergliedmaße, nicht aber bei der Hintergliedmaße.

Die Mechanismen der equinen und humanen Tendopathien sind sehr ähnlich und eignen sich deshalb gut für Vergleiche von Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie [35]. Eine ähnliche Studie aus der Humanmedizin [36] hat Achillessehnen auf ihre Gefäßdichte untersucht und ebenfalls im mittleren Sehnenquerschnitt die geringste Anzahl an Gefäßen ermitteln können. Die Autoren beschreiben diese reduzierte Vaskularisation der mittleren Sehnenregion als prädisponierender Faktor für die gut bekannte Achillessehnenruptur. Das Gefäßmuster könnte hypoxische Zustände und damit degenerative Prozesse in der Sehne begünstigen. Eine ältere Studie [37] hingegen konnte keine Unterschiede der Gefäßdichte entlang der Achillessehne feststellen, die Gefäßanzahl wurde jedoch lediglich an Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitten gezählt. In der Studie von Zantop et al. 2003 wurden die Gefäße mittels Immunhistochemie markiert, wobei ein Antikörper gegen Laminin, eine Komponente der Basalmembran, zur Anwendung kam. Parallel durchgeführte Injektionsstudien zeigten eine gute Übereinstimmung mit der Immunhistochemie. Die Immunhistochemie bietet Vorteile gegenüber der Histologie (Hämatoxylin und Eosin-Färbung), da auch kleine kollabierte Kapillaren identifiziert werden können.

Einerseits kann die Vaskularisierung (Zahl der Gefäße pro Sehnenquerschnitt) die Entstehung von Tendopathien beeinflussen, andererseits können auch Gefäßveränderungen relevant sein. Eine weitere Studie aus der Humanmedizin [38] konnte mittels Histopathologie und Elektronenmikroskopie degenerative Prozesse in verschiedenen Sehnen bei Personen älter als 35 Jahre feststellen. Die Autoren schlussfolgern, dass solche Veränderungen spontane Rupturen begünstigen. Als Pathogenese werden ebenfalls hypoxisch-bedingte degenerative Prozesse der Tenozyten und der Kollagenfasern beschrieben. Bezüglich der Gefäße wird eine Verengung oder Obliteration von Arterien und Arteriolen infolge Hypertrophie der Intima und Media beschrieben [38]. Teilweise waren sogar Fibrinablagerungen und Thromben sichtbar. Gefäßveränderungen waren in 2/3 der Kontrollsehnen sichtbar, insgesamt waren degenerative Prozesse jedoch signifikant häufiger in rupturierten Sehnen als in Kontrollsehnen. Für die hypoxisch-degenerativen Prozesse wird ein verminderter arterieller Blutfluss verantwortlich gemacht.

Eine Studie an Kaltblütern mit Tendopathien der tiefen Beugesehnen fand histologisch Anzeichen von strukturellen Gefäßveränderungen wie Angiogenese, Fibroplasie, Hypertrophie der Gefäßwand und Thrombenbildung [39]. Thrombenbildung und daraus resultierende Ischämie führt wiederum zu degenerativen Veränderungen des Sehngewebes. Neovaskularisationen kommen oft am Ort des Schadens vor [40] und können ebenfalls mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Jones et al. 2003 verwendeten einen Antikörper gegen CD-

31, ein Endothelzellmarker, der das Endothel von Arterien, Venen und Kapillaren markiert und an Sehnen von Kaninchen, Mensch und Pferd etabliert wurde. Das Markierungsmuster ist vergleichbar mit den Resultaten der vorliegenden Studie, in der ein Antikörper gegen human alpha smooth muscle actin verwendet wurde. Alpha smooth muscle actin kommt in der Media von Gefäßen sowie auch in Perizyten vor, die der Außenwand von Blutkapillaren anliegen. Kapillaren bestehen aus Endothel, Perizyten und einer Basalmembran und werden demnach auch mit dem Antikörper gegen alpha smooth muscle actin markiert.

Limitationen der vorliegenden Studie sind sicher die geringe Zahl der untersuchten Pferde sowie die fehlende Vorgeschichte. Zudem wurden nur Wallache und ein Hengst untersucht, nicht aber Stuten. Die Altersverteilung lag mit 7–14 Jahren im mittleren Lebensabschnitt, es waren keine ganz jungen oder sehr alte Pferde dabei. Es waren alles Warmblüter, was doch einen gewissen Vergleich ermöglicht. Da es sich um Schlachtpferde handelte, waren weder die klinische Vorgeschichte noch der Schlachtungsgrund bekannt. Die untersuchten Lokalisationen wiesen jedoch keine Hinweise auf degenerative Prozesse auf. Allerdings könnten Schlachtpferde zu Lebzeiten Lahmheiten aus Nicht-Sehnen-erkrankungsgründen gehabt haben, was zur Schonung von Gliedmaßen geführt haben könnte. Diese Schonung wiederum könnte Auswirkungen auf die Gefäßversorgungsichte und vielleicht auch auf die anti-SMA Markierung gehabt haben. Diese Studie liefert erste Erkenntnisse bezüglich der Gefäßdichte der OBS der Vorder- und Hintergliedmaßen beim Pferd. Eine umfangreichere Studie mit größeren Patientenzahlen und klinischen Untersuchungsbefunden wäre interessant, um die vorliegenden Befunde zu bestätigen. Die drei untersuchten Lokalisationen ermöglichen lediglich einen gezielten Einblick in die Sehnenstruktur, es wären unzählige weitere Schnitte nötig, um die gesamte Länge der Sehne abzubilden, was technisch nur schwer möglich ist. Sehnen lassen sich nur schwer mit dem Mikrotom schneiden, gerade Querschnitte sind aufwändiger und schwieriger anzufertigen als zum Beispiel Längsschnitte. Querschnitte hingegen sind nötig, um Gefäßzählungen vorzunehmen, wie in dieser Studie.

Literatur

- 1 Ely ER, Avella CS, Price JS, Smith RK, Wood JL, Verheyen KL (2009) Descriptive epidemiology of fracture, tendon and suspensory ligament injuries in National Hunt racehorses in training. *Equine Vet J* 41, 372–378, DOI 10.2746/042516409x371224
- 2 Kasashima Y, Takahashi T, Smith RK, Goodship AE, Kuwano A, Ueno T, Hirano S (2004) Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Vet J* 36, 346–350, DOI 10.2746/0425164044890580
- 3 Murray RC, Dyson SJ, Tranquille C, Adams V (2006) Association of type of sport and performance level with anatomical site of orthopaedic injury diagnosis. *Equine Vet J Suppl* 36, 411–416, DOI 10.1111/j.2042-3306.2006.tb05578.x
- 4 Trump M (2014) A retrospective study of the prevalence of injuries to the suspensory ligament, digital flexor tendons and associated structures in a nonracehorse referral-hospital population: University of Zurich

- 5 Williams RB, Harkins LS, Hammond CJ, Wood JL (2001) Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998. *Equine Vet J* 33, 478–486, DOI 10.2746/042516401776254808
- 6 Wylie CE, Newton JR (2018) A systematic literature search to identify performance measure outcomes used in clinical studies of racehorses. *Equine Vet J* 50, 304–311, DOI 10.1111/evj.12757
- 7 Clegg P (2012) Musculoskeletal disease and injury, now and in the future. Part 2: Tendon and ligament injuries. *Equine Vet J* 44, 371–375, DOI 10.1111/j.2042-3306.2012.00563.x
- 8 Perkins NR, Reid SW, Morris RS (2005) Risk factors for injury to the superficial digital flexor tendon and suspensory apparatus in Thoroughbred racehorses in New Zealand. *New Zeal Vet J* 53, 184–192, DOI 10.1080/00480169.2005.36503
- 9 Takahashi T, Kasashima Y, Ueno Y (2004) Association between race history and risk of superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc* 225, 90–93, DOI 10.2460/javma.2004.225.90
- 10 Weller R, Pfau T, Verheyen K, May SA, Wilson AM (2006) The effect of conformation on orthopaedic health and performance in a cohort of National Hunt racehorses: preliminary results. *Equine Vet J* 38, 622–627, DOI 10.2746/042516406x159034
- 11 Tully LJ, Murphy AM, Smith RK, Hulin-Curtis SL, Verheyen KL, Price JS (2014) Polymorphisms in TNC and COL5A1 genes are associated with the risk of superficial digital flexor tendinopathy in National Hunt Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J* 46, 289–293, DOI 10.1111/evj.12134
- 12 Alzola R, Easter C, Riggs CM, Gardner DS, Freeman SL (2018) Ultrasonographic-based predictive factors influencing successful return to racing after superficial digital flexor tendon injuries in flat racehorses: A retrospective cohort study in 469 Thoroughbred racehorses in Hong Kong. *Equine Vet J* 50, 602–8, DOI 10.1111/evj.12810
- 13 Auer JA, Stick JA, Kümmerle JM, Prange T (2019) *Equine Surgery*, 5th Edition, Elsevier, Missouri, 1411–1445
- 14 Ross MW, Dyson SJ (2011) *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*, 2nd Edition, Elsevier, Missouri, 706–726
- 15 Dakin SG (2016) A review of the healing processes in equine superficial digital flexor tendinopathy. *Equine Vet Educ* 29, 516–20, DOI 10.1111/evj.12572
- 16 Witte S, Dedman C, Harriss F, Kelly G, Chang YM, Witte TH (2016) Comparison of treatment outcomes for superficial digital flexor tendonitis in National Hunt racehorses. *Vet J* 216, 157–163, DOI 10.1016/j.tvjl.2016.08.003
- 17 Dyson SJ (2004) Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992–2000). *Equine Vet J* 36, 415–419, DOI 10.2746/0425164044868422
- 18 Strömberg B (1971) The normal and diseased superficial flexor tendon in race horses. A morphologic and physiologic investigation. *Acta Radiol Suppl* 305, 1–94
- 19 Tamura N, Kodaira K, Yoshihara E, Mae N, Yamazaki Y, Mita H, Kuroda T, Fukuda K, Tomita A, Kasashima Y (2018) A retrospective cohort study investigating risk factors for the failure of Thoroughbred racehorses to return to racing after superficial digital flexor tendon injury. *Vet J* 235, 42–46, DOI 10.1016/j.tvjl.2018.03.003
- 20 Birch HL, Bailey AJ, Goodship AE (1998) Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine Vet J* 30, 534–539, DOI 10.1111/j.2042-3306.1998.tb04530.x
- 21 Fackelman GE (1973) The nature of tendon damage and its repair. *Equine Vet J* 5, 141–149, DOI 10.1111/j.2042-3306.1973.tb03214.x
- 22 Smith RK, Birch H, Patterson-Kane J, Firth EC, Williams L, Cherdchutham W, Goodship AE (1999) Should equine athletes commence training during skeletal development?: changes in tendon matrix associated with development, ageing, function and exercise. *Equine Vet J Suppl Jul* 30, 201–209, DOI 10.1111/j.2042-3306.1999.tb05218.x
- 23 Webbon PM (1977) A post mortem study of equine digital flexor tendons. *Equine Vet J* 9, 61–67, DOI 10.1111/j.2042-3306.1977.tb03981.x
- 24 Patterson-Kane JC, Firth EC, Goodship AE, Parry DA (1997) Age-related differences in collagen crimp patterns in the superficial digital flexor tendon core region of untrained horses. *Austr Vet J* 75, 39–44, DOI 10.1111/j.1751-0813.1997.tb13829.x
- 25 Patterson-Kane JC, Wilson AM, Firth EC, Parry DA, Goodship AE (1997) Comparison of collagen fibril populations in the superficial digital flexor tendons of exercised and nonexercised thoroughbreds. *Equine Vet J* 29, 121–125, DOI 10.1111/j.2042-3306.1997.tb01653.x
- 26 Patterson-Kane JC, Wilson AM, Firth EC, Parry DA, Goodship AE (1998) Exercise-related alterations in crimp morphology in the central regions of superficial digital flexor tendons from young thoroughbreds: a controlled study. *Equine Vet J* 30, 61–64, DOI 10.1111/j.2042-3306.1998.tb04089.x
- 27 Patterson-Kane JC, Becker DL, Rich T (2012) The pathogenesis of tendon microdamage in athletes: the horse as a natural model for basic cellular research. *J Comp Pathol* 147, 227–247, DOI 10.1016/j.jcpa.2012.05.010
- 28 Birch HL, Wilson AM, Goodship AE (1997) The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *J Experiment Biol* 200, 1703–1708, DOI 10.1242/jeb.200.11.1703
- 29 Wilson AM, Goodship AE (1994) Exercise-induced hyperthermia as a possible mechanism for tendon degeneration. *Biomechanics* 27, 899–905, DOI 10.1016/0021-9290(94)90262-3
- 30 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 Vet J* 24, 46–51, DOI 10.1111/j.2042-3306.1992.tb02778.x
- 31 Strömberg B (1973) Morphologic, thermographic and ¹³³Xe clearance studies on normal and diseased superficial digital flexor tendons in race horses. *Equine Vet J* 5, 156–161, DOI 10.1111/j.2042-3306.1973.tb03217.x
- 32 Strömberg B (1980) Sehenschäden - Ätiologie, Pathogenese und Therapie. *Der praktische Tierarzt* 61, 2–9
- 33 Strömberg B, Tufvesson G (1969) Lesions of the superficial flexor tendon in race horses. A microangiographic and histopathologic study. *Clin Orthop Rel Res* 62, 113–123
- 34 Patterson-Kane JC, Firth EC (2009) The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J* 181, 79–89, DOI 10.1016/j.tvjl.2008.02.009
- 35 Smith RKW, McIlwraith CW (2021) „One Health“ in tendinopathy research: Current concepts. *J Orthop Res* 39, 1596–1602, DOI 10.1002/jor.25035
- 36 Zantop T, Tillmann B, Petersen W (2003) Quantitative assessment of blood vessels of the human Achilles tendon: an immunohistochemical cadaver study. *Arch Orthop Trauma Surg* 123, 501–504, DOI 10.1007/s00402-003-0491-2
- 37 Ahmed IM, Lagopoulos M, McConnell P, Soames RW, Sefton GK (1998) Blood supply of the achilles tendon. *J Orthop Res* 16, 591–596, DOI 10.1002/jor.1100160511
- 38 Kannus P, Jozsa L (1991) Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg* 73, 1507–1525
- 39 Crisan MI, Damian A, Gal A, Miclaus V, Cerneo CL, Denoix JM (2013) Vascular abnormalities of the distal deep digital flexor tendon in 8 draught horses identified on histological examination. *Res Vet Sci* 95, 23–26, DOI 10.1016/j.rvsc.2013.03.006
- 40 Jones M, Clayton E, Noel C, Ladhani K, Grobbelaar A (2003) Immunohistochemical endothelial localisation—a novel method of vessel delineation in tendon tissue. *J Immunol Methods* 280, 175–181, DOI 10.1016/s0022-1759(03)00205-9