

Aus der
Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Biomechanische Analyse des Rupturverhaltens der
Achillessehnen von Tenomodulin (TNMD)-Knock-Out-Mäusen
im Vergleich zu Kontrollmäusen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Georgi Ivanov
aus Pleven, Bulgarien
München 2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Frederick Klauschen
Prof. Dr. Hans Arnholdt

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Mehmet F. Güleçyüz
und
Prof. Dr. Denitsa Docheva

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Sehnenaufbau	1
1.2 Tenomodulin	4
1.3 Anatomie	11
1.3.1 Anatomie der menschlichen Achillessehne und des M. Triceps surae	11
1.3.2 Definition der Achillessehnenruptur.....	12
1.3.3 Klinik einer Achillessehnenruptur	12
1.3.4 Diagnostik der Achillessehnenruptur	13
1.3.5 Anatomie des Mausunterschenkels.....	15
1.4 Sehnenpathologie, Epidemiologie der Achillessehnenruptur, Therapie	16
1.4.1 Sehnenpathologie	17
1.4.2 Epidemiologie der Achillessehnenruptur und Therapie	18
1.5 Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Die Präparate	21
2.2 Die biomechanische Testung	23
2.2.1 Auswahl der Messsonde	24
2.2.2 Versuchsaufbau	24
2.3. Konditionierung der Achillessehnen	27
2.4. Messparameter	29
2.5. Statistik	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Sehnenlänge	33
3.2 Sehnendurchmesser	34
3.3. Maximale Ausreißkraft (Fmax).....	34
3.4. Elastizitätsmodul (E-Modul).....	35
3.5. Rupturort.....	36

3.6. Korrelation der Ausreißkraft zur Sehnenlänge von Tnmd-Knock-Out-Mäusen	38
3.7. Korrelation des Elastizitätsmoduls zur Sehnenlänge von Tnmd-Knock-Out-Mäusen	39
3.8. Korrelation der Ausreißkraft zur Sehnenlänge von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen	39
3.9. Korrelation des Elastizitätsmoduls zur Sehnenlänge von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen	40
3.10. Korrelation der Ausreißkraft zum Durchmesser von Tnmd-Knock-Out-Mäusen	41
3.11. Korrelation des Elastizitätsmoduls zum Sehnendurchmesser von Tnmd-Knock-Out-Mäusen	41
3.12. Korrelation der Ausreißkraft zum Sehnendurchmesser von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen	42
3.13. Korrelation des Elastizitätsmoduls zum Sehnendurchmesser von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen	42
3.14. Maximale Ausreißkraft vs. Elastizitätsmodul	43
3.14.1 Korrelation der maximalen Ausreißkraft zum Elastizitätsmodul von Tnmd-Knock-Out-Mäusen	43
3.14.2 Korrelation der maximalen Ausreißkraft zum Elastizitätsmodul von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen	44
4. Diskussion	45
4.1. Allgemeines	45
4.2. Diskussion der Materialien und Methoden	47
4.2.1. Versuchsaufbau	47
4.2.2 Power-Analyse.....	49
4.3. Diskussion der Ergebnisse	50
4.3.1. Maximale Kraft bis zum Versagen bzw. zur Sehnenruptur	50
4.3.2. Einfluss der Sehnendehnung und des Elastizitätsmoduls	51
4.3.3. Rupturlokalisierung der getesteten Achillessehnen	54
4.3.4. Korrelationsanalysen	55
5. Zusammenfassung	57

6. Literaturverzeichnis	59
7. Abbildungsverzeichnis.....	64
8. Abkürzungsverzeichnis.....	67
9. Anhang	69
9.1. Tabelle 1	69
9.2. Tabelle 2.....	70
10. Danksagung	71
11. Eidesstattliche Versicherung	72

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Sehnenaufbau

Die Sehnen bestehen aus Bindegewebe und sind ein Teil des Muskels, der diesen mit einem Knochen verbindet. Sie erlauben die Übertragung der Muskelkraft bzw. der Muskelkontraktion in Form einer Zugspannung auf den Knochen und somit ermöglichen die Mobilität und die Elastizität des menschlichen Körpers.

Die Sehnen bestehen aus gut differenzierten Tenozyten sowie aus Kollagen und Elastin, welche eine wasserhaltige extrazelluläre Matrix (EZM) bilden. In der EZM ist das Kollagen in parallel nebeneinander stehenden Fibrillen angeordnet. Zwischen den Kollagenfibrillen befinden sich die Tenozyten. Der Hauptkollagentyp der Sehnen bzw. der EZM ist das Strukturprotein-Kollagen Typ I, das 60% der Trockenmasse des Gewebes und bis zu 95% des Gesamtkollagengehalts bildet [1]. Das Kollagen Typ I, sowie Kollagen Typ II und Typ III formen lange und dicke Fibrillen, die durch eine gestaffelte parallele Aneinanderlagerung der Peptidketten (Tripelhelix) entstehen. Diese Peptidketten werden durch kovalente Bindungen (Schiff-Basen) quervernetzt [2]. Als Hauptstrukturprotein ist das Kollagen Typ I für die mechanische Festigkeit der Sehnen verantwortlich. Das Kollagen Typ III ist der zweithäufigste Typ, der in einer Sehne vorkommt. Er produziert kleinere Fibrillen als Kollagen Typ I und seine Rolle wird jedoch mit der mechanischen Festigkeit der Sehnen assoziiert. Bei pathologischen Veränderungen von Sehnen sowie bei dem Sehnenheilungsprozess wird Kollagen Typ III am häufigsten synthetisiert [1]. Das Kollagen Typ II kommt v.a. in hyalinem und elastischem Knorpelgewebe vor. Durch die Bildung eines fibrillären Netzwerks bindet das Kollagen Typ II Proteoglykane an und verleiht dem Gewebe eine Viskoelastizität [3]. In der EZM finden sich noch Kollagen Typ IV, V, VI, XII, XIV und XV. Beim Kollagen Typ IV werden die Fasern nicht parallel angeordnet, sondern End-zu-End verknüpft, und sein Vorkommen ist auf die Basalmembran der Sehnenblutgefäße beschränkt. Das Kollagen Typ VI bildet ein blattartiges Netzwerk durch Bindung an unterschiedliche Komponenten der EZM und ist normalerweise zusammen mit

den Kollagenfasern vom Typ I in der normalen Sehne verteilt zu finden. Dem Kollagen Typ VI wird die Rolle der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität durch seine Funktion zur Bindung an die EZM-Komponenten zugeschrieben. Kollagene vom Typ XII und Typ XIV sind mit der Oberfläche der Kollagenfibrillen vom Typ I assoziiert, insbesondere bei der Insertion der Fibrillen [1]. Außer dem Kollagen besteht die EZM aus anderen Komponenten wie elastischen Fibern, anorganischen Partikeln und einer intrazellulären Substanz (IZS). Die intrazelluläre Substanz setzt sich aus Hyaluronan, Proteoglykan, strukturellen Glykoproteinen und Wasser zusammen. Das Wasser bildet bis zu 60-80 % an der Masse der IZS und der Prozentanteil des Proteoglykans liegt bei 1-2 % [4]. Die kleinste Kollageneinheit ist das Tropokollagen. Es ist in den Tenozyten synthetisiert und in einem triple-helix Polypeptid aggregiert, das in der EZM sezerniert wird. Die größeren Kollagenfibrillen bilden die Kollagenfasern, welche unterschiedlich dicke Faszikel formen. Makroskopisch formieren sich die Faszikel in Sehnenfasern weiter, d.h. dass die angeordneten Fasern die Sehnen ausbilden. Die Fasern sind durch ein dünnes, retikuläres, bindegewebiges Netzwerk, das sog. Endotenon ausgekleidet. Die größeren Sehnenfaszikel sind durch eine lockere Schicht, das sog. Epitenon gedeckt, die die vaskuläre, lymphatische und neuronale Versorgung des Gewebes leistet. Die zarte, fast reibungslose Bewegung der Sehnenfaszikel geschieht durch das lubrizierende Molekül – Lubrizin [5]. Die Sehnenhülle wird Paratenon genannt. Die musklotendinösen Übergänge sind hochspezifische Regionen, wo Kollagenfibrillen in Vertiefungen ansetzen, die durch die Myozyten zusätzlich gebildet sind [6]. Vor kurzem wurden multipotente, klonogenitätsfähige Stammzellen-Tendon Stem/ Progenitor Cells (TSPCs) entdeckt, deren genaue Lokalisation im Bereich der EZM detektiert wurde [7]. Die Rolle von TSPC in der Sehnenproliferation und Sehnendegeneration durch die Expression unterschiedlicher Gene ist unvollständig geklärt und wird aktuell aktiv untersucht [7]. Die folgende Abbildung (**Abb. 1**) stellt den Sehnenaufbau dar.

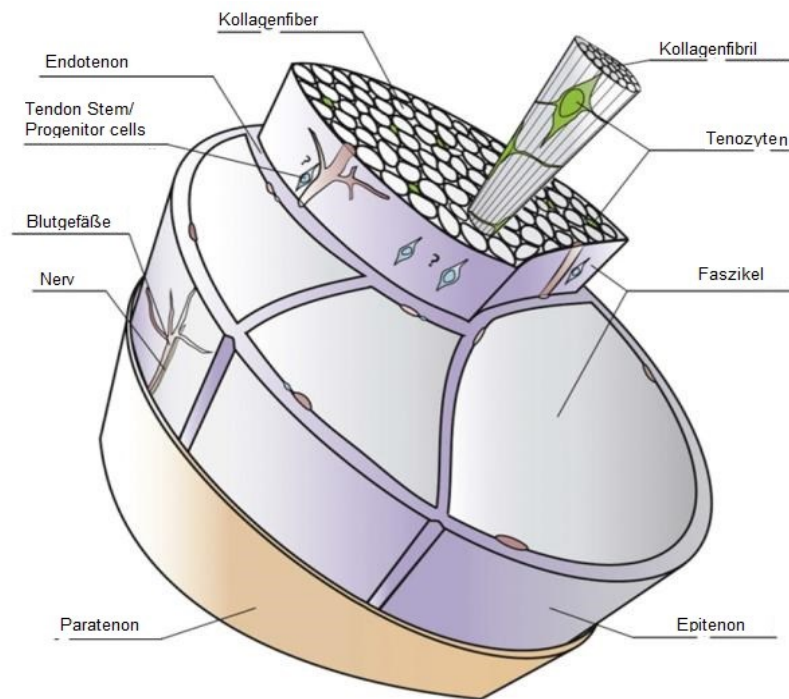


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Sehnen nach Docheva et al. [8].

Die Hauptfunktion der Sehnen ist die Kraftübertragung bei den Muskelkontraktionen zu den Zielstrukturen und das Widerstehen mechanischen Stresses in Form von Dehnungskräften [9]. Die Tenozyten reagieren auf verschiedene Arten mechanischer Beanspruchung und so wird die Synthese des Kollagens kontrolliert [9].

Die zelluläre Kommunikation der Tenozyten wird durch die sog. Gap Junctions bzw. Zellenkommunikationsproteine Connexin 32 und Connexin 43 gewährleistet. Das stimulierende Protein Connexin 32 befindet sich auf Gap Junctions an der Hauptzugspannungsseite. Das inhibierende Protein Connexin 43 verbindet Zellen in allen Richtungen [10]. Durch eine mechanische Beanspruchung der Tenozyten in der EZM und durch den Aktivitätswechsel von beiden Proteinen wird die Expression von Kollagen je nach einer adäquaten Anpassungsreaktion der Tenozyten bei der mechanischen Belastung so stimuliert oder gehemmt.

Es ist nicht vollständig wissenschaftlich geklärt, welche sehnenpezifischen Faktoren auf molekular-genetischer Ebene durch die repetitive muskuläre Kraftübertragung auf den Sehnenapparat und durch die mechanische

Beanspruchung zu einer Degeneration bzw. zur Rupturgefahr dieses hochelastischen Gewebes im zeitlichen Verlauf führen könnten.

1.2 Tenomodulin

Das Tenomodulin (TNMD) ist ein sehnenspezifisches Typ II-Transmembranglykoprotein, das im Jahr 2001 von zwei unterschiedlichen Expertengruppen entdeckt worden ist [11], [12]. Durch Northern Blot wurde nachgewiesen, dass es eine Tnmd-Expression in den bindegewebigen Strukturen des Muskel-, Diaphragma- und Augengewebes gab. Zusätzliche genetische Untersuchungen zeigten, dass Tenomodulin sowohl in den Sehnen und Ligamenten, als auch im Chorda tendinae des Herzens zu finden ist. Jeweils wurde das Protein als Sehnenmarker eingestuft, denn seine Eigenschaften sind immer noch ein Studienthema. Die Ruptur von avaskularisierten, aus Bindegewebe bestehenden Chordae tendinae cordis (CTC) ist eine häufige Ursache für Mitralklappenregurgitationen. Das neulich entdeckte, transmembrane Glykoprotein vom Typ II-Tenomodulin (TNMD) scheint eine grundlegende Rolle als Regulator für die Inhibition der Vaskularität und die Proliferation von Sehnengewebe zu haben [13]. Das Protein wurde in der elastinreichen subendothelialen Außenschicht von Chorda tendinae cordis in normalen Nagetieren, bei Schwein, Hund und Menschen vermehrt exprimiert. Die unterschiedliche Expression des Proteins wird mit CTC-Rupturen assoziiert. Durch kultivierte CTC-Interstitialzellen wurde nachgewiesen, dass die tubuläre Bildung und die Mobilisation von Endothelzellen stark inhibiert wurden. Durch kleine interferierende RNA gegen Tenomodulin wurden diese Prozesse teilweise gehemmt. Im Rupturbereich der CTC konnte Tenomodulin histologisch nicht nachgewiesen werden [13]. Das verstärkt die These, dass die lokale Abwesenheit bzw. die fehlende Expression von Tenomodulin eine Rolle in den Rupturprozessen spielt. Kleine mRNA-Transkripte des Proteins werden auch in anderen bindegewebigen Strukturen von Säugetieren und Menschen exprimiert. Seine Hauptfunktion wird aber in der Regulation von Proliferation, Degenerationszuständen, sowie auch in der Avaskularisation im Narbengewebe der Sehnen vermutet [14], [15]. Lin et al. zeigten, dass das Fehlen von TNMD zu einem schlechteren morphologischen Ergebnis und einer niedrigeren

Zelldichte der Tenozyten führt, während es die Adipozytenakkumulation und die Adipozyten-verwandte Genexpression sowie Gefäßzahlen in der frühen Reparaturregion von verletzten Sehnen aktiviert [16]. Die Arbeitsgruppe von Lin et al. untersuchte in ihrer in-vivo histologischen Studie rupturierte und danach chirurgisch mit Naht versorgte Achillessehnen von speziell gezüchteten Tnmd-Knock-Out-Mäusen (KO) und Wildtyp-(WT)-Mäusen. Sie weisen nach, dass die Tnmd-Knock-Out-Mäusesehnen nach der Ruptur und der Sehnennahtversorgung eine verminderte Gesamtzelldichte besitzen. Im Anschluss erfolgten Hematoxylin-Eosin-(HE)-Färbungsanalysen und Immunfluoreszenzfärbungen der beiden Mäusesehnengruppen, d.h. der Tnmd-Knock-Out-Mäuse und der Wildtypmäuse als Kontrollgruppe. Dabei ergab sich, dass die mittlere Adipozytenakkumulation, die Anzahl der Blutgefäße und die Kollagen IV-positiven Bereiche an den Narbenstellen der Sehnen signifikant erhöht wurden. Ein erhöhter mRNA-Spiegel des adipogenen Markergenes Peroxisomproliferator-aktivierten Rezeptors Gamma (Ppar γ) und die Lipoproteinlipase (Lpl) wurden in den Sehnen von Tnmd-Knock-Out-Mäusen durch eine quantitative reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR) nachgewiesen [16]. Die qualitative und quantitative Expression von TNMD bestätigt vermutlich seine Spezifität in der Pathophysiologie von Sehnenrupturen.

Das Tenomodulin gehört zu den Typ II-Transmembranglykoproteinen und zeigt eine homologe Ähnlichkeit mit dem anderen Protein dieser Gruppe, Chondromodulin I (ChM-1). Tenomodulin besitzt sieben Exons auf dem X-Chromosom und insgesamt 317 Aminosäuren [17]. Chondromodulin wird im Knorpel und weniger im Thymus und im Auge exprimiert [11]. Beide Proteine zeigen eine genetische Expression mit einem überlappenden Muster, wobei der extrazelluläre Anteil der beiden Proteine zwei Domänen besitzt: BRICHOS und eine spaltbare C-terminale Cystein-reiche Domäne. Die BRICHOS-Domäne ist heutzutage immer noch weniger bekannt. Die BRICHOS-Domäne wurde erstmals in BRI (für britische Demenz), ChM-I und SP-C (für Tensid-assoziiertes Protein C) identifiziert. Die C-terminale Cystein-reiche Domäne dient als Regulator der Zellproliferation und der Differenzierung [14]. Dies passiert dadurch, dass die rekombinante, Cystein-reiche C-Domäne des Chondromodulins die Proliferation von primären Chondrozyten steigert [18], aber die endotheliale Proliferation wurde durch die ektopische endotheliale Expression

von der C- terminalen Cystein-reichen Domäne des TNMD oder ChM-I inhibiert. Jeweils stimuliert die komplette Expression von Tenomodilin in den endothelialen Zellen deren Proliferation [15]. Eine genetische Deletion des ChM-I Gens in Mäusen zeigte aber keinen Einfluss auf die Proliferation des Endothelgewebes oder auf die Chondrozyten. Wenn das Tnmd-Gen im Chondromodulin-I-armen Gewebe nicht hochreguliert wird, zeigte sich, dass der Mangel an ChM-I durch andere Faktoren beeinflusst wird [19]. Der spaltbare C-Terminus des Tnmd-Gens wurde als einen wichtigen Regulator der Proliferation von Sehnenstammzellen (TSPC) und der Alterungsprozesse des Sehnengewebes identifiziert. Seine Expression wird durch eine mechanische Stimulation vermutet [20]. Ein Vergleich zwischen Wildtypmäusen und Tnmd-Knock-Out-Mäusen zeigte auf Molekularebene, dass die Abwesenheit von TNMD zu einem verminderten TSPC-Vermehrungsvermögen in den tierischen Knock-Out-Populationen führte. Durch die β -Galatosidase-Färbung und den Mangel am Proliferationsmarker Cyclin D1 wurde nachgewiesen, dass der Alterationsprozess der Stammzellen häufiger in diesen Populationen im Vergleich zu den Wildtyppopulationen zu treffen war. Jedoch zeigte sich eine Hochregulation des Tumorsuppressorgens p53 auch bei den Knock-Out-Mäusen. All diese Ergebnisse, zusammen mit der Tatsache, dass die Tnmd-Knock-Out-Populationen einen abnormen kollagenfibrillären Phänotyp und pathologisch dickere Fibrillen exprimierten, wiesen eine vorzeitige Vergreisung und verminderte Proliferation des Sehnengewebes von TSP-Zellen nach. Jeweils spielte der Mangel an Tenomodulin keine Rolle für die Multipotenz der Stammzellen [20]. Darüber hinaus hemmte die Überexpression von TNMD in den murinen mesenchymalen Stammzellen (MSCs) deren Bindung an die adipogenen, chondrogenen und osteogenen Linien und förderte gleichzeitig deren tenogene Differenzierung.

Ein Beispiel für relevante experimentelle Knockout-Studien wurde von Dex et al. [21] veröffentlicht, wo die Dauerlaufleistung von Tenomodulin-defizienten Tnmd-Knock-Out-Mäusen analysiert wurde. Das Protein-Tenomodulin (TNMD) wird als einen nachgewiesenen und weitakzeptierten genetischen Marker eingeordnet, der in Zusammenhang mit der Alterung der Sehnen und Ligamenten kommt. Der Verlust seiner Funktion in den Mäusenpopulationen führt zu einem Phenotyp mit signifikanten Zeichen von einer vorzeitigen Alterung des Sehnengewebes und

zur Hemmung der Proliferation der Stamm/Progenitorzellen (TSPC). Das Gen, auf dem sich das Protein Tenomodulin befindet, ist vermutlich mechanosensibel. Sein C-terminales-Ende liegt zusammen mit dem Gen des Kollagens Typ I in der extrazellulären Matrix als co-lokalisiert [13], [14]. Ein Vergleich des Durchhaltevermögens von Tnmd-Knock-Out-Typ-Mäusen und Wildtypmäusen mit einem etablierten Trainingsprotokoll zeigte, dass sich der Verlust von Tenomodulin in einer signifikant niedrigeren Leistung äußerte, die auf Dauer weiter sank. Jeweils ließ sich eine anormale Expression von Kollagen Typ I-Crosslinking und Proteoglykangen in dieser Knock-Out-Mäusepopulation feststellen, was zur unadäquaten Kollagen-Typ I-Dichte und Elastizität geführt hatte [21]. Ein TNMD-Mangel führte zu einer deutlich schlechteren Laufleistung, die sich mit dem Training verschlechterte. Mit Hilfe einer spezifischen mikroskopischen Messung zeigte sich, dass die einzigen Kollagen I-Fibrillen in den Sehnen der Knock-Out-Populationen eine erhöhte laterale Dicke und Steifigkeit besitzen. Die Tnmd-Knock-Out-Mäuse zeigten eine verminderte Mobilität und Trainingsleistung, im Vergleich zur Wildtyppopulation. Durch die Nutzung von Atomic Force Microscopy (AMF-Technologie) bestätigten die Knock-Out-Achillessehnen auf mikroskopischer Ebene die Vermutung, dass die Kollagentopographie im Sehnenapparat durch den Mangel an TNMD stark beeinflusst wurde. Sie wurde weniger kompakt, mehr ausgefranst und durch Lücken unterbrochen [21]. Die Abbildung 2 (**Abb. 2**) veranschaulicht diese Ergebnisse. Die Signifikanz dieser nachgewiesenen Tatsachen zeigte die vermutete Regulatorrolle des Proteins in den Sehnenproliferationsprozessen noch deutlicher.

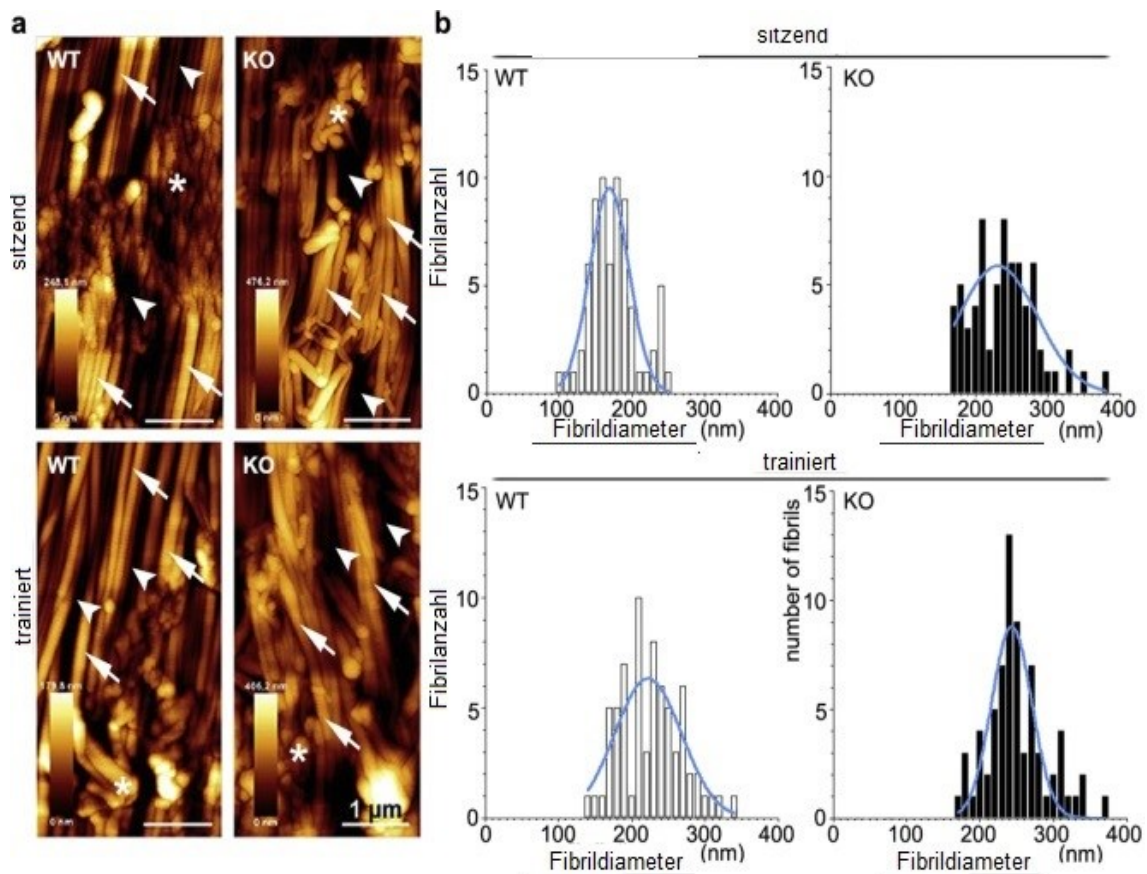


Abbildung 2: AMF-Analyse mit Nano-Topographie.

a. AMF-Bilder aus beiden Gruppen: sitzend und trainierte Mäuse (Tnmd-Knock-Out-Mäuse, WT-Wildtypmäuse). Die Pfeile zeigen die Kollagen-I-Fibrillen, die Pfeilenköpfe – die interfibrilläre Matrix, die Sternchen – die Artefakte. Dargestellt ist, dass die Kollagentopographie bei den Tnmd-Knock-Out-Mäusen weniger kompakt, geschlängelt und durch Lücken unterbrochen aussieht.

b. Verteilung der Fibrillendurchmessergröße von Kollagen Typ I: die blauen Kurven zeigen die Gauß'sche Verteilung. Die Fibrillenanzahl und v.a. der Fibrillendurchmesser zeigen den deutlichen Unterschied zwischen den sitzenden und trainierten Wildtypgruppen und den Tnmd-Knock-Out-Gruppen (aus Dex et al. [21]).

Docheva et al. [14] untersuchten die Rolle von TNMD in vivo und konnten nachweisen, dass die fehlende Genexpression von Tnmd in Knock-Out-Mäusen die Proliferation von Tenozyten verhindert und zur verminderten Tenocytendichte führt. Die abgelagerten Mengen an extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagentypen I, II, III und VI waren nicht betroffen, aber die Kaliber der Kollagenfibrillen variierten signifikant und zeigten einen erhöhten Maximaldurchmesser. Docheva et al. [14] beschreiben, dass ein TNMD-Protein in einer gespaltenen Form in-vivo existiert. Seine Funktion in-vivo scheint, von der proteolytischen Proteinspaltung abhängig zu sein. Die Forschungsgruppe

von Docheva et al. weisen noch nach, dass die TNMD-defizienten Mäuse eine starke Abnahme der proliferierenden Zellen in den neugeborenen Sehnen zeigten. Es bleibt jedoch nicht vollständig geklärt, durch welche Signalwege das TNMD seine Regulation entwickelt, da nur wenige vorgelagerte Faktoren wie Scleraxis (*Scx*) und Mohawk (*Mkx*) bisher identifiziert wurden. In Bezug auf die nachgeschalteten Effektoren von TNMD besteht ein Mangel an Wissen über die direkten Proteinbindungspartner, die eine TSCP oder Tenozytenproliferation beeinflussen könnten [17]. Dex et al. beschreiben die Funktion von TNMD a.e eher als ein Feinabstimmer der Proliferation und nicht als ein *Master-Switch-Gen* [21]. In ihrer Studie wird auch festgestellt, dass die Tnmd-Knock-Out-Mäuse ein eingeschränktes Bewegungsverhalten und schlechtere Ergebnisse bezüglich eines etablierten Trainingsprotokolls aufweisen. Es bestehen eingeschränkte Daten, welche anderen Faktoren das Protein TNMD auf genetischer Ebene beeinflussen. In vivo lässt sich vermuten, dass TNMD eine Schlüsselrolle in der Feinregulation und in der Proliferation besitzt. Unsere Studie erweitert das wissenschaftliche Verständnis der strukturellen und funktionellen Beziehungen von Sehnengewebe durch den Vergleich des biomechanischen Verhaltens von beiden Mäusegruppen.

Die Sehnenmikroarchitektur, die Kollagenexpression, die Differenzierung von TSPC und die Tenozytenproliferation werden durch das Protein TNMD nicht nur auf genetischer Ebene beeinflusst, sondern auch strukturell auf mikroskopischer Ebene [14], [16], [17], [20], [21]. Zu erwähnen sind auch andere Faktoren wie TGF- β 3 growth factor-Smad 2/3 Mediatoren, Scleraxis (*Scx*) und Osterix [22] sowie deren Transkriptionsaktivität [23], die die Sehnen in ihrer Struktur und ihren Eigenschaften kennzeichnen. Die Arbeitsgruppe von Dex et al. [21] hatte für die Versuche in ihrer Studie mit Knock-Out- bzw. Wildtypmäusen die gleichen Versuchstiere – Mäuse vom Labortyp C57BL/6 – benutzt, genauso wie es in unserer Studie ist. Durch den Fortschritt in den letzten Jahren, um das Verständnis der Sehnenpathophysiologie und Regeneration zu verbessern, wurde die Existenz von Sehnenstammzellen (TSPC) in mehreren Studien nachgewiesen. Die mesenchymalen Stammzellen wurden zur Behandlung von Sehnenverletzungen wegen ihrer vielversprechenden Wirkung auf das Gewebeengineering eingesetzt [24], [25]. Ihre Anwendung wurde durch die niedrige tenogene Differenzierungskapazität behindert, deren Potential durch die

Expression von Regulatorgenen multifaktoriell beeinflusst wurde. Eine vermutlich wesentliche Schlüsselrolle in der Regulation dieses Prozesses konnte durch das Transmembranglykoprotein vom Typ II TNMD erklärt werden [26]. Die häufigsten pathologischen Veränderungen nach Sehnenrupturen sind die Adipozytenakkumulationen, die die Entstehung von fibrovaskulären Narben und Muskelatrophien bedingen [27]. Interessanterweise wird behauptet, dass die unterschiedlichen regulatorischen Mechanismen des TNMD-Signalweges in unterschiedliche Zelltypen involviert wurden. Die Übereinstimmungen in den Studien von Lin et al. [16] und Jiang et al. [28] deuteten darauf hin, dass TNMD eine zelltypspezifische Wirkungsweise haben konnte bzw. dass TNMD die Proliferation von Sehnenzellen positiv beeinflusste, jedoch wurde die Proliferation von vaskulär abgeleiteten Zellen inhibiert, was auch als einen Störfaktor für die Proliferation betrachtet werden kann. Ergänzend wiesen die Tnmd-Knock-Out-Versuchsobjekte eine signifikant höhere Adipozytenakkumulation sowie eine erhöhte Adipozytendifferenzierungsrate der TNMD-/Stammzellen auf. Eine Überexpression von TNMD schien aber, die Adipogenese von mesenchymalen Stammzellen zu hemmen. Diese und viele andere Beobachtungen weisen darauf hin, dass das Verständnis des Tenomodulinmolekülnetzwerks eine ausschlaggebende Rolle in der Therapie von Sehnen haben könnte.

In Anlehnung an diese Studien wollten wir die Achillessehnen der beiden Populationen bzw. Tnmd-Knock-Out-Mäusesehnen und Wildtypmäusesehnen als Kontrollgruppe biomechanisch testen und die Unterschiede in der Primärstabilität der getesteten Sehnen zusammenfassen. Diese Unterschiede können die Rolle der Tnmd als Regulatorgen weiter verstärken. Das Interesse an Tnmd als Schlüsselgen für die Regulation der Sehnendegeneration bzw. der Proliferation und der Heilung steigt in den letzten Jahren. Unsere biomechanische Analyse sollte durch die Messung der Sehnenlänge, des Sehnendurchmessers, der maximalen Ausreißkraft, der Elastizität und durch den Vergleich der Dehnungskurven und des Rupturorts der Achillessehne Auskunft über die Unterschiede in der Primärstabilität und im Ausreißverhalten der Achillessehnen der beiden Mäusepopulationen geben.

1.3 Anatomie

1.3.1 Anatomie der menschlichen Achillessehne und des M. Triceps surae

Der M. triceps surae besteht aus beiden Köpfen des M. Gastrocnemius (Caput mediale und Caput laterale) und M. soleus, die in der gemeinsamen Ansatzsehne, der Achillessehne (Tendo calcaneus) verlaufen. Der dorsale Fußanteil des Standbeins wird durch den M. triceps surae gegen das Körpergewicht vom Boden abgehoben, wenn Gehe- und Laufbewegungen erfolgen. Dadurch wird sowohl der aufrechte Stand beim Stehen zu den Mm. gluteus maximus und M. quadriceps femoris synergistisch gesichert, als auch das Vornüberkippen im oberen Sprunggelenk (OSG) verhindert.

Der M. triceps surae ist der stärkste Beuger im oberen Sprunggelenk und auch der stärkste Supinator im unteren Sprunggelenk [29]. Er überträgt seine Kraft auf das hintere Ende des Calcaneus über die Achillessehne. Mit einer Querschnittsfläche von bis zu 1 cm² hält die Achillessehne einer Belastung von über 500 kg stand. Die menschliche Achillessehne ist durchschnittlich 20-25 cm lang und hat eine mittlere Sehnenquerschnittsfläche von etwa 70-80 mm² mit einer Reißfestigkeit von 60-100 N/mm [30]. Abbildung 3 (**Abb. 3**) stellt die Anatomie des rechten Fußes dar.

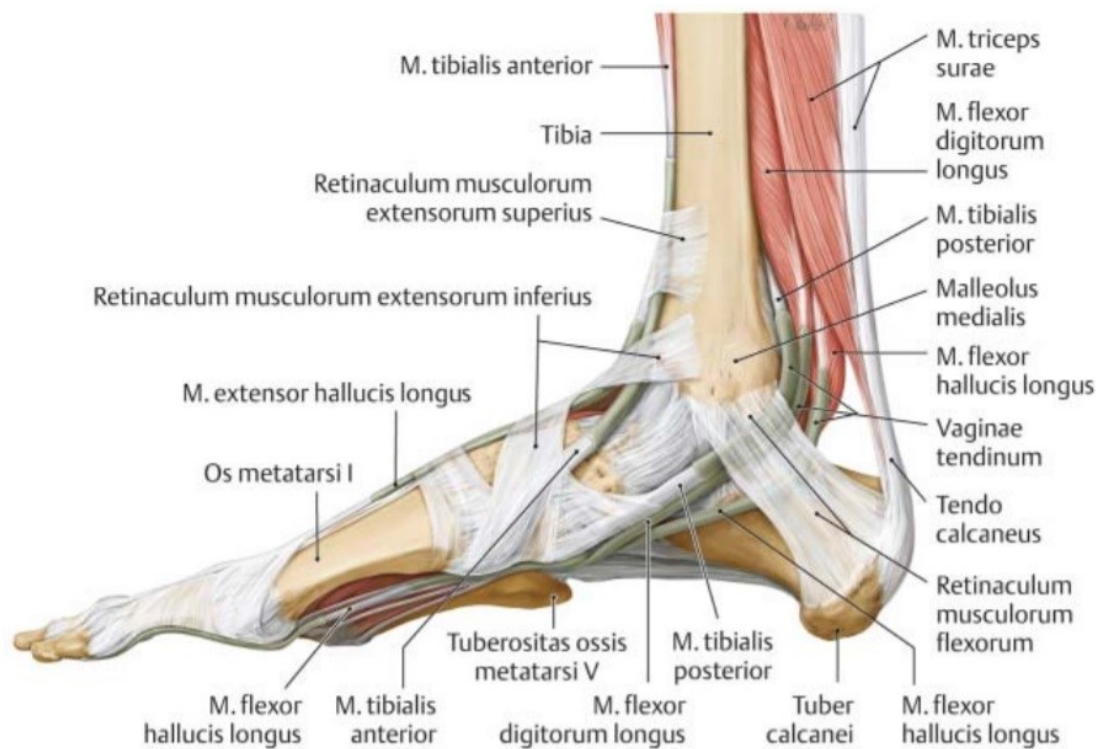


Abbildung 3: Anatomische Strukturen; Rechter Fuß, mediale Ansicht [29].

1.3.2 Definition der Achillessehnenruptur

Die Achillessehnenruptur entsteht traumatisch bei einer oft degenerativ vorgeschädigten Sehne. Die Rupturen sind meist gedeckt und können sich infolge einer unkontrollierten Überbeanspruchung und einer plötzlichen Belastung der Sehne oder durch ein direktes Trauma ergeben [31].

1.3.3 Klinik einer Achillessehnenruptur

Die degenerativen Gewebeveränderungen der Sehne sind eine Voraussetzung für die Achillessehnenrupturen. Verursacher dafür können noch die indirekten Gewalteinwirkungen auf die Sehne in der Arbeit oder im Sport, manchmal auch ohne übermäßige Belastung wie der schnelle Richtungswechsel, das plötzliche Anhalten nach Laufen, Springen, Ballspielen, Skifahren usw. sein. Die Achillessehnenrupturen könnten als partielle bzw. Teilrupturen und vollständige, komplette Rupturen eingeteilt werden. Am häufigsten ereignen sich die

Achillessehnerupturen durch maximale Anspannung beim Sport. Die Verletzten verspüren vor allem einen plötzlichen, stechend-ziehenden Schmerz, der mit einem laut hörbaren, peitschenknallähnlichen Geräusch verbunden ist. Eine endgradige Plantarflexion und Fußspitzenstand ist bei den Betroffenen nicht möglich. Neben den starken Schmerzen im Bereich der Achillessehne könnte eine Delle in der Achillessehne unmittelbar nach dem Ereignis meistens 3-4 Querfinger oberhalb der Ferse getastet werden. Im Verlauf kann dieser klinische Befund durch eine druckdolente Schwellung und Hämatombildung verdeckt werden. Durch die erhaltene Funktion des M. plantaris wird die aktive Plantarflexion nicht aufgehoben, jedoch sehr stark geschwächt und schmerzbedingt eingeschränkt [32]. Abbildung 4 (**Abb. 4a**) zeigt schematisch eine Achillessehnenruptur und (**Abb. 4b**) eine intakte Achillessehne.

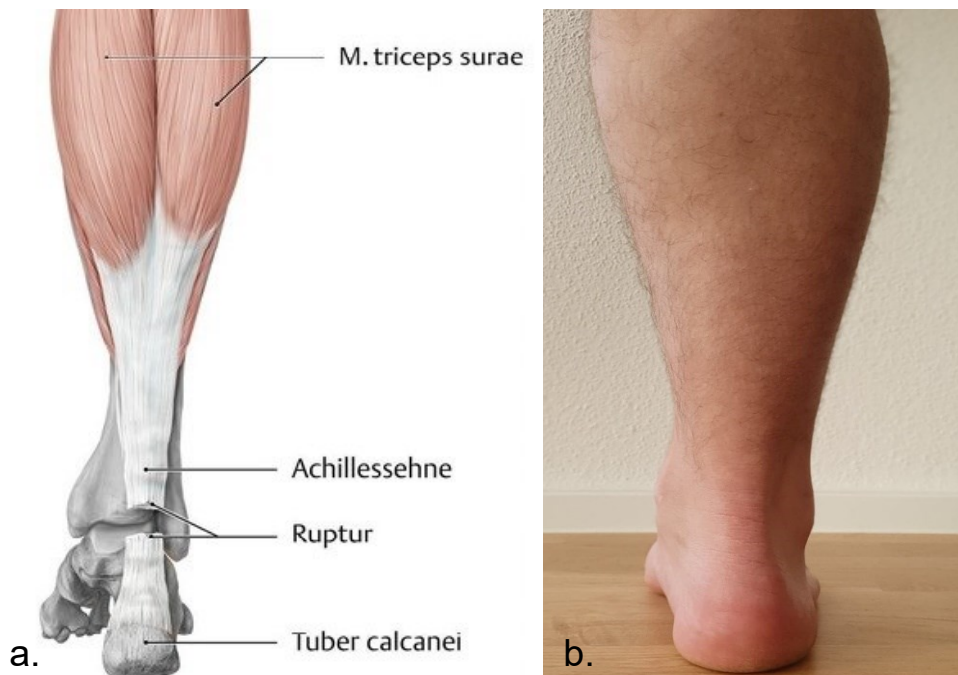


Abbildung 4a: Achillessehnen mit schematischer Darstellung einer Rupturzone [30], **b:** intakte Achillessehne.

1.3.4 Diagnostik der Achillessehnenruptur

Die Diagnostik der Achillessehnenruptur beginnt mit der Anamnese. Häufig berichten die Patienten über den Unfallmechanismus, ein deutlich hörbares Geräusch und über plötzlich verspürbare Schmerzen im Bereich der

Achillessehne. Kurz nach dem Unfallereignis kann eine gut tastbare Delle entlang der Kontrur der Sehne verspürt werden. Die Patienten können einen Zehenspitzenstand nicht durchführen und die plantare Flexion ist schmerzbedingt eingeschränkt. Ein positiver Thompson-Test (Wadenkneiftest) (**Abb. 5**) ist in der klinischen Diagnostik wegweisend. Durch den Thompson-Test werden die Funktionalität der Achillessehne sowie die Übertragung der Muskelkontraktion des M. triceps surae über die Achillessehne auf dem hinteren Ende des Os calcaneus überprüft. Zur Durchführung des Tests soll der Patient auf der Untersuchungsfläche in Bauchlage liegen. Die Füße sollen über den Rand der Liege frei hinausragen. Der Untersucher drückt die Wadenmuskulatur zusammen und somit wird eine passive Kontraktion der Muskulatur bewirkt. Bei einer intakten Achillessehne entsteht auf diese Weise eine Streckung des Fußes bzw. eine Bewegung des gesamten Fußes fußsohlenwärts (= Plantarflexion). In diesem Fall wäre der Test „Thompson-negativ“. Bei einer rupturierten Achillessehne bleibt diese Reaktion aus, d.h. dass keine Bewegung im Fuß durch die Kompression der Wadenmuskulatur erzeugt wird. Der Test wäre in dem Fall „Thompson-positiv“, indem auf eine Verletzung der Achillessehne hingewiesen wird [33].

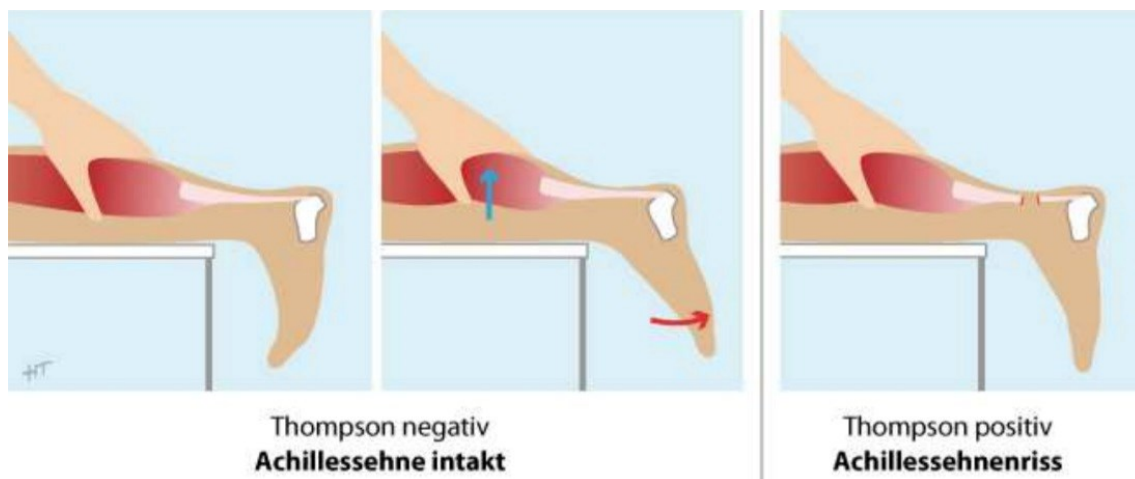


Abbildung 5: Thompson-Test – links negativ, rechts positiv [34].

Durch die Ultraschalluntersuchung (Sonographie) könnten die Lokalisation der Sehnenruptur und der Abstand der beiden freien Sehnen-Enden ermittelt werden. Die Durchführung einer Röntgen-Untersuchung wird zum Ausschluss von knöchernen Verletzungen oder besonders von einem knöchernen

Achillessehnenauriss benutzt. Bei einer eingeschränkten Beurteilbarkeit im Ultraschall, bei einem unklaren Befund (häufig bei älteren Teilrupturen) oder zur Beurteilung der Sehnenqualität für eine genaue operative Planung kommt die Kernspintomographie (MRT) als passende Untersuchungsmethode vor [35]. Die folgende Abbildung (**Abb. 6**) veranschaulicht die unterschiedlichen Untersuchungen.

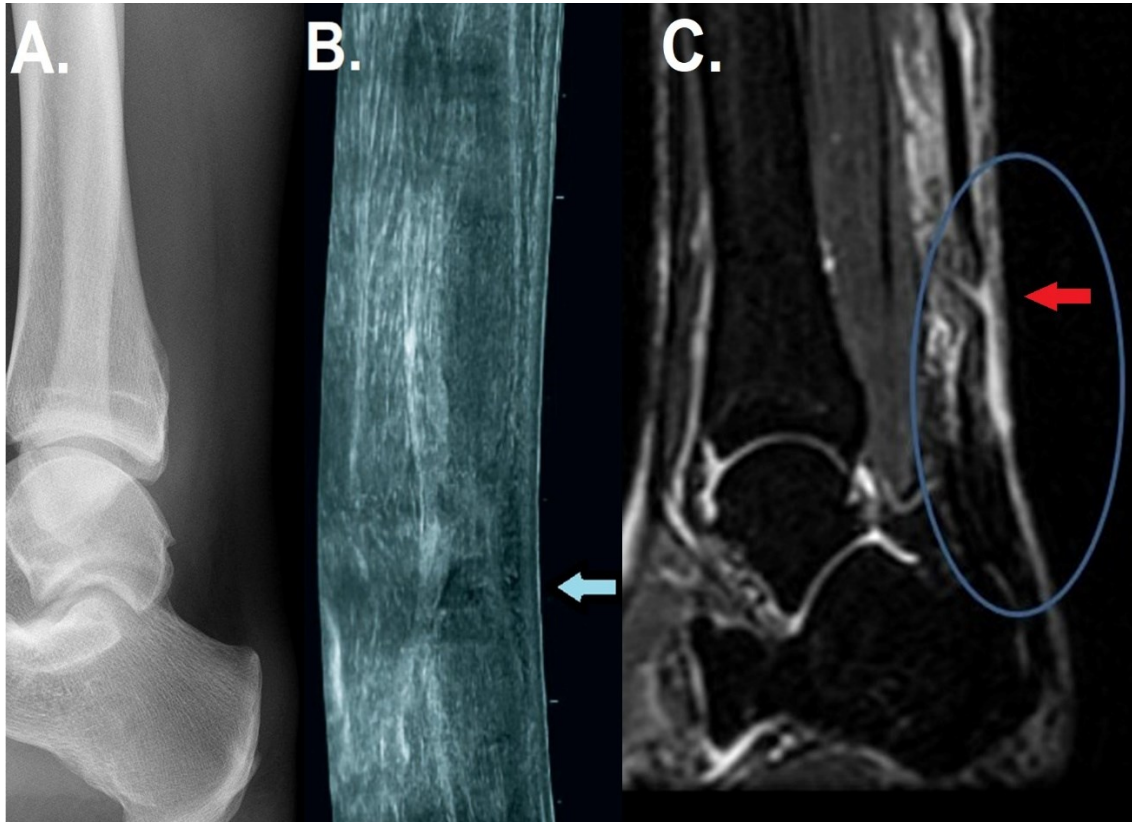


Abbildung 6: A. Röntgenbild zum Ausschluss knöcherner Verletzung B. Achillessehnenruptur in der Sonographie: Kontinuitätsunterbrechung (Blauer Pfeil) [36] C. Kernspintomographie einer gerissenen Achillessehne (Roter Pfeil) [37].

1.3.5 Anatomie des Mausunterschenkels

Mit seinen knöchernen Strukturen ähnelt der Mäuseunterschenkel (**Abb. 7**) dem menschlichen Unterschenkel. Beim Vergleich zeigt sich die Besonderheit bei der Tibia und Fibula, die proximal und distal verwachsen sind und somit gegeneinander unbeweglich. Am distalen Fußanteil sind alle fünf Zehen vorhanden und gut ausgebildet. Im Unterschied zu dem menschlichen Fuß sind Os metatarsale I und Os tarsale I verschmolzen. Dadurch ist die erste Zehe

kürzer als die anderen. Im dorsalen Anteil des Mäuseunterschenkels befinden sich der kleine M. plantaris, der deutlich prominente M. gastrocnemius mit seinen medialen und lateralen Köpfen und M. soleus. Der M. gastrocnemius (Caput mediale und Caput laterale) und der M. soleus verlaufen in der Achillessehne analog wie bei den Menschen zusammen und setzen sich an den Os calcaneus an. Interessanterweise ist die gesamte plantare Fläche des Mäusefußes bis zum Tarsalgelenk haarlos, was darauf hinweist, dass die Maus ein Sohlengänger ist [38].

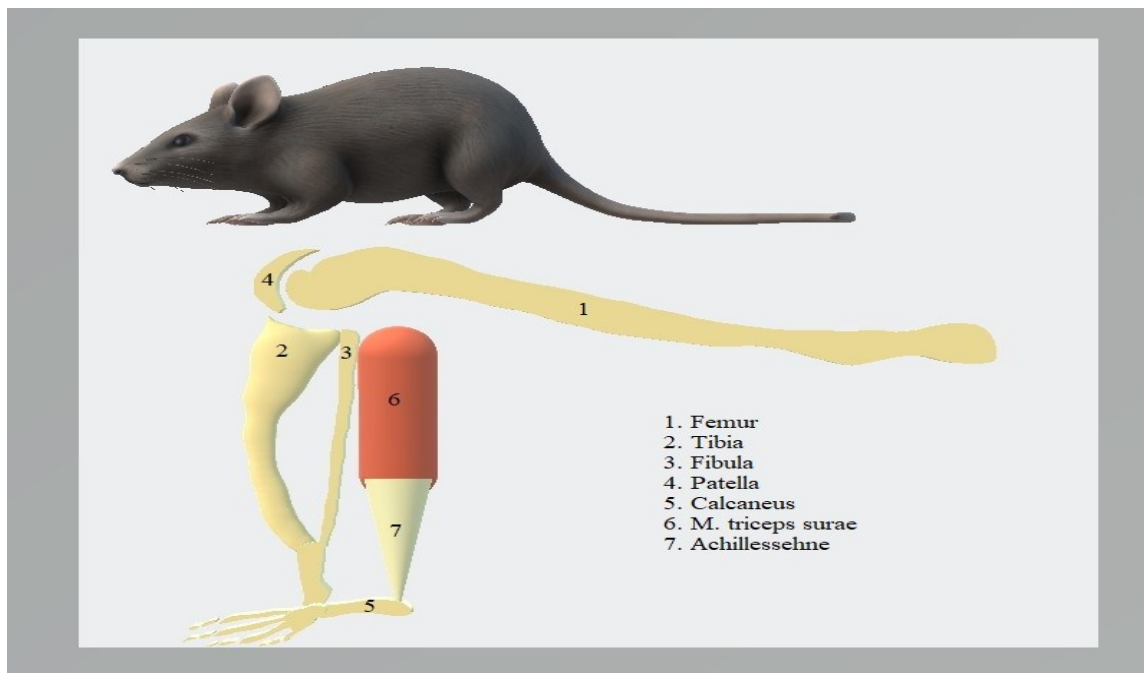


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Anatomie des hinteren Mäuseunterschenkels (erstellt mit Paint 3D, 2015-2018 Microsoft Corporation ©).

1.4 Sehnenpathologie, Epidemiologie der Achillessehnenruptur, Therapie

Durch die zunehmende Lebenserwartung, die immer steigende Bedeutung der sportlichen Aktivitäten und die Mobilität in der menschlichen Lebensweise beweisen sich die Sehnenrupturen und die Tendinopathien als eine häufige, nicht suffizient behandelbare klinische und finanzielle Herausforderung. Die Sehnen haben eine geringere natürliche Heilungskapazität und die benutzten Rekonstruktions- und Regenerationsmethoden in der Chirurgie, Orthopädie und Physiotherapie bieten unzufriedenstellende Ergebnisse in langer Sicht bei den

Patienten an. Nicht selten genesen die Sehnen nach einem pathologischen Ereignis ohne Wiederherstellung ihrer primären, kompletten Zugkraft, Festigkeit und Funktionalität.

1.4.1 Sehnenpathologie

Die Sehnen besitzen eine niedrigere Zelldichte, was eine wichtige Rolle für ihren Elastizitätsverlust und die Rupturneigung vermutlich spielt [8]. Die degenerativen Sehnenerkrankungen besitzen eine relativ hohe Prävalenz, v.a. beim zunehmenden Alter oder bedingt angesehen, bei einer erhöhten Sehnenbelastung, wie bei den Sportlern. Die degenerierten Sehnen können im Verlauf bereits bei einer geringeren Gewalteinwirkung rupturieren. Die Hauptbedingungen, die die Sehnen beeinträchtigen, sind Tendinitis und Tendinosis. Die Tendinitis ist mit einer inflammatorischen und schmerzhaften Klinik verbunden, wobei sie mit langsamen progredienten Degenerationsprozessen verwandt ist [39]. Es wurde vermutet, dass diese Krankheitsbedingungen selten spontan und durch einzelne Faktoren verursacht werden. Sonst sind sie durch eine Vielfalt von pathophysiologischen Zuständen hervorgerufen. Die Tendinosis wird v.a. durch mechanische Überbeanspruchung über längerer Zeit prädisponiert. Die Tendinitiden scheinen einen Zusammenhang mit den Entzündungen des naheliegenden Gewebes (Muskeln, Synovia, Gefäße und Nerven) zu haben, wie autoimmune, osteogene oder endogene bzw. bakteriämische Entzündungen. Die klinische Evidenz-basierte Medizin und die Statistik geben an, dass einige Sehnen anfälliger für pathologische Veränderungen und Rupturen sind [8], [40]. Diese sind die Sehnen der Rotatorenmanschette, Ligamentum tibialis posterior, die Patellarsehne und die Achillessehne [8]. Für die Sehnenpathologie spielen sowohl intrinsische Faktoren wie Geschlecht, Alter, Sehnenanatomie, Körpergewicht und systematische Erkrankungen, als auch extrinsische Faktoren wie physische Belastung, sportliche Aktivität, Berufs- und Umweltbedingungen bzw. Laufflächen oder Schuhe [1], [41].

1.4.2 Epidemiologie der Achillessehnenruptur und Therapie

Die Achillessehnenrupturen sind mit steigender Tendenz ein wichtiger Grund für die Verminderung der körperlichen Aktivitäten und die konsequente Minimierung des sportlichen Verhaltens bei Patienten. Innerhalb der letzten Jahre ist die Inzidenz in Deutschland an Achillessehnenrupturen auf ca. 20 000 Rupturen pro Jahr gestiegen. Die betroffenen Patienten sind mit durchschnittlich ca. 49 Jahren um 7 Jahre älter als 1994. Die Erklärung dafür ist in der steigenden Lebenserwartung, dem steigenden Interesse an sportlichen Aktivitäten und in der physischen Belastung bei den Patientengruppen über dem fünfzigsten Lebensjahr zu finden [42]. Insgesamt liegt die Inzidenz in den nördlichen Ländern (Nord Amerika, Europa) bei ca. 21,5 % [43]. Die Betroffenen sind meistens Männer zwischen 45 und 55 Jahren [44]. Der Heilungsprozess der Achillessehnenrupturen ist häufig langwierig und die Ergebnisse sind, subjektiv und funktionell angesehen, nicht selten unzufriedenstellend [45]. Bis zu 80 % der Patienten sind nach einer Achillessehnenruptur sportlich aktiv, aber weisen eine wesentliche Muskelschwäche und auch weiter verminderte Funktionalität auf, die mit einer Schwäche im Gastrocnemius-Soleus-Komplex und dem einhergehenden Kraftverlust der Plantarflexion im Vergleich zur gegenseitigen Extermität verbunden sind [46]. Die operierten Achillessehnen benötigen für die Heilung eine ca. sechs bis acht Wochen lange postoperative Entlastung bzw. spezielle Entlastungshilfsmittel und eine spezielle physiotherapeutische Beübung für ca. ein halbes Jahr postoperativ, was zum Verlust der notwendigen Spannung in der Muskel-Sehnen-Einheit und somit zu einer Veränderung des Gangbildes führt [47]. Der Rückkehr zur sportlichen Aktivität und die Wiederherstellung der präpathologischen Belastungskapazität werden postoperativ selten erreicht.

Nach einer konservativen Behandlung oder einer chirurgischen Intervention ist jedoch eine möglichst frühzeitige Mobilisation erwünscht, um das Risiko von einer Muskelatrophie und Thrombenbildung zu verhindern und um eine progrediente Sehnenversteifung zu vermeiden. Gleich angefangene postoperative konservative Mobilisierungseingriffe verursachen eine übermäßige Zugkraft der Sehne und dies erhöht das Risiko einer Rezidivruptur [48] und Sehnenverlängerung [49], [50]. Um die Sehnenheilungsprozesse zu fördern, ist

die postoperative Phase von grundlegender Bedeutung. Das Ziel ist die frühzeitige Verbesserung der Plantarflexionskraft, Steigerung der Gastrocnemiusmechanik und eine adäquate Kraft-Längen-Beziehung, oder die optimalen tiefen und oberflächlichen Plantarsynergisten zu aktivieren [51], [52]. Es besteht jedoch kein Konsens darüber, welche Operationstechnik am besten geeignet ist. Eine frühe physiotherapeutische Rehabilitation leistet aber die passenden postoperativen Bedingungen, damit diese Veränderungen begünstigt werden könnten. Der Grad des Risikos für eine Rezidivruptur und Sehnenverlängerung hängt von der Prävention des klinischen Versagens ab, d.h. Sehnenendtrennung über 5 mm, was durch das Reparaturdesign beeinflusst wird [50]. Die offenen Bunnell, Krackow- oder Kirchmayr-Kesslertechniken sind die standardisierten chirurgischen Eingriffe, die eine offene operative Gewebedissektion und Erweiterung des Eingriffs beinhalten [53]. Diese Technik verwendet ein Naht-Design an den lateralen Rändern der Sehnenenden, um die Stränge zu befestigen, und bringt die Sehnenenden bis zur kompletten Apposition näher, indem sie die freien Enden festzieht und bindet [54]. Der perkutane Eingriff, Dresdenertechnik genannt, erfolgt durch das zu diesem Zweck angewendete Instrumentarium und die Sehnennaht. Gezielt wird, das Paratenon zu bewahren und auf diese Weise die Sehnenheilung zu verbessern. Wird die Rupturregion bei der Operation eröffnet, wird von kombinierten offen-perkutanen Techniken (z.B. Hannoveraner Technik) gesprochen. Jedoch bietet die operative Versorgung einer Achillessehnenruptur keine komplette Wiederherstellung der Sehne. Trotz des etablierten operativen Verfahrens und der postoperativen Physiotherapie könnte die Rupturrezidivrisiko nicht gesenkt werden.

Während viele Sehnenverletzungen akut sind, ist eine sehr große Anzahl davon chronisch, die durch degenerative Prozesse verursacht ist [55]. Die Reparatur führt meistens zur Bildung von fibrovaskulären Narben, Adipozytenablagerungen oder heterotoper Ossifikation. Verglichen mit der gesunden Sehne werden die groben histologischen oder mechanischen Eigenschaften der operierten Sehne selten erreicht [56], [57]. Die genauen Mechanismen der Matrixregeneration, der postoperativen Gewebewiederherstellung und der anschließenden Reparaturprozesse bleiben weitgehend unbekannt [16].

1.5 Zielsetzung

Die Rolle von TNMD als Schlüsselprotein für die Sehnenproliferation wurde bis heute nicht ausreichend untersucht. Ziel dieser experimentellen, in-vitro Studie ist die biomechanische Analyse und der Vergleich des Ausreißverhaltens der Achillessehnen von Tnmd-Knock-Out-Mäusen als Versuchsgruppe und Wildtypmäusen als Kontrollgruppe.

Wir stellten die Hypothese auf, dass sich Unterschiede hinsichtlich der Ausreißkräfte und des Rupturverhaltens zwischen den Tnmd-Knock-Out-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen ermittelt werden könnten. Diese Studie wurde randomisiert und als Doppel-Blindstudie durchgeführt.

Folgende Fragen sollten im Zuge dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Unterscheidet sich die maximale Ausreißkraft der beiden Achillessehnengruppen bei den biomechanischen Dehnungsversuchen?
2. Gibt es Unterschiede der Primärstabilität der Gruppen hinsichtlich des Elastizitätsmoduls?
3. Welche weiteren Faktoren beeinflussen das Ausreißverhalten der Versuchs- und Kontrollgruppe biomechanisch?

2. Material und Methoden

2.1 Die Präparate

In der biomechanischen Testung wurden dreizehn Achillessehnenpaare, bzw. insgesamt 12 Mäuseachillessehnen (Wildtyp- und Heterozygote Tieren) und 14 Tnmd-Knock-Out-Mäuseachillessehnen sowie sechs weitere Achillessehnenpaare zur Optimierung und Etablierung eines standardisierenden Testverfahrens an der Zwick–Universalprüfmaschine (Modell Z010/TN2A, Fa. Zwick, Ulm, Deutschland) in Blindstudie und randomisiert analysiert (**Abb. 8 A**). Das Tenomodulin Gen ist im X-Chromosom lokalisiert, d.h. folgende genetische Kombinationen kommen vor: bei den Tieren weiblichen Geschlechts X^+X^+ (WT), X^+X^- (Heterozygot), X^-X^- (KO) und bei den Tieren männlichen Geschlechts X^+Y (WT) und X^-Y (KO). Es muss darauf hingewiesen werden, dass keine Genprodukte bei den heterozygoten Tieren weiblichen Geschlechts durch die X-Chromosom-Inaktivierung häufig erstellt werden und somit könnten sich diese Tiere wie Tnmd-KO verhalten bzw. werden die Tnmd-Allele aufgrund der Methylierung des X-Chromosoms inaktiviert. Die Achillessehnenpräparate von den Wildtyp- und Heterozygote-Mäusen und Tnmd-Knock-Out-Typ-Mäusen für die Vorversuchsphase und die Testungsphase stammen von speziell gezüchteten Mäusen vom Typ C57BL/6. Die beiden Gruppen von Präparaten (Hinterextremitäten) wurden paarweise vor der Testphase entnommen und uns vom Labor der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Campus Innenstadt der Universität München zur Verfügung gestellt. Von den insgesamt zwölf Wildtyp- und Heterozygote-Achillessehnen waren zehn (fünf Testmäuse) weiblichen Geschlechts (Heterozygot; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten) und zwei (eine Testmaus) männlichen Geschlechts. Bei den Knock-Out-Mäuseschienen waren von insgesamt vierzehn Achillessehnen zwölf (sechs Testmäuse) weiblichen Geschlechts und zwei (eine Testmaus) männlichen Geschlechts. Die Tnmd-Knock-Out-Mauslinie wurde durch ein standardisiertes Verfahren nach Docheva et al. [14] gewonnen. Es wurde cDNA von TNMD-Protein benutzt, ausgehend aus mäuselicher Phage, um eine künstliche chromosomale Datenbank herzustellen. Zwei Genfragmente

wurden subkloniert, sequenziert und in einem Vektor impliziert. Dieser Vektor wurde in embryonalen Stammzellen elektrophoriert. Ausgewählte Stammzellen wurden in mäusele Blastozysten injiziert, um Keimbahnchimären zu generieren. Diese wurden anschließend in C57BL/6 weiblicher Mäuse befruchtet. Danach wurde eine Genotypisierung durch Southern Blot durchgeführt. Die Tiere wurden im 5. Lebensmonat mit CO₂ euthanasiert und die Sehnenpräparate wurden direkt nach Euthanasie der Versuchstiere innerhalb von 24 Stunden post mortem zur Gewinnung vom ganzen Fuß-Sehnengewebe seziiert bzw. wurde eine en bloc-Resektion der muskulotendinösen Struktur gemeinsam mit Os Calcaneus grob durchgeführt (**Abb. 8 B**). Die Präparate wurden im Labor der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Campus Innenstadt der Universität München entnommen und bis zur biomechanischen Testung in einer Gefrierkammer bei -20 °C in phosphatgepufferter Kochsalzlösungskryokonserviert [58]. Wie der Abbildung 8 B. (**Abb. 8 B**) zu entnehmen ist, wurde zu wenig Fläche vom Os Calcaneus bei der Gewebepräparation übriggelassen, weswegen eine sichere Befestigung der Proben erschwert war.

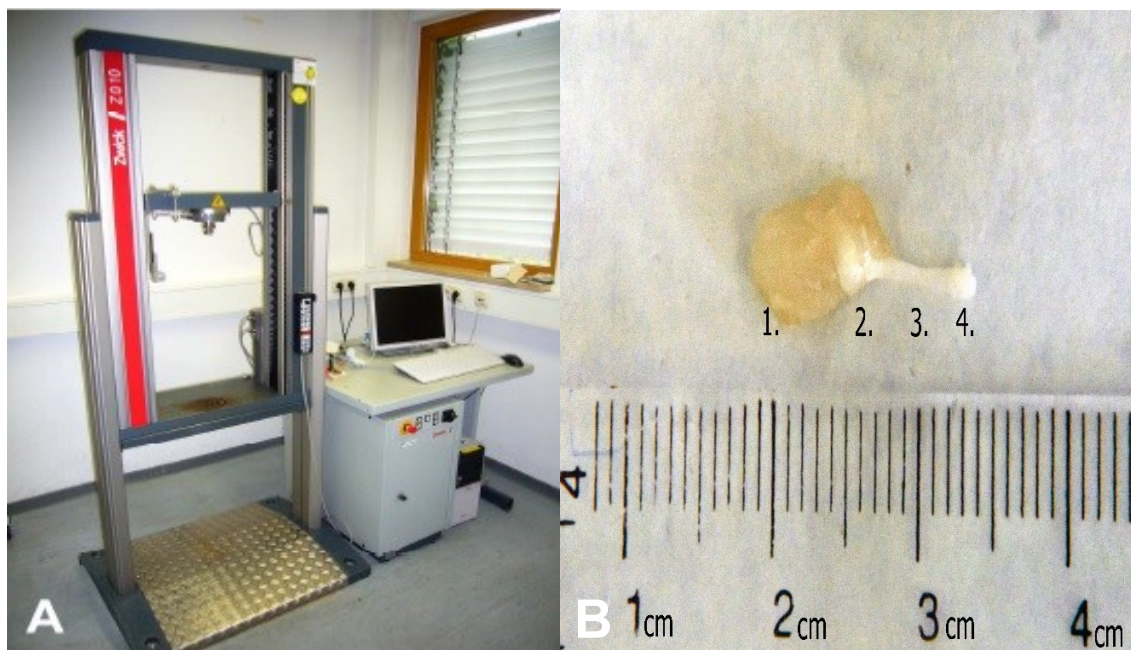


Abbildung 8: A. Arbeitsplatz mit der Zwick-Universalprüfmaschine zur Durchführung der biomechanischen Testung [59] B. C57BL/6-Mäusepräparate mit Beschriftung der anatomischen Hauptstrukturen: 1. M. Triceps surae, 2. Muskulotendinöser Übergang, 3. Achillessehne, 4. Os Calcaneus.

Die Transportierung wurde sowohl für die Vorversuchspräparate, als auch für die Testpräparate in einem Styropor-Transportbehälter mit Trockeneis durchgeführt und sofort im Tiefkühlschrank im Universitätslabor für Biomechanik & Experimentelle Orthopädie der Orthopädischen Klinik und Poliklinik, Campus Großhadern gelagert. So wurden alle Proben die ganze Zeit im tiefgefrorenen Zustand gehalten, um ihre physikalischen Eigenschaften unbeeinflusst zu erhalten [60]. Jedes Sehnenpaar wurde einen Tag vor der biomechanischen Testung bei Raumtemperatur ca. 23-24 °C aufgetaut. Es wurde darauf geachtet, dass eine zeitliche Grenze von 24 Stunden zwischen dem Anfang des Auftauprozesses und dem biomechanischen Test nicht überschritten wurde.

Nach dem Auftauen und vor der biomechanischen Testung wurden die Sehnen von der restlichen Wadenmuskulatur freipräpariert. In dieser Präparationsphase wurde darauf geachtet, dass keine muskulotendinöse Faser im muskulösen Teil der Mäuseunterschenkel beschädigt wurde. Dieser Prozess wurde bei Raumtemperatur mit regelmäßiger (circa jede 5. Minute) Anfeuchtung der Strukturen mit 0,9 % NaCl-Lösung durchgeführt. Um die Zeitamplituden zu vermessen, wurde eine Alarmuhr benutzt. In der Zeit, die für die Feinpräparation, das Vermessen jedes Präparats und für den biomechanischen Test gebraucht wurde, wurde die zweite Sehne vorsichtig in eine Mullkompressen gewickelt und in einer 0,9 % NaCl-Lösungswanne reingelegt, um eine Austrocknung und Beeinflussung der elastischen Eigenschaften vorzubeugen.

2.2 Die biomechanische Testung

Um ein standardisiertes Testprotokoll für die biomechanische Testung der Mäuseachillessehnen zu erstellen, hatten wir weitere sechs Sehnenpaare in Blindstudie und randomisiert getestet. Diese Achillessehnen wurden uns jeweils vom Labor der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Campus Innenstadt der Universität München zur Verfügung gestellt. Dafür nutzten wir den unterschiedlichen Aufbau der biomechanischen Testversuche für diese Sehnen. Mit der Vorversuchstestphase wurde darauf gezielt, mögliche Fehlerquellen zusammenzufassen, zu erkennen und ein standardisiertes

Testprotokoll zu erstellen. Die Präparation der Achillessehnen erfolgte vor der Vorbereitung der Vorversuchstestphase.

2.2.1 Auswahl der Messsonde

Für den korrekten ethischen Umgang mit den tierischen Präparaten ist es essentiell, auf größtmögliche Datengewinnung pro Präparat zu achten. Die Größe der Achillessehne (Mittelwert der Länge der Vorversuchsgruppe ~4,041 mm, Mittelwert des Durchmessers der Vorversuchsgruppe ~1,1 mm) der Mäusepräparate und die Durchführung der Tests an einer unpassenden Messsonde hätte zu systematischen Fehlern führen können. Deswegen war die erste Frage, die passende Auswahl der Messsonde des Gerätes und das vermutliche Ausreißkraftintervall zu finden, da keine ausreichende Information über die biomechanische Testung von Mäuseachillessehnen vom Typ C57BL/6 in der Fachliteratur vorhanden war. Ausgehend von dem Ergebnis der Rupturkraft in Rattenversuchen [61], die bei 34.8 N lag, wobei die Rattenachillessehnen an Durchmesser und Länge doppelt so groß als die Mäusesehnen sind, haben wir eine Messsonde (Model HBM Z6FD1; Zwick) mit einem Messbereich bis zu 100 Newton gewählt. Laut Angaben des Herstellers verfügte die Messsonde über eine Traversengeschwindigkeit von 0,001 bis 1000 mm/min (Geschwindigkeitsgenauigkeit von < 0,0125 %) sowie eine relative Messunsicherheit von 0,21 %. Die Handhabung der Universalprüfmaschine, die Verfolgung des Testprozesses und die Auswertung der Experimente erfolgten durch das Programm testXpert V12.1 (Zwick, Ulm, Deutschland). Das Programm wurde auf einem PC mit Windows XP als Betriebssystem installiert.

2.2.2 Versuchsaufbau

Nach der Vorbereitung und dem Vermessen jeder einzelnen Testsehne wurden vier circa 6 x 6 mm Sandpapierstücke pro Achillessehne ausgeschnitten. Diese wurden auf beiden Seiten des Testspräparats gegeneinander mithilfe von Sekundenkleber Pattex 3g.-Henkel AG & Co. KGaA (Rohstoffbasis/ Inhaltstoff:

Ethylcyanacrylat/ Thyxotroper Cyanacrylatklebstoff mit Mikro-Gummipartikeln) aufgeklebt. Nur der knöcherne Anteil distal des Os Calcaneus wurde am unteren Sehnenrand geklebt, damit die Dehnbarkeit der Sehnen durch den Sekundenkleber nicht beeinflusst wurde. Am oberen Sehnenrand wurde das Sandpapier circa 5 mm über dem muskulotendinösen Übergang im Bereich der Streifenmuskulatur geklebt. Zu diesem Zweck wurden anatomische Pinzetten benutzt, mit deren Hilfe die kleinen Sandpapierstücke positioniert wurden (**Abb. 9**) [62]. Der flüssige und lösungsmittelfreie Sekundenkleber (Pattex 3g.) besaß einen stoßsicheren Dosierspender, sodass ein präzises und kontrolliertes Auftragen beim optimalen Auslaufschutz ermöglicht wurde. In der Herstellerbeschreibung des Sekundenklebers wurde angegeben, dass er keine thermischen Reaktionen verursacht und ein temperaturbeständiges Wirkungsspektrum von (- 20 °C bis + 80 °C) aufweist. Auf diese Weise wurde eine thermische Einwirkung der Sehneneigenschaften in Bezug auf Dehnbarkeit, Elastizität und Festigkeit vermieden. Nach der Beklebung der Sehne wurde die 5-minütige Wirkungszeit des Klebstoffs abgewartet. In dieser Zeit wurde jede Sehne mittels Injektionsspritze mit Nadel mit einer NaCl 0,9 %-igen Lösung einmal angefeuchtet.

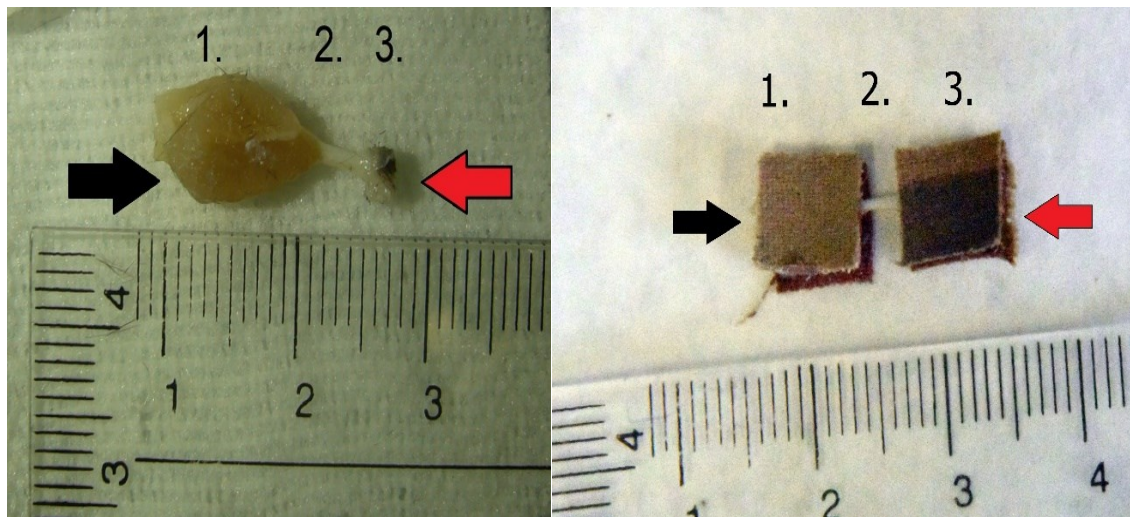


Abbildung 9: Darstellung des beschriebenen Vorgangs zum Versuchsaufbau mit Nummerierung der Sehnenanteile. Der rote Pfeil zeigt den distalen, knöchernen Anteil und der schwarze Pfeil den proximalen, muskulösen Anteil der Sehne. Mit **1.** sind der M. Triceps surae, mit **2.** die Achillessehne und mit **3.** Os calcaneus dargestellt.

Die angefertigten Testpräparate und die darauf geklebten Sandpapierstücke wurden am proximalen (muskulären) Anteil mittels zwei Klammern (proximale Klammerhalterung) an der Messsonde der Universalprüfmaschine (Zwick Z 10) gegeneinander verschraubt. Die Schrauben hatten keinen Kontakt zum Muskel. Die Sehnenposition wurde durch den Drehvorgang der Schrauben nicht beeinflusst. Der distale Teil der Sehne bzw. der knöchernen Fußteil (Os calcaneus) wurde zwischen zwei beweglichen Schraubenklammern (distale Klammerhalterung) ebenfalls an der Prüfmaschine befestigt. Demnächst wurden die Testsehnen durch präzise Einstellung an der Universalprüfmaschine (Zwick Z 10) bzw. an der beweglichen Traverse in der anatomisch korrekten Achse und in der spannungsfreien Position ausgerichtet.

Nach der optimalen Positionierung des Präparats wurde der distale Schraubenklammerteil mit zwei Werkzeugklemmen links und rechts an einer Halterungsplatte am unteren unbeweglichen Teil der Universalprüfmaschine festgedreht. Die folgende Abbildung (**Abb. 10**) veranschaulicht eine positionierte Achillessehne und den Aufbau der Befestigungsteile vor dem Dehnungsversuch.

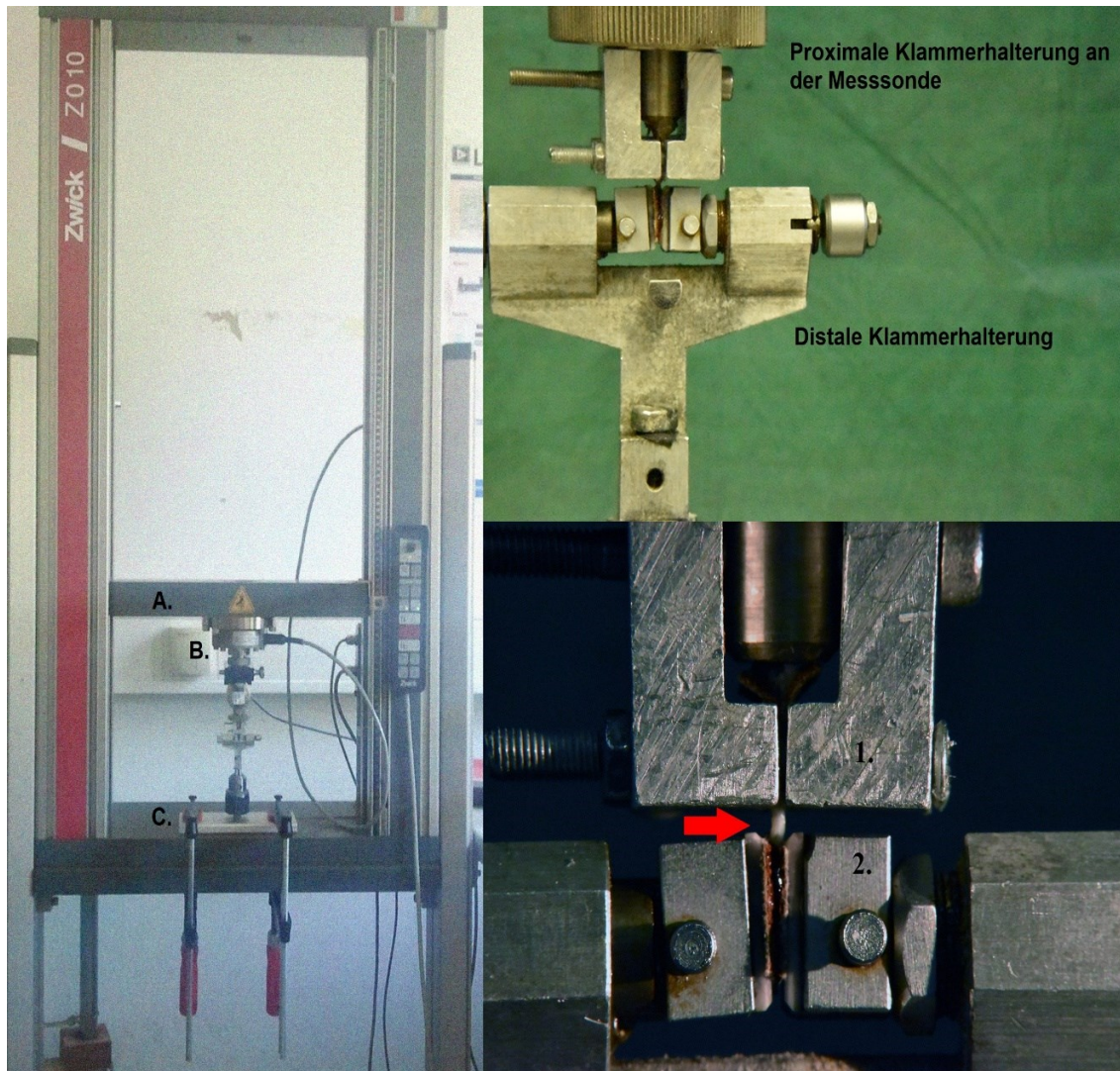


Abbildung 10: Darstellung der an der Zwick Z 10-Universalprüfmaschine befestigten Achillessehne. **A.** Traverse, **B.** Messsonde, **C.** Halterungsplatte. Der rote Pfeil zeigt die Achillessehne in einer zugfreien Anfangsposition zwischen Klammerbacke proximal und distal. Mit **1.** sind die verschraubten Klammern am proximalen (muskulären) Rand der Sehne zu sehen bzw. mit **2.** der distale (knöcherne) Teil mit den Schraubenklammern.

2.3. Konditionierung der Achillessehnen

Um die Simulation einer physiologischen Situation des Sehnenrisses zu gewährleisten, wurde eine zyklische ex-vivo Sehnenkonditionierung bei jedem Präparat nach der Positionierung der Achillessehne in der Universalprüfmaschine Zwick Z10 und nach Angabe der Sehnenlänge und des Sehnen durchmessers durchgeführt. Die Sehnenfibrillen wurden in Ruhe geschlängelt aufgeräumt. Durch die Konditionierung konnten die Sehnenfibrillen längst gerichtet werden. Somit konnte eine optimale Zugfestigkeit der

Sehnenfibrillen erreicht werden. Die Konditionierung wurde aufgrund eines etablierten Testprotokolls nach Ficklscherer et al. [63] durchgeführt. In ähnlichen Versuchen aus unserem Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie etablierten Ficklscherer et al. ein Testprotokoll zur Konditionierung von Sehnen bei Dehnungsversuchen.

Für die Konditionierung wurde eine Vorspannung auf 0,2 N angelegt bzw. einen Lastzustand, ab dem alle Proben beginnen, um eine Standard-Nulllast zu definieren. Nach der Vorspannung und laut dem Protokoll wurde eine Dehnungsrate mit einer Geschwindigkeit von 0,1 %/s ausgewählt, um einen optimalen und ständigen Zug zu gewährleisten und einen konsistenten Lastverlauf für jedes Präparat zu definieren [63]. Es wurden 5 Zyklen in angespannter Position und 5 Zyklen in entspanntem Zustand für 300 Sekunden pro Zyklus durchgeführt (**Abb. 11**). Die Achillessehnen wurden am Anfang jeder Konditionierungsphase mit einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung angefeuchtet. Auf diese Weise wurde ein Sehnenzustand angestrebt, der einer in vivo Situation vor der Sehnenruptur möglichst nahekommt. Zur Prüfung der Kraft und des Elastizitätsmoduls beim Versagen wurde anschließend ein Test der konstanten Dehnungsrate bis zum Versagen durchgeführt. Nach dem Abschluss der Konditionierung und des Zugversuchs bis zum Sehnenversagen wurden für jede Sehne Testprotokolle erfasst. Wir haben die TestXpert-Software (Version 12.1; Zwick, Ulm, Deutschland) verwendet, um die Messungen aufzuzeichnen und die Daten auszuwerten.

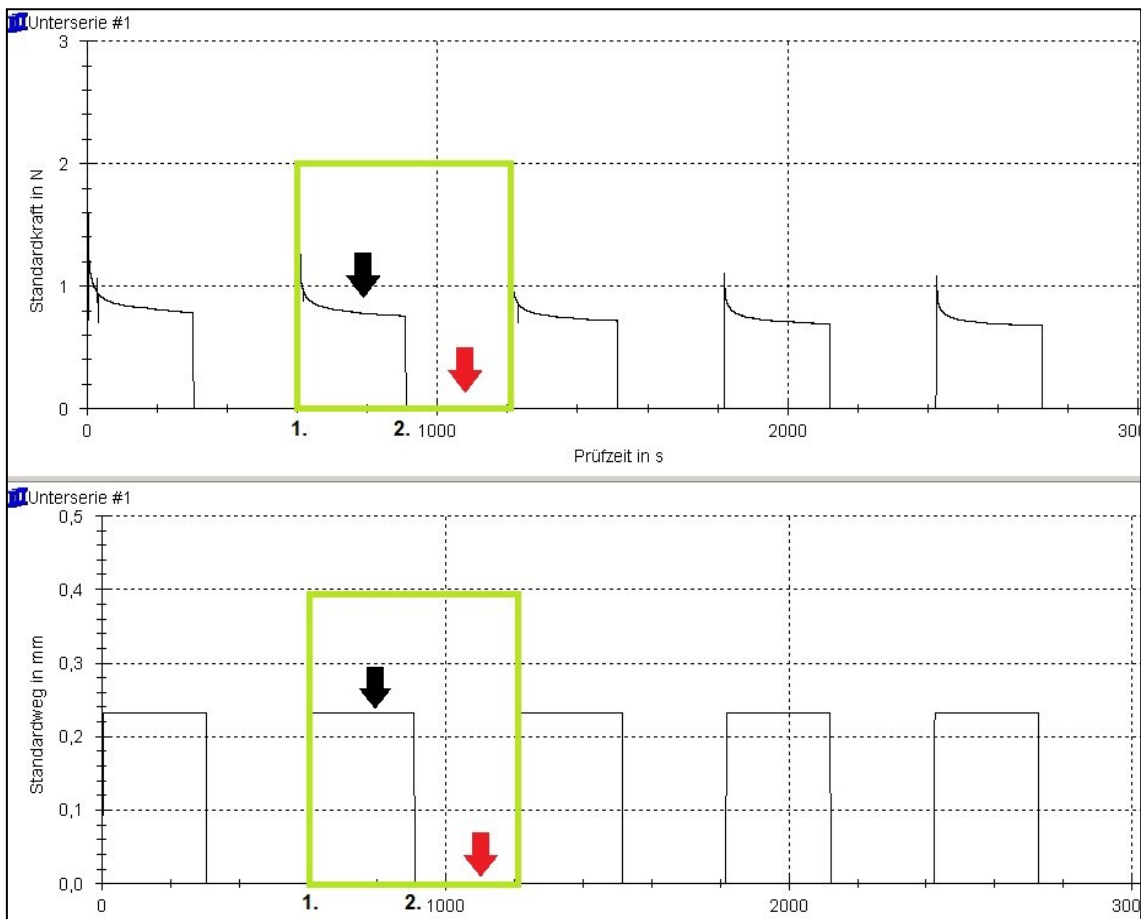


Abbildung 11: Dargestellt sind die fünf Konditionierungszyklen. Oben ist die Standardkraft in Newton angegeben. Unten ist der Standardweg (Vordehnung) in Millimeter gezeigt. Das grüne Rechteck zeigt einen Konditionierungszyklus. Mit 1. ist der Anfang der Anspannungsphase und mit 2. der Anfang der Entspannungsphase dargestellt. Der schwarze Pfeil zeigt die Achillessehne bei der Anspannungsphase (300 s), der rote Pfeil zeigt die Achillessehne in der spannungsfreien Phase (300 s).

2.4. Messparameter

Für den Test wurden folgende Werte und Parameter bestimmt. Die Bestimmung der Sehnenlänge und des Durchmessers wurde vor der Befestigung des Präparates an der Universalprüfmaschine durchgeführt.

- Die Sehnenlänge und der Sehnendurchmesser wurden mittels eines digitalen Messschiebers (Messfehler nach Hersteller zwischen 0,01 mm und 0,2 mm) gemessen. Jede Messung der Länge und des Durchmessers wurde zweimal durchgeführt. Für das Prüfprotokoll wurde der Mittelwert von den beiden Messungen genommen. Bei dem Ausmessen der Länge wurde nur die tatsächliche Länge der Achillessehne berücksichtigt, ohne

dass die Restmuskulatur, der musklotendinöse Übergang oder der knöcherne Anteil (Os calcaneus) miteinbezogen werden. Dann wurde der Durchmesser mit dem Messschieber ausgemessen. Ebenfalls erfolgten zwei Messungen des Durchmessers. Für den Test wurde der Mittelwert benutzt. Um eine Beschädigung der Strukturen beim Messvorgang vorzubeugen, lag jedes Präparat im angefeuchteten Zustand auf einer feuchten Mullkompressen. Der Messvorgang kann mit der Abbildung 12 (**Abb. 12**) veranschaulicht werden. Die protokollierten Messwerte wurden für jede Achillessehne ins Programm testXpert V12.1 (Zwick, Ulm, Deutschland) eingetragen.

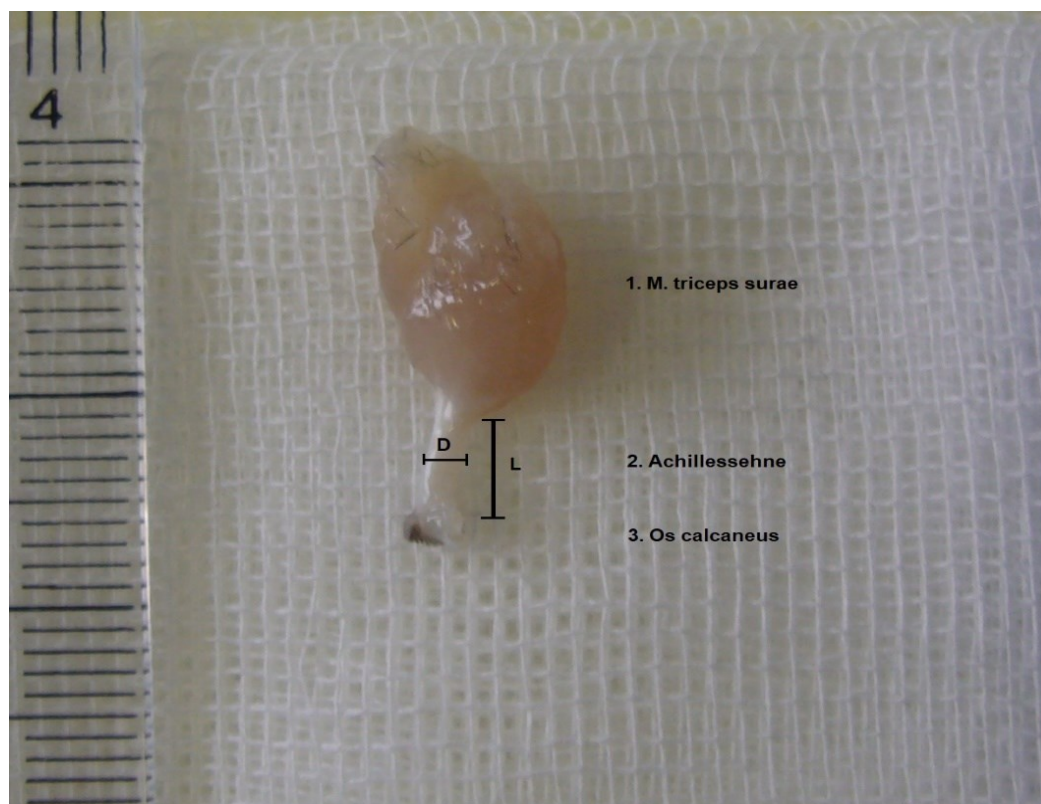


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Messung von Sehnenlänge (L) und Durchmesser (D) mit einem Messschieber.

- Maximale Ausreißkraft ($F_{\max}$): Als maximale Ausreißkraft wird die Maximalkraft in Newton bezeichnet, die erforderlich ist, um eine Ruptur der Sehne bzw. das Materialversagen zu beobachten.
- Das Elastizitätsmodul (E-Modul) beschreibt die Änderung der Form einer festen Struktur bei einer ausgeübten Kraft an der Struktur bzw. das proportionale Verhältnis zwischen der Dehnung und der Spannung bei der

linear-elastischen Verformung eines festen Körpers. Das E-Modul wurde in Newton/mm² anhand der Formel: $m = \Delta y / \Delta x = y_2 - y_1 / x_1 - x_2$ berechnet. Es wurde darauf geachtet, dass sich die ausgewählten Punkte für x und y nur auf der Parabel der elastischen Verformung befinden. Auf diese Weise wurde gezielt, dass keine systematischen Fehler auf Grund der Größe der Probesehnen durch das Software-Programm entstehen könnten. Zum Ende jedes Zugversuches wurde jede Achillessehne an der Universalprüfmaschine weiter gedehnt, damit eine vollständige Durchtrennung der beiden Sehnenenden beobachtet werden konnte. Erst dann wurde der tatsächliche Rupturort dokumentiert.

- Sehnenrupturort: Als Sehnenrupturort (**Abb. 13**) wird der Sehnenanteil bezeichnet, wo ein Riss bzw. Versagen der Sehne durch die ausgeübte Zugkraft beobachtet wird. Der Rissort wurde an folgenden vier Punkten bzw. von proximal nach distal wie folgt bestimmt: am muskulotendinösen Übergang, am proximalen Sehnenanteil, intratendinös (an der Sehnenmitte) und am distalen Sehnenanteil (vor dem Sehnenansatz am Calcaneus).

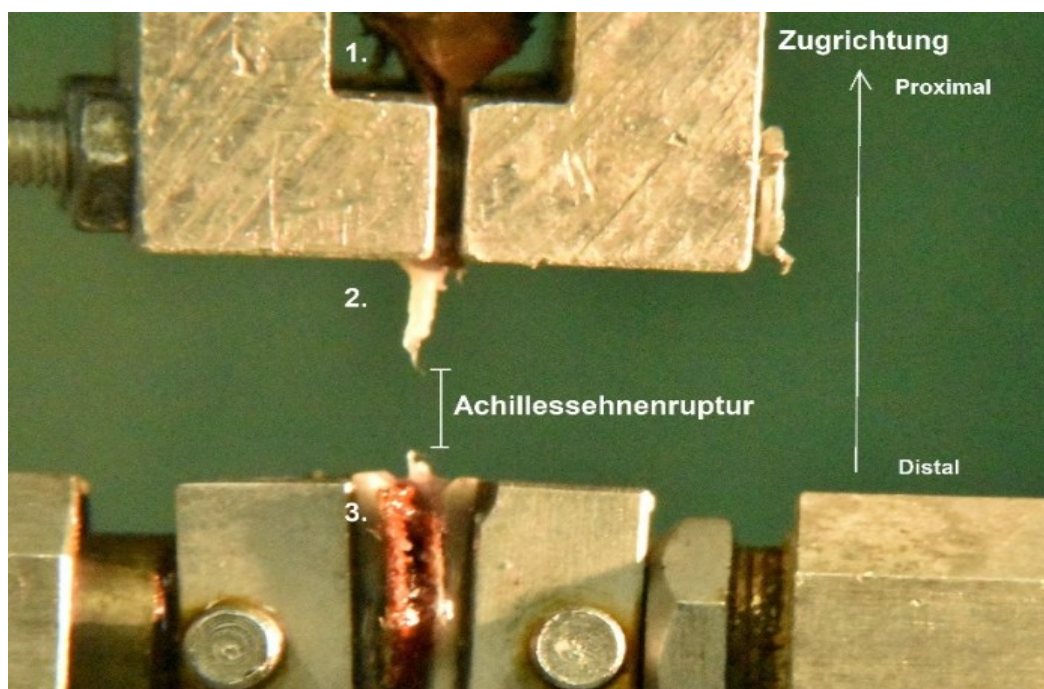


Abbildung 13: Darstellung einer vollständigen Sehnenruptur am Ende des Zugversuchs. Auf diesem Bild ist eine Ruptur im Bereich des distalen Sehnenanteils zu sehen. (1. M. Triceps surae, 2. Achillessehne, 3. Os Calcaneus).

2.5. Statistik

Die statistische Datenerhebung, die Evaluation, die Signifikanzberechnung, die Korrelationsanalysen und die graphische Darstellung der statistischen Daten wurden mit GraphPad Prism statistical software, Version 6.01 (GraphPrism Software, San Diego, CA) für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Zur Signifikanzprüfung wurden hauptsächlich nicht-parametrische Testverfahren benutzt. Von einer Normal- bzw. Gaußverteilung bezüglich der verwendeten Präparate konnte nicht ausgegangen werden.

Die Daten über die Sehnenlänge und den Durchmesser, das E-Modul und die maximale Ausreißkraft wurden in Box-Plot-Diagrammen zusammengefasst, dargestellt und durch einen ungepaarten t-Test ausgewertet. Damit konnte die Differenz vom Mittelwert der Stichproben zum tatsächlichen Mittelwert der Grundgesamtheit berechnet werden.

Zur Berechnung der Korrelationen wurden lineare Regressionsanalysen angewendet. Für die Berechnung der Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) als obere Grenze ausgewählt. Mit den Korrelationsdiagrammen wurden die Werte visualisiert.

3. Ergebnisse

3.1 Sehnenlänge

Die folgenden Diagramme stellen die statistische Zusammenfassung der gemessenen Daten über die Sehnenlänge dar.

Die Achillessehnen der Tnmd-Knock-Out-Mäusen hatten eine mittlere Sehnenlänge von 4,575 mm (Standardabweichung $\sigma = 0,3136$ mm) und lagen im Intervall zwischen 4,100 mm und 5,200 mm. Die Achillessehnen der Wildtyp- und Heterozygoten-Mäusen hatten eine mittlere Sehnenlänge von 4,638 mm (Standardabweichung $\sigma = 0,2247$ mm) und lagen im Intervall zwischen 4,200 mm und 4,900 mm. Die folgende Abbildung (**Abb. 14**) veranschaulicht die Sehnenlänge der beiden Testgruppen. Es zeigte sich keine Signifikanz beim Vergleich der Sehnenlänge beider Mäusegruppen, und der p-Wert betrug 0,5006. Bei den Präparatenproben 9.1 und 9.2, die von den hinteren Extremitäten gleichen Versuchstiers stammen, konnte die größte Differenz in der Sehnenlänge mit ca. 0,7 mm beobachtet werden. Eine weitere deutliche Längendifferenz von 0,5 mm zwischen den beiden hinteren Extremitäten gleichen Versuchstiers wurde bei Proben 11.1 und 11.2 gemessen.

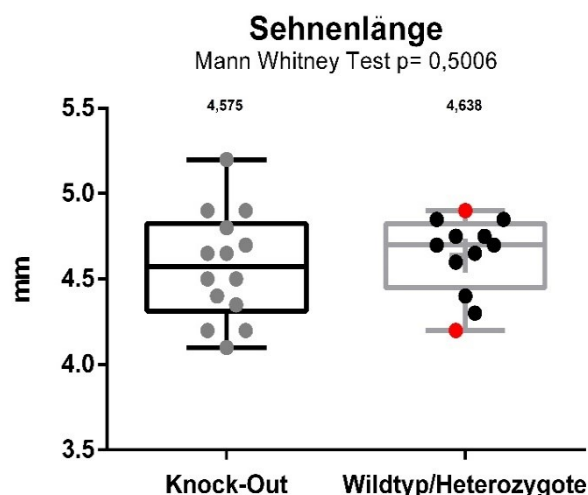


Abbildung 14: Sehnenlänge in mm, Knock-Out vs. Wildtyp/Heterozygote (Die roten Punkte zeigen die Mäuse männlichen Geschlechts) mit dem entsprechenden Mittelwert für die beiden Gruppen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.

3.2 Sehnendurchmesser

Die Achillessehnen der Tnmd-Knock-Out-Mäusen hatten einen mittleren Sehnendurchmesser von 0,9179 mm (Standardabweichung $\sigma = 0,1539$) und lagen im Intervall zwischen 0,6500 mm und 1,200 mm. Die Achillessehnen der Wildtyp/Heterozygoten-Mäuse hatten eine mittlere Sehnenlänge von 0,8917 mm (Standardabweichung $\sigma = 0,1412$) und lagen im Intervall zwischen 0,7500 mm und 1,200 mm. Der statistische Zusammenhang in Bezug auf den gemessenen Durchmesser der Präparate wird mit dem folgenden Diagramm (**Abb. 15**) verdeutlicht. Es zeigten sich keine statistischen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit $p = 0,5993$.

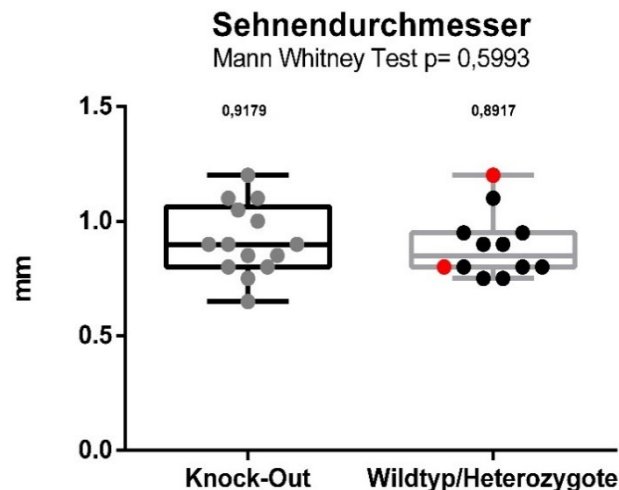


Abbildung 15: Sehnendurchmesser in mm, Knock-Out vs. Wildtyp/Heterozygote (Die roten Punkte zeigen die Mäuse männlichen Geschlechts) mit dem entsprechenden Mittelwert für die beiden Gruppen Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.

3.3. Maximale Ausreißkraft (Fmax)

Die maximale Ausreißkraft wurde in Newton (N) gemessen. Das Ausreißkraftintervall ergab Werte von 2,620 N und 19,490 N bei den TNMD-Knock-Out-Mäusepopulationen bzw. 4,120 N und 14,560 N bei der Wildtyp/

Heterozygoten-Vergleichsgruppe. Die Mittelwerte betrugen 7,100 N in der ersten Gruppe und 10,560 N in der zweiten. Der Mittelwert der Rupturkraft bei den Tnmd-Knock-Out-Mäusen lag bei 9,960 N (Standardabweichung $\sigma = 5,110$) und 9,878 (Standardabweichung $\sigma = 3,040$) für die Kontrollgruppe bzw. Wildtyp/Heterozygoten-Mäuseachillessehnen. Der p-Wert lag bei $p = 0,9616$. Damit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der getesteten Sehnen von den beiden Mäusegruppen. Das Box-Plot-Diagramm (**Abb. 16**) stellt die gemessene maximale Ausreißkraft bzw. die maximale Zugkraft bis zum Versagen der Achillessehnen in den beiden Gruppen-TNMD-Knock-Out-Mäusesehnen und Wildtyp/Heterozygoten-Mäusesehnen dar.

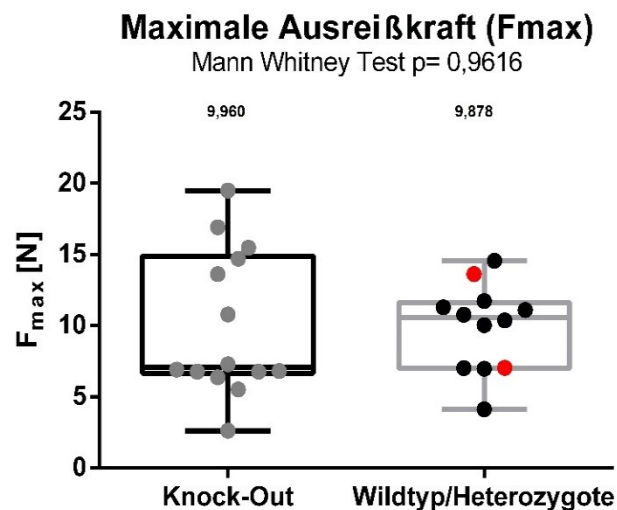


Abbildung 16: Maximale Ausreißkraft in Newton, Knock-Out-Mäuse vs. Wildtyp/Heterozygoten-Mäuse (Die roten Punkte zeigen die Mäuse männlichen Geschlechts) mit dem entsprechenden Mittelwert für die beiden Gruppen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.

3.4. Elastizitätsmodul (E-Modul)

Die gemessenen Daten über das Elastizitätsmodul wurden in Newton/mm² dargestellt. Die getesteten Knock-Out-Sehnen zeigten ein Elastizitätsintervall von 5,876 Newton/mm² bis zu 26,14 Newton/mm² und dieses der Wildtyp/Heterozygoten-Kontrollgruppe wies Werte zwischen 4,121 Newton/mm² und 32,59 Newton/mm² auf. Der Median ergab sich als relativ ähnlich in den

beiden Vergleichsgruppen wie folgt: 14,05 Newton/mm² bei den Knock-Out-Mäusen und 12,40 Newton/mm² bei den Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen. Mit einem Unterschied von 0,44 Newton/mm² lag der Mittelwert beim Vergleich der beiden Gruppen bei 14,47 Newton/mm² in der Knock-Out-Population (Standardabweichung $\sigma = 6,235$) und 14,03 Newton/mm² in der Wildtyp/Heterozygoten-Population (Standardabweichung $\sigma = 8,433$). Der p-Wert betrug $p = 0,8797$. In den beiden Gruppen konnte keine wesentliche, statistische Signifikanz festgestellt werden. Das folgende Diagramm (**Abb. 17**) veranschaulicht das Elastizitätsmodul beim Vergleich der beiden Testgruppen bzw. TNMD-Knock-Out-Mäuseschienen und Wildtyp/Heterozygoten-Mäuseschienen.

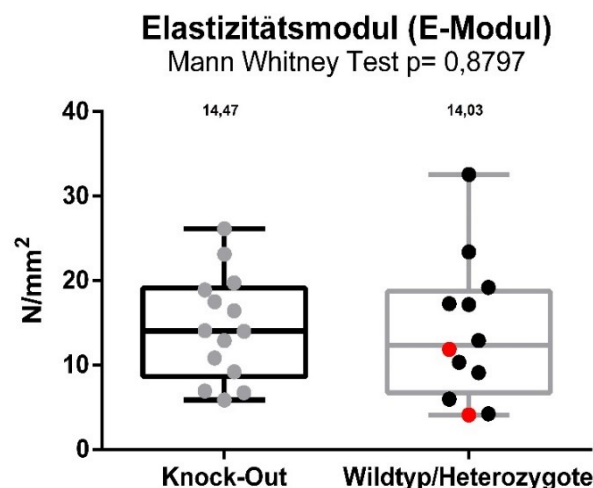


Abbildung 17: Elastizitätsmodul in Newton/mm², Knock-Out-Mäuse vs. Wildtyp/Heterozygoten-Mäuse (Die roten Punkte zeigen die Mäuse männlichen Geschlechts) mit dem entsprechenden Mittelwert für die beiden Gruppen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.

3.5. Rupturort

Am Ende jedes Zugversuchs wurden die vollständige Ruptur bzw. die Rupturhöhe der Achillessehne protokolliert. Der Rupturort wurde in vier Punkten aufgeteilt bzw. von proximal nach distal wie folgt: muskulotendinöser Übergang (MT-Übergang), proximaler Sehnenanteil (proximal), Sehnenmitte

(intratendinös) und distaler Sehnenanteil (distal). Bei jedem getesteten Präparat wurde der Durchtrennungsort fotografiert und ausgewertet. Bei den Knock-Out-Achillessehnen rupturierten neun Sehnen im distalen Anteil, zwei intratendinös, jeweils zwei im Bereich des muskulotendinösen Übergangs der Sehne und eine Achillessehne im proximalen Sehnenanteil. In der Wildtyp/Heterozygoten-Mäusegruppe rupturierten neun jedoch im distalen Sehnenanteil, eine Sehne im Bereich der muskulotendinösen Übergangszone und eine im proximalen Sehnenanteil. Intratendinös konnte keine Ruptur in dieser Gruppe beobachtet werden. Bei achtzehn der insgesamt sechsundzwanzig getesteten Sehnen wurde eine Ruptur im distalen Sehnenbereich, zwischen dem anatomischen Calcaneusansatz und dem intratendinösen Sehnenanteil beobachtet. In drei der Achillessehnen befand sich der Rupturpunkt auf der Höhe des muskulotendinösen Übergangs. Zwei der Sehnen wurden im intratendinösen Bereich rupturiert und bei drei getesteten Sehnen lag der Rupturpunkt im proximalen Sehnenbereich unterhalb des muskulotendinösen Übergangs und oberhalb des mittleren Sehnenanteils. Die folgenden Balkendiagramme (**Abb. 18 und Abb. 19**) zeigen systematisch den Rupturort der getesteten Achillessehnen von den beiden Mausgruppen bzw. Tnmd-Knock-Out-Mäusen und Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen.

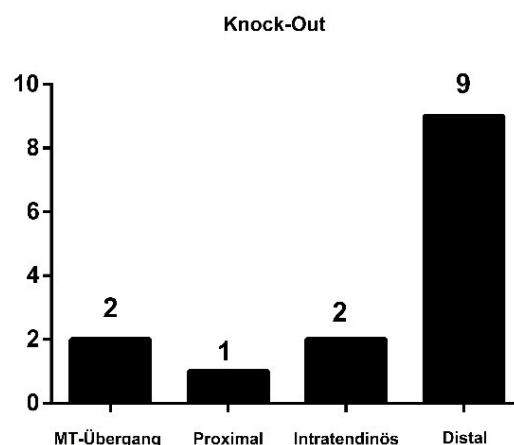


Abbildung 18: Rupturort der Knock-Out-Achillessehnen. Am häufigsten sind die Sehnen im distalen Anteil rupturiert.

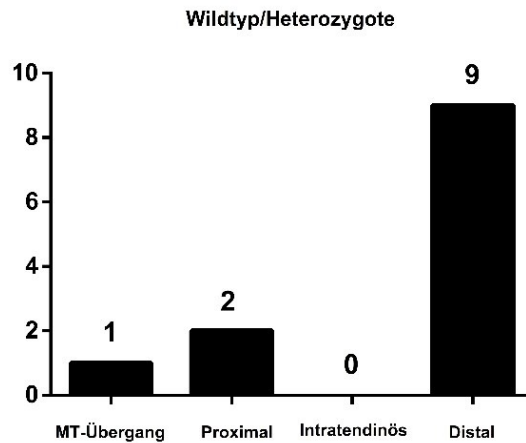


Abbildung 19: Rupturort der Wildtyp/Heterozygoten-Achillessehnen. Am häufigsten wird eine Ruptur im distalen Sehnenanteil beobachtet. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.

3.6. Korrelation der Ausreißkraft zur Sehnenlänge von Tnmd-Knock-Out-Mäusen

Bei den Knock-Out-Mäusen (**Abb. 20**) konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen der maximalen Ausreißkraft und der Sehnenlänge bestimmt werden. Es besteht kein Zusammenhang beim Vergleich der maximalen Ausreißkraft und der zunehmenden Sehnenlänge.

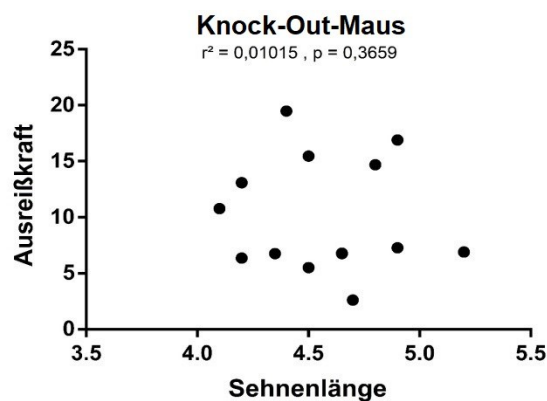


Abbildung 20: Korrelation der Ausreißkraft zur Sehnenlänge bei Knock-Out-Maus.

3.7. Korrelation des Elastizitätsmoduls zur Sehnenlänge von Tnmd-Knock-Out-Mäusen

Es bestand jedoch keine positive signifikante Korrelation bei den Knock-Out-Mäusen zwischen dem Elastizität-Modul und der Sehnenlänge. (**Abb. 21**)

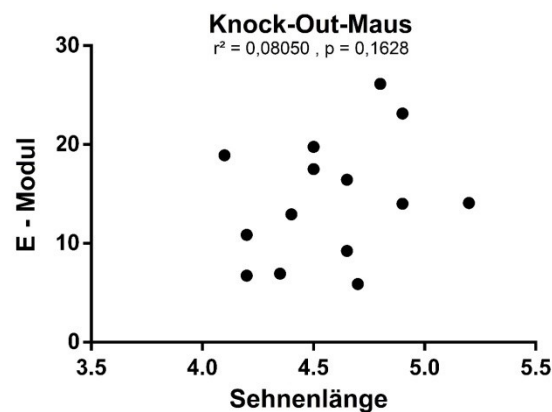


Abbildung 21: Korrelation des E-Moduls zur Sehnenlänge bei Knock-Out-Maus.

3.8. Korrelation der Ausreißkraft zur Sehnenlänge von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen

Die Korrelation zwischen der Ausreißkraft und der Sehnenlänge von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen war nicht signifikant (**Abb. 22**). Hinweis zu Heterozygoten-Mäusen: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten. In Anbetracht der Korrelation zwischen der Ausreißkraft und der Sehnenlänge von Knock-Out-Mäusen lässt sich das Ergebnis ermitteln, dass die Ausreißkraft unabhängig von der Sehnenlänge ist.

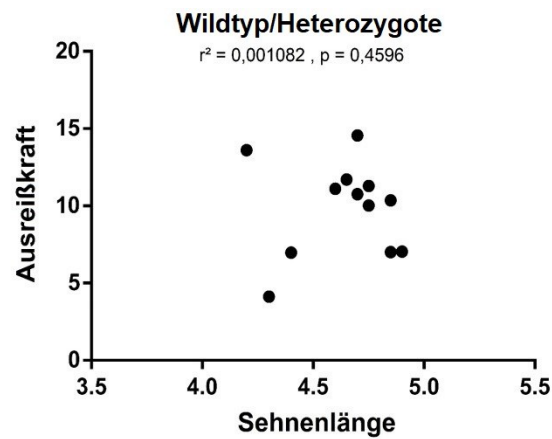


Abbildung 22: Korrelation zwischen der Ausreißkraft und der Sehnenlänge von Wildtyp/Heterozygoten-Maus. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.

3.9. Korrelation des Elastizitätsmoduls zur Sehnenlänge von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen

Bei der Korrelationsanalyse des Elastizitätsmoduls gegenüber der Sehnenlänge der Wildtyp-Mäuse zeigte sich jedoch keine Signifikanz (**Abb. 23**). Beim Vergleich der beiden Korrelationsanalysen zwischen dem Elastizitätsmodul und der Sehnenlänge der beiden Mäusegruppen bzw. Tnmd-Knock-Out-Mäuse und Wildtyp/Heterozygoten-Mäuse kann ausgegangen werden, dass das Elastizitätsmodul unabhängig von der Sehnenlänge der Präparate ist.

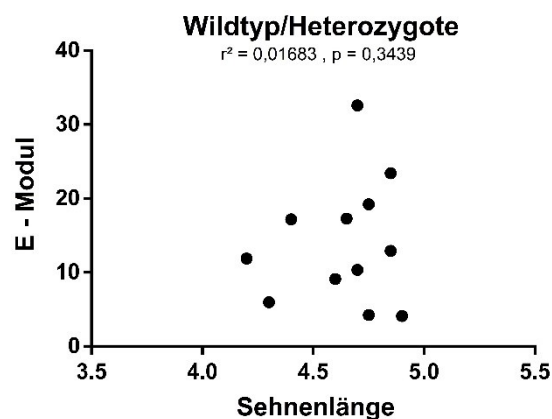


Abbildung 23: Korrelation zwischen dem E-Modul und der Sehnenlänge bei Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.

3.10. Korrelation der Ausreißkraft zum Durchmesser von Tnmd-Knock-Out-Mäusen

Es zeigte sich bei den Knock-Out-Mäusen keine signifikante Korrelation zwischen der Ausreißkraft und dem Durchmesser der Präparate (**Abb. 24**).

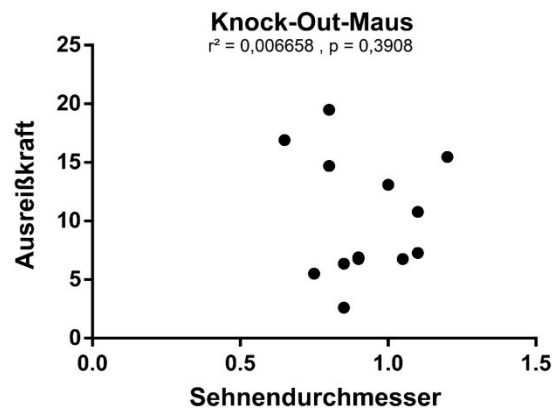


Abbildung 24: Korrelation der Ausreißkraft zum Sehndurchmesser bei Knock-Out-Maus.

3.11. Korrelation des Elastizitätsmoduls zum Sehndurchmesser von Tnmd-Knock-Out-Mäusen

Die Korrelationsanalyse zwischen dem Elastizitätsmodul und dem Sehndurchmesser ergab jedoch keine Signifikanz (**Abb. 25**).

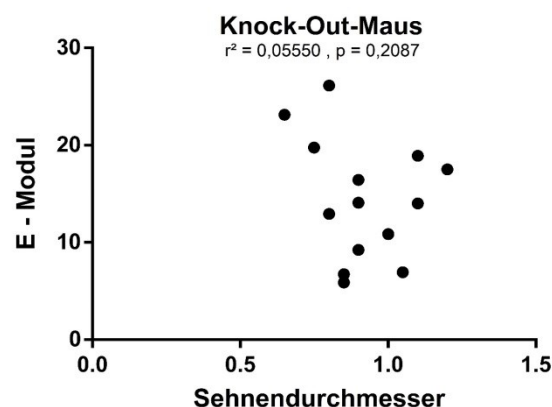


Abbildung 25: Korrelation des E-Moduls zum Sehndurchmesser bei Knock-Out-Maus.

3.12. Korrelation der Ausreißkraft zum Sehnendurchmesser von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen

In der Korrelationsanalyse der Ausreißkraft und des Sehnendurchmessers von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen (**Abb. 26**) lässt sich jedoch keine Signifikanz feststellen. Daher ist es beim Vergleich der Korrelationsanalysen von den beiden Genotypgruppen bzw. Tnmd-Knock-Out-Mäusen und Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen zu vermuten, dass die maximale Ausreißkraft beim zunehmenden Sehnendurchmesser keinen signifikanten Zusammenhang hat.

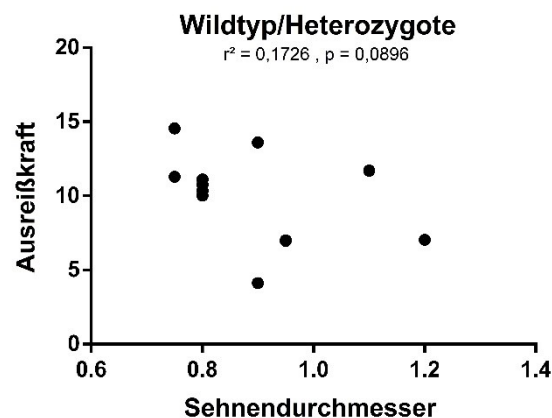


Abbildung 26: Korrelation zwischen der Ausreißkraft und dem Sehnendurchmesser von Wildtyp/Heterozygoten-Maus. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.

3.13. Korrelation des Elastizitätsmoduls zum Sehnendurchmesser von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen

Es konnte keine Signifikanz in der Korrelationsanalyse zwischen dem Elastizitätsmodul und dem Sehnendurchmesser von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen (**Abb. 27**) ermittelt werden. Dieses Ergebnis beim Vergleich der beiden Korrelationsanalysen von Knock-Out-Mäusen und Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen lässt die Vermutung zu, dass das Elastizitätsmodul keinen statistischen Zusammenhang mit der Zunahme des Sehnendurchmessers hat.

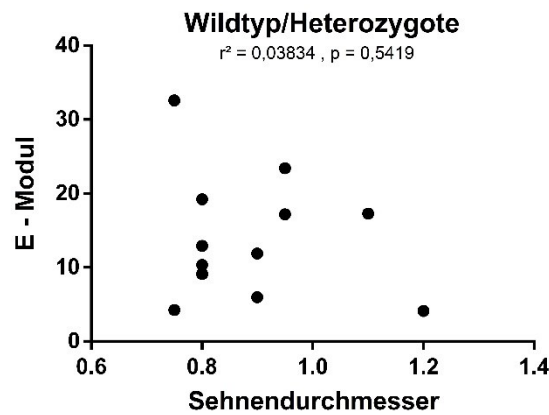


Abbildung 27: Korrelation zwischen dem E-Modul und dem Sehnendurchmesser bei Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.

3.14. Maximale Ausreißkraft vs. Elastizitätsmodul

Um den statistischen Zusammenhang zwischen der maximalen Ausreißkraft und dem Elastizitätsmodul zu veranschaulichen, wurden Korrelationsanalysen in den beiden Genotypgruppen durchgeführt.

3.14.1 Korrelation der maximalen Ausreißkraft zum Elastizitätsmodul von Tnmd-Knock-Out-Mäusen

Bei den Tnmd-Knock-Out-Achillessehnen konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der maximalen Ausreißkraft und dem Elastizitätsmodul ermittelt werden (**Abb. 28**). Daher war aber der p-Wert mit $p = 0,0285$ als nicht signifikant angenommen. So zeigte sich, dass die Elastizität der Tnmd-Knock-Out-Mäuse mit steigender Ausreißkraft nicht proportional steigt.

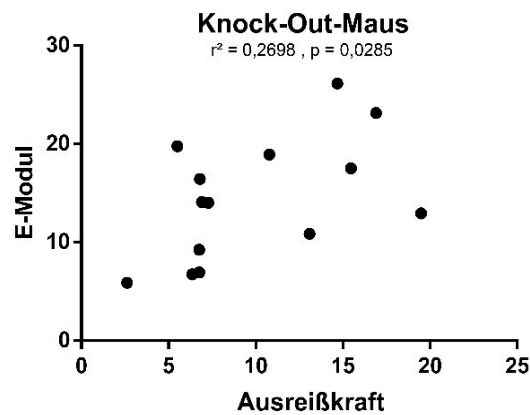


Abbildung 28: Korrelation der maximalen Ausreißkraft vs. Elastizitätsmodul bei TNDM-Knock-Out-Mäusen.

3.14.2 Korrelation der maximalen Ausreißkraft zum Elastizitätsmodul von Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen

Nicht signifikant waren hingegen die Korrelationen von der maximalen Ausreißkraft zum Elastizitätsmodul bei den Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen (**Abb. 29**). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Elastizität unabhängig von der maximalen Ausreißkraft ist.

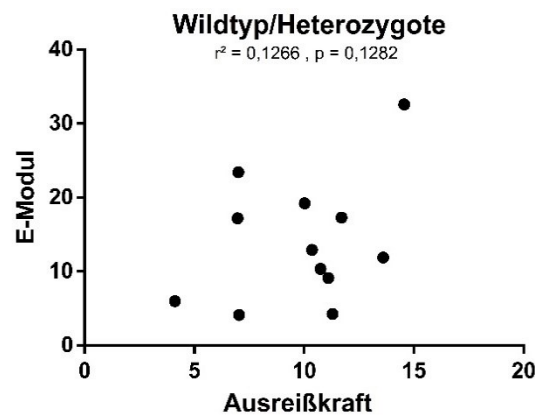


Abbildung 29: Korrelation der maximalen Ausreißkraft vs. Elastizitätsmodul bei Wildtyp/Heterozygoten Mäusen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.

4. Diskussion

4.1. Allgemeines

Die Achillessehnenruptur bleibt weiterhin eine anspruchsvolle Problematik des Bewegungsapparats, die eine lang anhaltende Therapie, Rehabilitation und eine hohe Patientencompliance verlangt. Häufig ergibt sich für die Betroffenen ein nicht zufriedenstellendes Ergebnis. Obwohl die chirurgische Versorgung meistens indiziert wird, stellt die Achillessehnenruptur eine große Herausforderung in der orthopädischen Chirurgie dar. Nicht nur die Operationstechnik, die postoperative Nachsorge und Rehabilitation sind für das Endergebnis ausschlaggebend, sondern auch die Biologie der Achillessehne. Viele Studien beschäftigen sich mit den pathologischen Voraussetzungen der Sehnenpathologie auf molekularer Ebene bzw. mit Proteinen, wie z. B. das TNMD-Protein, die eine Rolle in der Sehnendegeneration spielen. Daher ist es unerlässlich, Sehnen mit einer vermuteten genetischen Pathologieprädisposition biomechanisch zu untersuchen, um die etablierten Maßnahmen in der Medizin vergleichen und verbessern zu können.

Die Hypothese, dass ein deutlicher Unterschied des Rupturverhaltens bzw. der maximalen Ausreißkraft und des Elastizitätsmoduls bei der biomechanischen Testung der Tnmd-Knock-Out-Mäuseachillessehnen und der Wildtypmäuseachillessehnen ermittelt werden könnte, wurde unter unseren experimentellen Bedingungen nicht bestätigt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Achillessehnenpräparate der beiden Mäusegruppen (Tnmd-Knock-Out-Mäusesehnen und WT/Heterozygote-Mäusesehnen) mit der von uns verwendeten Methode vergleichbare Primärstabilität und Ausreißverhalten zeigten. Folgende Aspekten müssen trotzdem berücksichtigt werden: 1) Biologische Unterschiede (Geschlecht und Genotyp) und 2) Technische Limitationen (Apparatur, Messung, Sensitivität, Probenpräparation). Wie bereits unter Punkt 2.1. erwähnt wurde, ist das Tenomodulin Gen im X-Chromosom lokalisiert. Bei Tieren weiblichen Geschlechts, die ursprünglich als WT charakterisiert wurden, wurde festgestellt, dass es sich um heterozygote Tiere handelt. Durch X-Chromosom-Inaktivierung werden keine Genprodukte erstellt

und somit verhalten sich diese Tiere wie Tnmd-Knock-Out. Deswegen könnten die Ergebnisse in der Kontrollgruppe WT/Heterozygoten-Mäusen von dem oben genannten Phänomen stark beeinflusst und die Unterschiede zu Tnmd-KO nicht detektierbar werden. Für eine zukünftige Analyse ist es sehr wichtig, Tnmd Transkript und TNMD-Protein in den Heterozygoten genau nachzuweisen. In der Studie von Docheva et al. [14] wurde die Rolle von Tnmd als Regulatoren für die Tenozytenproliferation und die Sehnenreifung beschrieben. Dex et al. [21] zeigen, dass die Tnmd-Knock-Out-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen eine verminderte Mobilität, Trainingsleistung aufweisen. Auf Nanoebene zeigte AFM data klare Unterschiede zwischen den Genotypen. Die Achillessehnen der Tnmd-KO Tiere hatten ein signifikant höheres Elastizitätsmodul. Auf mikroskopischer Ebene besteht auch ein deutlicher Unterschied des Sehnenapparates bei den beiden Achillessehnengruppen, bedingt durch den Tenomodulinmangel. Die Transmissionselektronmikroskopie zeigte eine pathologische Verdickung der Kollagenfibrillen von Tnmd-KO Tieren, ein Anzeichen von einer frühzeitigen Alterung. Die meisten Studien über das TNMD-Protein wurden v.a. auf molekularer Ebene bzw. in Zellkulturen durchgeführt [14], [16], [20]. Die biomechanische Stabilität der Tnmd-Knock-Out-Mäuseachillessehnen und der Wildtypmäuseachillessehnen wurde bis dato kaum untersucht.

4.2. Diskussion der Materialien und Methoden

4.2.1 Versuchsaufbau

Die Achillessehne ist die größte und die stärkste Sehne im menschlichen Körper [64]. Sie ist auch die am häufigsten verletzte Sehne der unteren Extremitäten [65]. Bei den getesteten Mäusen stellt die Achillessehne auch die größte ligamentäre Struktur der unteren Extremitäten dar. Wie Franz-Viktor Salomon in der Anatomie für die Tiermedizin [38] beschreibt, sind die Mäuse Sohlengänger wie die Menschen. Daher lässt sich vermuten, dass die Achillessehnen der Mäuse ähnlicherweise einem ständigen mechanischen Stress ausgesetzt sind. Die Mäuse sind jedoch vierbeinige Lebewesen. In unserer Studie könnte nicht eruiert werden, inwieweit die Bewegungsgewohnheiten bzw. die Dominanz der Belastung auf der einzelnen Extremität die Achillessehneneigenschaften beeinflusst.

Für die Versuche wurden gefrorene Präparate in phosphatgepufferter Kochsalzlösung benutzt. Hochstrat et al. [66] zeigten, dass vier Auftauen-Einfrieren-Zyklen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung zu einer signifikanten Erhöhung des dynamischen E-Moduls und zur Schädigung der Vitalität von Sehnenzellen führte. Jedoch wurden keine Unterschiede bei der biomechanischen Ergebnisse festgestellt und zwar zwischen Sehnen, die einmalig in phosphatgepufferter Kochsalzlösung eingefroren wurden [66]. Ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren von Patellasehnen hingegen, wurde durch Jung et al. [67] beschrieben. Es wurde beobachtet, dass kein größerer Einfluss auf die Primärstabilität in diesem Prozess eintritt. Dieses Verfahren könnte als eine gute Möglichkeit für das Lagern von Präparaten benutzt werden, die erst bei späteren Versuchen gebraucht werden. In ähnlichen Studien wurde diese Beobachtung bereits von Woo et al. [68] beschrieben und durch Goh et al. [58] für ein Mäusemodell mit Tiefkühlung bis - 20 °C bestätigt. In der Literatur sind sehr oft Versuche mit eingefrorenen Präparaten beschrieben [58], [60], [69]. Als Vorteil in solchen Versuchen muss erwähnt werden, dass der Zeitpunkt für das Auftauen und Testen durch das Einfrieren von Kadaverpräparaten selbstständig gewählt werden kann und dass keine Abhängigkeit zum Zeitpunkt des Todes

besteht. Durch die Aufbewahrung der Kadaverpräparate im gefrorenen Zustand und die verlaufene Zeit zwischen der Euthanasie und der Testung konnten eine intrastrukturelle Austrocknung und ein zellulärer Wasserverlust trotz der Kryokonservation und der externen Anfeuchtung bei den Ausreißversuchen behauptet werden. In unseren Versuchen wurde die 0,9%-ige NaCl-Lösung in bestimmten zeitlichen Abständen nur äußerlich appliziert, nicht aber auf Mikroniveau in den Sehnen. Es soll weiter untersucht werden, ob andere Ergebnisse hinsichtlich der Primärstabilität der Sehnen unter anderen Testbedingungen zu erzielen sind [66], [70].

Post mortem verlieren die Zellrezeptoren ihre physiologischen Eigenschaften zu den Elektrolyten und dem Wasseraustausch. Unsere Literaturrecherche konnte keine eindeutigen Studien finden, die eine Veränderung der biomechanischen Eigenschaften durch Testung in physiologischen feuchten Bedingungen von genetisch selektierten Mäusen beschreiben. Somit ist mit unserer Studie nicht möglich zu eruieren, inwieweit eine hypothetische Veränderung des interstetiellen Wasserhaushaltes in den Kadaverpräparaten das Ausreißverhalten beeinflussen könnte.

Backer et al. [71] untersuchen in ihrer Studie die Degenerationsraten durch Ausmessen der Sehnendurchmesser an MRT-Bildern als Zeichen einer vorbestehenden Tendinosis in schon rupturierten humanen Achillessehnen. Sie wiesen nach, dass eine Erhöhung der Sehnendicke bzw. des Sehnendurchmessers in allen an der Studie beteiligten Sehnenrupturen bestand. Unsere Studie zeigt, dass keine statistischen Unterschiede zwischen der Sehnenlänge und dem Durchmesser in den beiden Testgruppen von Achillessehnen makroskopisch bestehen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass auch post-mortem Faktoren die Sehnenanatomie und die physiologischen Eigenschaften stark beeinflussen könnten. Außerdem wurde festgestellt, dass die Gewebeentnahme/-explantation der Präparate für unsere Studie suboptimal verlief, da Os Calcaneus zu kurz präpariert wurde. Die Mäuse für unsere Studie wurden im Labor gezüchtet und aufbewahrt. Es bestand keine Auskunft über das Bewegungsverhalten der Tiere und die Belastungsgewohnheiten der Extremitäten als vierbeinige Tiere.

Auf zellulärer Ebene könnte die Expression und Hochregulation von TNMD auch von mehreren anderen Faktoren und Proteinen im Zusammenspiel mit den TSPC

beeinflusst werden [14], [16], [20], [21]. Bezüglich der relativ ähnlichen Ergebnisse in unserer Studie könnte beim Vergleich des Ausreißverhaltens von beiden Achillessehnengruppen behauptet werden, dass multiple externe und interne, auf molekularer Ebene existierende Faktoren bei der ex-vivo biomechanischen Testung der Präparate wesentliche Einflüsse auf die Regulatorrolle von TNMD aufweisen. Bedingt durch das Studiendesign sind daher die Einflussfaktoren auf die getesteten Achillessehnen nicht auszuschließen.

4.2.2 Power-Analyse

Wie oben beschrieben, zeigte die Literaturrecherche über das TNMD-Protein, dass das TNMD die Sehnenmorphologie und die Sehnenpathologie auf zellulärer Ebene tatsächlich beeinflusst. Die Hypothese in unserer Studie, dass es einen Unterschied im Rupturverhalten bei der biomechanischen Testung von beiden Achillessehnengruppen gibt, wurde nicht bestätigt. Vom Labor der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Campus Innenstadt der Universität München wurden 12 Wildtyp/Heterozygoten-Mäuse- und 14 Tnmd-Knock-Out-Mäuse-Präparate zur Verfügung gestellt und biomechanisch getestet. Um weitere mögliche Fehlerquellen zu identifizieren, haben wir eine Power-Analyse durchgeführt. Es ergab sich eine Power der Studie mit $1 - \beta = 0,23$ bei den getesteten Präparaten. Es zeigte sich, dass unsere Studie aufgrund der Probenanzahl unterpower ist. Die Power-Analyse wurde als post-hoc-Analyse mit zwei unabhängigen Variablen durchgeführt. Zum Zweck der Berechnung der Studienpower wurde das Programm: G*Power (Version 3.1.9.7, Franz Faul, Universität Kiel, Deutschland 1992- 2020 ©) benutzt. Die weitere Analyse zeigte, dass ca. fünfundsechzig Achillessehnen pro Gruppe für unser Studiendesign benötigt wären, um einen Wert ($1 - \beta$) von 0,80 zu erreichen.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Maximale Kraft bis zum Versagen bzw. zur Sehnenruptur

In unserer biomechanischen in-vitro Testung des Ausreißverhaltens der Mäuseachillessehnen haben sich jedoch relativ identische Ergebnisse bei dem Vergleich der maximalen Ausreißkraft von den beiden Testgruppen von ca. ~ 10 N ergeben. Es bestehen jedoch kaum Studien, die die Biomechanik der Tnmd-Knock-Out-Mäuseachillessehnen vom Labortyp C57BL/6 untersuchen. In dieser Studie wurden alle sechsundzwanzig Achillessehnen nach der gleichen Prüfmethode untersucht. Die Muskelbelastung wurde durch die ausgeübte Zugkraft bis zum Versagen simuliert. Zum Testen der Kraft beim Versagen wurde danach ein Test mit konstanter Dehnungsrate bis zum Versagen durchgeführt [63], [72]. Wang et al. äußern die Hypothese, dass alle Sehnen durch unterschiedliche Prozesse steifer werden und durch diese Steifigkeit bei hohen Belastungsraten größere Muskelbelastungen auf den Knochen übertragen können [73]. Wie auch Alberton et al. [20] und Dex et al. [21] beschreiben, haben wir angenommen, dass die Knock-Out-Achillessehnen durch die Abwesenheit von TNMD als Regulatorprotein nicht nur eine Änderung der Sehnenarchitektur besitzen, sondern davon ausgehend, eine erhöhte Steifigkeit aufweisen. Trotz der Unterschiede auf zellulärer Ebene lässt sich bei den getesteten Achillessehnen in dieser Studie in Anlehnung an der Hypothese von Wang et al. [73] ausgehen, dass eine schnellere und direkte Übertragung der Zugkraft bei den Knock-Out-Achillessehnen aufgrund der erhöhten Steifigkeit bei den Zugversuchen stattfindet. Das könnte eine Erklärung für die relativ gleichen Ergebnisse beim Vergleich der maximalen Ausreißkraft der beiden Testgruppen sein. Diese Vermutung kann jedoch mithilfe einer größeren Anzahl an Testpräparaten von Wildtyp und Knock-Out-Typ weiter geforscht werden. In ihrer Studie untersuchten Matson et al. [74] durch hydraulische Zugversuche die Elastizität und die Ausreißkraft der Sehnen von sechs verschiedenen Muskeln im Hinterbein von Wildtruthähnen, um festzustellen, ob sich das Elastizitätsmodul, die Zugfestigkeit und die Ausreißkraft unterscheiden. Es ergab sich, dass insbesondere steifere Sehnen, stärker sind, also höhere Zugkraft bis zum

Versagen besitzen. Dieser Zusammenhang ist auf einen eingeschränkten Wert der Bruchdehnung zurückzuführen, der sich zwischen den Sehnen unterschiedlicher getesteter Muskeln nicht signifikant unterscheidet. Von der genetischen Prädisposition der Tnmd-Knock-Out-Achillessehne ausgehend, die eine höhere Steifigkeit besitzt, konnte diese Behauptung in unserer Studie nicht bestätigt werden.

4.3.2 Einfluss der Sehnendehnung und des Elastizitätsmoduls

Die Materialfestigkeit bzw. die Sehnenfestigkeit kann mithilfe eines standardisierten Spannungs-Dehnungs-Diagramms veranschaulicht werden (**Abb. 30**). Die relative Längendehnung eines Materials, z.B. der Achillessehne ist auf der x-Achse dargestellt. Auf die y-Achse wird die mechanische Zugspannung (Zugkraft in Newton pro Querschnittsfläche in mm^2) aufgetragen.

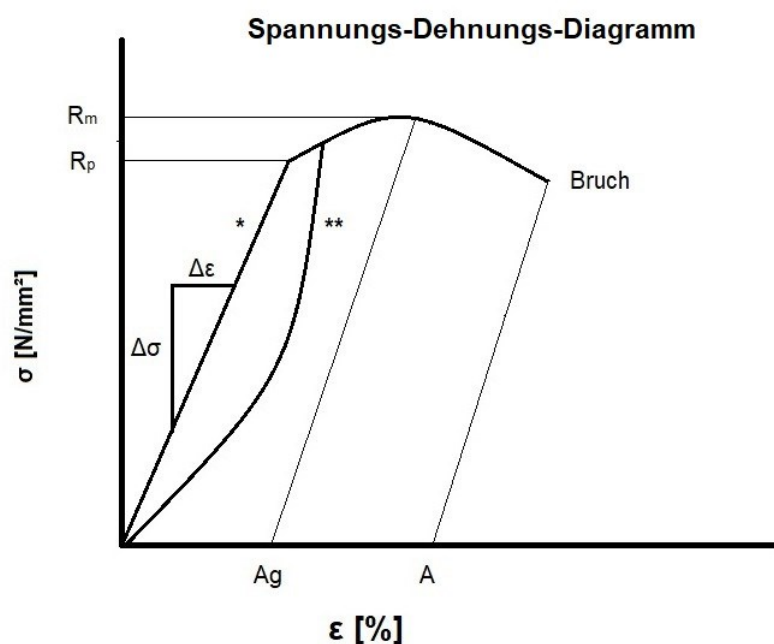


Abbildung 30: Spannungs-Dehnungs-Diagramm (* Belastung; ** Entlastung).

Im Spannungs-Dehnungs-Diagramm ist die linear steigende Kurve in der Elastizitätsgrenze zu sehen. Ab der Grenze der plastischen Dehnung (R_p) beobachtet man in diesem Fall zusätzlich zu der reversiblen elastischen Dehnung

noch eine irreversible plastische Dehnung bzw. Verformung des Materials der Achillessehne. Durch die lineare Steigung in der Elastizitätsgrenze bis zur Dehnungsgrenze (R_p) wird die Berechnung des Elastizitätsmoduls (E-Modul) bzw. der Sehnensteifigkeit ermöglicht. Nach dem Hooke'schen Gesetz: $E = \Delta\sigma/\Delta\epsilon$ könnte der Elastizitätskoeffizient (E-Modul) für das jeweilige Material errechnet werden. Es könnte noch beobachtet werden, dass der Querschnitt des Materials ab dem Punkt des Einschnürungsbeginns bzw. nach dem Erreichen der maximalen Zugfestigkeit (R_m) bis zum Versagen bzw. bis zum Erreichen der Sehnenruptur kontinuierlich abnimmt. Die Gleichmaßdehnung bzw. die Rupturdehnung wird mit (A_g), und (A) auf der x-Achse bezeichnet.

Die Ergebnisse dieser Studie haben vergleichbare Werte des Elastizitätsmoduls in den beiden Untersuchungsgruppen von Mäuseachillessehnen ergeben. Die Sehnen haben viskoelastische Eigenschaften, d.h. dass das elastische Verhalten von der Rate der mechanischen Beanspruchung abhängig ist [73]. Wang et al. [73] beschreiben, dass ein viskoelastisches Material, wie die Sehnen, bei niedrigen Dehnungsraten mehr verformbar und bei hohen Dehnungsraten jedoch weniger verformbar ist. In diesem Zusammenhang, um die Simulation einer möglichst physiologischen Ruptursituation zu gewährleisten, wurden alle Testsehnen in unserer Studie in Zyklen konditioniert. Durch die Annahme, wie Dex et al. [21] beschreiben, dass die Knock-Out-Achillessehnen deutlich schlechtere qualitative Eigenschaften besitzen, haben sich in unserer Studie keine wesentlichen Unterschiede beim Vergleich des Elastizitätsmoduls mit einem Mittelwert in den beiden Gruppen um $\sim 14 \text{ Newton/mm}^2$ ergeben. Die Studie von Dex et al. [21] bestätigt auch die Hypothese, dass die Tnmd-Regulatorrolle mechanosensibel wäre. Daher soll angenommen werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Expression von TNMD und der mechanischen Belastung einer Sehne besteht [73]. Genau deswegen sollte unbedingt überprüft werden, ob die explantierten Sehnen von Tieren weiblichen Geschlechts und ursprünglich als „WT“ kategorisiert, nicht tatsächlich heterozygot sind und das Tnmd-Gen nur an einem Allel tragen. Der Effekt von einer möglichen X-Chromosom-Inaktivierung sollte ernsthaft in Betracht gezogen werden. Hannafin et al. [75] postulieren in ihrer in-vitro Studie mit caninen flexor digitorum profundus Sehnen ohne genotypische Selektion, wie in dieser Studie, dass der Stressentzug (verglichen wurden Sehnen mit und ohne zyklische

Zugbelastung innerhalb von 8 Wochen) insgesamt zu einer progressiven und statistisch signifikanten Abnahme des Elastizitätsmoduls führte. In-vitro-Zugbelastungen von Sehnen über einen Zeitraum von 4 Wochen führten zu einer signifikanten Erhöhung des Elastizitätsmoduls (93 % der Kontrolle) im Vergleich zu diesem der spannungsarmen Sehnen (68 % der Kontrolle). Daher kann angenommen werden, dass eine niedrigere Elastizität, eine Erhöhung der Steifigkeit und eine reduzierte maximale Ausreißkraft zu erwarten wären. Histologisch zeigten die Sehnen ohne zyklische Zugbelastung quantitative Veränderungen in der Morphologie und in der Anzahl der Zellen sowie in der Ausrichtung des Kollagens. Dex et al. beschreiben jedoch eine Veränderung der Kollagenmikroarchitektur bei Tnmd-Knock-Out-Achillessehnen [21]. In unserer Studie wurden die Sehnen nach dem identischen standardisierten Verfahren konditioniert. Durch diesen Prozess sollten die Kollagenfibrillen längst gerichtet werden, um eine optimale Elastizität und Zugfestigkeit der Achillessehnen zu erreichen. Hannafin et al. [75] zeigten noch, dass die Unterschiede der Zugeigenschaften nicht mit einer Änderung des Wassergehalts des Gewebes verbunden waren, aber vermutlich von der Anwesenheit einer lebensfähigen Zellpopulation abhängen. Tote (azelulläre) Sehnen zeigten in diesem in-vitro-System keine Zunahme des Elastizitätsmoduls. Daher könnte ohne Annahme der genetischen Regulationsfaktoren wie Tnmd angenommen werden, dass die post mortem Faktoren, die Versuchsvorbereitungszeit und die Zeit von Euthanasie bzw. Einfrieren und Auftauen sowie die unmittelbare erneute Zugbelastung in unserer Studie einen Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften und die Belastbarkeit der Sehnen bei den Zugversuchen ausüben. Diese Tatsache kann auch als ein wesentlicher Störfaktor bei der biomechanischen Testung von beiden Mäusegruppen in unserer Studie betrachtet werden. Unsere Beobachtungen zeigten auch, dass manche Sehnen, die von den linken und rechten Extremitäten gleichen Versuchstiers stammen, einen wesentlichen Unterschied in der Ausreißkraft aufweisen. Ein schonendes Verhalten oder eine erhöhte Bewegungsaktivität könnte auch im Seitenvergleich zu unterschiedlich intensiven Austreibungs-, Degenerations- und Atrophiezuständen führen. Weiter ist zu erwähnen, dass jede Achillessehne mitsamt der proximalen und distalen Klammerhalterung als Gesamtkomplex in unserer Studie zu betrachten ist. Das Gesamtkonstrukt der Zugversuche war für alle getesteten Sehnen identisch. Die

Summe der Sehnendehnung und einer möglichen minimalen Dislokation des Konstruktes aufgrund der Zugkraft ist in einem nicht definierbaren Zusammenhang zu beschreiben. Die isolierte Bestimmung der Sehnendehnung bzw. der möglichen Dislokation ist in diesem Testverfahren nicht möglich.

4.3.3 Rupturlokalisierung der getesteten Achillessehnen

Der Rupturort der Mäuseachillessehne wurde in unserer Studie am Ende jedes Zugversuchs nach der vollständigen Durchtrennung durch den ausgeübten Zug auf den Sehnenpräparaten markiert. Die Rupturorte wurden in vier Punkten wie folgt protokolliert: Muskulotendinöser Übergang, proximaler, intertendinöser und distaler Sehnenanteil. Zu erwähnen ist, dass der distale Punkt nicht im Bereich des Sehnenansatzes auf dem Calcaneus, sondern oberhalb des anatomischen Ansatzortes entlang der Sehne zu beschreiben ist. Unsere Ergebnisse zeigen, dass neun Achillessehnen vom Knock-Out-Typ und neun Achillessehnen vom Wildtyp/Heterozygoten bzw. insgesamt achtzehn von sechsundzwanzig getesteten Sehnen distal, d.h. zwischen dem intertendinösen Anteil (Sehnenmitte) und dem anatomischen Sehnenansatzort auf dem Calcaneus gerissen wurden.

Der menschlichen Achillessehne fehlt eine echte Synovialscheide. Die Sehne ist vielmehr von einem Paratenon umhüllt. Für die Blutversorgung der Sehne ist das Paratenon größtenteils durch ein stark vaskularisiertes Areolargewebe an der Vorderseite verantwortlich [76]. Die übrige Blutversorgung der Achillessehne wird proximal vom muskulotendinösen Übergang und distal vom Knochen abgeleitet. Aufgrund der Blutversorgung ist die Achillessehne in einem Wassereinzugsgebiet zwischen der Sehnenmitte und kurz vor dem Sehnenansatz am Calcaneus verletzungsanfälliger [77]. Laut der Studie von Gwynne-Jones et al. [78] kommt es in diesem Einzugsgebiet in etwa 75 % der Fälle zu einem Bruch. Darüber hinaus können Risse an den anderen Sehnenanteilen auftreten. Unsere Studie zeigt v.a. identische Ergebnisse mit diesen der Forschungsgruppe von Gwynne-Jones et al. in Bezug auf den Rupturort der Sehnen. Die statistischen Daten von Gwynne-Jones et al. beziehen sich vorwiegend auf humane Achillessehnen von lebenden Menschen.

Nichtdestotrotz muss in unserer Studie in Erwägung gezogen werden, dass die Versuche ausschließlich an tierischen Kadaverpräparaten durchgeführt worden sind. In unserer Studie besteht eine längere Zeit zwischen der Euthanasie der Versuchstiere und der biomechanischen Testung der Achillessehnen, in der die Sehnen kryokonserviert waren. Es ist umstritten, inwieweit eine stattgehabte Durchblutung der Achillessehnen in unserem Fall eine Schlüsselrolle für das Rupturverhalten der Sehnen in den beiden Genotypgruppen bei den Zugversuchen spielen könnte. Das Fehlen von TNMD soll zu einer schlechteren Sehnenmorphologie mit niedrigerer Zelldichte bei verletzten Sehnen führen. Weiter soll das TNMD in solchen Sehnen in früheren Reparaturregionen die Adipozytenakkumulation, die Adipozyten-verwandte Genexpression sowie die Gefäßproliferation aktivieren [16]. In unserer Studie kann keine Auskunft über die Mikroverletzungen der Sehnenpräparate während der Aufbewahrung bis zur biomechanischen Testung sowie über stattgehabte Verletzungen, Tendinopathien oder einen Degenerationsfortgang der Achillessehnen vor der Euthanasie der Tiere eruiert werden. Alle Testpräparate wurden als intakt zum Zeitpunkt der Versuche betrachtet. Aus unseren Ergebnissen könnte ermittelt werden, dass die getesteten Mäusepräparate in den beiden Genotypgruppen am häufigsten an der gleichen Stelle, wie die Achillessehnen von lebenden Menschen rupturieren. Ein direkter Vergleich mit den Faktoren, die eine Rolle für die in-vivo Achillessehnenruptur bei den Menschen spielen, ist aber unerlässlich.

4.3.4 Korrelationsanalysen

Die makroskopische Ausmessung der Sehnenlänge und des Sehrendurchmessers in unserer Studie sowie die Korrelationsanalysen zwischen der Sehnenlänge bzw. dem Durchmesser und der maximalen Ausreißkraft und dem Elastizitätsmodul wurden durchgeführt, damit verglichen wird, ob die Regulatorrolle von TNMD bei der Differenzierung von TSPC und der Proliferation von Tenozyten zu einer Differenz bezüglich der Anatomie, Sehrendegeneration und der Sehneneigenschaften beitragen könnte. Es bestehen geringe, nicht-signifikante, makroskopische, anatomische Unterschiede in Bezug auf die Sehnenlänge und den Sehrendurchmesser der

Versuchstiere. In unserer Studie konnte aber nachgewiesen werden, dass diese keinen Zusammenhang mit einer bestimmten Versuchsgruppe und keine signifikante Korrelation mit der maximalen Ausreißkraft oder dem Elastizitätsmodul haben.

In unseren Ergebnissen zeigt sich keine Korrelation zwischen der maximalen Ausreißkraft und dem Elastizitätsmodul bei den Knock-Out-Achillessehnen und den Wildtyp/Heterozygoten-Achillessehnen. Beim Vergleich der Dehnungskurven der beiden Sehnentypen konnte kein wesentlicher Unterschied eruiert werden, ob die Wildtyp/Heterozygoten-Achillessehnen eine bessere reversible elastische Dehnung aufweisen. In dieser Studie wurde angenommen, dass die Versuchssehnen von den beiden Mäusepopulationen nur makroskopisch unversehrt sind. Es war unmöglich, die Evaluation der biologischen Alteration und die TNMD-Expressionsrate in den Kadaver-Achillessehnen zu verfolgen. Es wäre interessant zu sehen, wie die biologischen Prozesse in vivo die biomechanische Stabilität der Knock-Out-Sehnen, verglichen mit den Wildtyp/Heterozygoten-Sehnen im Laufe der Zeit beeinflussen würden und ob dies zu einem signifikanten Unterschied führt.

5. Zusammenfassung

Das Protein Tenomodulin besitzt einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der TSPC-Differenzierung und der Tenozytenproliferation in vivo. Unser Wissensstand über die Rolle von Tenomodulin in der Sehnenpathophysiologie und der Sehnenreparatur ist noch sehr begrenzt.

In dieser Studie wurden sechszwanzig Präparate von speziell gezüchteten Mäusen vom Typ C57BL/6–Wildtyp, Heterozygoten und Tnmd-Knock-Out-Typ entnommen. Die Achillessehnen wurden im 5. Lebensmonat paarweise reseziert und kryokonserviert. Die biomechanische Testung wurde in Blindstudie an der Zwick-Z10-Universalprüfmaschine durchgeführt. Bei jeder getesteten Sehne wurden die Sehnenlänge und der Sehnendurchmesser protokolliert. Nach der Konditionierung der Sehnen erfolgte die maximale Zugbelastung der Achillessehnen, bis eine Ruptur aufgetreten ist. Nach der vollständigen Durchtrennung der Achillessehne wurden der Rupturort, die maximale Ausreißkraft in Newton und das Elastizitätsmodul protokollkonform dokumentiert. Hinsichtlich der maximalen Ausreißkraft und des Elastizitätsmoduls konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tnmd-Knock-Out-Sehnen und den Wildtyp/Heterozygoten-Sehnen erhoben werden. Die getesteten Sehnen der beiden Genotypen wiesen auch eine identische Sehnenlänge und einen Durchmesser auf. Die Tnmd-Knock-Out-Sehnen und die Wildtyp/Heterozygoten-Sehnen rupturieren fast ausschließlich im distalen Drittel und selten proximal bzw. im Bereich des musculotendinösen Übergangs.

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung des biomechanischen Ausreißverhaltens von genetisch selektierten Tnmd-Knock-Out-Mäuseachillessehnen im Vergleich zu Wildtyp/Heterozygoten-Mäuseachillessehnen. Die Studie zeigte in-vitro keine wesentlichen signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen und in den statistisch vergleichbaren Werten. Das Tenomodulin Gen ist im X-Chromosom lokalisiert. Es muss darauf hingewiesen werden, dass keine Genprodukte bei heterozygoten Tieren weiblichen Geschlechts durch X-Chromosom-Inaktivierung häufig erstellt werden und dass sich diese Tiere dadurch wie Tnmd-KO verhalten. Zunächst bestätigen die Daten unserer Studie die primäre Stabilität der Achillessehnen und geben

keine Auskunft über die genetischen Faktoren, die in-vitro und in-vivo das Ausreißverhalten der Sehnen beeinflussen. Wir könnten nicht ausschließen, dass auch diverse externe, sowie auch post-mortem Faktoren, die nicht genau definierbar sind, bei der Überprüfung der Sehneneigenschaften in den getesteten Mäusepopulationen in Frage kommen.

Um die biologischen Limitierungen und das Verständnis über die Pathophysiologie und die Regeneration des Sehnengewebes zu vertiefen, sollten weitere Untersuchungen in diesem Bereich durchgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Riley, G., The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford)*, 2004. 43(2): p. 131-42.
2. Joachim Rassow, K.H., Roland Netzker, Rainer Deutzmann, *Biochemie. Duale Reihe*, 2012. 3. Auflage(Extrazelluläre Matrix, Kapitel 7).
3. Cheah, K.S., et al., Identification and characterization of the human type II collagen gene (COL2A1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(9): p. 2555-9.
4. Kannus, P., Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports*, 2000. 10(6): p. 312-20.
5. Sun, Y., et al., Mapping lubricin in canine musculoskeletal tissues. *Connect Tissue Res*, 2006. 47(4): p. 215-21.
6. Wu, F., M. Nerlich, and D. Docheva, Tendon injuries: Basic science and new repair proposals. *EFORT Open Rev*, 2017. 2(7): p. 332-342.
7. Bi, Y., et al., Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*, 2007. 13(10): p. 1219-27.
8. Docheva, D., et al., Biologics for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. 84: p. 222-39.
9. Benjamin, M., E. Kaiser, and S. Milz, Structure-function relationships in tendons: a review. *J Anat*, 2008. 212(3): p. 211-28.
10. Waggett, A.D., M. Benjamin, and J.R. Ralphs, Connexin 32 and 43 gap junctions differentially modulate tenocyte response to cyclic mechanical load. *Eur J Cell Biol*, 2006. 85(11): p. 1145-54.
11. Brandau, O., et al., A novel gene, tendin, is strongly expressed in tendons and ligaments and shows high homology with chondromodulin-I. *Dev Dyn*, 2001. 221(1): p. 72-80.
12. Shukunami, C., Y. Oshima, and Y. Hiraki, Molecular cloning of tenomodulin, a novel chondromodulin-I related gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 280(5): p. 1323-7.
13. Kimura, N., et al., Local tenomodulin absence, angiogenesis, and matrix metalloproteinase activation are associated with the rupture of the chordae tendineae cordis. *Circulation*, 2008. 118(17): p. 1737-47.
14. Docheva, D., et al., Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(2): p. 699-705.
15. Oshima, Y., et al., Anti-angiogenic action of the C-terminal domain of tenomodulin that shares homology with chondromodulin-I. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 13): p. 2731-44.
16. Lin, D., et al., Tenomodulin is essential for prevention of adipocyte accumulation and fibrovascular scar formation during early tendon healing. *Cell Death Dis*, 2017. 8(10): p. e3116.
17. Dex, S., et al., Tenogenic modulating insider factor: Systematic assessment on the functions of tenomodulin gene. *Gene*, 2016. 587(1): p. 1-17.
18. Hiraki, Y., et al., Molecular cloning of a new class of cartilage-specific matrix, chondromodulin-I, which stimulates growth of cultured chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 175(3): p. 971-7.

19. Brandau, O., et al., Chondromodulin I is dispensable during enchondral ossification and eye development. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(18): p. 6627-35.
20. Alberton, P., et al., Loss of tenomodulin results in reduced self-renewal and augmented senescence of tendon stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 2015. 24(5): p. 597-609.
21. Dex, S., et al., Tenomodulin is Required for Tendon Endurance Running and Collagen I Fibril Adaptation to Mechanical Load. *EBioMedicine*, 2017.
22. Takimoto, A., et al., Scleraxis and osterix antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone. *Development*, 2015. 142(4): p. 787-96.
23. Maeda, T., et al., Conversion of mechanical force into TGF-beta-mediated biochemical signals. *Curr Biol*, 2011. 21(11): p. 933-41.
24. Tan, Q., et al., Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 2012. 18(7-8): p. 840-51.
25. Ni, M., et al., Engineered scaffold-free tendon tissue produced by tendon-derived stem cells. *Biomaterials*, 2013. 34(8): p. 2024-37.
26. Dale, T.P., et al., Tenogenic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Tissue Eng Part A*, 2017.
27. Oak, N.R., et al., Inhibition of 5-LOX, COX-1, and COX-2 increases tendon healing and reduces muscle fibrosis and lipid accumulation after rotator cuff repair. *Am J Sports Med*, 2014. 42(12): p. 2860-8.
28. Jiang, Y., et al., Enhanced tenogenic differentiation and tendon-like tissue formation by tenomodulin overexpression in murine mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017. 11(9): p. 2525-2536.
29. G, A., *Duale Reihe Anatomie*. 2010. 2. Auflage.
30. Michale Schünke, E.S., Udo Schumacher, Markus Voll, Karl Wesker, *Prometeus Atlas, Kapitel: Muskulatur des Unterschenkels*. Geor Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2011. 3. Auflage.
31. Subotnik, I.A.B.n., *Fußchirurgie*. Thieme Verlag, 1989.
32. Jürgen Krämer, J.G., *Orthopädie*. Springer Verlag, 2005. 7. Auflage.
33. Ina Aschenbrenner, P.D.P.B., *Thompson Test*. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie.
34. Thun, H.M., *Patienteninformation, Achillessehneruptur*, Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie. 2018.
35. :Ina Aschenbrenner, P.D.P.B., *MRT bei Achillessehnenruptur*. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie.
36. Hirschmüller, A., *Sonographie der Achillessehne. Ultrasonographic assessment of the achilles tendon*, 2018. Deutscher Ärzteverlag.
37. *Klinik der Universität München- Klinik für Allgemein-, U.-u.W., Diagnostik einer Achillessehnenruptur*. 2018.
38. Franz-Viktor Salomon, H.G., Uwe Gille, *Anatomie für die Tiermedizin* Enke Verlag, 2008. 2. Auflage.
39. Maffulli, N., K.M. Khan, and G. Puddu, Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology. *Arthroscopy*, 1998. 14(8): p. 840-3.
40. Gibson, W., Are "spontaneous" Achilles tendon ruptures truly spontaneous? *Br J Sports Med*, 1998. 32(3): p. 266.

41. Rees, J.D., A.M. Wilson, and R.L. Wolman, Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology (Oxford)*, 2006. 45(5): p. 508-21.
42. Ganestam, A., et al., Increasing incidence of acute Achilles tendon rupture and a noticeable decline in surgical treatment from 1994 to 2013. A nationwide registry study of 33,160 patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016. 24(12): p. 3730-3737.
43. Lantto, I., et al., Epidemiology of Achilles tendon ruptures: increasing incidence over a 33-year period. *Scand J Med Sci Sports*, 2015. 25(1): p. e133-8.
44. De la Fuente, C., et al., Prospective randomized clinical trial of aggressive rehabilitation after acute Achilles tendon ruptures repaired with Dresden technique. *Foot (Edinb)*, 2016. 26: p. 15-22.
45. Olsson, N., et al., Major functional deficits persist 2 years after acute Achilles tendon rupture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011. 19(8): p. 1385-93.
46. Nilsson-Helander, K., et al., Acute achilles tendon rupture: a randomized, controlled study comparing surgical and nonsurgical treatments using validated outcome measures. *Am J Sports Med*, 2010. 38(11): p. 2186-93.
47. Suydam, S.M., et al., Compensatory muscle activation caused by tendon lengthening post-Achilles tendon rupture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2015. 23(3): p. 868-74.
48. Gulati, V., et al., Management of achilles tendon injury: A current concepts systematic review. *World J Orthop*, 2015. 6(4): p. 380-6.
49. Ortiz, C., et al., Biomechanical comparison of four methods of repair of the Achilles tendon: a laboratory study with bovine tendons. *J Bone Joint Surg Br*, 2012. 94(5): p. 663-7.
50. De la Fuente, C., et al., Clinical failure after Dresden repair of mid-substance Achilles tendon rupture: human cadaveric testing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2017. 25(6): p. 1849-1856.
51. De la Fuente, C.I., et al., Medial Gastrocnemius Myotendinous Junction Displacement and Plantar-Flexion Strength in Patients Treated With Immediate Rehabilitation After Achilles Tendon Repair. *J Athl Train*, 2016. 51(12): p. 1013-1021.
52. Finni, T., et al., Muscle synergism during isometric plantarflexion in achilles tendon rupture patients and in normal subjects revealed by velocity-encoded cine phase-contrast MRI. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 2006. 21(1): p. 67-74.
53. Sadoghi, P., et al., Initial Achilles tendon repair strength--synthesized biomechanical data from 196 cadaver repairs. *Int Orthop*, 2012. 36(9): p. 1947-51.
54. McCoy, B.W. and S.L. Haddad, The strength of achilles tendon repair: a comparison of three suture techniques in human cadaver tendons. *Foot Ankle Int*, 2010. 31(8): p. 701-5.
55. Galatz, L.M., et al., Tendon regeneration and scar formation: The concept of scarless healing. *J Orthop Res*, 2015. 33(6): p. 823-31.
56. Aslan, H., et al., Molecular targets for tendon neoformation. *J Clin Invest*, 2008. 118(2): p. 439-44.
57. Gaspar, D., et al., Progress in cell-based therapies for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. 84: p. 240-56.
58. Goh, K.L., et al., Effects of frozen storage temperature on the elasticity of tendons from a small murine model. *Animal*, 2010. 4(9): p. 1613-7.

59. Gülecü, M.F., Experimentelle Untersuchung der biomechanischen Primärstabilität von knotenfreien Fadenankersystemen zur Versorgung der Rotatorenmanschettenruptur unter Berücksichtigung der trabekulären Knochendichte des Tuberculum majus. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, 2011.
60. Hirpara, K.M., P.J. Sullivan, and M.E. O'Sullivan, The effects of freezing on the tensile properties of repaired porcine flexor tendon. *J Hand Surg Am*, 2008. 33(3): p. 353-8.
61. Okamoto, N., et al., Treating Achilles tendon rupture in rats with bone-marrow-cell transplantation therapy. *J Bone Joint Surg Am*, 2010. 92(17): p. 2776-84.
62. Freedman, B.R., et al., Nonsurgical treatment and early return to activity leads to improved Achilles tendon fatigue mechanics and functional outcomes during early healing in an animal model. *J Orthop Res*, 2016. 34(12): p. 2172-2180.
63. Ficklscherer, A., et al., Does footprint preparation influence tendon-to-bone healing after rotator cuff repair in an animal model? *Arthroscopy*, 2014. 30(2): p. 188-94.
64. O'Brien, M., Functional anatomy and physiology of tendons. *Clin Sports Med*, 1992. 11(3): p. 505-20.
65. Ahmad, J., M. Repka, and S.M. Raikin, Treatment of myotendinous Achilles ruptures. *Foot Ankle Int*, 2013. 34(8): p. 1074-8.
66. Hochstrat, E., et al., Cryopreservation of tendon tissue using dimethyl sulfoxide combines conserved cell vitality with maintained biomechanical features. *PLoS One*, 2019. 14(4): p. e0215595.
67. Jung, H.J., et al., The effects of multiple freeze-thaw cycles on the biomechanical properties of the human bone-patellar tendon-bone allograft. *J Orthop Res*, 2011. 29(8): p. 1193-8.
68. Woo, S.L., et al., Effects of postmortem storage by freezing on ligament tensile behavior. *J Biomech*, 1986. 19(5): p. 399-404.
69. Leitschuh, P.H., et al., Effects of postmortem freezing on tensile failure properties of rabbit extensor digitorum longus muscle tendon complex. *J Orthop Res*, 1996. 14(5): p. 830-3.
70. Kronenberg, D., et al., Increased Collagen Turnover Impairs Tendon Microstructure and Stability in Integrin alpha2beta1-Deficient Mice. *Int J Mol Sci*, 2020. 21(8).
71. Backer, H.C., T.T. Wong, and J.T. Vosseller, MRI Assessment of Degeneration of the Tendon in Achilles Tendon Ruptures. *Foot Ankle Int*, 2019. 40(8): p. 895-899.
72. Galatz, L.M., et al., Complete removal of load is detrimental to rotator cuff healing. *J Shoulder Elbow Surg*, 2009. 18(5): p. 669-75.
73. Wang, J.H., Q. Guo, and B. Li, Tendon biomechanics and mechanobiology--a minireview of basic concepts and recent advancements. *J Hand Ther*, 2012. 25(2): p. 133-40; quiz 141.
74. Matson, A., et al., Tendon material properties vary and are interdependent among turkey hindlimb muscles. *J Exp Biol*, 2012. 215(Pt 20): p. 3552-8.
75. Hannafin, J.A., et al., Effect of stress deprivation and cyclic tensile loading on the material and morphologic properties of canine flexor digitorum profundus tendon: an in vitro study. *J Orthop Res*, 1995. 13(6): p. 907-14.

76. Wolff, K.S., et al., The avascular plane of the Achilles tendon: a quantitative anatomic and angiographic approach and a base for a possible new treatment option after rupture. *Eur J Radiol*, 2012. 81(6): p. 1211-5.
77. Pedowitz, D. and G. Kirwan, Achilles tendon ruptures. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2013. 6(4): p. 285-93.
78. Gwynne-Jones, D.P., M. Sims, and D. Handcock, Epidemiology and outcomes of acute Achilles tendon rupture with operative or nonoperative treatment using an identical functional bracing protocol. *Foot Ankle Int*, 2011. 32(4): p. 337-43.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Sehnen nach Docheva et al. [8].	3
Abbildung 2: AMF-Analyse mit Nano-Topographie.	8
Abbildung 3: Anatomische Strukturen; Rechter Fuß, mediale Ansicht [29].	12
Abbildung 4a: Achillessehnen mit schematischer Darstellung einer Rupturzone [30], b: intakte Achillessehne.	13
Abbildung 5: Thompson-Test – links negativ, rechts positiv [34].	14
Abbildung 6: A. Röntgenbild zum Ausschluss knöcherner Verletzung B. Achillessehnenruptur in der Sonographie: Kontinuitätsunterbrechung (Blauer Pfeil) [36] C. Kernspintomographie einer gerissenen Achillessehne (Roter Pfeil) [37].	15
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Anatomie des hinteren Mäuseunterschenkels (erstellt mit Paint 3D, 2015-2018 Microsoft Corporation ©).	16
Abbildung 8: A. Arbeitsplatz mit der Zwick-Universalprüfmaschine zur Durchführung der biomechanischen Testung [59] B. C57BL/6-Mäusepräparate mit Beschriftung der anatomischen Hauptstrukturen: 1. M. Triceps surae, 2. Muskulotendinöser Übergang, 3. Achillessehne, 4. Os Calcaneus.	22
Abbildung 9: Darstellung des beschriebenen Vorgangs zum Versuchsaufbau mit Nummerierung der Sehnenanteile. Der rote Pfeil zeigt den distalen, knöchernen Anteil und der schwarze Pfeil den proximalen, muskulösen Anteil der Sehne. Mit 1. sind der M. Triceps surae, mit 2. die Achillessehne und mit 3. Os calcaneus dargestellt.	25
Abbildung 10: Darstellung der an der Zwick Z 10-Universalprüfmaschine befestigten Achillessehne. A. Traverse, B. Messsonde, C. Halterungsplatte. Der rote Pfeil zeigt die Achillessehne in einer zugfreien Anfangsposition zwischen Klammerbacke proximal und distal. Mit 1. sind die verschraubten Klammern am proximalen (muskulären) Rand der Sehne zu sehen bzw. mit 2. der distale (knöcherne) Teil mit den Schraubenklammern.	27
Abbildung 11: Dargestellt sind die fünf Konditionierungszyklen. Oben ist die Standardkraft in Newton angegeben. Unten ist der Standardweg (Vordehnung) in Millimeter gezeigt. Das grüne Rechteck zeigt einen Konditionierungszyklus. Mit 1. ist der Anfang der Anspannungsphase und mit 2. der Anfang der Entspannungsphase dargestellt. Der schwarze Pfeil zeigt die Achillessehne bei der Anspannungsphase (300 s), der rote Pfeil zeigt die Achillessehne in der spannungsfreien Phase (300 s).	29

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Messung von Sehnenlänge (L) und Durchmesser (D) mit einem Messschieber.	30
Abbildung 13: Darstellung einer vollständigen Sehnenruptur am Ende des Zugversuchs. Auf diesem Bild ist eine Ruptur im Bereich des distalen Sehnenanteils zu sehen. (1. M. Triceps surae, 2. Achillessehne, 3. Os Calcaneus).....	31
Abbildung 14: Sehnenlänge in mm, Knock-Out vs. Wildtyp/Heterozygote (Die roten Punkte zeigen die Mäuse männlichen Geschlechts) mit dem entsprechenden Mittelwert für die beiden Gruppen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.	33
Abbildung 15: Sehrendurchmesser in mm, Knock-Out vs. Wildtyp/Heterozygote (Die roten Punkte zeigen die Mäuse männlichen Geschlechts) mit dem entsprechenden Mittelwert für die beiden Gruppen Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.....	34
Abbildung 16: Maximale Ausreißkraft in Newton, Knock-Out-Mäuse vs. Wildtyp/Heterozygoten-Mäuse (Die roten Punkte zeigen die Mäuse männlichen Geschlechts) mit dem entsprechenden Mittelwert für die beiden Gruppen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.	35
Abbildung 17: Elastizitätsmodul in Newton/mm ² , Knock-Out-Mäuse vs. Wildtyp/Heterozygoten-Mäuse (Die roten Punkte zeigen die Mäuse männlichen Geschlechts) mit dem entsprechenden Mittelwert für die beiden Gruppen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.	36
Abbildung 18: Rupturort der Knock-Out-Achillessehnen. Am häufigsten sind die Sehnen im distalen Anteil rupturiert.....	37
Abbildung 19: Rupturort der Wildtyp/Heterozygoten-Achillessehnen. Am häufigsten wird eine Ruptur im distalen Sehnenanteil beobachtet. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.	38
Abbildung 20: Korrelation der Ausreißkraft zur Sehnenlänge bei Knock-Out-Maus. ..	38
Abbildung 21: Korrelation des E-Moduls zur Sehnenlänge bei Knock-Out-Maus.	39
Abbildung 22: Korrelation zwischen der Ausreißkraft und der Sehnenlänge von Wildtyp/Heterozygoten-Maus. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.....	40
Abbildung 23: Korrelation zwischen dem E-Modul und der Sehnenlänge bei Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.....	40

Abbildung 24: Korrelation der Ausreißkraft zum Sehnendurchmesser bei Knock-Out-Maus.....	41
Abbildung 25: Korrelation des E-Moduls zum Sehnendurchmesser bei Knock-Out-Maus.....	41
Abbildung 26: Korrelation zwischen der Ausreißkraft und dem Sehnendurchmesser von Wildtyp/Heterozygoten-Maus. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.....	42
Abbildung 27: Korrelation zwischen dem E-Modul und dem Sehnendurchmesser bei Wildtyp/Heterozygoten-Mäusen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.....	43
Abbildung 28: Korrelation der maximalen Ausreißkraft vs. Elastizitätsmodul bei TNDM-Knock-Out-Mäusen.	44
Abbildung 29: Korrelation der maximalen Ausreißkraft vs. Elastizitätsmodul bei Wildtyp/Heterozygoten Mäusen. Heterozygote; Hinweis: diese Tiere können sich wie Tnmd-KO verhalten.....	44
Abbildung 30: Spannungs-Dehnungs-Diagramm (* Belastung; ** Entlastung).	51

8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Bruchdehnung
Abb.	Abbildung
Ag	Gleichmaßdehnung
AMF	Atomic Force Microscopy (engl.)
Art.	Articulatio (lat.) = Gelenk
bds.	beidseits
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
ChM- I	Chondromodulin I
cm	Centimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlestoffdioxid
CTC	Chorda tendinae chordis (engl.)
D	Durchmesser
d.h.	das heißt
E-Modul	Elastizitätskoeffizient
engl.	Englisch
et al.	et alteri (lat.) = und andere
etc.	et cetera
EZM	extrazelulläre Matrix
F _{max}	Maximale Ausreisskraft
g	Gramm
h	hor (lat.) = Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
IZS	intrazelulläre Substanz
KO	Knock-Out
L	Länge
lat.	lateral

Lig	Ligament (lat.) = Band
Lpl	Lipoproteinlipase
M.	musculus (lat.) = Muskel
med.	medial
min	Minute
Mkx	Mohawk
mm	Millimeter
mRNA	Messenger- RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymal Stem Cells (engl.)
N	Newton
N/mm ²	Newton/Quadratmillimeter
NaCl	Natrium-Chlorid
OP	Operation
OSG	oberes Sprunggelenk
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
Rm	Punkt des Einschnürungsbeginns
RNA	ribonucleic acid (engl.) = Ribonukleinsäure
Rp	plastische Dehngrenze
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sog.	so genannt
Scx	Scleraxis
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SD-Diagramm	Spannungs-Dehnungs-Diagramm
Smad 2/3	Proteine in der Regulation von TGF
TGF-β3	transforming growth factor (engl.)
TNMD	Tenomodulin (Protein)
Tnmd	Tenomodulin (Gen)
tRNA	Transfer-RNA
TSPC	Tendon Stem/Progenitor Cells
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

9. Anhang

Die getesteten Präparate, die uns vom Labor der Klinik für Allgemeine-, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Campus Innenstadt der Universität München zur Verfügung gestellt wurden, wurden für unsere biomechanische Testung randomisiert nummeriert. Die Durchführung der biomechanischen Testung in unserem Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie der LMU München, Campus Großhadern erfolgte in Blindstudie, ohne Auskunft über die Mäusegruppe und das Geschlecht der Präparate. Nach dem Abschluss der biomechanischen Versuche wurden uns die endgültigen Daten in Bezug auf die getesteten Mäuseachillessehnen, einschließlich Geburtsdatum und Euthanasietag (beim vollendeten 5-monatigen Alter) mitgeteilt. Die folgenden Tabellen stellen die gesammelten Daten über die getesteten Präparate dar.

9.1. Tabelle 1

Probe	Geburtsdatum	Genotyp	Geschlecht	Euthanasietag
9.1	04.11.2015	Wildtyp	m	04.04.2016
9.2	04.11.2015	Wildtyp	m	04.04.2016
12.1	04.11.2015	Heterozygot	f	04.04.2016
12.2	04.11.2015	Heterozygot	f	04.04.2016
13.1	15.11.2015	Heterozygot	f	15.04.2016
13.2	15.11.2015	Heterozygot	f	15.04.2016
17.1	15.11.2015	Heterozygot	f	15.04.2016
17.2	15.11.2015	Heterozygot	f	15.04.2016
20.1	22.12.2015	Heterozygot	f	22.04.2016
20.2	22.12.2015	Heterozygot	f	22.04.2016
21.1	22.12.2015	Heterozygot	f	22.04.2016
21.2	22.12.2015	Heterozygot	f	22.04.2016
10.1	04.11.2015	K.O.	m	04.04.2016
10.2	04.11.2015	K.O.	m	04.04.2016
11.1	04.11.2015	K.O.	f	04.04.2016
11.2	04.11.2015	K.O.	f	04.04.2016
14.1	15.11.2015	K.O.	f	15.04.2016
14.2	15.11.2015	K.O.	f	15.04.2016
15.1	15.11.2015	K.O.	f	15.04.2016
15.2	15.11.2015	K.O.	f	15.04.2016
16.1	15.11.2015	K.O.	f	15.04.2016
16.2	15.11.2015	K.O.	f	15.04.2016
18.1	22.12.2015	K.O.	f	22.04.2016
18.2	22.12.2015	K.O.	f	22.04.2016
19.1	22.12.2015	K.O.	f	22.04.2016
19.2	22.12.2015	K.O.	f	22.04.2016

9.2. Tabelle 2

Probe	Länge (mm)	Durchmesser (mm)	OUP	Fmax (N)	E-Modul (N/mm ²)	Rissort
9.1	4,90	1,2	0,245	7,04	4,121	Proximal
9.2	4,20	0,9	0,210	13,61	11,883	Proximal
12.1	4,40	0,95	0,220	6,97	17,196	Distal
12.2	4,65	1,1	0,2325	11,71	17,278	Distal
13.1	4,30	0,9	0,215	4,12	5,977	Distal
13.2	4,75	0,75	0,2375	11,29	4,260	Distal
17.1	4,60	0,8	0,230	11,1	9,132	MT-Übergang
17.2	4,85	0,95	0,2425	7,0	23,430	Distal
20.1	4,70	0,8	0,235	10,75	10,352	Distal
20.2	4,75	0,8	0,2375	10,03	19,231	distal
21.1	4,85	0,8	0,2425	10,36	12,914	Distal
21.2	4,70	0,75	0,235	14,56	32,588	Distal
10.1	4,20	0,85	0,210	6,36	6,746	Distal
10.2	4,20	1,0	0,240	13,09	10,861	Intratendinös
11.1	5,20	0,9	0,260	6,91	14,085	Distal
11.2	4,70	0,85	0,235	2,62	5,876	MT-Übergang
14.1	4,35	1,05	0,2175	6,77	6,950	Distal
14.2	4,90	1,1	0,245	7,29	14,018	Distal
15.1	4,40	0,8	0,220	19,49	12,933	Proximal
15.2	4,65	0,9	0,2325	6,76	9,232	Distal
16.1	4,50	1,2	0,225	15,47	17,505	MT-Übergang
16.2	4,10	1,1	0,205	10,78	18,908	Distal
18.1	4,90	0,65	0,245	16,91	23,134	Distal
18.2	4,80	0,8	0,240	14,69	26,141	distal
19.1	4,65	0,9	0,2325	6,80	16,438	Intratendinös
19.2	4,50	0,75	0,225	5,50	19,766	Distal

10. Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter E. Müller für die fachliche und vielfältige Unterstützung bei Fragen während der Forschung im Labor sowie beim Erstellen der Arbeit bedanken.

Ganz besonderes bedanke ich mich bei Herrn Dr. Mehmet Güleçyüz, der mit mir das Thema erarbeitete, mich in die Präparation der Sehnen einwies und für seine Hilfe bei der Etablierung des Versuchsprotokolls. Herrn Dr. Mehmet Güleçyüz bedanke ich mich ganz herzlich, dass er Tag und Nacht bereit war, mich bei allfälligen Fragen zu unterstützen und dass er an mich geglaubt hat.

Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson danke ich für das Vertrauen in meine Person und für die Motivation und Unterstützung im Labor.

Ein großer Dank gehört auch dem Biomechanischen Team rund um Herrn Prof. Dr. med. habil. Dr.-Ing. Wolfgang Plitz, Herrn Dipl.-Ing. Christian Schröder und den weiteren Mitarbeitern, welche bei technischen Fragen stets zur Verfügung standen und mit ihrem Wissen und Fertigkeiten weiterzuhelfen versuchten.

Ein besonderer Dank an Frau Prof. Dr. Denitsa Docheva für die Zurverfügungstellung meines Studienthemas, sowie für die Ideen und die Unterstützung sowie für die uns zur Verfügung gestellten Versuchspräparate.

Ein ganz spezieller Dank geht an meine Liebe, Frau Vesela Docheva, die mich stets bestärkt, kritisiert und aufgebaut hat.

Den größten Dank schulde ich meinen Eltern, Mirela und Ivan Ivanov, die mich stets gefördert und mir dieses Studium ermöglicht haben. Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Lehrerin, Frau Milena Getsova.

11. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung Stand 03.02.2022

Ivanov, Georgi

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Biomechanische Analyse des Rupturverhaltens der Achillessehnen von Tenomodulin (TNMD)-Knock-Out-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 03.02.2022

Georgi Ivanov