

Aus dem Bereich
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**„Analyse des Einflusses von MALP-2 auf die Sehnenheilung im
murinen partiellen Tenotomiemodell“**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

der medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von Julia Felicitas Schäfer

geb. am 09.09.1994 in Kassel

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. T. Pohlemann

Tag der Promotion: 04. November 2021

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

Prof. Dr. med. Stefan Landgraeber

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
1. Zusammenfassung.....	1
1.1 Summary.....	2
2. Einleitung.....	3
2.1. Sehnen.....	3
2.1.1 Makroskopische Sehnenstruktur	4
2.1.2 Mikroskopische Sehnenstruktur.....	5
2.1.3 Physiologie	7
2.1.4 Biomechanische Eigenschaften einer Sehne	8
2.2 Sehnenverletzungen	9
2.3 Sehnenheilung	9
2.4 Sehndefektmodelle	10
2.4.1 Maus.....	11
2.4.2 Ratte.....	12
2.5 Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid 2	12
2.6 PCNA	14
2.7 Cyclin D.....	14
2.8 Caspase 3	15
2.9 Hämoxygenase-1	15
2.10 NF- κ B	16
2.11 COX-2	16
2.12 Zielsetzung.....	16
2.13 Fragestellung.....	17
3. Material und Methoden.....	18
3.1 Intervention.....	18
3.1.1 Versuchsprotokoll	18
3.1.2 Tiermodell.....	19
3.1.3 Zusammensetzung der Lösung der Kontroll- und MALP-2-Gruppe	19
3.1.4 Protokoll CatWalk XT 10.....	19
3.1.5 Operation	19
3.1.6 Applikation MALP-2/Vektor.....	20
3.1.7 Tötung der Tiere	23
3.1.8 Explantation der Sehne	23
3.2 Zielkriterien und Auswertung.....	23
3.2.1 CatWalk TM.....	23

3.2.2	Biomechanik	26
3.2.3	Western Blot	27
3.3	Statistik.....	28
4.	Ergebnisse	29
4.1	Postoperativer Verlauf.....	29
4.2	Makroskopie	29
4.3	CatWalk Analyse	30
	Run Duration (s)	30
4.4	Biomechanik.....	50
4.5	Western Blot.....	52
5.	Diskussion	54
5.1	Diskussion der Methoden.....	54
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	61
5.3	Fazit.....	64
6.	Literaturverzeichnis	65
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	91
7.1	Abbildungsverzeichnis	91
7.2	Tabellenverzeichnis.....	92
8.	Publikation/Danksagung.....	94
8.1	Publikation.....	94
8.2	Danksagung	94
9.	Lebenslauf.....	96
10.	Anhang.....	97

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
AZ	Aktenzeichen
BAFF	B cell activating factor
BER	Basenexzisionsreparatur
bFGF	basic fibroblast growth factor
BOS	Base of Support
BR	Biliverdin
bspw.	Beispielsweise
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
cm	Zentimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CPP32	Caspase 3
CTGF	connective tissue growth factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMG	Elektromyogramm
et al.	et alteri
EU	Europäische Union
EZM	Extrazellulärmatrix
FDL	Flexor Digitorum Longus
G	Gauge
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
G-Phase	Gap-1-Phase
h	Stunde
HO-1	Hämoxigenase-1
ICE	Interleukin-1-beta converting enzyme
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
IκB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
kDa	Kilodalton

kg	Kilogramm
li	links
Lig.	Ligament
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
M	Mittelwert
M.	Musculus
MALP	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kaskade
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute/Minuten
Mio.	Millionen
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MPa	Mega Pascal
MSA	Makrophagen-stimulierende Aktivität
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
MTJ	myotendinous junction/muskulo-tendinöse Verbindung
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
OTJ	osteotendinous junction/osseo-tendinöse Verbindung
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PDGF	Platlet derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pRb	Retinoblastom-Protein
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
re	rechts
s	Sekunde
S-Phase	Synthese-Phase
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standardfehler
sog.	sogenannt

Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming growth factor β
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
USA	United States of America
v/v	Volumenprozent
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

1. Zusammenfassung

Degenerative und traumatische Schädigungen von Sehnen sind häufig auftretende Krankheitsbilder, welche zu langanhaltenden Beeinträchtigungen im Alltags- und Arbeitsleben führen können, und zu einer hohen finanziellen Belastung des Gesundheitssystem führen. Die Heilung von Sehnen umfasst einen langandauernden Prozess, welcher trotz Interventionen in bleibenden Funktionseinschränkungen und reduzierten biochemischen und mechanischen Eigenschaften der Sehne resultieren kann. Makrophagen-aktivierendem Lipoprotein 2 (MALP-2) wurde in der Literatur regeneratives Potenzial zugeschrieben. Keine Studie hat bisher den Einfluss von MALP-2 auf die Sehnenheilung untersucht. Das Ziel dieser Arbeit war es, die regenerativen Eigenschaften von MALP-2 nach partieller Tenotomie im Mausmodell zu untersuchen.

Hierfür wurden 64 C57Bl/6 Mäuse einer partiellen Tenotomie der Sehne des M. flexor digitorus longus am linken Hinterlauf unterzogen. Anschließend erfolgte die Applikation von gelöstem MALP-2 bzw. nur des Lösungsmittels (Isopropanol) als Kontroll-Gruppe. Die Evaluation des Einflusses von MALP-2 erfolgte durch eine biomechanische Testung im axialen Zugversuch und Bestimmung der Steifheit (N/mm) mittels Universaltestungsmaschine nach 7 und 36 Tagen nach Intervention. Das funktionelle Outcome wurde durch eine automatisierte Ganganalyse (CatWalk) an Tag 1 präoperativ, sowie postoperativ an Tag 1, 3, 7, 14 und 36 analysiert. Zur weitergehenden Analyse intrazellulärer Reaktionen erfolgte die Explantation unbehandelter Sehnen von 12 C57Bl/6 Mäusen zur molekularbiologischen Untersuchung der Wirkung von MALP-2 auf die Expression von Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen, Cyclin D, Caspase 3, Hämoxigenase-1, nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells und Cyclooxygenase-2.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Steifheit (N/mm) der mit MALP-2 behandelten Gruppe nach 7 und 36 Tagen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant reduziert war und so von einem schlechteren biomechanischen Zustand der Sehne ausgegangen werden kann. In der Analyse des klinischen Verlaufes mittels CatWalk präsentierte sich im Vergleich zur Kontroll-Gruppe bei der Mehrzahl der untersuchten Parameter eine Verschlechterung bis zum 14. Tag postoperativ. Aus den Ergebnissen der Proteinexpressionsanalyse ließ sich schließen, dass MALP-2 auf Sehnen nicht apoptotisch, aber vermutlich stark entzündungsinduzierend wirkt.

Die hohen Erwartungen an das MALP-2 in der Frühphase der Sehnenheilung konnten nicht erfüllt werden und es bedarf in Zukunft der Untersuchung weiterer potenzieller heilungsfördernder Agenzien, ggf. in Kombination mit MALP-2.

1.1 Summary

Degenerative and traumatic injuries of tendons are common clinical challenges which can result in long term impairments for both in the workspace and the everyday life and represent also a high economic burden of the healthcare system. The healing of tendons consists a long process. Despite of remodelling or interventions impaired clinical function and biochemical or mechanical properties are likely to occur. MALP-2 has been described for its regenerative potential in literature. Until now, no study has shown the effects of MALP-2 during tendon healing. Considering this, the aim of this study was to investigate the regenerative potential of MALP-2 on tendons after partial tenotomy.

A partial tenotomy of the flexor digitorum longus on the left hind was induced in 64 C57Bl/6 mice. The partial tenotomy was followed by the application of either 5µg MALP-2 (n=32) dissolved in a vehicle (isopropanol) or vehicle only (control; n=32).

To evaluate the impact of MALP-2 on tendon healing, structural stability of the tendon was biomechanically tested on days 7 and 36 post intervention. The postoperative stiffness was determined and compared to control group. Gait pattern and gait recovery were analysed using the CatWalk system previous to surgical intervention and postoperatively on day 1, 3, 7, 14 and 36. To analyse intracellular reactions of MALP-2 in tenocytes, untreated tendons of 12 C56Bl/6 mice were used to perform Western blotting for Proliferating-Cell-Nuclear-Antigene, Cyclin D, Caspase 3, Heme oxygenase-1, nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells and cyclooxygenase-2.

The application of MALP-2 led to a significant decrease of stiffness on day 7 and 36 postoperatively compared to control group. Hence mechanical properties after MALP-2 treatment were impaired compared to control group. The majority of analysed CatWalk parameters showed a reduced functional outcome up to day 14 postoperative. Western Blotting findings led to the presumption that MALP-2 has no apoptotic effect, but inflammatory effect on tenocytes.

The application of MALP-2 on partial tenotomised flexor digitorum longus tendons does not lead to improved mechanical properties or gait recovery during the healing process compared to control group. Further studies concerning other potential agents possibly in combination with MALP-2 are required in the future.

2. Einleitung

Sehnen sind *in vivo* großen mechanischen Belastungen ausgesetzt und können bei Überlastung traumatisch reißen oder bei Verletzungen getrennt werden. Häufige Sehnenschäden treten im Bereich der Fingerbeugesehnen z.B. durch Schnittverletzungen auf. Sehnen sind auch hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt und unterliegen degenerativen Prozessen. Auf Basis dieser Degeneration entstehen häufig typische Sehnenverletzungen, wie z.B. Rupturen im Bereich der Rotatorenmanschette, der Patellarsehne sowie der Achillessehne. Resultat ist neben eingeschränkter Beweglichkeit oder abnormer Gelenkkinematik auch eine Verletzung des umliegenden Gewebes. Dies führt letztendlich zu Morbidität und Schmerz und kann in Arthrosen des betroffenen Gelenkes resultieren [233]. Sehnenverletzungen können zu Einschränkungen alltäglicher Aktivitäten sowie der Arbeitsfähigkeit führen [215].

Die Kosten für muskulo-skeletale Verletzungen belaufen sich in den USA auf ca. 30 Milliarden Dollar pro Jahr und Sehnen- und Bandverletzungen machen etwa 45% aller muskulo-skeletalen Verletzungen in den USA aus [55]. Erwartungsgemäß wird die Häufigkeit dieser Verletzungen zunehmen, da die Bevölkerung älter und aktiver wird [34].

Trotz in der Bevölkerung häufig vorkommenden Beeinträchtigungen durch Sehnenverletzungen und Tendinopathien, ist die Anzahl forschender Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet sehr überschaubar [3]. Daher ist das vorhandene Wissen über die Mechanismen der Sehnenheilung noch beschränkt.

Um aktuelle Therapieansätze der Sehnenheilung besser verstehen und die vorhandenen Therapien weiter entwickeln zu können, müssen zunächst einzelne Mechanismen der Sehnenregeneration untersucht und geklärt werden [3] [55].

Die Einflussfaktoren der Sehnenheilung können sowohl mittels verschiedener *in vitro* als auch *in vivo* Modelle untersucht werden. In der Vergangenheit wurde bereits der Einfluss von Makrophagen auf die Sehnenheilung nach Sehnenverletzungen beschrieben. Allerdings ist über die Immunmodulation durch Makrophagen im Rahmen des Heilungsprozesses nur wenig bekannt. Durch ein etabliertes *in vivo* Modell soll der Einfluss der Stimulation von Makrophagen auf die Sehnenheilung untersucht werden. Dadurch können in der Zukunft möglicherweise neue Therapiekonzepte zur Verbesserung der Sehnenheilung im klinischen Alltag entwickelt werden.

2.1. Sehnen

Sehnen sind anatomische Strukturen, welche die vom Muskel hervorgebrachte Kraft auf den Knochen übertragen. Dadurch werden Gelenkbewegungen ermöglicht [98].

Unterschieden wird die Ursprungssehne (Origo) von der Ansatzsehne (Insertio). Über die Ansatzsehne wird der Muskelzug auf die zu bewegenden Skelettteile übertragen, welche durch die Sharpey-Fasern eine feste Verankerung des Bindegewebes im Knochen bilden [12]. Eine einzelne Sehne kann die Wirkung mehrerer Muskeln auf einen Knochen fokussieren. Dadurch kann eine höhere Kraftübertragung auf ein Gelenk ausgeübt werden. Ein einzelner Muskel kann allerdings auch über mehrere Sehnen auf verschiedene Knochen wirken.

Sehnen können die Kraft eines Muskels über eine große Distanz übertragen. So kann eine Bewegung über mehrere Gelenke hinweg über eine Sehne gesteuert werden, wie durch die Muskeln am Unterarm mit der Wirkung an den Fingern [23].

Bei Zugsehnen stimmt die Wirkungsrichtung mit der Hauptlinie des entsprechenden Muskels überein. Bei Gleitsehnen hingegen weicht die Zugrichtung der Sehne von der des Muskels ab, wie z.B. beim M. tibialis posterior oder M. fibularis longus. Die Ablenkung der Sehnenverlaufsrichtung kann durch ein Retinaculum (Halteband) oder durch ein Skelettelement erfolgen. Ein mögliches Widerlager, um welches die Sehne geleitet wird, bezeichnet man als Hypomochlion. Eine Aponeurose ist eine breitflächige, platte Sehne (z. B. Bauchmuskulatur) [12].

Sehnen bilden mit dem dazugehörigen Muskel eine integrierte Muskel-Sehnen-Einheit. Sehnen besitzen die wichtige, aber limitierte Fähigkeit, sich zu dehnen. Die Dehnbarkeit der Sehne ermöglicht es dieser als Energiespeicher während der Bewegung zu fungieren. Durch Dehnen und konsekutives Zusammenziehen wird weniger Energie für eine Bewegung gebraucht [23].

2.1.1 Makroskopische Sehnenstruktur

Gesunde Sehnen sind glänzend weiß und bestehen aus fibro-elastischem Gewebe. Das Gewebe erweist sich als sehr beständig gegenüber mechanischen Kräften [98].

Die Region der Sehne aus dem Ursprung des Muskels wird als myotendinous junction/muskulo-tendinöse Verbindung (MTJ) bezeichnet. Die Knochenansatzregion wird osteotendinous junction/osseo-tendinöse Verbindung (OTJ) genannt. Form und Befestigung am Knochen variiert von flachen bis zylindrischen, fächerförmigen oder bandförmigen Sehnen [98].

Die äußere Knochenhaut, das Periost, überzieht den kompletten Knochen. Ausgenommen davon sind überknorpelte Gelenkflächen und Knochenabschnitte, welche von der Synovialmembran überzogen sind. Die äußere Schicht, das Stratum fibrosum, enthält geflechtartiges, straffes Bindegewebe, dessen Kollagenfasern bevorzugt entsprechend der Längsachse verlaufen. Die Sharpey-Fasern zweigen davon ab und verlaufen durch die gefäß-

und nervenführende innere Schicht (Stratum osteogenicum) direkt in die darunter gelegene Kompakta. Dies führt zu einer festen Verbindung zwischen Periost und Knochen. Sehnen und Bänder setzen im Stratum fibrosum an [12].

Sehnen sind in ihr Umfeld über lockeres, reichlich vaskularisiertes Bindegewebe, das Paratendineum, eingebettet. In diesem Sehnengleitgewebe werden Gefäße und Nerven an die Sehne herangebracht [200].

Die ganze Sehne wird von dem Epitendineum, einer Hülle aus lockerem Bindegewebe, umfasst. Von ihm verlaufen Septen aus lockerem Bindegewebe, das Peritendineum, in das Innere der Sehne. Das Peritendineum unterteilt die Sehne in Faserbündel. Diese Septen fungieren als Nerven-Gefäß-Straßen und Verschiebeschichten. Diese genannte Bauweise gilt für Zugsehnen [12].

Im Kontaktbereich des Hypomochlions wird das Sehnengewebe auf Druck und Schub beansprucht (Gleitsehne) und hat histologische Merkmale von Faserknorpel [132].

Sehnen, die in Weichteilen ansetzen, bestehen aus vielen elastischen Fasern (z. B. Muskeln des Gesichts) [12].

Eine spezialisierte Gewebsgrenzfläche, die Enthesis, verknüpft Sehnen und Bänder mit Knochen [24] [25]. Die Enthesis weist Gradienten der Gewebsorganisation auf. Diese können in vier verschiedene Zonen mit unterschiedlicher Zellzusammensetzung, mechanischen Eigenschaften und Funktionen aufgeteilt werden [7].

Die Enthesis sichert, dass die vom Muskel generierten Kontraktionskräfte auf das Skelettsystem übertragen werden [24]. Es wird vermutet, dass die Enthesis die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften von Sehnengewebe und Knochengewebe ausgleicht, um räumliche zentrierte Maxima von Zugkräften zu vermeiden [24] [29] [105]. Die Struktur der Enthesis von Sehnen spiegelt die Notwendigkeit, die Belastung von der Grenzfläche auf Sehne und/oder Knochen zu verteilen, wider. Trotz ihrer Struktur kann die Enthesis von Abnutzung und Zerreißen betroffen sein [24].

2.1.2 Mikroskopische Sehnenstruktur

Die Extrazellulärmatrix (EZM) von Sehnen setzt sich zusammen aus Kollagen und kleinen Bruchteilen von Elastin, eingebettet in eine hydratisierte Proteoglykanmatrix. Hauptaufgabe der Kollagenfasern ist die Widerstandsfähigkeit. Proteoglykane sind hauptsächlich für die Viskoelastizität verantwortlich.

Die kleinste strukturelle Einheit ist die Kollagenfibrille. Die einzelne Fibrille besteht aus Querverbindungen formenden, wasserlöslichen Tropokollagenmolekülen, welche unlösliche Kollagenmoleküle bilden. Diese häufen sich schrittweise zunächst zu Mikrofibrillen, Fibrillen

und letztendlich zu Fasern an. Bündel von Fasern werden zusammengehalten vom Epi- und Endotendineum [26] [55]. Die am reichlichsten vorhandene Kollagenkomponente in Sehnen ist Kollagen Typ I. Kollagen Typ I macht ca. 60% der Trockenmasse und 95% des Gesamtkollagens aus [232]. Die verbleibenden 5% des Gesamtkollagens bestehen aus Typ III und Typ V Kollagen [57]. Proteoglykane machen ca. 1-2% der Trockenmasse der EZM aus [232]. In Regionen, die Druck ausgesetzt sind, ist der Anteil von Proteoglykanen höher, als in den Regionen, die Spannung ausgesetzt sind [27]. Proteoglykane wie Aggrecan und Decorin binden Wasser, halten Druck stand und ermöglichen den Fibrillen einen gewissen Spielraum während der Deformation [182] [230] [232]. Elastische Fasern gewährleisten Gewebsflexibilität. Sie ermöglichen eine weitreichende Verformbarkeit und passiven Zurückzug ohne vermehrten Energieaufwand. Elastische Fasern spielen eine Rolle bei der Erholung des Faltmodells der Kollagenfasern nach Zug an der Sehne [55].

Eine Sehne besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen. Dazu gehören Tenozyten, Chondrozyten, Synovialzellen und Gefäßzellen. Die erhebliche Mehrheit der Zellen sind Tenozyten [233]

Zwischen den Kollagenfasern liegen Reihen lang gestreckter Fibroblasten, Tendinozyten/Tenozyten, von denen histologisch meist nur die Kerne erkennbar sind. Ultrastrukturell weisen Tenozyten im Querschnitt mehrere flügelartige Fortsätze auf, die radiär zwischen die Kollagenfibrillen ragen. Gap junctions sind für die Koordination von Tendinozyten/Tenozyten verantwortlich [132].

Histologisch betrachtet, kann die Enthese als fibrös oder fibrocartilaginär charakterisiert werden. Fibrocartilaginäre Insertionen sind häufiger [62].

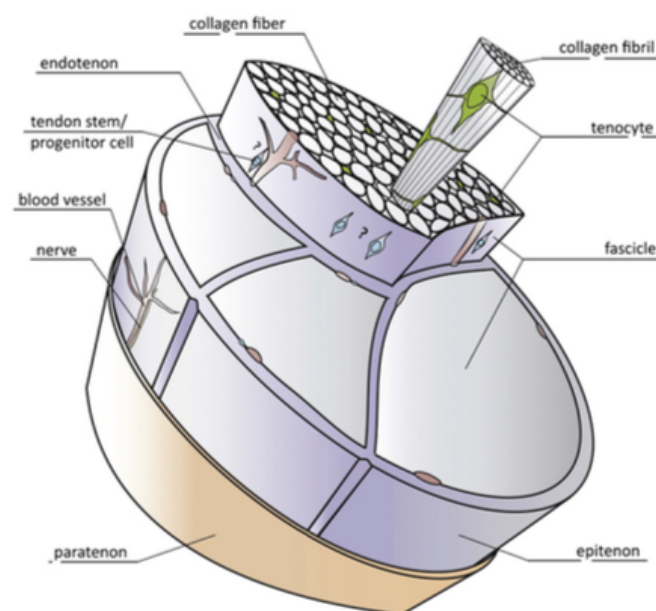


Abb. 1 Schematische Darstellung der grundsätzlichen Struktur einer Sehne nach Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans CH (2015) *Biologics for tendon repair. Adv Drug Deliv Rev* 84:222–239 [55].

2.1.3 Physiologie

Sehnen sind ein gering stoffwechselaktives Gewebe. Sehnen können Kollagen und andere Komponenten der Matrix selbst herstellen [172].

Menschliche und tierische Sehnenzellen besitzen eine Enzymausstattung für alle drei Hauptstoffwechselwege der Energiegewinnung: für den Citratzyklus, die anaerobe Glykolyse sowie den Pentosephosphatweg [173].

Im Verlauf des Lebens stellt sich der Stoffwechsel von hauptsächlich aerob (Citratzyklus, Pentosephosphatweg) zu vermehrter anaerober Energiegewinnung (anaerobe Glykolyse) um [173].

Tenozyten sind in der Lage, sämtliche Bestandteile der EZM der Sehnen herzustellen. Während des Wachstums ist die Syntheseleistung hoch, im Alter ist sie vermindert und bei pathologischen Prozessen nimmt sie drastisch ab.

Die geringe Stoffwechselleistung ermöglicht es der Sehne, Belastungen standzuhalten und im gedehnten Zustand für längere Zeit verweilen zu können. Das Risiko einer Ischämie oder Nekrose wird so vermindert. Nachteil ist die langsame Erholung nach Belastung und die langsame Heilung des Gewebes nach Verletzung [173].

Sehnen werden von sensorischen Nerven der überlagernden oberflächlichen Nerven oder von den in der Nähe verlaufenden tiefen Nerven versorgt. Die Versorgung ist weitestgehend, wenn nicht ausschließlich, afferent. Die afferenten Rezeptoren befinden sich Nahe der muskulo-tendinösen Verbindung (MTJ), entweder an der Oberfläche oder in der Sehne [173].

Die Nerven neigen dazu, einen longitudinalen Plexus zu bilden und treten in die Sehne über die Septen des Endotendineums oder des Mesotendineums ein. Zweige der Nerven vom Paratendineum dringen über das Epitendineum zur Oberfläche des Inneren der Sehnen ein [173].

Es gibt vier Arten von Rezeptoren: Typ I Ruffini Körperchen (Mechanosensoren, Druck), Typ II Vater-Pacini-Körperchen (Mechanosensoren, Vibration), Typ III Golgi-Sehnenorgane (Tiefensensibilität) und Typ IV Rezeptoren, welche freie Nervenendigungen darstellen (Schmerzrezeptoren) [173].

Die Blutversorgung der Sehnen gestaltet sich als sehr variabel und unterteilt sich normalerweise in drei Regionen:

1. Die muskulo-tendinöse Verbindung (MTJ), welche über oberflächliche Gefäße der umgebenden Gewebe versorgt wird,
2. der Mittelteil der Sehne, der seine Gefäße aus dem Paratendineum erhält und
3. die Gefäße für die osseo-tendinöse Verbindung (OTJ) versorgen das untere Drittel der Sehne.

Es gibt keine direkte Kommunikation zwischen den Gefäßen der Sehne und des Knochens aufgrund einer dazwischenliegenden fibrocartilaginären Schicht. Jedoch lässt sich eine indirekte Anastomose auffinden [172].

2.1.4 Biomechanische Eigenschaften einer Sehne

Sehnen übertragen nicht nur Muskelkraft auf den Knochen. Sie sind Puffer, indem sie externe Kräfte auffangen und damit Muskelschäden beschränken. Sehnen weisen eine hohe mechanische Stärke, gute Flexibilität und ein hohes Level an Elastizität auf [172] [202].

Muskeln, welche starke, widerstandsfähige Kräfte ausüben, besitzen kurze und breite Sehnen. Muskeln, die feine und zarte Bewegungen ausführen, haben lange und dünne Sehnen [98]. Dickere Sehnen sind weniger dehnbar. So wird die Muskelkraft nicht zur Dehnung der Sehne selbst genutzt, sondern um die Kraft auf den Knochen zu übertragen [23]. Grund dafür sind das Fasermuster und die viskoelastischen Eigenschaften einer Sehne.

Die Viskoelastizität resultiert aus der Zusammensetzung aus Kollagen, Wasser und der Interaktionen zwischen Kollagenen und nicht-kollagenen Proteinen der Sehne [33] [232].

In Ruhe sind die Kollagenfasern und – fibrillen gefaltet [233] ab 2% Spannung, wird die Sehne aus dieser Konfiguration heraus ausgedehnt, das heißt sie muss um mindestens 2% gedehnt werden, damit sich die Kollagenfasern und – fibrillen entfalten [232] [237]. Der linear-elastische Bereich streckt sich bis zu 4% Spannung aus. Die Steigung in diesem Bereich beschreibt das Elastizitätsmodul der Sehne [232].

Fasern mit einem kleinen Faltungswinkel versagen schneller als solche mit einem großen Faltungswinkel. Wenn die Sehne über 4% (nichtlinear-elastischer Bereich) gespannt wird, treten mikroskopische Zerreißen auf, nach 8-10% (elastisch-plastischer Bereich) Belastung makroskopische Zerreißen [33] [232]. Es wurde gezeigt, dass Flexorensehnen bis zu 14% elastisch gedehnt werden können [52] [232].

Die geheilte Sehne erlangt normalerweise nicht wieder die mechanischen Eigenschaften einer unverletzten Sehne [97]. Die reduzierte Kraft des Narbengewebes verglichen mit der einer nativen Sehne resultiert aus einer reduzierten Integration von Kollagenfasern. Diese besteht aus einem höheren Verhältnis von Kollagen Typ III (geringerer Durchmesser) zu Kollagen Typ I. Die verletzte Sehne wird dicker und steifer, um die geringere mechanische Kraft auszugleichen. Die Qualität der Sehne und die funktionelle Aktivität sind reduziert [232] [236] [241].

2.2 Sehnenverletzungen

Sehnenverletzungen können in akute und chronische Verletzungen unterteilt werden [91] [208]. Risse und Rupturen sind zwei häufige akute Verletzungsformen. Sie treten oft im sportlichen Setting oder durch penetrierende Traumata (Schnitt, Hieb-, Stich- oder Schussverletzungen) auf [123].

Sehnenverletzungen sind oft indirektes Resultat akuter Zugüberlastung und sich wiederholender Mikrotraumata, die bei der Überbeanspruchung auftreten. Am häufigsten führen Überbeanspruchung und Zugüberlastung zu Verletzungen der muskulo-tendinösen Verbindung (z. B. Verstauchung, Verspannung oder Ruptur) oder der osseo-tendinösen Verbindung (Fraktionsfraktur oder Knochenablösung). Selten zerreißt der mittlere Teil der Sehne. Gesunde Sehnen können höheren Zugkräften standhalten als die Muskel- oder Knochenverbindungen [91] [123] [206].

Chronische Sehnenverletzungen werden meist als Tendinopathie bezeichnet. Eine Tendinopathie manifestiert sich klinisch durch Schmerz und Entzündung. Die Ätiologie von Tendinopathien ist unklar [202].

Einmal verletzt, unterzieht sich die Sehne einem langsamen spontanem Heilungsprozess. [202].

2.3 Sehnenheilung

Die Sehnenheilung erfolgt über drei sich überlappende Phasen [147] [231].

Inflammatorische Phase

Während der inflammatorischen Phase dringen Erythrozyten und Entzündungszellen, vor allem neutrophile Granulozyten, in die Defektstelle ein. In den ersten 24 Stunden dominieren Monozyten und Makrophagen. Durch diese wird anfallendes nekrotisches Gewebe phagozytiert. Freigesetzte vasoaktive und chemotaktische Faktoren führen zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität, beginnender Angiogenese, Stimulierung der Tenozytenproliferation und Rekrutierung weiterer Entzündungszellen. Tenozyten wandern in die Wunde ein. Es folgt die Synthese von Kollagen III [202] [231].

Regenerative Phase

Nach wenigen Tagen beginnt die regenerative Phase. Die Kollagen-III-Synthese erreicht über einige Wochen ihr Maximum. Der Wassergehalt und die Glykosaminglykankonzentration sind hoch [202].

Umbauphase

Etwa nach 6 Wochen beginnt die Umbauphase mit verminderter Zellularität und erhöhter Kollagen- und Glykoaminoglykansynthese. Die Umbauphase kann in eine *Konsolidierungsphase* und die *Maturationsphase* unterteilt werden.

Die *Konsolidierungsphase* beginnt etwa in Woche sechs und erstreckt sich über ca. vier Wochen. Das Ausbesserungsgewebe verändert sich von zellulär zu fibrös. Der Metabolismus der Tenozyten verbleibt hoch. Tenozyten und Kollagenfasern werden in die Richtung der Belastung ausgerichtet. Es überwiegt die Synthese von Kollagen I. Nach zehn Wochen beginnt der Übergang in die *Reifungsphase* mit schrittweisem Ersatz von fibrösem Gewebe mit Narbengewebe. Diese Phase setzt sich ca. über ein Jahr fort. In der letzten Hälfte sinkt der Umsatz der Tenozyten und die Vaskularität der Sehne. Das mechanische Belastungsvermögen nimmt im Vergleich zu gesunden Sehnen ab [202] [231].

Viele verschiedene Zelltypen nehmen eine wichtige Rolle beim Heilungsprozess ein. Es wird angenommen, dass die Reparatur verletzter Sehnen von Makrophagen und Fibroblasten bestimmt wird [214].

Makrophagen fördern neben der Phagozytose von nekrotischem Gewebe auch die Fibroblastenproliferation und lenken die Umformung durch Ausschüttung von chemotaktischen Stoffen und Wachstumsfaktoren. Zwei unterschiedliche Phänotypen werden differenziert. Klassisch aktivierte pro-inflammatorische M1 Makrophagen fördern den Abbau der EZM, die Entzündung und Apoptose. Alternativ aktivierte anti-inflammatorische M2 Makrophagen koordinieren das Ablagern der EZM und die Gewebsausbesserung [214].

Die Suppression von M1- oder der M2-Makrophagenfunktion beeinträchtigt stark die Gewebsregeneration. Eine Balance zwischen Entzündung und Regeneration ist für ordnungsgemäße Gewebereparatur wichtig [214]. Ein Problem der Sehnenheilung liegt in der Bildung von Adhäsionen [202].

Zwei überlappende Mechanismen sind grundlegend für die Sehnenheilung: die extrinsische und die intrinsische Heilung. Die extrinsische Heilung beginnt zuerst und impliziert die Invasion von Entzündungszellen aus der Peripherie zum Ort der Verletzung. Diese Zellen synthetisieren die anfängliche Kollagenmatrix und fördern den Heilungsprozess. Das intrinsische Heilen fördert über die Rekrutierung lokaler Stamm- und Vorläuferzellen den Heilungsprozess [241].

2.4 Sehndefektmodelle

Experimentelle in vitro Studien erlauben den Effekt eines isolierten Faktors zu untersuchen. In vitro Experimente können aufgrund der hohen Verfügbarkeit einzelner Zellen zur

Untersuchung gezielter Wirkmechanismen oder einzelner Signalwege herangezogen werden [123]. Im Forschungsgebiet der Sehnenverletzung und –heilung wurden beispielsweise anhand von in vitro Modellen Sehnenzellen von Flexorsehnen kultiviert [148] und auf die Stärke der Flexorsehnenheilung [196] getestet. Die Ergebnisse von in vitro Studien sind Voraussetzungen zur Entwicklung von Hypothesen und Design von in vivo Experimenten [123].

Tiermodelle werden genutzt, um die Physiologie und Krankheit zu verstehen. Sie helfen bei Entwicklung und Beurteilung von Therapiemöglichkeiten [21]. Eine Reihe von patientenbezogenen, chirurgischen und postoperativen Einflüssen sollte bei der Wahl und der Entwicklung von übertragbaren Tiermodellen bezüglich Sehnenreparatur und –heilung beachtet werden. Die zu untersuchenden Variablen umfassen die operative Technik, Komorbiditäten (z. B. Adipositas, Rauchen), Reparaturverstärker (z. B. Transplantate, Zellen, Wachstumsfaktoren) und postoperative Belastung (Rehabilitation). Da das Ziel dieser Studien die Übertragung auf die Patientenversorgung ist, sollte das genutzte Tiermodell die spezifische Sehne und die klinisch relevanten Eigenschaften im größtmöglichen Umfang abdecken [223]. Zur Übertragung der Ergebnisse repräsentieren nicht-menschliche Primaten die ideale Spezies. Ihre Anatomie und Physiologie ähneln denen der Menschen am meisten. Ihre Verwendung ist aus ethischen Gründen eingeschränkt und die Verfügbarkeit sehr limitiert [234]. Große Tiermodelle wie das Pferd [206], Ziegen [142] oder Hunde [13] kommen ebenso in der Forschung zum Einsatz, benötigen aber häufig ein Minimum von zwei Untersuchern, außerdem sind die Kosten signifikant höher als die kleinerer Spezies [234].

Das Verstehen von grundlegenden Mechanismen der Sehnenheilung ermöglicht die Entwicklung von neuen Therapiestrategien. Tiermodelle zur Untersuchung intratendinösen Heilens ohne iatrogene Reparatur sind weit verbreitet. Anhand von Ratten- und Mausmodellen werden Achilles-, Patellar und Flexorsehnenverletzungen erforscht. Die Verletzung wird bspw. durch Transsektion [197], Stanzbiopsie [21] oder Fensterung [36] generiert. Die Auswirkung einer Therapie auf die Heilung von intratendinösen Verletzungen wird anhand von Maus- und Rattenmodellen untersucht. Zum Einsatz kommt die Tenotomie [65] oder Tenektomie [177] der Rotatorenmanschette, Flexor- oder Achillessehne. Das Verheilen von Sehnen an Knochen wird mit Ratten- und Mausmodellen mittels scharfer Transsektion mit folgender Naht an den Knochen erforscht. Durchgeführt wird dies an Rotatorenmanschette [70], Achilles- [68] und Flexorsehne [130] [223].

2.4.1 Maus

Aufgrund ihrer ähnlichen Physiologie zum Menschen ist die Maus ein beliebtes Modell. Darüber hinaus können durch genetische Modifikationen einzelne Fragestellungen

tiefgehend analysiert werden. Außerdem sind die Tiere in einer großen Anzahl verfügbar [21] [22]. Dadurch bieten die Modelle eine hohe genetische Vielfalt und niedrige Kosten. Dies ermöglicht gute Untersuchungsmöglichkeiten der Heilungsprozesse in vivo, der Formation von Adhäsionen [83] [238] und Effekte von biologischer Interventionen [72] [126] [222].

Nachteil ist die Dimension der vorhandenen Sehnen. Dies macht beständige und reproduzierbare Verletzungsmodelle und nachfolgende biomechanische Evaluation schwierig [21]. Um eine Versorgung des herbeigeführten Defektes zu verhindern, muss entweder eine partielle Lazeration oder Ruhigstellung der Sehne gewährleistet werden [126].

Es wird implizit davon ausgegangen, dass die Mechanismen der Tiermodelle übertragbar sind auf menschliche Sehnen und deren Heilung. In welchem Ausmaß ist zum derzeitigen Standpunkt der Forschung noch nicht ganz geklärt [223].

Weitere Forschung ist wichtig, um die Generalisierbarkeit und Übertragbarkeit von grundlegenden wissenschaftlichen Studien betreffend Sehnenforschung in Tiermodellen zu validieren [223].

2.4.2 Ratte

Aufgrund des ähnlichen skelettalen Aufbaus im Vergleich zum Menschen, ist die Ratte das angemessenste Tiermodell bezüglich menschlicher Rotatorenmanschetten-Sehnenpathologien [209]. So wird die Entstehung der Pathologien als auch Heilungsmechanismen anhand von Ratten untersucht. Die Ratte wird zudem zur Untersuchung der Ätiologie der Tendinopathie genutzt mittels Ermüdungsbelastungsmodellen [231]. Allerdings sind die Tierhaltungskosten höher und die genetische Vielfalt niedriger als bei Mäusen.

2.5 Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid 2

Makrophagen werden typischerweise von Komponenten der mikrobiellen Zellwand, bspw. Peptidoglykanfragmenten [17] [211], Lipopolysacchariden (LPS) [160], Lipoteichonsäuren [103] und bakteriellen Lipoproteinen [89] stimuliert [166]. Überraschenderweise können zellwandlose Mykoplasmen sehr effizient Makrophagen aktivieren [129] [166]. Bruchteile, die Lipoproteine von *Mycoplasma fermentans* [108], *Mycoplasma arginini* [86], oder anderen *Mycoplasma*-Spezies [187] enthalten oder damit angereichert wurden, weisen Makrophagen-stimulierende Aktivität (MSA) auf [166]. Diese sind natürlich vorkommende Lipopeptide, die ähnlich zum klassischen *Escherichia coli* mureinen Lipoprotein sind [47].

Das Makrophagen-aktivierende-Lipopeptid 2 (MALP-2) wurde aus einem Klon von *Mycoplasma fermentans* isoliert [166]. Wie das natürliche MALP-2 ist das synthetische Derivat (S-[2,3-bis-palmitoyloxypropyl] cysteinyl-GNNDENISFKEK) ein sehr wirksamer Induktor von Chemokinen und Cytokinen [101] [127] [163]. MALP-2 stimuliert humane Monozyten und murine Makrophagen. Diese schütten Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Prostaglandine aus [163] [164] [166]. Interferon-gamma (IFN- γ)-geprägte murine Makrophagen schütten auch Stickstoffmonoxid (NO) aus [165] [166] [192]. MALP-2 regelt die Major Histocompatibility Komplex (MHC)-II Expression auf Makrophagen runter [66]. Dies resultiert in einer eingeschränkten Antigenpräsentation gegenüber T-Lymphozyten [66]. Außerdem ist MALP-2 ein toll-like Rezeptor (TLR)-2/6 Agonist [127] [217] [218]. TLR wurden als Rezeptoren für Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) wie z.B. LPS, Peptidoglykane und Lipopeptide identifiziert [2] [174]. TLR-2 benötigt TLR-6 als Ko-Rezeptor zur Erkennung von diacylierten Lipopeptiden [218]. Mehr als 10 TLR wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt entdeckt. Sie aktivieren klassische Entzündungswege, wie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade oder den Transkriptionsfaktor NF- κ B [102] [112]. Besonders Monozyten, Makrophagen und Granulozyten werden von TLR stimuliert und produzieren in der Folge reaktive Sauerstoffspezies, Zytokine und ko-stimulierende Moleküle, um Pathogene zu töten und zu beseitigen [2] [79].

Von Bedeutung ist die Rolle von TLR bei Wundheilung und Gewebsregeneration. Dies weist auf einen regenerativen Aspekt des TLR Signalwegs hin. MALP-2 wurde schon erfolgreich zur Förderung von Hautwundheilung bei Mäusen verwendet [48]. Wundheilung erfordert nicht nur die Rekrutierung von Entzündungszellen, sondern auch die Induktion von Angiogenese [77]. MALP-2 zeigt Potential, Angiogenese über TLR-2/6 und die Sekretion von GM-CSF zu induzieren [77] [104] [117]. Dies stellt einen endogenen Mechanismus zur Wiederherstellung von Kapillaren und Rekrutierung von Entzündungszellen in infiziertem Gewebe dar [77]. Nach Gefäßverletzung fördert MALP-2 Re-Endothelialisierung und hemmt die Bildung der Neointima [79]. Diese regenerativen Eigenschaften werden einer autokrinen und parakrinen Stimulation von Angiogenese sowie der kurzweiligen Attraktion von Entzündungszellen zugeschrieben [77] [80] [169].

Deiters et al. beschrieben den Einfluss von MALP-2 auf die Wundheilung nach Applikation auf die Wunde [48]. MALP-2 stimuliert zunächst Fibroblasten und einige Makrophagen der Haut. Diese setzen Chemokine wie z.B. MCP-1 frei. MCP-1 und andere chemotaktisch aktive Mediatoren verursachen eine erhöhte lokale Infiltration von zunächst neutrophilen Granulozyten und später von Monozyten und Makrophagen. Diese Makrophagen und vermutlich andere noch nicht-identifizierte Zellen werden dann von einer kleinen Menge von sich in der Wunde befindlichem MALP-2 stimuliert. Verschiedene Wachstumsfaktoren führen neben anderen Effekten zur Neovaskularisation. Ein Überschuss von MALP-2 wird von

infiltrierenden Leukozyten degradiert. Ist einmal der Prozess in Gang gesetzt, resultiert die inflammatorische Phase in der Wundschließung [48].

Die beschriebenen Eigenschaften lassen das Lipopeptid MALP-2 als sehr interessant im Hinblick auf die Regeneration und Heilung von Sehnenverletzungen erscheinen. Es könnte eine vielversprechende Möglichkeit zur beschleunigten Heilung in den nur langsam heilenden Sehnen darstellen.

2.6 PCNA

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ist ein 36 kDa großes Protein, welches im Nukleus lokalisiert ist [74] [157] [186] [219]. Das Protein wurde in Nuklei von Hefen, Pflanzen und tierischen Zellen, welche Zellteilung betreiben, nachgewiesen [186] [213] [219]. PCNA bildet eine 90 kDa große toroidale, ringförmige Struktur aus drei symmetrisch verbundenen, identischen Monomeren [19] [45] [111]. Dieser Ring umgibt die Desoxyribonukleinsäure (DNA) und fungiert als Plattform, an der Polymerasen und andere Proteine andocken können, um verschiedenen DNA Stoffwechselwege durchzuführen [45] [76]. PCNA interagiert mit multiplen Partnern. Diese Partner sind involviert in verschiedenen Stoffwechselwegen, einschließlich Okazaki Fragment Prozession [14], DNA Reparatur [250], Transläsions-DNA-Synthese [93] [138], DNA-Methylierung [42] [120], Chromatinumbau [204] [256] und Zellzyklusregulation [139] [244] [253].

Das Protein fungiert als Untereinheit der DNA-Polymerasen d und e , welche beide mit der DNA Reparatur [137] [170], einschließlich Nucleotid-Exzisionsreparatur (NER) [168] [205], Basen-Exzisionsreparatur (BER) [251] [255], mismatch- [255] und post-Replikations-Reparatur [42] in Verbindung gebracht werden.

PCNA Expression kann als Marker der Zellexpression genutzt werden, da Zellen bei der Proliferation länger in der G1/S-Phase verbleiben [46] [139].

2.7 Cyclin D

Cyclin D1, D2 und D3 werden als essentielle Verbindungen des Zellzyklus zwischen zellulärer Umgebung und des Kerns bei Säugetieren betrachtet [43] [109] [203] [243]. D-Cycline binden und aktivieren Cyclin-abhängige Kinasen (CDK4, CDK6), um das Retinoblastom-Protein(pRB) zu phosphorylieren [18] [151] [152] [155]. Die Phosphorylierung des Tumorsuppressors pRb resultiert in der Freisetzung des Faktors E2F [15] [16]. E2F ist erforderlich zum Eintritt in die S-Phase [54] [71] [180].

Der Übergang von G1 zur S-Phase ist der wichtigste Schritt für die Fortführung des Zellzyklus. Dieser Schritt wird von Cyclin D/CDK4 und Cyclin D/CDK 6 in der Mitte der G1-Phase, sowie Cyclin E/CDK2 in der späten G1-Phase, kontrolliert [71]. Die Konzentration von D-Cyclinen wird weitestgehend von der extrazellulären Umgebung kontrolliert, die Cycline fungieren als Sensoren. Die D-Cycline werden von Mitogenen induziert. Die Konzentration sinkt, wenn Mitogene entfernt werden oder antimitogene Substanzen hinzugefügt werden [43] [150].

2.8 Caspase 3

Caspase 3 (CPP32/Casp3) ist ein Mitglied der wachsenden Familie der Cysteinproteasen, welche auch das interleukin-1 β -converting enzyme (ICE) beinhaltet [61] [113]. CPP32 ist eine 32 kDa große prototypische Caspase, welche während der Apoptose aktiviert wird und neben weiteren Faktoren für diese in Zellen der Säugetiere verantwortlich ist [61] [144] [240]. Die Aktivierung kann von ICE-ähnlichen Proteasen als auch dem Granzym B zytotoxischer T-Zellen initiiert werden [113] [210]. Aktiviert katalysiert CPP32 die spezifische Spaltung vieler zellulärer Schlüsselproteine des programmierten Zelltodes [113] [183]. CCP32 wurde als die verantwortliche Protease zur Spaltung von poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) während der Induktion der Apoptose identifiziert [198].

2.9 Hämoxigenase-1

In Säugetierzellen wurden bis dato drei genetisch verschiedene Isoenzyme der Hämoxigenase identifiziert. Hämoxigenase-1 (HO-1) ist eine induzierbare Form, HO-2 und HO-3 werden kontinuierlich exprimiert [135] [140] [141] [153]. HO-1 ist ein zelluläres Protein, welches lebenswichtige metabolische Funktionen erfüllt. So fungiert es als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym in der Degradation von zytotoxischem Häm zu Eisen und den Antioxidantien Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin (BR) [220]. HO-1 könnte einer der wichtigsten Faktoren bei der Anpassung der Zelle an oxidativen Stress sein, sowie bei der Regulation von Entzündungsprozessen, indem es biologisch aktive Endprodukte produziert [1] [41] [119] [128]. Bei Stress und Verletzungen der meisten Zelltypen und Gewebe wird HO-1 stark überexprimiert und hochreguliert. Diese Adaptation schützt die Zelle, indem es die physiologische Homöostase wiederherstellt [136] [184] [185] [194] [229].

2.10 NF-κB

Die große nuclear factor-κB (NF-κB) Familie spielt eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der angeborenen sowie adaptiven Immunantwort. Zur Familie dieser Transkriptionsfaktoren gehören u. a. Transkriptionsfaktor p65, NF-κB1 (p50; p105), NF-κB2 (p52; p100), c-Rel und RelB1,2 [121]. Das Protein ist ein Dimer aus zwei ähnlichen oder heterologen Untereinheiten. Es wird überwiegend inaktiv im Cytoplasma in Form von Komplexen mit Molekülen aus der Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells (IκB)-Familie vorgefunden. Die Aktivität von NF-κB ist eng reguliert durch die Interaktion mit den IκB Proteinen [75] [221] [228]. Der typische Signalweg wird ausgelöst von TLRs und pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNFα und IL-1. Dies führt zur Aktivierung von RelA, welches die Expression von pro-inflammatorischen und zellerhaltenden Genen reguliert [118].

Der alternative Signalweg wird durch Tumornekrosefaktor c, CD40L, B cell activating factor (BAFF) und Recepto Activator of NF-κB Ligand (RANKL), durch TNFα aber nicht aktiviert. Er resultiert in der Aktivierung von RelB/p52 Komplexen. Dieser Signalweg reguliert erforderliche Gene für Lymphorgangenese und B-Zell-Aktivierung [118]. Der NF-κB Signalweg steigert das Überleben der Zelle und unterbindet die Apoptose [149]. Die Aktivierung von NF-κB spielt eine große Rolle bei entzündlichen Krankheiten [73] [118].

2.11 COX-2

Cyclooxygenasen (COX) katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Bildung von Prostaglandinen und Thromboxan A₂ aus Arachidonsäure über Prostaglandin H₂ [115] [122] [207].

IL-1α, IL-1β, TNFα, und LPS induzieren die COX-2 Genexpression und somit folglich die Produktion von Prostaglandinen [162].

Im Grundzustand ist COX-2 nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorhanden [226]. Das Enzym wird bei Entzündung schnell von einer Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Liganden von G-Protein gekoppelten Rezeptoren aktiviert [226]. Die Induktion von COX-2 kann zu einer erhöhten Produktion von Mediatoren führen, welche eine Entzündung verstärken [94]

2.12 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit wird der Einfluss von MALP-2 auf Heilungsprozesse, Gangbild und Biomechanik bei partieller Tenotomie im Mausmodell untersucht.

An Methoden wurden zur Untersuchung eingesetzt: molekularbiologischer Proteinnachweis durch Western Blotting, Gangbildanalyse mittels CatWalk (Noldus, Wageningen, Niederlande), biomechanischer Testung und tierexperimenteller Untersuchung nach einem etablierten Tiermodell.

2.13 Fragestellung

Kann ein positiver Effekt durch Behandlung mit MALP-2 nach partieller Tenotomie auf die biomechanische Belastungsfähigkeit sowie statischen und dynamischen Bewegungsparameter beobachtet werden? Welche möglichen Signalwegmoleküle könnten dabei eine Rolle spielen? Anhand Interventions- und Kontroll-Gruppen wird dies in einer tierexperimentellen Studie analysiert um somit Rückschlüsse auf den Heilungsverlauf zu ziehen.

Die Nullhypothese lautet:

„Die Heilung einer partiellen Tenotomie in der Flexor-Digitorum-Longus Sehne der Maus zeigt nach Applikation von MALP-2 (Verum) keinen Unterschied der Sehnenheilung“.

Der Heilungsverlauf des Defektes wurde nach 1, 3, 7, 14 und 36 Tagen nach partieller Tenotomie hinsichtlich Veränderungen im Gangbild der lebenden Maus überprüft. Nach 7 und 36 Tagen erfolgte die Untersuchung der Heilung mit einer biomechanischen Methode an der postmortalen Sehne. Die molekularbiologische Untersuchung der in MALP-2 inkubierten nicht tenotomierten Sehnen mittels Western Blot diente dem Nachweis bestimmter Proteine wie z.B. Entzündungs- oder Apoptosemarker.

3. Material und Methoden

3.1 Intervention

3.1.1 Versuchsprotokoll

Nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes wurde der Tierversuch am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes realisiert.

Als zuständige Behörde erlaubte das Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz (Konrad-Zuse- Straße 11, 66115 Saarbrücken) das Projekt unter dem AZ 22/2016.

80 Mäuse wurden für die Durchführung des Versuches verwendet. Davon wurden 32 Tiere nach partieller Tenotomie mit MALP-2, welches in einer Vektorsubstanz gelöst wurde, behandelt. Als Kontroll-Gruppe erhielten 32 weitere Tiere auf den Defekt nur den Vektor. Die Sham-Gruppe bestand aus 4 Versuchstieren, bei denen lediglich ein oberflächlicher Hautschnitt durchgeführt wurde.

Die biomechanische Analyse der Sehnen erfolgte an Tag 7 und Tag 36 nach partieller Tenotomie.

Das Gangbild der Versuchstiere wurde in regelmäßigen Abständen von Tag 1 präoperativ, Tag 1, 3, 7, 14 und 36 postoperativ mittels CatWalk untersucht und analysiert.

Zur Gewöhnung an den CatWalk liefen die Versuchstiere ab Tag 2 präoperativ im Gerät.

Eine molekularbiologische Untersuchung mittels Western Blot erfolgte an unbehandelten Sehnen.

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Standzeit CatWalk			
7 Tage	n=16	n=16	
36 Tage	n=16	n=16	n=4

Tab. 1 zeigt das Versuchsprotokoll der Gangbildanalyse, inklusive der Tiere, deren Sehnen für die biomechanische Testung verwendet wurden.

	MALP-2	Kontrolle
Standzeit Biomechanik		
7 Tage	n=7	n=7
36 Tage	n=7	n=7

Tab. 2 zeigt das Versuchsprotokoll der biomechanischen Testung.

	MALP-2	Kontrolle
Western Blot	n=6	n=6

Tab. 3 zeigt das Versuchsprotokoll des Western Blots.

3.1.2 Tiermodell

Mit einem Körpergewicht von 21-37g dienten C57BL/6 Mäuse als Versuchstiere.

Die Tiere wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg, gehalten. In Käfigen bis zu maximal 8 Mäusen wurden die Versuchstiere bei klimatisierten Raum-Bedingungen (Lufttemperatur: 22 - 24 °C, relative Luftfeuchtigkeit: 60 %) mit einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Wasser sowie Standarddiätfutter der Firma Altromin (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) in Pelletform ad libitum wurde für die Tiere in den Käfigen bereitgestellt.

3.1.3 Zusammensetzung der Lösung der Kontroll- und MALP-2-Gruppe

Es wurden 0,5µg MALP-2 (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland)/Tier lokal appliziert. Dazu wurden 5µg MALP-2 in 5µl 30% Isopropanol ad 50µl NaCl (davon 5µl/Tier = 0,5µg/Tier) gelöst. Die Kontroll-Gruppe erhielt nur Lösungsmittel, welches sich aus 5µl 30% Isopropanol ad 50µl NaCl zusammensetzte.

3.1.4 Protokoll CatWalk XT 10

Das Gangbild der Versuchstiere wurde in regelmäßigen Abständen von Tag (-)1 präoperativ, Tag 1, 3, 7, 14 und 36 postoperativ mittels CatWalk (Noldus, Wageningen, Niederlanden) untersucht und analysiert.

Zur Gewöhnung an den CatWalk XT 10 liefen die Versuchstiere ab Tag 2 präoperativ im Gerät.

Präoperativ	OP	Postoperativ
Tag -1		Tag 1
		Tag 3
		Tag 7
		Tag 14
		Tag 36

Tab. 4 zeigt das zeitliche Schema des Versuchsablaufes.

3.1.5 Operation

Die Operationen wurden im Tieroperationssaal des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg, durchgeführt. Die partielle Tenotomie mittels definierter Kanüle (22 Gauge) ermöglichte die Standardisierung der Defektgröße.

Dadurch wurde das Nähen des Defektes unnötig, somit konnten insuffiziente Nahttechnik oder Fadenmaterial als störende Faktoren ausgeschlossen werden.

Die Narkose wurde durch die intraperitoneale Gabe von 2% Xylazin (2mg/kg Körpergewicht, Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und Ketamin (75mg/kg Körpergewicht, Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) erwirkt. Die postoperative Schmerztherapie bestand am Operationstag sowie über die folgenden 5 postoperativen Tage aus Tramadol (1mg/ml im Trinkwasser, Tramal®, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland). Über das Trinkwasser hatten die Versuchstiere einen dauerhaften Zugang zu dem schmerzstillenden Mittel.

Voraussetzung für den Beginn der OP war der vollständig erloschene Zwischenzehenreflex. War dieser positiv, wurde das linke Unterbein des Versuchstieres mit asid®-med Enthaarungscreme (ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) vollständig enthaart. Im Verlauf folgte eine 3-fache Hautdesinfektion mit Softasept® (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

3.1.6 Applikation MALP-2/Vektor

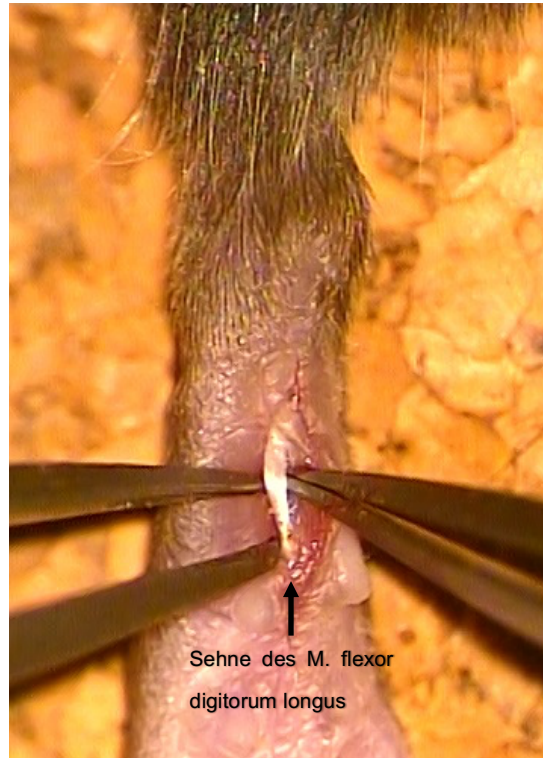
Die Operation erfolgte in Bauchlage der Maus. Der linke Hinterlauf wurde mit Leukosilk® (BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) zur Stabilisierung des OP-Gebiets an der Unterlage fixiert. Daraufhin erfolgte der Hautschnitt medial im Verlauf des Unterschenkels (Abb. 2). Die Sehne des M. flexor digitorum longus wurde vorsichtig stumpf freipräpariert (Abb. 3) und daraufhin mit der Pinzette dargestellt bzw. auf ihr aufgespannt (Abb. 4). Die partielle Tenotomie erfolgte durch Punktion der Sehne (Abb. 5 und Abb. 6) mit einer Kanüle (22 G, Sterican®, B. Braun Melsungen AG). Punktionsort stellte das distale Drittel der Sehne im Bereich des Unterschenkels dar.

Nach der partiellen Tenotomie folgte das Aufbringen des MALP-2 gelöst in der Trägersubstanz (Interventionsgruppe) bzw. der Trägersubstanz (Kontroll-Gruppe). Mithilfe einer 20 µl Pipette wurden 5µl auf die Sehne im Bereich des Defektes aufgetragen (Abb. 7).

Der kutane Verschluss erfolgte nach einer 10-minütigen Einwirkzeit der Lösung. Dafür wurde Prolene 5-0 Nahtmaterial (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Je nach Größe des Hautschnittes wurden eine Einzelknopfnah oder zwei Einzelknopfnähte gemacht (Abb. 8).



Abb. 2 zeigt das Operationsgebiet nach dem oberflächlichen Hautschnitt.



Sehne des M. flexor digitorum longus

Abb. 3 zeigt das stumpfe Freipräparieren der Sehne des M. flexor digitorum longus mithilfe zweier Pinzetten.

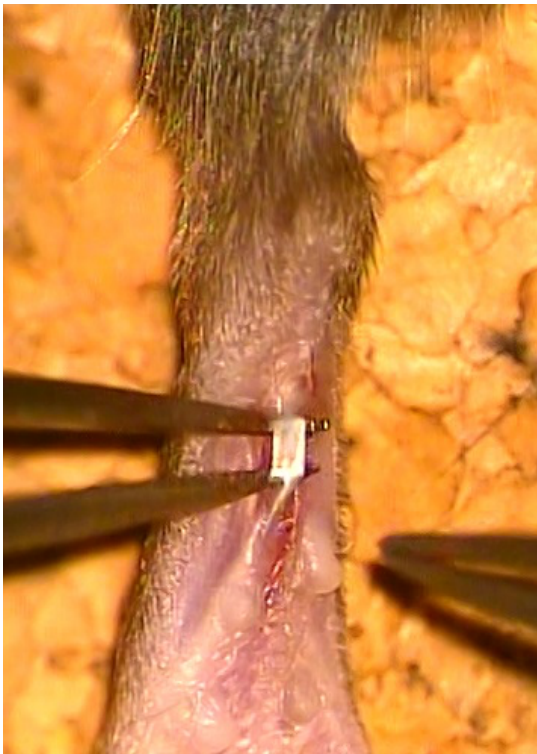
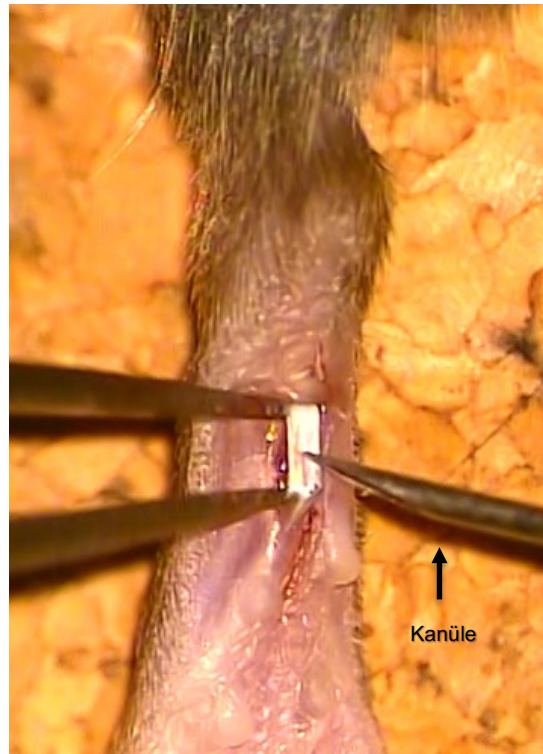


Abb. 4 zeigt das Aufspannen der Sehne des M. flexor digitorum longus auf einer Pinzette nach erfolgter Darstellung.



Kanüle

Abb. 5 zeigt das Aufsuchen des Punktionsortes im distalen Drittel der Sehne am Unterschenkel.

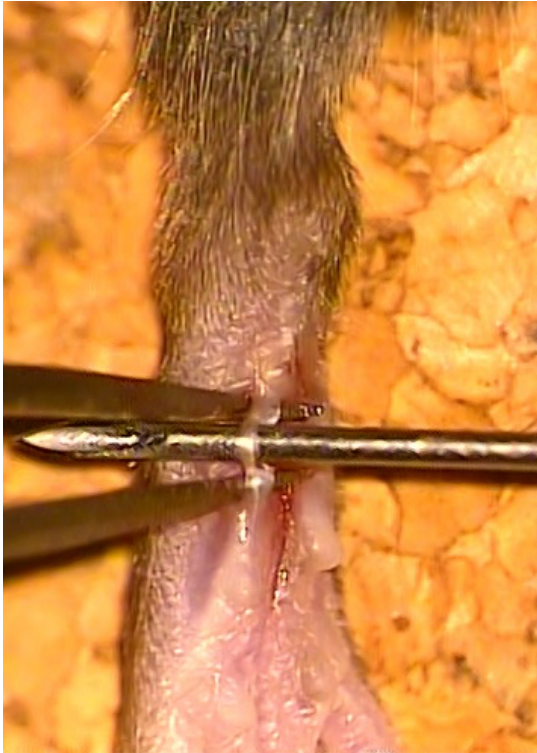


Abb. 6 zeigt die Punktion der Sehne mittels 16 G Kanüle.



Abb. 7 zeigt die Applikation von 5 μ l des in der Trägersubstanz gelösten MALP-2 (Interventionsgruppe) bzw. der Trägersubstanz (Kontroll-Gruppe) mithilfe einer 20 μ l Pipette.



Abb. 8 zeigt das Operationsgebiet nach kutanem Verschluss durch zwei Einzelknopfnähte.

3.1.7 Tötung der Tiere

Die Tiere wurden am Ende der jeweiligen Standzeit nach intraperitonealer Narkose mittels Genickbruch euthanasiert, um die anschließenden Analysen hinsichtlich Biomechanik und Western Blot durchzuführen.

3.1.8 Explantation der Sehne

Zur Explantation der FDL-Sehne wurde die Haut im zuvor genutzten Zugangsgebiet eröffnet. Die Sehne wurde anhand einer Pinzette im Verlauf von Fuß, Unterschenkel und Oberschenkel stumpf freipräpariert und daraufhin möglichst weit distal und proximal mit einem Skalpell aus der Einheit gelöst.

Für die biomechanische Testung wurde die frisch explantierte Sehne sofort verwendet und bis zur Testung mit NaCl 0,9% feucht gehalten.

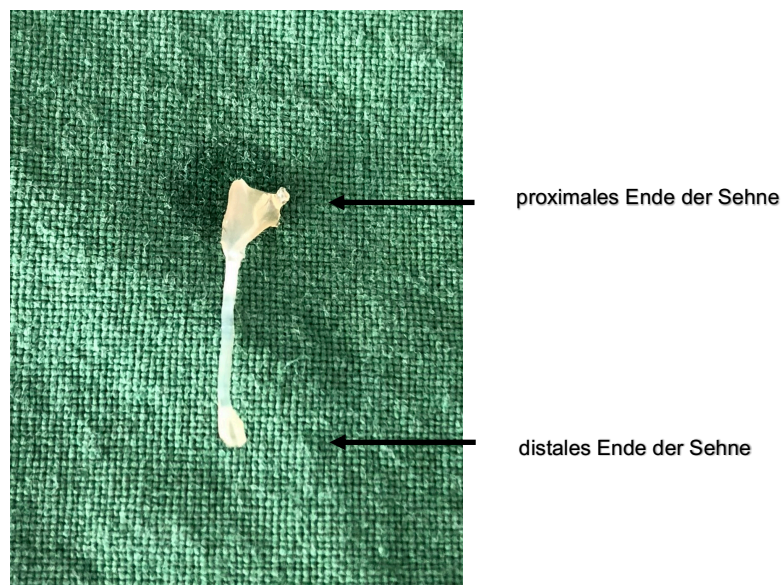


Abb. 9 zeigt eine explantierte FDL-Sehne.

3.2 Zielkriterien und Auswertung

3.2.1 CatWalk TM

Anhand des CatWalk (Noldus, Wageningen, Niederlanden) wurde die Ganganalyse entsprechend der Herstellerempfehlungen und im Vergleich zu anderen Studien ausgeführt. Das Gerät und das dazugehörige technische Equipment wurden in einem ruhigen und abdunkelbaren Raum aufgebaut.

Zentral befindet sich eine Glasplatte, mit einem seitlich begrenzten Gang. Dieser Gang gibt den Gangweg des Versuchstieres vor.

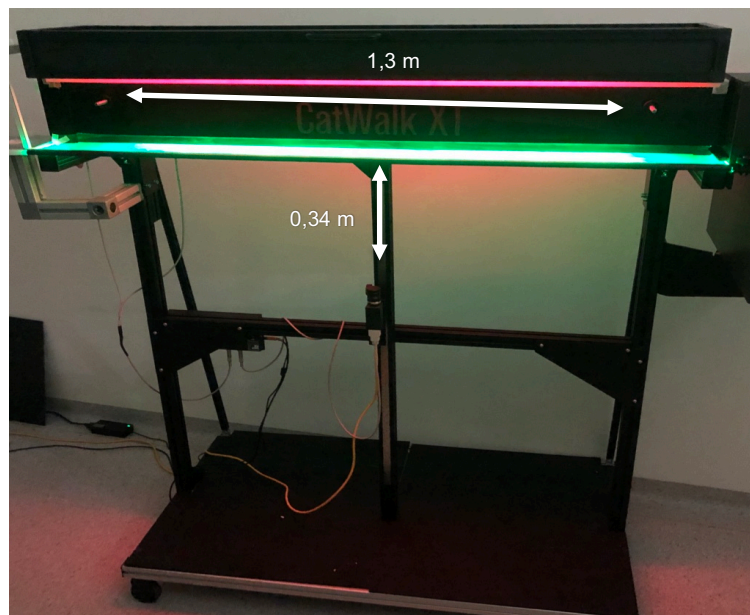


Abb. 10 zeigt den Gehweg und den Korridor des CatWalk-Systems.

Während die Maus über den CatWalk läuft, tritt grünes Licht in die Glasplatte ein und wird komplett im Inneren der Glasplatte reflektiert. Das Licht kann nur an den Stellen entweichen, an denen die Pfote des Tieres in Kontakt mit der Glasplatte steht. Durch den Pfotenabdruck des Tieres wird das Licht also gestreut. Dieser Effekt wird von einer Hochgeschwindigkeitsvideokamera unter der Glasplatte aufgenommen. Die Kamera transformiert jede aufgenommene Szene in digitale Bilder. Diese Bilder werden von der Software am Computer automatisch analysiert.



Abb. 11 zeigt einen durch die Kamera aufgenommenen und mit Software bearbeiteten Ausschnitt eines Videos eines Laufes einer Maus. Die jeweiligen Pfoten sind zugeordnet. LF= Left Front/Linker Vorderlauf, LH = Left Hind/Linker Hinterlauf, RF=Right Front/Rechter Vorderlauf, RH= Right Hind/Rechter Hinterlauf.

Zahlreiche Parameter wurden für die qualitative und quantitative Analyse des individuellen Schrittes und Ganges berechnet. Darunter beispielsweise Merkmale individueller Fußabdrücke (z. B. Fläche des Abdruckes), Distanzen zwischen den Fußabdrücken und zeitliche Beziehungen zwischen den Fußabdrücken.

Das System ordnete eigenständig die Pfoten zu, welches durch den Untersucher kontrolliert und ggf. ausgebessert wurde.

Die Tiere bewegten sich frei von der einen zur anderen Seite ohne Lockmittel. Somit konnte ein möglichst natürlicher Gang der Mäuse analysiert werden.

Nach vorhergegangenen Messungen und Überlegungen wurden die Einstellungen der Kamera kalibriert (Camera gain (dB): 13,80; Green Intensity Treshold: 0,2; Red Ceiling Light (V): 17,7; Green Walkway Light (V):16,5)

Für einen zur Analyse zulässigen Lauf mussten folgende Kriterien erfüllt sein: Durchlaufzeit von 0,5-5 Sekunden und maximale Geschwindigkeitsveränderung von 60%. Läufe, die diesen Kriterien nicht entsprachen, wurden nicht gewertet. Aus fünf gültigen Läufen einer Messung von einer Maus sind die im Experiment verwendeten Gangparameter bezogen worden.

Erhobene Gangparameter:

Parameter	Definition
Run Duration (s)	Länge des Laufes in (s)
Stand (s)	Dauer in (s) des Kontakts der Pfote mit der Glasplatte
Swing (s)	Dauer in (s), in der kein Kontakt der Pfote mit der Glasplatte besteht
Step Cycle (s)	Die Zeit in (s) zwischen zwei aufeinanderfolgenden Anfangskontakten einer Pfote Step Cycle = Stand + Swing
Duty Cycle (%)	Stand ausgedrückt in Prozent des Step Cycles Duty Cycle = Stand/(Stand + Swing) x 100% Duty Cycle = Stand/Step Cycle x 100%
Stride Length (%)	Die Distanz in (cm) zwischen aufeinanderfolgenden Platzierungen derselben Pfote
Max Contact Area (%)	Die maximale Fläche einer Pfote, welche Kontakt mit der Glasplatte hat
Print Area (%)	Die Fläche des gesamten Pfotenabdruckes. Die Print Area ist nach Definition mindestens genauso groß wie die Max Contact Area
Max Contact Max Intensity	Die maximale Intensität bei maximalem Kontakt einer Pfote. Die Intensität reicht von 0 bis 255. Die Intensität ist ein Maß für das Gewicht, welches auf die Platte aufgetragen wird

Max Contact Mean Intensity	Mittlere Intensität einer Pfote bei maximalem Kontakt. Die Intensität reicht von 0 bis 255
Regularity Index (%)	Die Anzahl normaler Schrittmuster relativ zur totalen Anzahl platzierten Pfoten

Tab. 5 zeigt die Übersicht und Beschreibung der in der Studie erhobenen Gangparameter.

3.2.2 Biomechanik

An Tag 7 oder 36 erfolgte die biomechanische Untersuchung. Nach Ausbau der Sehne erfolgte diese unmittelbar. Die Sehnen wurden während des Einspannens mit NaCl 0,9% feucht gehalten. Es erfolgte jeweils der direkte Vergleich der tenotomierten Sehne zu der kontralateralen gesunden Sehne.

Jede Sehne (rechts und links) wurde einem kontinuierlichen axialen Zugversuch unterzogen. Als Zugprüfmaschine diente eine Materialtestungsmaschine (Zwicki BZ 2.5/TS1S®, Zwick GmbH & Co, KG, Ulm/Deutschland). Die Maschine besteht aus einem Lastrahmen, an welchem eine motorbetriebene Spindel in vertikaler Ausrichtung nach oben oder unten (manuell/programmiert) gefahren werden kann. An dieser Spindel angeschlossen findet sich eine, somit bewegliche, Anschlussbuchse (Eigenbau), an der über einen Metallbolzen Sehnenklemme 1 montiert werden konnte. Eine zweite, unbewegliche Anschlussbuchse, ist am unteren Ende der Spindel platziert, an der die Sehnenklemme 2 sicher befestigt werden konnte. Zudem ist an diese untere Anschlussbuchse ein Kraftaufnehmer angeschlossen, welcher in einem Messbereich bis zu 3kN, die entstandenen Kräfte misst. Über eine im Programm definierte Zugkraft maß dieser Kraftaufnehmer die maximale Kraft, welche auf die Sehne ausgeübt werden konnte, bis sie zerriss.

Der distale sowie der proximale Teil der Sehnen wurden jeweils in eine Klemme eingespannt. Die Maschine hat mit kontinuierlicher Kraft oben und unten gleichzeitig an der Sehne bis zum Versagen bzw. Zerreißen gezogen.

Die Zeit zwischen Sehnenentnahme und Messung wurde so gering wie möglich gehalten. Zudem wurde einer Austrocknung der Sehnen durch die Befeuchtung mit NaCl Spüllösung entgegengewirkt, um eine mögliche Verfälschung der Werte zu verhindern. Die Versuche fanden bei Raumtemperatur statt.

Anhand der zuvor erstellten Prüfvorschrift erfolgte der Messvorgang jeder Sehne gleich und standardisiert. In entspannter, nicht gedehnter Ausgangsstellung wurde das Präparat zwischen den unten abgebildeten Klemmen befestigt. Es wurde darauf geachtet, dass die Punktionsstelle frei dazwischen liegt. Daraufhin wurde in dieser Stellung die Kraft „genullt“. Die

beim Einspannen der Sehne entstandenen Kräfte wurden mit einer Vorkraft von 2N/mm und einer Vorkraftgeschwindigkeit von 10mm/min kompensiert. Mit einer Prüfgeschwindigkeit von 50mm/min wurde das Präparat bis zum Versagen gedehnt. Die verwendete Prüfgeschwindigkeit wurde so gewählt, dass sie ca. der Dehnungsgeschwindigkeit der Sehne während des Heilungsprozesses entspricht, und z. B. nicht der beim akuten Trauma. Die ermittelten Werte des Zugversuches wurden mittels testXpert® -Software an dem an die Materialtestungsmaschine angeschlossenen Computer ausgewertet. Mithilfe dieser Software wurde auch die genutzte Prüfvorschrift erstellt. Das resultierende Kraft-Weg-Diagramm wurde aufgezeichnet. Das Programm berechnete die Steifigkeit N/mm, indem die Kraft (N) durch die Wegdifferenz zwischen Anfang und Ende des Versuches dividiert wurde.

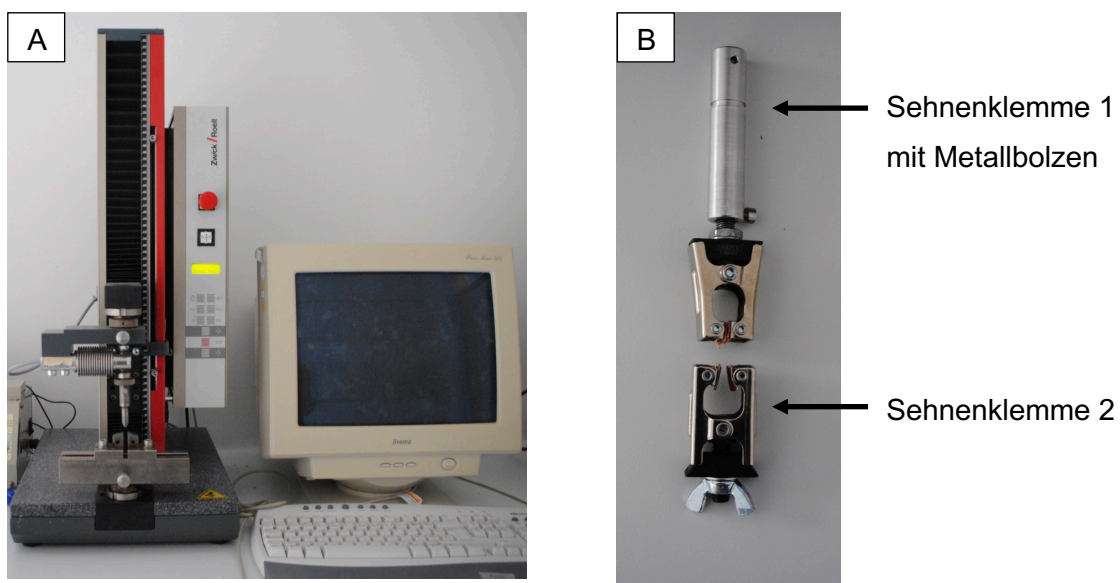


Abb. 12 zeigt **A** die Zwicki BZ 2.5/TS1S®, Zwick GmbH & Co, KG, Ulm/Deutschland und **B** die für das biomechanische Experiment genutzten Sehnenklemmen 1 und 2.

3.2.3 Western Blot

Parallel zur zuvor beschriebenen Testreihe wurden 24 unbehandelte Sehnen unter sterilen Bedingungen von 12 Mäusen entnommen. Aus den entnommenen Sehnen erfolgte die quantitative Ermittlung bestimmter Proteinexpression in mit MALP-2 behandelter Sehnen (Interventionsgruppe) bzw. mit Trägersubstanz behandelter Sehnen (Kontroll-Gruppe).

Die gesunden Sehnen wurden über 24 Stunden mit einer MALP-2 Konzentration von 0,5µg/mL bzw. der adäquaten Menge an Trägersubstanz inkubiert. Dies erfolgte in 24 Mikrotiterplatten bei 37°C/5%CO₂. Zur Proteinextraktion wurden die Sehnen in Lysis-Puffer gegeben, daraufhin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Dem Lysis-Puffer wurden

Proteaseinhibitoren (0,5mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1:100 v/v Protease Inhibitor Cocktail, 1:100 v/v Phosphatase Inhibitor Cocktail 2; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zugesetzt und durch mechanische Homogenisierung ein Gesamtzell-Extrakt gewonnen. Die quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte colorimetrisch mit der Lowry Methode. Die Western Blot Analysen wurden als SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-Page) durchgeführt. 5µg Protein pro Tasche wurden im Gel aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluoridmembran transferiert. Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland).

1. Proliferationsmarker: proliferating cell nuclear antigen (PCNA, 1:1000, Aligent, Hamburg, Deutschland) und Cyclin D (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland),
2. Apoptosemarker: cleaved Caspase 3 (Casp3, 1:300, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland),
3. Stressmarker: Hämoxigenase-1 (HO-1, 1:300, Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland),
4. Nuclear factor-κB p65 (NFκB p65, 1:100, Santa Cruz Biotechnology) und COX-2 (COX-2, 1:100, Abcam, Cambridge, Großbritannien)

Entsprechende Meerrettich-Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper (1:1500, Aligent oder 1:1000; R&D Systems) wurden bei Raumtemperatur für 1,5h hinzugegeben.

Die Proteinexpressionsstärke wurde mittels Chemilumineszenzreaktion visuell sichtbar gemacht. Die Analyse erfolgte anhand eines ECL ChemoCam Imager (Chemostar and LabImage 1D software; Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland). Als interner Standard diente der monoklonale β-Actin-Antikörper Klon AC-15 (1:5000, Sigma-Aldrich). In den erfolgten Western-Blot-Analysen wurde die Pixelintensität auf gleiche β-Actin-Konzentrationen korrekturgerechnet.

3.3 Statistik

Alle statistischen Daten sind als Mittelwerte mit ± Standardfehler angegeben worden. Zum Vergleich der Versuchsgruppen, Interventionsgruppe versus (vs.) Kontroll-Gruppe, wurde ein einseitiger repeated measure ANOVA-Test angewendet, welcher den Alpha-Fehler für Mehrfachvergleiche ausgleicht. Innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe (Interventionsgruppe, Kontroll-Gruppe oder Sham-Gruppe) wurde als weiterer Test der t-Test zweier unabhängiger Gruppen verwendet. Die gesamte Statistik wurde mittels SigmaPlot 13.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) erstellt. Der p-Wert wurde auf $p < 0,05$ festgelegt, um signifikante Unterschiede anzuzeigen.

4. Ergebnisse

4.1 Postoperativer Verlauf

Der postoperative Verlauf gestaltete sich ohne relevante Zwischenfälle. Es zeigte sich keine postoperative Infektion des Operationsgebietes. Die postoperative Gewichtsentwicklung zum Monitoring des Gesundheitsstatus der Mäuse wies geringfügige Unterschiede auf, ohne eine langfristige Gewichtabnahme im Zeitverlauf (Abb. 13).

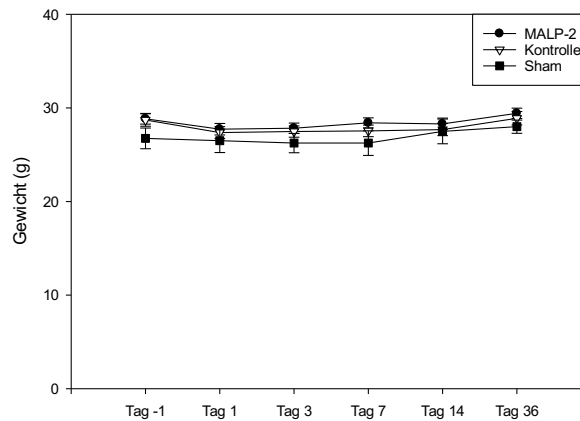


Abb. 13 zeigt den Verlauf des Parameters **Gewicht (g)** innerhalb der MALP-2-, Kontroll- und Sham-Gruppe über 36 Tage

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	28,844 ± 0,572	28,712 ± 0,667	26,75 ± 1,109
Tag 1	27,731 ± 0,613	27,369 ± 0,638	26,5 ± 1,258
Tag 3	27,873 ± 0,55	27,481 ± 0,608	26,25 ± 1,031
Tag 7	28,413 ± 0,527	27,55 ± 0,623	25,25 ± 1,315
Tag 14	28,3 ± 0,615	27,694 ± 0,653	27,5 ± 1,323
Tag 36	29,425 ± 0,556	28,9 ± 0,72	28 ± 0,707

Tab. 6 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des Parameters **Gewicht (g)**.

4.2 Makroskopie

Nach Eröffnung des ehemaligen Operationsgebietes des linken Hinterlaufes der Maus zeigte sich eine deutliche Narben- und Adhäsionsbildung. Weder nach 7 noch nach 36 Tagen konnte die Einstichstelle der Kanüle makroskopisch eindeutig erfasst werden. Die Sehne schien komplett durchgängig ohne Defekt.

4.3 CatWalk Analyse

Run Duration (s)

Innerhalb der MALP-2-Gruppe zeigten sich im Vergleich zu Tag -1 die Werte von Tag 3 ($p < 0,001$), Tag 7 ($p < 0,05$), Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,001$) signifikant reduziert. Nicht signifikant unterschieden sich die Werte von Tag 1 zu Tag -1.

Im zeitlichen Verlauf der Kontroll-Gruppe waren die Werte von Tag 3 ($p < 0,05$), Tag 7 ($p < 0,05$), Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,05$) signifikant zu Tag -1 niedriger. An Tag 1 waren die Werte nicht signifikant verändert zu Tag -1.

Innerhalb der Sham-Gruppe zeigte sich beim Parameter Run Duration (s) kein signifikanter Unterschied der Werte im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von 36 Tagen.

Beim Vergleich der Werte des linken Hinterlaufes zwischen MALP-2- und Kontroll-Gruppe war an Tag 1 der Wert der MALP-2-Gruppe signifikant reduziert ($p < 0,05$), hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Werte an Tag -1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 36.

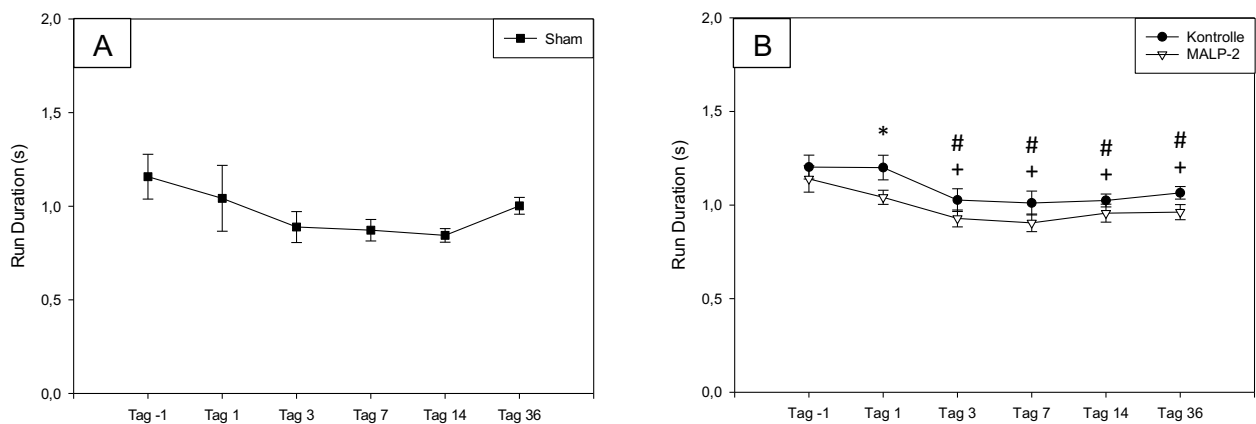


Abb. 14 zeigt den Verlauf des Parameters **Run Duration (s)** über 36 Tage in **A** der Sham-Gruppe und **B** in MALP-2- und Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 Sham/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	1,14 \pm 0,0708	1,203 \pm 0,0638	1,158 \pm 0,12
Tag 1	1,042 \pm 0,0378	1,201 \pm 0,0659	1,042 \pm 0,176
Tag 3	0,929 \pm 0,0454	1,027 \pm 0,0606	0,889 \pm 0,0828
Tag 7	0,905 \pm 0,0474	1,011 \pm 0,0639	0,872 \pm 0,0576
Tag 14	0,957 \pm 0,048	1,025 \pm 0,0343	0,844 \pm 0,0364
Tag 36	0,963 \pm 0,403	1,066 \pm 0,0336	1,003 \pm 0,0448

Tab. 7 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler des Parameters **Run Duration (s)**.

Stand (s)

Die Auswertung des Parameters Stand (s) innerhalb der MALP-2-Gruppe im Verlauf von 36 Tagen zeigten sich im Vergleich von rechtem mit linkem Hinterlauf die Werte des linken Hinterlaufes an Tag 1 ($p < 0,001$) und Tag 3 ($p < 0,001$) signifikant reduziert. Kein signifikanter Unterschied der Werte ergab sich an Tag -1, Tag 7, Tag 14 und Tag 36.

Am linken Hinterlauf konnte im Vergleich zu Tag -1 eine signifikante Verminderung der Werte an Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$) und Tag 7 ($p < 0,05$) nachgewiesen werden. An Tag 14 und Tag 36 erwies sich kein signifikanter Unterschied der Werte zu Tag -1.

Am rechten Hinterlauf zeigte sich eine signifikante Minderung der Werte an Tag 7 ($p < 0,05$) im Vergleich zu Tag -1. Tag 1, Tag 3, Tag 14 und Tag 36 wiesen keinen signifikanten Unterschied der Werte zu Tag -1 auf.

Die statistische Auswertung innerhalb der Kontroll-Gruppe zeigte im Vergleich von rechtem und linkem Hinterlauf an Tag 1 ($p < 0,05$) und an Tag 3 ($p < 0,05$) eine signifikante Erniedrigung der Werte des linken Hinterlaufes, nicht hingegen an Tag -1, Tag 7, Tag 14 und Tag 36. Am linken Hinterlauf zeigte sich eine signifikante Minderung der Werte zu Tag -1 an Tag 1 ($p < 0,05$) und Tag 3 ($p < 0,05$), Tag 7 ($p < 0,001$) und Tag 14 ($p < 0,05$), aber kein signifikanter Unterschied der Werte von Tag 36 zu Tag -1. Am rechten Hinterlauf ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Werte von Tag -1 im Verlauf der 36 Tage.

Innerhalb der Sham-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen rechtem und linkem Hinterlauf im zeitlichen Verlauf von 36 Tagen feststellen. Auch im zeitlichen Verlauf des linken und rechten Hinterlaufes zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Werte.

Beim Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2- und Kontroll-Gruppe ließ sich erkennen, dass die Werte der MALP-2-Gruppe an Tag 1 ($p < 0,001$) und an Tag 7 ($p < 0,05$) signifikant reduziert waren zu denen der Kontroll-Gruppe. Kein signifikanter Unterschied der Werte ergab sich an Tag -1, Tag 3, Tag 14 und Tag 36.

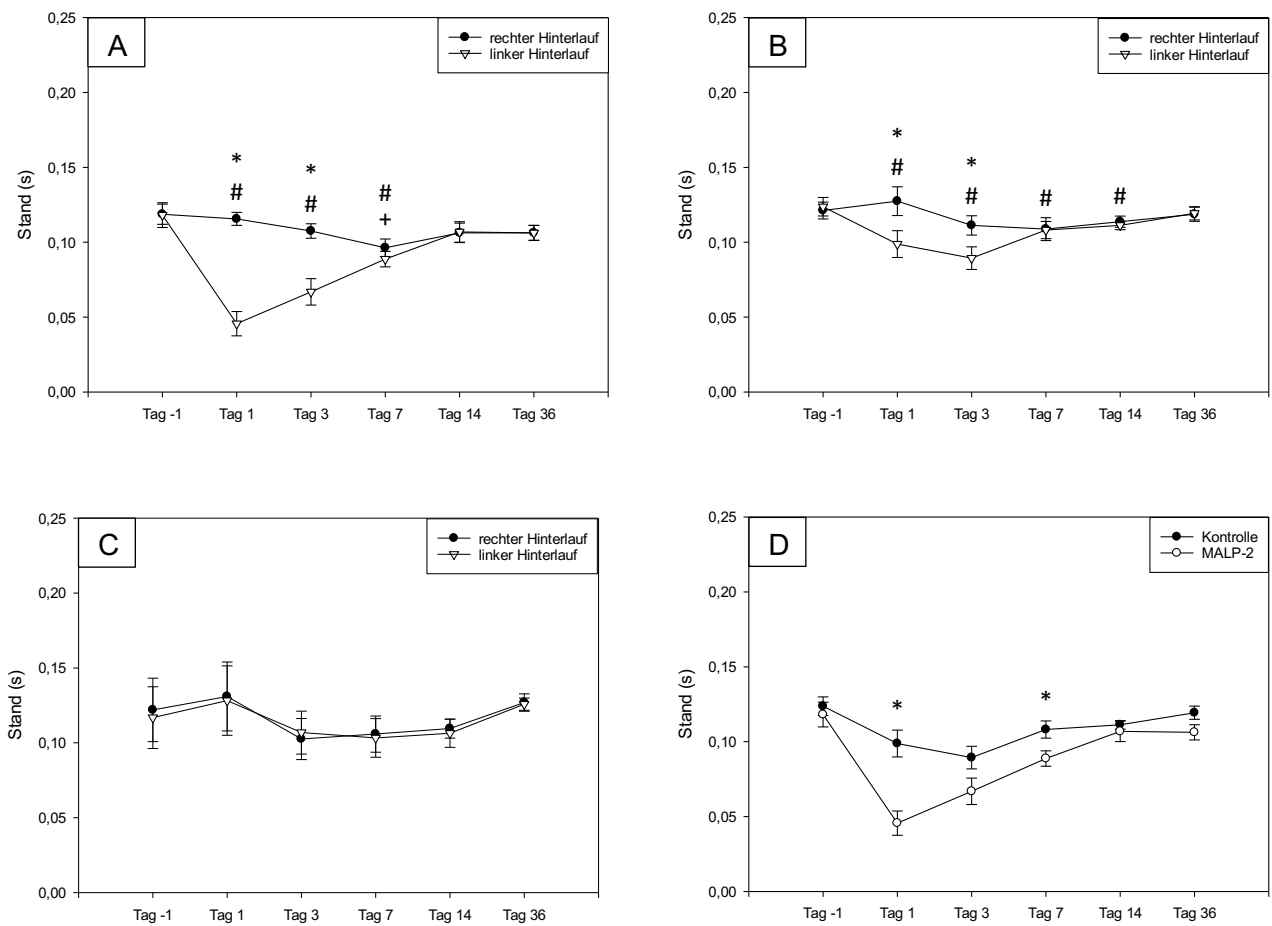


Abb. 15 zeigt den Verlauf des Parameters **Stand (s)**: Vergleich Verlauf von rechtem und linkem Hinterlauf über 36 Tage in **A** der MALP-2-Gruppe, **B** Kontroll-Gruppe und **C** in der Sham-Gruppe, **D** Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2-/Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. linker Hinterlauf/MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 linker Hinterlauf/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 rechter Hinterlauf/Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	0,118 \pm 0,00828	0,124 \pm 0,00618	0,117 \pm 0,0206
Tag 1	0,0456 \pm 0,00811	0,0988 \pm 0,00898	0,128 \pm 0,0232
Tag 3	0,0669 \pm 0,00884	0,0894 \pm 0,00755	0,103 \pm 0,0138
Tag 7	0,0887 \pm 0,00515	0,108 \pm 0,00579	0,103 \pm 0,013
Tag 14	0,107 \pm 0,00687	0,111 \pm 0,00287	0,106 \pm 0,0094
Tag 36	0,106 \pm 0,00507	0,119 \pm 0,00473	0,127 \pm 0,0058

Tab. 8 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufes beim Parameter **Stand (s)**.

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	0,119 ± 0,00676	0,121 ± 0,00562	0,122 ± 0,0212
Tag 1	0,116 ± 0,00437	0,128 ± 0,0096	0,131 ± 0,023
Tag 3	0,108 ± 0,00487	0,111 ± 0,00651	0,103 ± 0,0138
Tag 7	0,0963 ± 0,00591	0,109 ± 0,00769	0,106 ± 0,0121
Tag 14	0,106 ± 0,00651	0,114 ± 0,00375	0,11 ± 0,00637
Tag 36	0,106 ± 0,00491	0,119 ± 0,00473	0,127 ± 0,0058

Tab. 9 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter **Stand (s)**.

Swing (s)

Bei der Auswertung des Parameters Swing (s) innerhalb der MALP-2-Gruppe zeigte sich im Vergleich vom rechten zum linken Hinterlauf an Tag 1 ($p < 0,05$) und Tag 3 ($p < 0,05$) eine signifikante Erhöhung der Werte des linken Hinterlaufes. An Tag -1, Tag 7, Tag 14 und an Tag 36 ergab sich kein signifikanter Unterschied der Werte. Am linken Hinterlauf konnte eine signifikante Erhöhung der Werte von Tag 1 ($p < 0,05$) und Tag 3 ($p < 0,001$) zu Tag -1 und eine signifikante Minderung der Werte von Tag 14 ($p < 0,05$) zu Tag -1 beobachtet werden. Kein signifikanter Unterschied der Werte zeigte sich von Tag -1 zu Tag 7 und Tag 36. Es stellte sich in der MALP-2-Gruppe am rechten Hinterlauf kein statistisch signifikanter Unterschied der Werte im Vergleich zu Tag -1 im zeitlichen Verlauf von 36 Tagen heraus.

Innerhalb der Kontroll-Gruppe präsentierten sich die Werte des linken Hinterlaufes im Vergleich von rechtem mit linkem Hinterlauf an Tag 1 ($p < 0,001$) signifikant erhöht, an Tag -1, Tag 3, Tag 7, Tag 14, und Tag 36 zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Am linken Hinterlauf konnte eine signifikante Erhöhung der Werte zu Tag -1 an Tag 1 ($p < 0,001$) festgestellt werden. An Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 36 war kein signifikanter Unterschied der Werte feststellbar. Innerhalb des rechten Hinterlaufes zeigte sich im Vergleich zu Tag -1 der Wert des Tag 14 ($p < 0,05$) signifikant niedriger. Tag 1, Tag 3, Tag 7 und Tag 36 ergaben keinen signifikanten Unterschied der Werte zu Tag -1.

Innerhalb der Sham-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen rechtem und linkem Hinterlauf im zeitlichen Verlauf von 36 Tagen feststellen. Im zeitlichen Verlauf des linken Hinterlaufes zeigte sich von Tag -1 zu Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,05$) eine signifikante Verminderung der Werte. Kein signifikanter Unterschied der Werte war zu Tag 1, Tag 3 und Tag 7 feststellbar. Beim rechten Hinterlauf unterschieden sich die Werte im zeitlichen Verlauf nicht von Tag -1.

Beim Vergleich vom linken Hinterlauf von MALP-2- zur Kontroll-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Werte von Kontrolle und MALP-2-Gruppe im zeitlichen Verlauf darstellen.

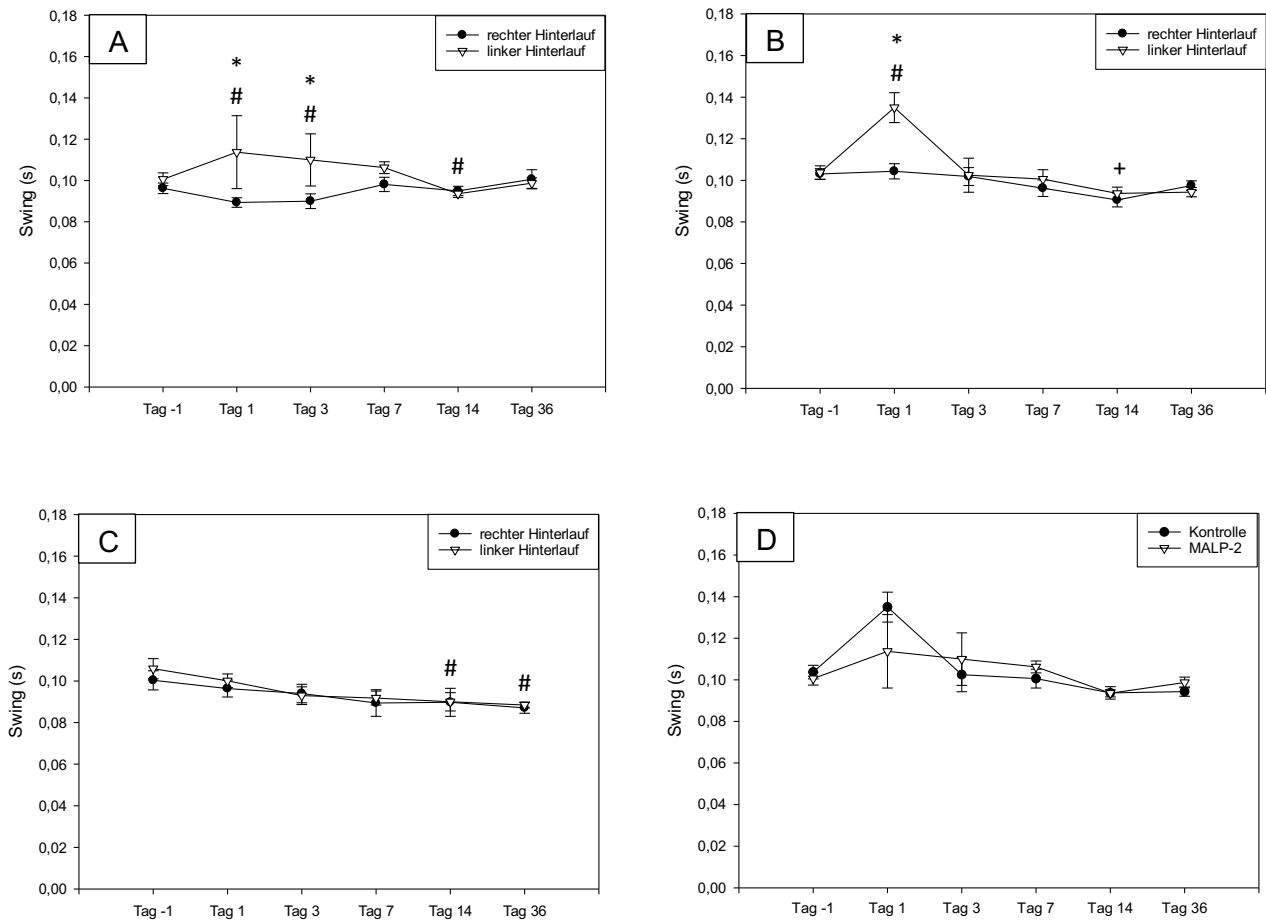


Abb. 16 zeigt den Verlauf des Parameters **Swing (s)**: Vergleich Verlauf von rechtem und linkem Hinterlauf über 36 Tage in **A** der MALP-2-Gruppe, **B** Kontroll-Gruppe und **C** in der Sham-Gruppe, **D** Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2-/Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. linker Hinterlauf/MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 linker Hinterlauf/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 rechter Hinterlauf/Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	0,101 ± 0,00309	0,104 ± 0,00328	0,106 ± 0,00485
Tag 1	0,114 ± 0,0177	0,135 ± 0,00719	0,1 ± 0,00326
Tag 3	0,11 ± 0,0126	0,102 ± 0,00819	0,093 ± 0,00424
Tag 7	0,106 ± 0,00287	0,101 ± 0,00452	0,0918 ± 0,00335
Tag 14	0,0936 ± 0,00177	0,0938 ± 0,00301	0,09 ± 0,00439
Tag 36	0,0988 ± 0,00256	0,0944 ± 0,00223	0,0885 ± 0,00141

Tab. 10 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des linken Hinterlaufes beim Parameter **Swing (s)**.

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	0,0963 ± 0,00256	0,103 ± 0,00254	0,1 ± 0,00461
Tag 1	0,0894 ± 0,00232	0,104 ± 0,00365	0,0964 ± 0,00461
Tag 3	0,09 ± 0,00354	0,102 ± 0,0043	0,094 ± 0,00444
Tag 7	0,0981 ± 0,00344	0,0963 ± 0,00397	0,0894 ± 0,00639
Tag 14	0,095 ± 0,00224	0,0906 ± 0,00335	0,0898 ± 0,00672
Tag 36	0,101 ± 0,00461	0,0975 ± 0,00233	0,0871 ± 0,0026

Tab. 11 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter **Swing (s)**.

Step Cycle (s)

Die statistische Analyse des Parameters Step Cycle (s) erbrachte im Vergleich von rechtem und linken Hinterlauf innerhalb der MALP-2-Gruppe im zeitlichen Verlauf keinen statistisch signifikanten Unterschied der Werte. Auch am linken und rechten Hinterlauf ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der Werte im zeitlichen Verlauf von 36 Tagen beobachten.

Innerhalb der Kontroll-Gruppe unterscheiden sich rechter und linker Hinterlauf an Tag -1, Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 oder Tag 36 nicht signifikant voneinander. Am linken Hinterlauf zeigte sich eine signifikante Minderung der Werte von Tag -1 zu Tag 3 ($p < 0,001$), Tag 7 ($p < 0,05$), Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,001$), nicht aber zu Tag 1. Im zeitlichen Verlauf demonstrierte sich am rechten Hinterlauf im Vergleich von Tag -1 im zeitlichen Verlauf kein signifikanter Unterschied der Werte.

Innerhalb der Sham-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen rechtem und linkem Hinterlauf an im zeitlichen Verlauf feststellen. Auch im Verlauf des linken und rechten Hinterlaufes zeigten sich zu Tag -1 kein statistisch signifikanter Unterschied der Werte im zeitlichen Verlauf.

Beim Vergleich vom linken Hinterlauf von MALP-2- zu Kontroll-Gruppe zeigten sich die Werte der MALP-2-Gruppe an Tag 1 ($p < 0,05$) signifikant reduziert, kein signifikanter Unterschied der Werte hingegen an Tag -1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 36.

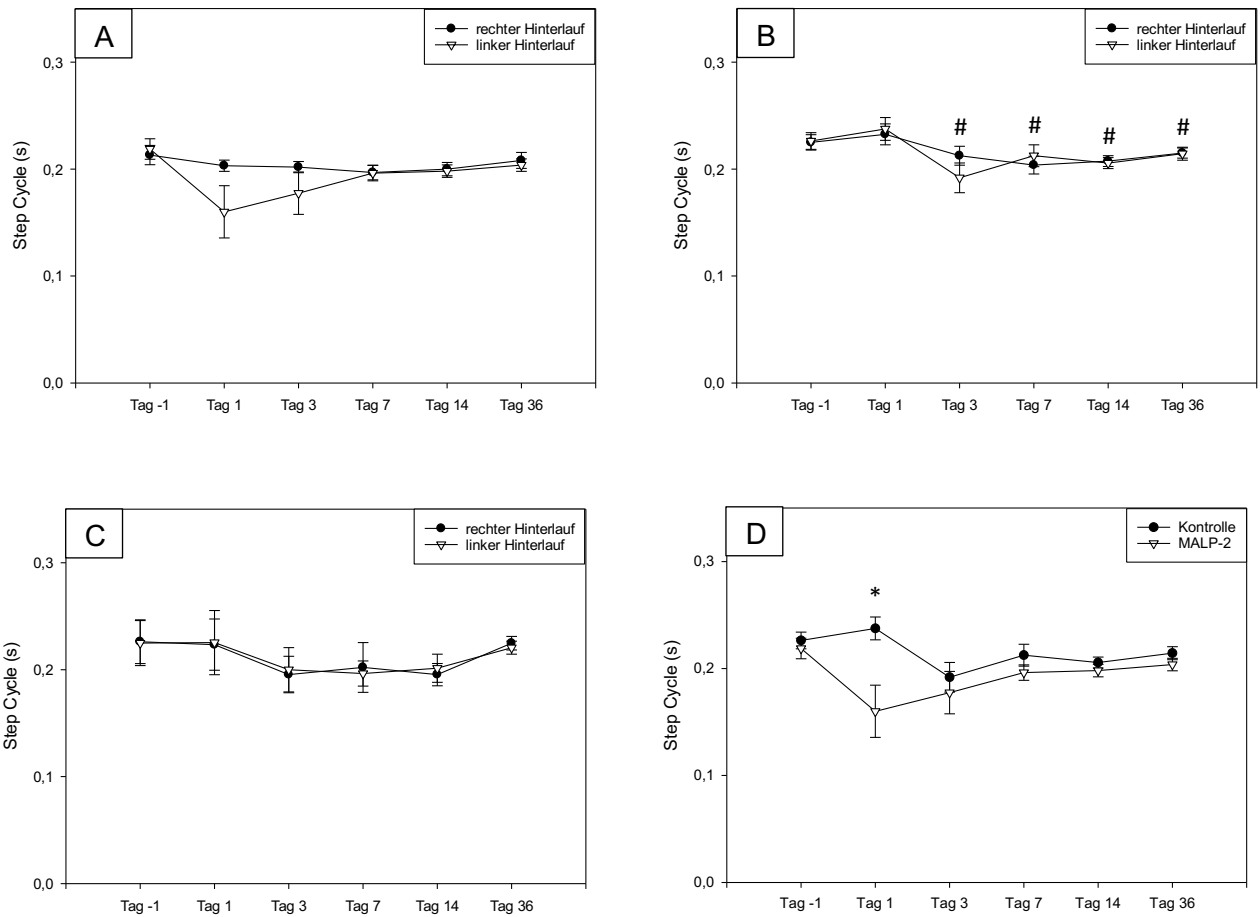


Abb. 17 zeigt den Verlauf des Parameters **Step Cycle (s)**: Vergleich Verlauf von rechtem und linkem Hinterlauf über 36 Tage in **A** der MALP-2-Gruppe , **B** Kontroll-Gruppe und **C** in der Sham-Gruppe, **D** Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2-/Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. linker Hinterlauf/MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 linker Hinterlauf/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 rechter Hinterlauf/Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	0,219 \pm 0,00957	0,226 \pm 0,00779	0,225 \pm 0,021
Tag 1	0,16 \pm 0,0245	0,238 \pm 0,0107	0,225 \pm 0,03
Tag 3	0,177 \pm 0,0198	0,192 \pm 0,0139	0,2 \pm 0,0207
Tag 7	0,196 \pm 0,00718	0,212 \pm 0,0102	0,196 \pm 0,0117
Tag 14	0,198 \pm 0,00586	0,206 \pm 0,00516	0,201 \pm 0,0131
Tag 36	0,204 \pm 0,00584	0,214 \pm 0,00605	0,221 \pm 0,00611

Tab. 12 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter **Step Cycle (s)**.

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	0,213 ± 0,00898	0,225 ± 0,00725	0,226 ± 0,0205
Tag 1	0,203 ± 0,00522	0,233 ± 0,00977	0,223 ± 0,024
Tag 3	0,202 ± 0,00526	0,213 ± 0,00887	0,195 ± 0,017
Tag 7	0,197 ± 0,00681	0,204 ± 0,00831	0,202 ± 0,0233
Tag 14	0,2 ± 0,00619	0,207 ± 0,00504	0,195 ± 0,0104
Tag 36	0,208 ± 0,00748	0,215 ± 0,00779	0,225 ± 0,00534

Tab. 13 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter **Step Cycle (s)**.

Duty Cycle (%)

Beim Parameter Duty Cycle (%) waren innerhalb der MALP-2-Gruppe an Tag 1 ($p < 0,001$) und Tag 3 ($p < 0,001$) die Werte des linken Hinterlaufes signifikant niedriger als die des rechten Hinterlaufes. An Tag -1, Tag 7, Tag 14, und Tag 36 konnte kein signifikanter Unterschied der Werte festgestellt werden. Auf der linken Seite ergab sich im Vergleich von Tag -1 zu Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$) und Tag 7 ($p < 0,001$) eine statistisch signifikante Minderung der Werte. An Tag 14 und Tag 36 zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Werte. Beim rechten Hinterlauf konnte von Tag -1 zu Tag 7 ($p < 0,05$) eine statistisch signifikante Minderung der Werte festgestellt werden. Die restlichen Tage, Tag 1, Tag 3, Tag 14 und Tag 36 wiesen keinen signifikanten Unterschied der Werte im Vergleich zu Tag -1 auf.

Innerhalb der Kontroll-Gruppe zeigte sich beim Vergleich von rechtem mit linkem Hinterlauf eine signifikante Minderung der Werte an Tag 1 ($p < 0,001$), und Tag 3 ($p < 0,05$). An Tag -1, Tag 7, Tag 14, und Tag 36 konnte kein signifikanter Unterschied der Werte nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Tag -1 sind die Werte des linken Hinterlaufes an Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$) und Tag 7 ($p < 0,05$) signifikant reduziert. Kein signifikanter Unterschied der Werte von Tag 14 und Tag 36 zu Tag -1. Auf der rechten Seite war kein signifikanter Unterschied der Werte von Tag -1 im zeitlichen Verlauf nachweisbar.

Innerhalb der Sham-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Werte von rechtem und linkem Hinterlauf im zeitlichen Verlauf feststellen. Im Verlauf des linken Hinterlaufes zeigte sich im zeitlichen Verlauf kein signifikanter Unterschied der Werte von Tag -1. Auch beim rechten Hinterlauf unterschieden sich die Werte im zeitlichen Verlauf nicht signifikant von Tag -1.

Beim Vergleich vom linken Hinterlauf von MALP-2- zu Kontroll-Gruppe zeigten sich die Werte der MALP-2-Gruppe an Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,05$), Tag 7 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,05$)

signifikant niedriger im Vergleich zu den Werten der Kontroll-Gruppe an den entsprechenden Tagen. Kein signifikanter Unterschied der Werte präsentierte sich an Tag -1 und Tag 14.

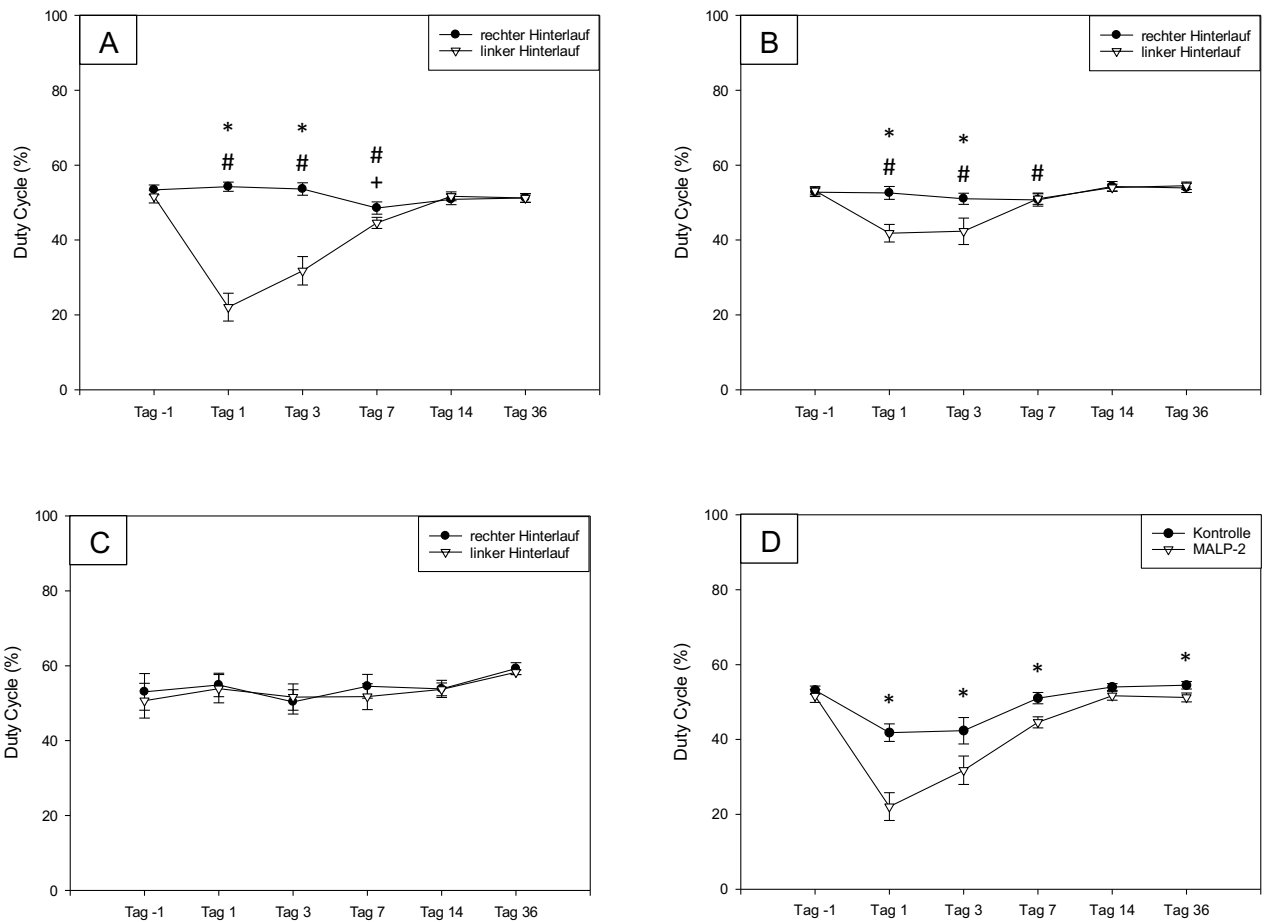


Abb. 18 zeigt den Verlauf des Parameters **Duty Cycle (%)**: Vergleich Verlauf von rechtem und linkem Hinterlauf über 36 Tage in **A** der MALP-2-Gruppe, **B** Kontroll-Gruppe und **C** in der Sham-Gruppe, **D** Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2-/Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. linker Hinterlauf/MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 linker Hinterlauf/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 rechter Hinterlauf/Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	51,639 \pm 1,716	53,189 \pm 1,097	50,685 \pm 4,64
Tag 1	22,061 \pm 3,711	41,818 \pm 2,336	53,889 \pm 3,78
Tag 3	31,779 \pm 3,789	42,346 \pm 3,538	51,647 \pm 3,518
Tag 7	44,579 \pm 1,508	51,049 \pm 1,511	51,775 \pm 3,456
Tag 14	51,696 \pm 1,182	54,031 \pm 0,91	53,701 \pm 1,71
Tag 36	51,239 \pm 1,175	54,502 \pm 0,999	58,282 \pm 0,632

Tab. 14 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufes beim Parameter **Duty Cycle (%)**.

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	53,411 ± 1,307	52,788 ± 1,158	53,036 ± 4,898
Tag 1	54,256 ± 1,226	52,602 ± 1,727	54,883 ± 3,133
Tag 3	53,641 ± 1,672	51,041 ± 1,479	50,359 ± 3,246
Tag 7	48,566 ± 1,633	50,723 ± 1,662	54,533 ± 3,185
Tag 14	50,879 ± 1,42	54,326 ± 1,326	53,84 ± 2,28
Tag 36	51,248 ± 1,123	53,934 ± 1,224	59,257 ± 1,592

Tab. 15 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter **Duty Cycle (%)**.

Stride Length (%)

Beim Parameter Stride Length (%) war kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen rechten und linken Hinterlauf innerhalb der MALP-2-Gruppe im zeitlichen Verlauf feststellbar. Auch am operierten linken und am nicht operierten rechten Hinterlauf zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Werte von Tag -1 im zeitlichen Verlauf von 36 Tagen.

Innerhalb der Kontroll-Gruppe konnte im zeitlichen Verlauf kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen rechtem und linkem Hinterlauf festgestellt werden. Auch am linken Hinterlauf war kein signifikanter Unterschied der Werte von Tag -1 zu Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 36 feststellbar. Auch am rechten Hinterlauf zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Werte von Tag -1 im zeitlichen Verlauf.

Innerhalb der Sham-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen rechtem und linkem Hinterlauf an Tag -1, Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 14, und Tag 36 feststellen. Im Verlauf des linken Hinterlaufes zeigte sich zu Tag -1 im zeitlichen Verlauf kein signifikanter Unterschied der Werte. Auch beim rechten Hinterlauf unterschieden sich die Werte im zeitlichen Verlauf nicht signifikant von Tag -1.

Beim Vergleich der Werte des linken Hinterlaufes zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und MALP-2-Gruppe im zeitlichen Verlauf.

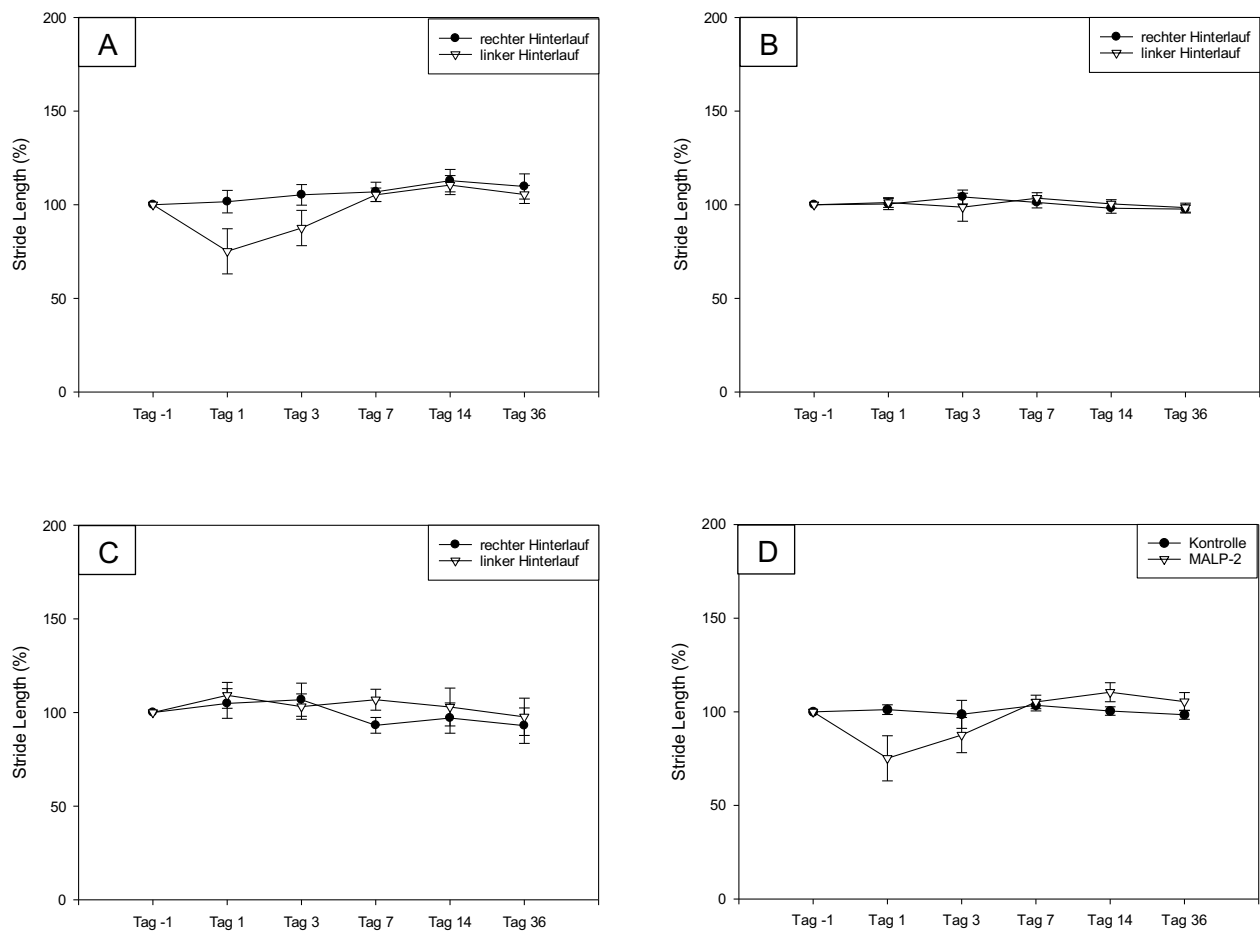


Abb. 19 zeigt den Verlauf des Parameters **Stride Length (%)**: Vergleich Verlauf von rechtem und linkem Hinterlauf über 36 Tage in **A** der MALP-2-Gruppe, **B** Kontroll-Gruppe und **C** in der Sham-Gruppe, **D** Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2-/Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. linker Hinterlauf/MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 linker Hinterlauf/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 rechter Hinterlauf/Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
Tag 1	75,147 \pm 12,052	101,201 \pm 2,596	109,177 \pm 6,938
Tag 3	87,596 \pm 9,418	98,681 \pm 7,473	103,168 \pm 6,793
Tag 7	105,294 \pm 3,606	103,486 \pm 2,974	106,828 \pm 5,581
Tag 14	110,505 \pm 5,07	100,449 \pm 2,26	102,935 \pm 10,079
Tag 36	105,484 \pm 4,824	98,465 \pm 2,404	97,705 \pm 9,971

Tab. 16 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufes beim Parameter **Stride Length (%)**.

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
Tag 1	101,646 ± 6,006	100,39 ± 2,974	104,835 ± 7,946
Tag 3	105,285 ± 5,504	104,159 ± 3,687	106,85 ± 8,859
Tag 7	106,891 ± 5,142	101,219 ± 2,908	93,155 ± 4,202
Tag 14	112,844 ± 5,984	98,15 ± 2,67	97,043 ± 8,102
Tag 36	109,758 ± 6,708	97,704 ± 2,136	92,975 ± 9,45

Tab. 17 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter **Stride Length (%)**.

Max Contact Area (%)

Beim Parameter Max Contact Area (%) resultierte innerhalb der MALP-2-Gruppe an Tag 1 ($p < 0,001$) und Tag 3 ($p < 0,05$) im Vergleich vom linken Hinterlauf zum rechten Hinterlauf eine statistisch signifikante Verminderung der Werte, hingegen an Tag -1, Tag 7, Tag 14, und Tag 36 nicht. Am linken Hinterlauf waren vergleichend zu Tag -1 die Werte von Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$), Tag 7 ($p < 0,05$) signifikant reduziert, die Werte von Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,05$) signifikant erhöht. Am rechten Hinterlauf zeigte sich im Vergleich von Tag -1 zu Tag 1 ($p < 0,05$) ein statistisch signifikant reduzierter Wert, zu Tag 14 ($p < 0,001$) und Tag 36 ($p < 0,05$) statistisch signifikant erhöhte Werte. An Tag 3 und Tag 7 zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Werte zu Tag -1.

Innerhalb der Kontroll-Gruppe zeigten sich an Tag 1 ($p < 0,05$) und Tag 3 ($p < 0,05$) die Werte des linken Hinterlaufes statistisch signifikant reduziert im Vergleich zu denen des rechten Hinterlaufes. Dies zeigte sich nicht an Tag -1, Tag 7, Tag 14 und Tag 36.

Am linken Hinterlauf präsentierte sich von Tag -1 zu Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$), Tag 7 ($p < 0,05$) und Tag 14 ($p < 0,05$) eine signifikante Minderung der Werte. Keinen signifikanten Unterschied der Werte gab es zu Tag 36. Es unterschieden sich die Werte am rechten Hinterlauf im Vergleich von Tag -1 im zeitlichen Verlauf nicht signifikant.

Innerhalb der Sham-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen rechtem und linkem Hinterlauf im zeitlichen Verlauf feststellen. Im zeitlichen Verlauf des linken Hinterlaufes zeigte sich von Tag -1 zu Tag 36 ($p < 0,05$) eine statistisch signifikante Erhöhung des Wertes von Tag 36. Hingegen weder zu Tag 1, Tag 3, Tag 7 oder Tag 14 bestand ein signifikanter Unterschied der Werte. Beim rechten Hinterlauf unterschieden sich die Werte von Tag 1 ($p < 0,05$), Tag 3 ($p < 0,001$), Tag 7 ($p < 0,05$), Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,001$) signifikant zu Tag -1.

Beim Vergleich vom linken Hinterlauf von MALP-2- zu Kontroll-Gruppe erwies sich der Wert der MALP-2-Gruppe an Tag 1 ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt, an Tag 14 ($p < 0,05$) zeigte sich vergleichend eine signifikante Erhöhung des Wertes der MALP-2-Gruppe. Keinen signifikanten Unterschied der Werte gab es an Tag -1, Tag 3, Tag 7 und Tag 36.

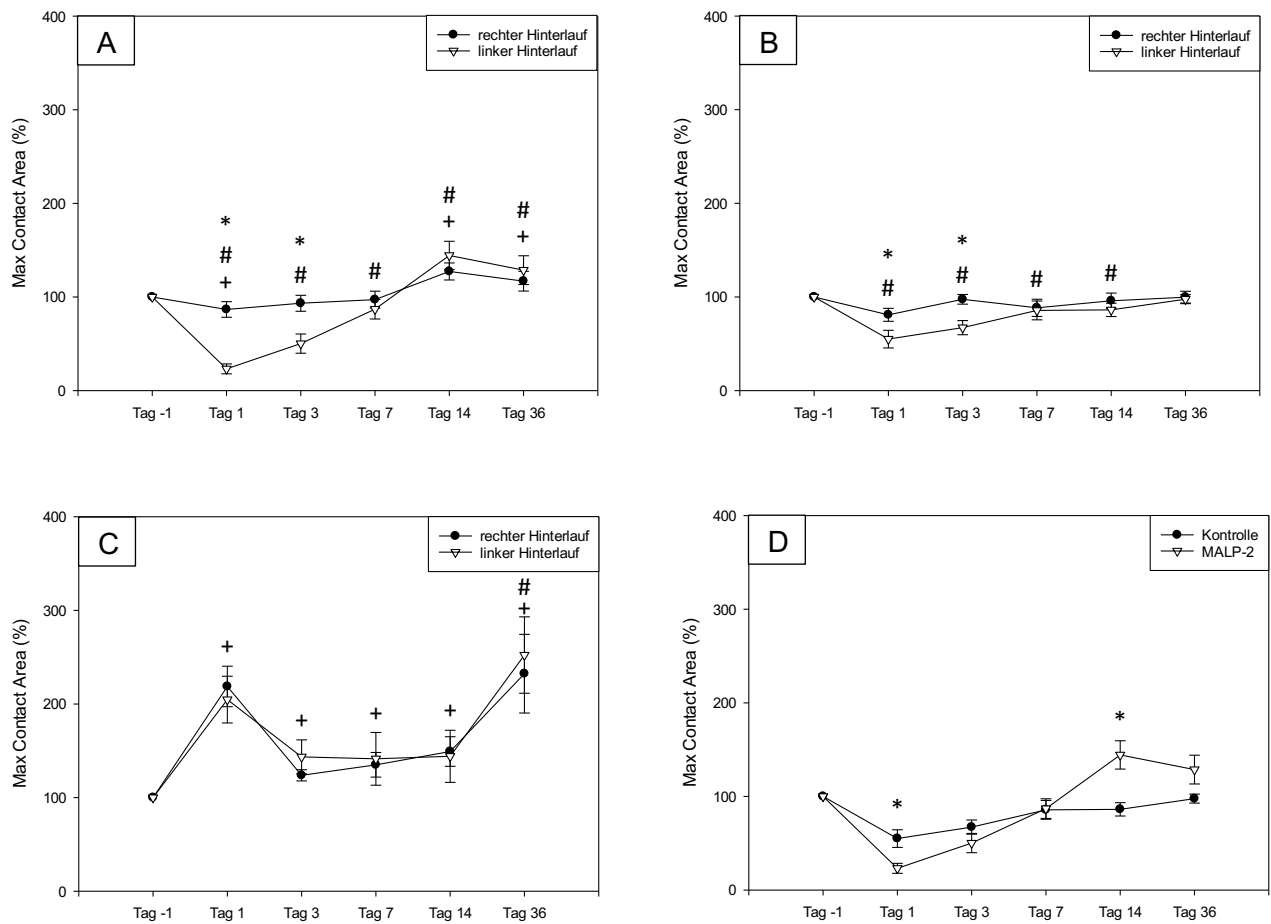


Abb. 20 zeigt den Verlauf des Parameters **Max Contact Area (%)**: Vergleich Verlauf von rechtem und linkem Hinterlauf über 36 Tage in **A** der MALP-2-Gruppe, **B** Kontroll-Gruppe und **C** in der Sham-Gruppe, **D** Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2/Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. linker Hinterlauf/MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 linker Hinterlauf/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 rechter Hinterlauf/Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
Tag 1	23,161 ± 5,311	54,989 ± 9,405	204,73 ± 24,944
Tag 3	50,159 ± 10,274	67,23 ± 7,576	143,477 ± 18,122
Tag 7	87,036 ± 10,502	85,608 ± 10,046	141,375 ± 28,167
Tag 14	144,362 ± 15,115	86,184 ± 7,133	144,068 ± 27,823
Tag 36	128,68 ± 15,364	97,627 ± 4,806	252,315 ± 40,813

Tab. 18 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter **Max Contact Area (%)**.

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
Tag 1	86,642 ± 8,339	80,945 ± 6,978	218,79 ± 21,573
Tag 3	93,26 ± 8,566	97,456 ± 5,172	123,785 ± 5,954
Tag 7	97,161 ± 9,028	88,403 ± 9,168	135,012 ± 13,116
Tag 14	127,283 ± 9,098	95,888 ± 8,225	149,197 ± 15,855
Tag 36	116,852 ± 10,528	99,792 ± 6,305	232,413 ± 41,96

Tab. 19 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter **Mac Contact Area (%)**.

Print Area (%)

In der MALP-2-Gruppe waren die Werte des linken Hinterlaufes signifikant an Tag 1 ($p < 0,001$) und Tag 3 ($p < 0,001$) im Vergleich zu denen des rechten Hinterlaufes reduziert. An Tag -1, Tag 7, Tag 14, und Tag 36 unterschieden sich die Werte des rechten und linken Hinterlaufes nicht signifikant voneinander. Eine signifikante Minderung der Werte am linken Hinterlauf zeigte sich vergleichend von Tag -1 zu Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$) und Tag 7 ($p < 0,001$). Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,05$) hingegen wiesen eine signifikante Erhöhung der Werte im Vergleich zu Tag -1 auf. Am rechten Hinterlauf war im Vergleich zu Tag -1 der Wert von Tag 14 ($p < 0,001$) signifikant erhöht. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Werte im Vergleich von Tag -1 zu Tag 1, Tag 3, Tag 7 und Tag 36 festgestellt werden.

Innerhalb der Kontroll-Gruppe zeigte sich an Tag 1 ($p < 0,05$) und Tag 3 ($p < 0,05$) eine statistisch signifikante Minderung des Wertes des linken Hinterlaufes im Vergleich zum rechten Hinterlauf, nicht jedoch an Tag -1, Tag 7, Tag 14 und Tag 36. Am linken Hinterlauf unterschieden sich zu Tag -1 die Werte von Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$) und Tag 7 ($p < 0,05$) als signifikant erniedrigt, Tag 14 ($p < 0,001$) und Tag 36 ($p < 0,05$) als signifikant erhöht. Im Verlauf des rechten Hinterlaufs resultierte im Vergleich von Tag -1 kein signifikanter Unterschied der Werte im zeitlichen Verlauf von 36 Tagen.

Innerhalb der Sham-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen rechtem und linkem Hinterlauf im zeitlichen Verlauf feststellen. Im zeitlichen Verlauf des linken Hinterlaufes zeigte sich im Vergleich zu Tag -1 der Wert von Tag 36 ($p < 0,05$) signifikant erhöht. Hingegen bestand weder zu Tag 1, Tag 3, Tag 7 oder Tag 14 ein signifikanter Unterschied der Werte. Beim rechten Hinterlauf unterschieden sich zu Tag -1 die Werte von Tag 1 ($p < 0,05$), Tag 3 ($p < 0,001$), Tag 7 ($p < 0,05$), Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,001$) signifikant erhöht.

Beim Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2- zu Kontroll-Gruppe erwies sich der Wert der MALP-2-Gruppe an Tag 1 ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant reduziert. An Tag 14 ($p < 0,05$) zeigte sich vergleichend eine signifikante Erhöhung des Wertes der MALP-2-Gruppe. Keinen signifikanten Unterschied der Werte gab es an Tag -1, Tag 3, Tag 7 und Tag 36.

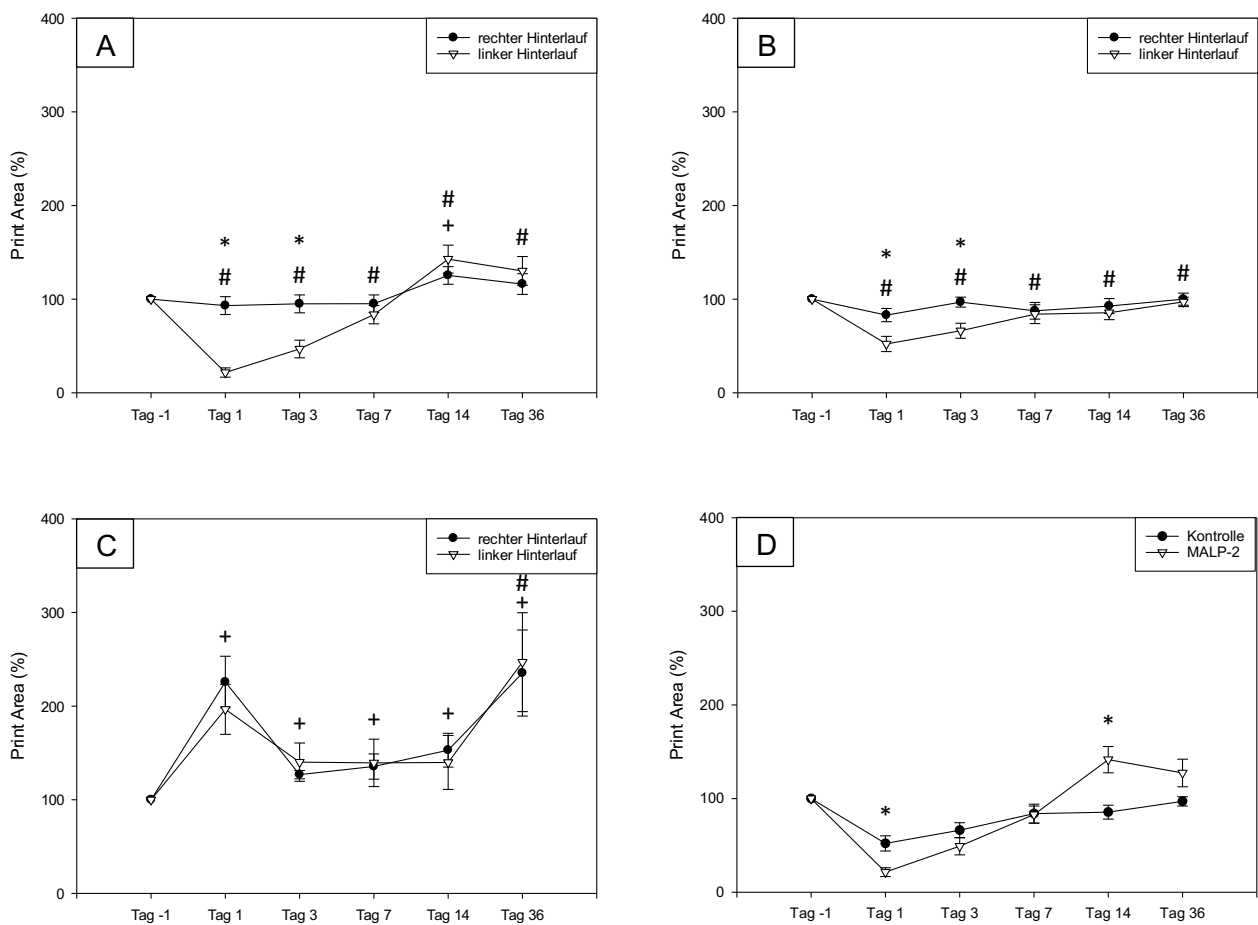


Abb. 21 zeigt den Verlauf des Parameters **Print Area (%)**: Vergleich Verlauf von rechtem und linkem Hinterlauf über 36 Tage in **A** der MALP-2-Gruppe, **B** Kontroll-Gruppe und **C** in der Sham-Gruppe, **D** Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2-/Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. linker Hinterlauf/MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 linker Hinterlauf/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 rechter Hinterlauf/Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
Tag 1	21,621 ± 5,004	52,096 ± 8,08	196,605 ± 26,728
Tag 3	46,751 ± 9,441	66,207 ± 8,021	140,173 ± 20,413
Tag 7	83,461 ± 9,774	83,987 ± 10,057	139,363 ± 25,297
Tag 14	142,778 ± 14,896	85,495 ± 7,459	139,855 ± 28,78
Tag 36	130,105 ± 15,397	97,003 ± 4,976	246,98 ± 52,83

Tab. 20 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter **Print Area (%)**.

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
Tag 1	93,134 ± 9,498	82,979 ± 7,104	225,723 ± 27,534
Tag 3	94,966 ± 9,556	96,777 ± 5,304	126,788 ± 4,409
Tag 7	95,074 ± 9,463	87,599 ± 8,913	135,52 ± 13,487
Tag 14	125,327 ± 9,424	92,596 ± 8,005	152,9 ± 18,096
Tag 36	116,082 ± 11,066	99,976 ± 6,467	235,34 ± 45,931

Tab. 21 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter **Print Area (%)**.

Max Contact Max Intensity

Beim Vergleich des Parameter Max Contact Max Intensity des rechten mit dem linkem Hinterlauf erwies sich innerhalb der MALP-2-Gruppe eine signifikante Verminderung der Werte des linken Hinterlaufes an Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$) und Tag 7 ($p < 0,05$). Kein signifikanter Unterschied der Werte zeigte sich an Tag -1, Tag 14 und Tag 36. Am linken Hinterlauf lässt sich von Tag -1 zu Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$) und Tag 7 ($p < 0,05$) eine statistisch signifikante Minderung der Werte beobachten, an Tag 14 ($p < 0,001$) und Tag 36 ($p < 0,001$) sind die Werte vergleichend zu Tag -1 signifikant erhöht. Eine signifikante Erhöhung der Werte zeigt sich am rechten Hinterlauf im Vergleich von Tag -1 zu Tag 14 ($p < 0,05$) und zu Tag 36 ($p < 0,05$). Nicht signifikant ist der Unterschied der Werte von Tag -1 zu Tag 1, Tag 3 und Tag 7.

Innerhalb der Kontroll-Gruppe zeigte sich an Tag 1 ($p < 0,05$) und Tag 3 ($p < 0,05$) eine statistisch signifikante Minderung der Werte zwischen rechtem und linkem Hinterlauf, nicht jedoch an Tag -1, Tag 7, Tag 14 und Tag 36. Am linken Hinterlauf unterschieden sich zu Tag -1 die Werte von Tag 1 ($p < 0,001$) und Tag 3 ($p < 0,001$) signifikant reduziert, von Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,05$) signifikant erhöht. Kein signifikanter Unterschied der Werte bestand an Tag 7. Am rechten Hinterlauf ließ sich im Vergleich von Tag -1 zu Tag 1 ($p < 0,05$) und Tag 3 ($p < 0,05$) eine

statistisch signifikante Minderung der Werte verzeichnen, an Tag 7 ($p < 0,05$), Tag 14 ($p < 0,001$) und Tag 36 ($p < 0,05$) hingegen eine signifikante Erhöhung der Werte.

Innerhalb der Sham-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen rechtem und linkem Hinterlauf im zeitlichen Verlauf feststellen. Auch im zeitlichen Verlauf des linken und rechten Hinterlaufes zeigten sich zu Tag -1 kein signifikanter Unterschied der Werte.

Beim Vergleich vom linken Hinterlauf von MALP-2- zu Kontroll-Gruppe zeigte sich eine signifikante Minderung der Werte des linken Hinterlaufes der MALP-2-Gruppe an Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,05$) und Tag 7 ($p < 0,05$). Kein signifikanter Unterschied der Werte verzeichnete sich an Tag -1, Tag 14 und Tag 36.

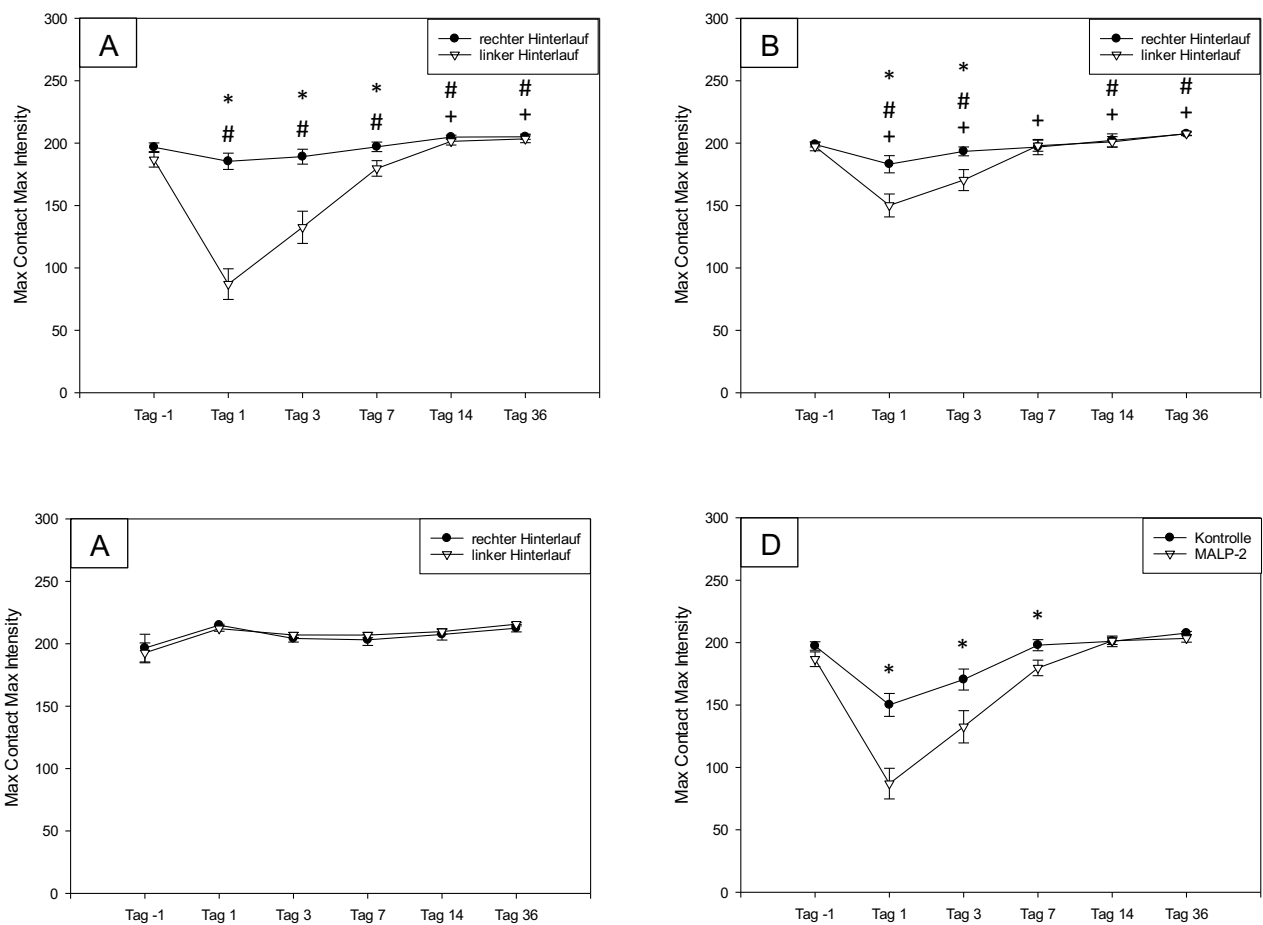


Abb. 22 zeigt den Verlauf des Parameters **Max Contact Max Intensity**: a Vergleich Verlauf von rechtem und linkem Hinterlauf über 36 Tage in **A** der MALP-2-Gruppe, **B** Kontroll-Gruppe und **C** in der Sham-Gruppe, **D** Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2-/Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. linker Hinterlauf/MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 linker Hinterlauf/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 rechter Hinterlauf/Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	186,709 ± 5,894	197,346 ± 3,369	186,709 ± 5,894
Tag 1	87,034 ± 12,28	150,135 ± 9,172	87,034 ± 12,28
Tag 3	132,571 ± 12,94	170,449 ± 8,43	132,571 ± 12,94
Tag 7	179,752 ± 6,252	197,995 ± 4,455	179,752 ± 6,252
Tag 14	201,471 ± 2,912	201,041 ± 4,233	201,471 ± 2,912
Tag 36	203,453 ± 3,067	207,639 ± 1,368	203,453 ± 3,067

Tab. 22 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter **Max Contact Max Intensity**.

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	196,753 ± 3,448	199,033 ± 2,062	196,753 ± 3,448
Tag 1	185,493 ± 6,535	183,157 ± 6,916	185,493 ± 6,535
Tag 3	189,178 ± 5,966	193,435 ± 3,57	189,178 ± 5,966
Tag 7	197,108 ± 3,799	196,929 ± 6,113	197,108 ± 3,799
Tag 14	204,841 ± 1,565	202,276 ± 5,248	204,841 ± 1,565
Tag 36	205,151 ± 2,07	207,528 ± 1,508	205,151 ± 2,07

Tab. 23 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter **Max Contact Max Intensity**.

Max Contact Mean Intensity

Innerhalb der MALP-2-Gruppe konnte hinsichtlich des Vergleiches von rechtem und linken Hinterlauf ein signifikante Minderung der Werte des linken Hinterlaufes an Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$) und Tag 7 ($p < 0,05$) festgestellt werden. An Tag -1, Tag 14 und Tag 36 bestand kein signifikanter Unterschied der Werte. An Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,001$) und Tag 7 ($p < 0,05$) zeigten sich am linken Hinterlauf die Werte statistisch signifikant reduziert vergleichend zu Tag -1. Keinen signifikanten Unterschied der Werte von Tag -1 gab es zu Tag 14 und Tag 36. Es zeigte sich am rechten Hinterlauf im Vergleich von Tag -1 im zeitlichen Verlauf kein statistisch signifikanter Unterschied der Werte.

Innerhalb der Kontroll-Gruppe zeigte sich an Tag 1 ($p < 0,05$) der Wert des linken Hinterlaufes statistisch signifikant reduziert im Vergleich zum rechten Hinterlauf, nicht jedoch an Tag -1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 36. Am linken Hinterlauf ergab sich eine signifikante Minderung der Werte von Tag 1 ($p < 0,001$) und Tag 3 ($p < 0,03$) zu Tag -1. Kein signifikanter Unterschied der Werte zu Tag -1 von Tag 7, Tag 14 und Tag 36. Beim rechten Hinterlauf zeigten sich zu Tag -1 die Werte von Tag 7 ($p < 0,001$), Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,001$) signifikant erhöht. Nicht signifikant zu Tag -1 unterschieden sich die Werte von Tag 1 und Tag 3.

Innerhalb der Sham-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen rechtem und linkem Hinterlauf im zeitlichen Verlauf feststellen. Im zeitlichen Verlauf des linken Hinterlaufes zeigten sich zu Tag -1 die Werte von Tag 1 ($p < 0,05$) und Tag 36 ($p < 0,05$) signifikant erhöht. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der Werte von Tag -1 zu Tag 3, Tag 7 und Tag 14. Beim rechten Hinterlauf unterschieden sich die Werte weder von Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 noch Tag 36 signifikant zu Tag -1.

Es erwies sich eine signifikante Minderung der Werte des linken Hinterlaufes der MALP-2-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe an Tag 1 ($p < 0,001$), Tag 3 ($p < 0,05$) und Tag 7 ($p < 0,05$). Kein signifikanter Unterschied der Werte bestand an Tag -1, Tag 14 Kontrolle und Tag 36.

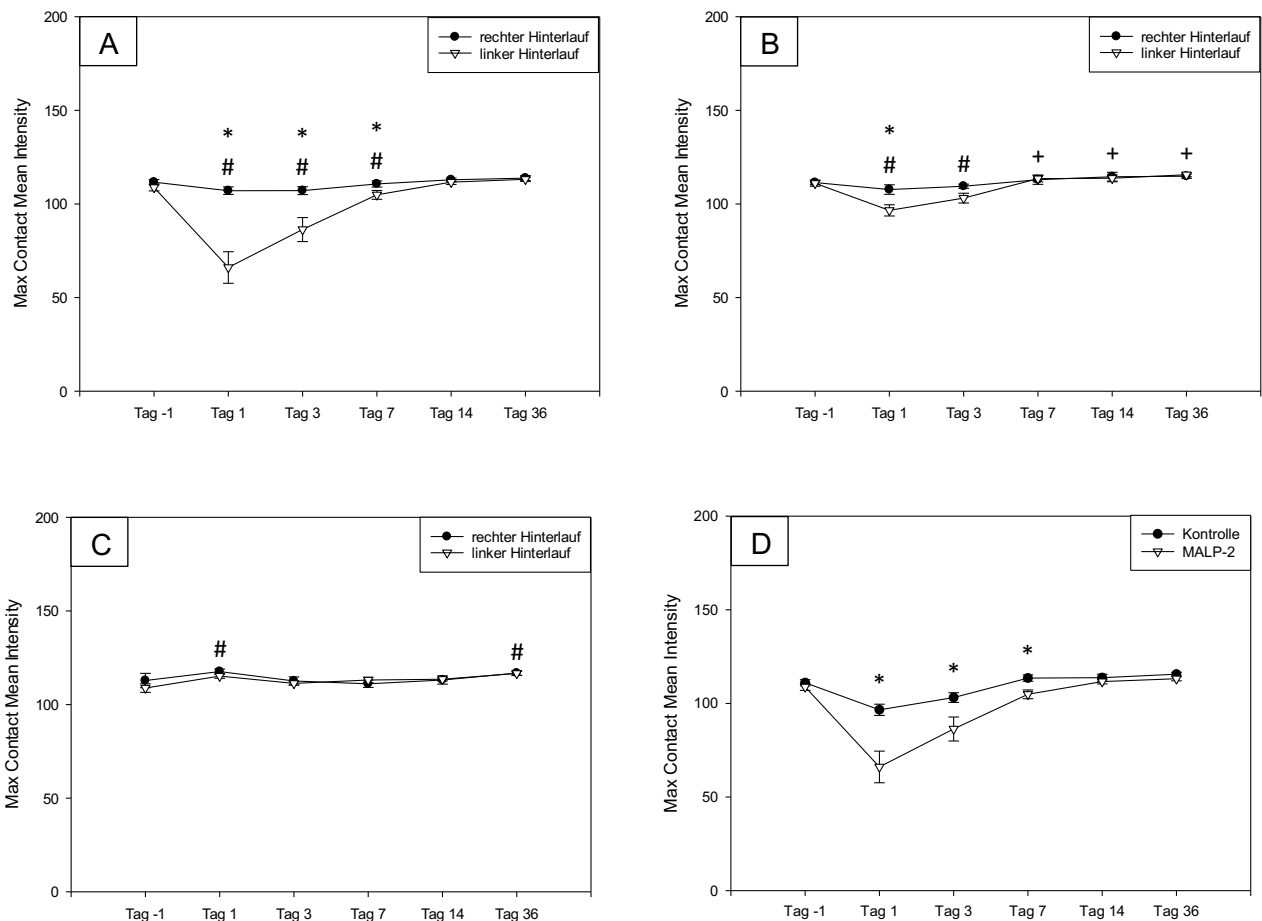


Abb. 23 zeigt den Verlauf des Parameters **Max Contact Mean Intensity**: Vergleich Verlauf von rechtem und linkem Hinterlauf über 36 Tage in **A** der MALP-2-Gruppe, **B** Kontroll-Gruppe und **C** in der Sham-Gruppe, **D** Vergleich des linken Hinterlaufes von MALP-2-/Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. linker Hinterlauf/MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 linker Hinterlauf/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 rechter Hinterlauf/Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	108,864 ± 1,872	111,091 ± 1,589	108,845 ± 2,29
Tag 1	66,054 ± 8,444	96,617 ± 2,97	115,229 ± 1,183
Tag 3	86,346 ± 6,455	103,164 ± 2,575	111,344 ± 0,838
Tag 7	104,886 ± 2,32	113,551 ± 1,7	113,159 ± 1,434
Tag 14	111,709 ± 1,286	113,779 ± 1,843	113,57 ± 0,898
Tag 36	113,211 ± 1,12	115,616 ± 1,062	116,729 ± 1,079

Tab. 24 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter **Max Contact Mean Intensity**.

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	108,864 ± 1,872	111,091 ± 1,589	108,845 ± 2,29
Tag 1	66,054 ± 8,444	96,617 ± 2,97	115,229 ± 1,183
Tag 3	86,346 ± 6,455	103,164 ± 2,575	111,344 ± 0,838
Tag 7	104,886 ± 2,32	113,551 ± 1,7	113,159 ± 1,434
Tag 14	111,709 ± 1,286	113,779 ± 1,843	113,57 ± 0,898
Tag 36	113,211 ± 1,12	115,616 ± 1,062	116,729 ± 1,079

Tab. 25 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter **Max Contact Mean Intensity**.

Regularity Index (%)

Innerhalb der MALP-2-Gruppe zeigte sich im Vergleich der Werte im zeitlichen Verlauf kein signifikanter Unterschied.

Auch im zeitlichen Verlauf der Kontroll-Gruppe unterschieden sich die Werte nicht signifikant zu Tag -1.

Innerhalb der Sham-Gruppe zeigte sich beim Parameter Regularity Index (%) kein signifikanter Unterschied der Werte von Tag -1 zu Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 36.

Beim Vergleich zwischen MALP-2- und Kontroll- Gruppe bezüglich des Parameters Regularity Index (%) konnte zwischen Kontroll- und MALP-2-Gruppe kein signifikanter Unterschied der Werte im zeitlichen Verlauf festgestellt werden.

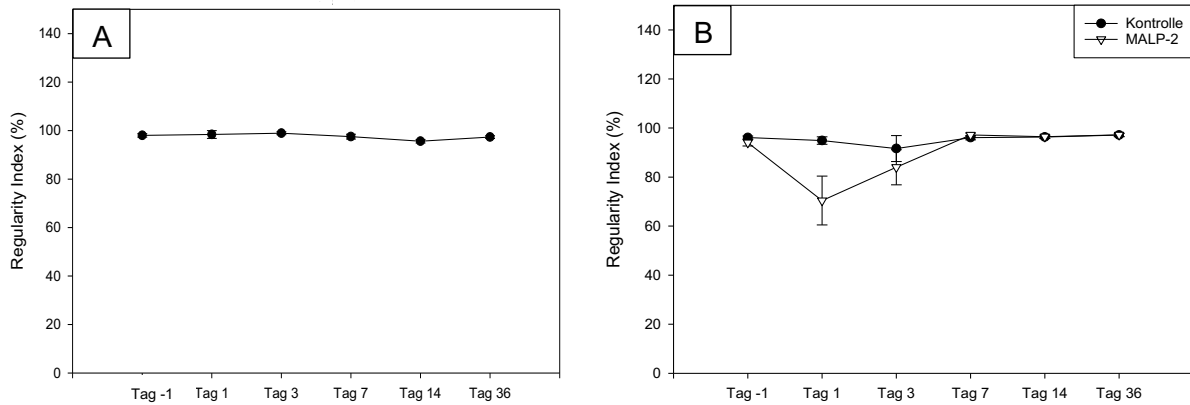


Abb. 24 zeigt den Verlauf des Parameters **Regularity Index (%)** über 36 Tage in **A** der Sham-Gruppe und **B** in MALP-2- und Kontroll-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. MALP-2, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 Sham/MALP-2, + $p < 0,05$ vs. Tag -1 Kontrolle).

	MALP-2	Kontrolle	Sham
Tag -1	94,044 \pm 1,341	96,131 \pm 0,643	98,028 \pm 0,719
Tag 1	70,438 \pm 9,972	94,89 \pm 1,543	98,405 \pm 1,595
Tag 3	84,019 \pm 7,156	91,623 \pm 5,287	98,935 \pm 0,616
Tag 7	97,172 \pm 0,79	96,086 \pm 0,902	97,525 \pm 0,975
Tag 14	96,477 \pm 0,748	96,323 \pm 0,606	95,642 \pm 0,716
Tag 36	97,211 \pm 0,657	97,155 \pm 0,678	97,33 \pm 0,565

Tab. 26 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler des Parameters **Regularity Index (%)**.

4.4 Biomechanik

Die biomechanische Auswertung zeigte einen signifikanten Unterschied sowohl zwischen der Interventionsgruppe und Kontroll-Gruppe an Tag 7 und Tag 36, als auch zwischen der operierten und nicht operierten Seite.

Innerhalb der 7-Tage-Gruppen zeigte sich links zwischen MALP-2-Gruppe und Kontroll-Gruppe ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Rechts hingegen konnte zwischen MALP-2-Gruppe und Kontroll-Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die MALP-2-Gruppe links unterschied sich signifikant zu MALP-2-Gruppe rechts ($p < 0,001$). Innerhalb der Kontroll-Gruppe links zeigte sich kein signifikanter Unterschied gegenüber rechts (Abb. 25.A). Innerhalb der 36-Tage-Gruppen zeigte sich links zwischen MALP-2-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Rechts zeigte sich zwischen MALP-2-Gruppe und Kontroll-Gruppe kein signifikanter Unterschied. Innerhalb der MALP-2-Gruppe unterschieden sich links signifikant gegenüber rechts ($< 0,05$). Kein signifikanter Unterschied

zeigte sich innerhalb der Kontroll-Gruppe von linkem Hinterlauf zu rechtem Hinterlauf (Abb. 25.B).

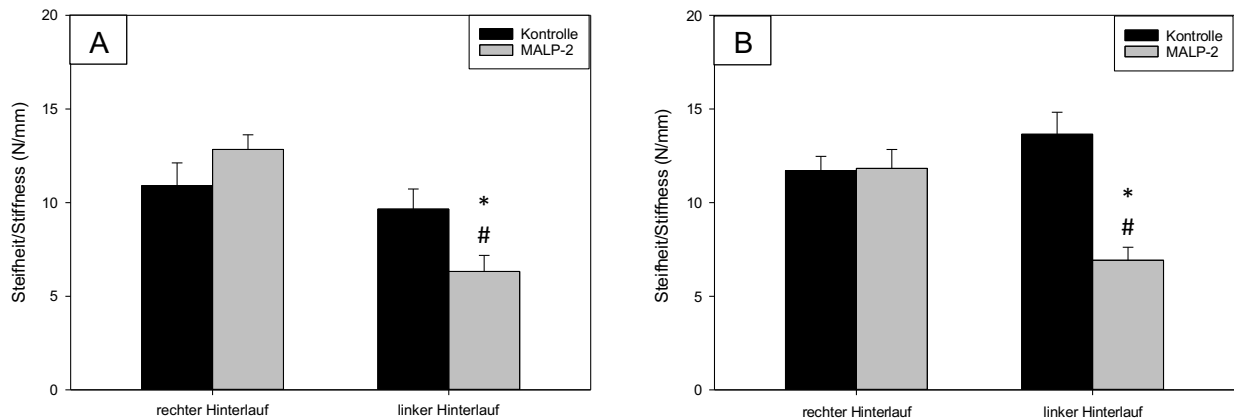


Abb. 25 zeigt den Vergleich der **Steifheit/Stiffness (N/mm)** zwischen rechter Sehne und linker Sehne nach **A** 7 Tagen und **B** 36 Tagen in der biomechanischen Testung. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. rechter Hinterlauf).

	Kontroll-Gruppe	MALP-2-Gruppe
rechts	10,907 \pm 1,217	12,84 \pm 0,785
links	9,653 \pm 1,074	6,323 \pm 0,863

Tab. 27 zeigt Mittelwert \pm Standardfehler der **Steifheit/Stiffness (N/mm)** nach 7 Tagen.

	Kontroll-Gruppe	MALP-2-Gruppe
rechts	11,71 \pm 0,761	11,829 \pm 1,011
links	13,651 \pm 1,177	6,921 \pm 0,697

Tab. 28 zeigt Mittelwert \pm Standardfehler der **Steifheit/Stiffness (N/mm)** nach 36 Tagen.

4.5 Western Blot

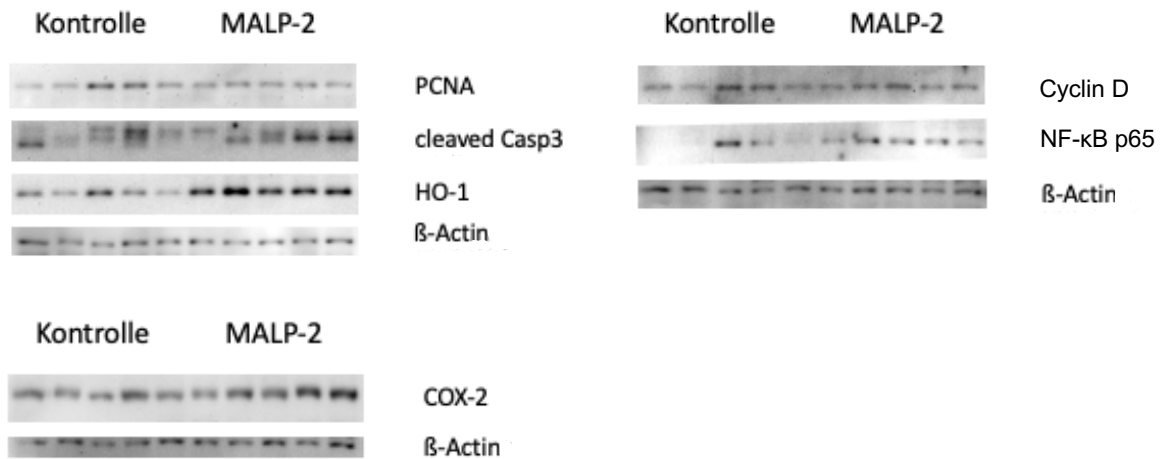
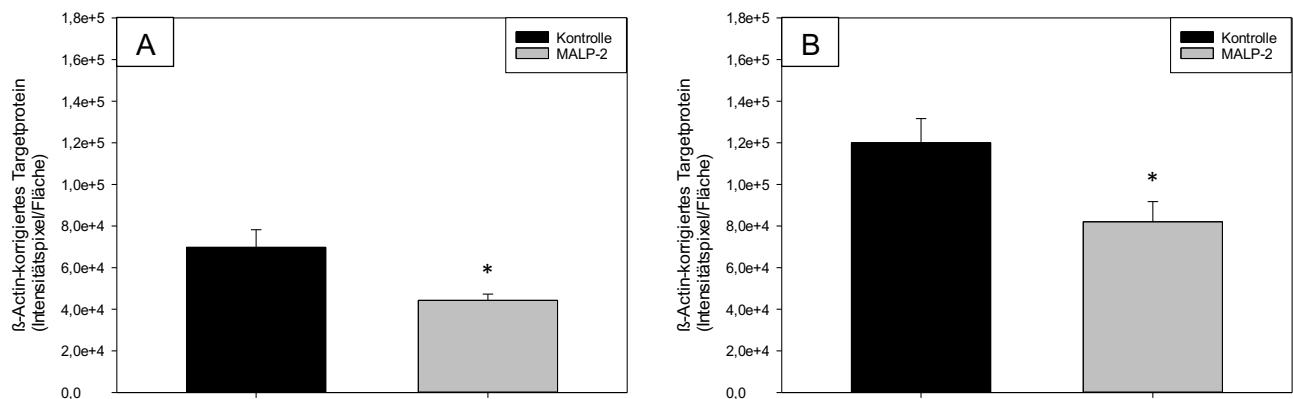


Abb. 26 zeigt die Banden der Western Blots der analysierten Proteine mit den jeweiligen dazugehörigen β-Actin-Banden.

Die statistische Auswertung der Western Blots zeigte, dass innerhalb der Kontroll-Gruppe statistisch signifikant mehr PCNA ($p < 0,05$) und Cyclin D ($p < 0,05$) im Vergleich zur MALP-2-Gruppe exprimiert wurde. Innerhalb der Kontroll-Gruppe wurde signifikant weniger HO-1 ($p < 0,05$) im Gegensatz zur Interventionsgruppe gebildet.

Kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MALP-2-Gruppe und Kontroll-Gruppe ergab sich in der quantitativen Expression von NF-κB, Casp3 und COX-2.



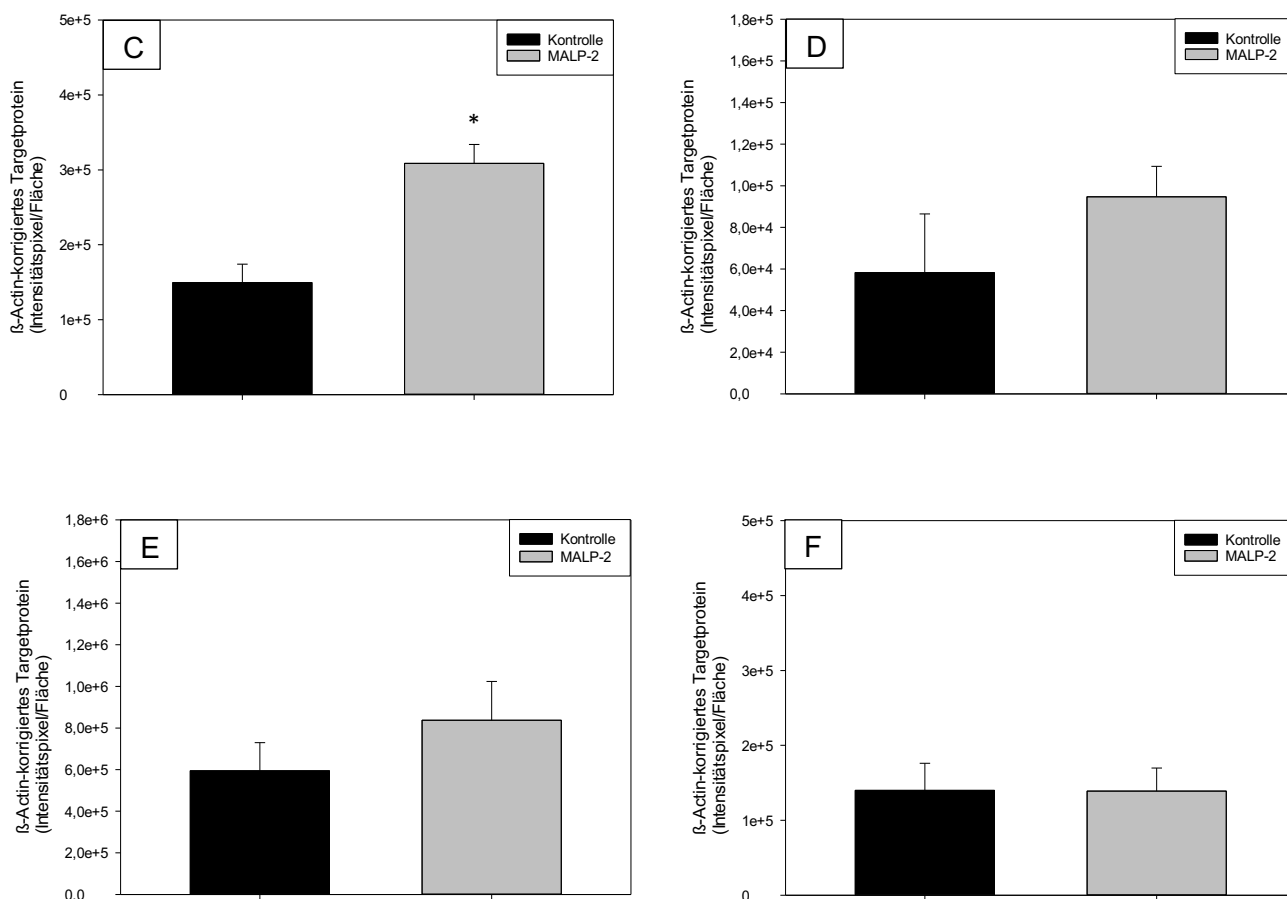


Abb. 27 zeigt den Vgl. zwischen Kontroll-Gruppe und MALP-2-Gruppe beim Nachweis von **A** PCNA **B** Cyclin D **C** HO-1 **D** NF-κB **E** COX-2 und **F** Casp3 im Western Blot. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben (*p<0,05 vs. Kontrolle).

	MALP-2-Gruppe	Kontroll-Gruppe
PCNA	44298,784 ± 2963,739	69739,68 ± 8497,461
Cyclin D	82066,37 ± 9708,111	120061,034 ± 11591,709
HO-1	308749,592 ± 25189,265	149589,674 ± 24549,780
NF-κB	94728,492 ± 14628,762	58241,99 ± 28232,757
COX-2	837687,084 ± 186294,880	594651,154 ± 134962,804
Casp3	138874,410 ± 30794,274	139919,796 ± 36172,529

Tab. 29 zeigt Mittelwert ± Standardfehler der einzelnen Proteinkonzentrationen im Western Blot.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Die Behandlung humaner Sehnenpathologien stellt bis zum heutigen Tage eine Herausforderung dar. So sind bei Sehnenverletzungen häufig operative Maßnahmen notwendig. In der Regel erfolgt die primäre Sehnennaht. Bei Versagen der Operationstechnik oder bei ausgeprägten Sehndefekten, wird häufig die sekundäre Transplantation eines Autografts, Allografts oder Xenografts notwendig. Diese Methoden sind allerdings durch die Morbidität der Donorseite, schlechter Transplantatintegration, der Formierung von Adhäsionen und hohen Raten von wiederkehrenden Zerreißen limitiert [245]. Um eine Operation, deren Nachteile und Komplikationen zu vermeiden, gibt es verschiedene Forschungsansätze, wie bspw. die lokale Applikation von Substanzen mit Regenerationspotential wie z. B. Mesenchymale Stammzellen oder einzelner Wachstumsfaktoren.

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind die meist genutzten Stammzellen beim Tissue engineering für Sehnen [38]. Multipotente mesenchymale Stammzellen können sich hierbei in gewebsspezifische Phänotypen differenzieren. Zudem können sie so für potente immunosuppressive und anti-inflammatorische Effekte sorgen. Allerdings konnte bis dato durch die isolierte Gabe von MSCs keine Verbesserung der Kraft und der Steifheit nach Heilung von intrasynovialen Sehndefekten in vivo gezeigt werden [126].

Ein anderer Ansatz ist die Applikation von Immunmodulatoren. Die Modulation der Inflammation in der frühen Phase der Sehnenheilung soll zu einem verbesserten Heilungsergebnis führen. Multiple Zytokine, Arachidonsäuremetabolite, Oxidantien und Proteasen modulieren die inflammatorische Antwort. Sie sollen die Entfernung von fremden Zellen, Debris und verletztem Gewebe erleichtern. Diese Produkte können hingegen auch eine sekundäre Verletzung des Gewebes induzieren [114]. Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren spielt eine wichtige Rolle während der Umbauphase der Sehnenheilung. Die Manipulation des Milieus von Wachstumsfaktoren stellt eine wichtige Strategie zur Verbesserung des Outcomes heilender Sehnen und Bänder dar [223]. Buchmann et al. applizierten Ratten u. a. G-CSF, welches zu einem verbesserten Sehnen-Remodelling führte [32]. Eine andere Studie benutzte den Immunmodulator TGF- β bei Ratten [100], dadurch wurde ein positiver Effekt von TGF- β auf die Versagenslast und Steifheit der Sehne demonstriert. Hierbei zeigte sich, dass TGF- β die Förderung des Matrixremodelling beeinflusst [223].

Die Untersuchung des Einflusses von Platelet derived growth factor (PDGF) auf die Sehnenheilung stellt einen weiteren Ansatz dar. Die Untersuchung erfolgte z. B. am Rattenmodell [216] und am Hund [222]. Die Applikation führte zu insbesondere funktionell verbesserten Eigenschaften nach Verletzung. Auch im Rattenmodell [36] [110] wurde der Einfluss von basic fibroblast growth factor/basischem Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) auf die Sehnenheilung erforscht. Beide Studien zeigten keinen eindeutig positiven Effekt von

bFGF auf die Sehnenheilung. PDGF und bFGF fördern effektiv die Fibroblastenproliferation und das Kollagenremodelling [223]. BFGF erhöht die Produktion von Kollagen-I und Kollagen-III [110]. Limitation der oben genannten Forschungsansätze ist die Fokussierung allein auf einzelne Wachstumsfaktoren, da die Regulierung der Inflammation durch Makrophagen eine wichtige Rolle im Heilungsprozess der Sehne darstellt.

Makrophagen induzieren verschiedene Wachstumsfaktoren und weitere inflammatorische Mediatoren. Ein besseres Verständnis der Signale, welche die Makrophagenaktivierung kontrollieren, ermöglicht fundamentale Erkenntnisse über den Ablauf von Gewebeausbesserung [48] [223]. Rekrutierung und Stimulation von Makrophagen mittels verschiedener Stoffe wurden bereits genutzt, um die Wundheilung in verschiedenen Tiermodellen zu beschleunigen [48].

In bisherigen Studien zeigte MALP-2 das Potential als Immunmodulator Makrophagen zu rekrutieren und über Makrophagen gleichzeitig verschiedene Wachstumsfaktoren zu stimulieren [117] [169]. Zwei essentielle Komponenten der Sehnenheilung könnten so positiv beeinflusst werden.

Deiters et al. zeigten, dass die topische Applikation von MALP-2 die Heilung durch Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen beschleunigt. Die Applikation von MALP-2 kann eine attraktive und ökonomisch günstige Alternative zur Applikation eines einzelnen Wachstumsfaktors bei chronischen Wunden darstellen, wenn der Grund der beeinträchtigten Heilung im Mangel suffizienter Trigger zur Initiierung des Heilungsprozesses liegt [48]. So weist MALP-2 hohe angiogenetische Eigenschaften auf [78], welche sich durch die inflammatorisch induzierte Angiogenese auch positiv auf die Sehnenheilung auswirken können. Ähnliche Effekte wurden bereits bei der Wundheilung und folgender Geweberegeneration nachgewiesen [78] [117].

Die Sehnenheilung stellt einen komplexen Mechanismus dar. Um diesen zu analysieren sind verschiedene Methoden notwendig. Hierzu erfolgt die in vivo Analyse intratendinöser Veränderungen zunehmend durch Ratten- und Mausmodelle aufgrund der breiten Verfügbarkeit, der geringen Haltungskosten sowie der zum Menschen analogen Anatomie und Physiologie. Die Ähnlichkeit zwischen Menschen und Nagetieren spiegelt sich genetisch wider, so stimmen 80-90% der Gene von Nagetieren mit denen von Menschen überein. Dadurch sind die Daten aus Studien an Mäusen und Ratten zur Übertragung auf den Menschen geeignet [234]. Die Maus verfügt über ein vielfältiges Angebot von genetisch veränderbaren Zielstrukturen, welche mit Sehnenheilung und -regeneration in Verbindung gebracht werden können [223]. Der Einfluss bestimmter Gene auf die Sehnenheilung kann anhand von Knockout-Mäusen weitergehend untersucht werden [5] [64] [124] [125]. Die

Tiergröße stellt eine Herausforderung und Limitierung im Hinblick auf operative Maßnahmen aufgrund der Größe der Sehne dar.

Um Veränderungen an Sehnen zu analysieren, wurden bereits verschiedene Forschungsansätze in der Literatur beschrieben. So unterscheidet man vollständige von partiellen Sehndefekten. Vollständige Sehndefekte können durch eine Tenotomie erzielt werden. Allerdings kann es bei vollständigen Sehndefekten zur Retraktion der Sehnenenden kommen, wodurch der Heilungsprozess die Überbrückung des Defektes erfordert [35]. Zur Überbrückung kommen z. B.: Allografts und Autografts [83] [84] [225] oder Nahtmaterial [40] [58] [171] zum Einsatz. Tissue Engineering könnte eine große Rolle in der Behandlung dieser Verletzungen spielen, weil neue Ansätze wie neue Materialien, bioaktive Moleküle oder Gentransfer, untersucht werden können [35]. Bei der Anwendung eines Tenotomiemodells sollten die biologischen Reaktionen und die Retraktion der Sehnenenden in der Analyse hinterfragt werden. Die Untersuchung eines biologischen Prozesses des Verletzungsortes (z. B. Inflammation) kann durch das Modell selbst beeinflusst werden, insbesondere beim Einsatz von allogenen Material oder Nahtmaterialien [21].

Um diese lokalen Reaktionen zu reduzieren und um einen standardisierten Defekt ohne Retraktion der Sehnenenden zu erreichen, wurde in dieser Studie ein partielles Tenotomiemodell verwendet [21]. Durch den standardisierten Defekt konnte makroskopisch bei allen Versuchstieren die gleiche Defektgröße erreicht werden und durch die partielle Läsion blieb die Sehne in ihrer Grundstruktur unverändert. Das Modell eignet sich zur Untersuchung von Medikamentenapplikation auf einen Defekt und war in Vorstudien bereits etabliert [44] [50]. Der Sehndefekt wurde in dieser Studie mittels Kanüle wie in der Literatur beschrieben herbeigeführt [44] [50]. Andere Autoren beschrieben die Erstellung des Defektes durch eine Stanzbiopsie [5] [6] [20] [21] [125] [254], auch diese ermöglicht eine reproduzierbare einheitliche Defektgröße, jedoch besteht ein höheres Verletzungsrisiko des angrenzenden Gewebes. Ein weiteres Verfahren zum Erreichen einer partiellen Sehnenverletzung stellt die partielle Lazeration der Sehne dar, hierbei werden ca. 50% der Sehnenfasern durchtrennt [21] [64] [201] [238] [239]. Nachteil der partiellen Lazeration ist das höhere Risiko einer resultierenden vollständigen Tenotomie oder sekundärer Sehnenruptur, sowie die Schwierigkeit der Reproduzierbarkeit der einheitlichen Defektgröße.

Die in bereits publizierten Studien am häufigsten genutzten Sehnen sind die Achillessehne [6] [21], die Patellarsehne [5] [20] [21] [125] [190] [201] und die Sehne des M. Flexor digitorum longus (FDL-Sehne) [21] [44] [64] [238] [239].

Die FDL-Sehne und Achillessehne eignen sich aufgrund ihrer Größe gut, um Verletzungen zu untersuchen. Der Nachteil der FDL-Sehne ist, dass mehr Gewebe mobilisiert werden muss, um die Sehne visualisieren und isolieren zu können [21].

Der Nachteil der offenen partiellen Tenotomie ist die erhöhte Weichteilschädigung und das Infektionsrisiko. Das Infektionsrisiko durch zusätzliches Fremdmaterial sollte so gering wie möglich gehalten werden. In dieser Studie zeigte keine Maus eine lokale Infektion. Vorteil der offenen partiellen Tenotomie ist, dass aufgrund der guten Visualisierung der Sehne, Komplikationen der Methode wie eine akzidentelle vollständige Tenotomie reduziert werden können. In dieser Studie kam es in keinem Fall zu einer akzidentellen vollständigen Tenotomie. Somit bestand lediglich durch die Narkose ein erhöhtes intraoperatives Risiko. Die Ausfallquote dieser Studie betrug 1,28%, dies ist vergleichbar mit anderen Studien [63].

Es existieren verschiedene Applikationsformen für ein Agens. Die einfachste Applikationsform ist die systemische Applikation. Aufgrund der systemischen Wirkung und der geringen biologischen Verfügbarkeit wird eine systemische Applikation nur selten angewendet. Nachteil besteht in unerwünschten systemischen Nebenwirkungen [126]. Dimmen et al. verabreichten Ratten über 7 Tage zweimal täglich Parecoxib oder Indometacin intraperitoneal. Die Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der Zugfestigkeit der Sehnen [53].

Weitere Applikationsform ist die Implantation von Scaffolds [39] [145] [176] [235].

Mit z.B. Wachstumsfaktoren beladene Scaffolds können standardisiert zwischen die Stümpfe behandelter Sehnen eingebracht werden. Andere Scaffolds werden an der Oberfläche behandelter Sehnen angebracht [126]. Durch Einbringen eines weiteren Trägermaterials kann ein weiterer Einfluss auf die Heilung erfolgen, der nicht von dem zu untersuchenden Agens ausgeht. Um diese Einflüsse zu reduzieren, beschrieben verschiedene Autoren die Applikation der Lösung in den Wunddefekt im Sinne eines single-shots [92] [106] [110]. Vorteil ist die einfache und einmalige Applikation. Nur das Agens wird appliziert und damit zusätzliche Wechselwirkungen aufgrund weiterer Bestandteile ausgeschlossen. Zu den Limitationen zählt, dass ggf. ohne einen unterstützenden Scaffold nur wenige Zellen auf die Zielstruktur transplantiert werden. Das applizierte Agens wirkt ggf. nur kurz an der Zielstruktur und diffundiert dann in das umliegende Gewebe. Vorausgegangene Studien zeigten, dass biologische Interventionen eine kontrollierte raumzeitliche Gabe erfordern, um die Heilung zu verbessern [126]. Diese konnte für MALP-2 bei single-shot Applikation bereits gezeigt werden [48]. Durch diese Applikationsform konnten mögliche Interferenzen durch Gele oder Scaffolds ausgeschlossen werden.

Die Etablierung eines geeigneten Messverfahrens des klinischen Verlaufs nach partieller Tenotomie und somit Evaluation des Heilungsverlaufes der Sehne nach klinischen Gesichtspunkten ist bis heute nur in wenigen Studien beschrieben worden. Es besteht derzeit keine ausreichende Datenlage bezüglich des klinischen Outcomes bei Mäusen nach partieller Tenotomie.

In klinischen Arbeiten ist es relevant, eine Ganganalyse durchzuführen. Diese Ganganalyse kann durch verschiedene Varianten erfolgen. Bei Tiermodellen wird die Ganganalyse bis dato selten eingesetzt.

Zur Ganganalyse wurden verschiedene Untersuchungen entwickelt. Zum Beispiel das Messen von Winkelvariationen von Gelenken auf einem Laufband ggf. in Kombination mit simultaner Elektromyographie. Nachteil dieser Methode ist der hohe Aufwand der Datenanalyse und die Invasivität des EMGs [154]. Die von Histing et al. genutzte Ganganalyse mittels digitaler Videoradiographie ist bereits etabliert, allerdings ist diese Methode invasiv, da hierzu Metallpins in das Femur und die Tibia zur Markierung und anschließenden Analyse eingebracht werden müssen. Die Inflammation und die erhöhte Strahlenbelastung durch die operativ eingebrachten Pins, sowie das intraoperative Trauma können Einfluss auf das Gangbild haben [88].

Eine andere Methode ist die Maus mit Tinte überzogenen Pfoten auf weißem Papier laufen zu lassen, dadurch können die entstandenen Laufmuster analysiert werden. Allerdings kann hierdurch keine Aussage über dynamische Parameter getroffen werden [154]. Auch kann die Geschwindigkeit, als kritische Ko-Variable für fast alle Gangparameter, nicht gemessen werden. Zudem ist die Menge an Tinte zwischen den Schritten und den Versuchen inkonsistent [116].

Um eine automatisierte und konsistente Analyse zu gewährleisten, wurde in den letzten Jahren zunehmend das CatWalk zur Datenerfassung und Analyse in der Literatur etabliert [4] [28] [31] [51] [60] [69] [81] [82] [87] [90] [146] [159] [178] [227] [257], dadurch kann eine objektive Quantifizierung von multiplen statischen und dynamischen Gangparametern erreicht werden [227].

In dieser Studie wurden multiple statische und dynamische Parameter des Gangbildes der Versuchstiere untersucht, um die Validität der Methode zu evaluieren.

Fast alle Gangparameter stehen zueinander in Beziehung und eine Reihe von Gangparametern sind notwendig, um kompensatorische Gangmuster zu verstehen. Eine Veränderung bei einem einzelnen Gangparameter erklärt unmöglich alle biomechanischen Zusammenhänge [116].

In Vorversuchen zu dieser Studie konnten durch die Ganganalyse mittels CatWalk bereits in vivo Unterschiede des Gangbildes zwischen verschiedenen Sehnen-Modellen gezeigt werden. So konnten signifikante Unterschiede zwischen der Sehne des M. Flexor digitorum longus im Vergleich zur Patellarsehne sowie der Achillessehne nachgewiesen werden [67]. So zeigte sich, dass mit Hilfe der CatWalk Methode bereits bei partiellen Tenotomien Unterschiede detektiert werden können.

Die analysierten Parameter wurden bereits in verschiedenen Studien eingesetzt (siehe Tabelle 30 im Anhang). Aufgrund des Einflusses der Geschwindigkeit auf das Gangbild, wurde

zunächst der Parameter Run Duration gewählt. Unterschiedlichen Ganggeschwindigkeiten können biomechanischen Differenzen zu Grunde liegen, sodass ein Unterschied in der Ganganalyse berücksichtigt werden muss [99].

Um die komplexen Bewegungen des Ganges zu beschreiben, sind mehrere Gangparameter notwendig. So können Parameter wie Geschwindigkeit, Schrittlänge (Stride Length), Standzeit (Stand), Schwungzeit (Swing), Regularity Index und die Pfotenanzahl, die den Körper unterstützt [224], die Gangsicherheit und Gangart beschreiben. Durch die druckabhängigen Parameter wie Intensität, Print Area und Max Contact Area kann in Zusammenschau die Belastbarkeit einer Pfote abgeleitet werden [31] [51].

Die Heilung von Sehnen umfasst eine zeitlich abhängige Reaktion auf Verletzungen, sodass experimentelle Zeitpunkte beachtet werden müssen, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten [30]. Die Untersuchungszeitpunkte der Ganganalyse und somit des klinischen Verlaufes orientierten sich an dem natürlichen Heilungszeitraum einer Sehne. Zunächst erfolgt eine Inflammationsphase an Tag 1-2 nach der Verletzung [161]. Daher wurde Tag 1 als erster postoperativer Untersuchungstag gewählt. An den Tagen 2-4 schließt sich eine Proliferationsphase an [161], weshalb der nächste Untersuchungszeitpunkt an Tag 3 postoperativ gewählt wurde. Von Tag 4 bis Tag 14 folgt im Prozess eine Reparationsphase [161]. Deshalb wurde Tag 7 als Untersuchungszeitpunkt verwendet, da zu diesem Zeitpunkt in der Regel die Revaskularisation des Gewebes begonnen hat und die Organisation des Defektes beginnt. Tag 14 markiert im Heilungsmodell den Beginn der Umbauphase [161], sodass dieser Tag zur Beurteilung des klinischen Verlaufes ausgewählt wurde. Ab Tag 21 nähern sich die Kollagenverhältnisse, der Wassergehalt und die Zellularität normalen Niveaus an [161]. Um somit den fortgeschrittenen Heilungsprozess beurteilen zu können, wurde Tag 36 postoperativ gewählt. Ein ähnliches Versuchsprotokoll ist bereits in der Literatur etabliert [10].

Zur biomechanischen und molekularbiologischen Untersuchung durch bereits etablierte Methoden war eine Tötung der Tiere notwendig.

Palmer et al. wählten als Zeitpunkte der biomechanischen Testung die postoperativen Tage 4, 8, 12, 16, 35 und 112 zur Untersuchung von langzeit-biomechanischen Effekten [177]. Lin et al. führten die biomechanischen Testungen nach 1, 3, 6 und 12 Wochen postoperativ durch [125], Beason et al. untersuchten 3 Wochen postoperativ [20] [21]. Loieselle et al. testeten Tag 0, 14, 21, 28, 42 und 63 Tage nach Operation [130]. Da in dieser Studie der frühzeitige Effekt von MALP-2 untersucht werden sollte, wurden die Zeitpunkte an den physiologischen Heilungsverlauf angelehnt ausgewählt. Die biomechanische Testung erfolgte an Tag 7

postoperativ zur Evaluation der Auswirkung von MALP-2 in der inflammatorischen Phase der Heilung der Sehne. Um eine abschließende Bewertung der biomechanischen Entwicklung nach Proliferations- und Umbauphase durchführen zu können, wurde als weiterer Zeitpunkt der 36. postoperative Tag gewählt.

Zur biomechanischen Untersuchung wurde die Sehne entsprechend dem Protokoll von Beason et al. präpariert [21]. Die Sehnen wurden reseziert und der Defekt, welcher am distalen Ende der Sehne gelegen war, wurde in eine angefertigte Konstruktion eingebracht. Die Konstruktion bestand aus zwei Klemmen, zwischen denen die Sehne aufgespannt wurde. Nachteil war das mögliche Herausgleiten der Sehne aus der Konstruktion. Mit der Konstruktion wurde die Sehne daraufhin nach etabliertem uniaxialen Zugversuch bis zum Versagen getestet [11] [44] [107] [143] [177]. Mehrmaliges Vorbelasten bei zyklischen Testungen wird zur Präkonditionierung von Sehnen eingesetzt [20] [21] [167] [179] [252]. Es kommt zu einer Zunahme der Steifigkeit beim Vordehnen der Sehne. Um ein mögliches frühzeitiges Versagen auszuschließen, wurde die vorherige zyklische Testung nicht durchgeführt.

Die Universalprüfmaschine stellt in einem Kraft-Weg-Diagramm die Messgrößen Längenänderung ΔL [mm], maximale Kraft F_{max} [N] und die Versagenskraft F [N] am Ende dar [85]. In der Literatur benutzte berechnete Materialparameter sind die Zugfestigkeit [134] [242] [248] und das Elastizitätsmodul/Young's Modulus [5] [20] [21] [56] [65] [125]. Für diese Materialparameter wird der Sehnendurchmesser benötigt. Die Messung des Durchmessers ist aufwändig und kann je nach Methode zu weiteren Ungenauigkeiten führen [85]. Als reliabler wurde in der Literatur der Parameter Steifigkeit ($F/\Delta L$) beschrieben [44] [56] [65] [133]. Dieser Parameter lässt sich aus den aufgezeichneten Diagrammen berechnen. Der Wert der Steifigkeit reflektiert den gesundheitlichen Zustand der Sehne [49]. Entsprechend wurde dieser Parameter hier in der Studie angewendet.

Der Western Blot ist ein etabliertes molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Neben dem Nachweis von Stoffwechselproteinen [8] [9] [181] [249] [254] können auch spezifische Strukturproteine der Sehne, beispielsweise Kollagene und Proteoglykane, nachgewiesen werden [10] [188] [189] [246].

So wurden bis dato verschiedene Faktoren in Zusammenhang mit der Sehnenheilung analysiert [38] [55]. Chen et al. zeigten eine erhöhte Genexpression von connective tissue growth factor (CTGF), transforming growth factor β (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF) und insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in der frühen Inflammationsphase.

Die Genexpression von Basic fibroblast growth factor (bFGF) präsentierte sich herabreguliert, während die von platelet derived growth factor B (PDGF-B) sich nur minimal verändert zeigte. Der Einfluss von MALP-2 auf die Sehnenheilung wurde bis dato in keiner Studie mittels Western Blot untersucht.

Neben biomechanischer und molekularbiologischer Untersuchung werden in der Literatur weitere Methoden zur Untersuchung der Sehnenheilung angewendet.

Die histologische Analyse des Sehnengewebes bzw. des Regeneratgewebes ermöglicht die Untersuchung zellmorphologischer Unterschiede im Vergleich zu gesunden Sehnen [95] [96] [145] [175]. Mit einer mehrzeitigen histologischen Auswertung kann der Heilungsverlauf beurteilt werden [133] [247]. Limitationen der Methodik sind bei Sehnen vielfältig. Die Größe sowie die Dicke der entnommenen Sehne der Maus ist gering. Somit ist pro Entnahme nur wenig Material vorhanden. Nur wenige Schnitte können pro Sehne hergestellt werden. Durch dickere Schnitte kann das Reißen des Schnitts reduziert werden, allerdings wird die mikroskopische Beurteilbarkeit stark eingeschränkt. Außerdem verringert sich dadurch nochmals die Anzahl möglicher Schnitte einer Sehne. Des Weiteren, sollte die zu analysierende Defektzone im histologischen Präparat abgebildet werden. Da diese Kriterien nicht erfüllt werden konnten, fokussierte sich diese Studie auf die Analyse der dynamischen Gangparameter, die biomechanische Belastbarkeit der Sehnen, sowie die molekularbiologische Analyse mittels Western Blot.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die postoperative Entwicklung des Körpergewichtes der Versuchstiere zeigte keine relevanten Unterschiede innerhalb der Gruppen, sodass der operative Eingriff und die Applikation der Medikation über den Beobachtungszeitraum zu keiner Änderung der Nahrungsaufnahme führten. Somit wurden der Eingriff und die Applikation durch die Versuchstiere gut vertragen. Des Weiteren kam es in keinem Fall zu einer postoperativen Infektion des Operationsgebietes, sodass die durchgeführte Intervention als alleinige Ursache der Veränderung des Gangbildes gewertet werden kann.

Im Vergleich zur gesunden Gegenseite und der Kontroll-Gruppe, zeigten sich die durch CatWalk Noldus TM analysierten funktionellen Parameter überwiegend bis zum 7. postoperativen Tag in der MALP-2-Gruppe verändert. Hierbei zeigte sich im Verlauf die Run Duration in Interventionsgruppe und Kontroll-Gruppe ab dem 3. Tage postoperativ signifikant reduziert, was durch einen Gewöhnungseffekt an das CatWalk-System durch die Mäuse erklärt werden kann. Gabriel et al. zeigten, dass dieser Gewöhnungseffekt im Rahmen der wiederholten Nutzung auftreten kann [69]. Da sich die Run Duration in gleichem Maße in beiden Gruppen veränderte, ist das Gangbild dennoch vergleichbar. Die funktionelle Belastung der operierten linken hinteren Extremität zeigte sich im Vergleich zur kontralateralen gesunden Seite in beiden Gruppen verändert. Hierbei waren signifikante Unterschiede des Belastungsanteils und der belasteten Fläche der linken hinteren Extremität in beiden Gruppen

bis zum Tag 3 postoperativ nachweisbar. Insbesondere die Abdruckkraft (Max Contact Max Intensity, Max Contact Mean Intensity) zeigte sich in beiden Gruppen signifikant reduziert, die mit MALP-2 behandelte Gruppe präsentierte sogar bis zum 7. postoperativen Tag eine reduzierte Abdruckkraft. In der Sham-Gruppe, konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden hinteren Extremitäten gezeigt werden, weshalb die Ergebnisse als Folge der partiellen Tenotomie und Applikation der Wirkstoffe (MALP-2 und Isopropanol) zu werten sind.

Im Vergleich von Interventions- und Kontroll-Gruppe zeigten sich signifikante funktionelle Unterschiede der Gangbilder. So wies die MALP-2-Gruppe einen signifikant verminderten Anteil der Belastung bei verlängerter Schwungphase im Vergleich zur Kontroll-Gruppe auf. Außerdem zeigte sich die maximale Kontaktfläche und die Pfotenfläche der MALP-2-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nur am 1. postoperativen Tag signifikant verringert und am 14. Tag signifikant erhöht. Dieser funktionelle Unterschied, kann durch eine MALP-2 induzierte Inflammation erklärt werden.

Deiters et al. zeigten, dass MALP-2 gerade diese frühe inflammatorische Phase triggert [48], wodurch dieses Ergebnis erklärt werden kann. Am 3. postoperativen Tag waren keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen beiden Gruppen nachweisbar. Die Inflammationsphase konnte bereits in anderen Studien [37] [59] [145] im Rahmen des Heilungsprozesses nach dem Trauma durch die induzierte Sehnenverletzung nachgewiesen werden. Der relative Mangel von Zellen in intrasynovialen Gewebe führt zu einer Verzögerung der Migration von oberflächlichen Sehnenzellen und extrinsischen Zellen aus der Synovialscheide. Hierbei scheint der Effekt von MALP-2 in der frühen inflammatorischen Phase erhöht, reduziert sich allerdings im weiteren Verlauf zunächst auf ein physiologisches Level aufgrund der Diffusion ins umgebende Gewebe [48]. Dennoch zeigt sich am 14. postoperativen Tag eine signifikant vergrößerte Fläche und der maximalen Kontaktfläche beim Auftritt der Pfote, welche als reaktive Gegenreaktion auf das vorher bestehende veränderte Gangbild und Inflammation gewertet werden kann [158] [193]. Dieser Effekt war nur in der MALP-2-Gruppe nachweisbar, jedoch ohne signifikante Veränderung zur gesunden Gegenseite. Somit verändert die Behandlung mit MALP-2 nicht nur das Gangbild der operierten hinteren Extremität, sondern das gesamte Gangbild der Maus. Dieses normalisiert sich im weiteren Zeitverlauf bis zum Tag 36 postoperativ, da hier keine Unterschiede mehr zwischen den beiden Gruppen und den hinteren Extremitäten nachgewiesen werden konnten. Um die Gangdynamik zu analysieren, wurde des Weiteren die Abdruckkraft (Max Contact Max intensity, Max Contact Mean Intensity) ausgewertet. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der MALP-2 Gruppe und der Kontroll-Gruppe von Tag 1 bis zum Tag 7. Somit könnte die Inflammation die Schmerzinduktion erhöhen. Allerdings zeigte sich kein

Unterschied in der Belastung der Pfote ab dem 7. postoperativen Tag in beiden Gruppen, sodass dies durch eine strukturelle Veränderung erklärbar ist.

Die biomechanische Analyse der Steifigkeit der Sehnen im Auszugsversuch erfolgte an Tag 7 und 36 postoperativ. Hierbei zeigten sich die mit MALP-2 behandelten Sehnen im Vergleich zur gesunden Gegenseite und zur Kontroll-Gruppe eine signifikant reduzierte Steifigkeit, welche sich in der reduzierten Belastbarkeit der behandelten Extremität demonstrierte. Die erhöhte Steifigkeit wird in der Literatur als positiver Parameter für die Heilung von Sehngewebe angewendet [191] [212].

So zeigten Delalande et al. in der Behandlung von Achillessehnenotomien, dass die reduzierte Steifigkeit des Sehngewebes zu einer strukturell reduzierten Architektur führt [49].

Der Behandlung mit einzelnen Zytokinen und Wachstumsfaktoren der Frühphase konnte in der Literatur ein positiver Effekt auf die Sehnenheilung bei gesteigerter Steifigkeit der Sehne zugeschrieben werden.

Kashiwagi et al. konnten nach der Applikation von TGF beta-1 tenotomierter Achillessehnen im Rattenmodell eine signifikante Steigerung der Steifigkeit der geheilten Sehne zwei und vier Wochen postoperativ nachweisen [100]. Auch die Applikation von Plättchenreichem Plasma-Gel auf Patellarsehnen bei Hasen zeigte eine signifikante Verbesserung der Steifigkeit nach 14 Tagen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe [134].

Somit haben Wachstumsfaktoren und Zytokine der frühen inflammatorischen Phase einen signifikanten Einfluss auf das Sehnenregenerat [202]. Durch Wachstumsfaktoren und Zytokine wandern vermehrt Immunzellen wie Makrophagen ins Sehngewebe ein [37] [199] [202]. Eine Veränderung dieses physiologischen Prozesses kann die Heilung verbessern oder verschlechtern.

So zeigte sich, dass durch die Depletion von Makrophagen die Sehnenheilung im Vergleich zu Wildtypmäusen verbessert werden konnte. De la Durantaye et al. führten dies auf das im physiologischen Zustand erhöhte Makrophagen-induzierte Stresslevel zurück. Aufgrund der früher einsetzenden Inflammation durch die Behandlung mit MALP-2, ist ebenfalls von einer, wie bereits in Vorstudien nachgewiesenen [48] [131], erhöhten Anzahl von Makrophagen im Sehngewebe auszugehen. Dies konnte allerdings histologisch nicht sicher bewiesen werden, sodass hierzu weiterführende Untersuchungen mittels Western Blot von gesundem Sehngewebe durchgeführt wurden, um das induzierte Stresslevel weiterführend zu untersuchen.

Im Western Blot zeigte die MALP-2-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe einen signifikant erhöhten intrazellulärem oxidativen Stress bei signifikant erhöhtem HO-1. Die erhöhte

intrazelluläre HO-1 Expression dient der Gegenregulation, wodurch erhöhte Level auf intrazellulären Stress schließen lassen [136]. Der erhöhte intrazelluläre Stress führte weiter zu einer geringeren Proliferation des Gewebes. Dies konnte durch ein signifikant reduziertes PCNA und Cyclin D in der MALP-2-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden. Die Proliferation wurde allerdings nicht durch Apoptose gehemmt. Denn es zeigten sich keine erhöhten Werte von Caspase 3, welche bei Apoptose nachweisbar ist. Auch in anderen Geweben, wie humanen mesenchymalen Zellen aus dem Amnion, führte MALP-2 nicht zu erhöhter Apoptose [195].

Die Konzentration des applizierten MALP-2 ist in Bezug auf den erhöhten intrazellulären Stress relevant. So konnten Ma et al. in einer vergleichbaren Western Blot Untersuchung eine erhöhte HO-1 Expression in humanen monozytischen T-Helferzellen-1 mit linearem Anstieg in Abhängigkeit der MALP-2 Konzentration nachweisen [136]. In dieser Studie wurde entsprechend der Literatur eine Konzentration von MALP-2 gewählt, welche der mittleren Dosis entspricht [136].

Entzündungsmarker wie NFκB und COX-2 waren tendenziell in der MALP-2-Gruppe stärker exprimiert, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Ein Anstieg von Entzündungsmarkern unterstützt die These der überschießenden inflammatorischen Wirkung. Mitsunari et al. zeigten an humanen plazentaren Trophoblasten die Induktion von COX-2 [156]. Dies konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Dennoch lässt die tendenzielle Erhöhung von den Entzündungsmarkern NFκB und COX-2 in der MALP-2-Gruppe auf eine pro-inflammatorische Genese schließen. Dies könnte u.a. eine Erklärung für die funktionellen und biomechanischen Ergebnisse dieser Studie sein.

5.3 Fazit

Obwohl MALP-2 das Heilungspotential in vorangegangenen Studien für Hautdefekte zeigen konnte, profitiert die frühe Sehnenheilung nicht von einer Behandlung mittels MALP-2. Es präsentierte sich ein negativer Einfluss von MALP-2 auf die Strukturintegrität der Sehne. Die Behandlung mit MALP-2 zeigte in der biomechanischen Testung eine signifikant reduzierte Steifheit der Sehne. Bereits durch die Ganganalyse konnte frühzeitig ein Hinweis auf die reduzierte Heilungstendenz aufgrund der reduzierten Belastung des operierten Hinterlaufes nach MALP-2-Behandlung gezeigt werden. In vitro löst MALP-2 bei unbehandelten Sehnen eine erhöhte Stressreaktion mit inhibierter Proliferation aus, jedoch keine Apoptose.

Leider konnten die hohen Erwartungen an MALP-2 nicht erfüllt werden. Somit ergibt MALP-2 keinen Vorteil gegenüber anderen sich in der Forschung befindlichen Wirkstoffen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abraham NG, Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Stoltz RA, Levere RD, Gerritsen ME, Shibahara S, Kappas A (1995) Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc Natl Acad Sci* 92:6798–6802
2. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124:783–801
3. Andarawis-Puri N, Flatow EL, Soslowky LJ (2015) Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 33:780–784
4. Angeby-Möller K, Berge O-G, Hamers FPT (2008) Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: effects of morphine and rofecoxib. *J Neurosci Methods* 174:1–9
5. Ansorge HL, Beredjikian PK, Soslowky LJ (2009) CD44 deficiency improves healing tendon mechanics and increases matrix and cytokine expression in a mouse patellar tendon injury model. *J Orthop Res* 27:1386–1391
6. Ansorge HL, Hsu JE, Edelstein L, Adams S, Birk DE, Soslowky LJ (2012) Recapitulation of the Achilles tendon mechanical properties during neonatal development: a study of differential healing during two stages of development in a mouse model. *J Orthop Res* 30:448–456
7. Apostolakos J, Durant TJ, Dwyer CR, Russell RP, Weinreb JH, Alaei F, Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, Mazzocca AD (2014) The enthesis: a review of the tendon-to-bone insertion. *Muscles Ligaments Tendons J* 4:333–342
8. Arnoczky SP, Tian T, Lavagnino M, Gardner K, Schuler P, Morse P (2002) Activation of stress-activated protein kinases (SAPK) in tendon cells following cyclic strain: the effects of strain frequency, strain magnitude, and cytosolic calcium. *J Orthop Res* 20:947–952
9. Arnoczky SP, Tian T, Lavagnino M, Gardner K (2004) Ex vivo static tensile loading inhibits MMP-1 expression in rat tail tendon cells through a cytoskeletonally based mechanotransduction mechanism. *J Orthop Res* 22:328–333

10. Aro AA, Simões GF, Esquisatto M a. M, Foglio MA, Carvalho JE, Oliveira ALR, Gomes L, Pimentel ER (2013) Arrabidaea chica extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury* 44:884–892
11. Aro D, Aparecida A, Carneiro GD, Teodoro LFR, Veiga D, Cristina F, Ferrucci DL, Simões GF, Simões PW, Alvares LE, Oliveira D, R AL, Vicente CP, Gomes CP, Pesquero JB, Esquisatto MAM, De Campos Vidal B, Pimentel ER (2018) Injured Achilles Tendons Treated with Adipose-Derived Stem Cells Transplantation and GDF-5. *Cells* 7:127
12. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spänel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch H-G, editors (2014) *Anatomie*. 3rd edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
13. Badylak SF, Tullius R, Kokini K, Shelbourne KD, Klootwyk T, Voytik SL, Kraine MR, Simmons C (1995) The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achille's tendon repair in a dog model. *J Biomed Mater Res* 29:977–985
14. Bae S-H, Seo Y-S (2000) Characterization of the Enzymatic Properties of the Yeast Dna2 Helicase/Endonuclease Suggests a New Model for Okazaki Fragment Processing. *J Biol Chem* 275:38022–38031
15. Bagchi S, Weinmann R, Raychaudhuri P (1991) The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 65:1063–1072
16. Bandara LR, La Thangue NB (1991) Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 351:494–497
17. Baschang G (1989) Muramylpeptides and lipopeptides: Studies towards immunostimulants. *Tetrahedron* 45:6331–6360
18. Bates S, Bonetta L, MacAllan D, Parry D, Holder A, Dickson C, Peters G (1994) CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 9:71–79
19. Bauer GA, Burgers PM (1990) Molecular cloning, structure and expression of the yeast proliferating cell nuclear antigen gene. *Nucleic Acids Res* 18:261–265

20. Beason DP, Abboud JA, Kuntz AF, Bassora R, Soslowky LJ (2011) Cumulative effects of hypercholesterolemia on tendon biomechanics in a mouse model. *J Orthop Res* 29:380–383
21. Beason DP, Kuntz AF, Hsu JE, Miller KS, Soslowky LJ (2012) Development and Evaluation of Multiple Tendon Injury Models in the Mouse. *J Biomech* 45:1550–1553
22. Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG (1997) Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev* 11:1–10
23. Benjamin M, Ralphs JR (1997) Tendons and ligaments--an overview. *Histol Histopathol* 12:1135–1144
24. Benjamin M, Kumai T, Milz S, Boszczyk BM, Boszczyk AA, Ralphs JR (2002) The skeletal attachment of tendons--tendon "entheses." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133:931–945
25. Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S (2006) Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat* 208:471–490
26. Benjamin M, Kaiser E, Milz S (2008) Structure-function relationships in tendons: a review. *J Anat* 212:211–228
27. Berenson MC, Blevins FT, Plaas AHK, Vogel KG (1996) Proteoglycans of human rotator cuff tendons. *J Orthop Res* 14:518–525
28. Bernardes D, Oliveira ALR (2017) Comprehensive catwalk gait analysis in a chronic model of multiple sclerosis subjected to treadmill exercise training. *BMC Neurol* 17:160
29. Biermann H (1957) Die Knochenbildung im Bereich periostaler-diaphysärer Sehnen- und Bandansätze. *Z Für Zellforsch Mikrosk Anat* 46:635–671
30. Bottagisio M, Lovati AB (2017) A review on animal models and treatments for the reconstruction of Achilles and flexor tendons. *J Mater Sci Mater Med* 28:45

31. Bozkurt A, Deumens R, Scheffel J, O'Dey DM, Weis J, Joosten EA, Führmann T, Brook GA, Pallua N (2008) CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurosci Methods* 173:91–98
32. Buchmann S, Sandmann GH, Walz L, Hoppe H, Beitzel K, Wexel G, Tian W, Winter G, Imhoff AB (2013) Refixation of the supraspinatus tendon in a rat model—influence of continuous growth factor application on tendon structure. *J Orthop Res* 31:300–305
33. Butler DL, Goldstein SA, Guilak F (2000) Functional Tissue Engineering: The Role of Biomechanics. *J Biomech Eng* 122:570–575
34. Butler DL, Juncosa N, Dressler MR (2004) Functional Efficacy of Tendon Repair Processes. *Annu Rev Biomed Eng* 6:303–329
35. Carpenter JE, Hankenson KD (2004) Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Biomaterials* 25:1715–1722
36. Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K (2000) Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: A rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand* 71:513–518
37. Chbinou N, Frenette J (2004) Insulin-dependent diabetes impairs the inflammatory response and delays angiogenesis following Achilles tendon injury. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 286:R952–R957
38. Chen CH, Cao Y, Wu YF, Bais AJ, Gao JS, Tang JB (2008) Tendon Healing In Vivo: Gene Expression and Production of Multiple Growth Factors in Early Tendon Healing Period. *J Hand Surg* 33:1834–1842
39. Chen JL, Yin Z, Shen WL, Chen X, Heng BC, Zou XH, Ouyang HW (2010) Efficacy of hESC-MSCs in knitted silk-collagen scaffold for tendon tissue engineering and their roles. *Biomaterials* 31:9438–9451
40. Chhabra A, Tsou D, Clark RT, Gaschen V, Hunziker EB, Mikic B (2003) GDF-5 deficiency in mice delays Achilles tendon healing. *J Orthop Res* 21:826–835

41. Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E (2014) Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol* 5:61
42. Chuang LS-H, Ian H-I, Koh T-W, Ng H-H, Xu G, Li BFL (1997) Human DNA-(Cytosine-5) Methyltransferase-PCNA Complex as a Target for p21WAF1. *Science* 277:1996–2000
43. Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E, Kalaszczynska I, Bronson RT, Rowitch DH, Gardner H, Sicinski P (2002) Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev* 16:3277–3289
44. David MA, Jones KH, Inzana JA, Zuscik MJ, Awad HA, Mooney RA (2014) Tendon Repair Is Compromised in a High Fat Diet-Induced Mouse Model of Obesity and Type 2 Diabetes. *PLOS ONE* 9:e91234
45. De Biasio A, Sánchez R, Prieto J, Villate M, Campos-Olivas R, Blanco FJ (2011) Reduced Stability and Increased Dynamics in the Human Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Relative to the Yeast Homolog. *PLoS ONE* 6:e16600
46. de Oliveira MG, Lauxen I da S, Chaves ACM, Rados PV, Sant'Ana Filho M (2008) Immunohistochemical analysis of the patterns of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions. *Med Oral Patol Oral Cirurgia Bucal* 13:E275-280
47. Deiters U, Mühlradt PF (1999) Mycoplasmal Lipopeptide MALP-2 Induces the Chemoattractant Proteins Macrophage Inflammatory Protein 1 α (MIP-1 α), Monocyte Chemoattractant Protein 1, and MIP-2 and Promotes Leukocyte Infiltration in Mice. *Infect Immun* 67:3390–3398
48. Deiters U, Barsig J, Tawil B, Mühlradt PF (2004) The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice. *Exp Dermatol* 13:731–739
49. Delalande A, Gosselin M-P, Suwalski A, Guilmain W, Leduc C, Berchel M, Jaffrès P-A, Baril P, Midoux P, Pichon C (2015) *ri*. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 11:1735–1744
50. Demir H, Menku P, Kirnap M, Calis M, Ikizceli I (2004) Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. *Lasers Surg Med* 35:84–89

51. Deumens R, Jaken RJP, Marcus MAE, Joosten EAJ (2007) The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods* 164:120–130
52. Devkota AC, Weinhold PS (2003) Mechanical response of tendon subsequent to ramp loading to varying strain limits. *Clin Biomech* 18:969–974
53. Dimmen S, Engebretsen L, Nordsletten L, Madsen JE (2009) Negative effects of parecoxib and indomethacin on tendon healing: an experimental study in rats. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17:835–839
54. Dobrowolski SF, Stacey DW, Harter ML, Stine JT, Hiebert SW (1994) An E2F dominant negative mutant blocks E1A induced cell cycle progression. *Oncogene* 9:2605–2612
55. Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans CH (2015) Biologics for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev* 84:222–239
56. Dourte LM, Pathmanathan L, Mienaltowski MJ, Jawad AF, Birk DE, Soslowky LJ (2013) Mechanical, compositional, and structural properties of the mouse patellar tendon with changes in biglycan gene expression. *J Orthop Res* 31:1430–1437
57. Duance VC, Restall DJ, Beard H, Bourne FJ, Bailey AJ (1977) The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett* 79:248–252
58. Durantaye M de la, Piette AB, Rooijen N van, Frenette J (2014) Macrophage depletion reduces cell proliferation and extracellular matrix accumulation but increases the ultimate tensile strength of injured Achilles tendons. *J Orthop Res* 32:279–285
59. Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P (2012) Achilles tendon healing in rats is improved by intermittent mechanical loading during the inflammatory phase. *J Orthop Res* 30:274–279
60. Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P (2011) Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav* 97:603–610

61. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1994) CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 269:30761–30764
62. Font Tellado S, Balmayor ER, Van Griensven M (2015) Strategies to engineer tendon/ligament-to-bone interface: Biomaterials, cells and growth factors. *Adv Drug Deliv Rev* 94:126–140
63. Forslund C, Bylander B, Aspenberg P (2003) Indomethacin and celecoxib improve tendon healing in rats. *Acta Orthop Scand* 74:465–469
64. Freeberg MAT, Farhat YM, Easa A, Kallenbach JG, Malcolm DW, Buckley MR, Benoit DSW, Awad HA (2018) Serpine1 Knockdown Enhances MMP Activity after Flexor Tendon Injury in Mice: Implications for Adhesions Therapy. *Sci Rep* 8:1–13
65. Freedman BR, Sarver JJ, Buckley MR, Voleti PB, Soslowsky LJ (2014) Biomechanical and structural response of healing Achilles tendon to fatigue loading following acute injury. *J Biomech* 47:2028–2034
66. Frisch M, Gradehandt G, Mühlradt PF (1996) Mycoplasma fermentans-derived lipid inhibits class II major histocompatibility complex expression without mediation by interleukin-6, interleukin-10, tumor necrosis factor, transforming growth factor- β , type I interferon, prostaglandins or nitric oxide. *Eur J Immunol* 26:1050–1057
67. Fritz T, Gerstenberg A, Histing T, Orth M, Braun B, Menger M, Pohlemann T, Klein M (2019) Just let them walk - Sehnenmodelle der Maus - eine Ganganalysese studie. Mannheim
68. Fujioka H, Thakur R, Wang G-J, Mizuno K, Balian G, Hurwitz SR (1998) Comparison of Surgically Attached and Non-Attached Repair of the Rat Achilles Tendon-Bone Interface. Cellular Organization and Type X Collagen Expression. *Connect Tissue Res* 37:205–218
69. Gabriel AF, Marcus M a. E, Honig WMM, Walenkamp GHIM, Joosten E a. J (2007) The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. *J Neurosci Methods* 163:9–16

70. Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, Das R, Mastny A, Havlioglu N, Silva MJ, Thomopoulos S (2006) Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res* 24:541–550
71. Galderisi U, Jori FP, Giordano A (2003) Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 22:5208
72. Gelberman RH, Thomopoulos S, Sakiyama-Elbert SE, Das R, Silva MJ (2007) The early effects of sustained platelet-derived growth factor administration on the functional and structural properties of repaired intrasynovial flexor tendons: an in vivo biomechanic study at 3 weeks in canines. *J Hand Surg* 32:373–379
73. Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225–260
74. Giglio AD, Drach J, Kornblau SM, Patel S, Novaes M, Khetan R, Sawaya N, Dorlhiac-Llacer P, Chamone DF, Andreeff M, Hester J, Deisseroth AB (1995) Quantitative Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen by Western Blot (PCNAWB) in Peripheral Blasts Correlates with Remission Induciton in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Leuk Lymphoma* 19:235–241
75. Gilmore TD (2006) Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680–6684
76. Gogol EP, Young MC, Kubasek WL, Jarvis TC, von Hippel PH (1992) Cryoelectron microscopic visualization of functional subassemblies of the bacteriophage T4 DNA replication complex. *J Mol Biol* 224:395–412
77. Grote K, Schuett H, Salguero G, Grothusen C, Jagielska J, Drexler H, Mühlradt PF, Schieffer B (2010) Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration. *Blood* 115:2543–2552
78. Grote K, Schütt H, Schieffer B (2011) Toll-Like Receptors in Angiogenesis. *ScientificWorldJournal* 11:981–991

79. Grote K, Sonnenschein K, Kapopara PR, Hillmer A, Grothusen C, Salguero G, Kotlarz D, Schuett H, Bavendiek U, Schieffer B (2013) Toll-Like Receptor 2/6 Agonist Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Promotes Reendothelialization and Inhibits Neointima Formation After Vascular Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:2097–2104
80. Grote K, Petri M, Liu C, Jehn P, Spalthoff S, Kokemüller H, Luchtefeld M, Tschernig T, Krettek C, Haasper C, Jagodzinski M (2013) Toll-like receptor 2/6-dependent stimulation of mesenchymal stem cells promotes angiogenesis by paracrine factors. *Eur Cell Mater* 26:66–79; discussion 79
81. Hamers FPT, Lankhorst AJ, van Laar TJ, Veldhuis WB, Gispens WH (2001) Automated Quantitative Gait Analysis During Overground Locomotion in the Rat: Its Application to Spinal Cord Contusion and Transection Injuries. *J Neurotrauma* 18:187–201
82. Hamers FPT, Koopmans GC, Joosten EAJ (2006) CatWalk-Assisted Gait Analysis in the Assessment of Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 23:537–548
83. Hasslund S, Jacobson JA, Dadali T, Basile P, Ulrich-Vinther M, Søballe K, Schwarz EM, O’Keefe RJ, Mitten DJ, Awad HA (2008) Adhesions in a murine flexor tendon graft model: Autograft versus allograft reconstruction. *J Orthop Res* 26:824–833
84. Hasslund S, O’Keefe RJ, Awad HA (2014) A mouse model of flexor tendon repair. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1130:73–88
85. Heister C (2007) Biomechanische Untersuchungen zum Einfluß der Hydrostatischen Hochdruck-Behandlung auf Zugfestigkeit und E-Modul von Sehnen des Schweins. Technische Universität, München
86. Herbelin A, Ruuth E, Delorme D, Michel-Herbelin C, Praz F (1994) Mycoplasma arginini TUH-14 membrane lipoproteins induce production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. *Infect Immun* 62:4690–4694
87. Herold S, Kumar P, Jung K, Graf I, Menkhoff H, Schulz X, Bähr M, Hein K (2016) CatWalk gait analysis in a rat model of multiple sclerosis. *BMC Neurosci* 17:78
88. Histing T, Kristen A, Roth C, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Menger MD, Pohlemann T (2010) In vivo gait analysis in a mouse femur fracture model. *J Biomech* 43:3240–3243

89. Hoffmann P, Heinle S, Schade UF, Loppnow H, Ulmer AJ, Flad H-D, Jung G, Bessler WG (1988) Stimulation of Human and Murine Adherent Cells by Bacterial Lipoprotein and Synthetic Lipopeptide Analogues. *Immunobiology* 177:158–170
90. Huehnchen P, Boehmerle W, Endres M (2013) Assessment of Paclitaxel Induced Sensory Polyneuropathy with “Catwalk” Automated Gait Analysis in Mice. *PLOS ONE* 8:e76772
91. Hyman J, Rodeo SA (2000) Injury and repair of tendons and ligaments. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 11:267–288
92. Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K, Sakamoto H, Fujimoto T, Mizuta H (2009) The effect of a local application of fibroblast growth factor-2 on tendon-to-bone remodeling in rats with acute injury and repair of the supraspinatus tendon. *J Shoulder Elbow Surg* 18:391–398
93. Iida T, Suetake I, Tajima S, Morioka H, Ohta S, Obuse C, Tsurimoto T (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells* 7:997–1007
94. Jackson LM, Hawkey CJ (2000) COX-2 Selective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Drugs* 59:1207–1216
95. Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, West JR, Sklenka AM, Butler DL (2005) Effects of Cell-to-Collagen Ratio in Mesenchymal Stem Cell-Seeded Implants on Tendon Repair Biomechanics and Histology. *Tissue Eng* 11:448–457
96. Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Gooch C, Galloway MT, West JR, Dunn MG, Butler DL (2006) The Effect of Autologous Mesenchymal Stem Cells on the Biomechanics and Histology of Gel-Collagen Sponge Constructs Used for Rabbit Patellar Tendon Repair. *Tissue Eng* 12:369–379
97. Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda K, Oshima Y, Yoshida A, Nagae M, Arai Y, Kawata M, Kubo T (2008) Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol* 215:837–845
98. Kannus P (2000) Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10:312–320

99. Kappos EA, Sieber PK, Engels PE, Mariolo AV, D'Arpa S, Schaefer DJ, Kalbermatten DF (2017) Validity and reliability of the CatWalk system as a static and dynamic gait analysis tool for the assessment of functional nerve recovery in small animal models. *Brain Behav* 7:e00723
100. Kashiwagi K, Mochizuki Y, Yasunaga Y, Ishida O, Deie M, Ochi M (2004) Effects of transforming growth factor- β 1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 38:193–197
101. Kaufmann A, Mühlradt PF, Gemsa D, Sprenger H (1999) Induction of Cytokines and Chemokines in Human Monocytes by *Mycoplasma fermentans*-Derived Lipoprotein MALP-2. *Infect Immun* 67:6303–6308
102. Kawai T, Akira S (2007) TLR signaling. *Semin Immunol* 19:24–32
103. Keller R, Fischer W, Keist R, Bassetti S (1992) Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 60:3664–3672
104. Kim Y-W, West XZ, Byzova TV (2013) Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J Mol Med* 91:323–328
105. Knese K-H, Biermann H (1958) Die Knochenbildung an Sehnen- und Bandansätzen im Bereich ursprünglich chondraler Apophysen. *Z Für Zellforsch Mikrosk Anat* 49:142–187
106. Komurcu M, Akkus O, Basbozkurt M, Gur E, Akkas N (1997) Reduction of restrictive adhesions by local aprotinin application and primary sheath repair in surgically traumatized flexor tendons of the rabbit. *J Hand Surg* 22:826–832
107. Korntner S, Kunkel N, Lehner C, Gehwolf R, Wagner A, Augat P, Stephan D, Heu V, Bauer H-C, Traweger A, Tempfer H (2017) A high-glucose diet affects Achilles tendon healing in rats. *Sci Rep* 7:1–12
108. Kostyal DA, Butler GH, Beezhold DH (1994) A 48-kilodalton *Mycoplasma fermentans* membrane protein induces cytokine secretion by human monocytes. *Infect Immun* 62:3793–3800

109. Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P (2004) Mouse Development and Cell Proliferation in the Absence of D-Cyclins. *Cell* 118:477–491
110. Kraus TM, Imhoff FB, Reinert J, Wexel G, Wolf A, Hirsch D, Hofmann A, Stöckle U, Buchmann S, Tischer T, Imhoff AB, Milz S, Anton M, Vogt S (2016) Stem cells and bFGF in tendon healing: Effects of lentiviral gene transfer and long-term follow-up in a rat Achilles tendon defect model. *BMC Musculoskelet Disord* 17:148
111. Krishna TSR, Fenyö D, Kong X-P, Gary S, Chait BT, Burgers P, Kuriyan J (1994) Crystallization of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 241:265–268
112. Kumar H, Kawai T, Akira S (2009) Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 420:1–16
113. Kumar S (1997) The apoptotic cysteine protease CPP32. *Int J Biochem Cell Biol* 29:393–396
114. Kurtz CA, Loebig TG, Anderson DD, DeMeo PJ, Campbell PG (1999) Insulin-Like Growth Factor I Accelerates Functional Recovery from Achilles Tendon Injury in a Rat Model. *Am J Sports Med* 27:363–369
115. Kurumbail RG, Kiefer JR, Marnett LJ (2001) Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol* 11:752–760
116. Lakes EH, Allen KD (2016) Gait analysis methods for rodent models of arthritic disorders: reviews and recommendations. *Osteoarthritis Cartilage* 24:1837–1849
117. Laschke MW, Augustin V, Kleer S, Tschernig T, Menger MD (2014) Locally applied macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) promotes early vascularization of implanted porous polyethylene (Medpor®). *Acta Biomater* 10:4661–4669
118. Lawrence T (2009) The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(6): a001651

119. Lee PJ, Alam J, Wiegand GW, Choi AM (1996) Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci* 93:10393–10398
120. Levin DS, McKenna AE, Motycka TA, Matsumoto Y, Tomkinson AE (2000) Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Curr Biol* 10:919-S2
121. Li Q, Verma IM (2002) NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725
122. Li Y, Soendergaard C, Bergenheim FH, Aronoff DM, Milne G, Riis LB, Seidelin JB, Jensen KB, Nielsen OH (2018) COX-2–PGE2 Signaling Impairs Intestinal Epithelial Regeneration and Associates with TNF Inhibitor Responsiveness in Ulcerative Colitis. *EBioMedicine* 36:497–507
123. Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJJ (2004) Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* 37:865–877
124. Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ (2005) Tendon properties in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. *J Biomech* 38:99–105
125. Lin TW, Cardenas L, Glaser DL, Soslowsky LJ (2006) Tendon healing in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. *J Biomech* 39:61–69
126. Linderman SW, Gelberman RH, Thomopoulos S, Shen H (2016) Cell and Biologic-Based Treatment of Flexor Tendon Injuries. *Oper Tech Orthop* 26:206–215
127. Link C, Gavioli R, Ebensen T, Canella A, Reinhard E, Guzmán CA (2004) The Toll-like receptor ligand MALP-2 stimulates dendritic cell maturation and modulates proteasome composition and activity. *Eur J Immunol* 34:899–907
128. Liu Y-T, Lin Z-M, He S-J, Zuo J-P (2019) Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target in rheumatic diseases. *Life Sci* 218:205–212
129. Loewenstein J, Rottem S, Gallily R (1983) Induction of macrophage-mediated cytotoxicity of neoplastic cells by mycoplasmas. *Cell Immunol* 77:290–297

130. Loisel AE, Bragdon GA, Jacobson JA, Hasslund S, Cortes ZE, Schwarz EM, Mitten DJ, Awad HA, O'Keefe RJ (2009) Remodeling of murine intrasynovial tendon adhesions following injury: MMP and neotendon gene expression. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 27:833–840
131. Lührmann A, Deiters U, Skokowa J, Hanke M, Gessner JE, Mühlradt PF, Pabst R, Tschernig T (2002) In Vivo Effects of a Synthetic 2-Kilodalton Macrophage-Activating Lipopeptide of *Mycoplasma fermentans* after Pulmonary Application. *Infect Immun* 70:3785–3792
132. Lüllmann-Rauch R, editor (2009) Taschenlehrbuch Histologie. 3rd edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
133. Lyras D, Kazakos K, Verettas D, Polychronidis A, Simopoulos C, Botaitis S, Agrogiannis G, Kokka A, Patsouris E (2010) Immunohistochemical study of angiogenesis after local administration of platelet-rich plasma in a patellar tendon defect. *Int Orthop* 34:143–148
134. Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Botaitis S, Agrogiannis G, Kokka A, Pitiakoudis M, Kotzakarlis A (2009) The effect of platelet-rich plasma gel in the early phase of patellar tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 129:1577–1582
135. Ma X, You X, Zeng Y, He J, Liu L, Deng Z, Jiang C, Wu H, Zhu C, Yu M, Wu Y (2013) *Mycoplasma fermentans* MALP-2 induces heme oxygenase-1 expression via mitogen-activated protein kinases and Nrf2 pathways to modulate cyclooxygenase 2 expression in human monocytes. *Clin Vaccine Immunol* 20:827–834
136. Ma X, You X, Zeng Y, He J, Liu L, Deng Z, Jiang C, Wu H, Zhu C, Yu M, Wu Y (2013) *Mycoplasma fermentans* MALP-2 Induces Heme Oxygenase-1 Expression via Mitogen-Activated Protein Kinases and Nrf2 Pathways To Modulate Cyclooxygenase 2 Expression in Human Monocytes. *Clin Vaccine Immunol* 20:827–834
137. Maga G, Hübscher U (1995) DNA polymerase epsilon interacts with proliferating cell nuclear antigen in primer recognition and elongation. *Biochemistry* 34:891–901

138. Maga G, Villani G, Ramadan K, Shevelev I, Gac NTL, Blanco L, Blanca G, Spadari S, Hübscher U (2002) Human DNA Polymerase λ Functionally and Physically Interacts with Proliferating Cell Nuclear Antigen in Normal and Translesion DNA Synthesis. *J Biol Chem* 277:48434–48440
139. Maga G, Hübscher U (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116:3051–3060
140. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK (1986) Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 261:411–419
141. Maines MD (1997) THE HEME OXYGENASE SYSTEM: A Regulator of Second Messenger Gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:517–554
142. Maiti SK, Kumar N, Singh GR, Hoque M, Singh R (2006) Ultrasound Therapy in Tendinous Injury Healing in Goats. *J Vet Med Ser A* 53:249–258
143. Majewski M, Ochsner PE, Liu F, Flückiger R, Evans CH (2009) Accelerated Healing of the Rat Achilles Tendon in Response to Autologous Conditioned Serum. *Am J Sports Med* 37:2117–2125
144. Mallat Ziad, Ohan Jeanny, Lesèche Guy, Tedgui Alain (1997) Colocalization of CPP-32 With Apoptotic Cells in Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation* 96:424–428
145. Manning CN, Havlioglu N, Knutsen E, Sakiyama-Elbert SE, Silva MJ, Thomopoulos S, Gelberman RH (2014) The early inflammatory response after flexor tendon healing: A gene expression and histological analysis. *J Orthop Res* 32:645–652
146. Masocha W, Parvathy SS, Pavarthi SS (2009) Assessment of weight bearing changes and pharmacological antinociception in mice with LPS-induced monoarthritis using the Catwalk gait analysis system. *Life Sci* 85:462–469
147. Mason ML, Allen HS (1941) THE RATE OF HEALING OF TENDONS: AN EXPERIMENTAL STUDY OF TENSILE STRENGTH. *Ann Surg* 113:424–459

148. Mass DP, Tuel R (1989) Human flexor tendon participation in the vitro repair process. *J Hand Surg* 14:64–71
149. Massaeli H, Jalali S, Viswanathan D, Mesaeli N (2014) Loss of calreticulin function decreases NFκB activity by stabilizing IκB protein. *Biochim Biophys Acta* 1843:2385–2393
150. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ (1991) Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65:701–713
151. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ (1992) Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71:323–334
152. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14:2066–2076
153. Mccoubrey WK, Huang TJ, Maines MD (1997) Isolation and Characterization of a cDNA from the Rat Brain that Encodes Hemoprotein Heme Oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247:725–732
154. Mendes CS, Bartos I, Márka Z, Akay T, Márka S, Mann RS (2015) Quantification of gait parameters in freely walking rodents. *BMC Biol* 13:50
155. Meyerson M, Harlow E (1994) Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14:2077–2086
156. Mitsunari M, Yoshida S, Shoji T, Tsukihara S, Iwabe T, Harada T, Terakawa N (2006) Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *J Reprod Immunol* 72:46–59
157. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM (1978) Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *J Immunol* 121:2228–2234
158. Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, Orita S, Kuniyoshi K, Ochiai N, Kishida S, Nakamura J, Eguchi Y, Arai G, Suzuki M, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Inoue G, Ohtori S (2011) Assessment of gait in a rat model of myofascial inflammation using the CatWalk system. *Spine* 36:1760–1764

159. Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, Suzuki M, Sakuma Y, Orita S, Oikawa Y, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Inoue G, Ohtori S (2013) Assessment of Pain Behavior in a Rat Model of Intervertebral Disc Injury Using the Catwalk Gait Analysis System. *Spine* 38:1459
160. Mizel SB, Oppenheim JJ, Rosenstreich DL (1978) Characterization of Lymphocyte-Activating Factor (LAF) Produced by a Macrophage Cell Line, P388D1: II. Biochemical Characterization of LAF Induced by Activated T Cells and LPS. *J Immunol* 120:1504–1508
161. Molloy T, Wang Y, Murrell GAC (2003) The Roles of Growth Factors in Tendon and Ligament Healing. *Sports Med* 33:381–394
162. Morita I (2002) Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68–69:165–175
163. Mühlradt PF, Quentmeier H, Schmitt E (1991) Involvement of interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-2, and IL-4 in generation of cytolytic T cells from thymocytes stimulated by a *Mycoplasma fermentans*-derived product. *Infect Immun* 59:3962–3968
164. Mühlradt PF, Schade U (1991) MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to in vitro interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. *Infect Immun* 59:3969–3974
165. Mühlradt PF, Frisch M (1994) Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. *Infect Immun* 62:3801–3807
166. Mühlradt PF, Kieß M, Meyer H, Süßmuth R, Jung G (1997) Isolation, Structure Elucidation, and Synthesis of a Macrophage Stimulatory Lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* Acting at Picomolar Concentration. *J Exp Med* 185:1951–1958
167. Nagasawa K, Noguchi M, Ikoma K, Kubo T (2008) Static and dynamic biomechanical properties of the regenerating rabbit Achilles tendon. *Clin Biomech* 23:832–838
168. Nichols AF, Sancar A (1992) Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucleic Acids Res* 20:2441–2446

169. Niebuhr M, Mühlradt PF, Wittmann M, Kapp A, Werfel T (2008) Intracutaneous injection of the macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) which accelerates wound healing in mice--a phase I trial in 12 patients. *Exp Dermatol* 17:1052–1056
170. Nishida C, Reinhard P, Linn S (1988) DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase delta. *J Biol Chem* 263:501–510
171. Noah AC, Li TM, Martinez LM, Wada S, Swanson JB, Disser NP, Sugg KB, Rodeo SA, Lu TT, Mendias CL (2019) Adaptive and Innate Immune Cell Responses in Tendons and Lymph Nodes After Tendon Injury and Repair. *bioRxiv* 658310
172. O'Brien M (1997) Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports* 7:55–61
173. O'Brien M (2005) Anatomy of Tendons. Springer, London. In: Maffulli N., Renström P., Leadbetter W.B. (eds) *Tendon Injuries* [E-Book]. Springer, London. DOI: 10.1007/1-84628-050-8_1
174. O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG (2013) The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13:453–460
175. Oshiro W, Lou J, Xing X, Tu Y, Manske PR (2003) Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. *J Hand Surg* 28:814–823
176. Ouyang HW, Goh JCH, Mo XM, Teoh SH, Lee EH (2002) The Efficacy of Bone Marrow Stromal Cell-Seeded Knitted PLGA Fiber Scaffold for Achilles Tendon Repair. *Ann N Y Acad Sci* 961:126–129
177. Palmes D, Spiegel HU, Schneider TO, Langer M, Stratmann U, Budny T, Probst A (2002) Achilles tendon healing: Long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. *J Orthop Res* 20:939–946
178. Parvathy SS, Masocha W (2013) Gait analysis of C57BL/6 mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis using the CatWalk system. *BMC Musculoskelet Disord* 14:14

179. Pelled G, Snedeker JG, Ben-Arav A, Rigozzi S, Zilberman Y, Kimelman-Bleich N, Gazit Z, Müller R, Gazit D (2012) Smad8/BMP2-engineered mesenchymal stem cells induce accelerated recovery of the biomechanical properties of the achilles tendon. *J Orthop Res* 30:1932–1939
180. Pestell RG (2013) New Roles of Cyclin D1. *Am J Pathol* 183:3–9
181. Petersen W, Varoga D, Zantop T, Hassenpflug J, Mentlein R, Pufe T (2004) Cyclic strain influences the expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) in tendon fibroblasts. *J Orthop Res* 22:847–853
182. Pins GD, Christiansen DL, Patel R, Silver FH (1997) Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. *Biophys J* 73:2164–2172
183. Porter AG, Jänicke RU (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6:99
184. Poss KD, Tonegawa S (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci* 94:10919–10924
185. Poss KD, Tonegawa S (1997) Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci* 94:10925–10930
186. Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B (1987) Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 326:517–520
187. Rawadi G, Roman-Roman S (1996) Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 64:637–643
188. Rees SG, Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B, Dent CM (2000) Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. *Biochem J* 350:181–188
189. Rees SG, Dent CM, Caterson B (2009) Metabolism of proteoglycans in tendon. *Scand J Med Sci Sports* 19:470–478

190. Ricchetti ET, Reddy SC, Ansorge HL, Zgonis MH, Van Kleunen JP, Liechty KW, Soslowsky LJ, Beredjiklian PK (2008) Effect of interleukin-10 overexpression on the properties of healing tendon in a murine patellar tendon model. *J Hand Surg* 33:1843–1852
191. Rickert M, Jung M, Adiyaman M, Richter W, Simank HG (2001) A Growth and Differentiation Factor-5 (GDF-5)-coated Suture Stimulates Tendon Healing in an Achilles Tendon Model in Rats. *Growth Factors* 19:115–126
192. Ruschmeyer D, Thude H, Mühlradt PF (1993) MDHM, a macrophage-activating product of *Mycoplasma fermentans*, stimulates murine macrophages to synthesize nitric oxide and become tumoricidal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 7:223–229
193. Sakuma T, Kamoda H, Miyagi M, Ishikawa T, Arai G, Eguchi Y, Suzuki M, Oikawa Y, Sakuma Y, Kubota G, Inage K, Saino T, Orita S, Yamauchi K, Inoue G, Takahashi K, Ohtori S (2013) Comparison of CatWalk Analysis and von Frey Testing for Pain Assessment in a Rat Model of Nerve Crush Plus Inflammation. *Spine* 38:E919
194. Salerno L, Floresta G, Ciaffaglione V, Gentile D, Margani F, Turnaturi R, Rescifina A, Pittalà V (2019) Progress in the development of selective heme oxygenase-1 inhibitors and their potential therapeutic application. *Eur J Med Chem* 167:439–453
195. Sato BL, Collier ES, Vermudez SA, Junker AD, Kendal-Wright CE (2016) Human amnion mesenchymal cells are pro-inflammatory when activated by the Toll-like receptor 2/6 ligand, macrophage-activating lipoprotein-2. *Placenta* 44:69–79
196. Savage R (1985) In vitro studies of a new method of flexor tendon repair. *J Hand Surg Br Eur Vol* 10:135–141
197. Schizas N, Li J, Andersson T, Fahlgren A, Aspenberg P, Ahmed M, Ackermann PW (2010) Compression therapy promotes proliferative repair during rat Achilles tendon immobilization. *J Orthop Res* 28:852–858
198. Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin T-T, Nicholson DW (1996) CPP32/Apopain Is a Key Interleukin 1 Converting Enzyme-like Protease Involved in Fas-mediated Apoptosis. *J Biol Chem* 271:1841–1844

199. Schulze-Tanzil G, Al-Sadi O, Wiegand E, Ertel W, Busch C, Kohl B, Pufe T (2011) The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights. *Scand J Med Sci Sports* 21:337–351
200. Schünke M (2014) *Topografie und Funktion des Bewegungssystems*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2014
201. Sereysky JB, Flatow EL, Andarawis-Puri N (2013) Musculoskeletal regeneration and its implications for the treatment of tendinopathy. *Int J Exp Pathol* 94:293–303
202. Sharma P, Maffulli N (2005) Basic biology of tendon injury and healing. *Surg J R Coll Surg Edinb Irel* 3:309–316
203. Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501–1512
204. Shibahara K, Stillman B (1999) Replication-Dependent Marking of DNA by PCNA Facilitates CAF-1-Coupled Inheritance of Chromatin. *Cell* 96:575–585
205. Shivji MKK, Kenny MK, Wood RD (1992) Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69:367–374
206. Silver IA, Brown PN, Goodship AE, Lanyon LE, McCullagh KG, Perry GC, Williams IF (1983) A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet J Suppl* 1–43
207. Smith WL, Marnett LJ, DeWitt DL (1991) Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* 49:153–179
208. Snedeker JG, Foolen J (2017) Tendon injury and repair – A perspective on the basic mechanisms of tendon disease and future clinical therapy. *Acta Biomater* 63:18–36
209. Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR (1996) Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 5:383–392

210. Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, Robertson N, Armstrong RC, Wang L, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES (1996) The Ced-3/Interleukin 1 β Converting Enzyme-like Homolog Mch6 and the Lamin-cleaving Enzyme Mch2 α Are Substrates for the Apoptotic Mediator CPP32. *J Biol Chem* 271:27099–27106
211. Staber FG, Gisler RH, Schumann G, Tarcsay L, Schläfli E, Dukor P (1978) Modulation of myelopoiesis by different bacterial cell-wall components: Induction of colony-stimulating activity (by pure preparations, low-molecular-weight degradation products and a synthetic low-molecular analog of bacterial cell-wall components) in vitro. *Cell Immunol* 37:174–187
212. Steiner M (1982) Biomechanics of tendon healing. *J Biomech* 15:951–958
213. Strzalka W, Ziemienowicz A (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot* 107:1127–1140
214. Sugg KB, Lubardic J, Gumucio JP, Mendias CL (2014) Changes in macrophage phenotype and induction of epithelial-to-mesenchymal transition genes following acute Achilles tenotomy and repair. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 32:944–951
215. Surg AA of O (2008) *Burden of Musculoskeletal Diseases in the United States: Prevalence, Societal and Economic Cost*. 1st edition. Amer Academy of Orthopaedic, Rosemont, IL
216. Suwalski A, Dabboue H, Delalande A, Bensamoun SF, Canon F, Midoux P, Saillant G, Klatzmann D, Salvetat J-P, Pichon C (2010) Accelerated Achilles tendon healing by PDGF gene delivery with mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials* 31:5237–5245
217. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S (2000) Cutting Edge: Preferentially the R-Stereoisomer of the Mycoplasmal Lipopeptide Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Activates Immune Cells Through a Toll-Like Receptor 2- and MyD88-Dependent Signaling Pathway. *J Immunol* 164:554–557
218. Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13:933–940

219. Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM (1986) An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem* 261:12310–12316
220. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61:748–755
221. Tergaonkar V, Bottero V, Ikawa M, Li Q, Verma IM (2003) I κ B Kinase-Independent I κ B α Degradation Pathway: Functional NF- κ B Activity and Implications for Cancer Therapy. *Mol Cell Biol* 23:8070–8083
222. Thomopoulos S, Das R, Silva MJ, Sakiyama-Elbert S, Harwood FL, Zampiakis E, Kim HM, Amiel D, Gelberman RH (2009) Enhanced flexor tendon healing through controlled delivery of PDGF-BB. *J Orthop Res* 27:1209–1215
223. Thomopoulos S, Parks WC, Rifkin DB, Derwin KA (2015) Mechanisms of tendon injury and repair. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 33:832–839
224. Timotius IK, Canneva F, Minakaki G, Mocerri S, Plank A-C, Casadei N, Riess O, Winkler J, Klucken J, Eskofier B, von Hörsten S (2019) Systematic data analysis and data mining in CatWalk gait analysis by heat mapping exemplified in rodent models for neurodegenerative diseases. *J Neurosci Methods* 326:108367
225. Toritsuka Y, Shino K, Horibe S, Nakamura N, Matsumoto N, Ochi T (1997) Effect of freeze-drying or γ -irradiation on remodeling of tendon allograft in a rat model. *J Orthop Res* 15:294–300
226. Uchida K (2017) HNE as an inducer of COX-2. *Free Radic Biol Med* 111:169–172
227. Vandeputte C, Taymans J-M, Casteels C, Coun F, Ni Y, Van Laere K, Baekelandt V (2010) Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. *BMC Neurosci* 11:92
228. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Antwerp DV, Miyamoto S (1995) Rel/NF- κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9:2723–2735
229. Vijayan V, Wagener FADTG, Immenschuh S (2018) The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation. *Biochem Pharmacol* 153:159–167

230. Vogel KG, Koob TJ (1989) Structural specialization in tendons under compression. *Int Rev Cytol* 115:267–293
231. Voleti PB, Buckley MR, Soslowsky LJ (2012) Tendon Healing: Repair and Regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* 14:47–71
232. Wang JH-C (2006) Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 39:1563–1582
233. Wang JH-C, Guo Q, Li B (2012) Tendon biomechanics and mechanobiology - a mini-review of basic concepts and recent advancements. *J Hand Ther* 25:133–141
234. Warden SJ (2007) Animal models for the study of tendinopathy. *Br J Sports Med* 41:232–240
235. Whitlock PW, Smith TL, Poehling GG, Shilt JS, Van Dyke M (2007) A naturally derived, cytocompatible, and architecturally optimized scaffold for tendon and ligament regeneration. *Biomaterials* 28:4321–4329
236. Williams IF, Heaton A, McCullagh KG (1980) Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. *Res Vet Sci* 28:302–310
237. Wilmink J, Wilson AM, Goodship AE (1992) Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibres in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses. *Res Vet Sci* 53:354–359
238. Wong JKF, Lui YH, Kapacee Z, Kadler KE, Ferguson MWJ, McGrouther DA (2009) The cellular biology of flexor tendon adhesion formation: an old problem in a new paradigm. *Am J Pathol* 175:1938–1951
239. Wong JKF, Metcalfe AD, Wong R, Bush J, Platt C, Garcon A, Goldspink N, McGrouther DA, Ferguson MWJ (2014) Reduction of Tendon Adhesions following Administration of Adaprev, a Hypertonic Solution of Mannose-6-Phosphate: Mechanism of Action Studies. *PLOS ONE* 9:e112672

240. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kägi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW (1998) Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12:806–819
241. Wu F, Nerlich M, Docheva D (2017) Tendon injuries: Basic science and new repair proposals. *EFORT Open Rev* 2:332
242. Xia W, Wang Y, Appleyard RC, Smythe GA, Murrell G a. C (2006) Spontaneous recovery of injured Achilles tendon in inducible nitric oxide synthase gene knockout mice. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc AI* 55:40–45
243. Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D (1991) Human D-type cyclin. *Cell* 65:691–699
244. Xiong Y, Zhang H, Beach D (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71:505–514
245. Yan Z, Yin H, Nerlich M, Pfeifer CG, Docheva D (2018) Boosting tendon repair: interplay of cells, growth factors and scaffold-free and gel-based carriers. *J Exp Orthop* 5:1
246. Yang G, Crawford RC, Wang JH-C (2004) Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. *J Biomech* 37:1543–1550
247. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ (1998) Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. *J Orthop Res* 16:406–413
248. Yuan J, Murrell G a. C, Wei A-Q, Appleyard RC, Del Soldato P, Wang M-X (2003) Addition of nitric oxide via nitroflurbiprofen enhances the material properties of early healing of young rat Achilles tendons. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc AI* 52:230–237
249. Yuan J, Murrell GAC, Trickett A, Wang M-X (2003) Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1641:35–41

250. Yuzhakov A, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M (1999) Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase δ holoenzyme. *EMBO J* 18:6189–6199
251. Zhang G, Gibbs E, Kelman Z, O'Donnell M, Hurwitz J (1999) Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1869–1874
252. Zhang G, Ezura Y, Chervoneva I, Robinson PS, Beason DP, Carine ET, Soslowsky LJ, Iozzo RV, Birk DE (2006) Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J Cell Biochem* 98:1436–1449
253. Zhang H, Xiong Y, Beach D (1993) Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 4:897–906
254. Zhang J, Middleton KK, Fu FH, Im H-J, Wang JH-C (2013) HGF Mediates the Anti-inflammatory Effects of PRP on Injured Tendons. *PLOS ONE* 8:e67303
255. Zhang P, Mo JY, Perez A, Leon A, Liu L, Mazloun N, Xu H, Lee MY (1999) Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the p125 catalytic subunit of mammalian DNA polymerase delta. *J Biol Chem* 274:26647–26653
256. Zhang Z, Shibahara K, Stillman B (2000) PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* 408:221–225
257. Zhou M, Zhang W, Chang J, Wang J, Zheng W, Yang Y, Wen P, Li M, Xiao H (2015) Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 584:184–189

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der grundsätzlichen Struktur einer Sehne
- Abb. 2: Operationsgebiet nach oberflächlichem Hautschnitt
- Abb. 3: Stumpfes Freipräparieren der Sehne des M. flexor digitorum longus
- Abb. 4: Aufspannen der Sehne des M. flexor digitorum longus auf eine Pinzette
- Abb. 5: Aufsuchen des Punktionsortes der Sehne
- Abb. 6: Punktion der Sehne mittels 16 G Kanüle
- Abb. 7: Applikation von 5 µl MALP-2 in Trägersubstanz gelöst bzw. der Trägersubstanz
- Abb. 8: Operationsgebiet nach kutanem Verschluss mittels zweier Einzelknopfnähte
- Abb. 9: Explantierte FDL-Sehne
- Abb. 10: Gehweg und Korridor des CatWalk-Systems
- Abb. 11: Mit der Kamera aufgenommenes und mit Software bearbeiteter Ausschnitt eines Videos eines Runs einer Maus
- Abb. 12: Universaltestungsmaschine für die biomechanische Testung und die genutzten Sehnenklemmen 1 und 2
- Abb. 13: Verlauf des Parameters Gewicht (g) i
- Abb. 14: Verlauf des Parameters Run Duration (s)
- Abb. 15: Verlauf des Parameters Stand (s)
- Abb. 16: Verlauf des Parameters Swing (s)
- Abb. 17: Verlauf des Parameters Step Cycle (s)
- Abb. 18: Verlauf des Parameters Duty Cycle (%)
- Abb. 19: Verlauf des Parameters Stride Length (%)
- Abb. 20: Verlauf des Parameters Max Contact Area (%)
- Abb. 21: Verlauf des Parameters Print Area (%)
- Abb. 22: Verlauf des Parameters Max Contact Max Intensity
- Abb. 23: Verlauf des Parameters Max Contact Mean Intensity
- Abb. 24: Verlauf des Parameters Regularity Index (%)
- Abb. 25: Vergleich der Mittelwerte \pm Standardfehler des Parameters Steifheit/Stiffness (N/mm) zwischen rechter und linker Sehne nach 7 und 36 Tagen
- Abb. 26: Banden der Western Blots der analysierten Proteine mit den jeweiligen dazugehörigen β -Actin-Banden
- Abb. 27: Vergleich der Mittelwerte \pm Standardfehler von Kontroll- und Interventionsgruppe der nachgewiesenen Proteine im Western Blot

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Versuchsprotokoll der Gangbildanalyse
Tab. 2:	Versuchsprotokoll der biomechanischen Testung
Tab. 3:	Versuchsprotokoll des Western Blots
Tab. 4:	Zeitliches Schema des Versuchsablaufes
Tab. 5:	Übersicht und Beschreibung der in der Studie erhobenen Gangparameter
Tab. 6:	Mittelwerte \pm Standardfehler des Parameters Gewicht (g)
Tab. 7:	Mittelwerte \pm Standardfehler des Parameters Run Duration (s)
Tab. 8:	Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter Stand (s)
Tab. 9:	Mittelwerte \pm Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter Stand (s)
Tab. 10:	Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter Swing (s)
Tab. 11:	Mittelwerte \pm Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter Swing (s)
Tab. 12:	Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter Step Cycle (s)
Tab. 13:	Mittelwerte \pm Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter Step Cycle (s)
Tab. 14:	Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter Duty Cycle (%)
Tab. 15:	Mittelwerte \pm Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter Duty Cycle (%)
Tab. 16:	Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter Stride Length (%)
Tab. 17:	Mittelwerte \pm Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter Stride Length (%)
Tab. 18:	Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter Max Contact Area (%)
Tab. 19:	Mittelwerte \pm Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter Max Contact Area (%)
Tab. 20:	Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter Print Area (%)
Tab. 21:	Mittelwerte \pm Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter Print Area (%)
Tab. 22:	Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter Max Contact Max Intensity
Tab. 23:	Mittelwerte \pm Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter Max Contact Max Intensity

- Tab. 24: Mittelwerte \pm Standardfehler des linken Hinterlaufs beim Parameter Max Contact Mean Intensity
- Tab. 25: Mittelwerte \pm Standardfehler des rechten Hinterlaufs beim Parameter Max Contact Mean Intensity
- Tab. 26: Mittelwerte \pm Standardfehler des Parameters Regularity Index (%)
- Tab. 27: Mittelwerte \pm Standardfehler der Steifheit/Stiffness (N/mm) nach 7 Tagen
- Tab. 28: Mittelwerte \pm Standardfehler der Steifheit/Stiffness (N/mm) nach 36 Tagen
- Tab. 29: Mittelwerte \pm Standardfehler der einzelnen Proteinkonzentrationen im Western Blot
- Tab. 30: Die in der Studie verwendeten CatWalk-Parameter in anderen Studien

8. Publikation/Danksagung

8.1 Publikation

Die vorliegende Arbeit ist derzeit in der Vorbereitung zur Einreichung bei verschiedenen Fachzeitschriften.

Vorträge

Schäfer J, Fritz T, Histing T, Pohlemann T, Orth M, Braun B, Menger M, Klein M. Die Wirkung von MALP-2 auf die Sehnenheilung der Maus, Abstract Meeting zum Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin, Oktober 2019

Posterbeiträge

Fritz T, Schäfer J, Histing T, Pohlemann T, Orth M, Braun B, Menger M, Klein M. Die Wirkung von MALP-2 auf die Sehnenheilung der Maus, Posterbeitrag zur 36. Arbeitstagung der Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie, Mannheim, September 2019

8.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit widme ich meiner Mutter, die mich mit ihrer unerschöpflichen Liebe bei all meinen Vorhaben unterstützt.

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Labor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Dr. med. Tim Pohlemann. Für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur selbstständigen Bearbeitung

Dr. med. Tobias Fritz. Für seine Betreuung während des ganzen Zeitraumes. Für die Ratschläge und Tipps, die Freundschaft, das Begleiten der Experimente, das lösungsorientierte Denken und für das wissenschaftliche Vorbild.

Prof. Dr. med. Michael Menger. Für das Bereitstellen der Räumlichkeiten und Gerätschaften, die Diskussionsbereitschaft und Hilfe.

Prof. Dr. med. Matthias Laschke. Für die konstruktive Hilfe und Ideen zur Bearbeitung des Themas.

Dr. rer. nat. Claudia Scheuer. Für die Unterstützung und große Hilfe bei allen molekularbiologischen Fragestellungen und Auswertungen. Die Denkanstöße, wissenschaftliche Expertise und Ratschläge bezüglich dieser Arbeit.

Frau Julia Parakenings. Ebenfalls für die Begleitung und Hilfestellungen bei den molekularbiologischen Fragestellungen und Auswertungen.

Dr. med. vet. Monika Frings. Für kompetente Beratung im Umgang mit den Tieren und die Erlaubnis zur Durchführung des Tierversuchs.

Meinem Freund Luis. Für die Unterstützung und Geduld, die zu dem Gelingen dieser Arbeit einen wesentlichen Beitrag erbracht haben.

9. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

10. Anhang

	Run Duration	Stand	Swing	Step Cycle	Duty Cycle	Stride Length	Max Contact Area	Print Area	Max Contact Max Intensiv	Max Contact Mean Intensiv	Regularity Index	Rodents (Maus/Ratte)
Herold et al.: Multiple Sklerose	X					X						R
Parvaty and Masocha: Monoarthritis		X	X		X	X		X	X		X	M
Miyagi et al.: Myofasziale Inflammation		X	X		X	X	X	X	X	X		R
Miyagi et al.: Schmerzverhalten Intervertebral Disc Injury		X	X	X	X	X	X	X	X	X		R
Gabriel et al.: akuter inflammatorischer Schmerz				X	X	X	X	X		X	X	R
Bozkurt: funktionelle Regeneration nach Ischiasverletzung								X				R
Bozkurt: periphere Nervenregeneration		X	X					X				R
Caballero-Garrido et al.: dMCAO	X					X	X	X				M
Cao et al.: Akkupunktur bei Stroke		X	X			X	X		X			R
Deumens et al.: Ischiasnervresektion		X	X			X	X	X		X	X	R
Huenchen et al.: Paclitaxel induzierte sensorische Polyneuropathie		X	X		X							M
Chiang et al.: chronisch konstruktive Nervenverletzung		X	X					X	X		X	R
Fröhlich et al.: Parkinson								X				M
Sakuma et al.: Nerve Crush Plus Inflammation					X							R
Masocha et al.: LPS-induzierte Monoarthritis								X			X	M
Möller et al.: Monoarthritis		X						X			X	R
Chen et al.: subtile neurologische Veränderungen		X	X					X		X	X	R
Kameda et al.: Nucleus pulposus		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	R
Ferland et al.: Osteoarthritis			X		X							R
Cendelin et al.: olivocerebellare Degeneration		X	X			X					X	M
Hamers et al.: Rückenmarkskontusion und -transektion			X			X		X			X	R
Bernardes et al.: chronische MS	X	X		X		X		X	X		X	M
Vandeputte et al.: Bewegungsstörungen		X	X					X				R
De Haas et al.: Leigh Krankheit	X	X		X		X	X					M
Zhou et al.: Parkinson		X		X	X	X	X					R
Hetze et al.: Schlaganfall	X	X			X	X	X				X	M
Westin et al.: Parkinson		X	X	X	X	X					X	R
Liu et al.: Schlaganfall		X			X	X	X	X		X		R
Neumann et al.: traumatische Hirnverletzung		X	X			X	X	X			X	M
Hoffmann et al.: Pristane induzierte Arthritis		X						X			X	R
Mountney et al.: penetrierende Hirnverletzung		X	X	X	X	X		X			X	R
Sucher et al.: Hinterlauftransplantation	X	X	X	X	X							M

Tab. 30 zeigt die in dieser Studie verwendeten CatWalk-Parameter in anderen Studien.