

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

---

Einfluss der selektiven Paralyse des M. supraspinatus auf die knöchernen Sehnenheilung  
nach Rotatorenmanschettendefekt an der Ratte – eine histologische Auswertung.

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

vorgelegt von  
Markus Scharf

aus Freising

Jahr  
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter E. Müller

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Ben Ockert  
Prof. Dr. med. Gerd Regel  
Prof. Dr. med. Peter Habermeyer  
Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Andreas Ficklscherer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2017

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Rotatorenmanschette	1
1.1.1	Aufbau und Funktion der Rotatorenmanschette	1
1.1.2	Ätiologie, Pathogenese und Pathophysiologie von Rotatorenmanschettenrupturen	3
1.1.3	Klassifikation der Rotatorenmanschettenruptur	5
1.1.4	Behandlung der Rotatorenmanschettenruptur	7
1.2	Anatomie von Sehngewebe und extrazellulärer Matrix	9
1.2.1	Morphologie und Metabolismus von Tenozyten	9
1.2.2	Zusammensetzung und Aufbau der extrazellulären Matrix	10
1.2.3	Synthese, Aufbau und Verteilungsmuster der Kollagene	10
1.2.3.1	Kollagen Typ I	11
1.2.3.2	Kollagen Typ II	11
1.2.3.3	Kollagen Typ III	12
1.3	Die Enthesis	12
1.3.1	Morphologie der Enthesis	13
1.3.1.1	Zugsehnen	13
1.3.1.2	Unmineralisierter Faserknorpel	13
1.3.1.3	Mineralisierter Faserknorpel	13
1.3.1.4	Knochen	14
1.3.2	Funktion der Enthesis und Ablauf der Sehnenheilung	15
1.4	Botulinumneurotoxin A (BoNT A)	16
1.4.1	Chemischer Aufbau	16
1.4.2	Wirkungsmechanismus	17

1.4.3	Indikationen zur Therapie mit Botulinumneurotoxin A in der Orthopädie und Unfallchirurgie	18
1.5	Fragestellung	19
1.5.1	Auswirkungen der neoadjuvanten Gabe von Botulinumneurotoxin A auf die Sehnenheilung und knöchernen Sehnenintegration	20
1.5.2	Auswirkungen von Immobilisation auf die knöchernen Sehnenintegration	20
1.5.3	Langzeitwirkung von Botulinumneurotoxin A auf die Morphologie der Muskulatur	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Tiermodell	21
2.1.1	Tierhaltung	21
2.1.2	Gruppeneinteilung	22
2.1.2.1	Statistik Paralysegruppe	22
2.1.2.2	Statistik Atrophiegruppe	23
2.1.3	Anästhesie der Versuchstiere	24
2.1.4	Infiltration von Botulinumneurotoxin A	24
2.1.5	Operationsmethode Paralysegruppe	24
2.1.6	Postoperative Analgesie	27
2.1.7	Euthanasie der Tiere	27
2.1.8	Präparatgewinnung	27
2.1.8.1	Paralysegruppe	27
2.1.8.2	Atrophiegruppe	27
2.2	Histologie und Immunhistochemie der Paralysegruppe	28
2.2.1	Fixierung der Präparate	28
2.2.2	Entkalkung der Präparate	28
2.2.3	Entwässern und Einbetten der Präparate	28
2.2.4	Fertigung der Schnitte	29
2.2.5	Konventionelle Färbemethoden	30
2.2.5.1	Hämatoxylin - Eosin (H. E.)	30

2.2.5.2	Safranin-O/ Fast Green Färbung	30
2.2.6	Immunhistochemie	31
2.2.6.1	Konzentration von Puffer, Reagenzien und Antikörper	31
2.2.6.2	Kollagen I	32
2.2.6.3	Kollagen II	33
2.2.6.4	Kollagen III und Aggrecan	33
2.2.7	Polarisationsmikroskopie mittels Picrosirius Red	33
2.2.8	Auswertemethoden und -verfahren der Paralysegruppe	34
2.3	<b>Atrophiegruppe</b>	<b>34</b>
2.3.1	Volumen- und Gewichtsmessung	35
2.3.1.1	Gewichtsmessung	35
2.3.1.2	Volumenmessung	35
2.3.1.3	Dichteberechnung	35
2.3.2	Histologie	35
2.3.2.1	Fixierung der Präparate	36
2.3.2.2	Fertigung der Schnitte	36
2.3.2.3	Färbemethoden	36
2.3.2.3.1	Übersichtsfärbung mit Hämatoxin – Eosin	36
2.3.2.3.2	Fettfärbung	37
2.3.2.3.3	Kernfärbung	37
2.3.2.4	Confocal Mikroskopie	38
2.3.2.4.1	Prinzip der Confocal Mikroskopie	38
2.3.2.4.2	Versuchsaufbau	39
2.3.2.5	Messung der Fibrillendurchmesser und Beurteilung der Morphologie der Myozyten	39
3	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	<b>Paralysegruppe</b>	<b>40</b>
3.1.1	Gewichtszunahme bis zum Tötungszeitpunkt	40
3.1.2	Koeffizient von Kollagen I zu Kollagen III als Zeichen einer fortgeschrittenen Sehnenheilung	41

---

3.1.3	Knorpelbildung am Knochen-Sehnen-Interface	45
3.1.4	Faserverlauf in der Polarisationsmikroskopie	54
3.1.5	Zellmorphologie und Verteilungsmuster	55
3.1.6	Insertionswinkel der Kollagenfasern an der Enthese	56
3.1.7	Sehndurchmesser und Querschnittsfläche	60
3.2	Atrophiegruppe	61
3.2.1	Volumenmessung und Feuchtgewicht	61
3.2.2	Dichteberechnung	65
3.2.3	Fibrillendurchmesser	67
3.2.4	Verfettungsgrad in der confocalen Mikroskopie	70
3.2.5	Morphologie und Anordnung der Myozyten	74
3.2.6	Reversibilität der Veränderungen im chronologischen Verlauf	76
4	Diskussion	77
4.1	Diskussion der Ergebnisse	77
4.1.1	Ergebnisse Paralysegruppe	77
4.1.1.1	Vermehrter Anteil von Kollagen Typ I als Zeichen einer fortgeschrittenen Sehnenheilung bei präoperativer Botulinumneurotoxin A – Injektion	77
4.1.1.2	Vermehrte Faserknorpelbildung bei präoperativer Botulinumneurotoxin A - Gabe	78
4.1.1.3	Höherer Ordnungsgrad beim Faserverlauf unter Botulinumneurotoxin A -Therapie	79
4.1.1.4	Keine Erhöhung der Entzündungsaktivität unter Botulinumneurotoxin A	80
4.1.1.5	Abmilderung des Effekts von Botulinumneurotoxin A bei gleichzeitiger Immobilisation	80
4.1.2	Ergebnisse Atrophiegruppe	81
4.1.2.1	Reduktion der Muskelmasse und des -volumens im Vergleich zur Kontrollgruppe	81
4.1.2.2	Signifikat höherer Verfettungsgrad unter Botulinumneurotoxin A	82

4.1.2.3	Veränderung der Zellmorphologie der Myozyten zum Zeitpunkt der Plateauphase von Botulinumneurotoxin A	83
4.1.2.4	Regeneration und Reversibilität der durch Botulinumneurotoxin A verursachten morphologischen Veränderungen	84
4.2	Diskussion der Methoden	84
4.2.1	Diskussion Paralysegruppe	84
4.2.1.1	Sprague Dawley- Ratte als etabliertes Modell für die Rotatorenmanschette	84
4.2.1.2	Injektionszeitpunkt und Dosierung von Botulinumneurotoxin A	85
4.2.1.3	Operationsmethode	86
4.2.1.4	Tötungszeitpunkt	87
4.2.2	Diskussion Atrophiegruppe	88
4.2.2.1	Sprague Dawley- Ratte als etabliertes Modell in der Botulinumneurotoxintherapie	88
4.2.2.2	Signifikanz der Wägemethode	89
4.2.2.3	Signifikanz der Volumenverdrängung	89
5	Zusammenfassung	91
6	Ausblick	94
7	Abkürzungsverzeichnis	96
8	Literaturverzeichnis	98
9	Abbildungsverzeichnis	107
10	Tabellenverzeichnis	109
11	Materialverzeichnis	110
12	Geräteverzeichnis	112
13	Medikamentenverzeichnis	113
14	Reagenzienverzeichnis	114

15	Veröffentlichungen	116
16	Danksagung	117
17	Eidesstattliche Versicherung	119

## **1 Einleitung**

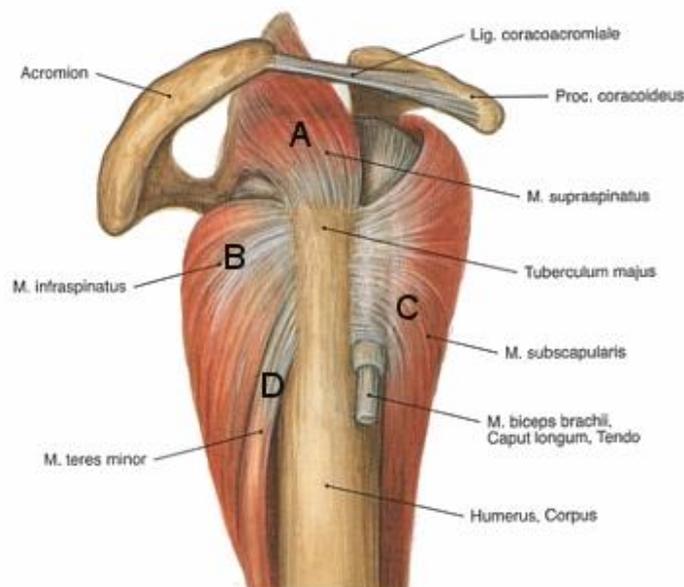
### **1.1 Die Rotatorenmanschette**

Die Intaktheit der Rotatorenmanschette ist maßgeblich für die korrekte Funktionsweise und den umfassenden Bewegungsumfang der Schulter verantwortlich. Die Häufigkeit von Verletzungen an der Rotatorenmanschette ist proportional zum Lebensalter und führt nach initialer Ruptur der Rotatorenmanschette bedingt durch nachfolgende Kranialisierung des Humeruskopfes meist zu einer Defektarthropathie im Endstadium. Dabei stellen Rotatorenmanschettendefekte unter allen Sehnenverletzungen mit einer Inzidenz von 3,73 % ein klinisch relevantes Problem dar [1]. Hierunter zeigen sich besonders degenerative Rotatorenmanschettentraktionen als eine der häufigsten Erkrankungen der oberen Extremität und sind in der Bevölkerungsgruppe der über 65-Jährigen mit bis zu 30 % aufzufinden [2, 3]. Durch die steigende Lebenserwartung ist mit einer Zunahme von Rotatorenmanschettendefekten zu rechnen. Die Formgebung von Humeruskopf und Glenoid erlaubt hohe Freiheitsgrade hinsichtlich der Bewegung. Die Intaktheit der Rotatorenmanschette ist weiterhin ursächlich für die Zentrierung des Humeruskopfes in der Cavitas glenoidalis und das hohe Bewegungsausmaß des Schultergelenks. Zum Verständnis der Auswirkung von traumatischen und degenerativen Verletzungen der Rotatorenmanschette ist die exakte Kenntnis der Anatomie von großer Bedeutung.

#### **1.1.1 Aufbau und Funktion der Rotatorenmanschette**

Die Rotatorenmanschette umfasst eine Gruppe von vier Muskeln (M. supraspinatus, M. infraspinatus, M. subscapularis und M. teres minor), deren Sehnen zusammen mit dem Ligamentum coracohumerale eine derbe Sehnenkappe bilden und das Schultergelenk von kranial, ventral und partiell auch dorsal einfassen [4]. Der Ursprung aller vier Muskeln liegt an der Scapula. Währenddessen sich der Ansatz von M. supraspinatus, M. infraspinatus und M. teres minor am Tuberculum majus befindet, inseriert der M. subscapularis am Tuberculum minus. Funktionell betrachtet erlaubt die Rotatorenmanschette Bewegungen in allen Freiheitsgraden. M. supraspinatus, M. infraspinatus und M. teres minor, die allesamt zur Gruppe der dorsalen Schultermuskulatur zählen, zeigen sich für die Außenrotation verantwortlich. Die Abduktion erfolgt durch den M. supraspinatus, für die Innenrotation ist der zur ventralen Schultermuskulatur zählende M. subscapularis verantwortlich. Letztgenannter ermöglicht ebenfalls im Zusammenspiel mit dem M. teres minor die

Adduktion. Die Retroversion fällt in das Aufgabenspektrum des M. teres minor. Im Zusammenspiel bewirken alle Muskel der Rotatorenmanschette eine Zentrierung und Stabilisierung des Humeruskopfes in der Cavitas glenoidalis [5]. Der Verlust dieser Zentrierungs- und Stabilisierungsfunktion wird insbesondere bei dem aus Rotatorenmanschettendefekten resultierenden Hochstand des Humeruskopfes offensichtlich. Rodosky et al. konnte zeigen, dass auch die lange Bizepssehnen funktionell zur Rotatorenmanschette zu rechnen ist, da von ihr ebenfalls ein zentrierende und stabilisierende Wirkung auf den Humeruskopf ausgeht [6].



**Abb. 1: Aufbau und Muskeln der Rotatorenmanschette von lateral, modifizierte Abb. aus [7]** (A: M. supraspinatus B: M. infraspinatus C: M. subscapularis D: M. teres minor) Die Muskeln sorgen für eine Zentrierung des Humeruskopfes und ermöglichen Bewegungen in allen Freiheitsgraden.

	<b>Ursprung</b>	<b>Ansatz</b>	<b>Innervation</b>	<b>Funktion</b>
M. supraspinatus	Fossa supraspinata, Fascia supraspinata	Proximale Facette des Tuberculum majus	N. suprascapularis (Plexus brachialis, Pars supraclavicularis)	Abduktion in der Scapularebene bis zur Horizontalebene, Außenrotation
M. infraspinatus	Kaudaler Rand der Spina scapulae, Fossa infraspinata, Fascia infraspinata	Mittlere Facette des Tuberculum majus	N. suprascapularis (Plexus brachialis, Pars supraclavicularis)	Außenrotation, Abduktion in der Scapularebene (kranialer Teil), Außenrotation, Adduktion in der Scapularebene (kaudaler Teil)
M. subscapularis	Fossa subscapularis	Tuberculum minus und angrenzender Teil der Crista tuberculi minoris	Nn. subscapulares (Plexus brachialis, Pars infraclavicularis)	Innenrotation, Abduktion in der Scapularebene (kranialer Teil), Adduktion in der Scapularebene (kaudaler Teil)
M. teres minor	Kaudaler Abschnitt der Fossa infraspinata, mittleres Drittel des Margo lateralis	Distale hintere Facette des Tuberculum majus	N. axillaris (Plexus brachialis, Pars infraclavicularis)	Außenrotation, Adduktion in der Scapularebene

Tab. 1: Die Muskeln der Rotatorenmanschette und deren Funktion, modifiziert nach [7]

### 1.1.2 Ätiologie, Pathogenese und Pathophysiologie von Rotatorenmanschettenrupturen

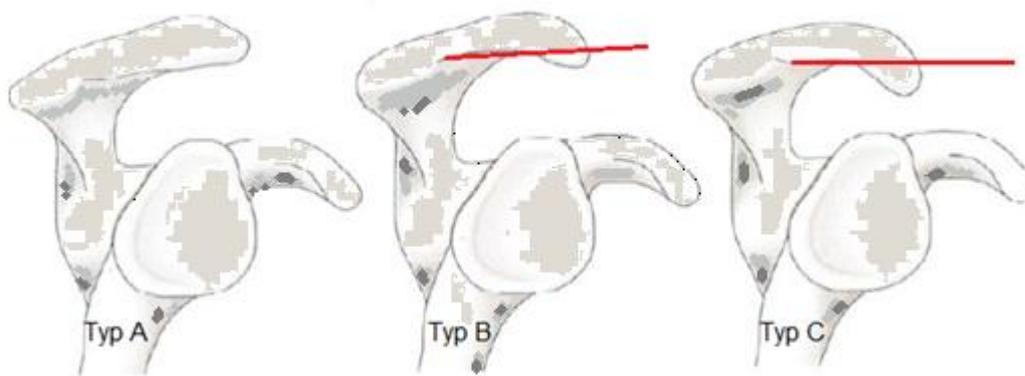
Rotatorenmanschettenrupturen zeigen sich insbesondere im Patientenkollektiv der über 65-jährigen mit bis zu 30 % [2], wobei hier eindeutig von degenerativen Rotatorenmanschettenrupturen auszugehen ist. Die auf ein Trauma zurückgeführten Läsionen werden je nach Literatur mit 5 - 8 % klassifiziert und betreffen ein jüngeres Patientenspektrum [8]. Neben der degenerativen und traumatischen Komponente lassen sich die Rupturen auch in inkomplette und komplette Rupturen unterscheiden. Bei Betrachtung der Inzidenz zeigen sich bis zu 37 % inkomplette Rupturen [9], während eine komplette Ruptur in bis zu einem Viertel Folge einer traumatischen Erstluxation ist [10]. Neuere Studien konnten auch zeigen, dass Patienten, welche wegen einer kompletten oder

inkompletten Rotatorenmanschettenruptur behandelt wurden, ein erhöhtes Risiko für eine Ruptur an der kontralateralen Seite aufweisen. Eine höchst signifikante Prävalenz im Vergleich zur Kontrollgruppe (keine stattgehabte Schädigung an der Rotatorenmanschette im Vorfeld) ließ sich insbesondere in der Altersgruppe 50 bis 69 Jahre aufzeigen [11]. Ein erhöhtes Risiko konnte ebenfalls für Überkopftätigkeiten bzw. Überkopfsportarten [12] aufgezeigt werden. Payne et al. konnte zeigen, dass eine Inzidenz von bis zu 91 % unter jungen Überkopfsportlern vorliegt [13].

Ätiologisch betrachtet erfolgt eine Rotatorenmanschettenruptur bei Überschreiten der mechanischen Belastbarkeit des Sehngewebes. Dies kann bedingt sein durch rezidivierende Kompression des Sehngewebes sowie Mikrotraumata insbesondere bei subacromialen Impingement [14]. Am häufigsten zeigt sich diese Erscheinung im Rahmen einer reaktiven Veränderung der Sehne im Sinne einer Tendinosis calcarea [15], welche in der klinischen Betrachtung bei Refior et al. bei 51,1 % zu Verkalkungen der Sehne bei gleichzeitigem Auftreten von Rotatorenmanschettenrupturen führte [16].

Hinsichtlich des Pathomechanismus müssen zwei Gruppen unterschieden werden. Bei traumatischen Rotatorenmanschettenrupturen ist ein intraartikuläres Abscheren des Sehnenansatzes, passive Humeruskopftraktion oder eine exzentrische Belastung angespannter Teile der Rotatorenmanschette, wie z.B. bei passiv forcierter Außen- oder Innenrotation zu finden [17], ursächlich. Degenerative Rotatorenmanschettenrupturen werden neben rezidivierenden Mikrotraumata meist durch ein subacromiales Impingement durch den Hochstand des Humerus hervorgerufen. Sekundär führt dies zu einer Schädigung der Sehnen der Rotatorenmanschette. Dieses von Fukuda et al. [18] auch als sekundäres Outlet Impingement bezeichnete Bild führt durch die mechanische Kompression zu einer entzündlichen Veränderung der Sehnen, welche kompressionsbedingt strukturell ausgedünnt werden. Folglich zeigt sich die Form des Acromions (klassifiziert nach Bigliani [19]) und die daraus resultierende Größe des Subacromialraumes von entscheidender Bedeutung für die aus der Impingementsymptomatik resultierenden Rotatorenmanschettendefekten und ist Ansatzpunkt für deren Therapie [20]. In der von Bibertaler et al. veröffentlichten in vivo Studie zeigte sich auch eine vaskuläre Komponente. Bei degenerativen Rotatorenmanschettenrupturen konnte eine signifikante Verringerung der Kapillardichte an den Rändern des Risses im Vergleich zum Kontrollgewebe nachgewiesen werden [21].

Diese Erkenntnis deckt sich auch mit den von Codman bereits 1934 veröffentlichten Erkenntnissen. Hier wurde bereits eine artikulareseitige Hypovaskularität im Ansatz von rupturiertem Sehngewebe publiziert [22]. Meist zeigt sich der vordere Ansatzpunkt des M. supraspinatus initial affektiert, von dem ausgehend es zu einer Progression des Risses aufgrund der zunehmenden Beanspruchung der restlichen Sehnenfasern kommt [23]. Dieser klinischen Tatsache folgend, basiert diese in vivo-Studie auf tierexperimentellen Untersuchungen des M. supraspinatus.



**Abb. 2: Die Acromiontypen nach Bigliani [19] (modifiziert nach [24]):** Bigliani teilt die Acromiontypen anhand des Neigungswinkels der Acromionunterfläche ein. Die rot eingezeichnete Markierung stellt die Resektionsebene bei der subacromialen Dekompression zu Überführung der Acromiontypen B und C in einen Acromiontyp A dar.

### 1.1.3 Klassifikation der Rotatorenmanschettenruptur

Die Klassifikation von Rotatorenmanschettenrupturen orientiert sich an anatomischen, funktionellen und physiologischen Parametern, auf deren Grundlage im Lauf der letzten beiden Jahrhunderte diverse Einteilungen entwickelt wurden. Bereits 1920 wurde eine Klassifikation von Bateman [25] erstmals beschrieben, welche sich primär bei kompletten Rotatorenmanschettenrupturen an der Größe des Defekts orientierte. Codman beschrieb 1934 eine Partialruptur, basierend auf einer hypovaskulären Genese [22]. Neer veröffentlichte 1983 eine Arbeit [26], in der er die aus der Impingementsymptomatik resultierenden Rotatorenmanschettenrupturen in drei Stadien klassifizierte. Während sich im Stadium 1 lediglich Einblutungen oder eine ödematöse Komponente in den Sehnen finden lässt, zeigen sich bei Persistenz der Symptomatik Fibrosierungen des Sehngewebes (Stadium II). Diese Fibrosierungen sind letztlich ursächlich für sich als

Folgezustand zeigende partielle oder transmurale Rotatorenmanschettenrupturen (Stadium III). In der von Patte 1990 eingeführten Klassifikation wurde der bestehende Parameter der Rissausdehnung um eine topographische Zuordnung des Risses in der Sagittal- oder Frontalebene ergänzt [25, 27]. Ellman [28] führte 1993 einerseits eine Korrelation der Rupturgröße zum Sehnedurchmesser, andererseits eine Klassifikation der Rupturform durch. Millstein und Snyder führten in der 2003 veröffentlichten Arbeit eine Einteilung der Ruptur in vier Kategorien durch. Es erfolgte eine Klassifikation nach den Kriterien Topographie (A - C) und Ausdehnung des Defektes (0 - 4) [29-31], welche in Tab. 2 zu sehen ist.

Einteilung nach der Lokalisation der Ruptur	
<b>A</b>	Partielle Rotatorenmanschettenruptur, artikularseitig
<b>B</b>	Partielle Rotatorenmanschettenruptur, bursaseitig
<b>C</b>	Komplette / transmurale Ruptur der Rotatorenmanschette
Einteilung nach der Rupturgröße	
<b>0</b>	Normalzustand
<b>1</b>	Entzündliche Infiltrate mit Affektion der Sehnenoberfläche, < 1cm
<b>2</b>	Partielle Rotatorenmanschettenruptur >1cm und <2cm
<b>3</b>	Rotatorenmanschettenruptur >2cm und <3cm
<b>4</b>	Komplexe Rotatorenmanschettenruptur >3cm

**Tab. 2: Einteilung von Rotatorenmanschettendefekten nach Millstein und Snyder**

Die am häufigsten im deutschsprachigen Raum verwendete Klassifikation ist die Sektoreinteilung nach Habermeyer [31, 32], welche der Ruptur drei spezifisch definierte Zonen zuordnet.

Einteilung nach der Lokalisation der Ruptur	
<b>A</b>	ventraler Abschnitt, die Subscapularissehne, das Rotatorenintervall und die lange Bizepssehne umfassend
<b>B</b>	kranialer Abschnitt im Bereich der Supraspinatussehnen
<b>C</b>	dorsales Kompartiment mit Affektion der Mm. infraspinatus und teres minor

Als Trennlinie zwischen Zone B und C fungiert die Verlängerungslinie der Spina scapulae.

**Tab. 3: Sektoreinteilung nach Habermeyer**

Diese Einteilung erfuhr einer Überarbeitung durch Habermeyer et al. im Jahre 2008, um den pathomorphologischen Gesichtspunkten besser Rechnung tragen zu können und klassifiziert nach folgenden Parametern [31, 33]:

Einteilung nach der Lokalisation der Ruptur	
<b>A</b>	Ruptur des Pulley-Systems im Bereich der medialen Grenze zur Supraspinatussehne und/oder in der Crescent Zone
<b>B</b>	Isolierte Partialruptur der Supraspinatussehne in der Crescent Zone, intaktes Rotatorenintervall
<b>C</b>	Ruptur ausgehend vom lateralen coracohumeralen Ligament bis in den medialen Anteil der Supraspinatussehne

**Tab. 4: Überarbeitung der Klassifikation nach Habermeyer et. al.**

#### 1.1.4 Behandlung der Rotatorenmanschettenruptur

Hinsichtlich der Behandlung von Rotatorenmanschettenläsionen ergeben sich, der in Erstellung befindlichen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie und deren Vorversion [17] folgend, sowohl konservative als auch operative Möglichkeiten. Die Wahl der Möglichkeiten ist abhängig von Beschwerdebild, pathophysiologischen Eigenschaften der Verletzung sowie den jeweiligen Begleiterkrankungen des Patienten. Grundsätzlich muss hinsichtlich der Behandlung zwischen Partial-, Total- und Massenrupturen differenziert werden.

Studien folgend, kristallisiert sich eine zunehmende Tendenz zur operativen Versorgung heraus, da weniger als 60 % aller konservativ versorgten Rotatorenmanschettenrupturen ein zufriedenstellendes Ergebnis (klassifiziert nach University of Carlifornia at Los Angeles (UCLA) [34] bzw. Simple-Shoulder-Test (SST) [35]) zeigen [36, 37]. Sollte z. B. auf Grund

nicht gegebener Operationsfähigkeit bei vorbestehenden Begleiterkrankungen eine primär konservative Versorgung indiziert sein, so ist ein therapeutischer Mix aus der Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika und physiotherapeutischer Behandlung indiziert. Ziel ist eine ausreichende Analgesie sowie die Kräftigung der noch bestehenden intakten Muskulatur der Rotatorenmanschette zur Zentrierung des Humeruskopfes in der Cavitas glenoidalis. Ergänzt werden kann diese Therapie mittels kryotherapeutischer Maßnahmen sowie einer lokalen Infiltrationstherapie mit Kortikosteroiden in den Subacromialraum. Letztere führt zu einer unmittelbaren Regression der entzündlichen Reaktion, wenngleich laut wissenschaftlichen Studien repetitive Gaben von Kortikosteroiden ebenfalls das Potential zur Progression von Rotatorenmanschettenläsionen aufweisen [38]. Auf Grund mangelnder Zufriedenheit nach primär konservativ versorgter Rotatorenmanschettenruptur [36, 37] steht zunehmend eine primär operative Versorgung im Vordergrund. Hierbei orientiert sich die Art des Eingriffs an den Parametern der Rupturausdehnung (Partial-, Total-, oder Massenruptur), dem acromiohumeralen Abstand sowie dem Acromiontyp nach Bigliani [19]. So ist primär bei Partialrupturen von Typ I nach Ellman [28] und fehlender Pathologie des Acromions ein primäres Glätten der Rupturränder ausreichend. Bei Acromiontyp II oder III sollte dieser Eingriff mit einer arthroskopischen subacromialen Dekompression komplettiert werden [39]. Bei Totalrupturen steht neben der arthroskopischen Rekonstruktion, auch in der Kombination mit Mini - open - Zugängen, weiterhin eine offene Rekonstruktion zur Verfügung. Hierdurch können nach wie vor hervorragende Langzeitergebnisse erzielt werden (vgl. [40]). Jedoch konnte auch durch Verbesserung der arthroskopischen Operationstechnik sowie durch die Etablierung von Ankertechniken ein vergleichbar gutes Outcome im kurzfristigen Intervall bei arthroskopischer Versorgung erzielt werden [40-42]. Problematisch stellen sich Massenrupturen im klinischen Alltag dar, da sie größtenteils aktuell nur insuffizient oder palliativ versorgt werden können. Als operative Verfahren kommen hier bei jüngeren, sportlich aktiven Patienten Muskeltransferoperationen wie die des M. pectoralis major [43], M. latissimus dorsi [44] oder des M. deltoideus [45] in Betracht. Eine interessante Arbeit wurde von Burkhart et al. [46] veröffentlicht, in der die spannungsfreie Partialrekonstruktion bei Massenrupturen der Rotatorenmanschette propagiert wurde. Dieses Verfahren erlaubt nur einen partiellen Verschluss der Ruptur mit hohem Risiko der Reruptur, sodass experimentelle Verfahren zur Möglichkeit einer spannungsfreien arthroskopischen

Rekonstruktion in den Vordergrund rücken (vgl. [47, 48]). Insgesamt muss angemerkt werden, dass gegenwärtig trotz aller chirurgischer Expertise und der Entwicklung spezieller Operationstechniken Rerupturraten von bis zu 94 % in der Literatur beschrieben werden [49, 50]. Daher zeigt sich ein dringlicher Handlungsbedarf, um dem Entstehen einer Defektarthropathie vorzubeugen. Denn als ultima ratio steht gegenwärtig bei der Versorgung von irreparablen, bereits fettig degenerierten Massenrupturen (klassifiziert nach [51]) und der daraus resultierenden Defektarthropathie durch die Kranialisierung des Humeruskopfes meist nur ein endoprothetischer Ersatz durch die Implantation einer inversen Schulterprothese zur Verfügung.

### **1.2. Anatomie von Sehngewebe und extrazellulärer Matrix**

Zum Verständnis der Sehnenheilung ist die exakte Kenntnis des anatomischen Aufbaus von Sehngewebe wichtig. Dem Untersuchungsziel dieser Arbeit folgend, ist der besondere Focus auf die Morphologie der Tenozyten sowie dem Verteilungsverhalten der Kollagene gerichtet.

#### **1.2.1 Morphologie und Metabolismus von Tenozyten**

Wichtigster Bestandteil des komplexen Aufbaus von Sehngewebe sind die Tenozyten. Von diesen geht einerseits die Synthese der Matrix aus und diese sind in der Lage, Kollagenfibrillen zu resorbieren [52, 53], andererseits stellen diese mengenmäßig mit bis zu 95 % den größten Bestandteil im Sehngewebe dar [54]. Dabei zeigt sich im Laufe des Entwicklungsalters von Sehngewebe eine Veränderung des initial langgezogenen und ovalen Tenozyten hin zu einer flacheren Zellmorphologie sowie einer deutlichen Reduktion der Zellzahl [52]. Hinsichtlich des ultrastrukturellen Aufbaus lässt sich ein gut ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum sowie ein Golgi Apparat finden. Hierin ist die hohe Synthesekapazität der Tenozyten begründet [54, 55]. Diese kann insbesondere durch zunehmende körperliche Aktivität im Sinne eines Trainings gesteigert werden, sodass Reorganisationsvorgänge an der Sehne stattfinden. Durch kontinuierliches Training kommt es zu einer Zunahme der Nettosynthese der extrazellulären Matrix, was zur Vergrößerung des Sehnedurchmessers führt. Biomechanisch betrachtet kommt es dadurch lokal zu einer querschnittsbezogenen Minderbelastung der Sehne [53]. Somit gehen von den Tenozyten ebenfalls auch Anpassungsvorgänge mit großer Wirkung für die Belastungsfähigkeit der

Sehnen aus. Eine exakte Betrachtung der extrazellulären Matrix, wie sie unter 1.2.2 und 1.2.3 erfolgt, liefert die Grundlage für das Verständnis von Umbauvorgängen, Pathologien und deren Regenerationsprozesse.

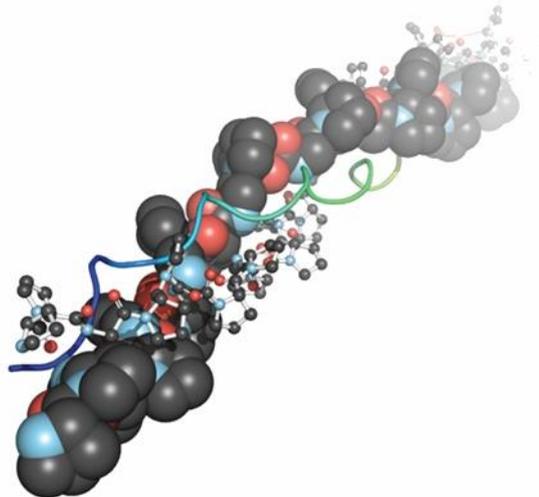
### **1.2.2 Zusammensetzung und Aufbau der extrazellulären Matrix**

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist gewebsspezifisch und setzt sich neben der aus Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Glykoproteinen bestehenden Grundsubstanz aus retikulären, kollagenen und elastischen Fasern zusammen [56]. Der Hauptfokus dieser Arbeit liegt im Aufbau, der Synthese und dem Verteilungsverhalten der Kollagene in Sehngewebe, welche im Folgenden genauer betrachtet wird.

### **1.2.3 Synthese, Aufbau und Verteilungsmuster der Kollagene**

Die Synthese der extrazellulären Matrix und der hierzu gehörenden Kollagene geht wie unter 1.2.1 aufgeführt von den Tenozyten aus und durchwandert die Stufen der Glycosylierung und Hydroxylierung, über die Assemblierung zur Tripelhelix bis letztendlich zur Ausbildung einer fibrillären Struktur. Dabei zeigen alle Kollagene vom fibrillären Typ, welche keine Unterbrechung von nicht helikalen Bestandteilen aufweisen, vom strukturellen Aufbau her ein homogenes Bild. Die Kollagene vom fibrillären Typ bestehend aus einer rechtsgängigen Tripelhelix, die durch Zusammenlagerung von drei linksgängigen Kollagen- $\alpha$ -Ketten, den sogenannten Tropokollagenen, gebildet wird [57, 58]. Dabei zeichnen sich die Tropokollagene durch eine repetitive Aminosäuresequenz aus Glycin-X-Y aus, wobei die X-Position meist von Prolin und die Y-Position meist von Hydroxyprolin, Lysin oder Hydroxylysin eingenommen wird. Grundsätzlich ist es fast allen natürlichen Aminosäuren möglich, die Y-Position einzunehmen [57, 59]. Jede der drei linksgängigen Helices weist drei Aminosäurereste pro Umdrehung, eine Ganghöhe von 0,94 nm sowie einen Anstieg pro Aminosäurerest von 0,31 nm auf [60]. Eine Stabilisierung der Polypeptidketten findet mittels Wasserstoffbrückenbindungen statt, welche sich zwischen den einzelnen Aminosäuren ausbilden. Zur Faltung der Polypeptidkette in eine eng gewundene linksgängige Helix ist das Vorhandensein von Glycin in jeder dritten Position notwendig. Hierdurch ist insbesondere eine Einpassung der Aminosäure Prolin, deren Peptidbindung durch eine Ringbindung fixiert ist, möglich [57, 60]. Drei dieser  $\alpha$ -Polypeptidketten lagern sich zur rechtsgängigen helikalen Tertiärstruktur zusammen. Durch enzymatische

Veränderungen mittels der Lysyl-Oxidase und durch Ausbildung von Schiff-Basen werden die Grundlagen für die Ausbildung von Kollagenfasern geschaffen [57].



**Abb. 3: Aufbau des Kollagens:** Die rechtsgängige helikalen Tertiärstruktur setzt sich aus drei linksgängigen  $\alpha$ -Polypeptidketten zusammen. Zu sehen ist die hochauflösende Kristallstruktur der Kollagentripelhelix, der molekulare Aufbau aus Aminosäuren ist angedeutet als Kugel-, Stab- und Bändermodell, Abb. aus [61].

### 1.2.3.1 Kollagen Typ I

Das Kollagen vom Typ I ist den fibrillären Kollagenen zuzuordnen und bildet mit 90 - 95 % den Hauptbestandteil der in einer Sehne aufzufindenden Kollagene [62] und ist ebenfalls mengenmäßig das häufigste Kollagen [56, 63]. Dabei setzt sich jedes Tropokollagen aus zwei  $\alpha_1$ -(I)-Ketten und einer  $\alpha_2$ -Kette zusammen, welche sich nach dem unter 1.2.3 genannten Schema letztlich zu Kollagenbündeln zusammenlagern. Aufzufinden ist Kollagen Typ I im menschlichen Körper u. a. in Knochen, Sehnen, Bändern und Dentin [56]. Dabei zeichnet sich diese Form des Kollagens durch seine molekulare Struktur und den im Vergleich zu anderen Kollagentypen größeren Fibrillendurchmesser aus. Durch diesen Aufbau lässt sich eine hohe Stabilität bei verringerter Elastizität erzielen [56, 64]. Daneben ist es nicht-fibrillären Kollagenen möglich, sich fibrillären Kollagenen wie dem Kollagen I anzulagern und damit das Dickenwachstum oder die Verschmelzung zu modellieren [56].

### 1.2.3.2 Kollagen Typ II

Das Vorkommen des Kollagens Typ II kann weitestgehend gleichgesetzt werden mit dem fibrillären Kollagen des Gelenkknorpels, welches aus drei identischen  $\alpha_1$ -(II)-Ketten aufgebaut ist [56, 65]. Dabei ist die Größe der Fibrillen im Vergleich meist relativ dünn mit

Variationen beim Fibrillendurchmesser. Aufgrund der am Gelenkknorpel wirkenden mechanischen Beanspruchung ist die Erhöhung der Zugfestigkeit der Kollagenfibrillen von Notwendigkeit, welche durch intermolekulare Quervernetzung via kovalenten Bindungen erzielt wird [66]. Durch die so getroffene Vernetzung ist die Stabilität bei Einwirkungen von Dreh- und Druckbelastungen erhöht. Auf Grund der dadurch erzielten erhöhte Beanspruchbarkeit eignet sich Kollagen II als Bestandteil von Knorpel, Sklera und Nucleus pulposus [56].

### 1.2.3.3 Kollagen Typ III

Nach dem Kollagen I stellt das Kollagen Typ III mengenmäßig das häufigste im menschlichen Körper vorkommende Kollagen dar [63]. Molekularbiologisch zeigt dieses Kollagen einen Aufbau aus drei identischen  $\alpha_1$ -(III)-Ketten. Auffällig ist das oft gemeinsame Vorkommen mit Kollagen I, z. T. sogar in einer Fibrille [56, 67]. Der Fibrillendurchmesser ist mit ca. 20 - 40 nm anzugeben [56]. Wissenschaftlichen Studien folgend zeigt sich ebenfalls in rupturiertem Sehngewebe eine prozentuale Zunahme des Kollagen III-Anteils [68, 69]. Durch Immunmodulation wird im Verlauf der Sehnenheilung das Kollagen Typ III durch das zugfestere Kollagen I [70] in normwertige Verhältnisse übergeführt wird. Aus diesem Grund ist das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III ein signifikanter Marker für die Qualität der Sehnenheilung, welcher ebenfalls in den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Arbeiten [48, 71] sowie weiteren Veröffentlichungen [72] Verwendung findet. Da es dem Kollagen III möglich ist, sich netzartig im Sinne von retikulären Fasern auszubilden, ist ihr Vorkommen neben den bereits erwähnten Sehngewebe in lymphatischen Organen, in der Wand von Gefäßen sowie an Oberflächen von Fett- und Muskelzellen ersichtlich.

## 1.3. Die Enthesis

Die Enthesis definiert sich aus dem Übergangsbereich von sehnigem zu knöchernem Gewebe im Bereich der Insertion der Sehne. Dabei zeigt sich ein klar gegliederter morphologischer Aufbau, welcher der Enthesis die mechanischen Eigenschaften verleiht und unter 1.3.1 genauer erläutert wird.

### **1.3.1 Morphologie der Enthesis**

Die Enthesis zeigt einen zonalen Aufbau, der sich in die Bereiche Zugsehne, unmineralisierter Faserknorpel, mineralisierter Faserknorpel und Knochen untergliedern lässt [73-76] und im Folgenden genauer erläutert wird.

#### **1.3.1.1 Zugsehnen**

Sehnen sind zugfeste Strukturen, welche primär aus in Zugrichtung parallel angeordneten Kollagenfasern der Typen I und III bestehen (vgl. 1.2.3). Hierin ist deren Zugfestigkeit im Vergleich zu anderen Gewebe bedingt [77]. Diese Fasern, welche von den Tenozyten synthetisiert werden (vgl. 1.2.1), zeigen sich von lockerem Bindegewebe, dem Peritendineum internum, welches Nervenfasern und kleine Blutgefäße enthält, umgeben [56]. Bei den Tenozyten handelt es sich um flache Fibroblasten mit flügelartigen Zellfortsätzen [56], welche durch endoplasmatisches Retikulum sowie einem Golgi Apparat die hohe Synthesekapazität der Tenozyten begründen [54, 55]. Nach außen werden die Sehnen in ihrer Gesamtheit vom Peritendineum externum, welches kontinuierlich in das Perimysium übergeht, abgegrenzt.

#### **1.3.1.2 Unmineralisierter Faserknorpel**

Auf die Zugsehne folgend zeigt sich die Zone des unmineralisierten Faserknorpels. Morphologisch betrachtet zeichnet sich hier ein Wandel der Zellform der Tenozyten hin zur Morphologie der Chondrozyten ab [75]. Hinsichtlich der Orientierung der Knorpelzellen zeigt sich eine longitudinale Ausrichtung zwischen den parallel angeordneten Kollagenfasern [75, 78]. Eine Abgrenzung des unmineralisierten Faserknorpels vom mineralisierten Faserknorpel erfolgt durch die "tidemark" [79], welche sich histologisch als basophile Linie lichtmikroskopisch zeigt [78].

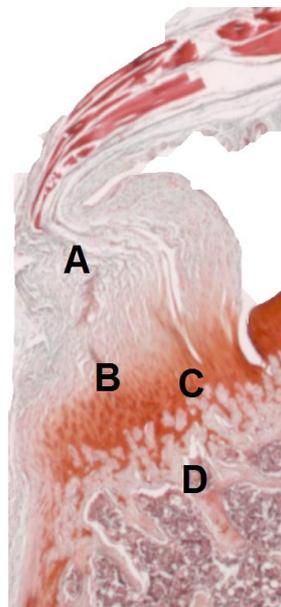
#### **1.3.1.3 Mineralisierter Faserknorpel**

Der mineralisierte Faserknorpel ist wie erwähnt mittels Tidemark vom unmineralisierten Faserknorpel abgegrenzt und zeigt sich als schmale bis teils nicht vorhandene Zone [78, 80]. Morphologisch sind in dieser Zone der Enthesis Chondrozyten gepaart mit extrazellulärer Matrix anzufinden [74]. Dabei ist das Zellreichtum im Vergleich zum unmineralisierten Faserknorpel als geringer zu bewerten. Ursächlich ist dies

möglicherweise in Ablagerungen von Calciumsalzen in der extrazellulären Matrix, welche zum Zelltod führen [78]. Immunhistochemisch lässt sich in dieser Region vermehrt Kollagen II detektieren, welches neben dem unmineralisierten Faserknorpel vor allem den mineralisierten Faserknorpel erfasst und sich ebenfalls für Aggrecan und Chondroitin-6-sulfat positiv zeigt [78, 81, 82]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Bereich des Faserknorpels ein Ersatz des sonst in Sehnen- und Knochengewebe vorherrschenden Kollagen I durch Kollagen II erfolgt (vgl. 1.2.3.1) und die Kollagen II-Region als Fuge imponiert, was auch als "gap-Phänomen" bezeichnet wird [81, 82].

#### 1.3.1.4 Knochen

Der Knochen zeigt einen Lamellenknochen mit den dafür typischen miteinander verbundenen Lamellen. Diese bestehen aus verkalkter Matrix mit ausgesparten linsenförmigen Lakunen, welche die Osteozyten beinhalten [56]. Dabei zeigt sich die Mehrheit der Lamellen konzentrisch um längs verlaufende Gefäße angeordnet und bildet die für einen Lamellenknochen typischen zylindrischen Baueinheiten der Osteone [56]. Hinsichtlich der Zugbelastung ist eine Verzahnung der Osteone mit dem Knorpelgewebe mit einer erhöhten Belastungsfähigkeit auf Zug verbunden, welche z. B. bei alleiniger Einstrahlung in das Periost nicht gegeben wäre [83].

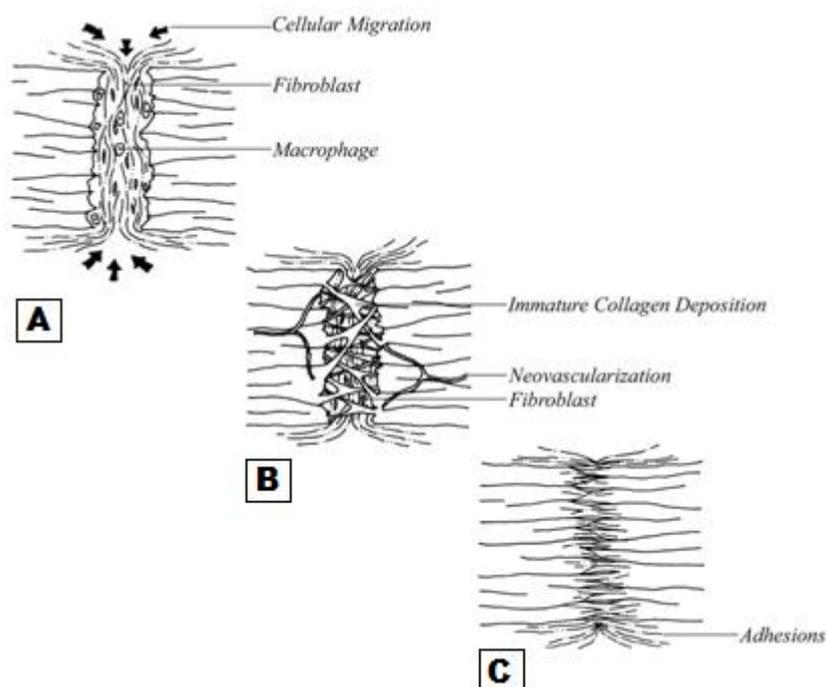


**Abb. 4: Der Aufbau der Enthesis:** Oben aufgeführte Abbildung zeigt den Übergang der Zugsehne (A) über den unmineralisierten Faserknorpel (B) zum mineralisierten Faserknorpel (C), welcher letztlich in den Lamellenknochen (D) übergeht; eigener histologischer Schnitt (Färbung: H.E.) aus einer Sprague-Dawley-Ratte (Humerus mit M. supraspinatus).

### 1.3.2 Funktion der Enthese und Ablauf der Sehnenheilung

Bedingt durch den Aufbau besteht die Funktion der Enthese darin, die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften von Knochen und Sehne kontinuierlich anzugleichen. Hierdurch können die an solchen Grenzflächen entstehenden lokalen Spitzenbelastungen verringert werden [73, 78, 84]. Die molekularbiologischen und mechanischen Eigenschaften der Enthese sind von entscheidender Bedeutung beim Remodeling nach mechanischer Belastung, insbesondere die mikrofilamentäre Quervernetzung der Tenozyten ist hierfür maßgeblich verantwortlich [73].

Der Ablauf der Sehnenheilung lässt sich gemäß Strickland in drei Phasen einteilen [85]. Nach Ruptur im Rahmen von traumatischen oder degenerativen Ereignissen zeigt sich initial eine lokale Blutung mit Anlagerung von Thrombozyten und Fibrin im Bereich der Rupturzone [86, 87]. Auf diese Phase folgt die Einwanderung von Entzündungszellen mit nachfolgendem Start der Entzündungskaskade und immunochemischen Reaktionen. Die von den Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren (u. a. transformin growth factor (TGF) und Platelet-derived growth factor (PDGF)) [86] führen zu einer Stimulierung der Fibroblasten und leiten in Anschluss an die durch Entzündungsreaktionen geprägte initiale Phase die Regenerationsphase mit Produktion von Kollagen III durch die Tenozyten (vgl. 1.2.1) ein [88]. Hierdurch wird eine Stabilisierung der Sehnenstümpfe erzielt, welche jedoch im Bereich der Rupturzone weiterhin arm an dem sonst in Sehngewebe vorherrschendem Kollagen I sind [62]. Weiterhin zeigt sich ein inhomogenes Bild hinsichtlich der Ausrichtung der Kollagenfasern. Im Zuge der ca. sechs bis acht Wochen nach der Ruptur folgenden Umformungsphase zeigt sich eine Reduktion der Kollagen III-Produktion hin zur Produktion von Kollagen I durch die Tenozyten. Ebenfalls erfolgt ein Remodeling der extrazellulären Matrix mit Ausrichtung der Kollagenfasern in Zugrichtung, welche den Zeitraum von drei bis vier Monaten in Anspruch nimmt. Insgesamt zeigt sich im Verlauf der Sehnenheilung eine Reduktion des Zellreichtums von inflammatorischer Phase zur Umformungsphase, in welcher der gewebsspezifische Zustand der Zellarmut im Sehngewebe wieder erzielt wird.



**Abb. 5: Die zellulären Phasen der Sehnenheilung:** A: Inflammatorische Phase mit dem Einwandern von Fibroblasten und Entzündungszellen und nachfolgenden phagozytären Reaktionen B: Fibroblastäre Phase: Proliferation von Fibroblasten, Ausbildung von Kollagen und Revaskularisation. C: Remodelingphase, Ausrichtung der Kollagenfasern in Zugrichtung, modifizierte Abb. aus [89, 90]

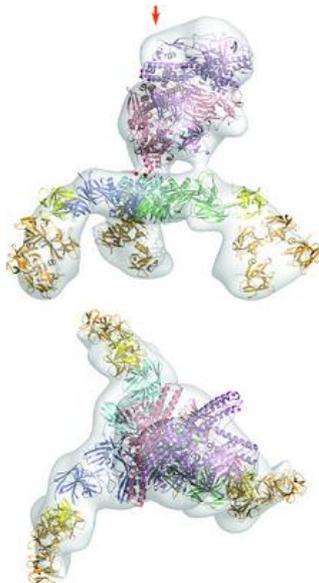
#### 1.4. Botulinumneurotoxin A

Botulinumneurotoxin A (BoNT A) ist ein vom anaeroben gram - negativem Bakterium *Clostridium botulinum* erzeugtes und ausgeschiedenes Protein [91]. Neben dem Serotyp A, welcher im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, zeigen sich ebenfalls die Serotypen B - H. Humanpathogen sind die Serotypen A, B, E, F und H [92, 93]. Auf Grund der Verwendung von Serotyp A beziehen sich nachfolgende Ausführungen zu chemischem Aufbau und Wirkmechanismus auf Botulinumneurotoxin A.

##### 1.4.1 Chemischer Aufbau

Die Produktion und Sezernierung des Botulinumneurotoxin A erfolgt durch das Bakterium *Clostridium botulinum*. Dabei besteht das Neurotoxin aus zwei Komponenten von Proteinkomplexen [94], einer schweren Kette und einer leichten Kette. Die schwere Kette, welche weitestgehend aus Hüllproteinen besteht und nicht toxisch ist, weist ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa auf. Von der leichten Kette mit Molekulargewicht von 50 kDa geht die eigentlich toxische Wirkung mittels einer zinkabhängigen Endopeptidase aus

[95]. Die Verbindung dieser beiden Ketten erfolgt mittels Disulfidbrücken, welche spezifisch für den jeweiligen Serotyp sind. Durch Spaltung der Disulfidbrücken ist eine Überführung in die biologisch aktive Form erst möglich ist [96]. Das Neurotoxin ist dabei wiederum Bestandteil eines Molekülkomplexes, welcher als Vorläufertoxin bezeichnet wird und sich aus den Komponenten Neurotoxinmolekül, nicht-toxischem Hämagglutinin-Molekül sowie einem Hämagglutinininkomplex zusammensetzt [95, 97, 98]. Die nicht-toxischen Komponenten stellen dabei eine protektive Wirkung, insbesondere bei Einfluss von Säuren dar und stabilisieren das Neurotoxin [98].



**Abb. 6: Die Raumstruktur des Botulinumkomplexes:** Obige Grafik zeigt den Proteinkomplex, der sich aus dem serotypspezifischen Neurotoxin, Hämagglutininen und einem nicht toxischen Protein zusammensetzt, u. a. sind mehr als 6500 Aminosäuren sowie das Neurotoxin, eine Zink-bindende Endoprotease beteiligt, Abb. aus [97]

#### 1.4.2 Wirkungsmechanismus

Der Wirkungsmechanismus von Botulinumneurotoxin A besteht in der Hemmung der Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin und somit einer Hemmung der nervalen Impulsübertragung zum Muskel [99]. Dabei vollzieht das Botulinumneurotoxin gemäß dem Toxikokinetikmodell von Simpson [100] einen mehrstufigen Verlauf bis zum Eintritt der Wirkung. Dieser Verlauf lässt sich in die Abschnitte Bindung, Internalisierung und Translokation sowie die proteolytische Wirkung untergliedern [99, 101].

Die initiale Bindung des Botulinumneurotoxin A erfolgt mittels des carboxyterminalen Endes an die präsynaptische Membran, dabei ist die Konfiguration der schweren Kette von entscheidender Bedeutung. Durch Depolarisation des Neurons und Ausschüttung von Acetylcholin wird der für die Internalisierung und Translokation erforderliche Rezeptor, das sogenannte membranständige Vesikelprotein SV2 für das Botulinumneurotoxin zugänglich [99, 102, 103]. Im Zuge der Internalisierung und Translokation ist dadurch eine Bindung des Botulinumneurotoxin A-Komplexes an den SV2 möglich und es erfolgt die Aufnahme mittels Endozytose [99, 102, 103]. Nach Ansäuerung durch eine Protonenpumpe und der dadurch verursachten Konformationsänderung wird durch den aminoterminalen Teil der schweren Kette eine Porenbildung in der Vesikelmembran geschaffen. Hierdurch kann nach Spaltung der Disulfidbrücke die leichte Kette zum Zytosol vordringen und die toxische Wirkung an cholinergen Nerven ist möglich [99, 104, 105]. Durch spezifische Spaltung des Zielproteins, welches bei Botulinumneurotoxin A das Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) darstellt, wird die Fusion der Vesikel mit der Membran inhibiert. Dadurch ist die Freisetzung von Acetylcholin verhindert und es bildet sich durch das Fehlen des Transmitters eine schlaffe Lähmung der Muskulatur aus [99, 104-106]. Bis zur Neubildung des für die Exozytose essentiellen SNAP-25, welches den Zeitraum von etwa 3 Monaten umfasst, erfolgt die Remission der Synapse über ein kollaterales Aussprossen des Axons mit Bildung neuer Nervenendigungen [99, 107].

### **1.4.3. Indikationen zur Therapie mit Botulinumneurotoxin A in der Orthopädie und Unfallchirurgie**

Botulinumneurotoxin ist seit Jahrzehnten ein etabliertes Medikament in der konservativen Orthopädie zur Erzielung einer selektiven Paralyse. Interessante Arbeiten wurden hierzu von Placzek et al., Keizer et al. [108] und Wong et al. [109] veröffentlicht, welche den Einsatz von Botulinumneurotoxin A bei spastischer Hüftlateralisation und -subluxation [110], chronischer Epikondylopathia humeri radialis [111, 112] sowie bei chronischer Plantarfasciitis [113] einer genaueren Untersuchung unterzogen und allesamt hinsichtlich des Krankheitsverlaufs positive Aspekte zeigen konnten. Ebenfalls konnten Döderlein et. al. [114], Seyler et. al. [115] und Mall et. al. [116] die teils mehr als 20 Jahre bestehende Erfahrung mit Botulinumneurotoxin A im Rahmen von spastischen und dystonen Bewegungsstörungen aufzeigen.

Während bei oben genannten Indikationen weitestgehend eine chronische und vorbestehende Komponente mittels Therapie durch Botulinumneurotoxin A behandelt wird, zeigt sich in einer von Tüzüner et al. [117] veröffentlichten Studie erstmals der Einsatz von Botulinumneurotoxin A bei der Versorgung einer akuten Verletzung.

Tüzüner untersuchte das postoperative Outcome von Beugesehnenverletzungen der Hand an sieben Kindern unter sechs Jahren, zu deren Versorgung er zur selektiven Paralyse Botulinumneurotoxin A in die korrespondierende Unterarmmuskulatur injizierte. Hierdurch konnte er in allen Fällen gute bis sehr gute Ergebnisse (gemessen an der Strickland Einteilung [118]) erzielen und den Patienten ein Maximum an Bewegungsfreiheit zusichern. Auf eine lange andauernde Immobilisation konnte ebenso verzichtet werden wie auf Aktivitätskontrolle.

Eingedenk der dort erzielten positiven Erfahrung und der in der Literatur beschriebenen Schmerzreduktion [119] unter Einfluss von Botulinumneurotoxin A sowie den unter 1.1.4 aufgeführten schlechten Langzeitergebnissen nach Rotatorenmanschettenrekonstruktion, formulierten wir folgende Fragestellung, die es im Rahmen der dieser Arbeit zugrunde liegenden Veröffentlichungen [48, 71] zu klären galt.

### **1.5 Fragestellung**

Da wie unter 1.1.4 aufgezeigt, mittel- und langfristige Ergebnisse eine Rerupturrate von bis zu 94 % [49, 50] aufweisen, stellt sich die Frage nach den hierfür ursächlichen Gründen. Mehrere Studien [120-122] zeigen ein erhöhtes Spannungsreichtum am Knochen - Sehnen-Interface als vermuteten Faktor auf, welcher insbesondere bei nur unter erhöhter Vorspannung zu adaptierenden großen und/ oder alten Rotatorenmanschettendefekten zu finden ist [120, 121, 123]. Die hier zu erwartende Zunahme der Vorlast geht einher mit einer Abnahme der zur Reruptur notwendigen Kraft [120-122]. Nach aktuellem Stand und klinischen Erfahrungswerten bieten sich kaum Möglichkeiten durch operative Techniken positiv auf die Vorspannung einzuwirken. Einen interessanten Aspekt bietet der Einsatz von Botulinumneurotoxin A, welches bisher als Neoadjuvant im Rahmen einer standardisierten Therapie keinen Einzug gefunden hat. Gestützt auf die Erfahrungen im Bereich der konservativen Orthopädie [114, 115] (siehe auch 1.4.3) und einer 2004 von Tüzüner et al. veröffentlichten Studie [117] (siehe 1.4.3) bezieht sich die Fragestellung dieser Arbeit darauf, ob durch eine neoadjuvante Botulinumneurotoxin A-Injektion in die

korrespondierende Schultermuskulatur sich langfristige Ergebnisse nach Rotatorenmanschettenrekonstruktionen positiv beeinflussen lassen. Durch die Reduktion der Vorlast mittels Paralyse versprechen wir uns insbesondere bei alten und/oder großen Rotatorenmanschettendefekten, bei denen eine arthroskopische Versorgung kaum möglich ist, Möglichkeiten zur minimalinvasiven Therapie (vgl. [46]). Bezogen auf die hohe Rerupturrate [49, 50] sehen wir weiterhin einen Ansatzpunkt in der Verringerung der Vorlast sowie des Muskeltonus, um so das langfristige Outcome der Sehnennaht zu verbessern [121, 124-126]. Abschließend sehen wir ebenfalls ein Potential in der Verkürzung der Rehabilitationsphase sowie der Verkürzung der Immobilisation mittels Orthese. Letztgenannter Aspekt ist maßgeblich von der Compliance des Patienten abhängig, so dass auch Bevölkerungsgruppen, die nachweislich eine herabgesetzte Compliance haben, wie z. B. an dementiellem Syndrom leidende Patienten von einer selektiven Paralyse profitieren könnten. Wir formulierten daher die unter 1.5.1 - 1.5.3 aufgeführten Versuchsparameter zur Kontrolle unserer Fragestellungen:

- 1.5.1 Auswirkungen der neoadjuvanten Gabe von Botulinumneurotoxin A auf die Sehnenheilung und knöchernen Sehnenintegration
- 1.5.2 Auswirkungen von Immobilisation auf die knöchernen Sehnenintegration
- 1.5.3 Langzeitwirkung von Botulinumneurotoxin A auf die Morphologie der Muskulatur

## 2 Material und Methoden

Der tierexperimentelle Part der Dissertation wurde im Walter-Brendel-Institut, Marchioninstr. 27, 81377 München (Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl) des Universitätsklinikums München, Campus Großhadern durchgeführt. Die histologischen und immunhistologischen Auswertungen erfolgten im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie, Marchioninstr. 23, 81377 München des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern (Leiter: Dr. rer. biol. hum. Oliver Betz). Sämtliche Untersuchungen erfolgten konform den geltenden Tierschutzbestimmungen und wurden von der Regierung von Oberbayern mit Sitz Maximilianstr. 39, 80538 München unter der Versuchsnummer 55.2-1-54-2531-194-09 genehmigt.

### 2.1 Tiermodell

Angelehnt an Peltz et. al. [127], Buchmann et. al. [128] und Hettrich et. al. [72] wurde ebenfalls das etablierte Tiermodell der Sprague Dawley- Ratte für Untersuchungen an der Rotatorenmanschette gewählt.

#### 2.1.1 Tierhaltung

Als Versuchsorganismus dienten sowohl für die Histologie, Immunhistochemie, Biomechanik als auch für die Atrophiestudie insgesamt 160 weibliche Sprague Dawley-Ratten mit einem Gewicht zwischen 180 g und 250 g (Fa. Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Haltung erfolgte im Tierstall des Walter-Brendel-Institut (Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl) des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern. Hier herrschen sowohl konstante Temperaturen von 21° C als auch ein zwölfstündiger, simulierter Tag-Nacht-Rhythmus durch Licht und Dunkelheit. Präoperativ und nach dem ersten operativen Eingriff (Injektion des Botulinumneurotoxin) erfolgte eine Gruppenhaltung in einem Käfig der Größe IV (gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde) mit maximal 4 Ratten pro Käfig. Auch nach dem zweiten operativen Eingriff (Sehennaht) wurden die Tiere, welche nicht mit einem Gips immobilisiert wurden, in Gruppen zu maximal 2 Ratten gehalten. Lediglich die Ratten mit immobilisierter oberer Extremität wurden für diesen Zeitraum (2 Tage) isoliert gehalten. Im Anschluss wurde eine erneute Gruppenhaltung angestrebt.

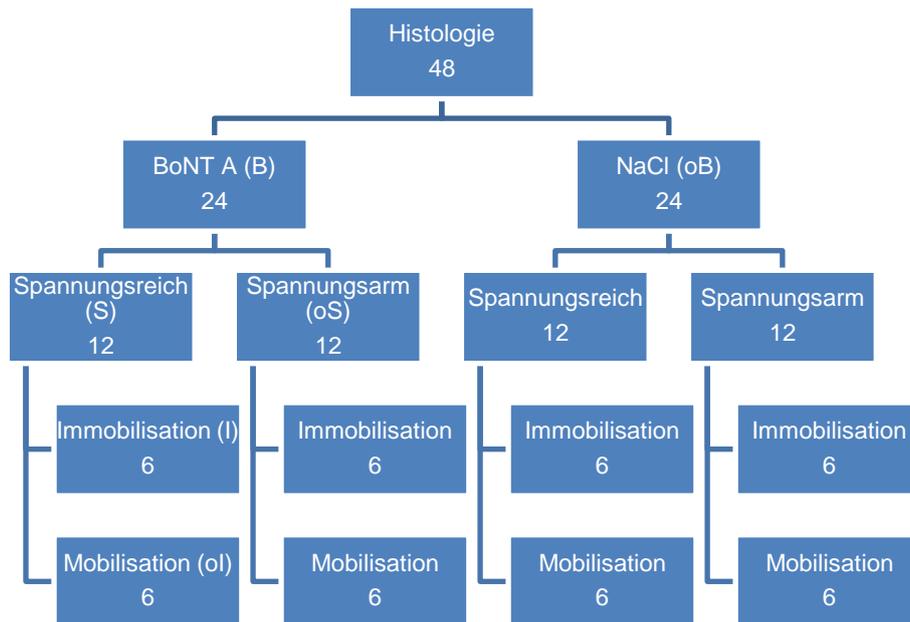
Während der Tierhaltungsphase wurde neben freier Beweglichkeit im Käfig auch ein ausreichender Zugang zu Futtermitteln (Trockenfutter, Alleinfuttermittel für Ratte und Maus der Fa. Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser (Stadtwerke München, München) gewährleistet. Das Hygienemanagement erfolgt nach den Kriterien der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) [129].

### **2.1.2 Gruppeneinteilung**

#### **2.1.2.1 Statistik Paralysegruppe**

144 Tiere wurden randomisiert in vier Gruppen zu je sechs (Histologie) bzw. zwölf (Biomechanik) Tieren verteilt. Dabei wurden vier Gruppen einer Scheinbehandlung mit NaCl und vier Gruppen der tatsächlichen Behandlung mit BoNT A zugeführt. Die hierfür notwendige Injektion von Botulinumneurotoxin A bzw. NaCl in den M. supraspinatus wurde 1 Woche vor OP durchgeführt. Weitere Variablen sind Spannungsreichtum der Naht sowie Immobilisation nach der Operation in einem zirkulären Oberkörpergips für 2 Tage post OP. Die hierzu notwendige Tierzahlberechnung wurde mittels Varianzanalyse nach Friedmann [130] bzw. Wilcoxon-Test [131] auf eine Mindestgruppengröße von 6 Versuchstieren gemäß statistischem Gutachten des Instituts für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Universität München [132] festgelegt.

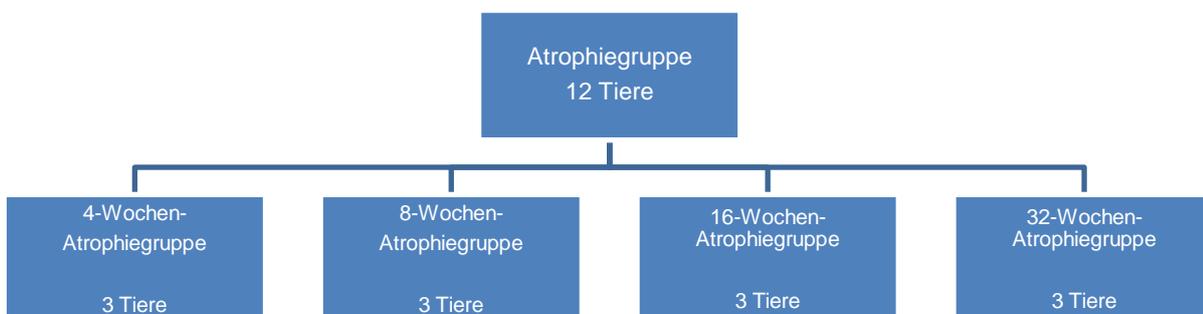
Die biomechanische Versuchsauswertung ist der Dissertation von Frau Tessa Hartl zu entnehmen.



**Abb. 7: Einteilung der Paralyzegruppe:** Einteilung in beide Versuchsschenkel unter Berücksichtigung von Immobilisation und Spannungsreichtum bei der Rekonstruktion der Rotatorenmanschettenruptur

### 2.1.2.2 Statistik Atrophiegruppe

Um die Auswirkungen von Botulinumneurotoxin A (BoNT A) im Muskelgewebe und die daraus resultierende Atrophie besser beurteilen zu können wurden 12 Tiere je Versuchsschenkel randomisiert vier Versuchsgruppen von je 3 Versuchstieren zugeordnet. Dabei erfolgte eine Injektion von Botulinumneurotoxin A/ NaCl (in den Kontrollgruppen) in die Musculi supraspinati. Im Abstand von 4, 8, 16 und 32 Wochen nach Injektionszeitpunkt erfolgte eine histologische und immunhistochemische Auswertung hinsichtlich der Reversibilität der durch das Botulinumneurotoxin A verursachten Atrophie des Muskels.



**Abb. 8: Einteilung der Atrophiegruppe:** Im Rahmen der Atrophiegruppe erfolgt die Nachbeobachtung hinsichtlich der Reversibilität der Atrophie zwischen 4 und 32 Wochen, Kontrollgruppe mit NaCl mit identischer Einteilung.

### 2.1.3 Anästhesie der Versuchstiere

Sowohl die Botulinumneurotoxin A /NaCl-Injektion 7 Tage vor der Operation als auch die Operation an der Rotatorenmanschette erfolgte unter suffizienter Anästhesie der Tiere. Die Narkoseeinleitung wurde durch Isofluran (Forene, Abott AG, Baar, Schweiz) vorgenommen. Anschließend erfolgte eine Kombinationsinjektion von Diazepam (Diazepam ratiopharm 10 Injektionslösung, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) von 2,5 mg/kg KGW i.p., Xylazin (Rompun 2 %, Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) von 9 mg/kg KGW i.p. und Ketaminhydrochlorid (Ketamin Inresa 10 ml/ 500 mg Injektionsflasche, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) von 60 mg/kg KGW i.m. Zusätzlich wurde Sauerstoff (Linde AG, Unterschleißheim, Deutschland) über eine Nasensonde appliziert. Um eine Aspiration von Speichel zu verhindern, wurde auf eine korrekte Lagerung mit erhöhtem Oberkörper geachtet sowie in regelmäßigen Abständen eine Absaugung des Speichels mit einem flexiblen Plastikkatheter durchgeführt.

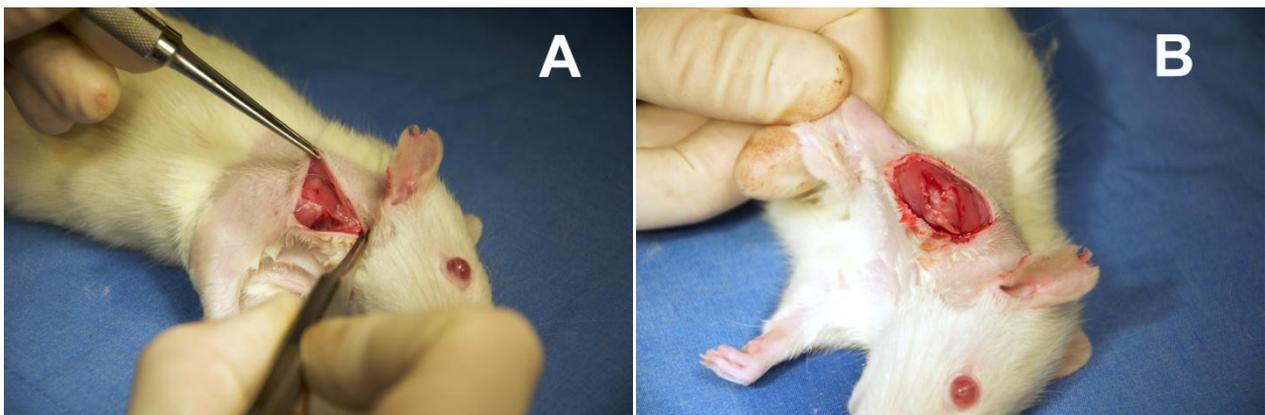
### 2.1.4 Infiltration von Botulinumneurotoxin A

Sieben Tage vor der eigentlichen Operation wurden die Tiere nach o.g. Schema anästhesiert. Die betroffene Extremität wurde rasiert (Schermaschine Favorita II, Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und der M. supraspinatus mit 6 U/kgKG (10 – 15 µl) Botulinumneurotoxin A (Botox 50 Allergan, Allergan Inc., Irvine, USA) in der Versuchsgruppe bzw. der gleichen Volumenmenge an NaCl (Natriumchlorid 0,9 %, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) in der Kontrollgruppe infiltriert. Eine Infiltration unter Sichtkontrolle konnte unterlassen werden, da in den Vorversuchen eine kontrollierte Infiltration gewährleistet werden konnte. In der Atrophiestudie erfolgte anstatt der Operation an der Rotatorenmanschette eine Nachbetrachtung von 4 - 32 Wochen post injektionem.

### 2.1.5. Operationsmethode Paralysegruppe

Sieben Tage nach erfolgter BoNT A- bzw. Natriumchloridinjektion erfolgte die eigentliche Operation an der Rotatorenmanschette, welche primär auf die unilaterale Freilegung des M. supraspinatus sowie der Supraspinatussehne [121] abzielt. Hier erfolgte eine Ablösung am Tuberculum majus. Als OP-Vorgehen wurde daher folgender Ablauf gewählt. Nach suffizienter Anästhesie (siehe 3.1.4) wurde die betroffene Extremität rasiert und desinfiziert (Kodan, Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland) und das OP-Feld abgedeckt

(Sengewald Klinikprodukte, Rohrdorf, Deutschland). Es erfolgte eine ca. 3 cm große Hautinzision über dem M. deltoideus (A). Der M. deltoideus wurde in Längsrichtung gesplittet und stumpf auseinander gedrängt (B). Anschließend wurde die Supraspinatussehne bis zum Tuberculum majus des Humerus dargestellt und dort scharf abgelöst. Für die später stattfindende transossäre Refixation wurde nicht resorbierbares Nahtmaterial vom Typ Prolene 6.0 (Ethicon Products, Norderstedt, Deutschland) am proximalen Ende der Supraspinatussehne durch eine Mason-Allen-Naht vorgelegt (C). Ab diesem Schritt erfolgte eine Variation zwischen der Gruppe der spannungsarmen Naht (= frische Rotatorenmanschettenläsion) und der Gruppe, welche eine degenerative, alte Läsion simulieren soll (Resektion eines 2 mm langen Sehnenstücks vor transossärer Refixation liefert eine spannungsreiche Naht) [133] (D). Im Anschluss daran wurden Bohrkanäle zur transossären Fixierung der Sehne des M. supraspinatus mit der Bohrmaschine (Proxxon Micromot 50, Föhren, Deutschland) durch das Tuberculum majus der Humerus gesetzt (E) und die Sehne mittels des vorgelegten nicht resorbierbaren Nahtmaterials am Tuberculum majus refixiert (F). Die darauf folgende Muskelnnaht des M. deltoideus wurde durch Einzelknopfnähte (G), die Hautnaht mittels einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial vom Typ Vicryl 6.0 (Ethicon Products, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt (H). Zusätzlich erfolgte ein Wundverschluss mittels Sprühverband (Opsite, Smith&Nephew GmbH, Schenefeld, Deutschland). Noch vor dem Aufwachen der Tiere wurden den Ratten der Untersuchungs- und Kontrollgruppe mit Immobilisierung zirkuläre Gipsverbände an der operierten Seite angelegt (I, J), diese werden für zwei Tage belassen (12,13). Postoperativ wurden die Tiere in einen sauberen Käfig unter eine Heizlampe, welche eine konstante Temperatur von 30° C gewährleistet, gelegt.



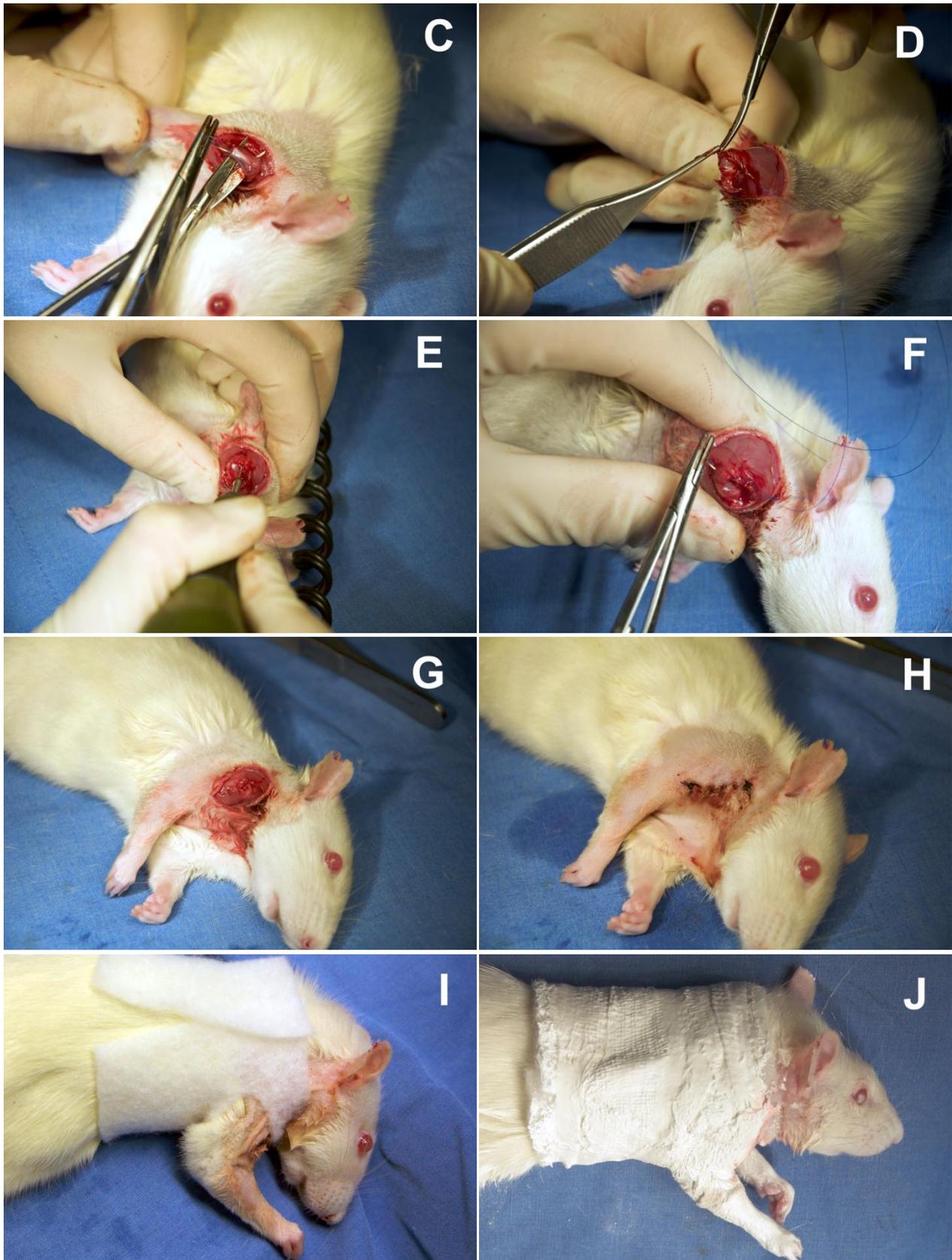


Abb. 9: Der Ablauf der simulierten Rotatorenmanschettenruptur und deren Rekonstruktion mit postoperativem Nachbehandlungsschema (Erläuterungen siehe Text, eigene Aufnahmen)

### 2.1.6 Postoperative Analgesie

Die Tiere erhielten direkt als auch 6 und 12 Std. postoperativ Buprenorphin (Buprenovet, Bayer Health Care; Leverkusen, Deutschland) 0,05 mg/kg KGW subkutan zur Schmerzstillung.

### 2.1.7 Euthanasie der Tiere

Die Nachbeobachtungszeit in der Paralysegruppe betrug 8 Wochen, in der Atrophiegruppe 4, 8, 16 bzw. 32 Wochen. Die Euthanasie der Tiere wurde mittels einer Isoflurannarkose begonnen. Diese war zum Zwecke der suffizienten i. p. Gabe der Pentobarbital-überdosierung (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos), die die eigentliche Tötung einleitet, notwendig.

### 2.1.8 Präparatgewinnung

Sämtliche Präparate wurden in dem unter 2.1.1 aufgeführten Tiermodell erzielt.

#### 2.1.8.1 Paralysegruppe

Nach Euthanasie der Tiere erfolgte die Rasur beider Schultern. Es erfolgte eine ca. 3 cm große Hautinzision über dem M. deltoideus. Der M. deltoideus wurde gesplittet und stumpf unterminiert. Anschließend wurde die Supraspinatussehne bis zum Tuberculum majus des Humerus dargestellt. Es erfolgte nach Eröffnung der Gelenkkapsel eine Exartikulation im Glenohumeralgelenk sowie im Articulatio cubiti. Sämtliche Muskeln mit Ausnahme des M. supraspinatus wurden scharf abgetrennt. Der M. supraspinatus wurde stumpf unterminiert und aus seinem Ursprung in der Fossa supraspinata scapulae gelöst.

#### 2.1.8.2 Atrophiegruppe

Die Entnahme der Muskel (M. supraspinatus und M. infraspinatus) erfolgte gemäß dem unter 2.1.8.1 dargestellten Verfahren, jedoch schloss sich nach dem Lösen des M. supraspinatus aus der Fossa supraspinata scapulae ein scharfes Abtrennen am Ansatz (Tuberculum majus) an. Analog erfolgte auch die Gewinnung der Präparate des M. infraspinatus, hier erfolgte eine Lösung aus dem dementsprechenden Ursprung in der Fossa infraspinata scapulae.

### **2.2 Histologie und Immunhistochemie der Paralysegruppe**

Sämtliche Präparate für die Histologie und Immunhistochemie wurden im Tiermodell gemäß 2.1 erzielt.

#### **2.2.1 Fixierung der Präparate**

Nach Entnahme erfolgte eine dreitägige Fixierung des Gewebes in Formaldehyd 4 % (Micros GmbH, Art.-Nr.; 29188; Garching, Deutschland) bei 4° C (Liebherr KTP 1750 Premium, Liebherr, Bulle, Schweiz). Als Fixierlösung wurde Formaldehyd 4 % gewählt, da niedriger dosierte Lösungen zu einer Autolyse des Gewebes führen. Die Ursachen der Autolyse liegen darin begründet, dass wegen des niedrigeren osmotischen Drucks der Lösung entgegen des Konzentrationsgefälles Wasser in die Zellen fließt. Dies führt zum Aufquellen der Zellen bzw. zur irreversiblen Zerstörung, was zu einer sehr schlechten morphologischen Qualität führt.

Höher konzentrierte Lösungen führen wegen des hohen osmotischen Drucks zu einer Entwässerung des Gewebes. Die Folge ist ein Schrumpfen der Zelle bzw. die Ausbildung einer Hydrathülle, was auf Grund des Manteleffektes eine Fixierung erschwert.

#### **2.2.2 Entkalkung der Präparate**

Um einerseits bessere Schnittbedingungen, insbesondere zur Darstellung des Knochen – Sehnen - Übergangs zu erzielen, andererseits Veränderungen in der Morphologie wie eine Maskierung zu vermeiden, war eine schonende Entkalkung der Präparate nach erfolgter Fixierung für drei Wochen mit EDTA-4Na 20 % Citronensäure, pH 7,1, 1L (EDTA-4Na 200g, Citronensäure-Monohydrat 37,19 g, Gereinigtes Wasser 1 L), Artikel-Nr: E0011, Apotheke Innenstadt, Universitätsklinikum München)) bei 4° C (Liebherr KTP 1750 Premium, Liebherr, Bulle, Schweiz) notwendig. Die hier vorgestellte Methode erwies sich in den Vorversuchen hinsichtlich Schnittqualität und Morphologie als Methode der Wahl [134].

#### **2.2.3 Entwässern und Einbetten der Präparate**

Die Entwässerung und Einbettung der Präparate erfolgte am Vollautomaten (Hypercenter XP, Shandon, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). Dazu wurden die Präparate in Biopsiekassetten (Rotilabo-Kassette für Biopsie, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) platziert, für 1 h mit Leitungswasser gewässert und gemäß programmierten

Einbettungsprotokoll (siehe Tab. 5) vollautomatisch in Paraffin eingebettet. Die Fertigung der zu schneidenden Blöcke erfolgte an der Paraffinausgießstation (Paraffinausgießstation Leica EG1160, Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland).

Medium	Temperatur	Vakuum	Immersion	Drain
Alkohol 70 %	20° C	J	02:00:00	01:00:00
Alkohol 70 %	20° C	J	01:00:00	01:00:00
Alkohol 96 %	20° C	J	01:00:00	01:00:00
Alkohol 96 %	20° C	J	01:00:00	01:00:00
Alkohol 96 %	20° C	J	01:00:00	01:00:00
Alkohol 100 %	20° C	J	01:00:00	01:00:00
Alkohol 100 %	20° C	J	01:00:00	01:00:00
Alkohol 100 %	20° C	J	01:00:00	01:20:00
Rotihistol	20° C	J	01:30:00	01:00:00
Rotihistol	20° C	J	01:30:00	01:20:00
Paraffin	60° C	J	01:30:00	01:20:00
Paraffin	60° C	J	01:30:00	01:20:00

**Tab. 5: Entwässerungs- und Einbettprotokoll der histologischen Schnitte:** Nach Entwässerung in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen erfolgt letztlich die Einbettung in Paraffin.

#### 2.2.4 Fertigung der Schnitte

Die histologischen Schnitte wurden an einem Schlittenmikrotom der Firma R. Jung AG (heute: Leica Microsystems AG), Nußloch bei Heidelberg, Deutschland durchgeführt. Zur Beurteilung morphologischer Details wurde eine Schnittdicke von 3 µm angestrebt [135]. Die Schnitte wurden mittels Seidenpapier in ein Wasserbad (GFL, Artikel-Nr. 1052, Burgwedel, Deutschland) übertragen und nach Aufziehen der Schnitte auf einem Objektträger (Objektträger Superfrost Plus, Thermo Scientific, Waltham, USA) zur besseren Fixierung auf eine Streckbank (Streckbank 13800, Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland) verbracht. Die endgültige Trocknung erfolgte im Brutschrank (Brutschrank Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 50° C.

### 2.2.5 Konventionelle Färbemethoden

Zur Durchführung konventioneller Färbungen erfolgte eine Entparafinierung der auf den Objektträger aufgezogenen Schnitte mittels eines zweimaligen fünfminütigem Bad in Rotihistol (Rotihistol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Die Überführung in die wässrige Phase wurde mittels einer Reihe von Alkoholverdünnungen in fortlaufend absteigender Konzentration (Isopropanol 100 % für 3 min, Isopropanol 100 % für 3 min, Isopropanol 96 % für 3 min, Isopropanol 70 % für 3 min, Aqua demin. für 3 min) durchgeführt. Es wurden Färbungen mit Hämatoxilin - Eosin (siehe 2.2.5.1) und Safranin O/ Fast Green (siehe 2.2.5.2) durchgeführt, welche nach dem Färbeverfahren einer Entwässerung (Isopropanol 70 % für 3 min, Isopropanol 96 % für 3 min, Isopropanol 100 % für 3 min, Rotihistol für 3 min, Rotihistol für 3 min) unterzogen wurden. Die entwässerten Schnitte wurden mittels Deckgläser (Deckgläser 24 x 50 mm, Menzel Gläser) mit Eukitt (Eukitt, O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) eingedeckt.

#### 2.2.5.1 Hämatoxilin - Eosin (H. E.)

Die Hämatoxilin - Eosin - Färbung setzt sich zusammen aus einer dreimaligen Kernfärbung in Hämalalaun Farblösung nach Mayer (Sigma, Steinheim, Deutschland) für jeweils 3 min, gefolgt von einer 10 - minütigem Bläuungsphase in fließendem Leitungswasser. Dem schloss sich eine 3 - minütige Färbephase mit Eosin 0,5 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) an. Die Präparate wurden für 3 min mit Aqua demin. gespült und dann mit dem unter 2.2.5 beschriebenen Entwässerungs- und Eindeckschema behandelt.

#### 2.2.5.2 Safranin O/ Fast Green-Färbung

Die nach dem in 2.2.5 dargestellten Procedere entparafinierten und in die wässrige Phase übergeführten Präparate wurden für 30 s in Safranin O 0,015 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gefärbt, anschließend jeweils in frischem Aqua demin. sechsmalig gedippt. Danach erfolgte ein 1- minütiges Bad in Fast Green 0,02 % (Sigma, Steinheim, Deutschland), gefolgt von 8- maligem Dippen in Eisessig 1 %. Das Färbeverfahren wurde mit sechsmaligem Dippen in Aqua demin. abgeschlossen. Die so gewonnenen Präparate wurden gemäß dem unter 2.2.5 aufgeführten Entwässerungs- und Eindeckschema für die mikroskopische Beurteilung aufbereitet.

### 2.2.6 Immunhistochemie

Zur weiteren Beurteilung, insbesondere für das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III als auch zur Differenzierung von Faserknorpel und hyalinem Knorpel ist die Anfertigung von immunhistochemischen Färbungen notwendig. In der zugrundeliegenden Arbeit wurde die indirekte Immunperoxidasetechnik (vgl. [136] ) verwendet. Die, wie unter 2.2.1 - 2.2.4 aufgeführt, erzielten Paraffinschnitte wurden immunhistochemischen Färbungen (2.2.6.2 - 2.2.6.5) unterzogen.

#### 2.2.6.1 Konzentration von Puffer, Reagenzien und Antikörper

Zur Durchführung von immunhistochemischen Färbungen ist die Anfertigung von Puffer- und Spüllösungen sowie die Dosierung der Antikörper von hoher Relevanz, welche im Nachfolgenden aufgeführt werden.

<u>PBS:</u>	1 L 10x PBS + 9 L Aqua dest.
<u>Waschpuffer:</u>	2 L 1x PBS + 2ml Brij (0,1%)
<u>3% BSA/PBS:</u>	300 mg BSA in 50ml Falcon abwiegen + 10 ml 1x PBS
<u>Proteinase XXIV:</u>	0,1 % in PBS
<u>Hyaluronidase:</u>	0,1 % in PBS
<u>Chondroitinase:</u>	2 U/ml Chondroitinase + 60,54 mg Tris-Puffer + 49,2 mg NaAcetat in 10 ml Aqua dest. pH 8, Gebrauchslösung 2 U/ml mit 0,1 M Tris 1:8
<u>Tris-Puffer:</u>	605,7 mg Tris (121,14 g/Mol) + 50ml Aqua dest. pH7
<u>Ziegen Serum:</u>	1:20 mit 3 % BSA/PBS, z. B. 50 µl Serum mit 950 µl 3 % BSA/PBS
<u>AK Kollagen I:</u>	Kollagen I 1:400 mit 3 % BSA/PBS, z. B. 1 ml: 2,49 µl AK + 997,51 µl BSA/PBS
<u>AK Kollagen II:</u>	Kollagen II 1:6 mit 3 % BSA/PBS, z. B. 1 ml: 166,7 µl AK + 833,3 µl BSA/PBS
<u>AK Kollagen III:</u>	Kollagen III 1:400 mit 3 % BSA/PBS, z. B. 1 ml: 2,49 µl AK + 997,51 µl BSA/PBS
<u>AK Aggrecan:</u>	Aggrecan 1:400 mit 1:400 mit 3 % BSA/PBS, z. B. 1ml: 2,49 µl AK + 997,51 µl BSA/PBS
<u>Sekundärantikörper:</u>	horse anti mouse 1:200 mit PBS, z. B. 5 µl AK + 995 µl PBS

ABC-Komplex: 1ml PBS + 1 Tropfen Substanz A + 1 Tropfen Substanz B (aus staining kit), 20 min vor Gebrauch ansetzen

DAB: 5 ml Aqua dest. + 2 Tropfen Puffer + 4 Tropfen DAB + 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 Tropfen Nickel Solution

### 2.2.6.2 Kollagen I

Die Färbung wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen gemäß dem im folgenden aufgeführten Färbeprotokoll durchgeführt.

#### 1. Tag

Nach erfolgter Entparafinierung erfolgt ein Hitzeverdau mittels Retrievalpuffer in EDTA-Puffer pH 9. Dabei werden die Schnitte mittels Dampfgerar nach 5 min Aufwärmphase bei 91 - 94° C gekocht und danach für 20 min im heißen Puffer zur Erkaltung belassen. Bei sich in den Vorversuchen zeigender Demaskierung der Kollagenfasern wird die Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) -Methode mit der Protein Induced Epitope Retrieval (PIER) - Methode kombiniert. Folglich schließt sich der HIER-Methode ein enzymatischer Verdau mittels Proteinase XXIV 0,1 % in PBS für 10 min bei Raumtemperatur (20° C) an, gefolgt von einer 30 min Inkubation in Hyaluronidase 0,1 % bei 37° C im Trockenschrank. , Nach der Durchführung der PIER-Methode erfolgt ein Waschen in PBS sowie die Rehydratation in PBS für 10 min. Folgend auf die Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur in 200 ml PBS mit 200 µl Wasserstoffperoxid, erfolgt abermals ein dreimaliges Spülen in Waschpuffer für jeweils 5 min. Diesem schließt sich ein 15 min Enzymverdau mit Chondroitinase bei 37° C im Wärmeschrank an. Nach Abklopfen der Chondroitinase wird nach Definierung des Schnitts 150 µl Goatserum aufgebracht, welches nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur ebenfalls vom Objektträger abgeklopft wird. Es folgt danach das Aufbringen des Primärantikörpers (Kollagen I, NB600-450, Novus Biologicals, Littleton, USA) und Inkubation bei 4° C im Kühlschrank über Nacht.

#### 2. Tag:

Nach Entnahme der Schnitte aus dem Kühlschrank erfolgt dreimalig ein 5 min Spülen der Schnitte in Waschpuffer, gefolgt vom Aufbringen des Sekundärantikörpers (horse anti mouse, Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA) mit nachfolgender Inkubation bei

Raumtemperatur von 30 min. Die immunhistochemische Färbung wird fortgesetzt mit einem dreimaligem Waschvorgang für jeweils 5 min. Durch das Aufbringen des ABC-Komplexes für 30 min wird durch die Biotinilierung und der Bindungsfähigkeit für Avidin eine Verstärkung der Färbewirkung erzielt. Nach abermaligem Waschvorgang erfolgt die Färbung mittels DAB für 6 - 8 min unter mikroskopischer Kontrolle der Färbewirkung. Die Färbung wird mittels Dippen im Aqua dest. und 1 min Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer nach 5 min Bläuungsvorgang unter fließendem Leitungswasser abgeschlossen. Es erfolgt das Eindecken der Schnitte mittels Abdeckgläser.

### **2.2.6.3 Kollagen II**

Die immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Kollagen II erfolgt nach dem unter 2.2.6.1 genannten Schema. Eine Ausnahme stellt den Verzicht auf die Heat Induced Epitope Retrieval (HIER)- Methode und die alleinige Verwendung der Protein Induced Epitope Retrieval (PIER)- Methode dar, weiterhin erfolgt der Austausch des Primärantikörpers gegen einen Kollagen II- Antikörper (CHC1, University of Iowa, USA).

### **2.2.6.4 Kollagen III und Aggrecan**

Die Färbungen für Kollagen III und Aggrecan erfolgen nach dem unter 2.2.6.1 genannten Färbeschema, abgesehen von der Verwendung von spezifischen Primärantikörper (Kollagen III, NBP1-41324, Novus Biologicals, Littleton, USA, bzw. Aggrecan ABIN259055, antibodies online, Atlanta, USA).

### **2.2.7 Polarisationsmikroskopie mittels Picrosirius Red**

Zur Beurteilung von Faserverlauf und Insertionswinkel der Kollagenfasern an der Enthesis erfolgte eine Färbung mit Picrosirius Red, dabei wird eine Modifikation des Färbeprotokolls in Anlehnung an Puchtler et al. [137] und Junqueira et al. [138] durchgeführt. Nach Entparafinierung und Rehydrierung der Schnitte (siehe 2.2.5) erfolgt initial die Kernfärbung mit Weigert's Hämalaun für 8 min, gefolgt von einer 5 min Bläuungsphase unter laufendem Leitungswasser. Nach dreimaliger Inkubation der Schnitte in Waschpuffer erfolgt die einstündige Färbung mit Picrosirius Red (Direct Red 80, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Nach dem Färbvorgang erfolgt abermals ein dreimaliger 5 min Waschvorgang in

Pufferlösung. Fortgeführt wird die Färbung mit dem wie unter 2.2.5 beschriebenen Dehydrationsvorgang und dem Eindecken der Schnitte.

### **2.2.8 Auswertemethoden und -verfahren der Paralysegruppe**

Sämtliche hier aufgeführten Ergebnisse wurden gemäß den oben aufgelisteten Methoden und Verfahren erzielt.

Die zu Auswertungszwecken notwendigen statistischen Verfahren für den Bereich der Paralysegruppe und bildmorphologischen Untersuchungen wurden mittels Graph Pad Prism (Graph-Pad Prism Version 5.02 für Windows, San Diego, Kalifornien), Image J (Flächen- und Winkelmessungen) sowie die primären Aufnahmen mittels Zeiss Axio Vision (Aufnahmesoftware, Zeiss, Jena, Deutschland) mit Zeiss Axio Cam (Zeiss, Jena, Deutschland) für den Part der konventionellen und immunhistochemischen Färbemethoden durchgeführt. Die Confocal Mikroskopie sowie deren Auswertung erfolgten an einem Confocal Mikroskop der Firma Zeiss (Zeiss, Jena, Deutschland). Zur Größenoptimierung der Bilder erfolgte eine Bearbeitung der Schnitte mittels Gimp 2 (GNU Image Manipulation Program, Freeware) und Paint (Paint, Microsoft, Redmond, USA)

Bezugnehmend auf andere Veröffentlichungen sowie auf Grundlage eines statistischen Gutachtens [132] wurde eine Gruppengröße von 6 Tieren pro Untersuchungsparameter gewählt [47, 72, 139]. Die Auswertung der Querschnittsflächen erfolgte mit dem nicht parameterfreien Mann-Whitney U-Test. Es wurde ein Signifikanzniveau mit  $p < 0,05$  gewählt. Die Kollagenflächenmessungen sowie die Insertionswinkelmessung erfolgten einer statistischen Auswertung mittels des t-Tests. Die Untersuchungsparameter wie Entzündungsreaktion, Vaskularisierungsgrad, Durchgängigkeit der Kollagenfasern usw. wurden keiner statistischen Analyse unterzogen.

### **2.3. Atrophiegruppe**

Zur Detektion struktureller Veränderungen des Muskels wurde eine Langzeitstudie durchgeführt, welche nach den Zeiträumen 4, 8, 16 und 32 Wochen (siehe 2.1.2.2 und 2.1.8.2) eine Nachbeobachtung hinsichtlich Gewicht und Volumen des Muskels sowie eine histologische Aufarbeitung der Präparate mit besonderem Focus auf Verfettungsgrad und Kernmorphologie der Myozyten zum Ziel hatte.

### **2.3.1 Volumen- und Gewichtsmessung**

Angelehnt an die Veröffentlichung von Hettrich et al. [72] führten wir ebenfalls Messungen sowohl des Volumens als auch des Muskelgewichts durch, um im Zeitfenster von 32 Wochen eine Reversibilität der Atrophie und der damit verbundenen Veränderungen detektieren zu können.

#### **2.3.1.1 Gewichtsmessung**

Die wie unter 2.1.8.2 aufgeführt, gewonnenen Präparate wurden unverzüglich nach Entnahme einer Gewichtsmessung zugeführt, diese erfolgte an einer Satorius Histolabor Präzisionswaage unter konstantem Luftdruck (1023hPa) und konstanter Temperatur (hier: 21,7° C).

#### **2.3.1.2 Volumenmessung**

Nach durchgeführter Gewichtsmessung erfolgte die Hydratation des Muskels in isotoner Kochsalzlösung. Da in Anbetracht des geringen Muskelgewichts nur sehr kleine Volumenänderungen zu erwarten waren, wurden sämtliche Messungen in einer Insulinspritze (Insulinspritze Omnifix F, Braun, Melsungen, Deutschland) , welche hierzu mit einem konstanten Flüssigkeitsspiegel von 0,3 ml befüllt wurde, durchgeführt. Das Volumen des Muskels ergibt sich aus der Differenz des verdrängten Volumens.

#### **2.3.1.3 Dichteberechnung**

Zur Objektivierung der Gewichts- und Volumenmessung erfolgte aus den ermittelten Daten die Dichteberechnung. Diese sollte in Zusammenschau mit der nachfolgenden histologischen Aufarbeitung (siehe 2.3.2) die These einer vermehrten Verfettung des Muskels unter Botulinumneurotoxin A und den daraus sich ergebenden Dichteunterschieden herausstellen.

### **2.3.2 Histologie**

Zur weiteren Unterstützung der These, dass Injektionen mittels Botulinumneurotoxin A zu einer reversiblen Atrophie und Verfettung des Muskels führen sowie als Grundlage für die Confocal Mikroskopie wurden sowohl konventionelle Übersichtsfärbungen als auch Spezialfärbungen zur Detektion von Fettgewebe und Kernmorphologie der Myozyten

durchgeführt. Sämtliche Untersuchungen wurden an kryofixierten Schnitten (siehe 2.3.2.1) durchgeführt.

### **2.3.2.1 Fixierung der Präparate**

Nach Entnahme der Muskeln (siehe 2.1.8.2) erfolgte die Fixierung der Präparate, zu dem die Muskeln in Einbettchälchen (Tissue Tek Cryomold Standard, 25x20x5 mm, Sakura Finetek GmbH, Heppenheim, Deutschland) verbracht werden, gefolgt von einer Überschichtung mit einem wasserlöslichem Kryoeinbettmedium (Tissue Tek Compound Einbettmedium, Sakura Finetek GmbH, Heppenheim, Deutschland). Die so gewonnenen Präparate wurden zur Fixierung in flüssigen Stickstoff verbracht, um dort auszuhärten. Bis zur Fertigung von Gefrierschnitten erfolgte eine Asservierung der Blöcke im Gefrierschrank bei -20° C.

### **2.3.2.2 Fertigung der Schnitte**

Sämtliche Gefrierschnitte wurden am Gefriermikrotom (Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland) unter konstanten Temperaturbedingungen von -17° C durchgeführt, dabei wurde ebenfalls eine Schnittdicke von 3 µm angestrebt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Objektträger Superfrost, Thermo Scientific, Waltham, USA) aufgezogen und bis zur endgültigen Verwendung im Gefrierschrank bei -20° C asserviert.

### **2.3.2.3 Färbemethoden**

Die im Rahmen der Atrophiegruppe gewonnenen und initial einer Volumen- und Gewichtsmessung zugeführten Präparate (vgl. 2.3.1) wurden nach Kryofixierung (2.3.2.1) und Fertigung von Gefrierschnitten (2.3.2.2) sowohl konventionellen als auch immunfluoreszierenden Färbemethoden zugeführt.

#### **2.3.2.3.1 Übersichtsfärbung mit Hämatoxin – Eosin**

Die Übersichtsfärbung mit Hämatoxin- Eosin (H.E.) erfolgte analog dem unter 2.2.5.1 aufgezeigten Färbeschema, abgesehen davon, dass eine Verwendung von Gefrierschnitten erfolgt, welche gemäß 2.3.2.2 erzielt wurden.

### 2.3.2.3.2 Fettfärbung

Zur Darstellung des möglichen Verfettungsgrades wurde eine Färbung mit Nilrot durchgeführt. Bei Nilrot, oder ebenfalls als Nilblau-Oxazon bezeichnet [140], handelt es sich um einen fluoreszierenden Phenoxacinfarbstoff, welcher basierend auf der Hydrophobie der Lipide ein Fluoreszenzverhalten im rot-gelblichen Bereich zeigt.

Die Färbung wurde an Kryoschnitten nach dem unten aufgeführten Schema durchgeführt. Initial setzt sich die Färbung aus den Komponenten Nilrot und Hoechst 33342 zusammen, welche vor Färbebeginn von der Stocklösung in eine Arbeitslösung überführt werden müssen.

#### Nilrot (Invitrogen N1142, Palsley, UK, 25 mg, MG 318,37)

Stocklösung: 1 mg/ml, d. h. 25 mg Nilrot in 12,5 ml DMSO auflösen, in 1 ml Aliquots positionieren, mit Alufolie umwickelt im Kühlschrank lagern

Arbeitslösung: 100 ml PBS + 100 µl Nilrot (0,5 mg/ml)

#### Hoechst 33342 (Invitrogen H-1399, Palsley, UK)

Stocklösung: 1 mg/ml

Arbeitslösung: 10 µl + 70 µl PBS, mit Alufolie umwickelt im Kühlschrank lagern

Die eigentliche Färbung findet nach Auftauen der Kryoschnitte statt. Zur Färbung werden die Schnitte mit 100 ml PBS, 100 µl Nilrot (0,5 mg/ml) und 50 µl Hoechst 33342 (1 mg/ml) in eine Färbegondel für 15 min verbracht und dunkel inkubiert. Der Färbung schließt sich eine zweimal fünfminütige Spülung in PBS an. Nach diesem Procedere werden die Schnitte einer Kernfärbung mit Sytox Green (siehe 2.3.2.3.3) zugeführt.

### 2.3.2.3.3 Kernfärbung

Zur Erzielung einer Kernfärbung erfolgt die Färbung mit Sytox Green (Invitrogen, Palsley, UK) in der Konzentration 1:20000 verdünnt mit PBS und eine Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min. Nach dieser Färbung werden die Schnitte abermals für jeweils 5 min zweimalig in PBS verbracht.

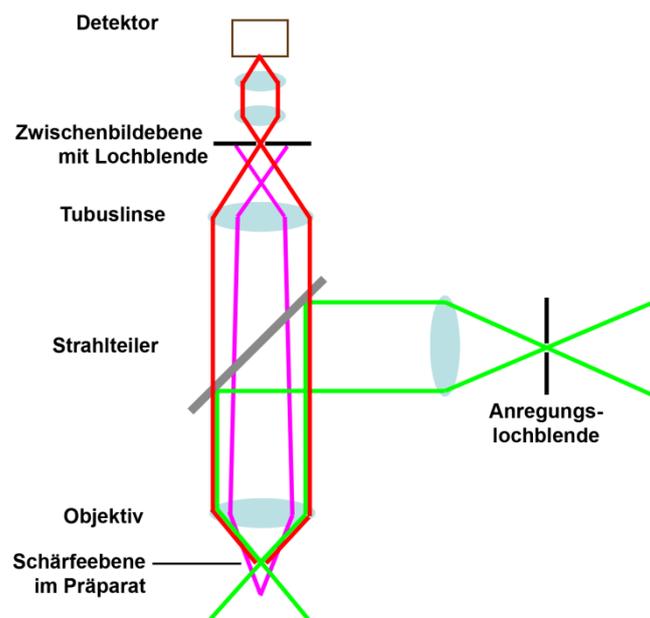
Zur Erzielung einer besseren Qualität der Fotos wird auf eine sofortige Eindeckung verzichtet und erst nach Anfertigung der Fotos mittels Deckgläser (Deckgläser 24 x 50 mm,

Menzel Gläser) und DAPI Mountain Medium eine langfristige Archivierung möglich gemacht.

### 2.3.2.4 Confocal Mikroskopie

#### 2.3.2.4.1 Prinzip der Confocal Mikroskopie

Der größte Unterschied im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie besteht darin, dass es bei der Confocal Mikroskopie nicht zu einer kompletten Abbildung des Präparats kommt, sondern sich das Gesamtbild aus dem mittels Laser abgerasterten Bildpunkten durch eine Lochblende zusammensetzt. Dadurch können selektiv nur Informationen aus der abgebildeten Ebene zum Detektor vordringen. Über eine Fluoreszenzmessung mit nachfolgender Rekonstruktion der Einzelbilder zum Gesamtbild ergibt sich auf Grund der Schnittfolge im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie die Möglichkeit einer dreidimensionalen Darstellung des Untersuchungsobjekts [141, 142]. Nach Sheppard et al. [143] besteht weiterhin bedingt durch die Lochblende ein schärferes Auflösungsvermögen, was die Punktschärfe erhöht. Nachfolgende Grafik zeigt den Aufbau und die Funktionsweise eines Confocal Mikroskop.



**Abb. 10: Aufbau eines Confocal Mikroskop, Abb. aus [144]:** Bei der Confocalmikroskopie wird mittels einer punktförmigen Lichtquelle, meist mittels Laser das Präparat rasterförmig abgetastet. Die jeweilige beleuchtete Stelle wird durch das Objektiv auf die Lochblende fokussiert und schließlich vom Detektor aufgenommen. Da Beleuchtungspunkt und der Punkt in der Mitte der Lochblende gleichzeitig im Focus stehen, wird dies als confocal bezeichnet.

### **2.3.2.4.2 Versuchsaufbau**

Zur Darstellung von Verfettungsgrad und Morphologie der Myozyten wurde aus den wie unter 2.3.2.3.2 und 2.3.2.3.3 dargestellten Färbungen eine Confocal Mikroskopie nach dem unter 2.3.2.4.1 aufgeführten Schema durchgeführt. Sämtliche Aufnahmen wurden an einem confocalen Laserscanningmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) unter Zuhilfenahme eines Photoelektronenvervielfachers (PMT, engl. für photomultiplier tube) bei 412 V durchgeführt. Dabei wurden Stacks (Fusionsbild ("Merging") aus 20 einzelnen Aufnahmen, welche mittels Bildbearbeitungssoftware auf der Grundlage von identischen Bildanteilen gleich ausgerichtet wurden) erstellt, die nachfolgend die Grundlage für die mittels Computeranalyse erstellten Grafiken darstellen.

### **2.3.2.5 Messung der Fibrillendurchmesser und Beurteilung Morphologie der Myozyten**

Auf der Basis der H.E.- Schnitte erfolgte eine Messung der Fibrillendurchmesser an drei zufällig gewählten Stellen mit Bildung des Mittelwerts mittels ImageJ, weiterhin wird bildmorphologisch das Aussehen der Myozyten beurteilt.

### 3 Ergebnisse

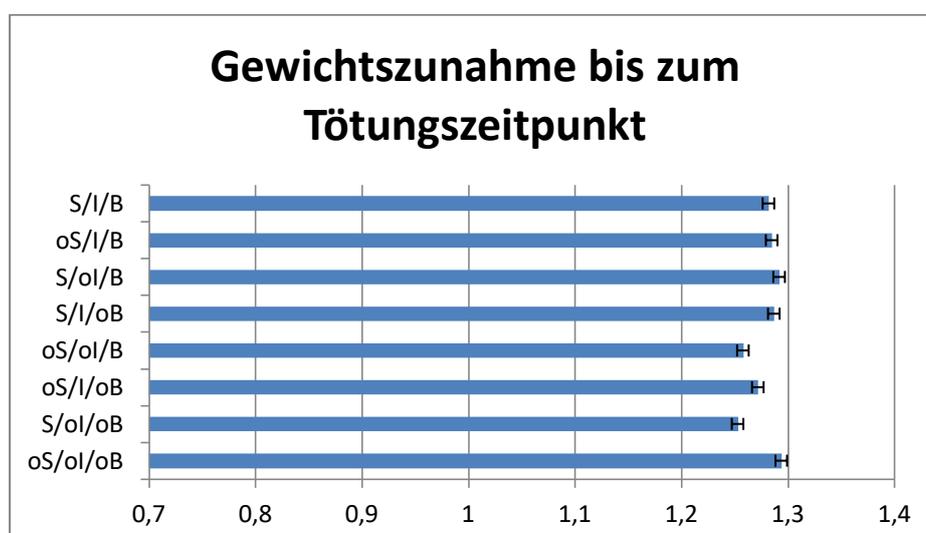
Sämtliche hier aufgeführten Ergebnisse wurden gemäß den unter 2. aufgelisteten Methoden und Verfahren erzielt.

Zusammenfassend verstarben zwei Tiere postoperativ durch anästhesiologische Probleme. Es zeigten sich weiter keine anderen peri- oder postoperativen Probleme, insbesondere zeigten sich keine Veränderungen bei der Nahrungsaufnahme (z.B. schmerzbedingt oder auf Grund der Immobilisation). Die Versuchstiere, die zum Zwecke der Immobilisation mit einem zirkulären Gips für 2 Tage versorgt wurden und für diesen Zeitraum isoliert gehalten wurden, kehrten schnell nach Entfernung des Gipses zu einer normalen Funktion des Vorderlaufs zurück. Weiterhin konnten keine Veränderungen im Sozialverhalten, wie Zeichen einer Aggression oder Eigengefährdung festgestellt werden.

#### 3.1 Paralysegruppe

##### 3.1.1 Gewichtszunahme bis zum Tötungszeitpunkt

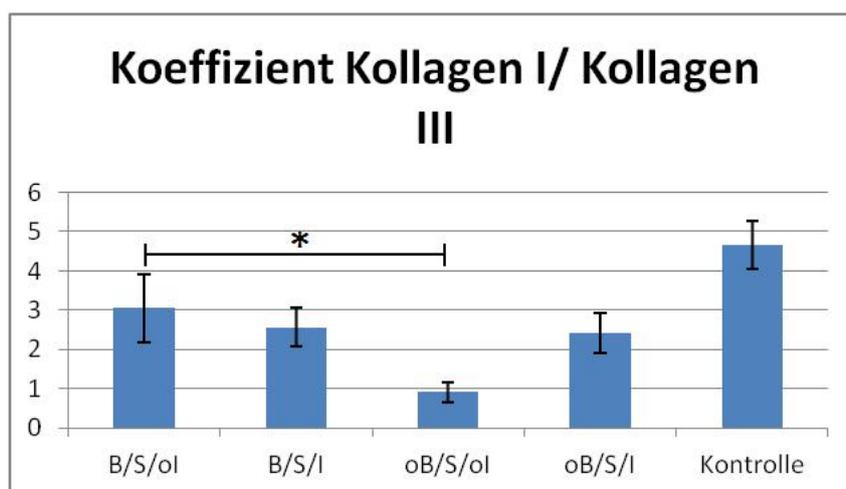
Hinsichtlich des Körpergewichts konnten wir keine signifikanten Veränderungen ( $p > 0,05$ ) innerhalb der Gruppen zwischen Injektions- und Euthanasiezeitpunkt feststellen, dabei war es unerheblich, ob eine Immobilisation oder Infiltration von Botulinumneurotoxin A oder deren Kombination erfolgte.



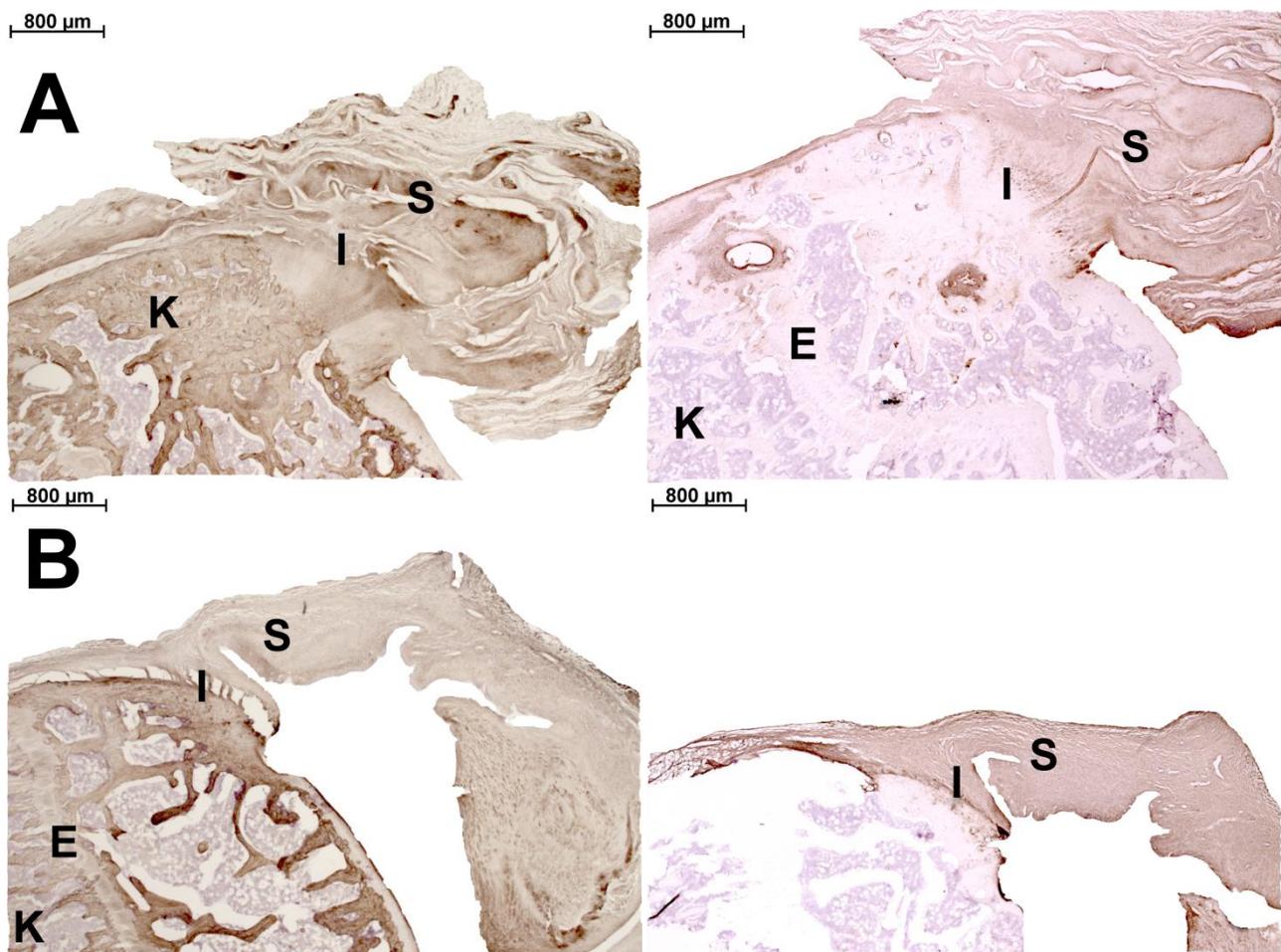
**Abb. 11: Gewichtszunahme bis zum Tötungszeitpunkt:** Unabhängig von der Versorgungsmethode konnten keine signifikanten Veränderungen des Körpergewichts innerhalb der Versuchsgruppen nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass Immobilisation oder selektive Paralyse keinen Einfluss auf Nahrungsaufnahme und das Gruppenverhalten zeigt. Abkürzungen gemäß Abb. 7 : Botox (B), NaCl (oB), spannungsreiche Naht (S), spannungsarme Naht (oS), Immobilisation mittels Gips (I) und freie Mobilisation (ol)

### 3.1.2 Koeffizient von Kollagen I zu Kollagen III als Zeichen einer fortgeschrittenen Sehnenheilung

Basierend auf den Flächenmessungen der immunhistochemischen Färbungen und beziehend auf den Ablauf der Sehnenheilung (vgl. 1.3.2) erfolgte die Berechnung des Kollagen I/ Kollagen III-Koeffizienten. Dabei zeigte sich unter besonderem Focus auf die vorhandene bzw. nicht vorhandene Paralyse, dass sich bei simulierten alten degenerativen Rotatorenmanschettendefekten unter Verzicht auf eine Immobilisation ein signifikantes Benefit ( $p= 0,0051$ ) bei Verwendung von Botulinumneurotoxin A ergibt. In der Kombination von Immobilisation und Paralyse konnte ebenfalls in der BoNT A-Gruppe ein höherer, wengleich auch nicht signifikanter ( $p=0,251$ ) Koeffizient erzielt werden.

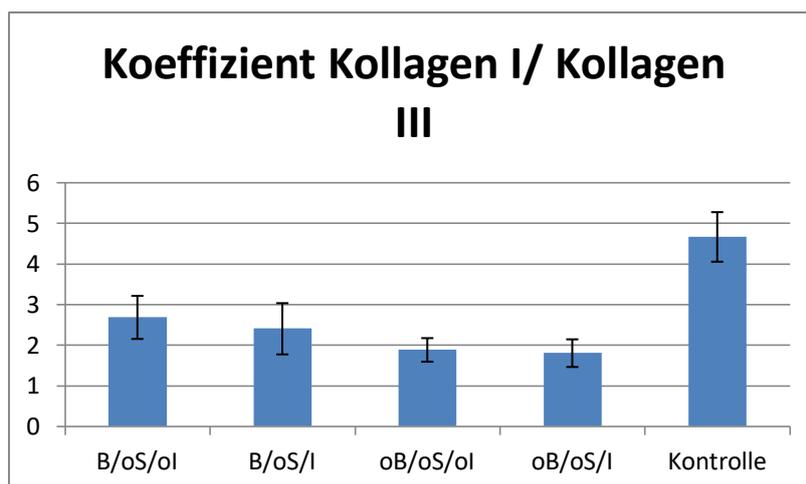


**Abb. 12: Der Kollagen I/ Kollagen III-Koeffizient als Zeichen einer fortgeschrittenen Sehnenheilung:** Wie aus der Grafik ersichtlich, zeigt sich insbesondere bei spannungsreicher Rotatorenmanschettennaht unter Verzicht auf Immobilisation durch die Verwendung der selektiven Paralyse (B/S/ol) im Vergleich zur Kontrollgruppe (oB/S/ol) ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0051$ )\*. Die Kombination aus beiden Immobilisationsverfahren liefert tendenziell ebenfalls einen höheren Koeffizienten, wengleich sich hier keine signifikanten Werte erzielen lassen.



**Abb. 13: Vergleich der Untersuchungsparameter spannungsreiche Naht ohne Immobilisation unter dem Einfluss des Parameters der vorhandenen (A) und nicht vorhandenen Paralyse (B):** Es zeigt sich unter dem Einfluss der präoperativen selektiven Paralyse ein signifikant höherer Kollagen I/ Kollagen III-Koeffizient, (vgl. Abb. 12), K: Knochen, S: Sehne, I: Interface, E: Epiphysenfuge; eigene Aufnahme: links Färbung Antikörper gegen Kollagen I, rechts Färbung Antikörper gegen Kollagen III

Unter Simulation einer frischen Rotatorenmanschettenruptur konnte innerhalb der Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden, wenngleich die Verwendung von Botulinumneurotoxin A als präoperatives Adjuvans höhere Koeffizienten erzielen ließ.



**Abb. 14: Der Kollagen I/ Kollagen III-Koeffizient bei spannungsarmer Naht:** Im Gegensatz zur spannungsreichen Naht lassen sich keine signifikanten Werte erzielen, wenngleich unter Verwendung einer selektiven Paralyse sich sowohl isoliert als auch in Kombination mit einer Immobilisation höhere Koeffizienten erzielen lassen.

Untersuchungsparameter	p-Value
B/S/ol vs. oB/S/ol	0,00051*
B/S/I vs. oB/S/I	0,251
B/oS/ol vs. oB/oS/ol	0,143
B/oS/I vs. oB/oS/I	0,241

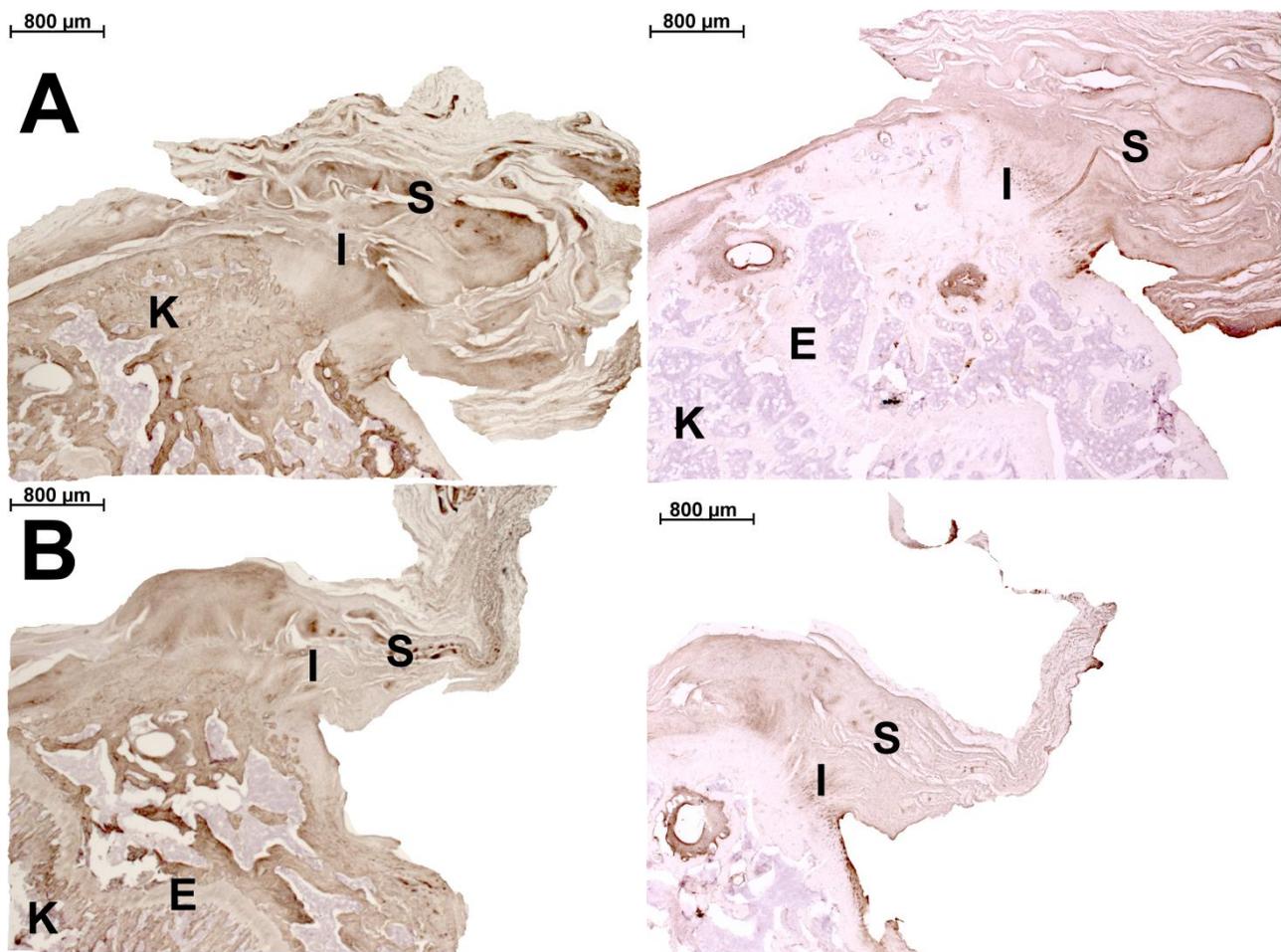
**Tab. 6: Statistische Auswertung unter besonderem Focus auf die Verwendung der selektiven Paralyse:** Wie den oben aufgeführten Grafiken zu entnehmen ist, zeigt sich unter selektiver Paralyse insbesondere bei spannungsreicher Naht ohne zusätzliche Immobilisation (B/S/ol) ein signifikantes Benefit (\*).

Bei besonderem Fokus auf das Spannungsreichtum der Naht zeigte sich, dass sich insbesondere bei spannungsreicher Naht durch die präoperative Paralyse im Bezug zur korrespondierenden Vergleichsgruppe positive Aspekte hinsichtlich des Kollagen I/ Kollagen III- Koeffizienten ergeben (siehe oben). In der Kombination spannungsreiche Naht mit selektiver Paralyse ließen sich die negativen Auswirkungen der erhöhten Vorlast abmildern und vergleichbare, teils erhöhte Parameter im Vergleich zur individuellen Kontrollgruppe erzielen. Maximale Abweichungen zeigten sich insbesondere, wenn das Spannungsreichtum der Naht mit dem Wegfall von selektiver Paralyse oder Immobilisation kombiniert wurde (vgl. B/S/ol vs. oB/S/ol, siehe Tab. 8).

Untersuchungsparameter	Koeffizient
Kontrolle	4,67 ± 0,61
B/S/ol	3,05 ± 0,87
B/oS/ol	2,69 ± 0,53
B/S/I	2,57 ± 0,48
B/oS/I	2,41 ± 0,63
oB/S/I	2,41 ± 0,51
oB/oS/ol	1,89 ± 0,21
oB/oS/I	1,81 ± 0,34
oB/S/ol	0,92 ± 0,25

**Tab. 7: Der Kollagen I/ Kollagen III - Koeffizient im Vergleich der Untersuchungsparameter:** In der Kontrollgruppe zeigt sich ein dem Literaturwert entsprechendes Verhältnis von Kollagen I und Kollagen III. Tendenziell ist durch selektive Paralyse ein höherer Koeffizient erzielbar, ohne die Parameter Spannungsreichtum und Immobilisation in Rechnung zu stellen. Die größten positiven Auswirkungen zeigen sich bei spannungsreicher Naht unter Verzicht auf eine Immobilisationsbehandlung (vgl. B/S/ol vs. oB/S/ol)

Unter besonderer Berücksichtigung des Parameters Immobilisation lässt sich sagen, dass die Kombination aus Immobilisation und selektiver Paralyse niedrigere Verhältnisse erzielen lässt als die alleinige Verwendung der selektiven Paralyse (vgl. B/S/ol vs. B/S/I). Weiterhin erscheint auch die selektive Paralyse einer Gipsbehandlung bis zum 2. postoperativen Tag zum Zwecke der Immobilisation überlegen.

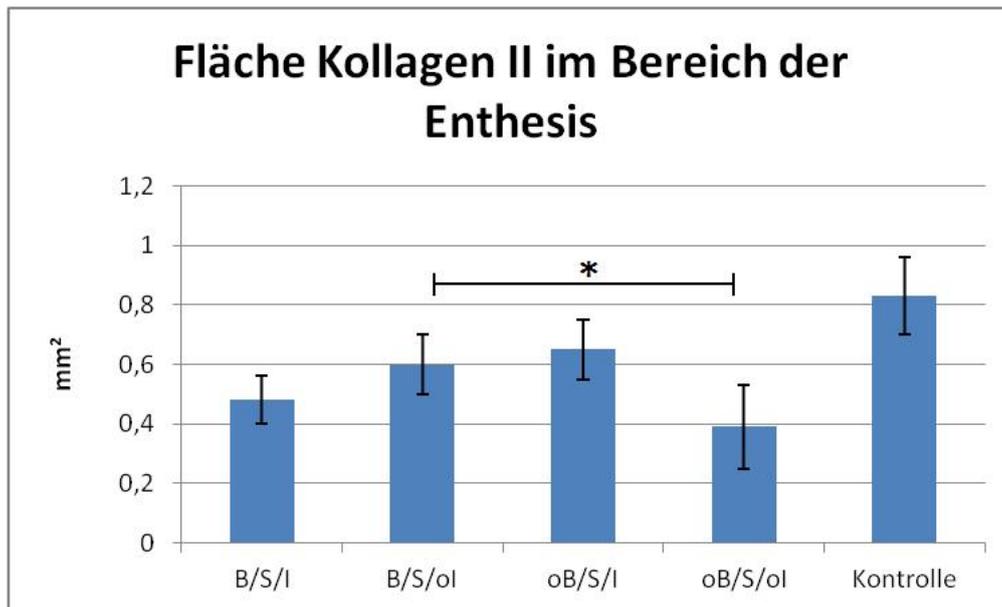


**Abb. 15: Die Auswirkungen der Immobilisation bei zeitgleicher selektiver Paralyse:** Unter Kombination der Immobilisation mit selektiver Paralyse (B) lassen sich geringere Werte wie unter alleiniger Paralysebehandlung (A) erzielen (exemplarische Darstellung an A (B/S/ol) vs. B (B/S/I), K: Knochen, S: Sehne, I: Interface, E: Epiphysenfuge); eigene Aufnahme: links Färbung Antikörper gegen Kollagen I, rechts Färbung Antikörper gegen Kollagen III

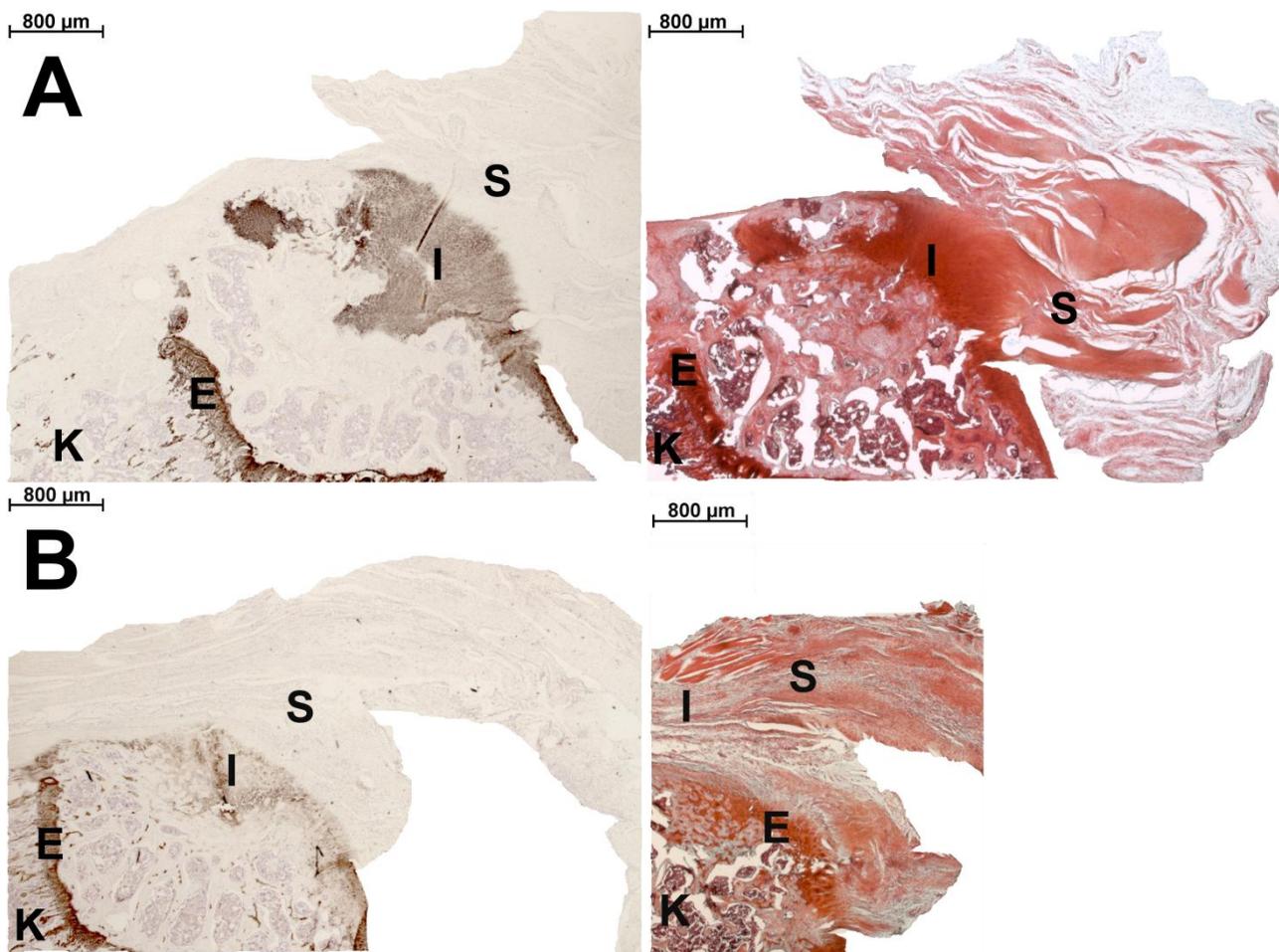
### 3.1.3 Knorpelbildung am Knochen-Sehnen-Interface

Die Präparate von Tieren, welche präoperativ einer selektiven Paralyse sowie postoperativ einer Immobilisation mittels eines zirkulären Gipses für 2 Tage unterzogen wurden, zeigten im Vergleich zu nicht eingegipsten Tieren bzw. zu mit Natriumchlorid behandelten Tieren eine wesentlich geringere Kollagen II-Fläche am Knochen-Sehnen-Interface. Die Kollagen II-Flächen waren in den Gruppen mit simulierter degenerativer Rotatorenmanschettenruptur ohne zusätzliche Immobilisation unter präoperativer Botulinumneurotoxin A-Injektion signifikant größer im Vergleich zur Referenzgruppe unter NaCl ( $0,60 \pm 0,1 \text{ mm}^2$  vs.  $0,39 \pm 0,14 \text{ mm}^2$ ,  $p=0,0235$ ). Unter einer Immobilisationsbehandlung mittels Gips zeigte sich bei der simulierten degenerativen Rotatorenmanschettenruptur eine mittlere

Durchschnittsfläche von  $0,48 \pm 0,08 \text{ mm}^2$  in der Paralyse- bzw.  $0,65 \pm 0,1 \text{ mm}^2$  in der Kontrollgruppe unter NaCl.

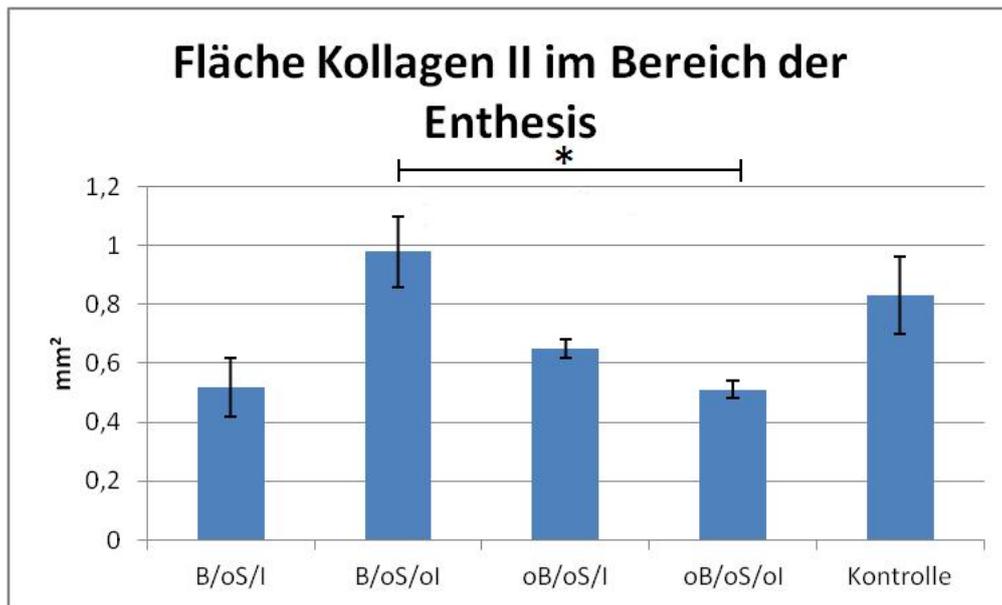


**Abb. 16: Die Kollagen II-Fläche im Bereich der Enthese unter spannungsreicher Naht:** Wie obiger Grafik zu entnehmen ist, zeigen sich unter alleiniger Immobilisationsbehandlung die größten Flächen, gefolgt von alleiniger selektiver Paralyse. Die Kombination aus beiden Verfahren lässt geringere Flächen aufzeigen, während die Ausbildung von Knorpel unter Verzicht jeglicher Verfahren auf ein Minimum reduziert ist. Ein signifikantes Benefit (\*) lässt sich bei spannungsreicher Naht ohne Immobilisationsbehandlung unter selektiver Paralyse erzielen ( $p=0,0235$ ).

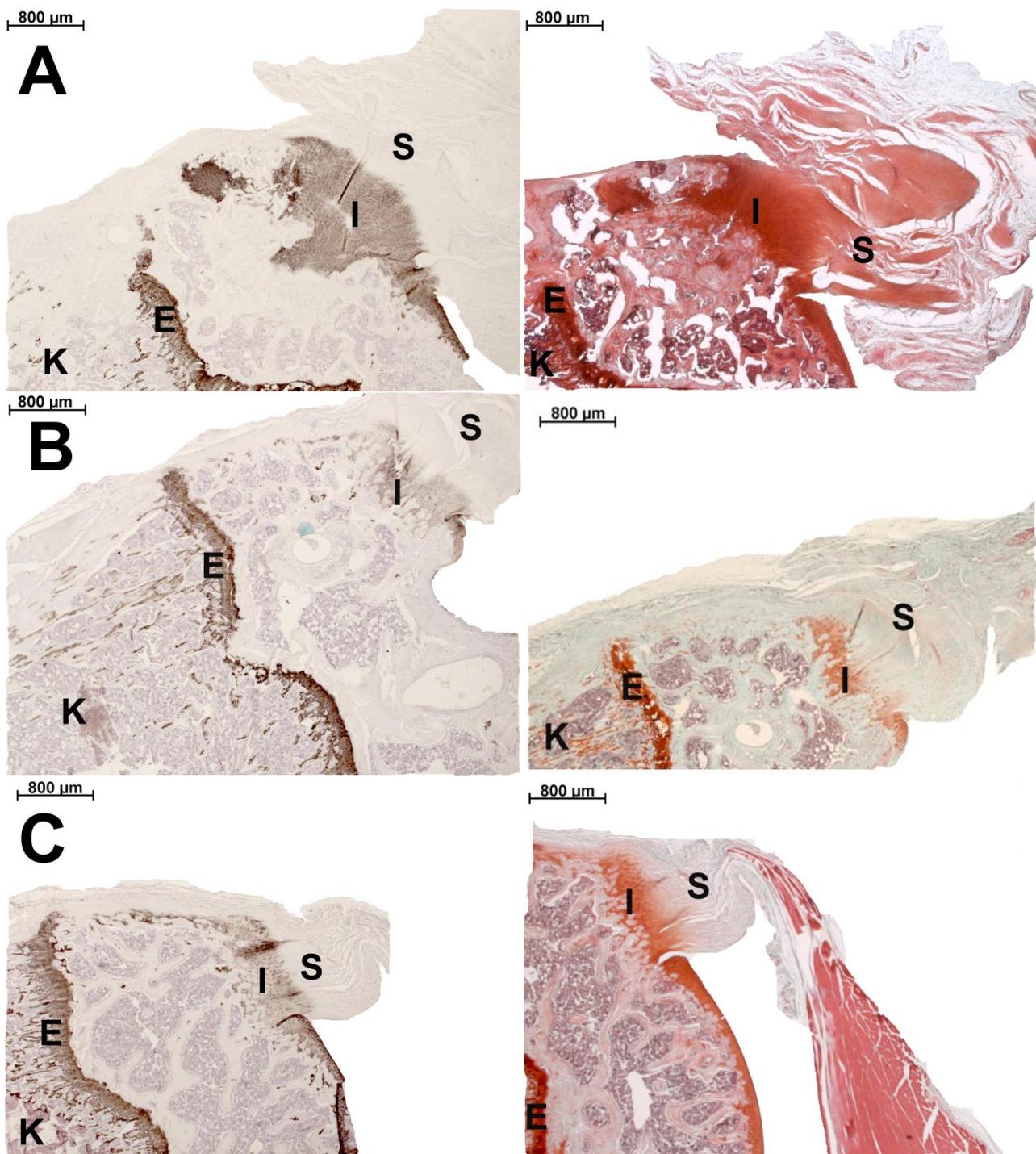


**Abb. 17: Vergleich der Untersuchungsparameter spannungsreiche Naht ohne Immobilisation unter dem Gesichtspunkt der selektiven Paralyse:** Unter Zuhilfenahme der selektiven Paralyse (A) lassen sich signifikant größere Flächen von Kollagen II im Bereich der Enthese detektieren,  $p=0,0235$ , K: Knochen, S: Sehne, I: Interface, E: Epiphysenfuge; eigene Aufnahme: links Färbung mittels Antikörper gegen Kollagen II, rechts Safranin O/ Fast Green-Färbung

Bei Simulation einer frischen Rotatorenmanschettenruptur zeigte sich eine signifikant ( $p=0,0173$ ) größere Kollagen II-Fläche von  $0.98 \pm 0.12\text{mm}^2$  in der BoNT A Gruppe bei fehlender zusätzlicher Immobilisation im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe unter Natriumchlorid mit  $0.51 \pm 0.03\text{mm}^2$ . Unter Immobilisationsbehandlung mittels Gips zeigten die mit normaler Vorlast operierten Tiere unter präoperativer selektiver Paralyse eine Kollagen II- Fläche von  $0.52 \pm 0.1 \text{mm}^2$ , in der Kontrollgruppe unter Natriumchlorid  $0.65 \pm 0.03 \text{mm}^2$ .



**Abb. 18: Die Kollagen II-Fläche im Bereich der Enthese unter spannungsarmer Naht:** Wie obiger Grafik zu entnehmen ist, zeigt sich bei spannungsarmer Naht unter alleiniger selektiver Paralyse die größte Fläche, welche über die der Kontrollgruppe noch hinausgehen, gefolgt von alleiniger Immobilisationsbehandlung. Die Kombination aus beiden Verfahren lässt geringere Flächen aufzeigen, während die Ausbildung von Knorpel unter Verzicht jeglicher Verfahren die geringsten Werte aufweist. Bei Simulation einer frischen Rotatorenmanschettenruptur zeigte sich eine signifikant ( $p=0,0173$ ) größere Kollagen II- Fläche in der BoNT A Gruppe bei fehlender zusätzlicher Immobilisation im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe unter Natriumchlorid (\*).



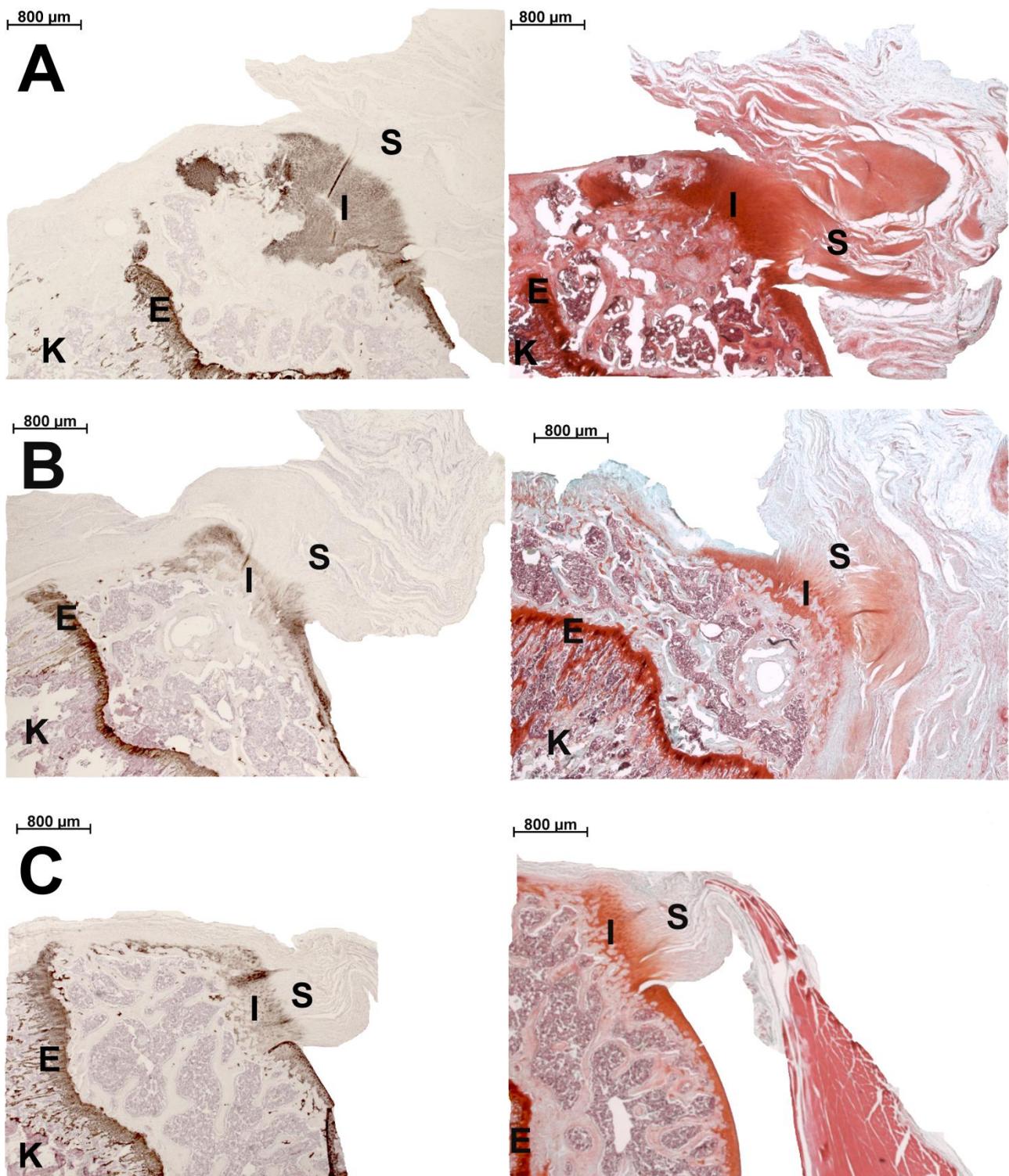
**Abb. 19: Vergleich der Parameter spannungsarme Naht in Kombination mit fehlender Immobilisation unter Auswirkung der Anwendung von selektiver Paralyse:** Bei Simulation einer frischen Rotatorenmanschettenruptur zeigt sich eine signifikant ( $p=0,0173$ ) größere Kollagen II-Fläche von  $0,98 \pm 0,12\text{mm}^2$  in der BoNT A Gruppe bei fehlender zusätzlicher Immobilisation (A) im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe unter Natriumchlorid (B) mit  $0,51 \pm 0,03\text{mm}^2$ . Auch im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle lassen sich unter selektiver Paralyse erhöhte Kollagen II-Flächen detektieren, K: Knochen, S: Sehne, I: Interface, E: Epiphysenfuge; eigene Aufnahme: links Färbung mittels Antikörper gegen Kollagen II, rechts Safranin O/ Fast Green-Färbung

Bei besonderem Focus auf den Messparameter "Immobilisation" konnte gezeigt werden, dass sowohl bei simulierter alter Rotatorenmanschettenruptur als auch bei frischer Ruptur die Kombination aus Immobilisation und Paralyse im Vergleich zur Anwendung nur einer Immobilisationsart teils statistisch signifikant, im Vergleich auch über alle Untersuchungsgruppen hinweg geringere Flächen von Kollagen II erzielen lässt (vgl. Abb. 19).

Untersuchungsparameter	p-Value
B/oS/I vs. B/oS/ol	0,012*
B/oS/I vs. oB/oS/I	0,154
B/oS/ol vs. oB/oS/ol	0,027*
oB/oS/I vs. oB/oS/ol	0,241

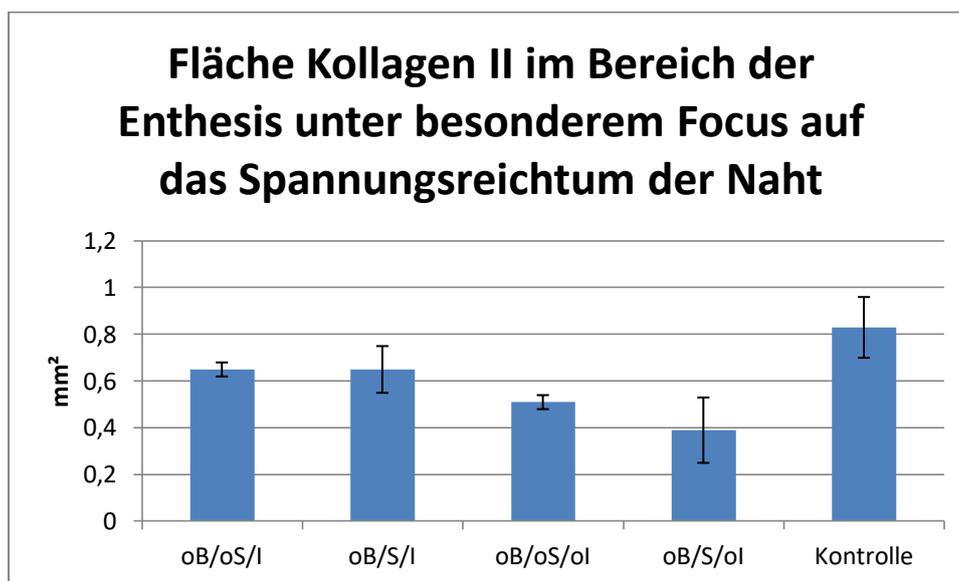
Untersuchungsparameter	p-Value
B/S/I vs. B/S/ol	0,0836
B/S/I vs. oB/S/I	0,0172*
B/S/ol vs. oB/S/I	0,1921
oB/S/I vs. oB/S/ol	0,0248*

**Tab. 8: Die Kollagen II-Fläche im Bereich der Enthese unter besonderer Beachtung des Parameters Immobilisation:** Sowohl bei simulierter alter Rotatorenmanschettenruptur als auch bei frischer Ruptur kann gezeigt werden, dass die Kombination aus Immobilisation und Paralyse im Vergleich zur Anwendung nur einer Immobilisationsart teils statistisch signifikante (\*), im Vergleich auch über alle Untersuchungsgruppen hinweg geringere Flächen von Kollagen II erzielen lässt.

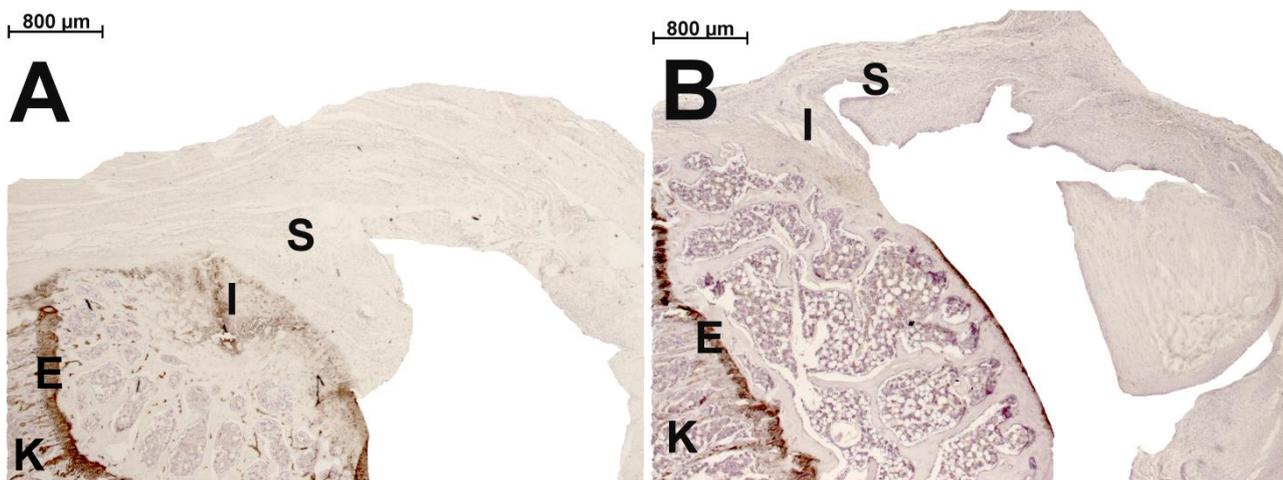


**Abb. 20: Vergleich der Untersuchungsparameter spannungsreiche Naht mit Immobilisation unter dem Gesichtspunkt der selektiven Paralyse:** Unter zusätzlicher selektiven Paralyse (B) lassen sich signifikant geringere Flächen von Kollagen II im Bereich der Enthese detektieren,  $p=0,0172$ ), C: unbehandelte Kontrollgruppe (K: Knochen, S: Sehne, I: Interface, E: Epiphysenfuge); eigene Aufnahme: links Färbung mittels Antikörper gegen Kollagen II, rechts Safranin O/ Fast Green-Färbung

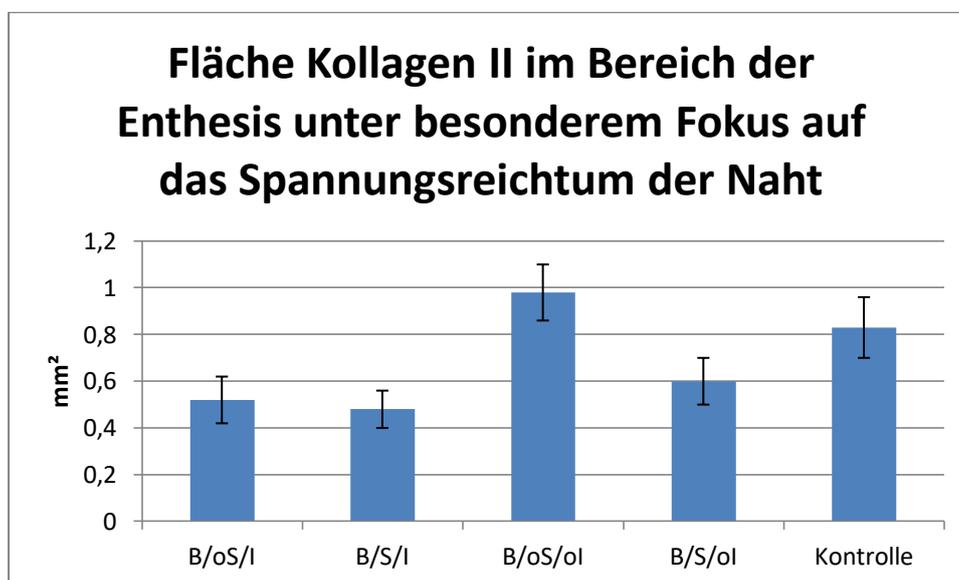
Unter dem Parameter Spannungsreichtum der Naht zeigte sich tendenziell ein in allen Versuchsgruppen geringerer Wert hinsichtlich der Kollagenfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe mit spannungsarmer Naht (vgl. Abb. 19 - 21). Durch den Einsatz von selektiver Paralyse mittels Botulinumneurotoxin A konnten größere Kollagen-II-Flächen in allen Versuchsgruppe mit spannungsreicher Naht erzielt werden (vgl. Abb. 22 + 23). Weiterhin zeigte sich, dass die Kombination aus Immobilisation und selektiver Paralyse geringere Flächen erzielen lässt (siehe oben).



**Abb. 21: Vergleich der Kollagen II-Flächen unter besonderem Focus auf das Spannungsreichtum der Naht ohne präoperative Paralyse:** Tendenziell zeigt sich bei spannungsreicher Naht eine geringere Kollagen-II-Fläche im Vergleich zur spannungsarmen Kontrollgruppe.



**Abb. 22: Auswirkungen des Spannungsreichtums der Naht auf die Kollagen-II-Fläche:** Unter spannungsreicher Naht zeigt sich eine geringere Kollagen-II-Fläche, was als Zeichen einer geringeren Verzahnung gewertet wird (exemplarische Darstellung an oB/oS/ol (A) und oB/S/ol (B), K: Knochen, S: Sehne, I: Interface, E: Epiphysenfuge); eigene Aufnahme: Färbung mittels Antikörper gegen Kollagen II



**Abb. 23: Vergleich der Kollagen II-Flächen unter besonderem Focus auf das Spannungsreichtum der Naht bei präoperativer Paralyse:** Es zeigen sich ebenfalls bei spannungsarmer Naht im Vergleich zur spannungsreichen Kontrollgruppe erhöhte Kollagen II-Flächen, wenngleich in Kombination von selektiver Paralyse mit Immobilisation sich identische Werte zeigen (vgl. B/oS/I vs. B/S/I)

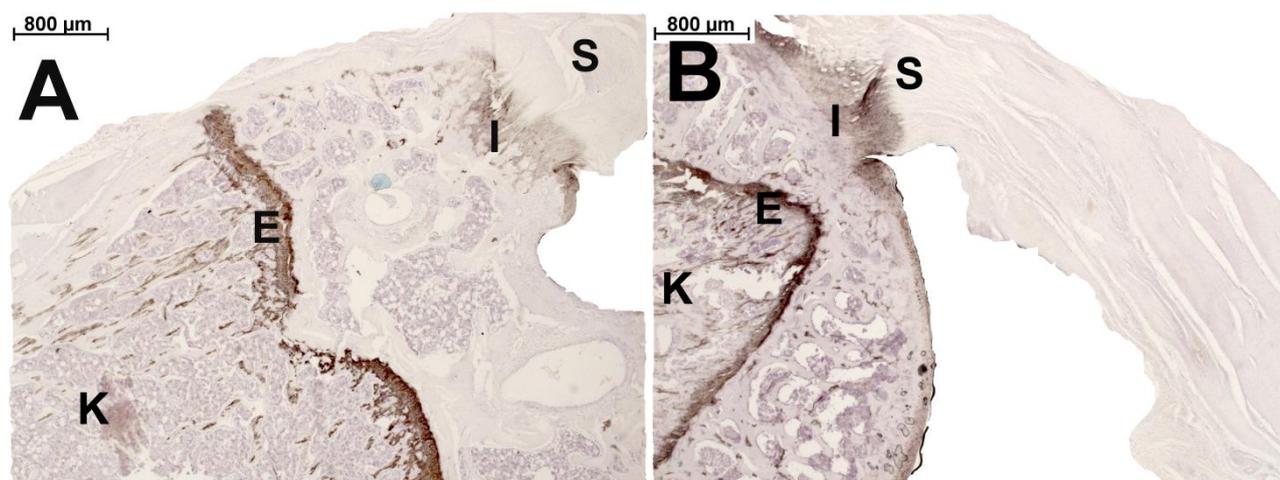


Abb. 24: Abmilderung des negativen Aspektes des Spannungsreichtums der Naht bei gleichzeitiger präoperativer Paralyse (exemplarisch dargestellt an B/oS/I (A) und B/S/I (B), K: Knochen, S: Sehne, I: Interface, E: Epiphysenfuge); eigene Aufnahme: Färbung mittels Antikörper gegen Kollagen II

Untersuchungsparameter	p-Value
B/S/I vs. B/oS/I	0,092
B/oS/I vs. oB/oS/I	0,007*
B/S/I vs. oB/S/I	0,073
oB/S/I vs. oB/oS/I	0,237

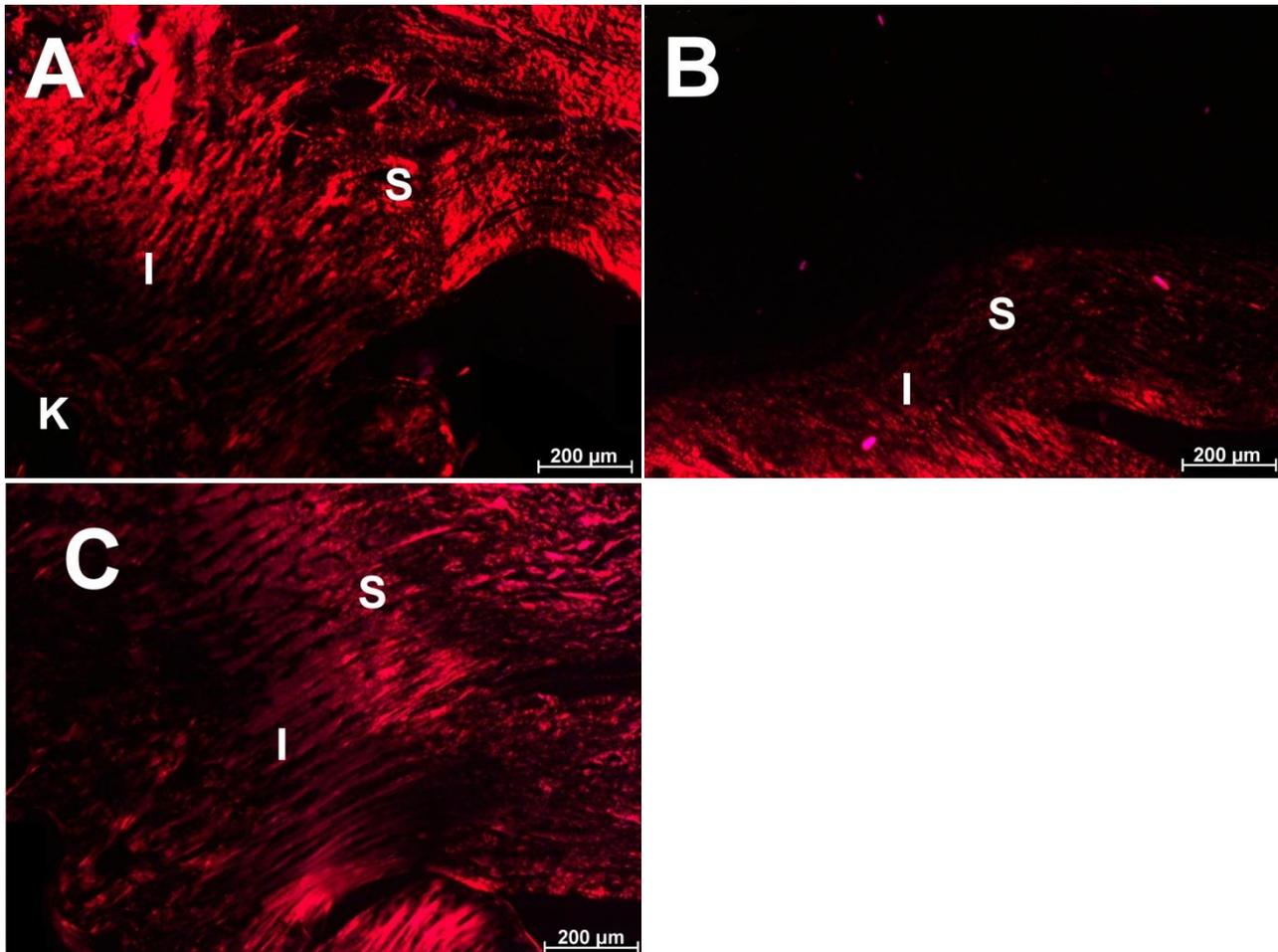
Untersuchungsparameter	p-Value
B/S/ol vs. B/oS/ol	0,001*
B/oS/ol vs. oB/oS/ol	0,002*
B/S/ol vs. oB/S/ol	0,130
oB/S/ol vs. oB/oS/ol	0,289

Tab. 9: Exemplarische Auflistung der Signifikanzniveaus der Kollagen II- Flächen unter den Bedingungen von präoperativer Paralyse, Spannungsreichtum der Naht und stattgehabter Immobilisation: Zusammenfassend zeigen sich signifikante Veränderungen zugunsten der präoperativen Paralyse mit Botulinumneurotoxin A, welche teils unter zusätzlicher Immobilisation sich weiterhin steigern lassen. Ebenso lässt sich das Spannungsreichtum der Naht als signifikanter Parameter detektieren, welcher sich unter Einfluss der selektiven Paralyse abmildern lässt (siehe auch Abb. 23 und 24)

### 3.1.4 Faserverlauf in der Polarisationsmikroskopie

Die Kollagenfasern der Tiergruppen, welche präoperativ einer selektiven Paralyse mit Botulinumneurotoxin A zugeführt wurden, zeigten im Bezug auf die Ausrichtung einen höheren Ordnungsgrad und orientierten sich hinsichtlich des Verlaufes mehr den Gegebenheiten der unbehandelten, kontralateralen Schulter. Das Maximum dieser

Abweichung konnte unter Abwesenheit einer Immobilisation erzielt werden. Der kumulative Effekt bei Verwendung von Immobilisation und selektiver Paralyse kam kaum zur Geltung. Das Spannungsreichtum der Naht scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen. Ebenfalls zeigten sich in den Subgruppen keine relevanten Auffälligkeiten hinsichtlich des Faserverlaufs.



**Abb. 25: Ordnungsgrad der Kollagenfasern (exemplarisch dargestellt an B/S/ol (A) im Vergleich zu oB/S/ol B):** Rotatorenmanschettenrekonstruktionen, welche im Vorfeld einer selektiven Paralyse unterzogen wurden, zeigen einen deutlich geordneteren Faserverlauf. Insgesamt sind die Gruppen nach stattgehabtem Eingriff in der Faserausrichtung der unbehandelten Kontrollgruppe (C) unterlegen, K: Knochen, S: Sehne, I: Interface, E: Epiphysenfuge; eigene Aufnahme: Polarisationsmikroskopie nach Färbung mittels Picrosirius Red

### 3.1.5 Zellmorphologie und Verteilungsmuster

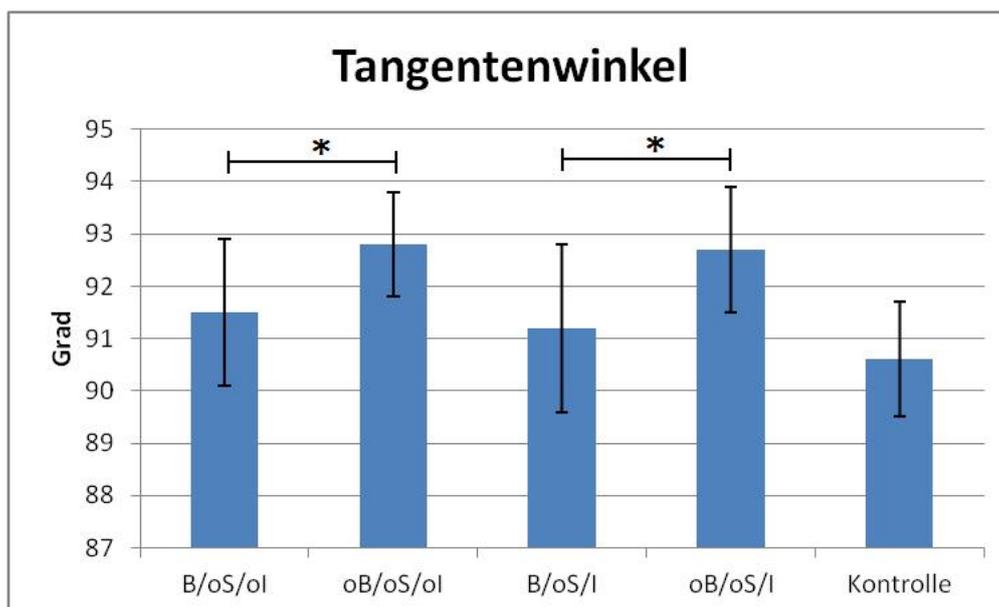
Im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe zeigte sich unter Vorbehandlung mit Botulinumneurotoxin A bei Simulation einer alten, degenerativen Rotatorenmanschettenruptur ein geringerer Zellanteil. Es konnten keine plumpen oder deformierten Chondro- oder Tenozyten nachgewiesen werden. Ebenfalls war ein geringerer Vaskularisierungsgrad

des Knorpels ersichtlich, ein Einsprossen von Blutgefäßen in den Knorpel im Bereich der Enthese war im Vergleich zur Kontrollgruppe auf wenige, nicht signifikante Einzelfälle beschränkt. Eine Zystenbildung im Sinne von florierenden oder abgelaufenen entzündlichen Prozessen war in keinem histologischen Schnitt sichtbar.

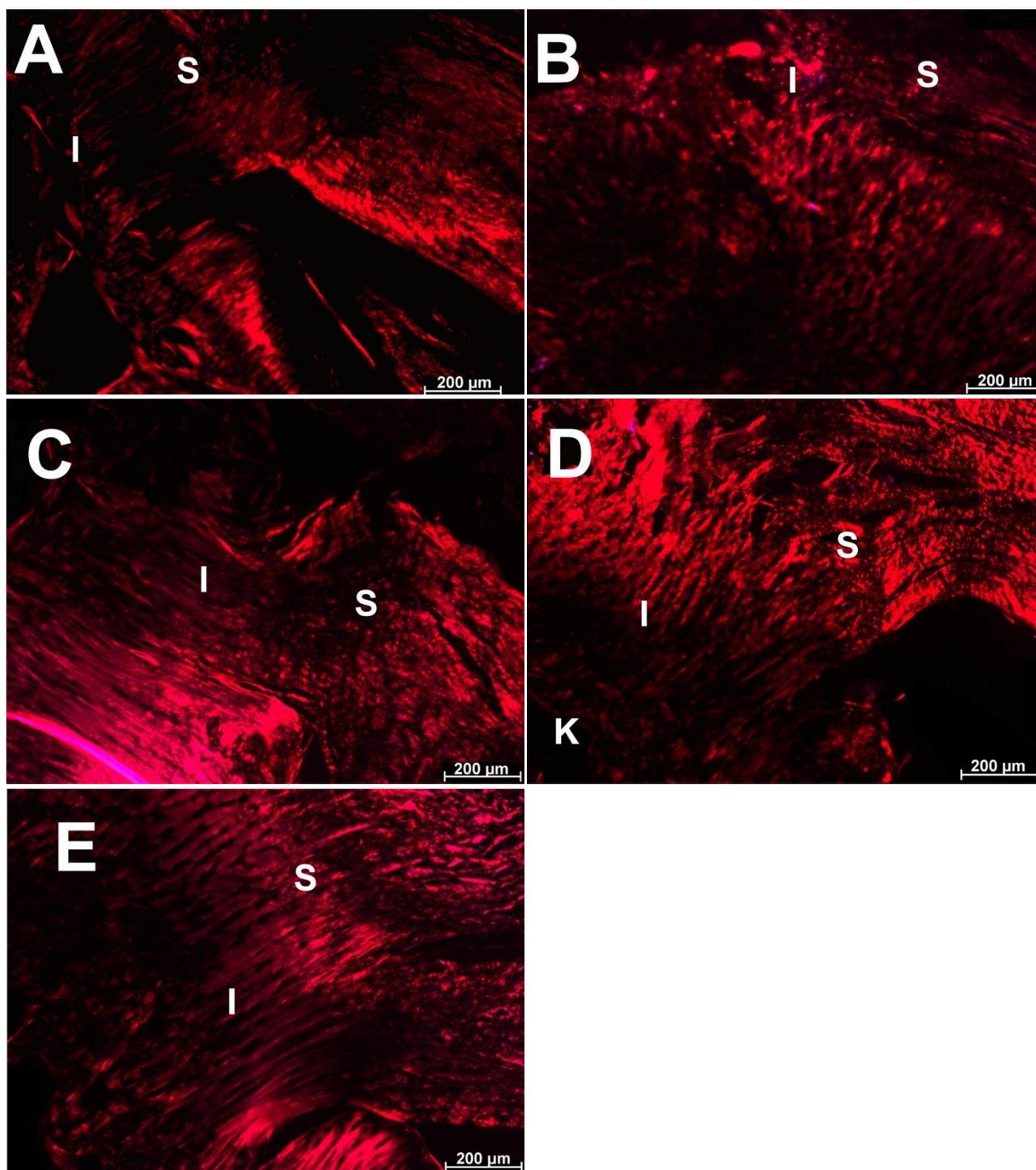
Eine zusätzliche Immobilisation mittels zirkulärem Gips für zwei Tage postoperativ zeigte hinsichtlich Zellmorphologie als auch im Bezug auf das Verteilungsmuster keine nennenswerten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Simulation einer akuten Sehnenruptur des M. supraspinatus zeigten sich sowohl unter Botulinumneurotoxin A- bzw. Immobilisationsbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede (Bildnachweise siehe histologische Schnitte).

### 3.1.6 Insertionswinkel der Kollagenfasern an der Enthese

Der Tangentenwinkel unter BoNT A bei simulierter frischer Rotatorenmanschettenverletzung war mit  $91,5^\circ \pm 1,4^\circ$  unter Verzicht von Immobilisation sowie  $92,8^\circ \pm 1,0^\circ$  unter Verzicht von präoperativer Paralyse signifikant ( $p < 0,05$ ) \*. Unter Gipstherapie zeigte sich bei Operation unter normaler Vorlast ein Tangentenwinkel von  $91,2^\circ \pm 1,6^\circ$  bei stattgehabter BoNT A-Injektion, welcher sich signifikant ( $p < 0,05$ ) zur Operationsgruppe unter NaCl zeigt ( $92,7^\circ \pm 1,2^\circ$ , siehe Abb. 26 und 27).

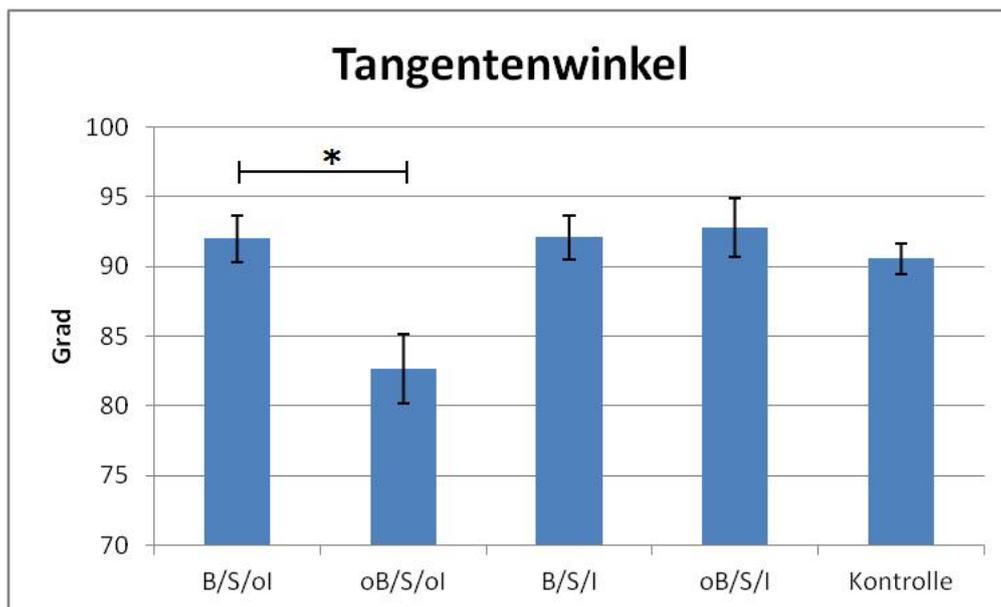


**Abb. 26: Der Tangentenwinkel unter Einfluss von Immobilisation und selektiver Paralyse bei simulierter frischer Rotatorenmanschettenruptur:** Unter selektiver Paralyse mit Botulinumneurotoxin A lassen sich sowohl unter alleiniger Therapie als auch in Kombination mit Immobilisation im Vergleich zur mit dem Placebo behandelten Gruppe näher am Kontrollwert der unbehandelten Gruppe liegende Tangentenwinkel aufzeigen (\*).

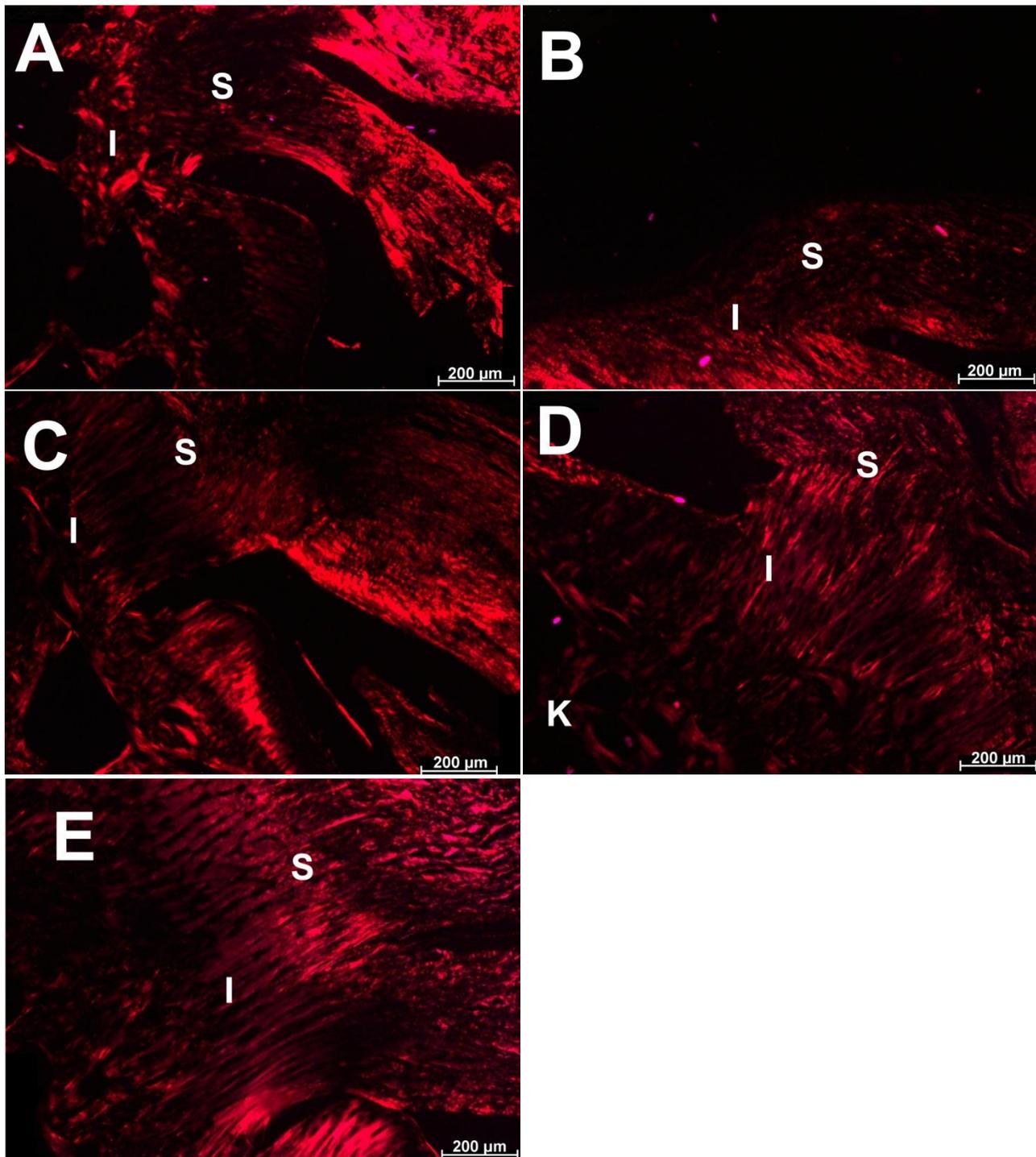


**Abb. 27: Der Tangentenwinkel bei simulierter frischer Rotatorenmanschettenruptur:** Unter selektiver Paralyse mit Botulinumneurotoxin A lassen sich sowohl unter alleiniger Therapie als auch in Kombination mit Immobilisation im Vergleich zur mit dem Placebo behandelten Gruppe näher am Kontrollwert der unbehandelten Gruppe liegende Tangentenwinkel aufzeigen (A: B/oS/ol, B: oB/oS/ol, C: B/oS/I, D: oB/oS/I, E: Kontrolle, K: Knochen, S: Sehne, I: Interface); eigene Aufnahme: Polarisationsmikroskopie nach Färbung mittels Picrosirius Red

Innerhalb der Gruppen, die mit einer erhöhten Vorlast operiert wurden, war der Tangentenwinkel bei Verzicht von Immobilisation unter präoperativer selektiver Paralyse im Vergleich zur Kontrollgruppe unter NaCl höchst signifikant ( $92,0^\circ \pm 1,7^\circ$  vs.  $82,72^\circ \pm 2,5^\circ$ ,  $p < 0,01$ ). Unter den Bedingungen der Immobilisation zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Nutzens einer selektiven Paralyse ( $92,1^\circ \pm 1,6^\circ$  unter BoNT A,  $92,8^\circ \pm 2,1^\circ$  unter NaCl,  $p > 0,05$ ). Die oben aufgeführten Fakten lassen sich der Abbildung 28 entnehmen.



**Abb. 28: Der Tangentenwinkel unter Einfluss von Immobilisation und selektiver Paralyse bei simulierter alter Rotatorenmanschettenruptur:** Unter selektiver Paralyse mit Botulinumneurotoxin A lassen sich bei alten degenerativen Rotatorenmanschetten ohne zusätzliche Immobilisation Tangentenwinkel erzielen, die eine geringere Abweichung von der Kontrollgruppe als die individuelle Referenzgruppe (oB/S/ol) aufweisen (\*). Unter Immobilisationsbehandlung können keine signifikanten Veränderungen aufgezeigt werden.

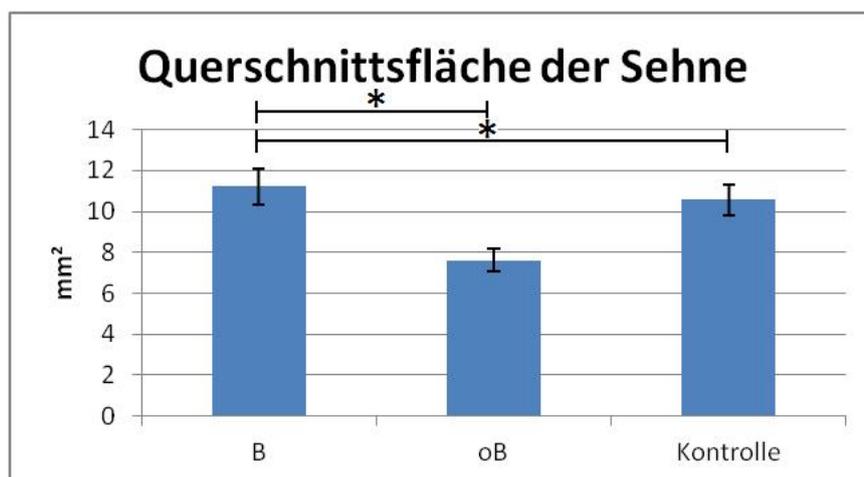


**Abb. 29: Der Tangentenwinkel bei simulierter alter Rotatorenmanschettenruptur:** Unter Einsatz von selektiver Paralyse lassen sich bei alten degenerativen Rotatorenmanschettenrupturen näher an der Kontrollgruppe liegende Tangentenwinkel erzielen, während unter Immobilisationsbehandlung keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur individuellen Referenzgruppe aufgezeigt werden können. (A: B/S/ol, B: oB/S/ol, C: B/S/I, D: oB/S/I, E: Kontrolle, K: Knochen, S: Sehne, I: Interface); eigene Aufnahmen: Polarisationsmikroskopie nach Färbung mittels Picrosirius Red

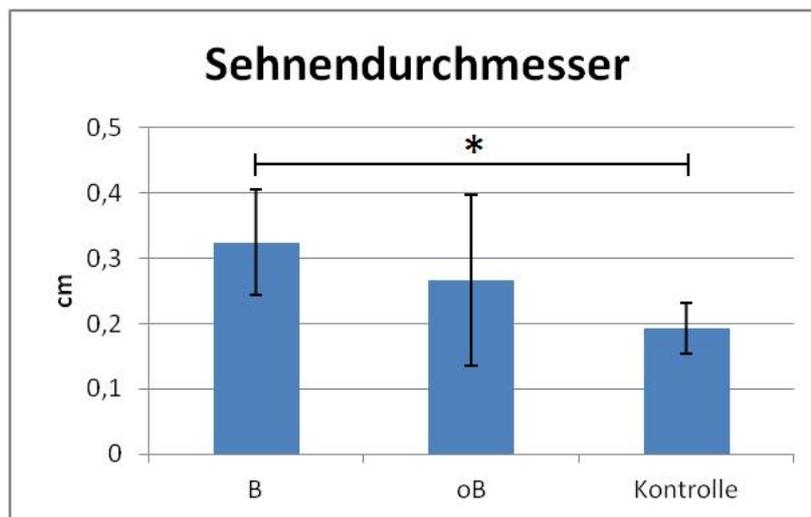
### 3.1.7 Sehrendurchmesser und Querschnittsfläche

Die Sehnen, die mit BoNT A behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Behandlung mit NaCl eine signifikant größere Querschnittsfläche (siehe Abbildung 30). Bei Betrachtung der einzelnen Gruppen konnten im Vergleich zur individuellen Korrespondenzgruppe keine signifikanten Werte erzielt werden ( $p > 0,05$ ).

Ebenfalls zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0036$ ) im Bezug auf den Sehrendurchmesser zwischen BoNT A - Gruppe und NaCl-Gruppe (BoNT A  $0.32 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$  vs. NaCl  $0.27 \text{ cm} \pm 0.17 \text{ cm}$ ). Eine Signifikanz ließ sich ebenfalls im Vergleich zur unbehandelten kontralateralen Schulter feststellen ( $p = 0,0015$ ;  $0.19 \text{ cm} \pm 0.04 \text{ cm}$ , siehe Abbildung 30). Bei Betrachtung der individuellen Gruppen konnten keine signifikanten Werte erzielt werden, ebenfalls zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei Immobilisation oder Paralyse ( $p > 0,05$ ).



**Abb. 30: Die Querschnittsfläche der Sehne:** Sehnen, welche präoperativ einer selektiven Paralyse unterzogen wurden zeigen in ihrer Gesamtheit (ohne Betrachtung der Einflussfaktoren von Immobilisation oder Spannungsreichtum der Naht) eine größere Querschnittsfläche, weiterhin zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten kontralateralen Schulter (\*).



**Abb. 31: Der Sehndurchmesser nach Rotatorenmanschettennaht:** Es zeigt sich ein signifikant größerer Sehndurchmesser bei den mittels selektiver Paralyse präoperativ behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (\*).

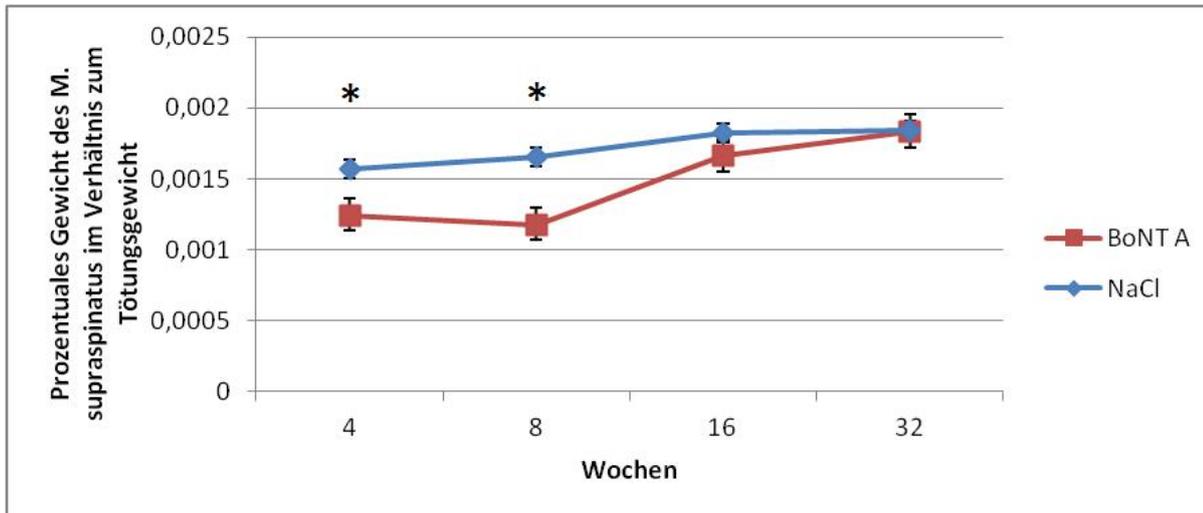
## 3.2 Atrophiegruppe

### 3.2.1 Volumenmessung und Feuchtgewicht

Zur Objektivierung langfristiger Folgen der selektiven Paralyse wurde eine prozentuale Berechnung des M. supraspinatus bezogen auf das Körpergewicht zum Tötungszeitpunkt durchgeführt. Hier zeigten sich nach 8 Wochen signifikante Unterschiede zwischen der Gesamtheit aller mit BoNT A (0,0012 % des Körpergewichts) und den mit NaCl (0,0018 % des Körpergewichts) behandelten Tieren ( $p=0.0143$ ). Eine Angleichung des prozentuellen Körpergewichts fand ab der 16. Woche statt, wenngleich auch zu diesem Zeitpunkt noch signifikante Unterschiede zur mit NaCl behandelten Kontrollgruppe ersichtlich waren ( $p=0,019$ ). In der 32-Wochenstichprobe zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnliche prozentuale Verhältnisse, signifikante Unterschiede konnten nicht mehr nachgewiesen werden ( $p=0,4667$ ). Ebenfalls konnten Kontrollmessungen der Mm. infraspinati über den gesamten Beobachtungszeitraum vom 4 bis 32 Wochen keine signifikanten Unterschiede detektieren. Somit war insbesondere keine kompensatorische Hypertrophie/ Hyperplasie der weiteren Muskeln der Rotatorenmanschette bei selektiver Paralyse ersichtlich, wie in Abbildung 43 zu sehen ist.

Angelehnt an Hettrich et al. [72], jedoch mittels einer Feindosierspritze (Omnifix F, Feindosierungsspritzen 1 ml) erfolgte ebenfalls eine Volumenmessung, welche zum Zeitpunkt der 4 und 8 Wochenkontrolle signifikante Unterschiede im Vergleich zur

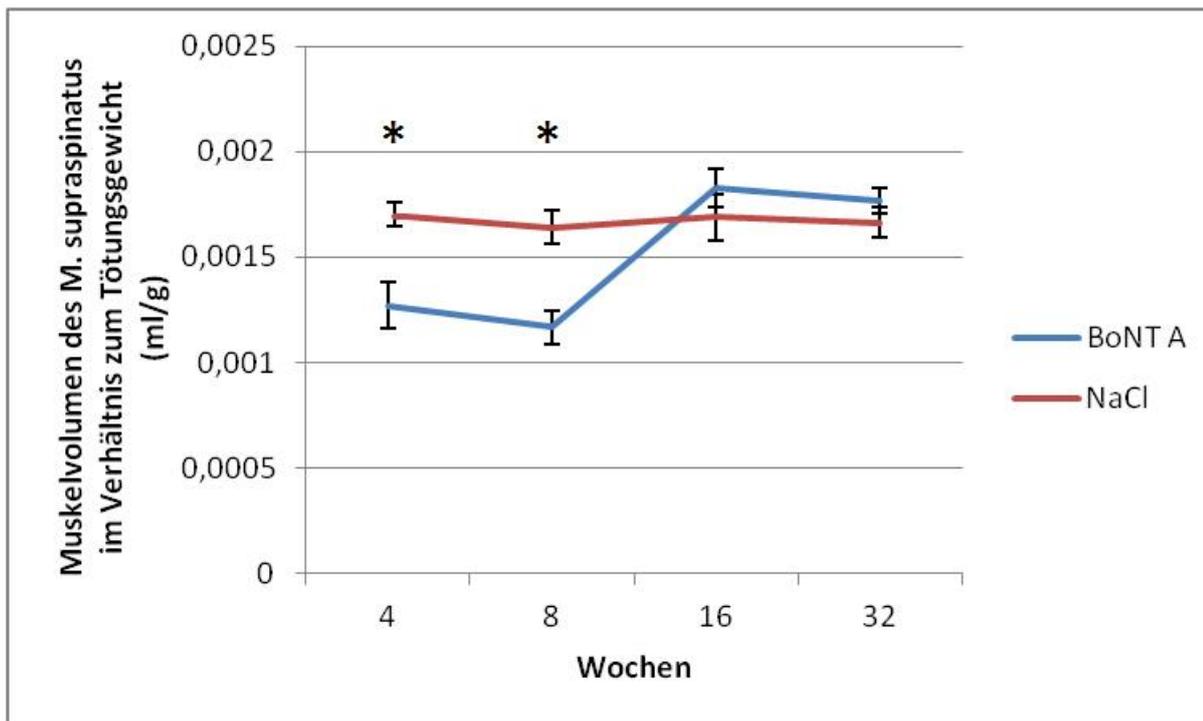
Referenzgruppe zeigte. Diese erwiesen sich als regredient in der Stichprobe der 16. und 32. Woche.



**Abb. 32: Prozentuales Gewicht des M. supraspinatus im Verhältnis zum Tötungsgewicht:** Die Muskelatrophie wird am Beispiel des prozentualen Anteils zum Tötungsgewicht dargestellt. In den Untersuchungen kann ein Maximum der Atrophie 8 Wochen nach erfolgter BoNT A- Injektion dargestellt werden, welche sich im Vergleich zur Kontrollgruppe als hoch signifikant erweist ( $p=0,0286$ ), signifikante Messwerte (\*).

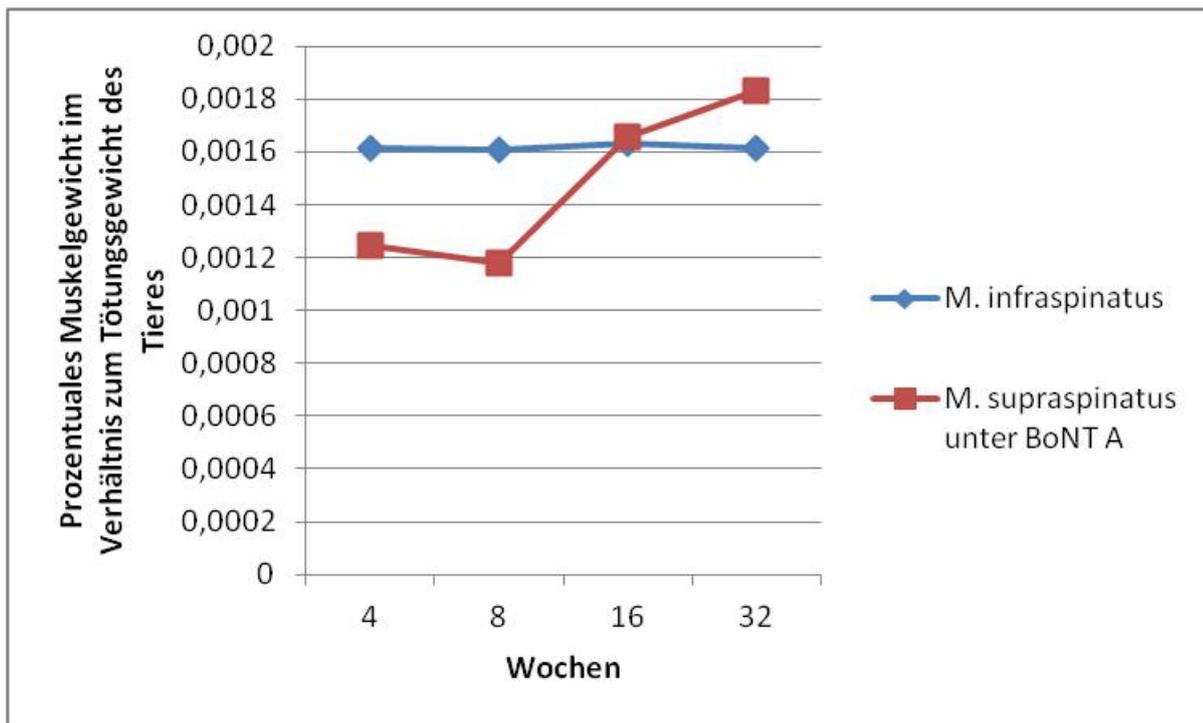


**Abb. 33: M. supraspinatus 4 Wochen nach erfolgter Botulinumneurotoxin A- Injektion (re) und 8-Wochen Kontrolle mit NaCl-Injektion (li):** Bereits makroskopisch zeigt sich ein deutlicher Volumenverlust im Vergleich zur Kontrollgruppe (eigene Aufnahme)

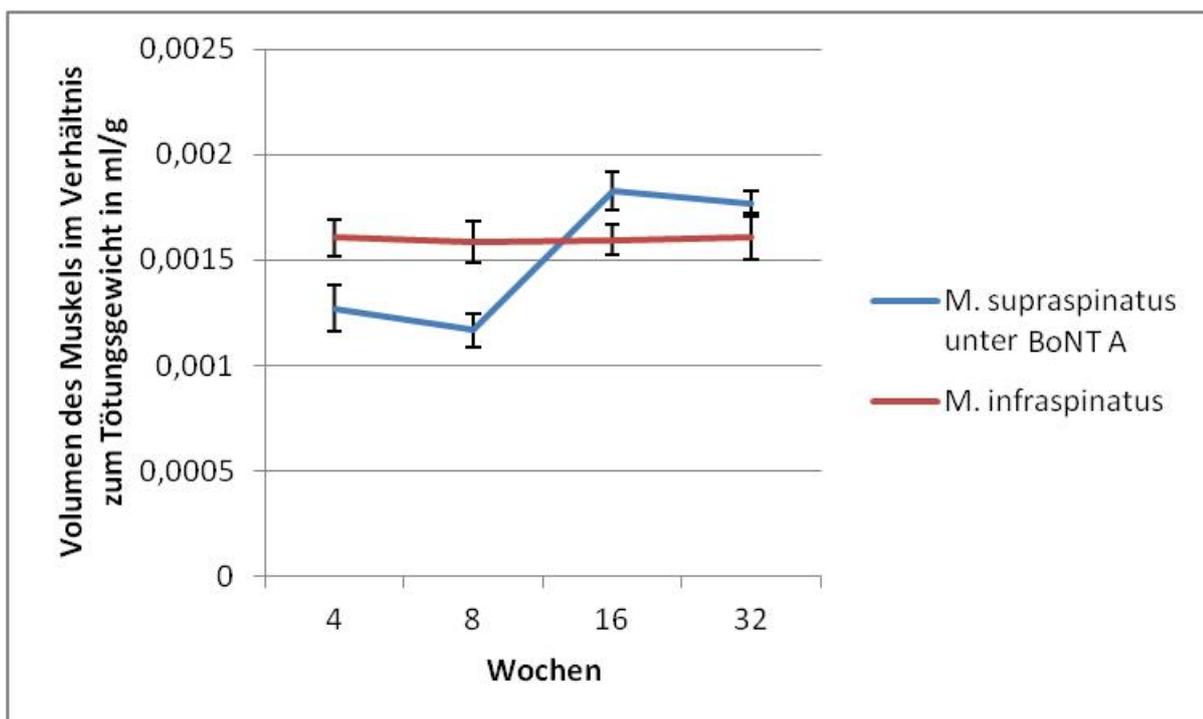


**Abb. 34: Volumen des M. supraspinatus im Verhältnis zum Tötungsgewicht.** Unter Therapie zeigt sich zum Untersuchungszeitpunkt der 4. und 8. Woche post injektionem ein signifikanter Unterschied (\*) hinsichtlich des Muskelvolumens, welcher sich ab der 16. Woche beginnend der Kontrollgruppe annähert.

Zur Detektion einer möglichen kompensatorischen Hypertrophie der nicht affizierten Muskulatur erfolgte ebenfalls eine Untersuchung des M. infraspinatus auf Volumen und Feuchtgewicht. Dabei zeigten sich sowohl in der Volumenmessung (siehe Abb. 35) als auch im Verhältnis des Muskels zum Gesamtkörpergewicht (siehe Abb. 36) keine signifikanten Änderungen. Somit konnte die Theorie einer kompensatorischen Hypertrophie nicht unterstützt werden. Dabei war auffällig, dass in den Untersuchungsgruppen bis zur 16. Woche signifikante Unterschiede im Muskelvolumen detektiert wurden. Im Untersuchungskollektiv der 16. Woche kam es seitens der BoNT A-Gruppe zu signifikant größeren Muskelvolumina, die sich in der Kontrollgruppe der 32. Woche als regressiert erwiesen.



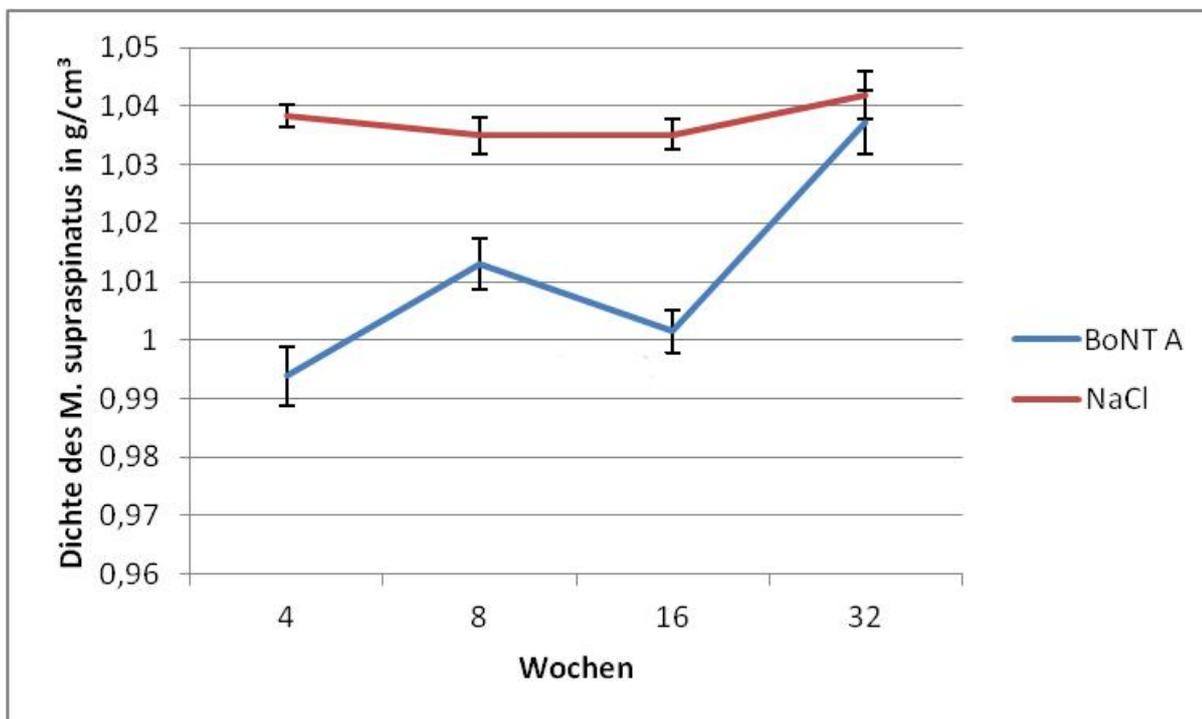
**Abb. 35: Prozentuales Muskelgewicht im Verhältnis zum Tötungsgewicht des Tieres.** Es zeigt sich keine kompensatorische Hypertrophie der Muskulatur. Während sich im Verlauf der prozentuale Gewichtsanteil des M. supraspinatus zwischen der 16. und 32. Woche einem Plateau annähert, zeigt sich das prozentuale Gewicht des M. infraspinatus weitestgehend konstant.



**Abb. 36: Volumen des Muskels im Verhältnis zum Tötungsgewicht:** Es zeigt sich keine kompensatorische Hypertrophie der Muskulatur. Während sich im Verlauf das Volumen des M. supraspinatus zwischen der 16. und 32. Woche einem Plateau annähert, zeigt sich das Volumen des M. infraspinatus weitestgehend konstant.

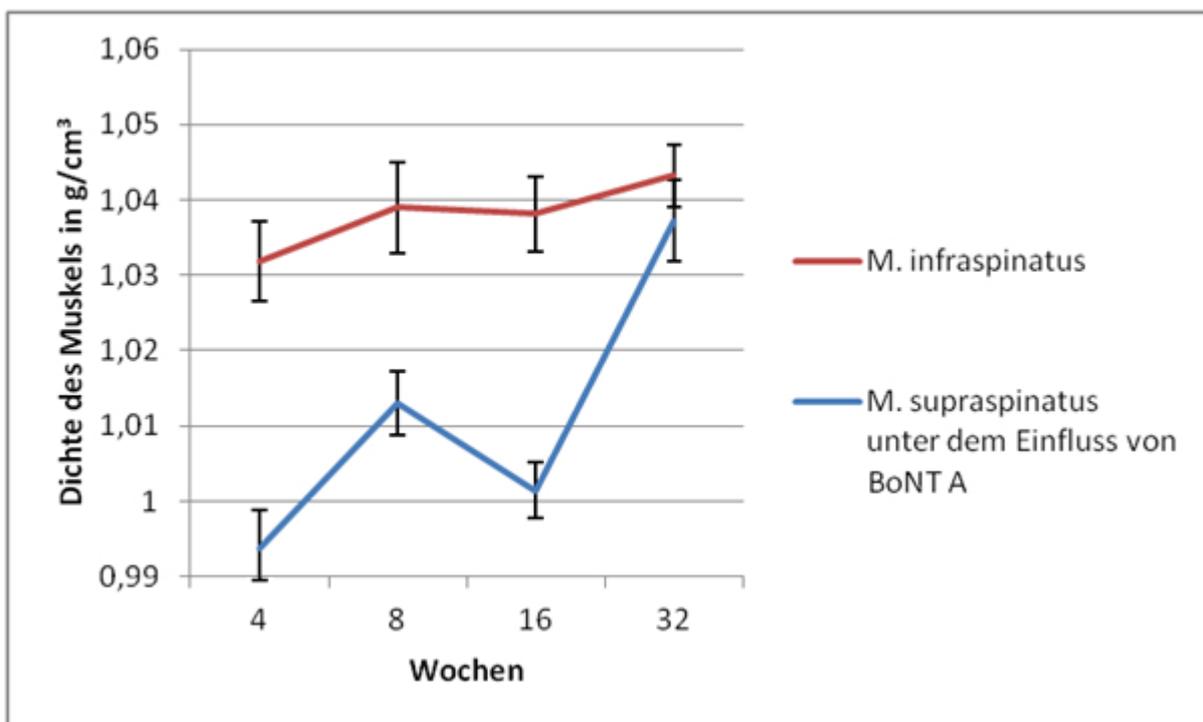
### 3.2.2 Dichteberechnung

Zur exakteren Beurteilung von Gewicht und Volumen der entnommenen Muskeln erfolgte auf der Grundlage der dort erhobenen Messwerte die Berechnung der Dichte. Dabei wurde die Beurteilung der Muskeldichte an dem von Brinkmann et al. publizierten Wert von  $1,056\text{g/cm}^3$  [145] im Vergleich zur geringeren Dichte von Fettgewebe ( $0,9\text{ g/cm}^3$ ) [146] durchgeführt. Auffällig zeigte sich, dass sich die mit NaCl infiltrierte Schultern konstant über den gesamten Beobachtungszeitraum am Literaturwert orientierten. Die mit Botulinumneurotoxin A infiltrierte Schultern befanden sich bis zur 16. Woche sowohl hinsichtlich der Dichte unter dem Literaturwert als auch unter dem der Referenzgruppe mit NaCl. Beachtenswert war der Abfall der Dichte im Kollektiv der Stichprobe der 16. Woche, welche sich durch den hohen Fettanteil trotz regelrechtem Muskelvolumen (vgl. 3.2.1 und 3.2.4 (Confocal Mikroskopie zur Detektion des Fettanteils)) erklären lassen.



**Abb. 37: Die Dichte des M. supraspinatus im Nachbeobachtungsintervall:** Die mit NaCl infiltrierte Schultern orientieren sich konstant über den gesamten Beobachtungszeitraum am Literaturwert. Die mit Botulinumneurotoxin A infiltrierte Schultern befinden sich bis zur 16. Woche sowohl hinsichtlich der Dichte unter dem Literaturwert als auch unter dem der Referenzgruppe mit NaCl. Beachtenswert ist der Abfall der Dichte im Kollektiv der Stichprobe der 16. Woche, welche sich durch den hohen Fettanteil trotz regelrechtem Muskelvolumen erklären lässt.

Zum Ausschluss einer kompensatorischen Hypertrophie und zu Vergleichszwecken einer nicht infiltrierten Muskelpartie erfolgten ebenfalls Dichtemessungen an der Muskulatur des M. infraspinatus. Über den gesamten Beobachtungsraum von 32 Wochen zeigten sich Dichteverhältnisse, welche sich am Literaturwert orientieren [145]. Unter Einfluss von Botulinumneurotoxin A zeigte sich oben genannter Verlauf bis hin zur völligen Regeneration in der 32. Woche.



**Abb. 38: Die Dichte des Muskels unter Einfluss von Botulinumneurotoxin A im Zeitverlauf:** Es ist keine kompensatorische Hypertrophie über den gesamten Nachbeobachtungszeitraum ersichtlich, die Dichteverhältnisse des M. infraspinatus orientieren sich allseits am Literaturwert.

Untersuchungsparameter	Dichte in g/cm <sup>3</sup>
4 Wochen BoNT A M. supraspinatus	0,993816 ± 0,0051
4 Wochen NaCl M. supraspinatus	1,0381978 ± 0,0019
4 Wochen M. infraspinatus	1,03184971 ± 0,0053
8 Wochen BoNT A M. supraspinatus	1,012974 ± 0,0043
8 Wochen NaCl M. supraspinatus	1,034982 ± 0,0032
8 Wochen M. infraspinatus	1,03897641 ± 0,0061
16 Wochen BoNT A M. supraspinatus	1,0014298 ± 0,0037
16 Wochen NaCl M. supraspinatus	1,0351751 ± 0,0027
16 Wochen M. infraspinatus	1,0381209 ± 0,0049
32 Wochen BoNT A M. supraspinatus	1,03725511 ± 0,0054
32 Wochen NaCl M. supraspinatus	1,0417932 ± 0,0041
31 Wochen M. infraspinatus	1,0432236 ± 0,0041

**Tab. 10: Die Dichteverhältnisse der Muskulatur im Zeitverlauf:** Unter Einfluss von selektiver Paralyse lassen sich geringere und unter dem Literaturwert liegende Dichteverhältnisse erzielen, welche sich im Zeitverlauf als reversibel erweisen. Eine kompensatorische Hypertrophie der nicht infiltrierte Muskulatur ist zu keinem Zeitpunkt zu detektieren.

### 3.2.3. Fibrillendurchmesser

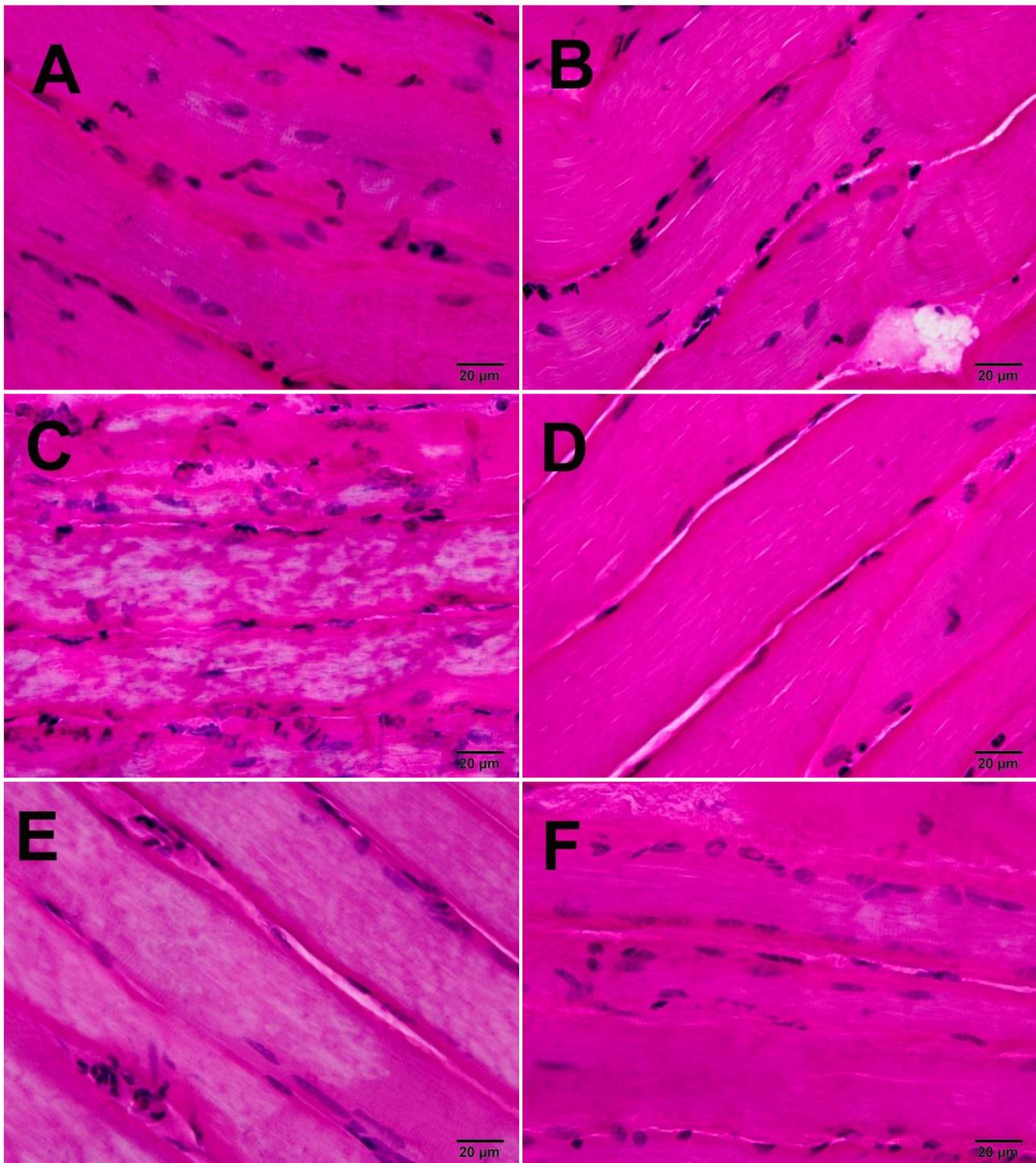
Auf der Grundlage der histologischen Schnitte erfolgte die Messung des Fibrillendurchmessers. Dabei zeigte sich, dass es beginnend in der 4 Wochenstichprobe zu einer Abnahme des Fibrillendurchmessers kommt. Die maximale Ausprägung war in der 8 Wochenstichprobe zu verzeichnen, während sich der Fibrillendurchmesser bis zur 32 Wochenstichprobe den Werten der unbehandelten Kontrolle angleicht. Teilweise zeigte sich auch eine Auflösung der fibrillären Strukturen. Am markantesten konnte dieses Phänomen in der 8-Wochenstichprobe aufgezeigt werden, jedoch zeigte sich bereits in der 16. Woche eine beginnende Regeneration. Bis zur 32. Woche waren die Reparationsvorgänge weitestgehend vollständig abgeschlossen.

---

Untersuchungsparameter	Durchmesser in $\mu\text{m}$
4 Wochen BoNT A	51,3 $\pm$ 6,8
4 Wochen Kontrolle	57,4 $\pm$ 5,7
8 Wochen BoNT A	48,4 $\pm$ 8,3
8 Wochen Kontrolle	59,8 $\pm$ 5,9
16 Wochen BoNT A	55,7 $\pm$ 7,1
32 Wochen BoNT A	56,2 $\pm$ 6,7

---

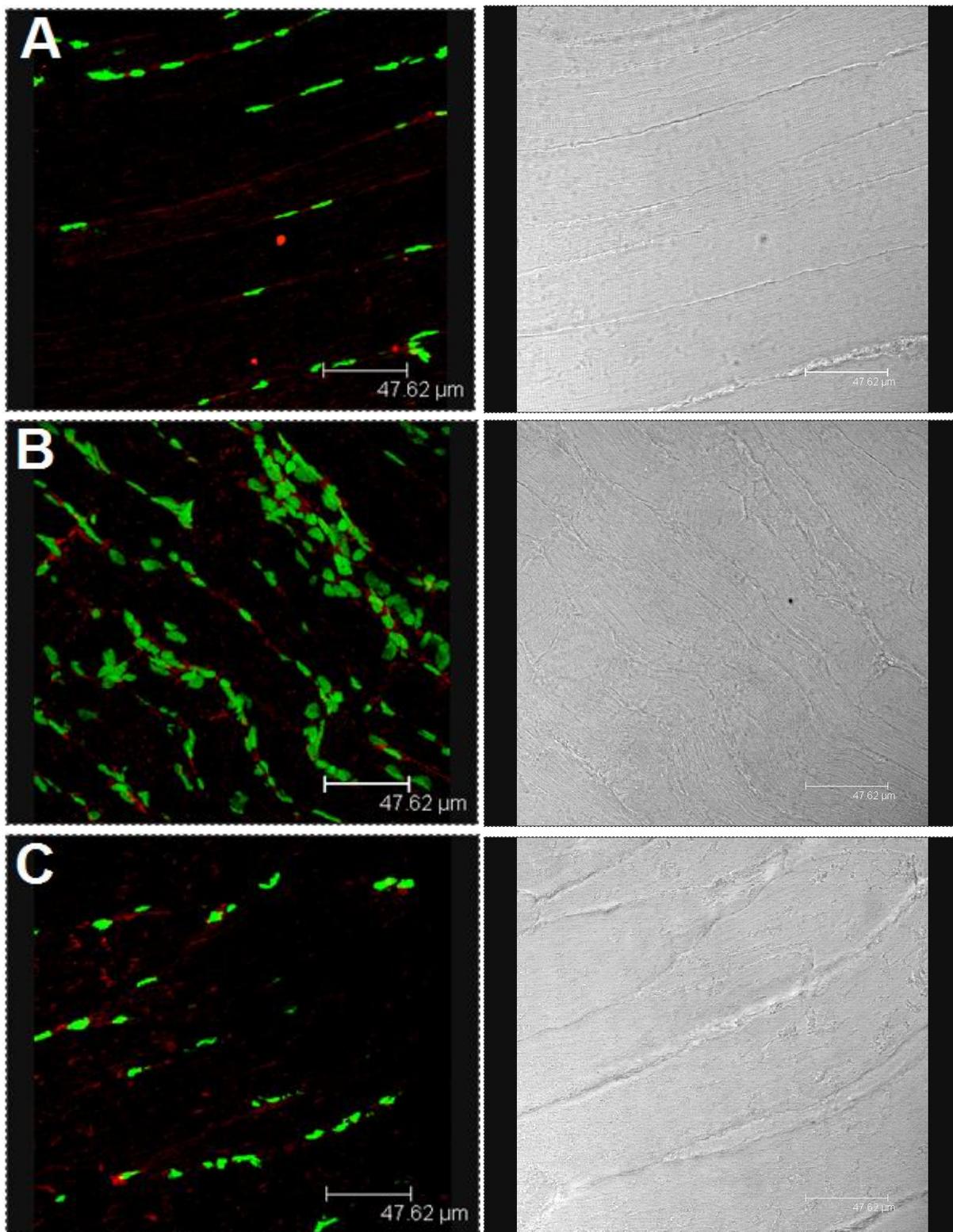
**Tab. 11: Der Fibrillendurchmesser unter Einfluss einer selektiven Paralyse:** Unter selektiver Paralyse mittels Botulinumneurotoxin A kommt es zum Abnahme des Fibrillendurchmessers mit p. m. in der 8-Wochenstichprobe. Gegen Ende des Nachbeobachtungszeitraums von 32 Wochen ist ein Angleichen an die unbehandelten Kontrollgruppen erfolgt.

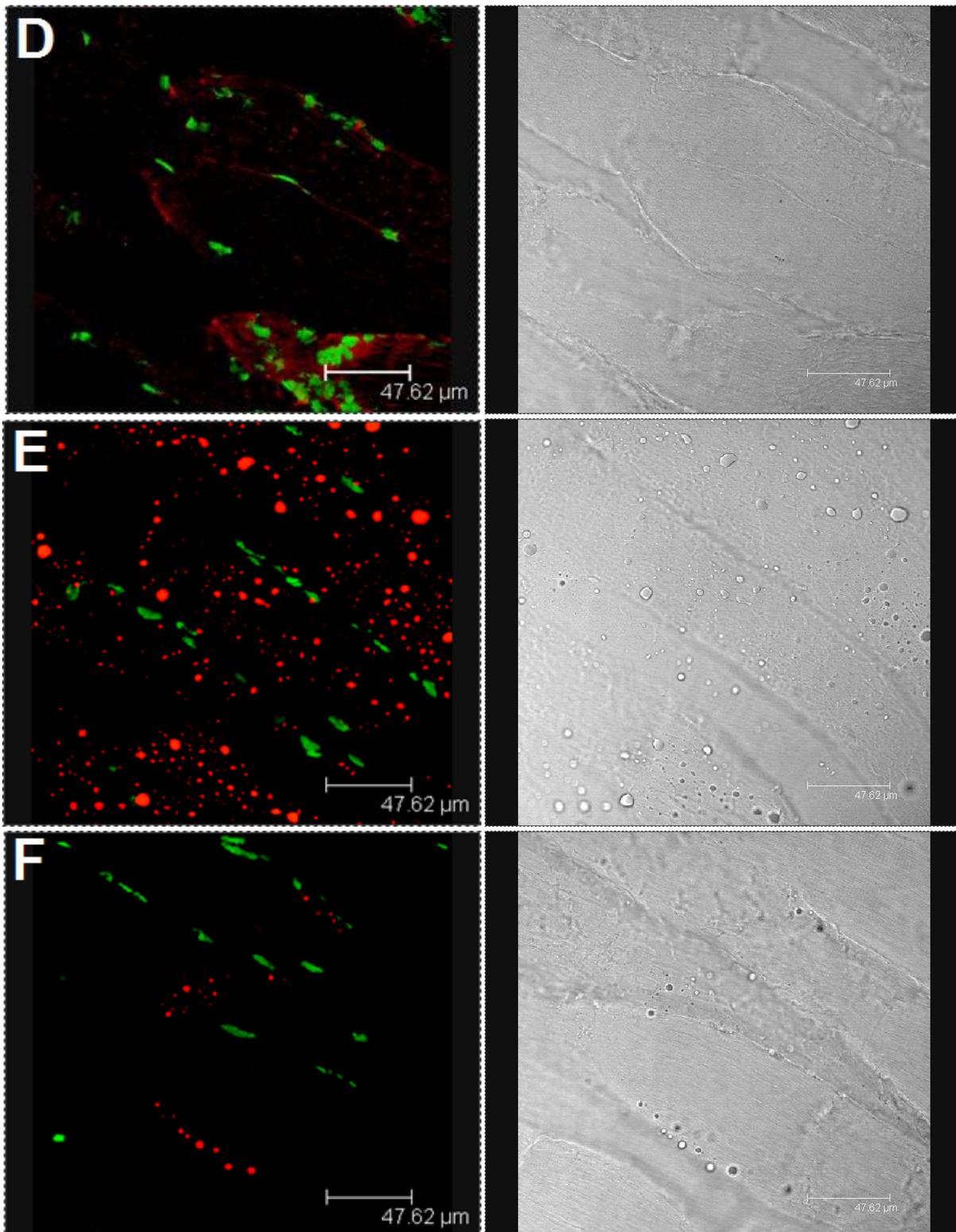


**Abb. 39: Der Fibrillendurchmesser unter Einfluss von Botulinumneurotoxin A.** Unter Einfluss von Botulinumneurotoxin zeigt sich eine Abnahme des Fibrillendurchmessers mit p. m. nach 8 Wochen. Ab der 16. Woche ist eine zunehmende Angleichung an den Durchmesser der Kontrollgruppe erfolgt. (A: 4 Wochen BoNT A, B: 4 Wochen Kontrolle, C: 8 Wochen BoNT A, D: 8 Wochen Kontrolle, E: 16 Wochen BoNT A, F: 32 Wochen BoNT A); eigene Aufnahmen: Färbung H.E.

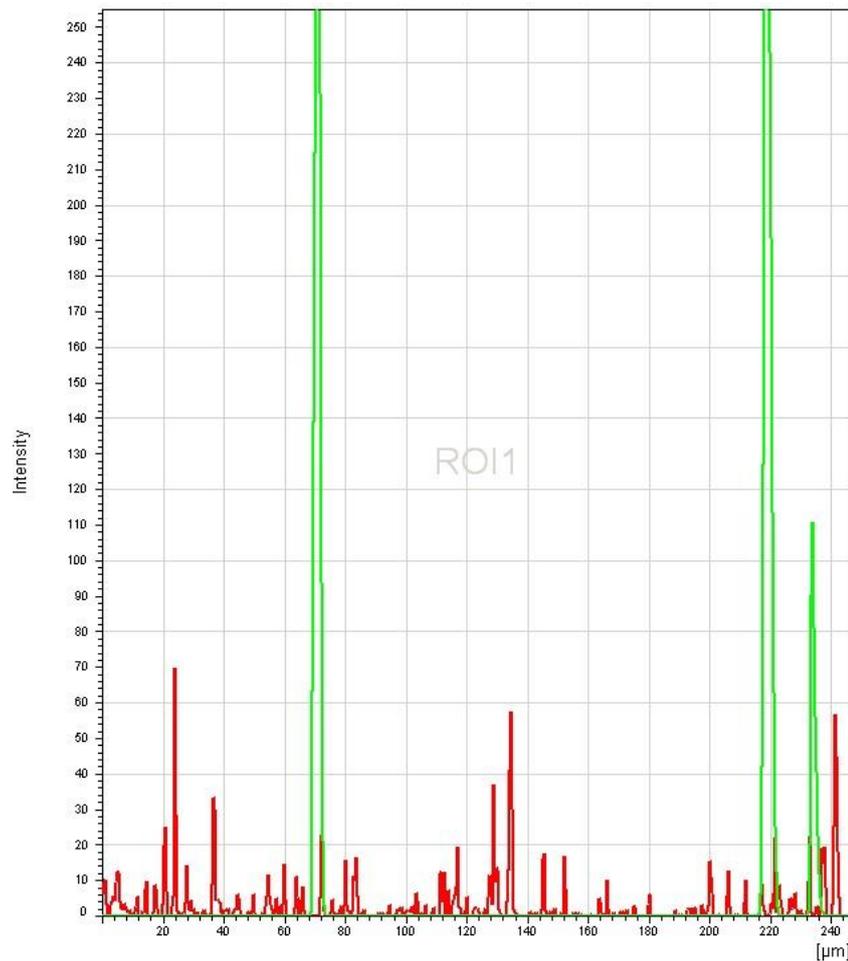
### 3.2.4 Verfettungsgrad in der confocalen Mikroskopie

Zur Detektion einer möglichen Verfettung unter Therapie mittels Botulinumneurotoxin A erfolgte nach durchgeführter NileRed Färbung eine confocale Mikroskopie. Diese konnte zeigen, dass es unter Therapie mit BoNT A zu einer im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe vermehrten Verfettung der Muskulatur kommt, welche ihr Maximum in der Versuchsgruppe der 16. Woche erreicht. Dort imponierte das Fett, welches zum Zeitpunkt der 4. und 8. Woche noch in die fibrilläre Struktur eingebettet ist, als tropfenförmig und extrafibrillär liegend. In der Stichprobe der 32. Woche glich sich der Verfettungsgrad dem der unbehandelten Kontrollen wieder an, wenngleich sich ebenfalls vereinzelt noch tropfenförmige Konfigurationen zeigten. Weiterhin kam es zur signifikant plumperen Konfiguration der Myozyten, welche sich in der Kontrollgruppe der 8. und 16. Woche ebenfalls teilweise als nicht mehr randständig erwiesen. Dieses Phänomen zeigte sich in der Kontrollgruppe der 32. Woche als regredient.

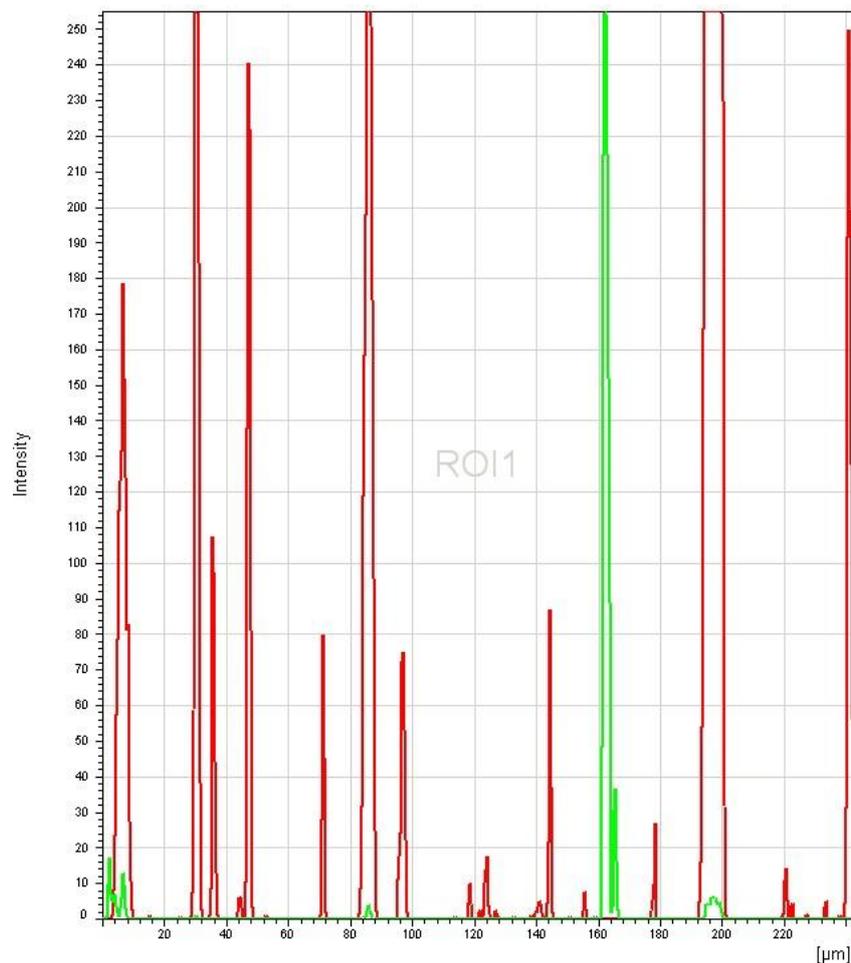




**Abb. 40: Confocal Mikroskopie über den Nachbeobachtungszeitraum von 32 Wochen:** Unter Einsatz von BoNT A zeigt sich mit p.m. in der Kontrollgruppe der 8. und 16. Woche eine plumpere Konfiguration der Myozyten sowie ein erhöhter Verfettungsgrad. Diese Erscheinungen erweisen sich bis zum Ende der Nachbeobachtungsperiode als regredient (A: 4 Wochen Kontrolle, B: 4 Wochen BoNT A, C: 8 Wochen Kontrolle, D: 8 Wochen BoNT A, E: 16 Wochen BoNT A, F: 32 Wochen BoNT A); eigene Aufnahme: Confocal Mikroskopie nach Färbung mittels Nilred/ Sytox Green.



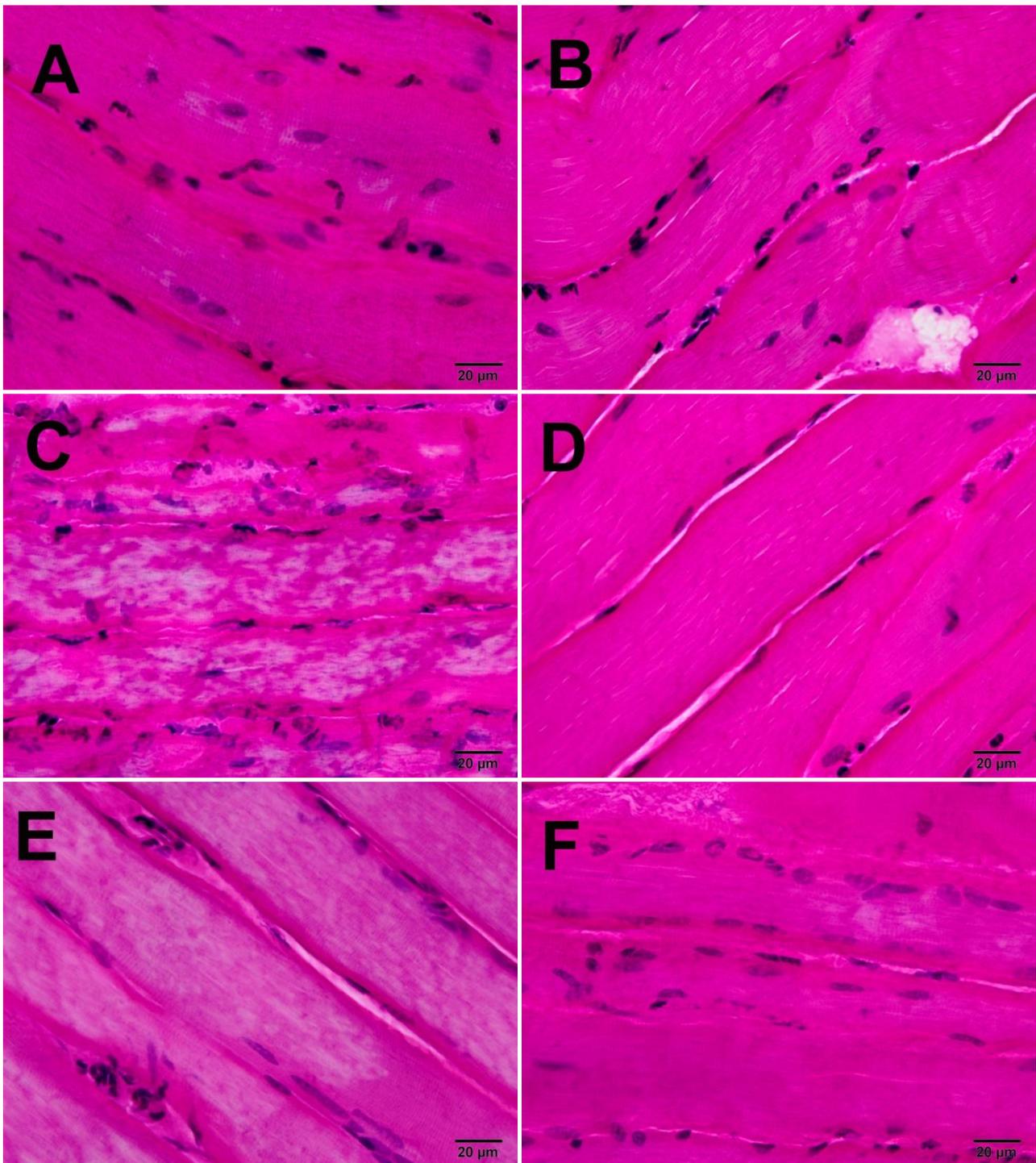
**Abb. 41: Intensitätsbestimmung der Farbanregung mittels ROI bei der 4 Wochen- Kontrolle:** Es zeigt sich eine homogen verteilte Grundanregung des Fettgewebes (rot), welcher in dieser geringen Intensität dem Normwert entspricht. Weiterhin zeigen sich die Zellkerne in hoher Intensität in ein zwei gruppierten schmalen µm-Bereichen (grün).



**Abb. 42: Intensitätsbestimmung der Farbanregung mittels ROI bei der 8- Wochen-Stichprobe:** Im Vergleich zu Abb. 41 (4 Wochen-Kontrolle) zeigt sich exemplarisch eine erhöhte Farbanregung des Spektrums für Fettinfiltration (rot) nach Färbung mit Nilered als Zeichen einer fettigen Infiltration, was auch passend zum histologischen und confocalen Bild ist.

### 3.2.5 Morphologie und Anordnung der Myozyten

Unter dem Einfluss von Botulinumneurotoxin A kam es zu Veränderungen in der Morphologie und Anordnung der Myozyten. Hierbei zeigte sich unter Einfluss von Botulinumneurotoxin A eine Veränderung der Morphologie von einer länglich, schlanken Form hin zu einer plumpen, aufgequollenen Morphologie. Teils gruppierte sich um die Myozyten eine ödematöse Komponente. Diese Erscheinung erwies sich ab der 16. Nachbeobachtungswoche als regredient.



**Abb. 43: Morphologie der Myozyten.** Unter Einfluss von Botulinumneurotoxin A zeigt sich eine aufgequollene, teils plumpere Form der Myozyten mit umgebender ödematöser Komponente. Diese Erscheinung weist zum Zeitpunkt der Plateauphase die größte Ausprägung auf und ist im Zeitverlauf regredient. (A: 4 Wochen BoNT A, B: 4 Wochen Kontrolle, C: 8 Wochen BoNT A, D: 8 Wochen Kontrolle, E: 16 Wochen BoNT A, F: 32 Wochen BoNT A); eigene Aufnahme: Färbung H.E.

### **3.2.6 Reversibilität der Veränderungen im chronologischen Verlauf**

Injektionen von Botulinumneurotoxin A führen wie unter 3.2.1 bis 3.2.5 aufgeführt zu Veränderungen der Zellmorphologie, veränderter Muskelstruktur und zunehmender Verfettung. Gemäß des Wirkungsverlaufs von Botulinumneurotoxin A erwiesen sich die Veränderungen bis zur Neusynthese von SNAP-25 nach 3 Monaten [99, 107] als regredient. So konnten sowohl histologisch als auch im Zuge der Wäageverfahren und Berechnungen maximale Abweichungen zu den Zeitpunkten der Plateauphase von Botulinumneurotoxin A gezeigt werden. Punktuell zeigten sich noch Unterschiede in der Untersuchungsgruppe der 16. Woche, was passend zu der unter 1.4.2 aufgelisteten Tatsache ist, dass bis zur Bildung von SNAP-25 die Remission der Synapse mittels kollateralem Aussprossen des Axons mit Bildung neuer Nervenendigungen erfolgt [99, 107]. In sämtlichen Untersuchungsgruppen der 32. Woche konnten sowohl morphologisch als auch immunhistochemisch keine Veränderungen zur Kontrollgruppe dargestellt werden.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Ergebnisse**

Die unter 3. aufgeführten Ergebnisse unterstützen die von uns gestellte Hypothese, dass Botulinumneurotoxin A (BoNT A) insbesondere bei der Versorgung von alten, degenerativen Rotatorenmanschettendefekten zu einer Verbesserung der Einheilung am Knochen-Sehnen-Interface führt.

#### **4.1.1 Ergebnisse Paralysegruppe**

##### **4.1.1.1 Vermehrter Anteil von Kollagen Typ I als Zeichen einer fortgeschrittenen Sehnenheilung bei präoperativer Botulinumneurotoxin A– Injektion**

Wie erwartet zeigte sich in den Gruppen der präoperativen Paralyse während des Zeitpunkts der Plateauphase höhere Koeffizienten für Kollagen I zu Kollagen III, was als fortgeschrittene Sehnenheilung zu werten ist. Maffulli et. al., welche die Kollagenproduktion an Tenozyten von unverletzten oder traumatischen Achillessehnen untersuchten, konnten zeigen, dass Tenozyten von rupturierten Achillessehnen einen höheren Anteil von Kollagen III produzieren [68, 69]. Dieses erhöhte Auftreten von Kollagen III ist, wie ebenfalls bei Eriksen et al. [68, 69] publiziert, maßgeblich in zuvor rupturiertem Sehngewebe zu finden. Erst durch Immunmodulation im Verlauf der Sehnenheilung erfolgt eine Überführung in das zugfestere Kollagen I [70]. Dass sich insbesondere bei simulierter alter und/oder degenerativer Rotatorenmanschettenruptur im Vergleich zur individuellen Kontrollgruppe (Verzicht auf präoperative selektive Paralyse) signifikante Unterschiede zeigen, ist darin begründet, dass es durch Botulinumneurotoxin A zu einer Steigerung der Expression von Kollagen I kommt [147]. Von histologischer Seite aus betrachtet ist dies als verbesserte Sehnenintegration mit zugfesterem Kollagen zu werten. Diese Tatsache stützt auch unsere Untersuchungen, welche tendenziell bei Verwendung von Botulinumneurotoxin A einen höheren Kollagen I / Kollagen III-Quotienten detektieren lassen. In wie weit sich diese Ergebnisse auch biomechanisch mittels der Detektion von erhöhten Ausreißkräften oder der Erhöhung des Viskoelastizitätskoeffizienten verifizieren lassen, ist der Dissertation von Tessa Hartl (ebenfalls Mitglied der Arbeitsgruppe) zu entnehmen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen der biomechanischen Untersuchungen (maximale Ausreißkraft, Viskoelastizitätskoeffizient) sich nur in den Gruppen mit BoNT A und spannungsreicher Naht im Vergleich zur Kontrollgruppe mit spannungsarmer Naht

signifikante Unterschiede aufzeigen lassen. Bedauerlicherweise kann, wie initial erwartet, kein signifikanter Unterschied zur individuellen Korrespondenzgruppe mit NaCl aufgezeigt werden. Wir führen diese Tatsache daraufhin zurück, dass insbesondere eine molekularbiologische Diagnostik zur Detektion der unterschiedlichen Arten von Kollagen eine höhere Sensitivität besitzt und somit Benefits im Heilungsverlauf besser aufgedeckt werden könnten.

### **4.1.1.2 Vermehrte Faserknorpelbildung bei präoperativer Botulinumneurotoxin A-Gabe**

Unter präoperativer Botulinumneurotoxin A-Gabe zeigt sich eine vermehrte Faserknorpelbildung im Bereich der Enthese, welche durch die dadurch mögliche verbesserte Verzahnung der Osteone mit einer verbesserten Zugbelastung einhergeht [83]. Passend zu dieser Tatsache ist die Erkenntnis, dass insbesondere in den Gruppen der simulierten frischen Rotatorenmanschettenruptur sich teils signifikant höhere Flächen für Kollagen II nachweisen lassen. Durch den geringeren Spannungsreichtum und die im Gegensatz zur simulierten alten Rotatorenmanschettenruptur mit einer geringeren Vorlast versehene Versorgung kann somit möglicherweise eine bessere Verzahnung der Osteone mit dem Knorpelgewebe erzielt werden. Dies ist auch passend zur Studienlage (vgl. 4.2.1.3), welche eine Vorlastzunahme am Sehnen-Knochen-Interface mit einer Abnahme der zur Re-Ruptur benötigten Kraft in Verbindung bringt [120-122]. Das hierdurch geringere Stressniveau durch eine geringere Vorspannung konnte ebenfalls von Thomopoulos et. al. [148] mit höheren Levels an Kollagen II und Aggrecan in Verbindung gebracht werden. Zu einer erhöhten Vorspannung kommt es im klinischen Alltag bei der Readaptation von großen und/ oder alten Rotatorenmanschettendefekten [120, 121, 123], denen in unserer Studie durch Erhöhung der Spannung am Knochen-Sehnen-Interface Rechnung getragen wurde. So zeigt sich primär das Spannungsreichtum der Naht ursächlich für die Ausbildung von Faserknorpel an der Enthese, welches durch Einsatz einer selektiven Paralyse bei spannungsreicherer Naht abgemildert werden konnte. Bezugnehmend auf Thomopoulos et al. [148] ist daher von einem geringeren Stressniveau am Knochen-Sehnen-Interface bei präoperativer Paralyse auszugehen. In wie weit sich diese histologisch günstige Erscheinung auch biomechanisch auswirkt, bedarf einer umfassenden Überprüfung und ist der Dissertation von Tessa Hartl zu entnehmen (analog 4.2.1.3)

#### 4.1.1.3 Höherer Ordnungsgrad beim Faserverlauf unter Botulinumneurotoxin A-Therapie

Unter Therapie mittels Botulinumneurotoxin A konnten insbesondere bei fehlender Immobilisation positive Aspekte auf den Ordnungsgrad der Kollagenfasern aufgezeigt werden. Diese Erkenntnis ist ebenfalls deckungsgleich mit der Veröffentlichung von Hettrich et. al. [72], welche ebenfalls einen gesteigerten Ordnungsgrad unter Verwendung einer selektiven Paralyse nach 4 Wochen Nachbeobachtungszeitraum berichten konnte. Die von Hettrich et. al. zum Zeitpunkt der 8-Wochen-Kontrolle nicht aufgefundenen positiven Auswirkungen der selektiven Paralyse führen wir auf die intraoperative Botulinumneurotoxingabe zurück. Der Literatur folgend ist ein Wirkungseintritt nach 24 - 48 h post injektionem mit einem Wirkmaximum zwischen dem 3 - 10. Tag zu erwarten [99, 149], sodass bei intraoperativen Gabe von keiner selektiven Paralyse ausgegangen werden muss. Eingedenk dieser positiven Auswirkungen formulierten Hettrich et. al. die Hypothese, dass intrinsische Faktoren zur Ausbildung einer Sehnenheilung und Anordnung der Fasern wichtiger erscheinen, wie die frühe mechanische Belastung. Hier setzt auch eine Veröffentlichung von Thomopoulos et. al. [148] an. Hierin werden negative Aspekte auf den Ordnungsgrad der Kollagenfasern bei erhöhter Vorlast beschrieben, weiterhin zeigte sich die Immobilisationsbehandlung überlegen. Da Thomopoulos keine selektive Paralyse durchführte, können die Methoden der selektiven Paralyse und Immobilisation mittels Gips nur eingeschränkt verglichen werden. Jedoch zeigt sich ebenfalls unter Gipsimmobilisation ein im Vergleich zur individuellen Kontrollgruppe verbesserter Faserverlauf. Somit ist es stimmig, dass sich ebenfalls in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie bei Verzicht auf Immobilisation und selektiver Paralyse in Kombination mit einer erhöhten Vorlast die geringsten Ordnungsgrade aufzeigen ließen. Ähnlich verhält sich diese Tatsache bei Betrachtung des Insertionswinkels. Auch hier konnte gezeigt werden, dass unter selektiver Paralyse sich annähernd vergleichbare Insertionswinkel wie in der unbehandelten Kontrolle zeigen. Dies legt die Tatsache nahe, dass zur verbesserten knöchernen Integration der Kollagenfasern ein besonderer Schutz des Knochen-Sehnen-Interfaces notwendig ist [148], welcher sich sowohl unter Immobilisation als auch selektiver Paralyse zeigt.

### **4.1.1.4 Keine Erhöhung der Entzündungsaktivität unter Botulinumneurotoxin A**

Unter Therapie mit Botulinumneurotoxin A zeigte sich keine Erhöhung der Entzündungsaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche ebenfalls zum Zwecke der Vergleichbarkeit eine Infiltration erhielt. Diese Tatsache beruht darauf, dass zur Infiltration ein vom Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) zugelassenes Präparat verwendet wurde, deren Entzündungspotential nicht über dem normalen Maß einer Injektion hinausgeht. Ebenfalls stimmig zeigt sich diese Erkenntnis in Anbetracht der Tatsache, dass in einer Vielzahl von Studien in den letzten 20 Jahren keine erhöhten Anzeichen von entzündlichem Geschehen *in vitro* gezeigt werden konnten [114-116]. Auch vergleichbare tierexperimentelle Studien [72, 150, 151] konnten sowohl im Tiermodell der Ratte als auch des Kaninchens keine vermehrte Entzündungsreaktion im Sinne von Abszess- oder Zystenbildung beschreiben. Eine interessante Studie von Irkoren et. al. konnte *in vivo* beim Einsatz in der plastischen Brustchirurgie zeigen, dass unter Botulinumneurotoxin A insgesamt eine verringerte Entzündungsreaktion zu detektieren ist [152], was die Ergebnisse unserer Studie stützt.

### **4.1.1.5 Abmilderung des Effekts von Botulinumneurotoxin A bei gleichzeitiger Immobilisation**

Im Vergleich zu Galatz et. al. [47] konnten bei gleichzeitiger Immobilisation und Botulinumneurotoxingabe keine positiven Auswirkungen auf das Kollagenverhältnis und die Morphologie erzielt werden. Wir führen diesen Aspekt daraufhin zurück, dass Galatz et. al. im Gegensatz zu der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie eine intraoperative Botulinumneurotoxininjektion durchführte. Daher lag die Wirkung des Botulinumneurotoxins nicht am Operationstag vor, da diese erst etwa 24 - 48 h post injektionem eintritt [99, 149] (vgl. 4.1.1.2). Die von Galatz et. al. publizierten Daten sind daher am ehesten in Kontext mit der Veröffentlichung von Gimbel et. al. [153] zu sehen, welche alleine durch die Immobilisation positive Aspekte auf die Sehnenheilung durch Verringerung des Bewegungsgrades aufzeigt. Diese Tatsache deckt sich auch mit der Erkenntnis von Galatz et. al., welche nach 3 Wochen sowohl in der Kombination Botulinumneurotoxin mit Immobilisation als auch in der korrespondierenden Kontrollgruppe eine beginnende Ordnung der Faserstruktur erkennen konnten. Dass zu diesem Zeitpunkt bei Kombination von Botulinumneurotoxin A mit Immobilisation im Vergleich zur korrespondierenden

Kontrollgruppe ein geringerer Ordnungsgrad ersichtlich war, deckt sich ebenfalls mit der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie. Hierin kommt man ebenfalls zur Erkenntnis, dass die Kombination von Immobilisation mit der Injektion von Botulinumneurotoxin, wenngleich präoperativ, insgesamt einen zu hohen Immobilisationsgrad erzielt [48]. Passend zu dieser Erkenntnis ist auch eine Veröffentlichung von Hügler et. al., welche einen mechanischen Stimulus zur Einleitung von Proliferation und Remodelingphase bei Sehnenverletzungen aufzeigt [86], welcher unter „dualer Immobilisation“ nur herabgesetzt gegeben ist.

### **4.1.2 Ergebnisse Atrophiegruppe**

Um die Auswirkungen der Botulinumneurotoxininjektion im Langzeitverlauf zu untersuchen, führten wir im Rahmen unserer Studie zu den Zeitpunkten 4, 8, 16 und 32 Wochen nach Injektion Messungen des Muskelgewichts, -volumens sowie histologische Untersuchungen hinsichtlich Zellmorphologie und Verfettungsgrad des Muskels durch.

#### **4.1.2.1 Reduktion der Muskelmasse und des -volumens im Vergleich zur Kontrollgruppe**

Wie erwartet zeigte sich ab dem 4-Wochenzeitpunkt ein geringeres Verhältnis der Muskelmasse im Bezug zum Körpergewicht bei allen mit BoNT A vorbehandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die maximale Abweichung des Verhältnisses zeigte sich nach 8 Wochen, während ab der 16. Nachbeobachtungswoche die prozentualen Verhältnisse zwischen BoNT A-Gruppe und Kontrollgruppe ausgeglichen waren. Hier zeigten sich auch ähnliche Dichtewerte, für deren Berechnung wir zusätzlich den Tieren den M. infraspinatus entnahmen. Dieser Wirkungsverlauf von Botulinumneurotoxin A zeigt sich ebenfalls bei Hettrich et. al. [72], welche ebenfalls zum Untersuchungszeitpunkt der 8. Nachbeobachtungswoche die maximale Abweichung des Muskelvolumens nach Botulinumneurotoxin A-Injektion hinsichtlich Muskelmasse und -volumen bei Sprague Dawley-Ratten aufzeigen konnte. Weiterhin war das nachfolgendem Angleichen des Gewichts und der Volumina im Zeitverlauf identisch. Verglichen mit Fortuna et al. [154] konnten wir in den nicht infiltrierte Muskel keine Massen- und Volumenveränderungen, welche wir exemplarisch an den M. infraspinatus untersuchten, feststellen. Fortuna konnte, wenngleich auch bei wiederholten Botulinumneurotoxin A-Injektionen in den M. quadrizeps femoris, ebenfalls strukturelle Veränderungen in der korrespondierenden Kniemusculatur

feststellen. Diese Tatsache scheint wohl den wiederholten Injektionen geschuldet zu sein, welche im Rahmen unserer Studie nicht angewendet wurden.

### **4.1.2.2 Signifikant höherer Verfettungsgrad unter Botulinumneurotoxin A**

Im Rahmen der mikroskopischen Analyse konnten wir ab der 8. Woche eine zunehmende Verfettung aufzeigen, welche über die 16. Woche hinausgeht. Ab der 16. Woche zeigte sich eine rückläufige Tendenz, welche sich erst ab dem Kontrollpunkt in der 32. Woche postinjektionem als reversibel erweist. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von Barton et al. [150], in deren Veröffentlichungen von keiner Fettinfiltration berichtet wird. Barton führte jedoch keine Injektion von Botulinumneurotoxin A durch, sondern induzierte eine Muskelatrophie mittels Ablösen des Supraspinatusmuskels ohne nachfolgende Reparatur. Er konnte weiterhin zeigen, dass der Supraspinatusmuskel der Ratte ein großes Regenerationspotential hinsichtlich atropher Muskelpartien besitzt. Diese von uns aufgezeigten Unterschiede scheinen auf die stattgehabte Botulinumneurotoxin A-Injektion zurückzuführen zu sein. Verglichen mit Fortuna R. et al. [151], welche die Langzeitauswirkungen von Botulinumneurotoxin A anhand 20 neuseeländischer Kaninchen mittels wiederholter Injektionen erforschte, zeigten sich in unserer Studie bereits nach einmaliger Botulinumneurotoxininjektion Zeichen der Verfettung. Möglicherweise war durch das Operationstrauma und die damit verbundenen Strukturverletzungen ein Abtransport des Botulinumneurotoxin A erst verzögert möglich. Diese Hypothese wäre passend zu unserer Datenlage, die erst den Rückgang der Verfettung ab der 16. Woche postinjektionem zeigt. Ähnliche Ergebnisse konnten Gilotra et al. [155] erzielen, welche ebenfalls unter Therapie mit Botulinumneurotoxin A bei Rotatorenmanschettenrekonstruktionen im Tiermodell des Kaninchens eine vermehrte Verfettung aufzeigen konnte. Die von unserer Arbeitsgruppe geäußerte Theorie des durch das Operationstrauma verzögerten Abtransports würde auch zur einer weiteren Studie von Fortuna R. et al. [154] passen, in der er bei monatlicher Botulinumneurotoxin A-Injektion bei Kaninchen über 6 Monate die komplette Regeneration von muskulären Veränderungen nach 6 Monaten nicht feststellen konnte. Da aber in der von uns durchgeführten Studie nur eine einmalige Injektion erfolgte, erscheint der kontinuierliche Rückgang der Verfettung bis zum dem in der unbehandelten Kontrolle ebenfalls aufgefundenen Verfettungsgrad in der 32. Wochenkontrolle als glaubwürdig. Hierbei kommt das von Barton et al. [150] publizierte

Reparationspotential atrophischer Muskelveränderungen des M. supraspinatus bei Ratten zum Tragen, welches durch die Botulinumneurotoxin A-Injektion verzögert wird.

### **4.1.2.3 Veränderung der Zellmorphologie der Myozyten zum Zeitpunkt der Plateauphase von Botulinumneurotoxin A**

Im Wirkungsverlauf von Botulinumneurotoxin A lassen sich zwischen der 8. und 16. Nachbeobachtungswoche Änderungen der Morphologie der Myozyten, hin zu einem plumperen Zellbild nachweisen. Da es sich bei Botulinumneurotoxin A um ein Neurotoxin handelt, welches primär durch Hemmung der nervalen Impulsübertragung zum Muskel [99] seine Wirkung entfaltet, ist ebenfalls von myolytischen oder reaktiven Einflüssen auf die Morphologie der Myozyten auszugehen. Passend zu dieser Hypothese ist eine Studie von Chuang et al., welche bei der Behandlung der benignen Prostatahyperplasie mit Botulinumneurotoxin A Zeichen der Apoptose in der Zellen der Prostata detektieren konnte [156]. Hier erscheint jedoch das plumpe Zellbild weniger zu dieser Hypothese passend. Bei Betrachtung der Spätkomplikationen ist ebenfalls in der Literatur eine Nekrose der Muskulatur beschrieben, was passend zum hier aufgefundenen Zellbild mit plumpen, von einer ödematösen Komponente umgebenen Myozyten ist [157]. Eine interessante Arbeit bezüglich der ödematösen Komponente wurde von Draheim [158] veröffentlicht. Hier konnten bei Patienten unter Langzeit-Botulinumneurotoxin-Therapie bei zervikaler Dystonie im Rahmen von kernspintomographischen Aufnahmen Veränderungen in den Signalintensitäten der T2-Gewichtung im Sinne einer Veränderung der Wasserverteilung aufgezeigt werden, welche ursächlich in einer peripheren Nervenläsion sind. Ein Maximum dieser Erscheinung zeigte sich im Bereich der Injektionsstelle, was auch passend zu den von uns getätigten Beobachtungen ist. Auch hier wies der Muskel im Verlauf des Nachbeobachtungsintervall keine homogene Morphologie der Myozyten auf, was oben genannter Tatsache geschuldet ist [158]. Ursächlich für das plumpe Zellbild erscheint daher eine Kombination aus den oben genannten Tatsachen, da eine entzündliche Komponente als Ursache für die Myozytenform ausgeschlossen werden kann (vgl. 4.1.1.4). Dass sich diese Erscheinungen sukzessive bis zur 32. Woche des Nachbeobachtungszeitraums regredient zeigt, ist ursächlich im Wirkungsverlauf von Botulinumneurotoxin A (vgl. 4.1.2.4).

#### **4.1.2.4 Regeneration und Reversibilität der durch Botulinumneurotoxin A verursachten morphologischen Veränderungen**

Wie unter 3.2.5 aufgeführt zeigt sich über den gesamten Nachbeobachtungszeitraum von 32 Wochen eine komplette Remission der durch das Botulinumneurotoxin A verursachten Veränderungen. Diese ist stimmig mit dem Wirkungsverlauf von Botulinumneurotoxin A [99, 149] bei Anwendung im Menschen. Weiterhin deckt sich dieses Erkenntnis mit der von Barton et. al. publizierten Erkenntnis, dass im Tiermodell der Ratte ein hohes Regenerationspotential bei atrophischen Verletzungen vorliegt [150]. Kontrastiert wird diese Studie von einer Veröffentlichung von Mathewson et al. [159], welche nach einmaliger Injektion von Botulinumneurotoxin A in den M. tibialis anterior bei Sprague Dawley-Ratten die Veränderungen bei Transkription innerhalb 3 Monaten als regredient zeigen konnte. Jedoch zeigte sich ein Muskelfunktionsdefizit für bis zu einer Zeitdauer von einem Jahr. Diese Studie bekräftigt die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen, welche ebenfalls bei einmaliger Botulinumneurotoxin A-Injektion das Maximum morphologischer Veränderungen im Zeitfenster von 4. bis 8. Woche post iniektionem aufzeigten konnte. Eine Aussage hinsichtlich der Muskelfunktion lässt sich jedoch in unseren Untersuchungen nur indirekt treffen, da keine Messung der Muskelfunktion durchgeführt wurde. Während der Käfighaltung zeigten die Ratten jedoch keine Veränderungen hinsichtlich Bewegungsmuster und Änderungen bei der Nahrungsaufnahme. Auch eine kompensatorische Hypertrophie der nicht infiltrierten korrespondierenden Muskulatur, wie bei Fortuna et al. [154] beschrieben, konnte nicht nachgewiesen werden (siehe 3.2.1). Diese Tatsache ist auf die im Gegensatz zu Fortuna et al. nur einmalig durchgeführte Botulinumneurotoxininjektion zurückzuführen.

## **4.2 Diskussion der Methoden**

### **4.2.1 Diskussion Paralysegruppe**

#### **4.2.1.1 Sprague Dawley-Ratte als etabliertes Modell für die Rotatorenmanschette**

Die Sprague Dawley- Ratte gilt als etabliertes Modell für die Rotatorenmanschette. Basierend auf Untersuchungen von Soslowsky et. al. [160] und Derwin et. al. [161] konnte lediglich bei Ratten eine annähernde Ähnlichkeit hinsichtlich des Verlaufs der Supraspinatussehne im coracoacromialen Bogen nachgewiesen werden. Weiterhin zeigen Ratten trotz des Vierbeingangs im Bezug auf das Bewegungsmuster beim Gangbild ein

vergleichbare Anatomie. Durch mehrmaliges Passieren der Sehne des M. supraspinatus durch das Acromion wird die im menschlichen Organismus bestehende vermehrte Belastung des M. supraspinatus auf Grund der anatomischen Konzeption gut simuliert. Ebenfalls konnte im Rattenmodell sowohl die Simulation einer akuten als auch einer degenerativen Rotatorenmanschettenruptur, hervorgerufen durch die vermehrten Belastungen im Rahmen einer subacromialen Kompression des Sehngewebes, gezeigt werden. Abgesehen von den anatomischen Übereinstimmungen ist zu beachten, dass der Heilungsverlauf bei Ratten einerseits stark beschleunigt, andererseits das Ausbilden einer fettig-degenerativen Komponente, wie bei Menschen ersichtlich [162,163] nur insuffizient abgebildet werden kann. Hierzu sollten Tiermodelle wie die eines Kaninchens oder besser eines Schafes gewählt werden [164], denn in Ratten zeigt sich eine Reversibilität der Atrophie [72]. Da im Rahmen dieser Studie an gesunden Tieren ein artifizier Defekt an der Rotatorenmanschette gesetzt wurde und dieser in selber Sitzung einer Rekonstruktion erfuhr, wurde der anatomischen Übereinstimmung eine höhere Priorität eingeräumt. Diese Prioritätensetzung deckt sich ebenfalls mit den Studien von Hettrich et. al. [72], welche einen vergleichbaren Versuchsaufbau etablierten und ebenfalls Sprague Dawley-Ratten verwendeten. Weiterhin ist ein beachtenswerter Aspekt, um den Grundsätzen von Tierversuchsanträgen zu folgen, grundsätzlich "niedere" Organismen einzusetzen. Im Vergleich zu Primaten, welche hinsichtlich Anatomie und Funktionalität der Rotatorenmanschette denen von Menschen noch näher kommen, wird die Sprague Dawley-Ratte als ein mit den Tierversuchsvorschriften konformer Versuchsorganismus eingestuft. Ebenfalls ist die Haltung von Ratten erleichtert und im Rahmen diverser Tierversuche gerade in Hinblick auf die Versorgung von Rotatorenmanschettendefekten und deren Nachbehandlung bestens etabliert. So wählten u. a. Peltz et. al. [127], Buchmann et. al. [128], Hettrich et. al. [72] oder Ficklscherer et. al. [48] diesen Versuchsorganismus.

### **4.2.1.2 Injektionszeitpunkt und Dosierung von Botulinumneurotoxin A**

Inspiziert von zwei bisher veröffentlichten Studien, welche unter selektiver Paralyse Sehnennähte an der Achillessehne (Ma et. al. [126]) bzw. wie ebenfalls der Dissertation zu Grunde liegend, den Einfluss der selektiven Paralyse bei Rotatorenmanschettenrekonstruktionen (Galatz et. al. [47]) mittels intraoperativer Gabe

von Botulinumneurotoxin A untersuchten, stellt sich die Frage nach einem optimalen Injektionszeitpunkt des Präparats. Der Literatur folgend ist ein Wirkungseintritt nach 24 - 48 h post iniektionem mit einem Wirkmaximum zwischen dem 3 - 10. Tag zu erwarten [99, 149]. Somit ist bei intraoperativer Gabe von keiner selektiven Paralyse zum Operationszeitpunkt auszugehen. Aus diesem Grund ist die präoperative Injektion, wie sie im Rahmen der dieser Dissertation zu Grunde liegenden Veröffentlichungen durchgeführt wurde, gerade in Hinblick auf die Aussagekraft der Verkürzung der postoperativen Immobilisation sowie der spannungsarmen Reinsertion der Sehne als korrekt zu werten. Da die Injektion 7 Tage vor der Operation durchgeführt wurde bestand spätestens nach Beendigung der Immobilisationsphase am 2. postoperativen Tag ein maximaler Botulinumneurotoxinschutz (vgl. 2.1.5). Dieser ist in den Veröffentlichungen von Ma et. al. [126] und Galatz et. al. [47] anzuzweifeln. Diese Erkenntnis deckt sich auch mit einer weiteren Veröffentlichung von Ma et. al., in der der volle Wirkungseintritt von Botulinumneurotoxin A ca. eine Woche post iniektionem postuliert wird [165]. Bei Galatz et. al. [47] steht weiterhin die nach Literatur [166] um ca. ein Drittel zu hoch gewählte Botulinumneurotoxin A-Dosis zur Diskussion, so dass die Aussagekraft dieser Studien zu hinterfragen ist. Laut Literatur ist ebenfalls die Botulinumneurotoxinwirkung nur abhängig von der Dosierung und nicht von Volumen und Konzentration, sodass auch hier systematische Fehler in der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Studie ausgeschlossen werden konnten [167].

### **4.2.1.3 Operationsmethode**

Nach Soslowsky et. al. [160] stellt die Ratte unter anatomischen Gesichtspunkten betrachtet, einen im Vergleich zu anderen Spezies äußerst geeigneten Organismus dar (vgl. 4.1.1.1). Aufgrund der geringen Größe und der dadurch kaum möglichen minimal-invasiven Operationsmöglichkeit wurde ein offenes Verfahren mittels Delta-Split gewählt, welches ebenfalls bei der Versorgung von irreparablen Rotatorenmanschettenrupturen zur Anwendung kommt [44]. Weiterhin erweist sich dieser Zugang neben dem deltoideo-pectoralen Zugang als einer der etablierten Zugänge für die Versorgung von proximalen Humerusfrakturen. Wenngleich in den letzten Jahren durch die Verbesserung von Ankertechniken bei geringerer Invasivität durch arthroskopische Verfahren ähnlich gute Ergebnisse wie bei offenen Verfahren erzielt werden konnten [40-42], zählt nach wie vor bei

knochennahen Defekten, insbesondere bei Begleitverletzungen am proximalen Humerus die offene transossäre Refixation der Sehne zu den Standardverfahren in der operativen Orthopädie und Unfallchirurgie [168]. Selbiger Zugangsweg wurde auch im Rahmen der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Studie durchgeführt. Die dabei verwendete Mason-Allen-Naht wird ebenfalls in chirurgischen Standardwerken empfohlen [168] und zeigte sich im Vergleich mit Nahttechniken wie Kleinert [169], Kessler, Mac oder Bunnell gerade bei der Versorgung von Rotatorenmanschettennähten vorteilhaft [170]. Im Vergleich mit ähnlichen Studien, welche allesamt Eingriffe an der Rotatorenmanschette an Ratten durchführten, zeigt sich u.a. bei Hettrich et. al. [72] ebenfalls die Verwendung eines Zugangswegs via Delta-Split. Auch die Nahttechnik mit Mason-Allen ist identisch, so dass auch im Literaturvergleich und in Anbetracht der Übersichtlichkeit vorliegendes Operationsverfahren eine hohe Aussagekraft und Übertragbarkeit liefert. Angemerkt sollte werden, dass keine Untersuchungen am M. deltoideus durchgeführt wurden, sich jedoch die Ratten im Verlauf der Käfighaltung hinsichtlich des Gangbildes als nicht auffällig präsentierten. Auch der makroskopische Aspekt bei der Entnahme des M. supraspinatus 8 Wochen postoperativ zeigte keine auffällige Muskelstruktur des M. deltoideus im Sinne einer Degeneration. Auch die Immobilisationsmethode ist wissenschaftlich etabliert und in vergleichbaren Veröffentlichungen aufgeführt [47, 72, 125, 126]. Im Vergleich zu Gimbel et al. [125] und Galatz et. al. [47] führten wir jedoch nur eine postoperative Immobilisation für wenige Tage anstatt für bis zu 8 Wochen, was dem Zeitpunkt einer kompletten Ausheilung der Ruptur entspricht, durch. Etwaige sich daraus ergebenden Veränderungen sind dem Diskussionsteil der Ergebnisse zu entnehmen. Anzumerken ist hier jedoch, dass gerade in Hinblick der verlängerten Immobilisation bei Sprague Dawley-Ratten in der Literatur Veränderungen des Kollagen I/ Kollagen III - Koeffizienten beschrieben sind. Hier zeigt sich eine vermehrte Bildung des Kollagen III, insbesondere am Kapsel-Band-Apparat, so dass bei länger dauernder Immobilisation dieser Auswertungsparameter möglicherweise verfälscht ist [171].

#### **4.2.1.4 Tötungszeitpunkt**

Wie bereits unter 4.1.1.1 aufgezeigt, zeigt sich der Heilungsverlauf im Tiermodell der Ratte als beschleunigt [72, 162, 163], daher stellt sich die Frage nach dem optimalen Nachbeobachtungszeitpunkt. Verglichen mit Hettrich et. al. [72], welche eine

Nachuntersuchung nach 4, 8 und 24 Wochen post injektionem durchführten, entschieden wir uns, den Ergebnissen von Hettrich et. al. folgend und eingedenk des in dieser Studie nicht optimal gewählten Injektionstermins von Botulinumneurotoxin A (vgl. 4.1.1.2) für einen Nachbeobachtungszeitraum von 8 Wochen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Sehnenheilung in Ratten weitestgehend abgeschlossen und noch kein komplettes Abflauen der Wirkung des Botulinumneurotoxin A beschrieben, wie Hettrich et. al. selbst veröffentlichten und was sich ebenfalls mit Shen et. al. [172] deckt. Galatz et. al. konnte ebenfalls bei intraoperativer Botulinumneurotoxingabe zwischen der 3. und 8. Nachbeobachtungswoche nur Unterschiede in Bezug auf die stattgehabte Immobilisation nach Rotatorenmanschettenrekonstruktion im Tiermodell der Ratte nachweisen, was unserer Meinung nach im verspäteten Applikationszeitpunkt des Botulinumneurotoxins begründet ist. In einer weiteren Studie, wenn gleich nicht an der Rotatorenmanschette von Ratten konnten Ma et. al. [126] bei Achillessehnennaht bereits 3 Wochen nach erfolgter Botulinumneurotoxininjektion signifikante Unterschiede in der Biomechanik im Sinne einer erhöhten Ausreißkraft nachweisen. So bietet sich wohl ein Zeitfenster zwischen der 3. und 8. Woche. Bei exaktem Injektionszeitpunkt und exakter Dosierung (vgl. 4.1.1.2) lässt sich nach Literaturrecherche zum Zeitpunkt der 8. postoperativen Woche wohl die größte Signifikanz erwarten.

### **4.2.2 Diskussion Atrophiegruppe**

#### **4.2.2.1 Sprague Dawley-Ratte als etabliertes Modell in der Botulinumneurotoxintherapie**

Wie bereits unter 4.1.1.1 aufgeführt, stellt die Ratte das etablierte Modell für die Rotatorenmanschette dar, da sich unter morphologischen Gesichtspunkten hohe Ähnlichkeit mit der der Menschen aufweist, jedoch erweisen sie sich bei der Detektion von Atrophie und Verfettung Nachteile gegenüber Kaninchen oder Schafen [72,163]. Da es jedoch im Rahmen der dieser Dissertation zu Grunde liegenden Studie galt, ausschließlich die Reversibilität der Auswirkungen der Botulinumneurotoxingabe im Kontext der Rotatorenmanschettenrekonstruktion zu beurteilen und in Anbetracht vorliegend ähnlicher Veröffentlichungen [47, 126] wurde als Versuchsorganismus ebenfalls die Sprague Dawley-Ratte gewählt. Verglichen mit Ma et. al. [126] und Galatz et. al. [47] führten wir eine Nachbeobachtung über die 24. Woche hinaus durch, um strukturelle morphologische

Veränderungen über den Wirkungsbereich von Botulinumneurotoxin A, welcher 4 - 6 Monate umfasst [126], detektieren zu können. Hinsichtlich der Auswertekriterien lässt sich oben genannte Studie am ehesten mit der von Fortuna et. al. [151] vergleichen, wenngleich hier eine repetitive Botulinumneurotoxin A-Gabe durchgeführt wurde. Weiterhin wurden als Versuchsorganismus Kaninchen gewählt wurden, welche wie bereits erwähnt, sich besser zur Detektion atrophischer Veränderungen eignen. Im Kaninchen hätte auch das von Barton et al. [150] beschriebene Reparationspotential atrophischer Muskelveränderungen im Tiermodell der Ratte abgemildert werden können, so dass zu hinterfragen ist, ob noch exaktere Ergebnisse in einem anderen Tiermodell erzielt werden könnten (vgl. 4.1.1.1).

### **4.2.2.2 Signifikanz der Wägemethode**

Die Aussagekraft und Exaktheit der Wägemethode ist primär von einer exakten Präparation abhängig, daher wurden sämtliche hier zu Grunde liegenden Präparationsschritte von einer Person ausgeführt. Ebenso erfolgte die Wägung an einer Präzisionswaage mit Ablesbarkeiten von 0,1mg (Sartorius Histolabor) unter identischen Luftdruck- und Temperaturbedingungen, so dass auch kleinste Gewichtsunterschiede detektiert werden konnten. Ähnliche Wägemethoden wurden bereits von Hettrich et. al. [72] ebenfalls an Muskelpräparaten der Ratte durchgeführt. So stellt sich als limitierender Faktor für die Aussagekraft primär das Präparationsverfahren, welches durch obengenannte Tatsache in allen Versuchsgruppen identisch war. Weiterhin ist anzumerken, dass hier eine prozentuale Messung zum Tötungsgewicht erfolgte und somit durch die Waage bedingte konstante Messfehler sich nicht auf das Ergebnis auswirken.

### **4.2.2.3 Signifikanz der Volumenverdrängung**

Ähnlich wie bei der Wägemethode zeigt sich bei der Volumenverdrängung ebenfalls eine primäre Fehlerquelle in der Präparationsmethode, welche durch die unter 4.1.2.2 genannten Tatsachen abgemildert wurde. Verglichen mit Hettrich et. al. [72], welche zur Volumenmessung einen Messzylinder verwendeten, wurden in der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Studie für eine noch exaktere Messung eine mit Flüssigkeit gefüllte Insulinspritze mit Maximalvolumen von 1ml gewählt. Dabei gilt anzumerken, dass das Prinzip der Volumenmessung durch Wasserverdrängung ebenfalls im medizinischen Bereich der Angiologie praktische Relevanz hat [173]. Weiterhin wurde vor Messung eine Rehydratation

des Muskels in isotoner Kochsalzlösung durchgeführt. Hierdurch kann eine Rehydratation und somit ein Volumenverlust der vorbestehenden Messflüssigkeit verhindert werden, was ebenfalls bei Hettrich et. al. [72] nicht beschrieben ist und nach unserer Meinung die Messgenauigkeit beeinflusst. Somit kann die hier gewählte Methode sowohl als wissenschaftlich und medizinisch etabliert bezeichnet werden, andererseits wurde durch Optimierung der Messbedingungen eine hohe Aussagekraft und Signifikanz erzielt.

### 5 Zusammenfassung

Alte, degenerative Rotatorenmanschettenrupturen erweisen sich nach wie vor schwierig in der Versorgung, da sie ein hohes Rerupturpotential aufweisen. Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf den Erfahrungen in der konservativen Orthopädie zu untersuchen, ob durch präoperative selektive Paralyse sich positive Auswirkungen auf die knöcherne Sehnenreintegration erzielen lassen. Weiterhin stellte sich die Frage, ob mittels Botulinumneurotoxin A als Neoadjuvant sich die Immobilitätsphase nach Rotatorenmanschettenrekonstruktion verkürzen lässt. Im Rahmen der durchgeführten Studien konnten wir zeigen, dass sowohl durch die Injektion als auch durch Immobilisation mittels zirkulärem Gips oder der Kombination aus beiden Verfahren es während der Käfighaltung zu keinen Veränderungen im Sozialverhalten oder Körpergewicht kam. Hinsichtlich der Versorgung erwiesen sich in Bezug auf das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III im Bereich der Enthese, was als Zeichen einer fortgeschrittenen Sehnenheilung gewertet wird (vgl. 1.3.2), bei simulierter frischer Rotatorenmanschettenruptur Immobilisation als auch selektiver Paralyse weitestgehend identisch. Grundsätzlich konnte das Problem der insuffizienten Versorgung von alten, degenerativen Rotatorenmanschettendefekten auch im Tiermodell aufgezeigt werden. Alle Versuchsgruppen mit simulierter alter Rotatorenmanschettenruptur schnitten schlechter als die simulierte frische Rotatorenmanschettenruptur ab. Jedoch zeigten sich unter selektiver Paralyse bei gleichzeitigem Fehlen einer Immobilisation Vorteile in Bezug auf das Kollagenverhältnis. Es kann daher gefolgert werden, dass die Kombination von Immobilisation und Paralyse insgesamt einen zu hohen Grad an Bewegungseinschränkungen aufweist. Hierdurch ist ein nur insuffizienter mechanischer Stimulus, dessen Vorhandensein eine wichtige Eigenschaft bei der Einleitung von Proliferation und Remodelingphase darstellt, vorhanden [86]. Diese Erkenntnis deckt sich auch mit der von uns erhobenen Datenlage. Innerhalb der Versuchsgruppen bei gleichzeitiger Verwendung von Immobilisation und Paralyse zeigte sich sowohl das Ausmaß von Kollagen II im Bereich der Enthese als Zeichen einer verbesserten Sehnenreintegration und erhöhter Widerstandsfähigkeit auf Zugbelastungen als auch die Sehne in Bezug auf Durchmesser und Querschnittsfläche verringert. Unter polarisationsmikroskopischer Betrachtung konnte generell bei Verwendung von selektiver Paralyse im Vergleich zur individuellen Kontrollgruppe ein geordneter Faserverlauf sowie ein näher an der unbehandelten Kontrollgruppe liegender Insertionswinkel der Kollagenfasern detektiert werden. Zellmorphologisch konnte im Bereich des

Sehnengewebes kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Morphologie der Teno- oder Chondrozyten oder des vermehrten Einsprossens von Blutgefäßen oder Vorhandensein von Entzündungszellen aufgezeigt werden. Es ist davon auszugehen, dass die Therapie mittels Botulinumneurotoxin A im Bereich der Enthese zu keinen strukturellen Veränderungen führt. Zur Detektion von morphologischen Veränderungen im Zeitintervall erfolgte eine Langzeitstudie mit besonderem Focus auf die Muskelstruktur. Hier konnte wie erwartet ein im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigtes Muskelgewicht und -volumen nach Therapie mit Botulinumneurotoxin A aufgezeigt werden. Diese Erscheinung ist auf die Atrophie des Muskelgewebes mit nachfolgender fettiger Infiltration zurückzuführen. Ebenfalls konnten, bedingt durch die toxische Wirkung von BoNT A plumpe Myozyten sowie geringgradig verringerte Fibrillendurchmesser detektiert werden. Diese zeigten sich im Verlauf der 8. bis 16. Nachbeobachtungswoche in rückläufiger Tendenz, sowie ab der 32. Woche als vollständig reversibel. Fibröse Muskelstrukturen konnten bei einmaliger Infiltration nicht aufgezeigt werden.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass die präoperative selektive Paralyse ein Neoadjuvant in der Versorgung alter degenerativer Rotatorenmanschettendefekte darstellen könnte. Unter der Prämisse des korrekten Infiltrationszeitpunkts und der Dosierung kann, wenngleich auch im Rahmen der tierexperimentellen Einschränkungen, gezeigt werden, dass mittels selektiver Paralyse die Immobilitätsphase bei weitestgehend identischem Outcome verkürzt werden könnte. Die in der Literatur beschriebene Muskelfibrose zeigt sich nach unseren Untersuchungen wohl erst bei wiederholter Infiltration, wenngleich ebenfalls morphologische Veränderungen, welche sich jedoch reversibel zeigten, detektiert werden konnten. Da die von uns gewählte Operationsmethode jedoch nur eine einmalige Infiltration vorsieht, ist dieser Aspekt zu vernachlässigen. Besonders interessant erscheint uns diese Versorgungsmethode bei alten, degenerativen Rotatorenmanschettenrupturen. Wenngleich nur simuliert im Tiermodell, erzielten diese im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe im Rahmen der gewählten Versuchsparameter bessere Ergebnisse. Weiterhin bietet der Verzicht bzw. die Verkürzung der Immobilisationsphase Vorteile für die Compliance des Patienten und ermöglicht ebenfalls eine Versorgung im Patientenkollektiv mit herabgesetzter Compliance [117]. In welcher Form die Immobilitätsphase im Rahmen dieser Studie überhaupt ursächlich für die Ergebnisse ist, lässt sich auch im Vergleich mit vergleichbaren Veröffentlichungen schwer sagen. Diese Studien wiesen allesamt Immobilitätsphasen von mehr als 7 Tagen auf, während in der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Studie eine Immobilisation mittels

zirkulärem Gips bis zum 2. postoperativen Tag stattfand. Bis zu diesem Zeitpunkt liegt jedoch bei der Sehnenheilung nur die inflammatorische Phase vor, ein Remodeling, welches mit dem Koeffizienten von Kollagen I zu Kollagen III als Hauptuntersuchungsparameter im Rahmen dieser Studie untersucht wurde, hat bis zu diesem Zeitpunkt in keinster Weise begonnen.

## **6      Ausblick**

Laut Meinung unserer Arbeitsgruppe könnte der Einsatz von Botulinumneurotoxin A ein wichtiges Neoadjuvans bei der Versorgung von alten degenerativen Rotatorenmanschettendefekten darstellen. Unter der Prämisse der zeitlich exakten Applikation und richtigen Dosierung, könnte hierin ein Schlüssel zur Verringerung der Vorlast liegen und somit eine spannungsärmere Versorgung von alten und degenerativen Rotatorenmanschettendefekten möglich sein. Da maßgeblich der Spannungsreichtum am Knochen-Sehnen-Interface für die Rerupturrate verantwortlich ist, ist möglicherweise hierdurch eine Reduktion zu erzielen. Das Tiermodell der Ratte kann jedoch nur eingeschränkt eine alte, degenerative Rotatorenmanschettenruptur simulieren (vgl. 4.1.1.1), da die fettig - degenerative Komponente fehlt. Für die Zukunft ist es daher sinnvoll, ähnliche Versuche im Tiermodell des Kaninchens durchzuführen, um noch aussagekräftigere Daten zu erzielen. Weiterhin erscheint es uns möglich, dass durch spezielle Präparationstechniken des Footprints wie Anbohrungen, dem Einsatz von Stammzellen oder Tissue engineering in Kombination mit selektiver Paralyse sich die Ergebnisse noch optimieren lassen. Ebenfalls bietet sich diese Versorgungstechnik bei Achillessehnenrupturen an, wie bereits publiziert wurde. Nach Meinung unserer Arbeitsgruppe wäre ein Einsatz auch bei Sehnen- und Bandplastiken denkbar, um dort eine Verkürzung der generellen Immobilitätsphase zu erzielen und selektiv die affektierte Muskulatur "immobilisieren" zu können. Hierzu bietet sich ebenfalls bei frischen Sehnenverletzungen ein Potential für die selektive Paralyse, da eine generelle Immobilisation nur bis zum Wirkungseintritt des Botulinumneurotoxin A zu erfolgen hätte [117].

Aufgrund der demographischen Entwicklung, der hohen Inzidenz von Rotatorenmanschettentraktionen sowie dem unspezifischen Einsatz sehen wir großes Potential im Einsatz von selektiver Paralyse. Da hier keine Compliance des Patienten beim Tragen der Orthese vorausgesetzt werden muss, bieten sich somit adäquate Versorgungsmöglichkeiten für Bevölkerungsgruppen mit nachweislich herabgesetzter Compliance wie z. B. Patienten mit dementiellem Syndrom. Nicht zu vernachlässigen ist die in der Literatur publizierte analgetische Wirkung von Botulinumneurotoxin A, welche ebenfalls einen positiven Aspekt bei der physiotherapeutischen Nachbehandlung zeigen wird. In wieweit sich durch selektive Paralyse eine spannungsärmere Reinsertion und Versorgung erzielen lässt, welche die

Möglichkeiten einer minimal-invasiven Versorgung erhöht, sollte in nachfolgenden Studien geklärt werden.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Symbol	
%	Prozent
° C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AG	Aktiengesellschaft
AK	Antikörper
Aqua	Wasser
B	Botox
BfArM	Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte
BoNT A	Botulinumneurotoxin A
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAB	Diaminobenzidin
Dest.	Destilliert
Dipl.-Ing.	Diplomingenieur
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dr.	Doktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fa.	Firma
FACR	Fellow of the American College of Radiology
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
<i>FRCR</i>	Fellow of the Royal College of Radiologists
g	Gramm
Gimp 2	GNU Image Manipulation Program
h	Stunde
h. c.	honoris causa
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
I	Immobilisation mittels Cast
i.p.	intraperitoneal
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
kDa	Kilodalton (Molekulargewicht)
KGW	Körpergewicht
m	Männlich
M.	Muskulus
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter

Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
Nr	Nummer
o. g.	oben genannt
oB	ohne Botox (NaCl)
ol	ohne Immobilisationsbehandlung
OP	Operation
oS	Spannungsarme Naht
PBS	phosphat buffred saline
PD	Privatdozent
PGE2	Prostaglandin E2
PIER	Protein Induced Epitope Retrieval
PMT	photomultiplier tube
Prof.	Professor
S	spannungsreiche Naht
S.	Seite
s.	Siehe
sec	Sekunde
SNAP-25	Synaptosomal-associated protein 25
SST	Simple-Shoulder-Test
SV2	synaptisches Vesikelprotein 2
Tab.	Tabelle
U	Unit
UCLA	University of California at Los Angeles
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

## 8. Literaturverzeichnis

1. Clayton RA, Court-Brown CM. The epidemiology of musculoskeletal tendinous and ligamentous injuries. *Injury* 2008 Dec;39(12):1338-44.
2. Sher JS, Uribe JW, Posada A, et al. 1995. Abnormal findings on magnetic resonance images of asymptomatic shoulders. *J Bone Joint Surg Am* 77:10–15.
3. Cheung EV, Silverio L, Sperling JW. Strategies in biologic augmentation of rotator cuff repair: A review. *Clin Orthop Relat Res* 2010. 468:1476–1484.
4. <http://flexikon.doccheck.com/de/Rotatorenmanschette>, aufgerufen am 25.03.2015
5. Karduna AR, Williams GR, Williams JL, Iannotti JP, Kinematics of the glenohumeral joint: influences of muscle forces, ligamentous constraints, and articular geometry. *J Orthop Res* 1996. Nov;14(6): p. 986-93.
6. Rodosky MW, Harner CD, Fu FH. The role of the long head of the biceps muscle and superior glenoid labrum in anterior stability of the shoulder. *Am J Sports Med* 1994 Jan;22(1):121-30
7. Putz R, Papst R, Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen, 22. Auflage, Urban und Fischer, München, 2007
8. Hawkins RJ, Morin WD, Bonutti PM. Surgical treatment of full-thickness rotator cuff tears in patients 40 years of age or younger. *J Shoulder Elbow Surg* 1999 May;8(3):259-65.
9. Fukuda H. Partial-Thickness Rotator Cuff Tears: A Modern View on Codman's Classic. *J Shoulder Elbow Surg*, 2000. 9(2): p. 163-8.
10. Habermeyer P, Lichtenberg S, Magosch P: Rotatorenmanschettenruptur und Schulterinstabilität. in: *Arthroskopie*. Vol. 20, Nr. 3, 2007, S. 217–222, doi:10.1007/s00142-007-0405-3
11. Liem D, Buschmann VE, Schmidt C, Gosheger G, Vogler T, Schulte TL, Balke M. The Prevalence of Rotator Cuff Tears: Is the Contralateral Shoulder at Risk? *Am J Sports Med*. 2014 Feb 5. [Epub ahead of print]
12. Economopoulos KJ, Brockmeier SF. Rotator cuff tears in overhead athletes. *Clin Sports Med*. 2012 Oct;31(4):675-92. doi: 10.1016/j.csm.2012.07.005.
13. Payne LZ, Altchek DW, Craig EV, and Warren RF, Arthroscopic Treatment of Partial Rotator Cuff Tears in Young Athletes. A Preliminary Report. *Am J Sports Med*, 1997. 25(3): p. 299-305.
14. Khan Y, Nagy MT, Malal J, Waseem M. The painful shoulder: shoulder impingement syndrome. *Open Orthop J*. 2013 Sep 6;7:347-51. doi: 10.2174/1874325001307010347. eCollection 2013.
15. Uthoff H, Sano H. Pathology of Failure of the Rotator Cuff Tendon. *Orh Clin North Am*, 1997. 28: p. 31-41.
16. Refior HJ, Krödel A, Melzer C. Examinations of the pathology of the rotator cuff. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1987;106(5):301-8.
17. von Salis-Soglio: [http://www.gaertner-servatius.de/krankheiten/rotatorenmanschettenruptur\\_leitlinien.pdf](http://www.gaertner-servatius.de/krankheiten/rotatorenmanschettenruptur_leitlinien.pdf), aufgerufen 10.09.2014
18. Fukuda H, Hamada K, Najajima T, Tomonaga A. Pathology and Pathogenesis of Intratendinous Tearing of the Rotator Cuff Viewed on a Bloc of Histologic Section. *Clin Orthop Rel Res*, 1990. 254: p. 60-67.
19. Bigliani L, Morrison D, April E. Morphology of the Acromion an its Relationship to Rotator Cuff Tears. *Orthop Trans*, 1986. 10: p. 228.
20. Judge A, Murphy RJ, Maxwell R, Arden NK, Carr AJ. Temporal trends and geographical variation in the use of subacromial decompression and rotator cuff repair of the shoulder in England. *Bone Joint J*. 2014 Jan;96(1):70-4. doi: 10.1302/0301-620X.96B1.32556.
21. Biberthaler P, Wiedemann E, Nerlich A, Kettler M, Mussack T, Deckelmann S, Mutschler W. Microcirculation associated with degenerative rotator cuff lesions. *J Bone Joint surg A* 85 (3):475-480
22. Codman EA. *The Shoulder: Rupture of the Supraspinatus Tendon and Other Lesions in or about the Subacromial Bursa*. Thomas Todd Co. Boston:.. 1934.

23. Karas V, Wang VM, Dhawan A, Cole BJ. Biomechanical factors in rotator cuff pathology. *Sports Med Arthrosc* 2011; 19:202-206
24. Echtermeyer et al. *Praxisbuch Schulter*, Thieme Verlag, Stuttgart, 2004
25. Habermeyer P, Magosch P, Lichtenberg S. *Classification and Scores of the Shoulder*, 2006, XV, 297 p., Softcover
26. Neer CS. Impingement lesions. *Clin Orthop Relat Res* 1983 Mar;(173):70-7.
27. Jerosch J, Heisel J, Imhoff AB. *Fortbildung Orthopädie & Traumatologie* 8, Steinkoff, Darmstadt, S. 125f.
28. Ellman H, Gartsman GM. Treatment of partial thickness rotator cuff tear: arthroscopic and mini-open. in: Ellmann H, Gartsman GM (eds) *Arthroscopic shoulder surgery and related procedures*. Lea & Febiger, Philadelphia 1993
29. Millstein ES, Snyder SJ. Arthroscopic management of partial, full-thickness, and complex rotator cuff tears: indications, techniques, and complications. *Arthroscopy* 2003 Dec;19 Suppl 1:189-99
30. Snyder SJ. Arthroscopic classification of rotator cuff lesions and surgical decision making. in: Snyder SJ (ed) *Shoulder arthroscopy*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003, pp 201–207
31. Krieter Christina: [https://edoc.ub.unimuenchen.de/8558/1/Krieter\\_Christina.pdf](https://edoc.ub.unimuenchen.de/8558/1/Krieter_Christina.pdf), aufgerufen am 17.04.2014
32. Habermeyer P, Schiller K, Schweiberer L. *Schulterchirurgie*. Urban u. Schwarzenberg. München Wien Baltimore, 1990 (1.Auflage). ISBN: 3541124512.
33. Habermeyer P, Krieter C, Tang KL, Lichtenberg S, Magosch P. A new arthroscopic classification of articular-sided supraspinatus footprint lesions: a prospective comparison with Snyder's and Ellman's classification. *J Shoulder Elbow Surg*. 2008 Nov-Dec;17(6):909-13. doi: 10.1016/j.jse.2008.06.007. Epub 2008 Sep 24.
34. Amstutz HC, Sew Hoy AL, Clarke IC. UCLA anatomic total shoulder arthroplasty. *Clin Orthop* 1981;155:7-20.
35. Lippitt SB, Harryman DT II, Matsen FA III. A practical tool for evaluating function: The Simple Shoulder Test. In: Matsen FA, Fu FH, Hawkins RJ, eds. *The shoulder: A balance of mobility and stability*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1992;501-518.
36. Wirth MA, Basamania C, Rockwood CA Jr. Nonoperative management of fullthickness tears of the rotator cuff. *Orthop Clin North Am* 1997; 28: 59–67
37. Goldberg BA, Nowinski RJ, Matsen FA. Outcome of nonoperative management of fullthickness rotator cuff tears. *Clin Orthop* 2001, 382: 99–107
38. Tillander B, Franzen LE. Effect of steroid injections on the rotator cuff: an experimental study in rats., *J Shoulder Elbow Surg*. 1999 May-Jun;8(3):271-4.
39. Iannotti JP. Management of rotator cuff disease. in: Iannotti JP, Williams GR (eds) *Disorders of the shoulder: diagnosis and management*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 1999
40. Zeichen J, Bosch U. Rotatorenmanschette, *Trauma Berufskrankh* 2003 • 5 [Suppl 1]: S120–S125
41. Murray TF Jr, Lajtai G, Mileski RM, Snyder SJ. Arthroscopic repair of medium to large full-thickness rotator cuff tears: outcome at 2- to 6-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg*, 2002, 11: 19–24
42. Galatz LM, Griggs S, Cameron BD, Iannotti JP. Prospective longitudinal analysis of postoperative shoulder function: a ten-year follow-up study of full-thickness rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83: 1052–1056
43. Shin JJ, Saccomanno MF, Cole BJ, Romeo AA, Nicholson GP, Verma NN. Pectoralis major transfer for treatment of irreparable subscapularis tear: a systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014 Aug 22.
44. Buchmann S, Plath JE, Imhoff AB. Latissimus dorsi transfer for the treatment of irreparable rotator tears: indication, surgical technique, and modifications. *Oper Orthop Traumatol*. 2012 Nov;24(6):502-12. doi: 10.1007/s00064-012-0162-y

45. Spahn G, Kirschbaum S, Klinger HM. A study for evaluating the effect of the deltoid-flap repair in massive rotator cuff defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006 Apr;14(4):365-72
46. Burkhart SS, Nottage WM, Ogilvie-Harris DJ, Kohn HS, Pachelli A. Partial repair of irreparable rotator cuff tears. *Arthroscopy*, 1994,10:363–370
47. Galatz LM, Charlton N, Das R, Kim HM, Havlioglu N, Thomopoulos S. Complete removal of load is detrimental to rotator cuff healing. *J Shoulder Elbow Surg.* 2009 Sep-Oct;18(5):669-75. PubMed PMID: 19427237. Epub 2009/05/12. eng.
48. Ficklscherer A, Hartl TK, Scharf M, Sievers B, Schroder C, Milz S, et al. Effects of selective paralysis of the supraspinatus muscle using botulinum neurotoxin a in rotator cuff healing in rats. *J Orthop Res.* 2013 May;31(5):716-23. PubMed PMID: 23239559.
49. Galatz LM, Ball CM, Teefey SA, Middleton WD, Yamaguchi K. The outcome and repair integrity of completely arthroscopically repaired large and massive rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am*, 2004. 86-A(2): p. 219-24.
50. Harryman DT 2nd, Mack LA, Wang KY, Jackins SE, Richardson ML, Matsen FA 3rd. Repairs of the rotator cuff. Correlation of functional results with integrity of the cuff. *J Bone Joint Surg Am*, 1991. 73(7): p. 982-9.
51. Goutallier D, Postel JM, Bernageau J, Lavau L, Voisin MC. Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre- and postoperative evaluation by CT scan. *Clin Orthop Relat Res.* 1994 Jul;(304):78-83.
52. Milz S, Ockert B, Putz R. Tenozyten und extrazelluläre Matrix, *Orthopäde* 2009, 38:1071–1079
53. Dickhut HH, Mayer F, Röcker K. *Sportmedizin für Ärzte*, 2. Auflage, Deutscher Ärzteverlag 2010, S. 259
54. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports.* 2000 Dec;10(6):312-20.
55. Sendzik J. *Wirkungen von Glukokortikoiden und Chinolonen auf Tenozyten vom Menschen in vitro*, Weißensee Verlag, Berlin 2006
56. Welsch U. *Lehrbuch Histologie*, 2. Auflage, Elsevier, München, 2006
57. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006
58. Brodsky B, Ramshaw JAM. The Collagen Triple-Helix Structure. *Matrix Biology*15,1997, 545-554
59. Dölz R, Heidemann E. Influence of Different Tripeptides on the Stability of the Collagen Triple Helix. I. Analysis of the Collagen Sequence and Identification of Typical Tripeptides. *Biopolymers*25, 1986,1069-1080
60. Horton R, Moran L, Scrimgeour G, Perry M, Rawn D. *Prinziples of Biochemistry*, Pearson Education, 2006
61. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry.* 2009;78:929-958. doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
62. Bailey AJ, Lapiere CM, Effect of an additional peptide extension of the N-terminus of collagen from dermatospartic calves on the crosslinking of collagen fibres. *Eur. J Biochem* 1973, 34: 91-96
63. Cameron GJ, Alberts IL, Laing JH, Wess TJ. Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils: an X-ray diffraction study. *J Struct Biol.* 2002;137(1-2):15-22. Epub 2002/06/18.
64. Silver FH, Birk DE. Molecular structure of collagen in solution: comparison of types I, II, III and V. *Int.J.Biol.Macromol Int.* 6. 1984: 125-132.S
65. Ackermann B, Steinmeyer J. Collagen biosynthesis of mechanically loaded articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005 Oct;13(10):906-14
66. Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem.* 1992 Jun;25(3):155-63.

67. Sawhney RS. Expression of type I and type III procollagen by lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(7):2195-202. Epub 1993/06/01.
68. Maffulli N, Ewen SW, Waterston SW, Reaper J, Barrass V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *Am J Sports Med* 2000 Jul;28(4):499-505.
69. Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res.* 2002 Nov;20(6):1352-7.
70. Klein M, Yalamanchi N, Pham H, Longaker MT, Chan J. Flexor tendon healing in vitro: Effects of TGF- $\beta$  on tendon cell collagen production. *The Journal of Hand Surgery Volume 27, Issue 4, July 2002, Pages 615–620.*
71. Ficklscherer A., Scharf M., Hartl TK., Milz S., Müller PE. Tissue characteristics in tendon-to-bone healing change after rotator cuff repair using botulinmneurotoxin A to paralyse the supraspinatus muscle in rats, *Connect Tissue Res.* 2014 Jan 24.
72. Hettrich CM, Rodeo SA, Hannafin JA, Ehteshami J, Shubin Stein BE. The effect of muscle paralysis using Botox on the healing of tendon to bone in a rat model. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011 Jul;20(5):688-97. PubMed PMID: 21194973. Epub 2011/01/05. eng.
73. Milz S, Boszczyk BM, Boszczyk AA, Putz R, Benjamin M, Die Enthesis *Orthopäde* 2005 • 34:526–532 DOI 10.1007/s00132-005-0807-8
74. Benjamin M, Evans EJ, Copp L. The histology of tendon attachments to bone in man. *Journal of Anatomy* 149:89-100. 1986
75. Cooper RR, Misol S. Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study. *The Journal of Bone and Joint Surgery [Am.]* 52:1-20. 1970
76. Gerber C, Schneeberger AG, Perren SM, Nyffeler RW. Experimental rotator cuff repair. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 1999, 81, (9):1281–1290
77. Möller HD, Evans CH, Maffulli N. Akutelle Aspekte der Sehnenheilung. *Orthopäde* 2000;29:182-187
78. Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, et al. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat.* 2006;208:471-490.
79. Hermann KG, Bollow M. Magnetic resonance imaging of the axial skeleton in rheumatoid disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2004 Dec;18(6):881-907.
80. Suzuki D, Toumi H, McGonagle D, Emery P, Benjamin M. The structure of bone at tendon and ligament attachment sites (entheses) *J Anat.* 2005
81. Boszczyk AA, Boszczyk BM, Putz R, Benjamin M, Milz S. Expression of a wide range of fibrocartilage molecules at the entheses of the alar ligaments possible antigenic targets for rheumatoid arthritis? *J Rheumatol.* 2003a;30:1420–1425.
82. Milz S, Tischer T, Buettner A. The molecular composition and pathology of entheses on the medial and lateral epicondyles of the humerus – a structural basis for epicondylitis? *Ann Rheum Dis.* 2004;63:1015–1021.
83. Zwipp H, Rammelt S. *Tscherne Unfallchirurgie Fuß.* Springer Verlag Heidelberg 2014.
84. Benjamin M, McGonagle D. The anatomical basis for disease localisation in seronegative spondyloarthropathy at entheses and related sites. *J Anat.* 2001;199:503-526.
85. Strickland JW, Development of flexor tendon surgery: twenty-five years of progress. *J Hand Surg Am.* 2000; 25(2): p. 214-35
86. Hügler T, Majewski M, Valderrabano V. Zell- und molekularbiologische Abläufe bei der Heilung von Sehnenverletzungen. *Schweizerische Zeitschrift für «Sportmedizin und Sporttraumatologie»* 60 (2), 49–51, 2012.
87. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Front Biosci* 2008; 13:3532–48.
88. Garner WL, McDonald JA, Koo M, Kuhn C, Weeks PM, Identification of the collagen-producing cells in healing flexor tendons. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83(5): p. 875-9.

89. Beredjikian PK. Biologic Aspects of Flexor Tendon Laceration and Repair. *J Bone Joint Surg Am*, 2003 Mar; 85 (3): 539 -550 . <http://dx.doi.org/>.
90. Strickland JW. Flexor tendons—acute injuries. in: Green DP, H.R., Pederson WC, editors. *Green's operative hand surgery*. New York: Churchill Livingstone; 1999. p 1851-97.
91. van Ermengem E. Classics in infectious diseases. A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. E. van Ermengem. Originally published as "Ueber einen neuen anaëroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus" in *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 26: 1-56, 1897. *Rev Infect Dis*. 1979 Jul-Aug;1(4):701-19.
92. Hirai Y. Clostridium botulinum and botulinum neurotoxin [Japanese]. *Brain Nerve* 2011;63(7):755–61
93. Barash JR, Arnon SS. A Novel Strain of Clostridium botulinum That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. *J Infect Dis*. (2013) doi: 10.1093/infdis/jit449 First published online: October 7, 2013
94. Inoue K, Fujinaga Y, Watanabe T, Ohyama T, Tekeshi K, Moriishi K, et al. Molecular composition of Clostridium botulinum type A progenitor toxins. *Infect Immun* 1996;64(5):1589–94
95. Linsenmeyer TA. Use of botulinum toxin in individuals with neurogenic detrusor overactivity: State of the art review. *J Spinal Cord Med*. 2013 Sep; 36(5): 402–419. .
96. Simpson LL. The action of botulinum toxin. *Rev Infect Dis* 1:656-662 1979.
97. Lee K, Gu S, Jin L, Le TTN, Cheng LW, Strotmeier J, Kruegel AM, Yao G, Perry K, Rummel A, Jin R. Structure of a bimodular botulinum neurotoxin complex provides insight into its oral toxicity, PPATHOGENS-D-13-01100
98. Placzek, R.: *Botulinumtoxin in Orthopädie und Sportmedizin*. Edited by Placzek, R., Bremen, UNI-MED Verlag AG, 2006.
99. Imhof M, Podda M, Sommer B. *Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft Ästhetische Botulinumtoxin-Therapie*, 2011
100. Simpson LL. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacol Rev*, 33(3): 155-88, 1981.
101. Rossetto O, Montecucco C. *Handbook of Botulinum toxin treatment*. Moore P and Naumann M (Hrsg.) 2003; 9-27 Blackwell Science, Oxford
102. Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. SV2 is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A. *Science* 2006;312 (5773):592–596
103. Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, Davletov B, Binz T. The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* 2006 Apr 3; 580 (8):2011-2014
104. Göbel H. et al ed. *Botulinumtoxin in der speziellen Schmerztherapie*. 1 ed. Hemmung der Freisetzung von Substanz P und Effekt auf andere Neurotransmitter. Vol. 1. 2004, UNI-MED: Bremen.
105. Naumann M e.a., ed. *Botulinumtoxin*. 2 ed. *Botulinumtoxin-Grundlagen*. 2003, UNI-MED Verlag AG: Bremen. 10-17.
106. Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, Südhof TC, Niemann H, Jahn R. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 1993; 365 (6442):160-163
107. De Paiva A, Meunier FA, Molgó J, Aoki KR, Dolly JO. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:32003205
108. Keizer SB, Rutten HP, Pilot P, Morré HH, v Os JJ, Verburg AD. Botulinum toxin injection versus surgical treatment for tennis elbow: a randomized pilot study. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(401): p. 125-31.
109. Wong SM, Hui AC, Tong PY, Poon DW, Yu E, Wong LK. Treatment of lateral epicondylitis with botulinum toxin: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*, 2005. 143(11): p. 793-7.

110. Placzek R, Deuretzbacher G, Meiss AL. Treatment of lateralisation and subluxation of the hip in cerebral palsy with botulinum toxin A – preliminary results based on the analysis of migration percentage data. *Neuropaediatrics*, 2003, 34:1-4
111. Placzek R, Lindner MS, Deuretzbacher G, Meiss AL. Therapie der chronischen Epicondylopathia humeri radialis mit Botulinumtoxin A – eine Therapiestudie mit 2 Jahren Nachuntersuchungszeitraum. *Z Orthop*, 2004, 142:701-705
112. Placzek R, Drescher W, Deuretzbacher G, Hempfing A, Meiss AL. Treatment of chronic radial epicondylitis with Botulinum toxin A – a double-blinded, placebo-controlled and randomized multi-centre study. *J Bone Joint Surg, Am* 2007, 89:255-260
113. Placzek R, Hölscher A, Deuretzbacher G, Meiss LA, Perka C. Treatment of chronic Plantar Fasciitis with Botulinumtoxin A – an open pilot study on 25 patients with a 14 week follow-up. *Z Orthop*, 2006, 144:405-409
114. Döderlein L. Botulinum toxin therapy in orthopaedics. *Orthopade*, 2006. 35(1): p. 107-17; quiz 118.
115. Seyler TM, Smith BP, Marker DR, Ma J, Shen J, Smith TL, et al. Botulinum neurotoxin as a therapeutic modality in orthopaedic surgery: more than twenty years of experience. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Nov;90 Suppl 4:133-45.
116. Mall V, Heinen F, Kirschner J, Linder M, Stein S, Michaelis U, Bernius P, Lane M, Korinthenberg R. Evaluation of botulinum toxin A therapy in children with adductor spasm by gross motor function measure. *J Child Neurol*, 2000, 15(4):214-7
117. Tüzüner S, Balci N, Ozkaynak S. Results of zone II flexor tendon repair in children younger than age 6 years: botulinum toxin type A administration eased cooperation during the rehabilitation and improved outcome. *J Pediatr Orthop*, 2004 Nov-Dec;24(6):629-33.24(6): p. 629-33.
118. Strickland JW, Glogovac SV. Digital function following flexor tendon repair in Zone II: A comparison of immobilization and controlled passive motion techniques. *J Hand Surg Am*. 1980 Nov;5(6):537-43.
119. Placzek, R., Sohling, M., Gessler, M., Jerosch, J. Botulinum toxin A in orthopedic pain therapy. *Schmerz*, 2004,18(6): 498-505
120. Davidson PA, Rivenburgh DW. Rotator cuff repair tension as a determinant of functional outcome. *J Shoulder Elbow Surg*, 2000. Nov-Dec; 9(6): p. 502-6.
121. Gimbel JA, Van Kleunen JP, Lake SP, Williams GR, Soslowsky LJ.. The role of repair tension on tendon to bone healing in an animal model of chronic rotator cuff tears. *J Biomech*, 2007. 40(3): p. 561-8.
122. Hayashi K. Biomechanical studies of the remodeling of knee joint tendons and ligaments. *J Biomech*, 1996. 29(6): p. 707-16.
123. Gimbel JA, Mehta S, Van Kleunen JP, Williams GR, Soslowsky LJ. The tension required at repair to reappose the supraspinatus tendon to bone rapidly increases after injury. *Clin Orthop Relat Res*, 2004(426): p. 258-65.
124. Gimbel JA, Van Kleunen JP, Mehta S, Perry SM, Williams GR, Soslowsky LJ. Supraspinatus tendon organizational and mechanical properties in a chronic rotator cuff tear animal model. *J Biomech*, 2004. 37(5): p. 739-49.
125. Gimbel JA, Van Kleunen JP, Williams GR, Thomopoulos S, Soslowsky LJ. Long durations of immobilization in the rat result in enhanced mechanical properties of the healing supraspinatus tendon insertion site. *J Biomech Eng*, 2007. 129(3): p. 400-4.
126. Ma J, Shen J, Smith BP. Bioprotection of tendon repair: adjunctive use of botulinum toxin A in Achilles tendon repair in the rat. *J Bone Joint Surg Am*, 2007; 89:2241–2249.
127. Peltz CD, Sarver JJ, Dourte LM, Würzler-Hauri CC, Williams GR, Soslowsky LJ. Exercise following a short immobilization period is detrimental to tendon properties and joint mechanics in a rat rotator cuff injury model. *J Orthop Res*. 2010 Jul;28(7):841-5. doi: 10.1002/jor.21059.

128. Buchmann S, Walz L, Sandmann GH, Hoppe H, Beitzel K, Wexel G, Battmann A, Vogt S, Hinterwimmer S, Imhoff AB. Rotator cuff changes in a full thickness tear rat model: verification of the optimal time interval until reconstruction for comparison to the healing process of chronic lesions in humans. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011 Mar;131(3):429-35. doi: 10.1007/s00402-010-1246-5. Epub 2010 Dec 29.
129. FELASA, PO Box 951, Needham Market, Ipswich, IP6 8WH, United Kingdom
130. [https://de.wikipedia.org/wiki/Friedman-Test\\_%28Statistik%29](https://de.wikipedia.org/wiki/Friedman-Test_%28Statistik%29), aufgerufen am 15.07.2013.
131. <https://de.wikipedia.org/wiki/Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test>, aufgerufen am 15.07.2013.
132. <http://www.ibe.med.uni-muenchen.de/index.html>, aufgerufen am 15.7.2013
133. Carpenter JE, Thomopoulos S, Flanagan CL, DeBano CM, Soslowsky LJ. Rotator cuff defect healing: a biomechanical and histologic analysis in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg.* 1998. 7(6): p. 599-605.
134. Plenck H jr.: Kapitel 25.3 Knochengewebe und Zähne. in: Böck P (Herausgeber): *Romeis mikroskopische Technik.* 17. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, S.527-566,1989
135. Bourne JA: *Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden.* Übersetzung: Mittag H, Torka B; Broschüre, DAKO Cooperation, Carpinteria, USA 1983
136. Boenisch T. *Handbuch II der Immunhistochemischen Färbemethoden* 4.Auflage, Dako Diagnostika GmbH, Hamburg, 2000, 9-33 139. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Puchtler H, W.F., Valentine LS., Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol.* 1973 Nov;150(2):174-87.
137. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol.* 1973 Nov;150(2):174-87.
138. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979 Jul;11(4):447-55.
139. Gulotta LV, Kovacevic D, Ehteshami JR, Dagher E, Packer JD, Rodeo SA. Application of bone marrow derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. *Am J Sports Med.* 2009 Nov;37(11):2126-33. PubMed PMID: 19684297. Epub 2009/08/18. eng.
140. Datenblatt Nilrot, Sigma-Aldrich
141. Shotton D. An introduction to the electronic acquisition of light microscope images. In: Shotton D, Hrsg. *Electronic light microscopy.* New York: Wiley-Liss. 1-38.1993.
142. Inoué S. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. in: Pawley J, Hrsg. *Handbook of biological confocal microscopy.* New York: Plenum Press. 1-17.1995.
143. Sheppard CJR. Confocal microscopy: Basic principles and system performance. in: Cheng P, Lin T, Wu W und Wu J, Hrsg. *Multidimensional Microscopy.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 1-32.1994.
144. [http://de.wikipedia.org/wiki/Konfokalmikroskop/media/File:Confocal\\_principle2-defocussed\\_fluor-deutsch.png](http://de.wikipedia.org/wiki/Konfokalmikroskop/media/File:Confocal_principle2-defocussed_fluor-deutsch.png), aufgerufen am 24.11.2014
145. Brinckmann P, Frobin W, Leivseth G. *Orthopädische Biomechanik.* 2000, Thieme, Stuttgart
146. Schönle C. Güth V. *Rehabilitation: 74 Tabellen.* 2004, Thieme, Stuttgart.
147. Oh SH, Lee Y, Seo YJ, Lee JH, Yang JD, Chung HY, Cho BC. The potential effect of botulinum toxin type A on human dermal fibroblasts: an in vitro study. *Dermatol Surg.* 2012 Oct;38(10):1689-94. doi: 10.1111/j.1524-4725.2012.02504.x. Epub 2012 Jun 28.
148. Thomopoulos S, Williams GR, Soslowsky LJ. Tendon to bone healing: differences in biomechanical, structural, and compositional properties due to a range of activity levels. *J Biomech Eng.* 2003 Feb;125(1):106-13.

149. Schlessinger J, Monheit G, Kane MA, Mendelsohn N. Time to onset of response of abobotulinumtoxin in the treatment of glabellar lines: a subset analysis of phase 3 clinical trials of a new botulinum toxin type A. *Dermatol Surg* 2011; 37(10):1434-42
150. Barton ER, Gimbel JA, Williams GR. Rat supraspinatus muscle atrophy after tendon detachment. *J Orthop Res* 2007; 23:259–265.
151. Fortuna R, Vaz MA, Youssef AR, Longino D, Herzog W. Changes in contractile properties of muscles receiving repeat injections of botulinum toxin (Botox). *J Biomech*. 2011 Jan 4;44(1):39-44. doi: 10.1016/j.jbiomech.2010.08.020. Epub 2010 Sep 15.
152. Irkoren S, Ozkan HS, Ceylan E, Sivrioglu N, Tataroglu C, Durum Y. The Effect of Botox on the Implant Stabilization and Capsular Formation: An Experimental Study. *Ann Plast Surg*. 2015 Jul;75(1):91-7. doi: 10.1097/SAP.0000000000000005.
153. Gimbel JA, Van Kleunen JP, Williams GR. Long durations of immobilization in the rat result in enhanced mechanical properties of the healing supraspinatus tendon insertion site. *J Biomech Eng* 2007;129:400–404.
154. Fortuna R, Vaz MA, Youssef AR, Longino D, Herzog W. Changes in contractile properties of muscles receiving repeat injections of botulinum toxin (Botox). *J Biomech*. 2011 Jan 4;44(1):39-44. doi: 10.1016/j.jbiomech.2010.08.020. Epub 2010 Sep 15.
155. Gilotra M, Nguyen T, Christian M, Davis D, Henn RF, Hasan SA. Botulinum toxin is detrimental to repair of a chronic rotator cuff tear in a rabbit model. *J Orthop Res*. 2015 Jan 28. doi: 10.1002/jor.22836. [Epub ahead of print].
156. Chuang YC, Chiang PH, Yoshimura N, De Miguel F, Chancellor MB. Sustained beneficial effects of intraprostatic botulinum toxin type A on lower urinary tract symptoms and quality of life in men with benign prostatic hyperplasia. *BJU Int*. 2006 Nov;98(5):1033-7; discussion 1337. Epub 2006 Sep 6.
157. Agaba AE, Mahmoud S, Esmail H, Sutton J, Bertalot JC, Jibani MM. Extensive myofascial necrosis: a delayed complication of botulinum toxin therapy. *Eur J Intern Med*. 2005 Dec;16(8):603-5.
158. Draheim NM. Langzeit-Botulinumtoxin-Therapie bei zervikaler Dystonie: eine kernspintomographische und quantitative EMG-Studie. <http://mediatum.ub.tum.de/doc/1083278/1083278.pdf>
159. Mathewson M, Minamoto V, Subramaniam S, Ward S, Lieber R. Gene Expression Changes After a Single Botox Injection in the Rat Tibialis Anterior Muscle. *The FASEB Journal*. 2012;26:1086.12
160. Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg*. 1996 Sep-Oct;5(5):383-92.
161. Derwin KA, Baker AR, Iannotti JP. Preclinical models for translating regenerative medicine therapies for rotator cuff repair. *Tissue Eng B Rev* 2010; 16:21–30.
162. Jost B, Zumstein M, Pfirrmann CW. Long-term outcome after structural failure of rotator cuff repairs. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88:472–479.
163. Boileau P, Brassart N, Watkinson DJ. Arthroscopic repair of full-thickness tears of the supraspinatus: does the tendon really heal? *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87:1229–1240.
164. Apoil A, Dautry P, Moinet P, Koechlin P. The syndrome "rupture of the cap of the rotations of the scapula". A propos of 70 cases. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 1977;63 Suppl 2:145-9.
165. Ma J, Elsaidi GA, Smith TL. Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection: an animal model study. *Am J Phys Med Rehabil* 2004; 83:774–780; quiz 781–773.
166. Seyler TM, Smith BP, Marker DR, Ma J, Shen J, Smith TL. Botulinum neurotoxin as a therapeutic modality in orthopaedic surgery: more than twenty years of experience. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Nov;90 Suppl 4:133-45.

167. Hulst JB, Minamoto VB, Lim MB, Bremner SN, Ward SR, Lieber RL. Systematic test of neurotoxin dose and volume on muscle function in a rat model. *Muscle Nerve*. 2014 May;49(5):709-15. doi: 10.1002/mus.23983. Epub 2014 Jan 28.
168. Ewerbeck V, Wentzensen A, Holz F et al. *Standartverfahren in der operativen Orthopädie und Unfallchirurgie*. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2007
169. Pechlaner S, Suckert K. Naht und funktionelle Nachbehandlung von Beugesehnenverletzungen der Hand nach H. Kleinert. *Erfahrungen und Ergebnisse nach 346 Beugesehnennähten*. *Unfallchirurgie* July 1985, Volume 11, Issue 4, pp 187-191.
170. Lee BG, Cho NS, Rhee YG. Modified Mason-Allen Suture Bridge Technique: A New Suture Bridge Technique with Improved Tissue Holding by the Modified Mason-Allen Stitch. *Clinics in Orthopedic Surgery*. 2012;4(3):242-245. doi:10.4055/cios.2012.4.3.242.
171. Liu Y, Ai YF, Cui GQ , Zhu JX. Changes of histology and capsular collagen in a rat shoulder immobilization model. *Chinese Medical Journal* 2011;124(23):3939-3944.
172. Shen J, Ma J, Lee C, et al. How muscles recover from paresis and atrophy after intramuscular injection of botulinum toxin A: study in juvenile rats. *J Orthop Res* 2006;24:1128-35. doi:10.1002/jor.20131
173. Kröger K, Gröchenig E. *Nicht invasive angiologische Diagnostik*, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 2007

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung		Seite
1	Aufbau und Muskeln der Rotatorenmanschette von lateral	2
2	Die Acromiontypen nach Bigliani	5
3	Aufbau des Kollagens	11
4	Der Aufbau der Enthese	14
5	Die zellulären Phasen der Sehnenheilung	16
6	Die Raumstruktur des Botulinumkomplexes	17
7	Einteilung der Paralysegruppe	23
8	Einteilung der Atrophiegruppe	23
9	Der Ablauf der simulierten Rotatorenmanschettenruptur und deren Rekonstruktion mit postoperativem Nachbehandlungsschema	25/26
10	Aufbau eines Confocal Mikroskop	38
11	Gewichtszunahme bis zum Tötungszeitpunkt	40
12	Der Kollagen I/ Kollagen III- Koeffizient als Zeichen einer fortgeschrittenen Sehnenheilung	41
13	Vergleich der Untersuchungsparameter spannungsreiche Naht ohne Immobilisation unter dem Einfluss des Parameters der vorhandenen und nicht vorhandenen Paralyse	42
14	Der Kollagen I/ Kollagen III- Koeffizient bei spannungsarmer Naht	43
15	Die Auswirkungen der Immobilisation bei zeitgleicher selektiver Paralyse	45
16	Die Kollagen II- Fläche im Bereich der Enthese unter spannungsreicher Naht	46
17	Vergleich der Untersuchungsparameter spannungsreiche Naht ohne Immobilisation unter dem Gesichtspunkt der selektiven Paralyse	47
18	Die Kollagen II- Fläche im Bereich der Enthese unter spannungsarmer Naht	48
19	Vergleich der Parameter spannungsarme Naht in Kombination mit fehlender Immobilisation unter Auswirkung der Anwendung von selektiver Paralyse	49
20	Vergleich der Untersuchungsparameter spannungsreiche Naht mit Immobilisation unter dem Gesichtspunkt der selektiven Paralyse	51
21	Vergleich der Kollagen II- Flächen unter besonderem Focus auf das Spannungsreichtum der Naht ohne präoperative Paralyse	52
22	Auswirkungen des Spannungsreichtums der Naht auf die Kollagen II- Fläche	53
23	Vergleich der Kollagen II-Flächen unter besonderem Focus auf das Spannungsreichtum der Naht bei präoperative Paralyse	53
24	Abmilderung des negativen Aspektes des Spannungsreichtums der Naht bei gleichzeitiger präoperativer Paralyse	54

25	Ordnungsgrad der Kollagenfasern (exemplarisch dargestellt an B/S/ol (A) im Vergleich zu oB/S/ol B)	55
26	Der Tangentenwinkel unter Einfluss von Immobilisation und selektiver Paralyse bei simulierter frischer Rotatorenmanschettenruptur	56
27	Der Tangentenwinkel bei simulierter frischer Rotatorenmanschettenruptur	57
28	Der Tangentenwinkel unter Einfluss von Immobilisation und selektiver Paralyse bei simulierter alter Rotatorenmanschettenruptur	58
29	Der Tangentenwinkel bei simulierter alter Rotatorenmanschettenruptur	59
30	Die Querschnittsfläche der Sehne	60
31	Der Sehnendurchmesser nach Rotatorenmanschettennaht	61
32	Prozentuales Gewicht des M. supraspinatus im Verhältnis zum Tötungsgewicht	62
33	M. supraspinatus 4 Wochen nach erfolgter Botulinumneurotoxin A- Injektion und 8-Wochen Kontrolle mit NaCl-Injektion	62
34	Volumen des M. supraspinatus im Verhältnis zum Tötungsgewicht	63
35	Prozentuales Muskelgewicht im Verhältnis zum Tötungsgewicht des Tieres	64
36	Volumen des Muskels im Verhältnis zum Tötungsgewicht	64
37	Die Dichte des M. supraspinatus im Nachbeobachtungsintervall	65
38	Die Dichte des Muskels unter Einfluss von Botulinumneurotoxin A im Zeitverlauf	66
39	Der Fibrillendurchmesser unter Einfluss von Botulinumneurotoxin A	69
40	Confocal Mikroskopie über den Nachbeobachtungszeitraum von 32 Wochen:	71/72
41	Intensitätsbestimmung der Farbanregung mittels ROI bei der 4 Wochen-Kontrolle	73
42	Intensitätsbestimmung der Farbanregung mittels ROI bei der 8-Wochen-Stichprobe	74
43	Morphologie der Myozyten	75

## 10. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>		<b>Seite</b>
1	Die Muskeln der Rotatorenmanschette und deren Funktion	3
2	Einteilung von Rotatorenmanschettendefekten nach Millstein und Snyder	6
3	Die Sektoreinteilung nach Habermeyer	7
4	Überarbeitung der Klassifikation nach Habermeyer et. al.	7
5	Entwässerungs- und Einbettprotokoll der histologischen Schnitte	29
6	Statistische Auswertung unter besonderem Focus auf die Verwendung der selektiven Paralyse	43
7	Der Kollagen I/ Kollagen III - Koeffizient im Vergleich der Untersuchungsparameter	44
8	Die Kollagen II-Fläche im Bereich der Enthese unter besonderer Beachtung des Parameters Immobilisation	50
9	Exemplarische Auflistung der Signifikanzniveaus der Kollagen II- Flächen unter den Bedingungen von präoperativer Paralyse, Spannungsreichtum der Naht und stattgehabter Immobilisation	54
10	Die Dichteverhältnisse der Muskulatur im Zeitverlauf	67
11	Der Fibrillendurchmesser unter Einfluss einer selektiven Paralyse	68

## 11. Materialverzeichnis

Material	Hersteller
Abdecktücher	Sengewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf-Thansau, Deutschland
Absaugkatheter CH16	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Alufolie	Fora GmbH, Radolfzell, Deutschland
Becherglas 40 ml	Duran Group, Wertheim/Main, Deutschland
Becherglas 500 ml	Duran Group, Wertheim/Main, Deutschland
Biopsiekassetten „Rotilabo“	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bohrer 1 mm	DePuy Synthes, Tuttlingen, Deutschland
Costar Stripette, 25 ml	Fisher Scientific, Waltham, USA
Costar Stripette, 5 ml	Fisher Scientific, Waltham, USA
Deckgläser. 24x32 mm	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Bestell-Nr.: 3500140, Braunschweig, Deutschland
Desinfektionsmittel „Kodan Tinktur forte, gefärbt“	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Drahtbügel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Bestell-Nr.: H553.1; Karlsruhe, Deutschland
Einmal-Pinzette, 12,5 cm	Seidel Medizin, Gauting, Deutschland
Falcon, 50 ml	Blu Max, Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich
Faltenfilter, Durchmesser 185 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Bestell-Nr.: CA10.1, Karlsruhe, Deutschland
Färbegestell 85x60x45 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Bestell-Nr.: H552.1, Karlsruhe, Deutschland
Feinhaarpinsel	Pelikan, Hannover, Deutschland
Gips	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Glasküvetten 105x85x70 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Bestell-Nr.: H554.1, Karlsruhe, Deutschland
Glastrichter, Durchmesser 100 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Bestell-Nr.: K245.1, Karlsruhe, Deutschland
handelsüblicher Topf, 3L	aus den Beständen des Labors
Kompressen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Messer für Schlittenmikrotom	PFM medical, Köln, Deutschland
Messzylinder, 100 ml	Brand, Wertheim, Deutschland
Messzylinder, 2000 ml	Brand, Wertheim, Deutschland
Messzylinder, 250 ml	Brand, Wertheim, Deutschland
Mundschutz	Barrier, Mölnlycke Health Care AB, Göteborg, Schweden
Nadelhalter	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA

Objektträgerpinzette	Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland
Öl für Schlittenmikrotom	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
OP-Haube „Surgeons Hood“	Barrier, Mölnlycke Health Care AB, Göteborg, Schweden
OP-Kittel „Secu-Drape“	Sengewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf-Thansau, Deutschland
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Pinzette	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Pipettenspitzen Gilson D1000	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen Gilson D200	Gilson, Middleton, USA
Roti-Labo-Kassetten für Biopsie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schere	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Nahtmaterial Vicryl	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Nahtmaterial Prolene	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Seidenpapier	aus den Beständen des Labors
Skalpell, Feather Disposable Scalpell, Gr. 11	Feather Saftey Razor Co. Ltd, Osaka, Japan
Skalpell, Feather Disposable Scalpell, Gr. 15	Feather Saftey Razor Co. Ltd, Osaka, Japan
Skalpell, Feather Disposable Scalpell, Gr. 20	Feather Saftey Razor Co. Ltd, Osaka, Japan
Sprühverband Opsite	Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland
Tupfer	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Untersucherhandschuhe Peha-Soft satin Powderfree	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Verbandwatte	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Vorratsgefäß mit Ablasshahn, 10 L	Kautex, Bonn, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	TPP, Artikel-Nr. 91015, Trasadingen, Schweiz

## 12. Geräteverzeichnis

Gerät	Hersteller
Axiocam Mikroskopierkamera	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Bildbearbeitungssoftware	GIMP (GNU Image Manipulation Program) MS Paint (Microsoft Corporation, Redmond, USA) Image J (Image Processing and Analysis in Java)
Bohrmaschine	Proxxon, Trier, Deutschland
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Digitalkamera	Canon, Tokio, Japan
Feuchte Kammer groß	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Feuchte Kammer klein	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fotographiesoftware „Zeiss Axio Vision“	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Gefrierschnittmikrotom	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
Gilson Pipetman 100 µl - 1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Gilson Pipetman 10 µl - 100 µl	Gilson, Middleton, USA
Gilson Pipetman 1 µl - 10 µl	Gilson, Middleton, USA
Heidolph MR 3001 Heizplatte	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Lamin Air HB 2448	Heraeus Instruments, Hereaus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Liebherr <u>GNP 4166 Premium NoFrost</u>	Liebherr, Bulle, Schweiz
Liebherr <u>KTP 1750 Premium</u>	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS, Tokyo, Japan
Paraffin-Streckbad 1052	GFL, Artikel-Nr. 1052, Burgwedel, Deutschland
Paraffinausgießstation Leica EG1160	Leica Microsystems Nußloch GmbH, Nußloch, Deutschland
PC	Dell, Round Rock, Texas, Vereinigte Staaten Lenovo, Peking, China
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Sartorius Certomat MO II	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Schermaschine	Schermaschine Favorita II, Aesculap B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Schlittenmikrotom	R. Jung AG (heute: Leica Microsystems AG), Nußloch bei Heidelberg, Deutschland
Streckbank 13800	Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
Heizmatte	Breuer GmbH, Ulm, Deutschland
Gewebeeinbettungssystem „Hypercenter XP“	GMI, Minnessota, USA
Wärmelampe	Breuer GmbH, Ulm, Deutschland

### 13. Medikamentenverzeichnis

Medikament	Hersteller
Buprenovet (Buprenorphin)	Bayer Health Care; Leverkusen, Deutschland
Baytril 2,5 % (Enrofloxacin)	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Botox 50 Allergan	Allergan Inc., Irvine, USA
Diazepam-ratiopharm 10 Injektionslösung (Diazepam)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Forene (Isofluran)	Abott AG, Baar, Schweiz
Ketamin Inresa 10 ml 500 mg (Injektionsflasche)	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
Narcoren (Pentobarbital-Na)	Merial, Unterschleißheim, Deutschland
Natriumchlorid 0,9 %, Rompun 2 % (Xylacin)	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Sauerstoff	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland
	Linde AG, Pullach, Deutschland

## 14. Reagenzienverzeichnis

Reagenz	Hersteller
100 % Ethanol	Apotheke Innenstadt, Bestell-Nr.: 402817, Universität München, Deutschland
70 % Ethanol	Apotheke Innenstadt, Bestell-Nr.: 402815, Universität München, Deutschland
96 % Ethanol	Apotheke Innenstadt, Bestell-Nr.: 402816, Universität München, Deutschland
ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA
Antikörper Kollagen I	Kollagen II, NB600-450, Novus Biologicals, Littleton, USA
Antikörper Kollagen II	CHC1, University of Iowa, USA
Antikörper Kollagen III	Kollagen III, NB600-450, Novus Biologicals, Littleton, USA
Aqua dest.	Labor für Tumorimmunologie, Universität München, Deutschland
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Brij 35 solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EDTA-4Na 20 % Citronensäure, pH 7,1, 1 L (EDTA-4Na 200g, Citronensäure- Monohydrat 37,19 g, gereinigtes Wasser 1 L)	Artikel-Nr: E0011, Apotheke Innenstadt, Universitätsklinikum München
Eosin Y Lösung mit Phloxin	Sigma-Aldrich, Bestell-Nr.: HAT 110332, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure 100 %,	Merck KGaA, Bestell-Nr.: 1.00063, Darmstadt, Deutschland
Eukitt	Kindler, Bestell-Nr.: 500959, Karlsruhe, Deutschland
Formalin	Apotheke Innenstadt, Universität München, Deutschland
Goat Serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HCl	Apotheke Innenstadt, Universität München, Deutschland
Leistungswasser	Stadtwerke München, München, Deutschland
Paraffin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rotihistol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Bestell-Nr.: 6640.2, Karlsruhe, Deutschland
Safranin T	Bestell-Nr.: 84120, Fluka bezogen über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Saure Hämalanlösung (nach P.Mayer) Romeis §648	Apotheke Innenstadt, Bestell-Nr.: FL0008 Universität München, Deutschland

Sekundärantikörper (horse anti mouse)	Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA
Tissue Tek	Sakura, Leiden, Niederlande
Tissue Tek Kryohold Intermediate	Sakura, Leiden, Niederlande
Wasserstoffperoxid	Apotheke Innenstadt, Universität München, Deutschland

---

---

## 15. Veröffentlichungen

*Effects of selective paralysis of the supraspinatus muscle using botulinum neurotoxin a in rotator cuff healing in rats.*

Ficklscherer A, Hartl TK, Scharf M, Sievers B, Schröder C, Milz S, Niethammer T, Pietschmann MF, Müller PE. J Orthop Res. 2013 May;31(5):716-23; Impact Factor 2,875

*Tissue characteristics in tendon-to-bone healing change after rotator cuff repair using botulinumneurotoxin A for temporary paralysis of the supraspinatus muscle in rats.*

Ficklscherer A, Scharf M, Hartl TK, Schröder C, Milz S, Roßbach BP, Gülecyüz MF, Pietschmann MF, Müller PE. Connect Tissue Res. 2014 Apr;55(2):140-6; Impact Factor 1,788

## 16. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Klinik.

Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller danke ich für die Überlassung des Themas und die kontinuierliche Betreuung, weiterhin danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit der Präsentation der Ergebnisse auf wissenschaftlichen Kongressen.

Herrn PD Dr. med. Andreas Ficklscherer danke ich für die gute Betreuung und die großen Freiräume bei der Gestaltung dieses Promotionsthemas. Weiterhin danke ich ihm für die Hilfe beim Verfassen von Kongressbeiträgen sowie der Einreichung von Anträgen für Promotionsstipendien.

Herrn Prof. Dr. med. Matthias Pietschmann danke ich ebenfalls für die wohlwollende Betreuung des von ihm initiierten Projekts sowie die Hilfestellung bei der Durchführung der Operationen.

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Milz danke ich für seine Expertise bei der Anfertigung und Bewertung der histologischen Schnitte.

Frau Bärbel Schmidt danke ich für die hervorragende Einarbeitung in sämtliche Labormethoden, durch ihre Große Geduld und Expertise trug sie zum guten Gelingen dieses Projekts bei.

Frau Brigitte Mack danke ich für Ihre uneigennützigte Hilfestellung bei der Confocal-Mikroskopie und der Möglichkeit, arbeitsgruppenübergreifend arbeiten zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden im Labor bedanken, welche in dieser langen Zeit voller Höhen und Tiefen das Labor zur Heimat haben werden lassen. Exemplarisch möchte ich hier meine Kollegin Kerstin Limbrunner nennen, welche auch dialektal das Labor zur Heimat erschienen ließ.

Ebenfalls möchte ich mich nochmals bei der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie für die Erwählung für ein Promotionsstipendium bedanken, welches mir ermöglichte, ebenfalls Kongressteilnahmen im europäischen Ausland anzunehmen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. med. Giesela Zeilinger und Raimund Eil sowie Helga und Werner Mitteregger, welche mir während meiner Studiumszeit München zu einer zweiten Heimat machten.

Zuletzt gebührt meinen Eltern der größte Dank, welche mich mein ganzes Leben lang unterstützten und mich auf meinem Weg zum Traumberuf "Arzt" immer begleiteten und mir dieses Studium möglich machten.

## 17. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Markus Scharf erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*"Einfluss der selektiven Paralyse des M. supraspinatus auf die knöcherne Sehnenheilung nach Rotatorenmanschettendefekt an der Ratte – eine histologische Auswertung"*

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

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

Ulm, den 05.09.2016