

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar



**LANGZEITUNTERSUCHUNGEN ZUR REGENERATION  
VON TRAUMATISIERTEM GEWEBE NACH KOMPLEXER  
NERVEN-MUSKELVERLETZUNG AN DER RATTE**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Ulrike Becker, geb. am 02.11.1984 in Rostock

aus Berlin

**Gutachter:**

1. Gutachter: Fr. Univ-Prof. Dr. med. B. Vollmar,  
Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock
2. Gutachter: Hr. Univ.-Prof. Dr. med. T. Mittelmeier  
Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Unfall-, Hand- und  
Wiederherstellungschirurgie, Universität Rostock
3. Gutachter: Hr. Prof. Dr. med. K.-D. Schaser, UniversitätsCentrum Orthopädie und  
Unfallchirurgie, Universität Dresden

**Datum der Einreichung:** 23. Mai 2016

**Datum der Verteidigung:** 28. September 2016

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Zusammenfassung .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
3.1. Aufbau der Skelettmuskulatur und muskuläres Trauma .....	4
3.2. Pathophysiologie des traumatisierten Muskelschadens .....	7
3.3. Therapie des traumatisierten Skelettmuskels .....	10
3.4. Aufbau des peripheren Nervens und nervales Trauma .....	12
3.5. Pathophysiologie des traumatisierten Nervenschadens .....	15
3.6. Therapie des traumatisierten Nerven .....	19
<b>4. Ziel der Studie .....</b>	<b>20</b>
<b>5. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
5.1. Versuchstiere .....	20
5.2. Narkose und chirurgische Präparation.....	21
5.3. Traumamodell .....	22
5.3.1. Traumamodell des Skelettmuskels .....	22
5.3.2. Traumamodell des Nerven .....	22
5.4. Versuchsgruppen und experimentelles Protokoll .....	23
5.5. Untersuchungsmethoden .....	24
5.5.1. Schmerztest nach von Frey .....	24
5.5.2. Biomechanische Untersuchung .....	25
5.5.3. Nervenleitgeschwindigkeit .....	27
5.5.4. Histomorphologische Untersuchungen .....	27

5.5.4.1.	Apoptose: TUNEL-Methode .....	27
5.5.4.2.	Proliferation: BrdU-Färbung .....	28
5.5.5.	Muskelfeuchtgewicht .....	29
5.5.6.	Vollblutanalyse .....	29
5.6.	Statistische Auswertung .....	29
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
6.1.	Verhalten .....	29
6.2.	Schmerztest nach von Frey .....	30
6.3.	Biomechanische Untersuchung .....	33
6.3.1.	Kurzkontraktion .....	33
6.3.2.	Tetanie .....	35
6.4.	Nervenleitgeschwindigkeit .....	36
6.5.	Histomorphologische Untersuchungen des M. soleus .....	38
6.5.1.	Apoptose: TUNEL-Methode .....	38
6.5.2.	Proliferation: BrdU-Färbung .....	38
6.6.	Muskelfeuchtgewicht .....	40
6.7.	Vollblutanalyse .....	41
<b>7.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>42</b>
<b>7.1.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>42</b>
7.1.1.	<i>In vivo</i> -Modell der Traumainduktion .....	42
7.1.2.	Die Ratte als Versuchstier .....	43
7.1.3.	Traumainduktion am Skelettmuskel .....	43
7.1.4.	Traumainduktion am Nerven .....	44
7.1.5.	Schmerztest nach von Frey .....	44
7.1.6.	Biomechanische Untersuchung .....	45
7.1.7.	Nervenleitgeschwindigkeit .....	46
7.1.8.	Histomorphologische Untersuchungen des M. soleus .....	46
7.1.8.1.	TUNEL-Methode .....	46
7.1.8.2.	BrdU-Färbung .....	48

<b>7.2. Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
7.2.1. Systemische Parameter .....	49
7.2.2. Schmerzverhalten nach einem Nerven-Muskeltrauma .....	50
7.2.3. Biomechanische Untersuchung: Regeneration der Muskelfunktion ...	51
7.2.4. Nervenleitgeschwindigkeit: Regeneration des Nerven .....	53
7.2.5. Immunhistochemie: Muskelzellregeneration .....	54
7.2.5.1. Muskelzellapoptose .....	54
7.2.5.2. Muskelzellregeneration .....	55
7.2.6. Muskelfeuchtgewicht .....	56
7.2.7. Vollblutanalyse .....	57
 <b>7.3. Zusammenfassung, Ausblick und Grenzen .....</b>	 <b>57</b>
 <b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	 <b>.....</b>
 <b>9. Thesen .....</b>	 <b>74</b>
 <b>10. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	 <b>76</b>
 <b>11. Lebenslauf .....</b>	 <b>77</b>
 <b>12. Danksagung .....</b>	 <b>80</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
ATP	Adenosin Tri-Phosphat
BRDU	5'-bromo-2'-deoxyuridine
CFU	Colony Forming Units
cm	Centimeter
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECM	Extra-Cellular Matrix
EDL	Musculus Extensor Digitorum Longum
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EPO	Erythropoietin
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
Hb	Hämoglobin
Hk	Hämatokrit
Hz	Hertz
i.c.	intracellular
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheiten
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kHz	Kilohertz KT
M.	Musculus
mA	Milliampere
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
µL	Mikroliter

mm	Millimeter
mmol	Millimol
µm	Mikrometer
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MRT	Magnetresonanz Thomographie
ms	Millisekunden
MTJ	Myotendinous Junctions
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N	Newton
N.	Nervus
NaCl	Natrium-Chlorid
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NO	Nitric Oxide
NSAID	Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
-OH	Hydroxyl-Gruppe
PBS	Phosphate Buffered Saline
ph	Potentia Hydrogenii
PLC	Phospholipase C
PNS	Peripheres Nervensystem
s.c.	subcutan
SD	Standard Deviation
s	Sekunden
SEM	Standard Error of the Mean
SFI	Sciatic Function Index
TNF	Tumor Necrosis Factor
TUNEL	TdT Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Abstract

In the accident surgery, muscular traumata are often correlated with nerve damage. This causes a reduction of motoric and sensory function, as well as pain. The intention of this work is to research the patho-physiological events in traumatically injured muscles with simultaneous nerve injury. It then establishes and evaluates a new rat-model.

We caused an muscular trauma of M. soleus on 70 Wistar rats (7x 10 s, 25 N). Then we combined it with a nerval crush-injury (1x 30 s, 25 N) or a transection of N. ischiadicus and made examinations on days 1,7,14 and 42.

For functional evaluation of the tissue, the contracting force was measured by biomechanical power measurement for the muscle and the examination of nerve conduction velocity and pain-behaviour is set in for the nerve. Besides the proliferative capacity, apoptosis was determined by the use of immuno-histochemical analyses of BrdU- and TUNEL-labeled cells.

The study showed that a muscular crush injury results in a loss of muscle strength (max. 77%), which increases by additional lesion of the responsible nerve (min. 11%). It also showed the pain reaction was enlarged until day 42 by combined nerve-muscle-injury, without regression to physiological data. Though apoptotic cells get back to physiological values, the proliferation increased until day 42.

The whole nerve transection causes a continuous atrophy and loss of function of nerval and muscular tissue. But a combined crush-injury allows regeneration. The highest regenerative strength was detected at these kinds of injuries between day 14 and 42, although muscular and nerval function did not achieve the initial values.

That is why this period has to be investigated in more detail to determine what is needed for a more favorable outcome. Alternately, the time span could be enlarged to get more exact information about the final point of regeneration. Overall, this study documents the changes of the regenerative process over the time, and in relation to the severity of muscular/ nerval trauma. It can be used as a model for future research.



## 2. Zusammenfassung

Komplexe Weichteiltraumata führen häufig durch die Kombination aus nervaler und muskulärer Läsion zu Komplikationen in der unfallchirurgischen Behandlung und zu möglichen Einschränkungen physiologischer Funktionen.

In der vorliegenden Studie soll ein Tiermodell aus nervaler und muskulärer Läsion etabliert werden und daran studiert werden, inwieweit Regenerationsprozesse bei kombiniertem Nerven-Muskeltrauma stattfinden.

Hierzu wurden 70 Wistar-Ratten untersucht, die in 3 Gruppen unterteilt wurden. In der Sham-Gruppe erhielten die Tiere ein offenes Muskeltrauma des M. soleus (7x 10 s, 25 N). Tieren der Crush-Gruppe wurde zusätzlich eine Kontusion des N. ischiadicus (1x 30 s, 25 N) und Tieren der Trans-Gruppe zusätzlich eine Transsektion des N. ischiadicus zugeführt. Die finalen Untersuchungen fanden an den Tagen 1, 7, 14 und 42 nach Traumainduktion statt.

Die Erfassung des Schmerzverhaltens wurde durch die taktile Allodynie mittels von Frey-Filamenten ermittelt. Anhand biomechanischer Messungen der Muskelkraft zusammen mit der Ermittlung der apoptotischen bzw. proliferativen Aktivität im asservierten M. soleus erfolgte die Analyse der muskulären Regenerationsfähigkeit. Das Ausmaß der nervalen Schädigung wurde über die Bestimmung der Latenzzeit des Nerven erfasst.

Es zeigte sich, dass das kombinierte Nerven-Muskeltrauma mit einer erhöhten Schmerzwahrnehmung einhergeht. Bei der Auswertung der biomechanischen Untersuchung wurde in keiner Gruppe das Niveau der Muskelkraft wie vor Traumainduktion erreicht (Tag 42: Sham-Gruppe ~77%, Crush-Gruppe ~48%, Trans-Gruppe ~12%). Immunohistochemisch konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum eine erhöhte Aktivität proliferierender Zellen in allen Versuchsgruppen beobachtet werden, wobei sich die Anzahl apoptotischer Zellen innerhalb von 42 Tagen auf Normwerte reduzierte. Obwohl Tiere der Transsektionsgruppe im Verlauf bis zum Tag 42 die höchste proliferative Aktivität zeigten, wiesen sie auch eine ca. 5fach höhere Apoptosereaktion als die Tiere in den anderen Gruppen auf. Durch eine Nervenkontusion konnte eine Reduktion der nervalen Leitungsgeschwindigkeit durch eine Erhöhung der Latenz um bis zu 44% beobachtet werden.

Die Untersuchungen zeigten, dass Tiere mit einer Nervenkontusion im Gegensatz zu Tieren mit einer Nerven-Transsektion über eine erhöhte Regenerationskraft zwischen den Tagen 14 und 42 verfügen. Ein kombiniertes Nerven-Muskeltrauma führte zu starken Einschränkungen der muskulären und nervalen Funktion. Dies spiegelt die erhebliche Bedeutung einer

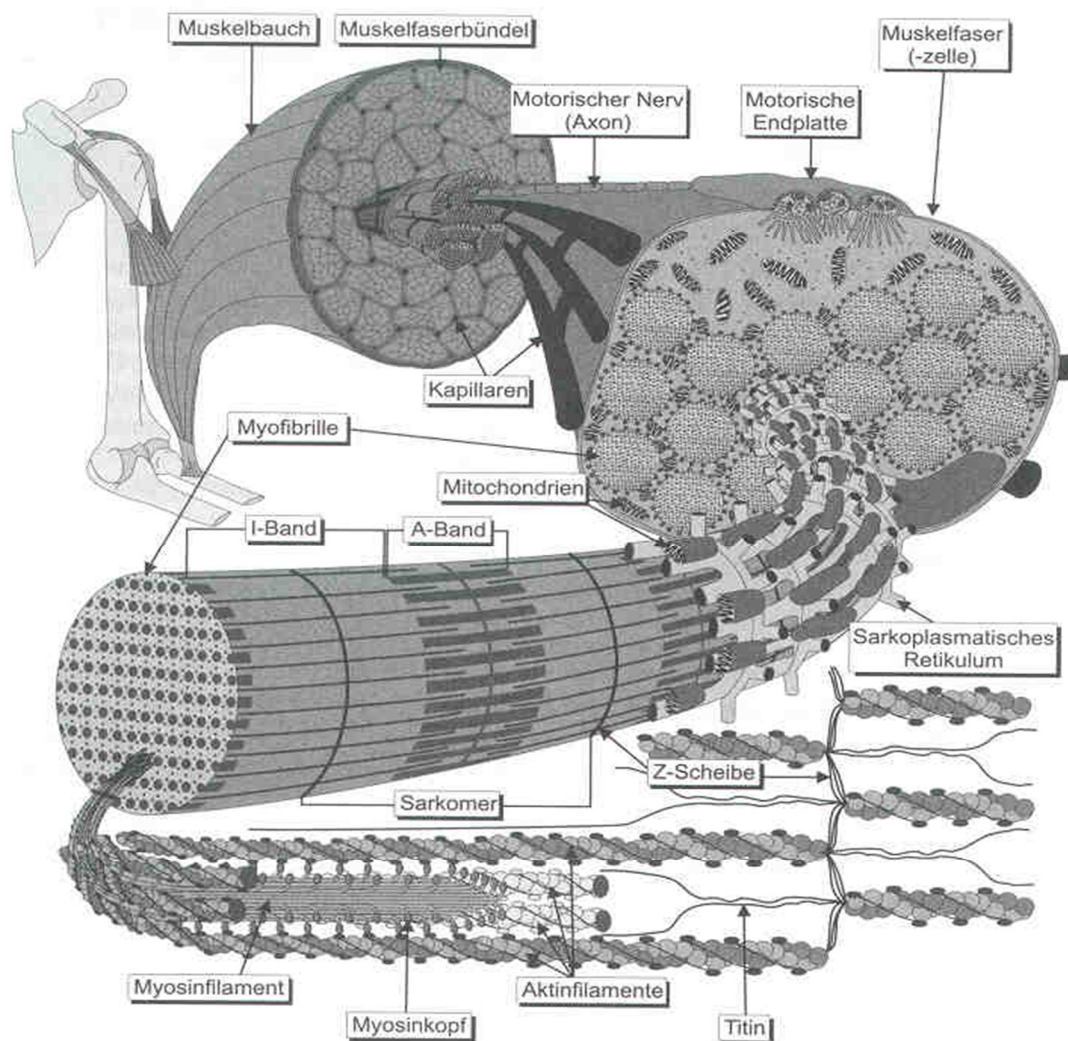
zusätzlichen Nervenläsion sowie die Rückgewinnung der Nervenfunktion für die muskuläre Regeneration wider.

Insgesamt konnten durch das gewählte Tiermodell aussagekräftige Ergebnisse über die Entwicklung der Regeneration des muskulären und nervalen Gewebes in allen Versuchsgruppen gewonnen werden.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Aufbau der Skelettmuskulatur und muskuläres Trauma

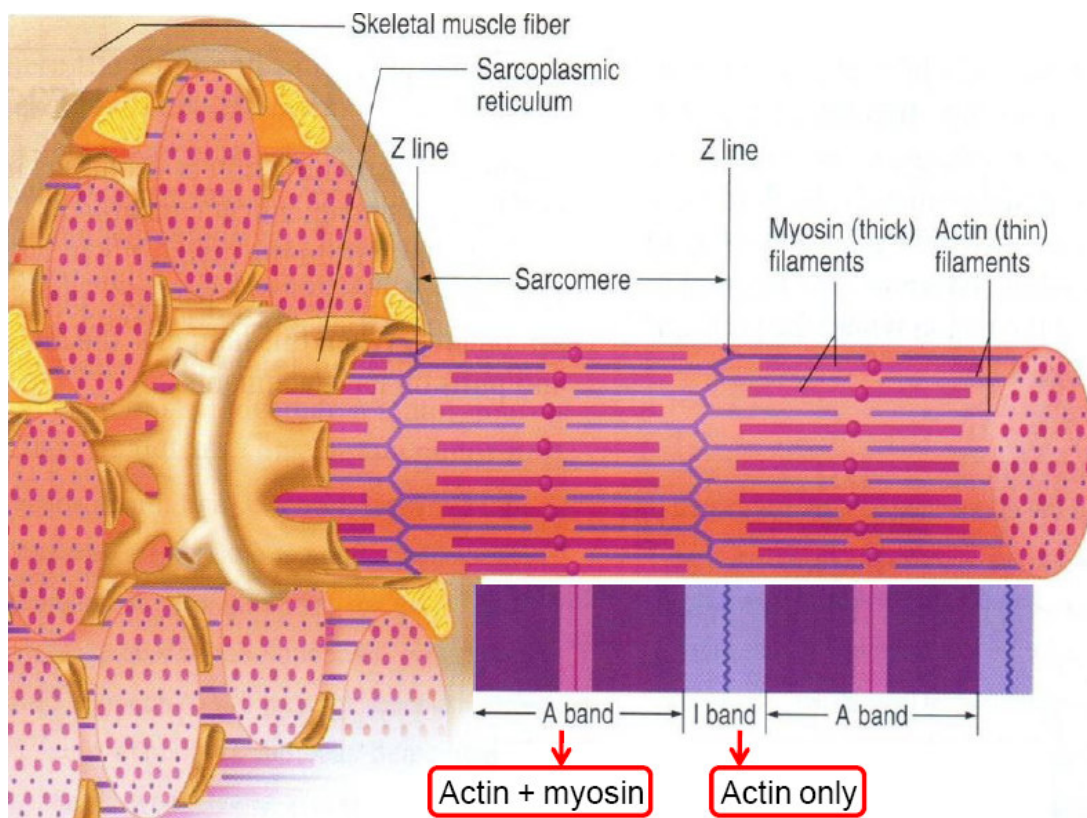
Die Skelettmuskulatur stellt fast die Hälfte der totalen Körpermasse dar und ist somit das häufigste Gewebe des menschlichen Körpers. Der Skelettmuskel erzeugt flüssige, gleichmäßige und koordinierte Körperbewegungen über seine Befestigung am Skelett. Er ist stark vaskularisiert und innerviert, wodurch ein korrekter funktioneller Ablauf garantiert wird [Grefte et al. 2007].



**Abbildung 1:** Die Abbildung stellt den Muskelaufbau bis in seine kleinste funktionelle Einheit (Myofibrillen) mit seinen aufbauenden Proteinen dar. Darüber hinaus wird auch die Eingliederung der Blutgefäße sowie die nervale Versorgung ersichtlich. Quelle: Hohmann, Lames, Letzelter (2003), „Einführung in die Trainingswissenschaft“.

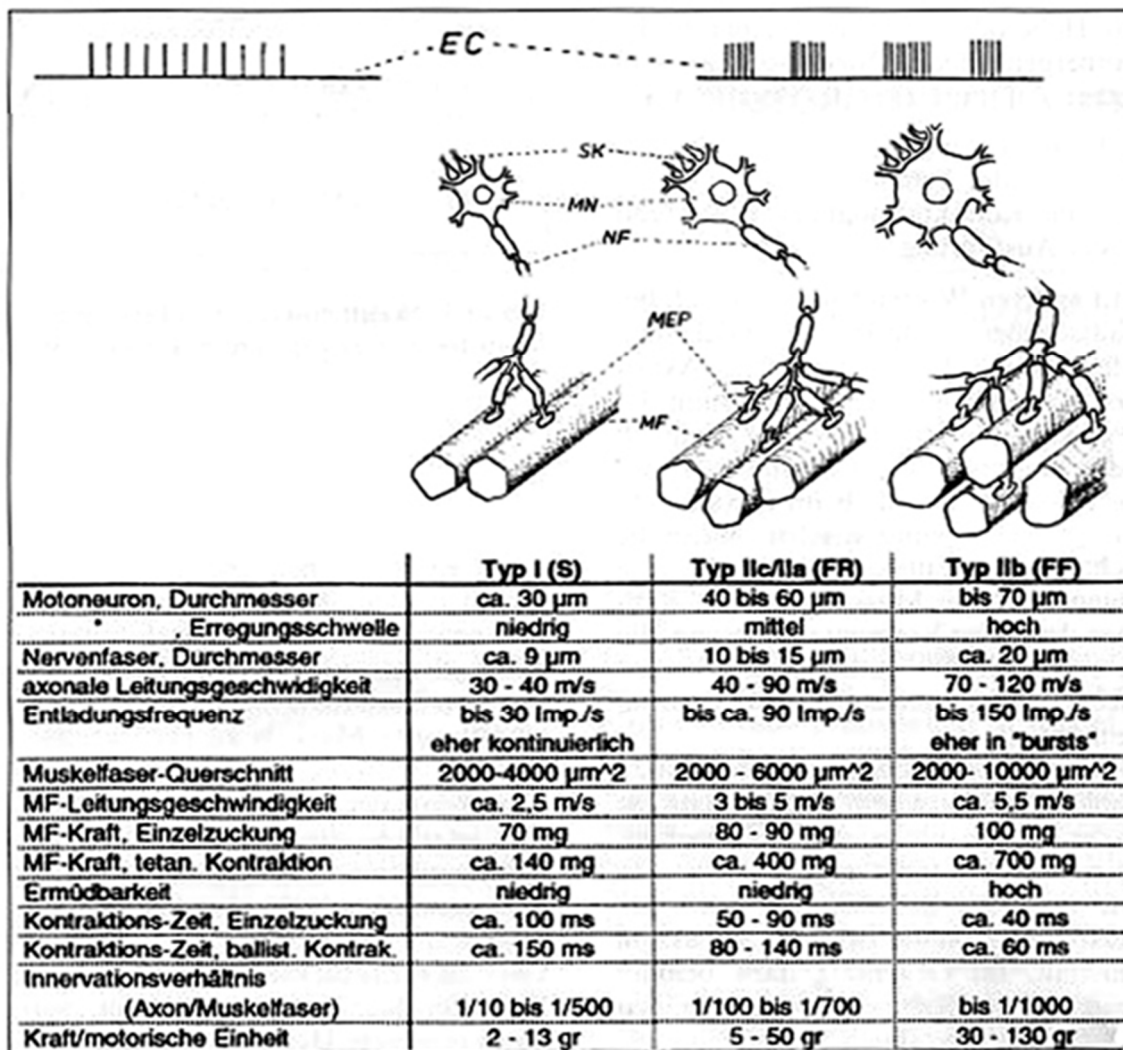
Der Skelettmuskel setzt sich aus Muskelfasern zusammen, die von einer Bindegewebsstruktur aus Endo-, Peri- und Epimysium umschlossen werden. Das Endomysium umgibt hierbei jede einzelne Muskelfaser. Durch das Perimysium werden 10-100 Muskelfasern zu einem Faszikel zusammengefasst. In ihm verlaufen Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven, die den Muskel versorgen. Das kräftigere und dickere Epimysium umhüllt den gesamten Muskelbauch und besteht aus mehreren Faszikeln (Abbildung 1).

Die einzelne Muskelfaser stellt die funktionelle Einheit des Skelettmuskels dar. Sie entsteht aus der Fusion zahlreicher Myoblasten und ist damit histologisch eine multinukleäre Zelle. Jede Muskelfaser besteht aus vielen Muskelfibrillen, welche sich wiederum aus wiederholenden Sarkomeren zusammensetzen. Ein Sarkomer ist eine Anordnung der kontraktilen Proteine Myosin und Actin, welche die dünnen und dicken Filamente bilden und zentrale Grundlage der kontraktilen Eigenschaften des Skelettmuskels darstellen (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** In der Abbildung ist der anatomische sowie der funktionelle Aufbau einer Muskelfaser dargestellt. Quelle: howmed.net. "Skeletal muscle". <http://howmed.net/physiology/skeletal-muscle/> [Stand 05.12.2015].

Es gibt verschiedene Arten von Muskelfasern, die unterschiedliche Kontraktionsformen erzeugen (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Aufführung der verschiedenen Muskelfasertypen mit ihren jeweiligen Eigenschaften. Quelle: Tidow, Wiemann (1993), „Zur Interpretation und Veränderbarkeit von Kraft-Zeit-Kurven bei explosiv-ballistischen Krafteinsätzen“, [http://www.biowiss-sport.de/interpret\\_1.html](http://www.biowiss-sport.de/interpret_1.html) [Stand 27.03.2012].

Wird eine Muskelfasern von einem Einzelimpuls durch nervale Stimulation mit entsprechender Intensität erregt, erfolgt eine schnelle Einzelzuckung („single twitch“) und eine sofort folgende Relaxation. Liegt eine Stimulation mit steigender Frequenz der Impulse vor, nimmt die Relaxationszeit zwischen den einzelnen Zuckungen ab, während die Muskelkraft daraus resultierend steigt. Dies wird als inkompletter Tetanus bezeichnet. Überschreitet die Frequenz einen Grenzwert („fusion frequency“), setzt keine deutliche Erholung zwischen den einzelnen Kontraktionen mehr ein, die maximale Muskelkraft ist erreicht und es liegt ein kompletter Tetanus vor [Garrett 1984].

Die Traumatisierung der Skelettmuskulatur ist eine der am häufigsten vorkommenden Verletzungen im Sport mit einer Inzidenz von 10-55 % aller Läsionen. Ursachen sind Muskelquetschung, -zerrung oder -riss. Mehr als 90 % aller Sport bedingten Läsionen sind Folge einer Muskelquetschung oder -zerrung. Zu einer Quetschung der Muskulatur kommt es, wenn sie einer plötzlichen, heftigen Druckkraft ausgesetzt ist, wie bei einem unmittelbaren Schlag auf den Muskel.

Die Muskelkontusion besteht aus einer definierten Sequenz von Ereignissen, die das mikroskopisch sichtbare Zerreißen und die Schädigung der Muskelzellen, makroskopisch erkennbare Defekte in den Muskelbäuchen, infiltrative Blutungen und eine Entzündung beinhalten [Järvinen et al. 2005; Beiner & Jokl 2002].

Die Schwere ist abhängig von der Einwirkungsseite, dem Aktivierungsstand der betroffenen Muskulatur, dem Alter des Patienten und der gegenwärtigen Ermüdung [Beiner & Jokl 2001]. Ein wichtiger Aspekt bei einer Quetschung der Muskulatur ist die Tatsache, dass nicht nur diese, sondern oft auch umliegendes Gewebe geschädigt wird und es so zu einer Kombination von Muskel-Nerven-Schäden kommen kann. Da die nervale Innervation wichtig für den Funktionserhalt der Muskulatur ist, ist eine Regeneration bzw. Reparatur des Nervengewebes ebenfalls von enormer Bedeutung [Järvinen et al. 2005].

### **3.2. Pathophysiologie des traumatisierten Muskelschadens**

Im Allgemeinen erfolgt die Regeneration des verletzten adulten Muskels in drei sich überlappenden Phasen: Degeneration (1-3 Tage), Regeneration (ca. 3-4 Wochen) und das Remodeling (ca. 3-6 Monate) [Garg et al. 2015]. Ein balancierter Ablauf von Muskelfaserregeneration und Fibrosierung mit Narbenbildung ist eine Voraussetzung für die optimale Wiederherstellung der kontraktilen Funktion des Muskels [Kannus et al. 2003; Järvinen et al. 2005; Smith et al. 2008].

#### **Degeneration**

Zunächst kommt es zur Ruptur der Muskelfasern mit gleichzeitiger Arrosion von Blutgefäßen und Nerven. Es zeigen sich spezifische pathologische Veränderungen der Muskulatur mit der Entstehung von drei Zonen:

1. Gesunde Muskelfasern beiderseits des Traumas
2. Ein Kontraktionsknoten aus kontrahierten Myofibrillen
3. Eine fokale Nekrose

Der "Kontraktionsknoten" grenzt den verletzten Abschnitt vom gesunden Anteil der Fasern ab, wodurch eine Ausbreitung der Nekrose verhindert wird [Price et al. 1964; Shafiq & Gorycki 1965; Sloper & Pegrum 1967; Reznik 1968; Hume et al. 1991; Järvinen et al. 2005].

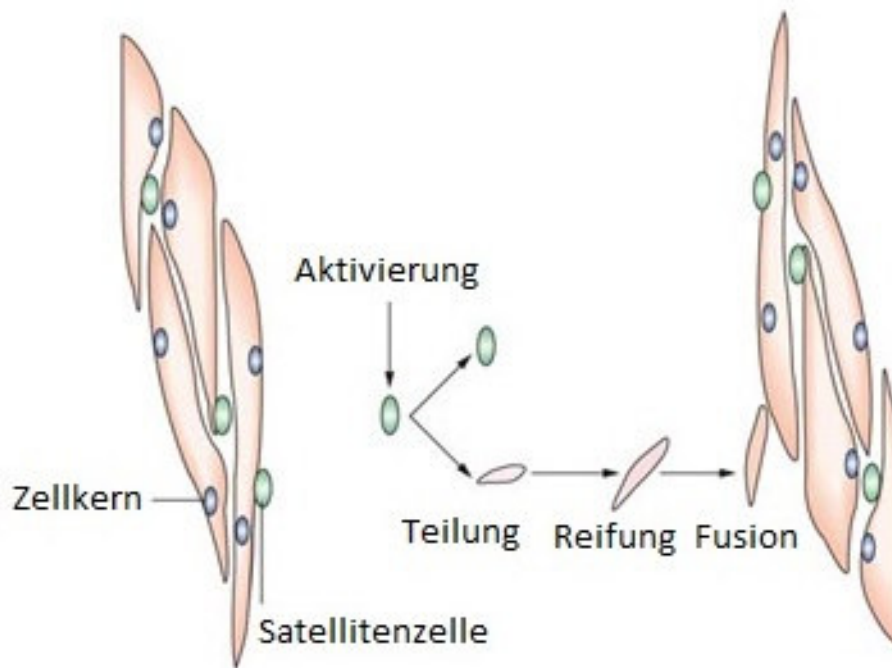
Durch die Gefäßarrosion kommt es zu einer Hämatombildung sowie zur Infiltration von Entzündungszellen des Blutes in das traumatisierte Gewebe. Durch die Sekretion von Wundhormonen, das Eindringen von Plasmaproteinen und die Aktivierung der Komplementkaskade wird die chemotaktische Extravasation inflammatorischer Zellen bewirkt. Neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen wandern daraufhin in das nekrotische Areal ein [Tidball 2005]. Makrophagen beginnen mit der Phagozytose von nekrotischem Gewebe [Järvinen & Lamb 2005] und sezernieren Zytokine, welche die Rekrutierung, Aktivierung und Proliferation von Satellitenzellen bewirken [Garg et al. 2015]. Plasmaproteine wie Fibrin und Fibronektin bilden ein Granulationsgewebe, die extrazelluläre Matrix, in das sich einwandernde Fibroblasten einlagern [Bunn et al. 2004]. Sie unterstützt den Heilungsprozess der rupturierten und geschädigten Muskelfasern [Garg et al. 2015]. Gebildete extrazelluläre Matrixproteine besitzen elastische Eigenschaften und geben dem neu gebildetem Bindegewebe nach etwa 10 Tagen eine gewisse Reißfestigkeit, um Spannungen durch Kontraktionskräfte im Gewebe standhalten zu können [Järvinen et al. 2005; Stratos I. et al. 2010].

### **Muskelregeneration**

Im Anschluss an die Destruktion und Entfernung nekrotischen Gewebes sowie abgestorbener Zellen kommt es zur Regeneration der Muskelfasern und ihres umliegenden Gewebes.

Zwischen Basallamina und Sarkolemm liegen sogenannte Satellitenzellen. Obwohl die Muskelfaser als irreversibel postmitotisch gilt, ist die regenerative Fähigkeit des Skelettmuskels durch einen intrinsischen Mechanismus gewährleistet, der zur Wiederherstellung des geschädigten, kontraktile Apparates dient. Satellitenzellen stellen einen Pool undifferenzierter Reservezellen dar, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und somit von entscheidender Bedeutung für die Muskelreparation nach einem Trauma sind. Nach ihrer Proliferation und Differenzierung zu einkernigen Myoblasten entstehen schließlich durch ihre Fusion multinukleäre Myotuben. Diese wiederum differenzieren sich zu skelettalen Myozyten mit umschließender Basallamina (Abbildung 4).





**Abbildung 4:** Die Abbildung zeigt die Lage der Satellitenzellen ihre Regenerationseigenschaft. Quelle: McNally EM, MacLeod H. (2005) *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2: 301–308.

Man unterscheidet zwei Arten von Stammzellen: „Klassische“ Stammzellen, die sich nach einem muskulärem Trauma in Myoblasten differenzieren können und Stammsatellitenzellen, die vor einer Differenzierung eine Zellteilung durchführen, sodass der Reservepool für zukünftige regenerative Prozesse aufgefüllt wird.

Auch wenn man noch weitere Stammzellen, die zur Muskelregeneration dienen, gefunden hat- wie aus dem Knochenmark oder der peripheren Blutbahn stammende Stammzellen- ist es fraglich, inwieweit sie gegenüber den im Muskel ortsständigen Stammzellen zu diesem Prozess beitragen [Labarge & Blau 2002; Charge & Rudnicki 2004]. Die erhöhte Aktivität der ortsständigen Stammzellen wird als sensibler Indikator für Muskeltraumata verwendet [Schultz et al. 1985; Best & Hunter 2000; Grefte et al. 2007; Järvinen et al. 2005].

Gleichzeitig kommt es zur Proliferation von Fibroblasten, die zwischen die endomysialen Räume der nekrotischen Muskelfasern proliferieren und so einen Schlauch endomysialen Bindegewebes um jede Muskelfaser bilden. Sie stellen wichtige Leitschienen für auswachsende Muskelfasern im Regenerationsprozess dar [Schröder 1982].

Bei entsprechendem Gleichgewicht von Satellitenzell- und Fibroblastenproliferation ist eine narbenfreie Muskelregeneration sehr wahrscheinlich. Kommt es jedoch wie bei starken Traumata zu einer vermehrten Fibroblastenproliferation, überwiegt die Entstehung von



Bindegewebe, wodurch eine Narbe entsteht, welche die funktionellen Eigenschaften des Muskels einschränkt [Järvinen & Lamb 2005; Järvinen et al. 2005].

Außerdem findet eine Vaskularisierung sowie Reinnervierung des neu gebildeten Muskel- und Bindegewebes statt. Nur durch die gleichzeitige Bildung, das Eindringen und die Reifung von Muskulatur, Bindegewebe, Blutgefäßen und Nerven kann eine adäquate Muskelregeneration einsetzen [Järvinen & Lamb 2005; Stratos 2010].

### **Remodelling**

Die Regenerationsphase überschneidet sich mit der Phase des Remodelling, in welcher die Reifung der regenerierten Fasern in funktionell kontraktile Einheiten stattfindet [Garg et al. 2015].

Es erfolgt die Reorganisation der extrazellulären Matrix, wobei das zunächst umfangreiche Granulationsgewebe zu einer kleineren Bindegewebsmasse kondensiert, die vor allem aus Typ I-Kollagen besteht. Der Anteil von Proteoglykanen, Zellen und Kapillaren nimmt ab und die Typ I-Kollagenfasern beginnen sich zur physiologischen Orientierung umzustrukturieren, womit auch die Reißfestigkeit der noch bindegewebigen Narbe steigt.

Nach etwa 6-8 Wochen nach dem Trauma können die neuen Kollagenfasern alltäglichen Belastungen standhalten. Die gesamte Reifungsphase eines heilenden kollagenen Gewebes nimmt jedoch bis zu 1-2 Jahren in Anspruch [Grefte et al. 2007; Järvinen et al. 2005; Kannus et al. 2003; Noyes 1977; Ng et al. 1997].

### **3.3. Therapie des traumatisierten Skelettmuskels**

Resultierend aus einer möglichst genauen Klassifikation eines muskulären Traumas kann die Behandlung und die Planung des Verlaufs der Rehabilitation festgelegt werden. Die Prognose und die Behandlungsdauer sind stark beeinflusst durch die Qualität der geleisteten ersten Hilfe am Unfallort. Eine frühe und konservative Therapie ist die Methode der Wahl [Bily & Kern 1998].

### **RICE-Prinzip**

Sofort nach der Verletzung bis etwa zum 7. Tag sollte das traumatisierte Gewebe nach dem RICE-Prinzip (rest, ice, compression and elevation --> Ruhe, Eis, Kompression und Hochlagerung) behandelt werden. Durch das RICE-Prinzip werden das Ausmaß an Schmerz, Ödem, Entzündung und Hämatom vermindert, was zur Verbesserung des Heilungsprozess führt [Noyes 1977; Salter et al. 1984; Jozsa & Kannus 1997; Järvinen et al. 2005].

## **Immobilisation**

Schonung und Immobilisation des geschädigten Bereichs des Gewebes werden empfohlen, um weitere Blutungen, sekundäre Verletzungen (Re-Rupturen) und vorzeitige Dehnung der verletzten Strukturen zu vermeiden [Järvinen 1975; Hume 1991; Järvinen & Lehto 1993].

## **Mobilisation**

Durch kontrollierte Mobilisation mit entsprechender Dehnung und Bewegung der Muskulatur wird eine Gewebeatrophie aufgrund von Immobilisation verhindert [Järvinen 1976; Noyes 1977; Kannus et al. 1992; Lehto 1993; Buckwalter 1995; Orchard & Best 2002].

Optimale Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Mobilisation nach einer kurzen Phase der Immobilisation (3-5 Tage bei einem M. gastrocnemius der Ratte) erfolgte [Järvinen 1976; Lehto 1993; Buckwalter 1995].

## **Chirurgische Intervention**

Bei spezifischen Indikationen sollte eine chirurgische Intervention in Betracht gezogen werden. Hierzu zählen ein intramuskuläres Hämatom, eine partielle oder komplette Muskelzerrung bzw. ein Abriss eines Muskels mit wenigen oder gar keinen agonistischen Muskeln sowie bei einem persistierenden Dehnungsschmerz (> 4-6-Monate) [Järvinen et al. 2005].

## **Schmerztherapie**

Auch der Bereich der Schmerztherapie sollte bei der Versorgung eines Skelettmuskeltraumas miteinbezogen werden. Die kurzzeitige Anwendung von nichtsteroidalen Antiphlogistika in der frühen Heilungsphase führt zu einer Abnahme der zellulären Entzündungsreaktion. Der Einsatz sollte jedoch auf die frühe Phase der Muskelregeneration beschränkt bleiben, da die langzeitige Anwendung sich Studien zufolge negativ auf die regenerierende Skelettmuskulatur auswirkt [Schoenfeld 2012].

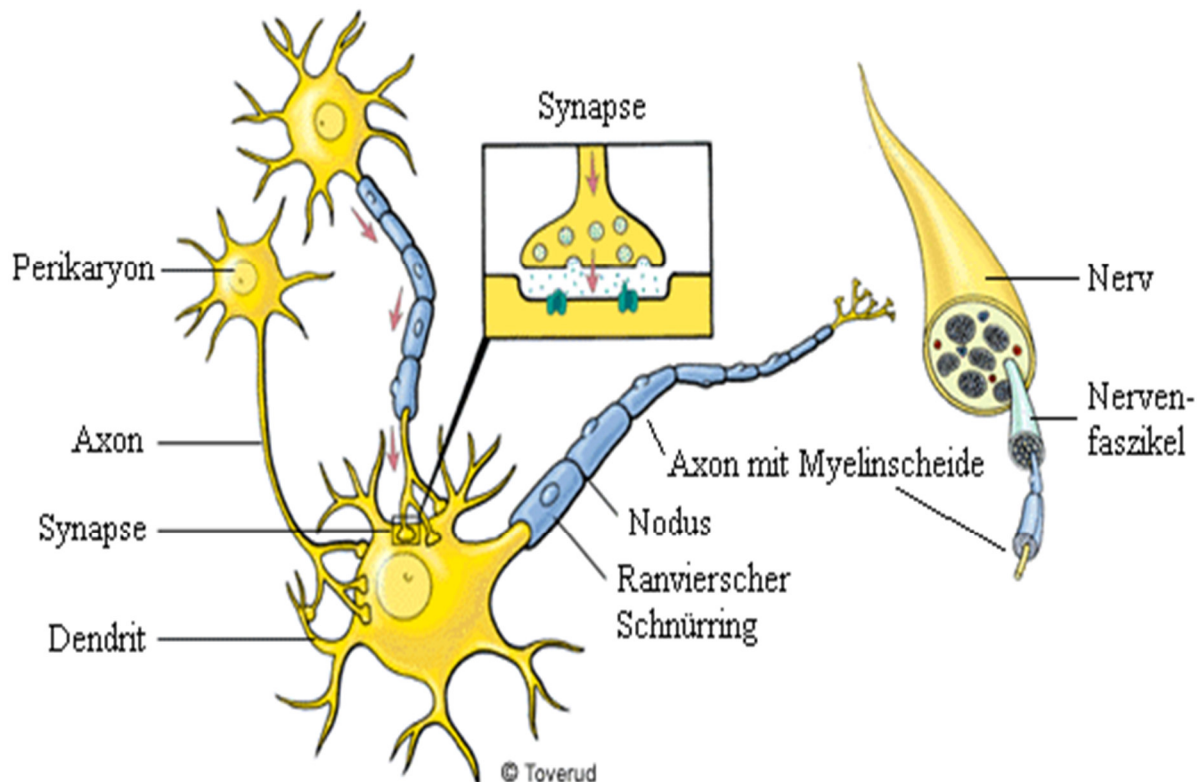
## **Adjuvante Therapien**

Die hyperbare Sauerstofftherapie ist eine weitere therapeutische Möglichkeit, die Regeneration eines verletzten Muskels zu verbessern. Jedoch gibt es noch keine klinischen Studien, weshalb man mit der Ausdehnung auf die klinische Praxis zurückhaltend sein sollte [Mutschler & Muth 2001].

Des weiteren gibt es die Möglichkeit, eine auf Wachstumsfaktoren basierende Therapie zur Stimulierung der Muskelregeneration anzuwenden [Grefte et al. 2007].

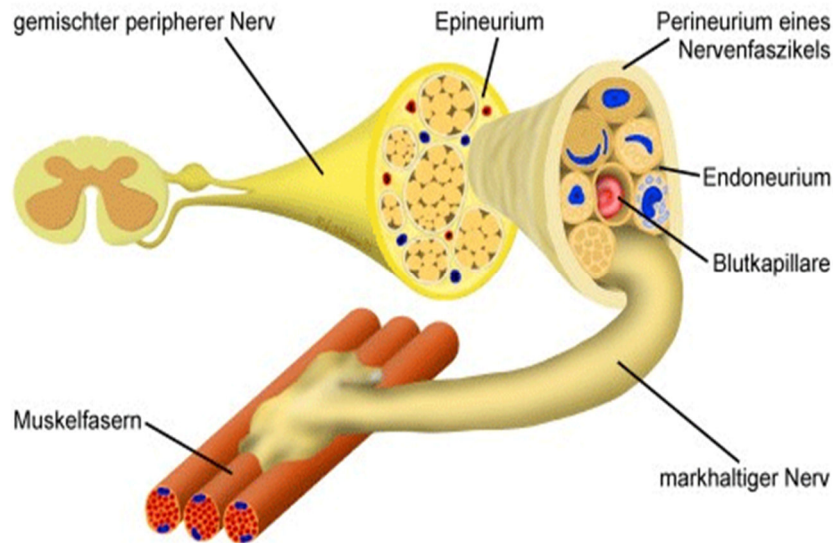
### 3.4. Aufbau des peripheren Nerven und nervales Trauma

Nach ihrem Ursprung werden bei Wirbeltieren Hirnnerven und Spinalnerven unterschieden. Das Nervengewebe im Allgemeinen besteht aus Nervenzellen (Neuronen) und einem „Stützgerüst“, den Gliazellen. Durch die Fortsätze der Neuronen können Verbindungen zu anderen Neuronen, Rezeptoren oder Effektoren wie Muskelfasern aufgebaut werden. Das Neuron (Abbildung 5) besteht aus einem Zellleib (Soma, Perikaryon) und zwei Varianten von Ausläufern: mehreren Dendriten und einem Neurit (Axon), der die Nervenimpulse weiterleitet.



**Abbildung 5:** Die Abbildung zeigt die Anatomie eines Neuriten inkl. der schematischen Darstellung der synaptischen Übertragung. Quelle: Lindstrom, (2005), „Nervensystem und die Zellen“. <http://www.1177.se/Tema/Kroppen/Nervsystemet-och-sinnesorganen/Hjarnaryggmarg-och-nerver/> [Stand 27.03.2012].

Er wird zusammen mit seiner Gliahülle als Nervenfaser bezeichnet (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung eines peripheren Nervens mit seinen umgebenden Geweben. Quelle: Krischek & Feigl (2008), „Verletzungen peripherer Nerven“, [http://www.neurochirurgie-tuebingen.de/website/index.php?article\\_id=20&clang=0](http://www.neurochirurgie-tuebingen.de/website/index.php?article_id=20&clang=0) [Stand 27.03.2012].

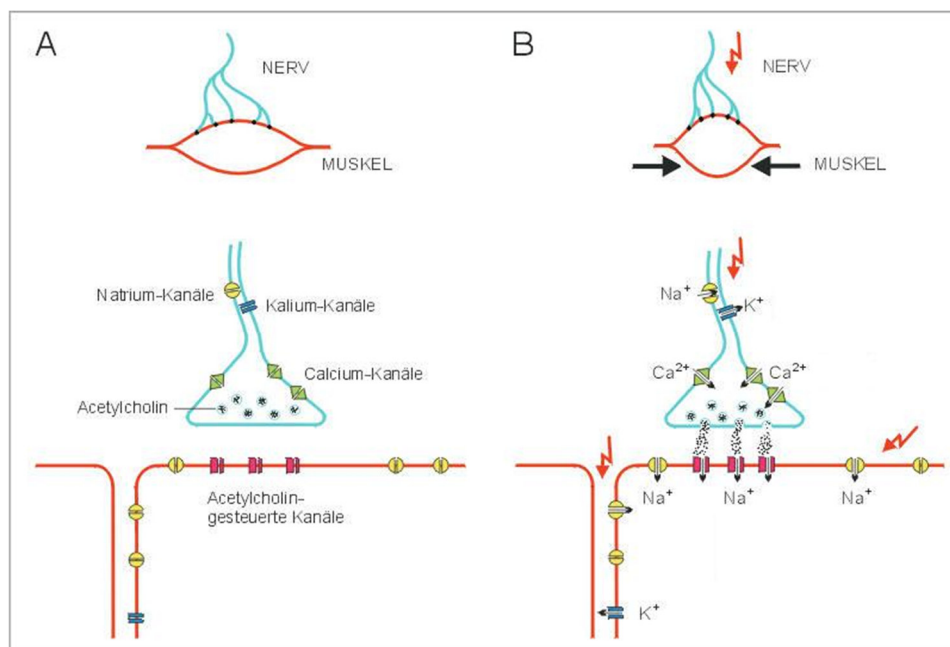
Ein Nerv wiederum ist ein Bündel aus Nervenfasern in einer Bindegewebshülle. Das bindegewebige Epineurium umgibt vollständig größere Nerven und enthält die zur Versorgung notwendigen Blutgefäße. Ein Nerv enthält mehrere Faszikel, die jeweils von ihrer eigenen Hülle -dem Perineurium- umgeben sind. Innerhalb eines Faszikkels liegen Nervenfasern zusammengefasst in einer weiteren Bindegewebsstruktur, dem Endoneurium. Alle genannten Hüllen dienen vor allem dem mechanischen Schutz der Nervenfasern [Lüllmann-Rauch 2003].

Periphere Nervenfasern kommen sowohl als marklose dünne Axone ohne Myelinscheide (im ZNS  $< 1 \mu\text{m}$ , im PNS  $< 2 \mu\text{m}$ ) als auch als markhaltige myelinisierte dickere Axone vor. Die Myelinscheide wird im peripheren Nervensystem durch Schwann-Zellen, im zentralen Nervensystem durch Oligodendrozyten gebildet. Myelinisierte Nervenfasern werden in regelmäßigen Abständen von myelinfreien Zonen unterbrochen (Ranvier-Schnürringe, Nodus). Das Internodium ist der Bereich zwischen zwei Schnürringen.

Erst durch die Myelinscheiden kann eine schnellere Weiterleitung von einzelnen elektrischen Erregungen (Aktionspotentialen) entlang dem Axon durch die saltatorische Erregungsleitung hergestellt werden als sie bei unmyelinisierten Axonen erreicht werden kann. Da Internodium-Länge, Axondurchmesser, Myelinscheidendicke und daher auch Faserdurchmesser direkt miteinander korrelieren, wird der Faserdurchmesser zur Klassifizierung von peripheren

Nerven verwendet (Gruppe A-C). Als „Faustregel“ gilt: Je dicker die myelinisierte Faser, desto höher ist die Leitungsgeschwindigkeit [Lüllmann-Rauch 2003].

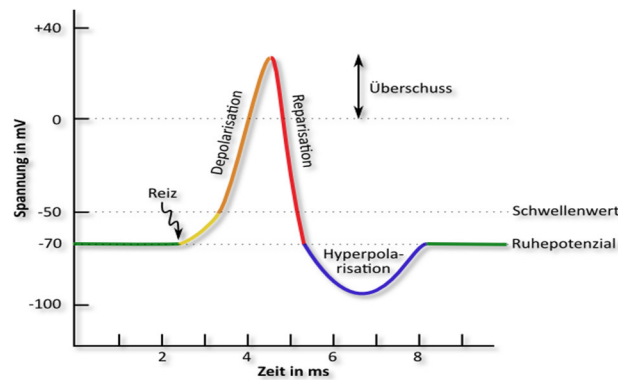
Präterminal verzweigt sich ein Axon in mehrere kleine Äste, die jeweils mit einer kolbenartigen Erweiterung (Endknopf) enden. Über diesen Endknopf wird die Übertragung des Nervenimpulses zu anderen Neuronen oder Effektoren hergestellt und somit eine Synapse gebildet. Die Information kann hierbei mittels interneuronalen chemischen oder elektrischen Synapsen (Gap junction) weitergeleitet werden. Bei ersteren besteht im Gegensatz zu elektrischen Synapsen ein Spalt zwischen den Plasmamembranen des Axonendes und der des „Empfängerneurons“ (synaptischer Spalt). Hier wird die bis jetzt elektrische Information mittels eines Neurotransmitters in eine chemische umgewandelt und von der prä- an die postsynaptische Membran weitergeleitet (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Die Abbildung zeigt den molekularen Mechanismus bei Eintreffen eines Aktionspotentials an der neuromuskulären Synapse mit Übertragung in die muskuläre Membran. Quelle: Frings (2011), „Die Vergiftung der neuromuskulären Synapse“, <http://www.sinnesphysiologie.de/cono/cono05.htm> [Stand 27.03.2012].

Als Transmitter dienen Acetylcholin, Monoamine, Aminosäuren und Neuropeptide.

Das Aktionspotential ist die Grundlage eines jeden Nervenimpulses sowie der elektrischen Erregungsweiterleitung [Mummert & Gradmann 1991; Klinke & Silbernagl 2005; Beilby 2007] (Abbildung 8).



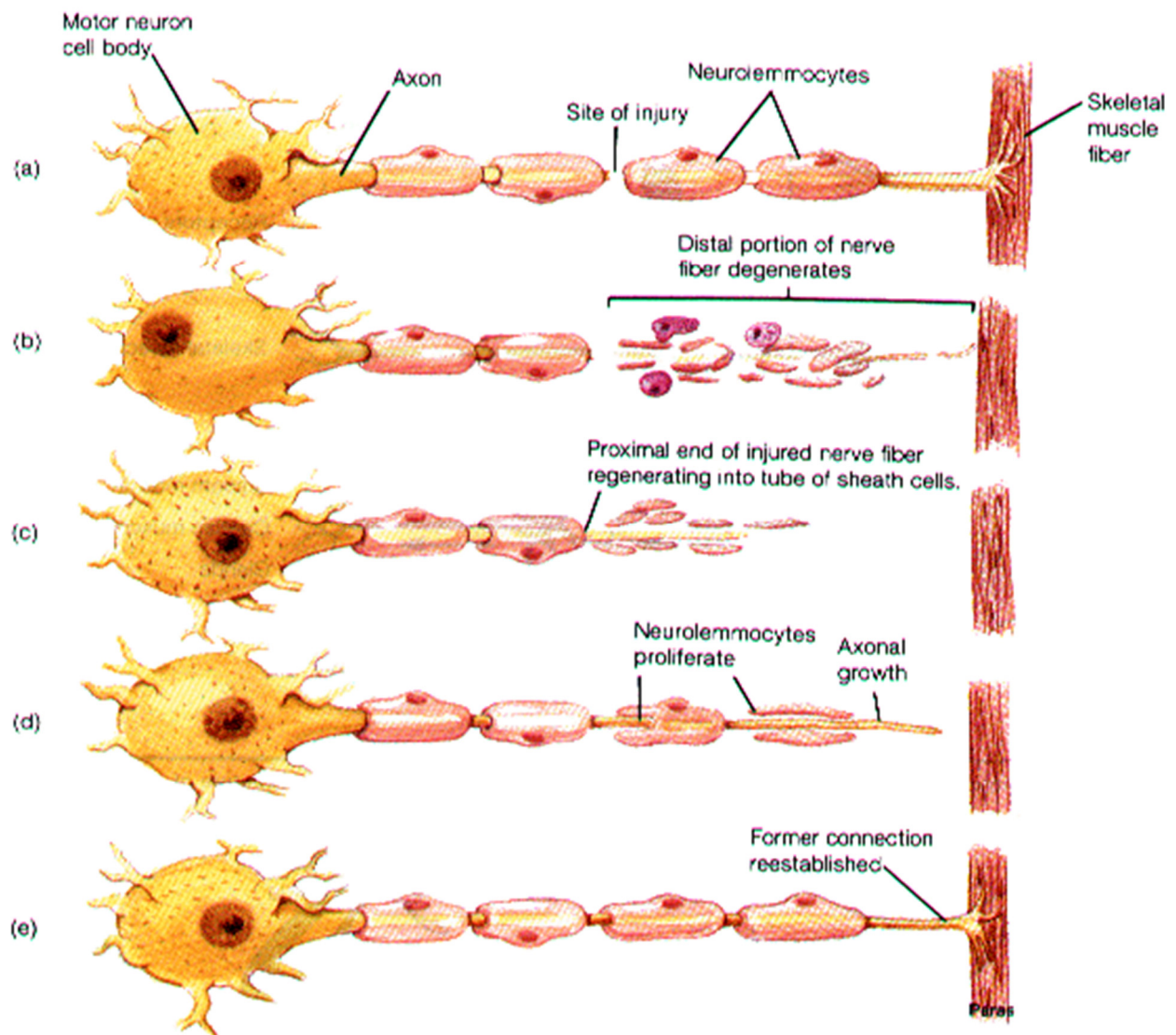
**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der elektrischen Vorgänge bei nervaler Erregung durch ein Aktionspotential. Quelle: Jagemann, K-U. (2009-2011), „Das Aktionspotential“, <http://www.jagemann-net.de/biologie/biol3/neurobiologie/aktionspotenzial/aktionspotenzial.php> [Stand 20.04.2012].

Außerdem werden offene Verletzungen, bei denen der Nerv scharf durchtrennt oder zerrissen worden ist, von geschlossenen, bei denen es zu Kontusionen kommen kann, differenziert. Traumatische Schädigungen peripherer Nerven sind Folge von Schnitt-, Stich-, Zug-, Schuss- und Druckverletzungen und treten oft zusammen mit Luxationen und Frakturen auf. Zu unterscheiden sind primäre und sekundäre Nervenschäden. Bei letzteren setzt der Nervenschaden erst nach Wochen bis Jahren (Spätlähmung) durch Kallus- und Narbenbildung ein. Aber auch iatrogen, durch chronische Druckschädigung und durch toxische oder metabolische Einflüsse können Nervenschäden hervorgerufen werden [Kretschmer et al. 2014].

Die Auswirkung von Nervenläsionen auf Motoneurone, Nerven und Muskulatur beinhalten metabolische, biochemische, elektrophysiologische und morphologische Veränderungen [Sunderland 1987; Brushhart 1988, 1993; Grubb et al. 1991; Kline & Hudson 1995; Doolabh et al. 1996; Brushhart et al. 1998; Rafuse & Gordon 1996; Zhou et al. 1995].

### 3.5. Pathophysiologie des traumatisierten Nervenschadens

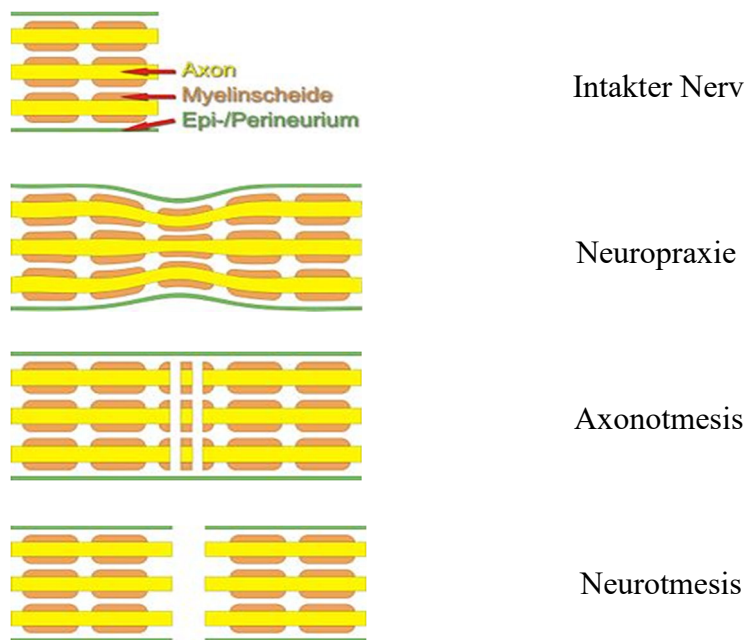
Wird ein Nerv komplett durchtrennt, setzt distal der Verletzung eine anterograde Degeneration des Axons und aller Myelinscheiden ein (Waller-Degeneration) [Kretschmer et al. 2014; Lüllmann-Rauch 2003] (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Gezeigt wird der Prozess der Regeneration eines Nervens inklusive der dazugehörigen Waller-Degeneration, die einen wesentlichen Aspekt hierbei darstellt. Quelle: Rastatter, Dodd, Lynch, Stratman (2009), "Biomaterials for nerve regeneration", <http://chen2820.pbworks.com/w/page/11951452/Biomaterials%20for%20nerve%20regeneration> [Stand 05.12.2015].

Im proximalen Axonabschnitt findet eine retrograde Degeneration der Fasern bis zum nächstgelegenen Ranvier-Schnürring statt [Mumenthaler et al. 2007]. Ist die Läsion zu nahe am Perikaryon, dann kann es gegebenenfalls zum Untergang des gesamten Neurons kommen. Der Schweregrad der Nervenläsion bestimmt das Ausmaß neurologischer Ausfälle. Daher wurden Einteilungen zur Beurteilung dieser aufgestellt. Klinisch hat sich vor allem die Einteilung von Seddon mit der Untergliederung in Neuropraxie, Axonotmesis und Neurotmesis bewährt (Abbildung 10):





**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Schädigungsgrade eines Nerven. Quelle: Mumenthaler, Stöhr, Müller-Vahl, (2003) (Wikipedia), „Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome“, <http://de.wikipedia.org/wiki/Neurotmesis> [Stand 27.03.2012].

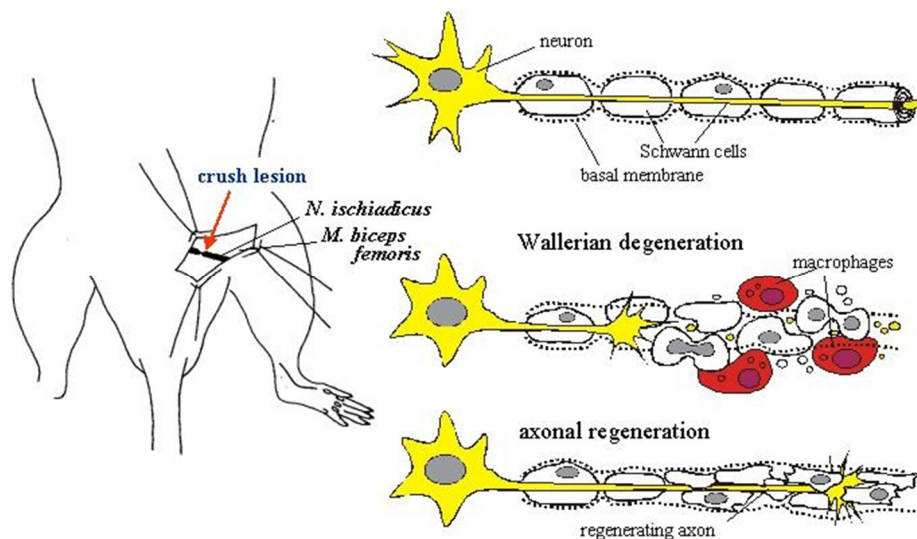
Durch Dehiszenz der Nervenenden wie bei der Neurotmesis können größere Lücken entstehen, was eine Regeneration erschwert bzw. verhindert. Denn proximale Axonaussprossungen benötigen bindegewebige „Leitstrukturen“, die sie zum distalen Abschnitt leiten, jedoch nur gewisse Distanzen überbrücken können [Mumenthaler et al. 2003; Masuhr & Neumann 2007]. Bei Traumata peripherer Nerven beobachtet man selten eine vollständige Rückgewinnung der ursprünglichen Funktion [Rodriguez 2004]. Es kommt zur Störung der Motorik, was zur Paralyse und Atrophie der denervierten Muskulatur führen kann. Obwohl elektrophysiologische Tests und histologische Methoden einen guten Grad der Reinnervation des betreffenden Muskels nach Trauma aufzeigen können, stellt sich nur eine geringe Korrelation zur Erholung der komplexen Funktionen dar, wie dies z.B. bei den Gehmustern nach Verletzung des Nervus ischiadicus deutlich wird [De Medinacelli 1988; Valero-Cabrè & Navarro 2002; Lago & Navarro 2006]. Die Hauptursache für bleibende Defizite und Dysfunktionen sind die begrenzte Zahl von Axonen, die durch die Regeneration den distal degenerierten Nerven erreichen und die mangelnde spezifische Ziel-Innervation durch die regenerierten Axone.

### Nervenregeneration

Eine erfolgreiche Nervenregeneration kann nur dann stattfinden, wenn die Axone des proximalen Stumpfes den distalen erreichen [Brämer 2009].



Daher dient als Grundlage für den Regenerationsprozess (Abbildung 11) die zunächst einsetzende Proliferation der Schwann-Zellen hauptsächlich des proximalen Nervenstumpfes durch die Wirkung mitogener Zytokine aus immigrierten Makrophagen.



**Abbildung 11:** Die Abbildung zeigt den Schädigungsort des Nerven an den Versuchstieren sowie dessen Regenerationsprozess. Nach Traumatisierung des Nerven wandern Makrophagen ein, die mit der Sekretion mitogener Faktoren die Regeneration unterstützen und Gewebsreste beseitigen. Im Sinne der Waller-Degeneration setzt zunächst die Degeneration des Axons ein. Bei intakter Basalmembran wächst das Axon an der sich neu gebildeten und als Leitstruktur dienenden Myelinscheide entlang zum distalen Axonstumpf. Quelle: Zhelyaznik und Mey (2006), „Retinoic Acid in Development and Regeneration of the Nervous System“, <http://www.bio2.rwth-aachen.de/research/RERENER.htm> [Stand 28.03.2012].

Sie lagern sich zu langen Ketten zusammen (Büngner-Bänder), die von einer neuen Basallamina umgeben werden. An den Axonen am proximalen Stumpf kommt es zu Aussprossungen, die zu allen Seiten hin auswachsen. Jedoch verlängern sie sich durch neurotrophe Faktoren aus den Schwann-Zellen vor allem in Richtung des distalen Nervenstumpfes. Indem sie in die Büngner-Bänder eindringen, benutzen sie diese als Leitschienen, um mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von ca. 1- 4 mm/d (Mensch) bzw. 3-4 mm/d (Ratte; nach Kontusionstrauma) oder 2-3 mm/d (Ratte; nach Transsektionstrauma) den Anschluss an das distale Ende zu finden. Nur die Aussprossung, die zuerst in synaptischen Kontakt mit dem distalen Nervenende tritt, bleibt erhalten, die übrigen werden abgebaut. Dieses neue Axon wird daraufhin von proximal aus myelinisiert [Lüllmann-Rauch 2003].

Wenn die durchtrennten Nervenenden nicht in unmittelbarer Nähe gelegen sind oder hat bereits eine Vernarbung an der Schnittstelle eingesetzt, führt dies zur Fehlleitung der Axone und der Schwann-Zellen. Es bildet sich ein Hyperregenerat des peripheren Nervens- ein

traumatisches bzw. Amputationsneurom [Herbst & Hübner 2003; <http://www.pathologie-online.de>. Stand 28.03.2012].

An einzelnen gemischten Nerven mit gleichen Regenerationsbedingungen wurde gezeigt, dass die Regeneration sensorischer Axone gegenüber der von motorischen dominiert [Suzuki et al. 1998]. Jedoch ist der erreichte Grad der funktionellen Reinnervation nach längerer Beobachtungszeit für große myelinisierte motorische und sensorische Fasern gleich [Navarro et al. 1994; Valero-Cabrè et al. 2001].

Als Maß für die Regenerationsfähigkeit eines Nerven wird die Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) herangezogen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die NLG nach erfolgreicher Operation in vielen Fällen besserte, aber nicht vollständig normalisierte, da die Myelinscheiden von verminderter Dicke im Vergleich zu physiologischen Werten blieben [Ludin 1979; Lüllmann-Rauch 2003; Shatat 2007].

### **3.6. Therapie des traumatisierten Nerven**

Das Erkennen einer Nervenläsion und das unverzügerte Einleiten einer fachgerechten Behandlung spielt eine wichtige Rolle im Hinblick auf die bestmögliche Funktionswiederherstellung [AWMF 2013].

Klinisch anwendbar für die Einschätzung des Regenerationsverlaufs und die daraus erfolgende Wahl der notwendigen therapeutischen Maßnahme sind das Hoffmann-Tinnel-Zeichen, das EMG, die NLG- und die MEP-Untersuchungen [Kretschmer et al. 2014].

#### **Konservative Therapie**

Bei der konservativen Therapie werden die Hochlagerung und Schienung der Extremität angewendet. Außerdem werden durch tägliche krankengymnastische Übungen die Regeneration eines peripheren Nerven und der Einsatz funktionsfähig gebliebener Antagonisten gefördert und gleichzeitig eine Überdehnung der paretischen Muskulatur sowie Kontrakturen vermieden. Um Muskelatrophien bei vollständiger Nervendurchtrennung zu verzögern, kann die Reizstromapplikation eine mögliche Therapievariante darstellen [Masuhr & Neumann 2005; Kretschmer et al. 2014]. Ist die Kontinuität erhalten geblieben, hat aber eine Erholung der Nervenfunktion nach konservativer Therapie nicht eingesetzt, sollte eine Exploration des Nerven und gegebenenfalls eine Rekonstruktion oder Neurolyse durchgeführt werden [Masuhr & Neumann 2005; Pschyrembel 2007; Krischek & Feigl, 2008].

## **Operative Therapie**

Bei allen Kontinuitätsunterbrechungen und bei schweren Neurotmesisschäden sollte eine operative Nervennaht oder ggf. eine Nerven transplantation zum Einsatz kommen [Masuhr & Neumann 2007].

Im Sinne des Tissue Engineering wird mittels künstlicher Materialien eine Nervenleitschiene als Alternative zu autologen Nerven transplantaten und Nerven nähten verwendet. Solche sogenannten Nervenkonduits sollen den intrinsischen Regenerationsprozess unterstützen und beschleunigen [Guenard et al. 1992; Bryan et al. 1996; Anselin et al. 1997; Levi et al. 1997; den Dunnen et al. 1996; Fansa et al. 2001].

## **4. Ziel der Studie**

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war die Etablierung eines Rattenmodells. Für dieses wurde der traumatisierte quergestreifte Skelettmuskel der Versuchstiere untersucht, dessen innervierender Nerv unterschiedlich starke Schädigungsgrade zusätzlich erhielt. Hierbei wurde nicht Muskel und Nerv einzeln betrachtet, sondern die Traumatisierung und ihre Wiederherstellung als Muskel-Nerven-Kombination untersucht. Dabei wurde auf die folgenden Fragen näher eingegangen:

1. Kann der gewählte Kraftgrad der nervalen und muskulären Trauma induktion sowie der Beobachtungszeitraum im Hinblick auf das Regenerationspotential aussagekräftige Ergebnisse für ein grundlegendes Tiermodell erbringen ?
2. Wie stark beeinflusst ein zusätzliches Nerven trauma die Regeneration des Muskel?
3. Wie beeinflusst ein zusätzliches Nerven trauma immunohistochemisch das apoptotische und proliferative Zellverhalten im traumatisierten Skelettmuskel?
4. Welche Auswirkung hat die kombinierte Muskel-Nerven-Verletzung auf das Schmerzverhalten?
5. Ist eine muskuläre und/ oder nervale Regeneration zu physiologischen Werten im verwendeten Beobachtungszeitraum möglich?

## **5. Material und Methoden**

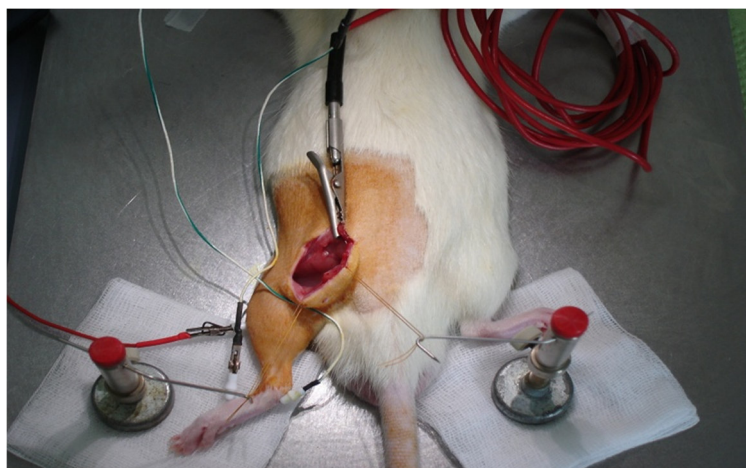
### **5.1. Versuchstiere**

Die Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten mit einem anfänglichen Körpergewicht von 275-325 g durchgeführt. Vor Beginn der experimentellen Untersuchungen wurden die

Tiere für mindestens eine Woche in einem klimatisierten Raum der Tierhaltung des Institutes für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar; Tierschutzbeauftragter Dr. rer. nat. H. Stein) artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in Einzellaborkäfigen bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter ad libitum gehalten. Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz genehmigt (LVL-MV/TSD/7221.3-1.1-049/04).

## 5.2. Narkose und chirurgische Präparation

Die Anästhesie der Tiere wurde mit Pentobarbital (55 mg/kg KG; Narcoren; Merial GmbH, Hallbergmoos) intraperitoneal eingeleitet. Anschließend wurden die Tiere am Abdomen, Rücken und den gesamten Hinterbeinen rasiert, mit Povidon-Jod desinfiziert (Betasisodona®; Mundipharma, Limburg, Deutschland) und in Bauchlage positioniert. Die Körperkerntemperatur wurde mittels Heizplatte (und rückgekoppelter rektaler Sonde) konstant bei 36-37°C gehalten. Das rechte Hinterbein wurde mittels Klebefilm über der jeweiligen Pfote fixiert. Der Hautschnitt für die Präparation des Nerven erfolgte zirka ab der Mittellinie des Rückens schräg hinunter bis zirka zum Hüftgelenk über etwa 2,5 cm. Durch stumpfes Auseinanderspreizen der Muskulatur wurde der N. ischiadicus freigelegt. Für eine exaktere und leichtere Durchführung der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit durch das Anhalten von Elektroden an den Nerven wurde die Haut ober- und unterhalb des Hautschnittes an jeweils zwei Fäden nach lateral und medial an Haken aufgespannt (Abbildung 12). Hierdurch wird ein freier Zugang zum Nerven ermöglicht.



**Abbildung 12** *Abbildung der Lagerung des Versuchstiers und Anbringung der Elektroden.*

Für die Präparation des M. soleus wurde das Tier in der eben angeführten Position belassen und zunächst ein Hautschnitt entsprechend des Verlaufs des Muskels vom Sprunggelenk bis zur Patella über zirka 2,5 cm gesetzt. Durch stumpfes Abtrennen der Muskelfaszie von der Haut wurde diese freigelegt und daraufhin der Länge des Muskels nach ähnlich dem Hautschnitt eröffnet. Daraufhin konnte der Muskel vorsichtig stumpf mit Wattestäbchen vom M. gastrocnemius freipräpariert und somit einzeln dargestellt werden.

Alle Eingriffe wurden mit mikrochirurgischen Instrumenten und unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **5.3. Traumamodell**

#### **5.3.1. Traumamodell des Skelettmuskels**

Für die Herstellung eines traumatischen Muskelschadens wurde eine instrumentierte Klemme verwendet. Diese ist leicht gebogen und die Branchen mit Polyethylenschläuchen überzogen, um die Verletzung der Muskelfaszie zu vermeiden. Für die Einstellung des mit der Klemme ausgeführten Drucks war eine computergestützte Eichung vorgenommen worden. Auf diese Weise konnte am freigelegten Muskel eine standardisierte Kontusion mit einer konstanten Kraft von 25 N durchgeführt werden (DMC PLUS, HBM Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Deutschland). Dabei wurde der Muskel an 7 verschiedenen Stellen (drei oberhalb und vier unterhalb des zentralen Gefäßbündels) quer zur Längsrichtung des Muskelverlaufs für jeweils 10 Sekunden mit gleichem Kraftgrad geklemmt. Das neurovaskuläre Gefäßbündel musste sorgsam ausgespart werden, um eine weiterhin ungestörte nervale und vaskuläre Versorgung des Muskels zu ermöglichen. Schließlich wurde posttraumatisch der Muskel mit 0,9 %iger NaCl-Lösung lavagiert und anschließend sowohl die Faszie als auch die Haut mit resorbierbaren Prolenfäden der Stärke 4-0 vernäht. Die verschlossene Wunde wurde nochmals antiseptisch mit Povidon-Jod gereinigt und mit Sprühpflaster (Opsite Spray, Smith & Nephew GmbH, Schenefeld, Deutschland) versorgt.

#### **5.3.2. Traumamodell des Nerven**

Nach Freilegung des N. ischiadicus und Offenhalten der Wunde durch an Haken befestigten Fäden wurde der Nerv -abhängig von der Versuchsgruppe- ebenfalls mit der gleichen Klemme für 30 Sekunden mit 25 N auf etwa der Hälfte der Oberschenkel-Länge proximal vom Abgang des N. peroneus com. gequetscht (DMC PLUS, HBM Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Deutschland), mittels einer mikrochirurgischen Schere durchtrennt oder lediglich von

den Branchen der standardisierten Klemme umfasst und jeweils mit 0,9 %iger NaCl-Lösung umspült worden. Schließlich wurde der Hautschnitt mit Einzelknopfnähten verschlossen, mit Povidon-Jod desinfiziert und mit Sprühpflaster (Opsite Spray, Smith & Nephew GmbH, Schenefeld, Deutschland) versorgt.

#### 5.4. Versuchsgruppen und experimentelles Protokoll

Für die Versuche wurden 12 Gruppen (Sham-, Crush-, Trans-Gruppe mit jeweils 4 unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen) mit je 6 männlichen Wistar-Ratten verwendet. Eine derartige Gruppengröße stellt die Grundlage zur Ermittlung signifikanter Werte.

Die Traumatisierung des M. soleus wurde an jedem Tier jeder Versuchsgruppe durchgeführt. Sowohl bei der Präparation des Muskels als auch des N. ischiadicus wurde 0,9 %ige NaCl-Lösung zum Lavagieren verwendet. In der Kontusionsgruppe wurde der N. ischiadicus zusätzlich mittels der instrumentierten Klemme für 30 Sekunden gequetscht und in der Transsektionsgruppe zusätzlich mit einer mikrochirurgischen Schere durchtrennt. Eine Kontrollgruppe mit vollständig intaktem N. ischiadicus ist außerdem einbezogen worden. Hier wurde nur das muskuläre Trauma gesetzt und der Nerv nach seiner Freilegung nicht geschädigt (Sham-Operation).

Nach der Randomisierung wurden die Tiere verschiedenen Gruppen zugeteilt und an den Tagen 1, 7, 14 und 42 die abschließenden Untersuchungen vorgenommen (Abbildung 13).

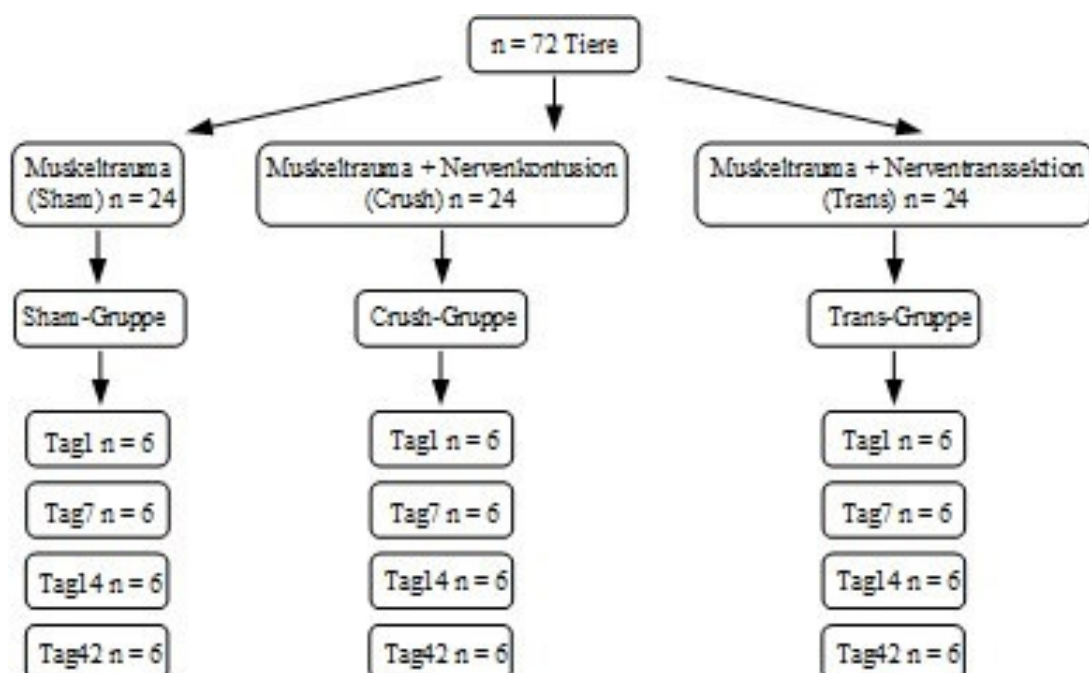


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen.

Nach regelmäßiger Prüfung des Schmerzempfindens der Tiere wurde die Pentobarbitaldosis dem aktuellen Bedarf angepasst. Die finalen Untersuchungen dauerten ca. eine Stunde. Das Blut für die abschließende Vollblutanalyse wurde durch Herzpunktion gewonnen.

## 5.5. Untersuchungsmethoden

### 5.5.1. Schmerztest nach von Frey

Insgesamt wurden alle Untersuchungen des schmerzassoziierten Verhaltens nach gültigen ethischen Grundregeln, wie sie von der Internationalen Vereinigung zum Studium des Schmerzes (International Association for the Study of Pain, IASP) vorgegeben sind, durchgeführt. Die Schmerztestung erfolgte dabei jeweils an Tag 0 vor nervaler und muskulärer Traumainduktion sowie an den finalen Untersuchungstagen.

Zur Ermittlung der mechanischen Schmerzschwelle wurde die Ratte zuerst in einen allseitig einsehbaren Käfig mit Maschenboden (0,6x 0,6 cm große Zwischenräume) gesetzt und dann zehn Minuten zur Gewöhnung an die neuen Umgebungsverhältnisse abgewartet. Danach wurde die Hinterpfote durch geeichte von Frey-Filamente (Semmes-Weinstein Monofilaments, North Coast Medical, Inc., Morgan Hill, CA, USA) der Stärken 0,6 g bis 15,0 g (5,83 mN bis 147 mN) stimuliert (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** *Abbildung der verschiedenen genutzten von Frey-Filamente in den Stärken 0,6 g, 1,4 g, 2,0 g, 6,0 g, 10,0 g und 15,0 g.*

Ein einzelner Durchgang enthielt sechs Stimulationen mit einer Frequenz von 1/s. Es wurden fünf Durchgänge in einem Intervall von drei Minuten durchgeführt. Die Reaktionen auf die Stimulation wurden in jedem dieser fünf Durchgänge prozentual angegeben (Formel: Anzahl der Reaktionen/ 30 x 100) [Chaplan et al. 1994]. Die Testung wurde für jede Filamentstärke durchgeführt. Begonnen wurde jeweils mit dem 0,6 g-Filament.



### 5.5.2. Biomechanische Untersuchung

Für die biomechanische Kraftmessung nach Matziolis et al. [Matziolis et al. 2006] wurden die Tiere mit Pentobarbital (55 mg/kg KG; Narcoren; Merial GmbH, Hallbergmoos) narkotisiert, der Rücken und die gesamten Hinterbeine beidseits rasiert, die Tiere in die Bauchlage auf einer Heizplatte positioniert und die rasierten Bereiche mit Braunoderm Hautdesinfektion gereinigt. Daraufhin erfolgte mittels mikrochirurgischer Instrumente beidseits die Präparation des N. ischiadicus und des M. soleus wie bereits beschrieben. Anschließend wurde die Durchtrennung der Achillessehne und das Abpräparieren aller Sehnen, die noch am M. soleus inserierten, vorgenommen. Auf diese Weise ist der Muskel in seiner Kraftwirkung vollkommen eigenständig bewertbar. Im Bereich der Ansatzsehne des M. soleus wurde ein Faden (Prolen 4-0) für die Untersuchung der Muskelkraft angebracht (Abbildung 15).

Das Tier wurde in die Kraftmessapparatur (Experimentaria, Budapest, Ungarn) umgelagert und in dieser positioniert. Dazu wurde das jeweilige zu untersuchende Hinterbein und seine Gelenke in eine physiologische Neutralnullstellung gebracht und das Hinterbein im Knie- und im Sprunggelenk fixiert. Auf diese Weise kann eine isometrische Kontraktion sichergestellt werden. Daraufhin wurde der Faden in der Ansatzsehne des M. soleus an der Transduktionseinheit des Messgerätes angebracht. Mittels des beweglichen Manipulators konnte die Extremitätenpositionierung optimiert und eine Vordehnung des Muskels von 20 g erreicht werden.



**Abbildung 15:** Versuchseinrichtung mit biomechanischer Kraftmessung an der Ratte. Zur indirekten Stimulation des M. soleus wurde der N. ischiadicus in eine gebogene Elektrode eingelegt. Der M. soleus wurde durch Anbringen einer Naht am Sehnenansatz in die Versuchseinrichtung eingespannt. Während computerunterstützter Gabe von elektrischen Reizen wurde die resultierende Muskelkraft -transferiert durch eine Messeinrichtung- digital aufgenommen.



Anschließend wurde für die indirekte Stimulation des M. soleus über den N. ischiadicus der Nerv in die Stimulierungselektrode gelegt und zur Optimierung der Leitfähigkeit die Kontaktstelle von Nerv und Elektrode mit 0,9%iger NaCl-Lösung umspült. Für die direkte Reizung des Muskels ist die Stimulierungselektrode an den Muskel gelegt und auch hier die Kontaktstelle mit 0,9%iger NaCl-Lösung umspült worden. Schließlich konnte nun die Messung der Kontraktionskraft des M. soleus durch das Experimentarie-Messsystem erfolgen. Dabei können sowohl die neuromuskuläre Konduktion als auch die kontraktile Funktionen des entsprechenden Muskels untersucht werden. Das System besteht aus dem Drei-Panel-Manipulator zur Veränderung der Position des FSG-01 Krafttransduktors, dem Krafttransduktor, AM-04-Manipulator, der Stimulierungselektrode, einer Verbindung zu Kraftumwandlern und dem Halterungs- und Fixierungsapparat. Vom Transduktor wird ein mechanisches Signal an den Kraftumwandler gesendet und von diesem in einen elektrischen Impuls transformiert. Dieser wird später von einer speziellen Software ausgewertet.

Für die Untersuchung wird der Nerv mittels eines bipolaren Signals mit 9 mA und 75 Hz fünfmal stimuliert. Die Reizdauer betrug 0,1 Sekunde (8 Perioden), die Intervalle zwischen den einzelnen Reizen 5 Sekunden [Matziolis et al. 2006]. Auf diese Weise wurden Einzelzuckungen -single twitch- erzeugt. Durch die Verlängerung der Reizdauer auf 3 Sekunden konnte eine tetanische Kontraktion -tetanus- erzeugt werden. Die Stärke der Kontraktionskraft im Einzel- und Tetanusmodus wurde durch die Berechnung des Mittelwertes der Amplituden von fünf aufeinander folgenden Muskelreaktionen erhalten. Nach Beendigung der Kontraktionskraftmessung der gesunden Seite (rechtes Bein) erfolgte die Messung an der traumatisierten Seite (linkes Bein). Die Ergebnisse der Muskelkraft sind durch das Verhältnis der Kraft des traumatisierten Muskels zu der des gesunden Muskels der kontralateralen Seite derselben Ratte ermittelt worden. Abschließend wurde der Muskel dem Tier beidseits entnommen und für weitere Untersuchungen wie die Ermittlung des Muskelfeuchtgewichts sowie histomorphologische Auswertungen asserviert.

#### Stimulierungsprotokoll:

Fast twitch: 9 mA/ 75 Hz, 5-mal für je 0,1 s bipolare Stimulation mit 5 s Intervallen zwischen den Impulsen.

Tetanus: 9 mA/ 75 Hz, 5-mal für je 3 s bipolare Stimulation mit 5 s Intervallen zwischen den Impulsen.

### **5.5.3. Nervenleitgeschwindigkeit**

Alle Tiere der Sham- (n=24) und der Kontusionsgruppe (n=24) wurden der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit unterzogen. Die erste Messung an jedem Tier erfolgte vor Traumainduktion, die zweite am letzten Tag der entsprechenden Versuchsgruppe (Tag 1, 7, 14 oder 42) vor der Untersuchung der Muskelkraft. Der Nerv wurde dabei an zwei verschiedenen Stellen stimuliert. Zum einen wurde ein Impuls proximal des Kontusionsbereichs nahe des Austrittspunktes des N. ischiadicus aus dem Foramen ischiadicum majus gesetzt, zum anderen distal der Läsionsstelle im gleichen Abstand wie bei der proximalen Reizung zur Kontusionsstelle. Zur Reizung wurden Rechteck-Stromstöße mit einer Dauer von 0,1 ms (supramaximaler Intensität) und einer Frequenz von 0,2 Hz (A320; World Precision Instruments, Berlin, Germany) unter Verwendung eines PCs (LabView software, National Instruments, Austin, TX, USA) appliziert. Zur Ableitung der durch den Stromreiz ausgelösten Muskelkontraktion ist eine Nadelelektrode (Meditronic Functional Diagnostics, Skovlunde, Dänemark) in der Extensorengruppe der hinteren Gliedmaße der Ratte positioniert worden. An der Dorsalseite wurde zwischen dem Mittelfußknochen die Referenzelektrode gesetzt. Außerdem ist eine Erdungselektrode subcutan plantar appliziert worden. Die erhobenen Daten wurden in einem Bereich zwischen 30 HZ und 1,3 kHz gefiltert und mit 1V/mV verstärkt (EXT-10C; Verstärker, npi electronics, Tamm, Germany). Die Körperkerntemperatur der Ratte wurde durch eine Heizplatte über den gesamten Zeitraum der Messung konstant auf 36-37 °C gehalten. Die Weiterverarbeitung und Auswertung der erhaltenen Daten wurde mit Hilfe der LabView-Software am PC durchgeführt. Durch diese Experimentieranordnung konnte die nervale und muskuläre Antwort auf einen elektrischen Reiz mit Latenz der Muskelkontraktion sowie die notwendige Reizstärke für die Erzeugung einer Muskelkontraktion ermittelt werden.

### **5.5.4. Histomorphologie des M. soleus**

Für die lichtmikroskopische Untersuchung des M. soleus wurde am Ende der in vivo-Versuche die Skelettmuskulatur entnommen und in 4%iger Formalinlösung 2-3 Tage fixiert. Anschließend erfolgte die Einbettung des Muskelgewebes in voller Muskellänge in Paraffin. Daraufhin wurden von den Gewebeblöcken 4 µm Serienschnitte in longitudinaler Richtung von proximal nach distal angefertigt.

#### **5.5.4.1. Apoptose: TUNEL-Methode**

Für den histomorphologischen Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen wurden die Muskeln in Paraffin eingebettet und von den Gewebeblöcken 4 µm starke Serienschnitte

angefertigt. Diese Schnittpräparate sind daraufhin mittels TUNEL-Methode untersucht worden (ApoTag; Shemicon International Inc., Temecula, CA, USA).

Dabei erfolgte die quantitative Analyse auf dem Auflichtmikroskop (Axioskop 40; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) unter Verwendung eines 40x Objektives (Achromplan, Zeiss, 0,65 NA). In den nach TUNEL-Methode angefertigten Schnittpräparaten fand die quantitative Auswertung durch Auszählen von TUNEL-positiven Zellen in 25 Gesichtsfeldern statt (angegeben wurde die Anzahl der Zellen pro Fläche  $n/mm^2$ ).

#### **5.5.4.2. Proliferation: BrdU-Färbung**

Für den immunhistologischen Nachweis proliferierender Zellen wurde den Tieren 48 Stunden vor der abschließenden Untersuchung BrdU in der Konzentration 50 mg/kg KG i.p. appliziert. Die Paraffinschnitte des Muskels wurden schließlich mittels der BrdU-Methode analysiert. Die Schnittpräparate wurden zunächst Mikrowellen ausgesetzt, um eine Antigendemaskierung zu erreichen. Die erste Behandlung erfolgte für 18 Stunden bei 4°C mit dem monoklonalen Anti-BrdU-Primärantikörper (1:50; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland). Nach dem Waschen und damit der Entfernung überschüssiger Primärantikörper wurde das Präparat mit einem Sekundärantikörper (HRP (horseradish peroxidase gekoppelter Antikörper) inkubiert, welcher sich an den Primärantikörper bindet. Dann wird das Präparat mit 3,3'Diaminobenzidin gefärbt und daraufhin die Gegenfärbung mit Hämalun durchgeführt. Abschließend werden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und mit einer Klebeschicht und einem Deckglas versehen.

Zur quantitativen Auswertung wurde das Lichtmikroskop (Axioskop 40; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einem 40x Objektiv (Achromplan, Zeiss, 0,65 NA) verwendet. Hierbei wurden die BrdU-positiven Zellen in 10 Gesichtsfeldern in der Penumbrazone ausgezählt. Die Penumbra -die ischämische Randzone- ist die Zone, die unmittelbar an den Bereich der zentralen Nekrose angrenzt. Bei der Zählung wurden die proliferierenden Zellen direkt unterhalb der Basalmembran als Satellitenzellen gewertet. Entsprechend wurden BrdU-positive Zellen im Interstitium als Fibroblasten und in der Nähe der Blutgefäße als proliferierende Endothelzellen gezählt. Die BrdU-positiven Zellen dieser drei Zellreihen wurden einzeln ausgezählt und als Zellzahl pro 10 Myozyten präsentiert, wie von Ferreira und Mitarbeitern [Ferreira et al. 2006] beschrieben.

### **5.5.5. Muskelfeuchtgewicht**

Am letzten Tag des jeweiligen Untersuchungszeitraumes wurde nach der biomechanischen Kraftmessung der Ratte sowohl der linke traumatisierte als auch der rechte gesunde M. soleus entnommen. Die Gewichte beider Muskeln wurden daraufhin bestimmt und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

### **5.5.6. Vollblutanalyse**

Nach Beendigung der finalen Untersuchungen wurde an jedem Tier arterialisiertes Blut aus dem Herzen entnommen. Für die Blutgasanalyse wurde eine heparinisierte Glaskapillare mit ca. 90 µl Blut verwendet. Anschließend konnten die arteriellen Partialdrücke von Sauerstoff (PaO<sub>2</sub>) und Kohlendioxid (PaCO<sub>2</sub>), pH, Hkt und BE bestimmt werden (Rapidlab 348; Bayer Vital, Fernwald, Germany). Zur Erstellung des Blutbildes wurde das arterielle Blut in 200 µl EDTA-Röhrchen abgenommen und anschließend mittels eines Blutanalysengerät (Rapidlab 348) die systemische Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration bestimmt.

## **5.6. Statistische Auswertung**

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW $\pm$ SEM) angegeben. Dabei rekrutieren sich die Mittelwerte der einzelnen Parameter aus den Einzelwerten pro Tier pro Versuchsgruppe. Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels „one way analysis of variance“ (ANOVA) gefolgt vom Student's t-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Signifikante Unterschiede von Werten innerhalb einer Gruppe wurden mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen geprüft.

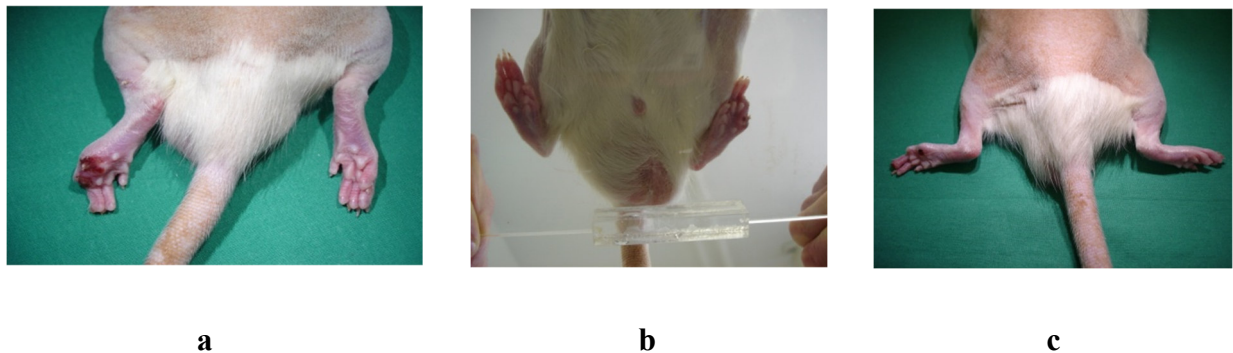
Die graphische Darstellung sämtlicher statistischer Tests wurde unter Verwendung des Software Pakets SigmaPlot Version 9.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt. Unterschiede wurden bei  $p < 0,05$  als signifikant angesehen [Stratos et al. 2010].

## **6. Ergebnisse**

### **6.1. Verhalten**

Alle Tiere erwachten nach Traumainduktion aus der Narkose ohne Komplikationen. Die Ratten zeigten nach wenigen Stunden eine Wiederaufnahme des physiologischen Ess- und Trinkverhaltens. Es ließen sich in keiner Versuchsgruppe Infektionen an der operierten Extremität feststellen. In den ersten Tagen konnte jedoch ein Schonverhalten des linken Hinterlaufs beo-

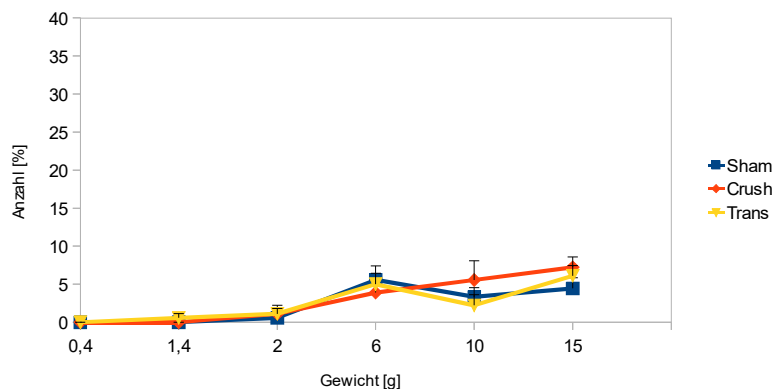
bachtet werden. Einige Tiere aus den Transsektionsgruppen für 14 und 42 Tage entwickelten ein autoaggressives Verhalten (Abbildung 16a-c).



**Abbildung 16a-c:** Die Bilder zeigen Versuchstiere, die ein autoaggressives Verhalten im Verlauf der Beobachtungszeit entwickelten. Sie bissen sich nach einer Zeit von mehr als 7 Tagen die Zehen des traumatisierten Beines ab und zeigten ein verstärktes Schonverhalten des jeweiligen Hinterlaufs.

## 6.2. Schmerztest nach von Frey

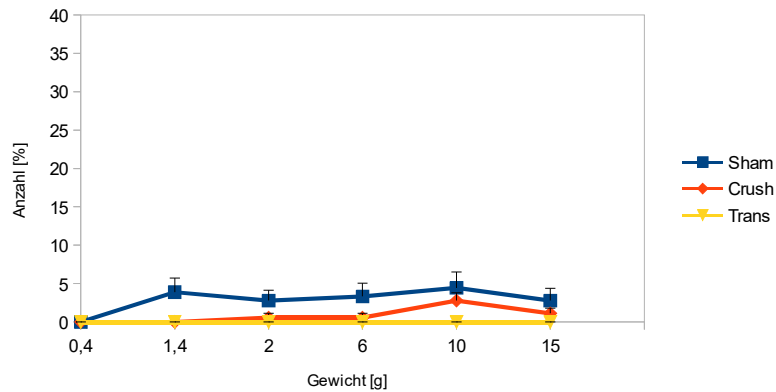
Bei der präoperativen Testung der Tiere am Tag 0 ergaben sich in jeder Versuchsgruppe Normwerte gemäß eines physiologischen Schmerzverhaltens mit einer maximalen Abwehrreaktion von 4-5% bei Filamenten mit 6 g und 7-12% bei 15 g (Abbildung 17).



Tag 0

**Abbildung 17:** Dargestellt ist die Schmerzreaktion der linken traumatisierten hinteren Extremität als prozentualer Anteil bei Tieren der Sham-, Crush- und Transsection-Gruppe jeweils  $n = 6$  am Tag der Traumatisierung (Tag 0) mit den verschiedenen Stärken der von Frey-Filamente. Angegeben sind  $MW \pm SEM$

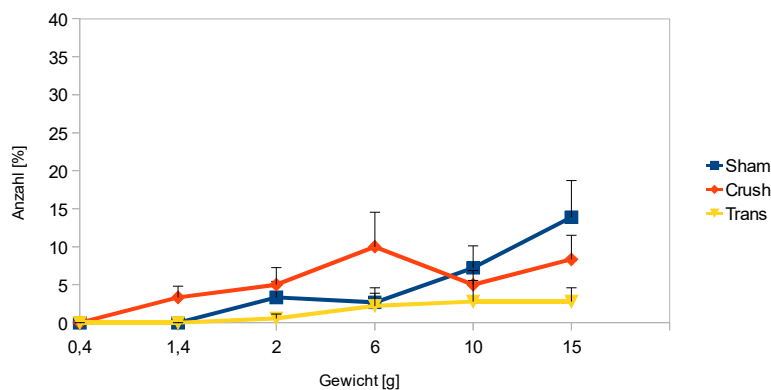
Am Tag 1 nach Traumatisierung zeigten die Tiere der Sham-Gruppe bei kleinen Filamentstärken von 1,4 g und 2 g einen deutlichen Anstieg der Schmerzreaktion mit einer Zunahme von 0 am Tag 0 auf bis zu 4% am Tag 1 (Abbildung 18).



Tag 1

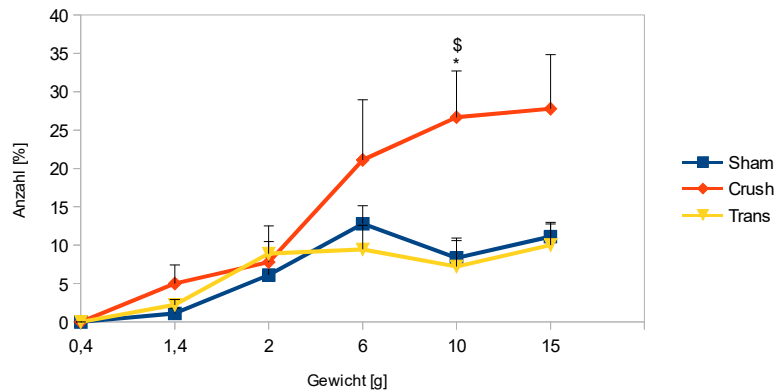
**Abbildung 18:** Dargestellt ist die Schmerzreaktion der linken traumatisierten hinteren Extremität als prozentualer Anteil bei Tieren der Sham-, Crush- und Transsection-Gruppe jeweils  $n = 6$ ) am Tag 1 nach Traumatisierung mit den verschiedenen Stärken der von Frey-Filamente. Angegeben sind  $MW \pm SEM$

An den folgenden Untersuchungstagen erhöhte sich die Schmerzreaktion v.a. bei höheren Filamentstärken von 6-15 g auf bis zu 14% (Tag 7) (Abbildung 19). Eine Normalisierung der Werte auf das Ausgangsniveau zeigte sich erst ab Tag 42 (Abbildung 21).



Tag 7

**Abbildung 19:** Dargestellt ist die Schmerzreaktion der linken traumatisierten hinteren Extremität als prozentualer Anteil bei Tieren der Sham-, Crush- und Transsection-Gruppe jeweils  $n = 6$ ) am Tag 7 nach Traumatisierung mit den verschiedenen Stärken der von Frey-Filamente. Angegeben sind  $MW \pm SEM$

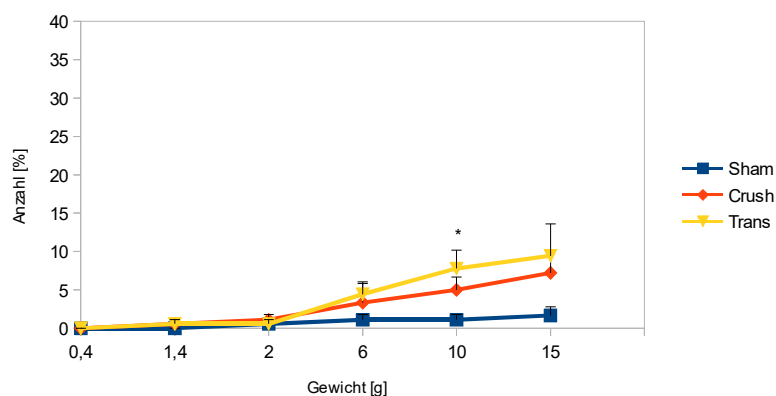


Tag 14

**Abbildung 20:** Dargestellt ist die Schmerzreaktion der linken traumatisierten hinteren Extremität als prozentualer Anteil bei Tieren der Sham-, Crush- und Transsektions-Gruppe jeweils  $n = 6$ ) am Tag 14 nach Traumatisierung mit den verschiedenen Gewichten der von Frey-Filamente. Angegeben sind  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham, \$  $p < 0,05$  vs. Trans.

Auf eine detaillierte Betrachtung kleinerer Filamentstärken wurde im Folgenden aufgrund der geringeren Aussagekraft weitestgehend verzichtet.

Die Crush-Gruppe zeigte am Tag 1 nach Trauma-induktion eine deutliche Verminderung der Schmerzreaktion auf bis zu 0,5% und damit eine Reduktion um 87% im Vergleich zu Sham-operierten Tieren (Abbildung 18). Bis zum Untersuchungstag 14 stiegen die Werte der Crush-Gruppe stark an auf bis zu 28%. Damit waren die Werte um bis zu 54% höher als bei den Tieren der Sham-Gruppe und um 64% höher als bei Tieren der Trans-Gruppe (Abbildung 20).



Tag 42

**Abbildung 21:** Dargestellt ist die Schmerzreaktion der linken traumatisierten hinteren Extremität als prozentualer Anteil bei Tieren der Sham-, Crush- und Transsektions-Gruppe jeweils  $n = 6$ ) am Tag 42 nach Traumatisierung mit den verschiedenen Gewichten der von Frey-Filamente. Angegeben sind  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham.

Bis zum Tag 42 kam es jedoch zum vollständigen Rückgang der Schmerzreaktion auf physiologische Werte (Abbildung 21).

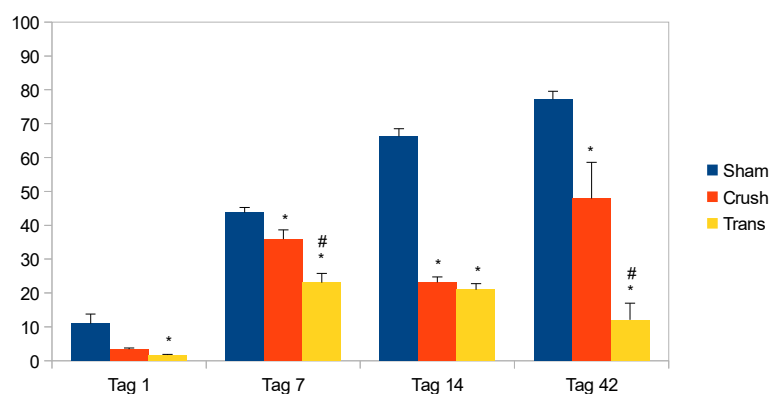
Bei Tieren mit zusätzlich durchtrenntem Nerv zeigte sich die anfängliche Plegie, wie sie auch bei Tieren der Crush-Gruppe mit verminderter Schmerzreaktion zu beobachten war, bis zum Untersuchungstag 7 mit 80% weniger Schmerzreaktion im Vergleich zu Sham-Tieren und 70% weniger im Vergleich zu Crush-Tieren (Abbildung 19). Bis zum 14. Tag erhöhten sich jedoch die Werte und waren um nur ~21% geringer als die Werte der Tiere der Sham-Gruppe an diesem Untersuchungstag (Abbildung 20). Allerdings blieben sie auf gleichem Niveau bis zum Tag 42 (Abbildung 21). Ein Rückgang zu physiologischen Werten kann hier nicht beobachtet werden.

### 6.3. Biomechanische Untersuchung

Die Amplitude der Kontraktionskraft betrug für den nicht traumatisierten Muskel im Mittelwert ca. 0,56 N für die Einzelzuckung und ca. 1,01 N für die tetanische Kontraktion.

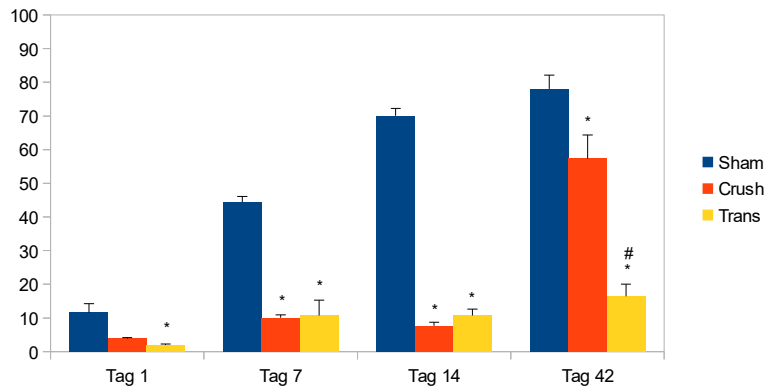
#### 6.3.1. Kurzkontraktion

In der Kontrollgruppe kam es zunächst am 1. postoperativen Tag zu einer starken Reduktion der Kontraktionskraft auf ~11% (Abbildung 22a). Jedoch zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme auf bis zu 78% am Tag 42. Physiologische Werte konnten folglich, obwohl es zu keiner zusätzlichen Nervenläsion kam, selbst bis zu diesem Zeitpunkt nicht erreicht werden (Abbildung 22a-b).



*a) Kurzkontraktion direkte Stimulation*





#### **b) Kurzkontraktion indirekte Stimulation**

**Abbildung 22 a-b:** Darstellung der Kraftentwicklung bei Kurzkontraktion des geschädigten *M. soleus* durch das jeweilige Verhältnis der Kraft des traumatisierter Muskels zur gesunden Gegenseite im Verlauf der Untersuchung an den Tagen 1, 7, 14 und 42 für die Sham-Gruppe (blau,  $n=6$ ), die Crush-Gruppe (rot,  $n=6$ ) und die Trans-Gruppe (gelb,  $n=6$ ). Abbildung 23a zeigt dies bei direkter und 23b bei indirekter Stimulation. Angegeben sind  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. Crush.

Nach Trauma-induktion stellte sich am Tag 1 bei Tieren der Crush-Gruppe eine bedeutend stärkere Abnahme der Muskelkraft im Vergleich zu Tieren der Sham-Gruppe dar. Sie zeigten um ~73% reduzierte Kraftwerte gegenüber Tieren ohne Nerven-trauma an diesem Tag. Zwar zeigten Tiere mit zusätzlich gequetschtem Nerv bis zum Tag 7 eine Zunahme der Kontraktionskraft um ~33% und verzeichneten damit die gleiche Regenerationskraft der Muskelkraft wie Kontrolltiere. Jedoch kam es bis zum Tag 14 zu einer erneuten Reduktion um dann 13%. Vom Tag 14 zu 42 konnte allerdings mit 56% mehr Kraftzunahme im Vergleich zu Sham-Tieren ein stärkeres Regenerationspotential in diesem Zeitraum ermittelt werden (Abbildung 22a). Bis zum längsten Untersuchungszeitpunkt beträgt jedoch der finale Wert mit 48% nur 62% der Kontraktionskraft, die Tiere der Kontrollgruppe erreichen konnten.

Tiere der Transsektions-Gruppe wiesen die geringste Muskelkraft am 1. postoperativen Tag in allen Versuchsgruppen und -zeiten auf. Nachdem auch diese Tiere bis zum Tag 7 einen anfänglichen Kraftzuwachs zeigten, sank die Kontraktionskraft daraufhin kontinuierlich ab und betrug am Tag 42 schließlich nur noch 15% der erreichten Kraft der Sham-Tiere (Abbildung 22a).

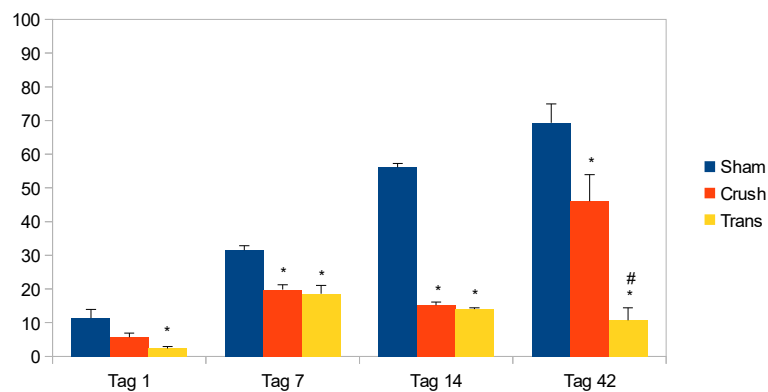
Bei beiden Untersuchungsgruppen mit zusätzlicher Nervenläsion konnte an den Untersuchungstagen 7 und 14 ein deutliches Kraftdefizit durch indirekte Stimulation des Muskels über den N. ischiadicus beobachtet werden (Abbildung 22b). Jedoch kam es bis zur finalen Untersuchung nach 42 Tagen zur weitestgehenden Angleichung der Werte, sodass in

beiden Gruppen schließlich die indirekte Reizung bis zu 10% (Crush-Gruppe) bzw. 4% (Trans-Gruppe) mehr Kontraktionskraft erzeugte (Abbildung 22a-b).

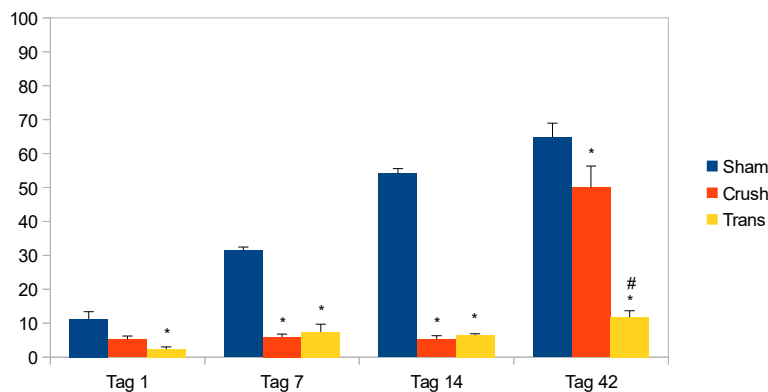
### 6.3.2. Tetanie

Die Ergebnisse der Muskelkraft sowohl in der direkten als auch in der indirekten Messung zeigten in allen Versuchsgruppen eine annähernd gleiche Kinetik wie bei der eben beschriebenen Kurzkontraktion, jedoch insgesamt auf einem reduzierten Niveau (Abbildung 23 a-b).

In der Crush-Gruppe konnte allerdings im Vergleich zur Kurzkontraktion im Zeitraum zwischen dem 14. und 42. Tag mit 5% weniger Kraftzuwachs in der indirekten Messung ein geringeres Regenerationspotential und mit 6% mehr Kraftzuwachs in der direkten Messung hier ein größeres Regenerationspotential beobachtet werden (Vergleich Abbildung 22a-b und 23 a-b).



**a) Tetanie direkt Stimulation**



**b) Tetanie indirekte Stimulation**

**Abbildung 23 a-b:** Darstellung der tetanischen Kraftentwicklung des geschädigten *M. soleus* durch das jeweilige Verhältnis der Kraft des traumatisierter Muskels zur gesunden Gegenseite im Verlauf der Untersuchung an den Tagen 1, 7, 14 und 42 für die Sham-Gruppe (blau,  $n=6$ ), die Crush-Gruppe (rot,  $n=6$ ) und die Trans-Gruppe (gelb,  $n=6$ ). Abbildung 24a zeigt dies bei direkter und 24b bei indirekter Stimulation. Angegeben sind  $MW \pm SEM$ , ANOVA Holm-Sidak, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. Crush.

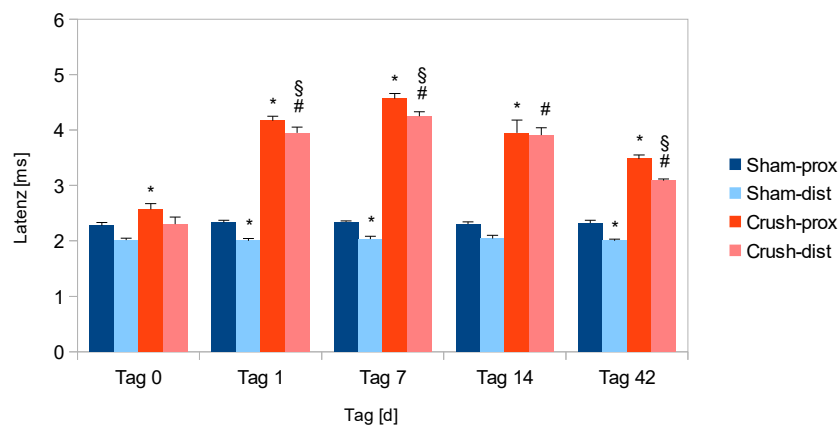
Bei Tieren mit zusätzlich durchtrenntem Nerven kam es mit nur 4% zu einer geringeren Kraftabnahme in der Tetanie von Tag 14 zu 42 als bei der Kurzkontraktion (9%).

Insgesamt konnte aber in allen Versuchsgruppen beobachtet werden, dass die tetanische Muskelkraft bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt unter der Kraft bei Einzelzuckung lag und somit ebenfalls keine physiologischen Werte erreichte (Vergleich Abbildung 22a-b und Abbildung 23a-b).

#### 6.4. Nervenleitgeschwindigkeit

Die Latenz betrug bei den Sham-operierten Tieren zu allen Untersuchungszeitpunkten proximal  $2,31 \pm 0,01$  ms und distal ca.  $2,01 \pm 0,01$  ms. Die Amplituden zeigten Werte von  $0,19 \pm 0,01$  mA proximal und  $0,23 \pm 0,01$  mA distal über den gesamten Untersuchungszeitraum. Direkt nach nervaler Kontusion stieg die Latenz distal gering auf 2,34 ms an. Die Amplitude entsprach annähernd dem Ausgangswert. Die proximale Messung ergab zu diesem Zeitpunkt keine verwertbaren Potenziale.

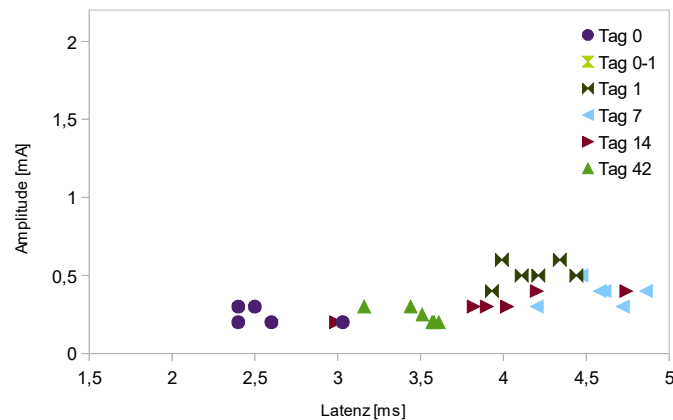
Im Verlauf stieg die Latenz und hat bis zum Tag 7 um ca. 44% proximal und 46% distal zugenommen. An beiden Messorten fand eine Reduktion der ermittelten Latenzwerte bis zum Tag 42 statt. Jedoch blieb sie noch mit einer Zunahme von ~26% im Vergleich zu physiologischen Ausgangswerten erhöht (Abbildung 24).



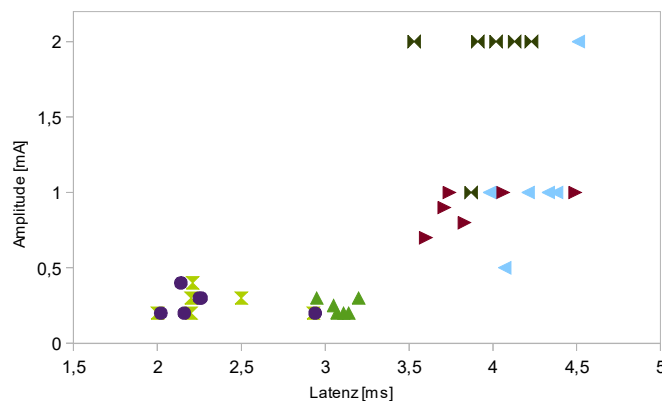
**Abbildung 24:** Diagramm der Latenz der Nervenleitgeschwindigkeit an Sham- und Crush-operierten Tieren proximal und distal des Kontusionsbereichs direkt nach der

*Traumatisierung sowie an den Tagen 1, 7, 14, und 42 nach Trauma. Aufgeführt sind MW  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham-prox, #  $p < 0,05$  vs. Sham-dist, §  $p < 0,05$  vs. Crush-prox.*

Auch die Amplitudenwerte nahmen bis zum Tag 7 zu. Vor allem bei der distalen Messung konnte eine Steigerung um 75% verzeichnet werden (Zunahme der proximalen Amplitudenwerte um 34%). Daraufhin fiel jedoch auch die Amplitude bis zum 42. Tag ab. Im Gegensatz zur Latenzmessung konnten zu diesem Untersuchungszeitpunkt wieder physiologische Ausgangswerte ermittelt werden (Abbildung 25a-b).



**a) Proximale Messung**



**b) Distale Messung**

**Abbildung 25 a-b:** Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte der Amplitude gegen die der Latenz bei den Tieren der Crush-Gruppe. Gemessen wurde sofort nach Traumatisierung distal der Kontusionsstelle (Tag 0-1) sowie nach 24 Stunden (Tag 0), 1, 7, 14 und 42 Tagen jeweils proximal (a) und distal (b) der Kontusionsstelle.

## 6.5. Histomorphologie des Muskels

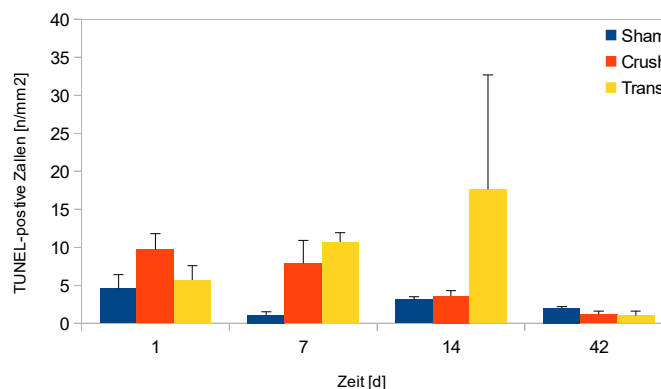
### 6.5.1. Apoptose: TUNEL-Methode

Die *in vivo* Daten des apoptotischen Gewebeschadens wurden mittels der histomorphologischen TUNEL-Methode verifiziert.

Am Untersuchungstag 1 konnte in allen Gruppen eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nachgewiesen werden. Kontrolltiere zeigten bereits ab dem 7. Tag für den gesamten weiteren Verlauf physiologische Werte.

Tiere mit gequetschtem Nerven wiesen mit  $9,7 \pm 2,1$  pro  $\text{mm}^2$  von allen 3 Untersuchungsgruppen die meisten TUNEL-positiven Zellen am Tag 1 auf. Sie zeigten allerdings ebenfalls bis zum Tag 42 eine stetige Reduktion der apoptotischen Zellen bis auf physiologische Werte.

Bei Tieren der Transsektionsgruppe stellte sich bis zum Tag 14 eine deutliche Zunahme apoptotischer Zellen mit bis zu 68% im Vergleich zu Tag 1 dar und betrug hiermit ~82% mehr als am gleichen Tag bei Tieren der anderen beiden Gruppen. Jedoch hatten sich zum Tag 42 die TUNEL-positiven Zellen auch in der Transgruppe wieder auf physiologische Ausgangswerte normalisiert (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Dargestellt ist der Nachweis apoptotischer Zellen im Skelettmuskel nach TUNEL-Färbung. Das Diagramm zeigt jeweils die Anzahl TUNEL-positiver Zellen in der Sham-Gruppe (blau,  $n=6$  pro Zeitpunkt), der Crush-Gruppe (rot,  $n=6$  pro Zeitpunkt) sowie der Trans-Gruppe (gelb,  $n=6$  pro Zeitpunkt) an den Tagen 1, 7, 14 und 42.

### 6.5.2. Proliferation: BrdU-Färbung

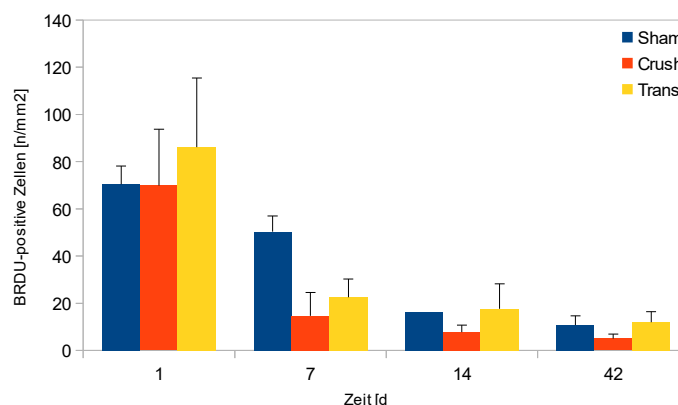
Um das Proliferationspotential der geschädigten Muskulatur aufzeigen zu können, wurden alle proliferierende Zellen sowie isoliert die Satellitenzellen mit der BrdU-Methode erfasst.

Am ersten postoperativen Tag konnte in allen Versuchsgruppen die höchste Anzahl an insgesamt proliferierenden Zellen nachgewiesen werden mit einem Maximalwert bei der Transsektions-Gruppe von  $86,1 \pm 29,3$  pro  $\text{mm}^2$ . In allen Gruppen zeigte sich außerdem eine stetige Abnahme der BRDU-positiven Zellen bis zur Normalisierung der Werte am Tag 42.

Tiere der Crush-Gruppe hatten bereits an Tag 1 reduzierte Zahlen proliferativer Zellen und wiesen vor allem am Tag 7 mit 71% weniger BrdU-positiver Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren eine deutlich schneller rückläufige Proliferation auf.

Bei den Tieren der Trans-Gruppe konnten zu allen Untersuchungszeitpunkten mehr proliferierende Zellen ermittelt werden als bei Tieren der Crush-Gruppe. Sie betrugen bis zum längsten Untersuchungszeitpunkt von 42 Tagen mit  $12,0 \pm 4,4$  pro  $\text{mm}^2$  noch mehr als das Doppelte der Werte der Crush-Tiere und lagen noch 10% über denen der Kontrolltiere.

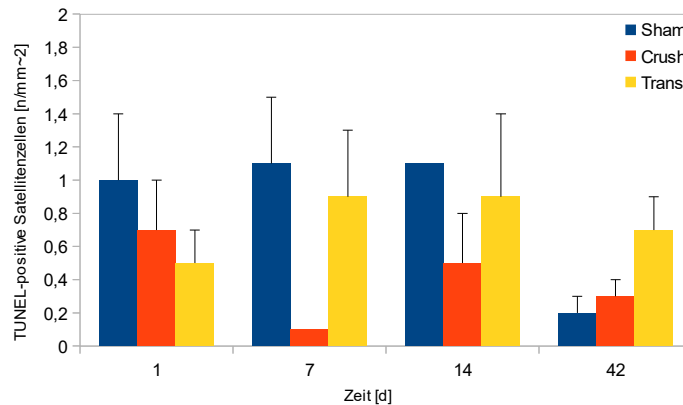
Somit zeigten die Sham-operierten Tiere zwar anfänglich die stärkste Proliferationskraft auf, blieben jedoch im Verlauf gering hinter den Tieren der Transsektions-Gruppe zurück (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Dargestellt ist der Nachweis aller proliferativer Zellen im Skelettmuskel nach BrdU-Färbung. Das Diagramm zeigt jeweils die Anzahl BrdU-positiver Zellen in der Sham-Gruppe (blau,  $n=6$  pro Zeitpunkt), der Crush-Gruppe (rot,  $n=6$  pro Zeitpunkt) sowie der Trans-Gruppe (gelb,  $n=6$  pro Zeitpunkt) an den Tagen 1, 7, 14 und 42.

### Satellitenzellen

Proliferierende Muskelzellen, die unter der Basalmembran als BrdU-positive Satellitenzellen liegen und daher gezählt wurden, konnten am deutlichsten bei Kontrolltieren bis zum Tag 14 mit maximal  $1,1 \pm 0,4$  pro  $\text{mm}^2$  nachgewiesen werden. Danach kamen sie auf Ausgangswerte zurück (Abbildung 28).



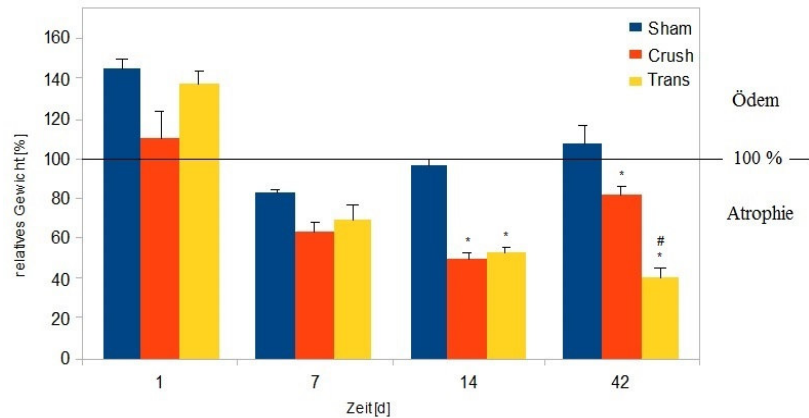
**Abbildung 28:** *Abgebildet ist der Nachweis der anteilig proliferierenden Satelliten-Zellen nach BrdU-Färbung im Skelettmuskel. Das Diagramm zeigt jeweils die Anzahl BrdU-positiver Satelliten-Zellen in der Sham-Gruppe (blau, n=6 pro Zeitpunkt), der Crush-Gruppe (rot, n=6 pro Zeitpunkt) sowie der Trans-Gruppe (gelb, n=6 pro Zeitpunkt) an den Tagen 1, 7, 14 und 42.*

Obwohl Tiere mit zusätzlich gequetschtem Nerven noch am ersten postoperativen Tag zirka 29% mehr positive Satellitenzellen aufwiesen als Tiere mit durchtrenntem Nerven, nahmen diese ab diesem Tag stark ab und lagen zum längsten Untersuchungszeitpunkt wieder bei physiologischen Ausgangswerten. Nach Tag 1 hatten sie im Verlauf im Vergleich aller Gruppen die geringste Aktivität proliferierender Muskelzellen.

In der Transsektions-Gruppe konnte hingegen nach Tag 1 ein deutlicher Anstieg BrdU-positiver Satellitenzellen auf annähernd den Werten der Sham-Tiere beobachtet werden. Bis zum längsten Untersuchungszeitpunkt am Tag 42 zeigte sich jedoch im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen eine weiterhin erhöhte Anzahl positiver Satellitenzellen, die ~71% höher war als bei Tieren der Sham-Gruppe und ~57% als bei Tieren der Crush-Gruppe. Somit kam es im gesamten Untersuchungsintervall zu einer Verschiebung der Regenerationskraft von Muskelzellen von zunächst Sham-operierten Tieren zu Tieren mit gleichzeitig durchtrenntem Nerven (Abbildung 28).

## 6.6. Muskelfeuchtgewicht

24 Stunden nach Traumatisierung des Muskels stellt sich ein deutlicher Anstieg des Muskelfeuchtgewichts im Sinne eines Ödems in allen Versuchsgruppen im Vergleich zur nicht traumatisierten Seite dar mit einer Zunahme auf bis zu 145% (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Das Diagramm zeigt das relative Muskelfeuchtgewicht des traumatisierten *M. soleus* im Vergleich zur Gegenseite an den Tagen 1, 7, 14 und 42 nach Schädigung für die Sham-Gruppe (blau,  $n=6$ ), die Crush-Gruppe (rot,  $n=6$ ) und die Transsektions-Gruppe (gelb,  $n=6$ ). Aufgeführt sind  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. Crush.

Zum Untersuchungstag 7 zeigt sich jedoch dann bei allen Gruppen eine Gewichtsreduktion unter physiologische Ausgangswerte, wobei Tiere der Crush-Gruppe den größten Verlust auf nur noch 63% aufzeigten. Ab diesem Tag wiesen Tiere der Kontrollgruppe eine kontinuierliche Zunahme des Gewichtes und erreichten im Verlauf physiologische Werte.

Bei Tieren der Crush-Gruppe kam es zunächst nach Tag 7 zu einer weiteren Muskelatrophie bis auf 49% am Tag 14. Hiermit lag der Wert weiterhin unter dem der Transsektions-Tiere, bei denen die Muskelreduktion mit 52% nicht so stark ausgeprägt war wie bei Tieren mit geringerer Nervenläsion. Jedoch kam es ab dem 14. Tag bei Tieren der Crush-Gruppe zu einer verstärkten Zunahme des Muskelfeuchtgewichts, was mit einer Erhöhung um 33% von Tag 14 zu 42 deutlich über der Gewichtssteigerung der Kontrolltiere mit nur noch 10% lag.

Transsektions-Tiere zeigten über den gesamten Verlauf eine stetige Muskelatrophie bis auf nur noch 41% Muskelgewicht.

Physiologische Werte konnten in keiner Gruppe mit zusätzlichem Nerventrauma wieder erreicht werden.

## 6.7. Vollblutanalyse

Nach der Durchführung aller genannten Untersuchungen wurde jedem Tier zum Abschluss des Experiments intrakardial Blut entnommen und die hämatologischen Parameter analysiert. Hierbei ergaben sich zu allen Untersuchungszeitpunkten für die gewählten Parameter (Leukozyten, Hämoglobin, Hämatokrit) physiologische Werte (Tabelle 1).



Tag	Leukozyten [ $\times 10^9/l$ ]			Hb [mmol/l]			Hk [%]		
	Sham	Crush	Trans	Sham	Crush	Trans	Sham	Crush	Trans
<b>1</b>	3,8+ 0,4	3,7+ 0,3	3,9+ 0,4	8,7+ 0,2	8,5+ 0,4	8,8+ 0,2	43+ 1	43+2	44+ 2
<b>7</b>	3,8+ 0,4	3,6+ 0,5	3,8+ 0,4	8,6+ 0,2	8,7+ 0,2	8,5+ 0,3	43+ 1	43+ 1	42+ 1
<b>14</b>	4,0+ 0,5	3,8+ 0,4	4,0+ 0,3	8,7+ 0,3	8,6+ 0,2	8,7+ 0,2	42+ 2	42+ 2	43+ 1
<b>42</b>	3,7+ 0,3	3,6+ 0,4	3,8+ 0,4	8,8+ 0,3	8,7+ 0,2	8,5+ 0,2	44+ 1	44+ 1	42+ 2

**Tabelle 1:** Die Tabelle zeigt die Anzahl der Leukozyten sowie den Hämoglobin- und Hämatokritwert an den Untersuchungstagen für die Sham-, Crush- und Trans-Gruppen. Angegeben sind MW  $\pm$  SEM.

## 7. Diskussion

### 7.1. Material und Methoden

#### 7.1.1. *In vivo*-Modell der Traumainduktion

In der wissenschaftlichen Literatur sind verschiedenste Trauma-Modelle mit einer unterschiedlichen Wahl von Versuchstieren, Schweregraden der Verletzungen, der analysierten Muskel- und Nervengruppen sowie der Untersuchungszeiträumen zu finden. Durch eine bessere Vergleichbarkeit von Ergebnissen und somit umfassenderem Verständnis der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen kann eine für den klinischen Alltag wichtige Relevanz geschaffen werden [Smith et al. 2008].

Die *in-vivo*-Untersuchungen stellen den Vorteil der gleichzeitigen Betrachtung der nach Traumainduktion umfassend stattfindenden Reaktionen verschiedener Zell- und Gewebearten inklusive dem sehr vielfältig reagierendem Immunsystem dar.

Zur Anwendung kommen Untersuchungszeiträume zur Betrachtung von Kurzzeiteffekten mit der Auswertung nach 3 und 7 Tagen [Nakasa et al. 2010] oder 14 Tagen [Grefte et al. 2010]. Um unter anderem den Zeitpunkt ermitteln zu können, an dem erneut physiologische Ausgangswerte vorliegen, wurden die Untersuchungszeiträume verlängert auf 8 Wochen [Varejão et al. 2004], 60 Tage [Lago & Navarro 2006] oder 90 Tage [Valero-Cabré et al. 2004; Master et al. 2009]. Durch die Kombination von kurz- und langfristigen Betrachtungen wie z.B. am Tag 7, 14, 28 und 56 [Leterme & Tyc 2004], am Tag 0, 3, 6, 14, 21, 30 und 60 [Bontioti et al. 2003; Leterme & Tyc 2004] können umfassendere und valide Betrachtungen gewonnen werden.

### **7.1.2. Die Ratte als Versuchstier**

Im Hinblick auf die Verwendbarkeit der Untersuchungsergebnisse für den klinischen Alltag stellt die Ratte durch ihre weitestgehend analoge Anatomie zum Menschen und das hohe Regenerationspotential [Borisov 1999; Kannus et al. 2003] ein geeignetes Versuchstier für diese Studie dar. Ein weiterer Vorteil stellt die einfache Haltung und die hohe Reproduktivität mit schneller Aufzucht dar. Darüber hinaus können an der Ratte der M. soleus und der N. ischiadicus durch ihre Größe und ihre freie Zugänglichkeit ohne Probleme freigelegt und somit für Untersuchungen optimal zur Verfügung gestellt werden [Kannus et al. 2003; Matziolis et al. 2006]. Für die vorliegende Abhandlung wurden daher männliche Wistar-Ratten mit einem standardisiertem Gewicht verwendet.

### **7.1.3. Traumainduktion am Skelettmuskel**

Bei Untersuchungen zum Thema Muskelregeneration wurden bereits unterschiedlichste Muskeln und Muskelgruppen *in vivo* untersucht. Für die Erforschung des Skelettmuskel kam die Muskulatur des Frosches [Tym l & Groom 1980; Dietrich & Tym l 1992], der Katze [Henrich 1978; Sullivan & Johnson 1981], des Hamsters [Honig 1977; Klitzman & Duling 1979; Swain & Pittman 1989] und der Ratte [Hutchins et al. 1974; Tym l 1991] zur Anwendung.

Für die Untersuchung von traumatisch geschädigtem Skelettmuskelgewebe wurde an der Ratte bereits der M. tibialis anterior [Nakasa et al. 2010], M. extensor digitorum longus [Tym l et al. 1999] und der M. soleus [Pudupakkam et al. 1998; Mittlmeier et al. 2003; Gierer et al. 2005] genutzt.

In der vorliegenden Studie wurde die Trauma-Induktion am M. soleus in Anlehnung an die Arbeitsgruppe um Matziolis et al. vorgenommen [Matziolis et al. 2006]. Diese konnten durch 10-maliges Quetschen des M. soleus mit 25 N für jeweils 10 s eine Reduktion der Muskelkraft auf ~50% nach 14 Tagen induzieren. Daher wurde der M. soleus mit genügendem Regenerationspotential und Möglichkeit zur einfachen chirurgischen Präparation, Applikation des Muskeltraumas sowie standardisierten Kraftmessung verwendet.

Jedoch ist der Kraftgrad (7-maliges Quetschen mit 25 N für je 10 s) reduziert und der Beobachtungszeitraum verlängert worden (bis 42 Tage), um -wenn möglich- den Regenerationsprozess bis zur Rückkehr zu physiologischen Werten weiter untersuchen zu können.

#### **7.1.4. Traumainduktion am Nerven**

Zur Untersuchung von traumatischen Nervenschädigungen wurden bislang verschiedenste Modelle der Traumainduktion verwendet. Der N. ischiadicus wird dabei sehr häufig zur detaillierten Beobachtung für Studien ausgewählt.

Die jedoch unterschiedlichsten Applikationsarten des nervalen Trauma mit daraus resultierenden verschiedenen Schweregraden lassen nur eine sehr eingeschränkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu.

Eine Nervenschädigung wurde unter anderem durch toxische Präparate wie Acrylamid-Monomere [Schaumburg HH et al. 2010] oder Alkohol [Tiwari et al. 2010], durch Ischämie-/Reperfusionsschäden [Nouri et al. 2008; Iida et al. 2007] oder Diabetes bedingt bewirkt. Die Anwendbarkeit für den unfallchirurgischen Alltag mit einer standardisierten Reproduzierbarkeit der Traumata ist jedoch in diesen Modellen nicht gegeben.

Bei Modellen zur Nervenkontusion wurde mittels eines Clips für 30 s der Nerv [Tang et al. 2009] oder durch eine feine Pinzette für zweimal 40 s gequetscht [Bontioti et al. 2003]. Andere Arbeitsgruppen erzeugten eine Kontusion durch 30 s langes Drücken mit einer feinen Pinzette in drei verschiedenen Richtungen [Lago & Navarro 2006] oder fassten den Nerv mit einer feinen Pinzette mit verschiedenen Kraftstärken für 10 s [Kakegawa et al. 2006].

Bei den genannten Kraftmodellen ist jedoch auch hier die Reproduzierbarkeit der Kontusionsstärken nicht gegeben.

Aufgrund der guten Regenerationsfähigkeit, seiner komplikationslos erreichbaren anatomischen Lage an der Ratte zur Präparation und damit der Möglichkeit zur standardisierten Untersuchungsmethoden wurde der N. ischiadicus zur Trauma-Induktion durch das beschriebene Modell verwendet.

#### **7.1.5. Schmerztest nach von Frey**

Durch die Forschungen von Maximilian Ruppert Franz von Frey (1852-1932) wurden Ergebnisse über Mechanorezeptoren in Bezug auf die Haut- und Tiefensensibilität und das Vorhandensein von spezifischen Schmerzpunkten gewonnen [Wikipedia; Tiber Egle et al. 2003, „Handbuch chronischer Schmerz“]. Die von ihm eingeführten von Frey-Filamente [Fruhstorfer 1991] werden noch immer als Anästhesiometer eingesetzt [Chaplan et al. 1994; Gradl 2005]. Durch die Schmerztestung nach von Frey können Beobachtungen zur Analgesie, Hyperalgesie und allgemein zur postoperativen Neuropathie erstellt werden [de Kock et al. 2005; Lavand'homme et al. 2005; Hägele et al. 2005].

Eine komplexere Methode der Erfassung veränderter Schmerzwahrnehmung ist die quantitative sensorische Testung (QST), die eine standardisierte Erweiterung der klinisch-neurologischen Sensibilitätsprüfung darstellt. Es erlaubt durch die Erfassung von 13 Parametern inkl. der Anwendung der Schmerztestung nach von Frey die vollständige Erhebung aller somatosensiblen Funktionsmodalitäten [Hägele et al. 2005].

Bei der Anwendung der Schmerztestung nach von Frey in der vorliegenden Studie wurde die Hinterpfote mit aufsteigenden Filamentstärken gereizt. Die Untersuchungen erfolgten sowohl vor als auch nach Traumatisierung, um auf Grundlage der Ausgangswerte für jedes Tier vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Dadurch konnte eine die Schmerzwahrnehmung beeinflussende Wirkung des Nerven-Muskeltraumas quantitativ erfasst und beurteilt werden.

### **7.1.6. Biomechanische Untersuchung**

Im Bereich der Unfallchirurgie und Orthopädie aber auch der Sportmedizin werden biomechanische Untersuchungen zur Beurteilung nervaler und muskulärer Funktionen sowie Bewegungsabläufen angewendet.

Eine valide Methode zur Muskelkraftmessung stellt die Erfassung der maximalen Muskelkraft über isometrische Kontraktion mittels des Experimentaria-Messsystems dar [Matziolis et al. 2006]. Der Versuchsaufbau zur Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften des M. soleus wurde durch Matziolis et al. etabliert, wobei isometrische Kontraktionskräfte analysiert werden. Bei dieser Form der Kraftentwicklung bleibt die Länge des Muskels gleich, die Muskelspannung ändert sich. Dadurch können auf die Messgenauigkeit bestehende Einflussfaktoren wie Messposition, Gelenkwinkel, Muskellänge und Schnelligkeit der Gelenkbewegung minimiert werden. Morphologische (Muskelmasse, -faserstruktur, -faserlänge) und dynamische (Gelenkwinkel, Schnelligkeit der Gelenkbewegung) Einflussfaktoren wurden durch die Berechnung relativer Werte der Muskelkraft sowie dem etabliertem Versuchsaufbau minimiert [Tidball et al. 1986]. Auf diese Weise konnte die muskuläre Regeneration bzw. der Grad der Schädigung durch Messung von Einzelzuckung und Tetanie dargestellt werden.

Alternativ kommen zur Muskelfunktionsdiagnostik Verfahren wie die Muskelfunktionsdiagnostik nach V. Janda [Janda 2000], EMG-Untersuchungen, Kraftmessplatten auf piezoelektrischer Grundlage sowie das Dynamometer auf Dehnungsmessstreifenprinzip [Hollmann & Strüder 2009] zur Anwendung.

Hierbei können allerdings nicht Läsionen einzelner Muskeln sowie die isolierte Kraftentwicklung bei Stimulation des innervierenden Nerven bei kombiniertem Nerven-

Muskeltrauma analysiert werden, weshalb der oben beschriebene Versuchsaufbau gewählt wurde.

#### **7.1.7. Nervenleitgeschwindigkeit**

In der Neurologie gehört die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) zu den Standarduntersuchungen neural bedingter Erkrankungen, da eine Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit unter anderem muskuläre Funktionseinschränkungen bedingt. Daher findet sie vielseitige Anwendung wie in der Diagnostik unterschiedlicher Erkrankungen, z.B. der Polyneuropathie [Jalali et al. 2011] und dem Diabetes mellitus [Bansal et al. 2010]. Darüber hinaus wird die NLG zu Therapiekontrollen angewendet.

In wissenschaftlichen Studien kommt die Nervenleitgeschwindigkeitsuntersuchung zur Erforschung der neuralen Schädigungsgrade sowie der Regenerationsfähigkeit an verschiedenen Nerven zur Anwendung wie dem N. palmaris [Zarucco et al. 2009] und dem N. ulnaris und medianus [Dolene 1977; Golubev et al. 2008]. Neben der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit existieren umfangreiche Messungen wie der SFI (Sciatic Functional Index) und der BBB-Score (Basso, Bresnahan, Beattie), die die nervale Funktion sowie die Nervenregeneration darstellen und somit neuromuskuläre Defizite aufzeigen [Schiaveto de Souza et al. 2004; Varejao et al. 2004; Hadlock et al. 2005; Luis et al. 2007].

Für unsere Untersuchung wurde der Stimulationsort ca. 1 cm distal der Läsionsstelle des Nerven gewählt. Nur durch die distale Messung können valide Aussagen über den Einfluss der Nervenkontusion und der entsprechende Einfluss auf die Nervenregeneration gewonnen werden. Um Messungenauigkeiten durch anatomische Verhältnisse weiter zu minimieren, müssten größere Versuchstiere mit längeren freiliegenden Nervenstrecken zum Einsatz kommen. Der Einflussfaktor der Temperatur (Erhöhung der Nervenleitgeschwindigkeit um 1-2 m/s pro 1°C), konnte durch eine konstante Körpertemperatur der Versuchstiere ausgeschlossen werden. Die nervale Regeneration konnte somit durch die Messung der neuralen Latenz im gewählten Tiermodell dargestellt werden.

#### **7.1.8. Histomorphologische Untersuchung des M. soleus**

##### **7.1.8.1. TUNEL-Methode**

Die physiologische und programmierte Form des Zelltodes ist die Apoptose. Durch äußere Einflüsse (z.B. Immunzellen) oder aber durch zellinterne Prozesse (z.B. starke DNA-Schädigung) kann diese ausgelöst werden und ist als aktiver Prozess Teil des Stoffwechsels

der Zellen sowie der Gewebekomöostase. Sie folgt einer immer gleichen Phasenabfolge mit jeweils charakteristischen morphologischen und histochemischen Veränderungen [Böhm & Schild 2003].

Durch die Aktivierung von Caspasen wird der vom Organismus selbst zugeführte Zelltod induziert. Es kommt zur Kondensation des Chromatins, zur Spaltung der DNA in Fragmente spezifischer Größe (apoptotic laddering), zum Exponieren Apoptose spezifischer Marker (Fas/ Apo-1 oder Fas-L) und zur Externalisierung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zytoplasmamembran [Hale et al. 1996].

Zur Darstellung und Auswertung der Apoptosereaktion existieren diverse Untersuchungsmethoden. Um morphologische Veränderungen genauer darzustellen, kommt die Licht- und Elektronenmikroskopie zur Anwendung [Strasser & Ferrando-May 2008]. Vorteilhaft ist hier die hohe Auflösbarkeit der allerdings sehr kleinen untersuchten Areale, weshalb die Betrachtung ausreichend großer Gesichtsfelder mit einem großen arbeitstechnischen Aufwand verbunden ist [Pipinos et al. 2007].

Zum Nachweis apoptotischer Zellen werden außerdem immunohistochemische Verfahren wie die Detektion von DNA-Bruchstücken mit 160 bis 200 Basenpaaren oder deren Vielfache (apoptotic laddering) angewendet, die bei der DNA-Fragmentierung durch die Caspase-aktivierte Desoxyribonuklease (CAD) entstehen. Dafür kann das DNA-laddering, die TUNEL- sowie die Nicoletti-Methode herangezogen werden [Nicoletti et al. 1991; Ricardi & Nicoletti 2006]. Außerdem kann die Caspase-Aktivität, die Kernfragmentierung, die Translokation des Phosphatidylserins, das mitochondriale Cytochrom C und das Bcl-2 Protein nachgewiesen werden [Zinkel et al. 2006; Duan et al. 2009]. Verwendet man Bisbenzimid kann die Apoptose bereits vor Fragmentierung der DNA dargestellt werden [Labarca & Paigen 2008].

Um einzelne apoptotische Zellen nachzuweisen, werden in der Forschung außerdem die TUNEL-Methode (Terminal-Desoxynucleotidyl-Transferase dUTP Nick End Labeling) und die „nick“-Translokation angewendet.

Bei der TUNEL-Methode können DNA-Strangbrüche gezielt und apoptotische Zellen valide quantifiziert werden. Werden durch die Fragmentierung der DNA an den Bruchenden Hydroxygruppen frei, können mittels dem Enzym TdT (Terminal-Desoxynucleotidyl-Transferase) fluoreszenzmarkierte Nukleotide angefügt und über die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden [Negoescu et al. 1998]. Nachteilig bei dieser Technik ist, dass eine Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nur bedingt möglich ist. Falsch positive und negative Ergebnisse beruhen auf Unterschieden in der Färbungskinetik,

der Konzentration der Reagenzien, der vorbestehenden Fixation der Gewebe und dem Ausmaß der Proteolyse. Daher sollten labortechnische Prozesse einer genauen Standardisierung unterliegen und Auswertungen an ausreichenden Gesichtsfeldern vorgenommen werden.

Bei der nick-Translation wird die DNA-Polymerase I aus *E. coli* genutzt, um in Einzelstrangbrüche („nicks“) markierte Nukleotide zu integrieren. Diese Polymerase katalysiert die Anlagerung von komplementären Nukleotiden in Einzelstrangbrüche von Doppelstrang-DNA, wenn der zweite DNA-Strang intakt als Matritze vorliegt [Mainwaring et al. 1998]. Dies stellt jedoch auch einen Nachteil für die Ergebnisqualität im Vergleich zur TUNEL-Methode dar. Weitere Vorteile der TUNEL-Methode gegenüber der nick-Translation sind die schnellere Kinetik des Nukleotid-Einbaus, einer präferentielle Markierung apoptotischer gegenüber nekrotischer Zellen und eine größere Menge an eingebauten markierten Nukleotiden in apoptotischen Zellen, was zu einer höheren Sensitivität führt [Gold et al. 1994]. Daher wurde die TUNEL-Methode für diese Studie als ausreichend valide Untersuchung zur Darstellung der Apoptose erachtet.

#### **7.1.8.2. BrdU-Färbung**

Der Proliferation zugrunde liegende Zyklus einer jeden Zelle besteht aus verschiedenen Phasen mit charakteristischen Vorgängen. Hierbei von zentraler Bedeutung für histochemische Anfärbungen mittels BrdU ist die S-Phase, in der die Verdopplung der DNA stattfindet und BrdU als Thymidin-Analogon um den Einbau in die DNA konkurriert [Nowakowski et al. 1989]. Als nächstes schließt sich die Mitose mit der Zellteilung an [Waldeyer 1988].

In den Anfängen der Forschung an Proliferationsvorgängen wurde von der Arbeitsgruppe um Taylor et al. eine Nachweismethode für S-Phase-Zellen entwickelt, die einen ersten selektiven Marker für die DNS-Synthese verwendete. Sie setzte mit radioaktivem Tritium ( $^3\text{H}$ ) markiertes Thymidin ein, welches kompetitiv von proliferierenden Zellen anstatt des Thymidins eingebaut wird. Mittels Autoradiographie wird das inkorporierte ( $^3\text{H}$ )-Thymidin dann erfasst [Taylor et al. 1957]. Der Nachteil ist jedoch die lange Halbwertszeit des Tritium von mehr als 12 Jahren, die benötigte lange Expositionszeit und die hohen Kosten aufgrund der Einhaltung besonderer Schutzmaßnahmen durch die radioaktive Kontamination [Soriano & Del Rio 1991].

Zur Untersuchung der Zellproliferation werden heutzutage andere Methoden wie die Anwendung von Proliferationsmarkern mit z.B. Ki67, PCNA (Proliferating Cell Nuclear

Antigen), MCM-2 oder Bcl-2 herangezogen [Scholzen & Gerdes 2000; Lavezzi et al. 2002; Essers et al. 2005; Guzinska-Ustymowicz et al. 2009]. Eine andere Untersuchungstechnik macht sich durch in-situ-Hybridisierung der Expression von Histonen-mRNA in der S-Phase der Zellteilung zunutze [Hawke et al. 2007], was jedoch ein sehr aufwendiges Verfahren zur Proliferationsbestimmung darstellt.

Durch Gratzner et al. konnte bereits 1982 mit der Inkorporation von 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) eine vorteilhaftere Methode zur Darstellung der Proliferation entwickelt werden. BrdU ist ein chemisches Analogon zu Thymidin und wird anstatt des Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die neu synthetisierte DNA während der S-Phase kompetitiv eingebaut. Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen BrdU kann die DNA-Synthese und damit die zelluläre Proliferation immunzytochemisch nachgewiesen werden. Der Vorteil ist, dass BrdU nicht radioaktiv ist und in vivo appliziert werden kann. Dies kann auf verschiedene Weise erfolgen: als einmalige intraperitoneale Injektion, durch subcutane Implantation von Retardkapseln, mittels osmotischer Minipumpe oder durch die Verabreichung über das Trinkwasser [Goldsworthy et al. 1993], wobei die Art der Applikation vom Gewebe abhängt (schnell/langsam teilend).

Außerdem muss auf die Eindringtiefe der Marker und die dafür notwendige Schnittdicke geachtet werden, die für die Penetration der Antikörper ins Gewebe notwendig ist. Hier zeigt sich ein bedeutender Nachteil für die Anwendung von (<sup>3</sup>H)-Thymidin: Seine  $\beta$ -Strahlung zeigt nur eine sehr geringe Eindringtiefe in das Gewebe, wodurch nur oberflächlich gelegene proliferierende Zellen detektiert und ausgewertet werden können.

Da sich nach Untersuchungen der Labeling Index (LI- prozentualer Anteil der Anzahl positiv gelabelter Zellen in Beziehung zur Gesamtzahl aller Zellen) der BrdU- und (<sup>3</sup>H)-Thymidin-Methode nicht signifikant unterscheidet [Lanier et al. 1989; Eldridge et al. 1990], kommt hauptsächlich BrdU wegen seiner Vorteile hinsichtlich Kosten, Zeitaufwand, Handhabung und der nicht vorhandenen Radioaktivität zum Einsatz. Ein weiterer Vorteil stellt die Detektion von Satellitenzellen dar. Daher wurde schließlich für die vorliegende Studie die BrdU-Färbung als geeignete Methode zur Darstellung der Proliferation erachtet.

## **7.2. Ergebnisse**

### **7.2.1. Systemische Parameter**

Der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz wurden mittels Narkosevertiefung und die Körpertemperatur durch eine Heizplatte auf Normwerte gehalten. Ein Einfluss auf die



mikrozirkulatorischen, biomechanischen und histomorphologischen Ergebnisse konnte somit nahezu ausgeschlossen werden.

### **7.2.2. Schmerzverhalten nach einem Nerven-Muskeltrauma**

Es konnte beobachtet werden, dass Tiere ohne eine zusätzliche Nervenläsion innerhalb von 42 Tagen ihre physiologischen Ausgangswerte wiedererlangten. Tiere mit einem kombinierten Nerven-Muskeltrauma zeigten nach einer anfänglichen Reduktion der Schmerzreaktion ein bis zu 60% (Crush-Tiere, Tag 14) bzw. bis zu 82% (Trans-Tiere, Tag 42) stärkeres Schmerzverhalten als Tiere der Kontrollgruppe.

Eine Ursache dieser Reaktionen kann die erhöhte Entzündungsreaktion bei gleichzeitiger Verletzung von Muskel und seines innervierenden Nerven darstellen, wodurch vermehrt inflammatorische Reize das Schmerzverhalten beeinflussen.

Bei Entzündungsprozessen werden verschiedene Mediatoren wie Serotonin, Histamin, Kinine und Prostaglandin freigesetzt, die schmerzauslösend auf Nozizeptoren einwirken und die Schmerzwahrnehmung steigern [Otte & Wagenhauser 1980].

Darüber hinaus kommt es durch die Erregung der Nozizeptoren zum neurogenen Reflex mit der Sekretion von NGF (Nerve growth factor) und CGRP (Calcitonin gene related peptide). Dadurch werden benachbarte, noch nicht aktivierte Schmerzrezeptoren sensibilisiert und durch NGF Nervenfasern zum Aussprossen angeregt, was zur Erregung einer noch größeren Anzahl von Nozizeptoren führt [Rutherford 2002]. Diesen Aspekt belegt auch die erhöhte Amplitude in der Anfangszeit der Untersuchung, da sie als ein Maß der aktivierten Nervenfasern gilt [Hövels 2006].

In einer Transsektions-Studie konnten diese Axonaussprossungen nach 3 Wochen beobachtet werden [Gümüs et al. 2015], was die bis zum letzten Untersuchungstag noch weiterhin erhöhte Schmerzwahrnehmung bei Tieren mit zusätzlicher Nervenläsion erklären kann.

Insgesamt sind dies zwei wesentliche Reaktionen, welche die Schmerzwahrnehmung bei Entzündungen steigern.

Die anfängliche Plegie der Tiere mit Nervenläsion erklärt die bis zum Tag 7 (Crush-Gruppe) bzw. Tag 14 (Trans-Gruppe) noch verminderte Schmerzreaktion im Vergleich zur Sham-Gruppe entsprechend des Schweregrades des nervalen Traumas.

In der Arbeitsgruppe um Feng und Yuan konnte in einem Crush-Modell der Verlauf der Schmerzwahrnehmung nach Nervenläsion durch den SFI (Sciatic functional index) dargestellt werden [Feng & Yuan 2015]. Sie konnten ebenfalls ab Tag 7 einen deutlichen Anstieg der Schmerzreaktion mit der Senkung des SFI auf bis zu  $-78,48 \pm 2,4$  verzeichnen, der bis zum

Tag 14 wie in der vorliegenden Studie weiter abfiel. Ab dem Tag 21 und auch am 28. Tag zeigten sich deutlich verbesserte SFI-Werte im Vergleich zu Tag 7 mit einer Reduktion um ca. 27%. In dieser Studie wurde außerdem einer Versuchsgruppe -neben der Zufügung der Nervenläsion- Dexamethason verabreicht, was eine Immunsuppression bewirkte. Hierdurch konnten um ca. 20% verminderte Werte im SFI erreicht werden.

Auch in der Arbeitsgruppe um Rotter et al. konnte durch die Verabreichung von EPO gezeigt werden, dass durch die hierbei stattgefundene Reduktion des Schmerzverhaltens um ca. 68% ein Entzündungsprozesses wesentlich die Schmerzwahrnehmung beeinflusst [Rotter et al. 2012].

In der vorliegenden Studie wurde das Crush-Trauma für Nerv und Muskel auf die gleiche Weise wie in der Studie von Rotter et al. 2012 vorgenommen. Es konnte jedoch nun durch das Hinzuziehen einer Trans-Gruppe gezeigt werden, dass durch zusätzliche Druchtrennung des innervierenden Nerven im Vergleich zur Quetschung eine um 24% erhöhte Schmerzwahrnehmung der Trans-Tiere im Vergleich zu Crush-Tieren besteht. Allerdings zeigten auch Crush-Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren noch eine 77%ig erhöhte Schmerzreaktion. Die ist vergleichbar mit den gewonnenen Ergebnisse nach 42 Tagen in der Crush-Gruppe in der Arbeit von Kuhn [Kuhn 2012].

Insgesamt finden die erzielten Ergebnisse Bestätigung in vielen weiteren Studien der Forschung an nervalen Regenerationsprozessen mit Bezug auf das Schmerzverhalten [Kalender et al. 2009; Chen et al. 2015; Tang et al. 2015].

### **7.2.3. Biomechanische Untersuchung: Regeneration der Muskelfunktion**

Eine zusätzliche Nervenschädigung mit Erhalt der Basalmembran und des umhüllenden Parenchyms eines Nerven stellt den Ergebnissen zufolge ein höheres Regenerationspotential nach 14 Tagen dar als ein isoliertes Muskeltrauma.

Die Arbeitsgruppe um Rotter et al. konnte in einem ähnlichen Crush-Modell des Muskels ohne gleichzeitige Nervenläsion annähernd gleiche Ergebnisse der Muskelkraft wie bei den hier untersuchten Kontrolltieren beobachten- einschließlich der noch weiterhin eingeschränkten Muskelfunktion nach 6 Wochen (Fast-twitch ~79%, Tetanie 56%) [Rotter et al. 2008]. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [Matziolis et al. 2006; Stratos et al. 2007; Stratos et al. 2010; Fu & Gordon 1995; Rafuse & Gordon 1996] und verdeutlicht die hohe Abhängigkeit der muskulären Regeneration allein durch das muskuläre Trauma. Auch für längere Untersuchungszeiten konnte dies belegt werden [Irintchev et al. 1990; McGeachie 2000; Winkler et al. 2010].

Durch eine zusätzliche Nervenkontusion zeigte sich an jedem Untersuchungstag eine noch deutlich geringere Muskelkraft. So konnte nur in der Crush-Gruppe bei zwar insgesamt geringerem Niveau der Ergebnisse der Sham-Tiere ein deutlich erhöhter Kraftzuwachs mit maximal 31% zwischen dem 14. und 42. Tag beobachtet werden (Sham-Tiere 20%). Kontrolltiere konnten dieses starke Regenerationspotential nur in den ersten 7 Tagen aufweisen.

In einer Studie mit ähnlichem, kombinierten Crush-Modell von Nerv und Muskel konnten vergleichbare Werte für die Kontusionsgruppe erreicht werden mit einem Zurückliegen der Werte unter denen der Sham-Gruppe. Dabei wurde ebenfalls ein deutlich größerer Kraftzuwachs vom 7. bis 42. Tag (~50%) als vom 1. bis 7. Tag (~3%) festgestellt [Kuhn 2012]. Eine weitere Studie mit jedoch nur nervaler Kontusion konnte zeigen, dass nach 2 Wochen die direkte Kraftmessung zu einer Abnahme der Muskelkraft um maximal 17% führte [Hadj-Saïd et al. 2012], was eine um 60% geringere Reduktion ist im Vergleich zu Tieren mit kombiniertem Crush-Trauma in der vorgelegten Studie. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der nervalen Innervation für das Regenerationsverhalten des geschädigten Muskels sowie den weitaus größeren Einschränkungen durch kombinierte Läsionen.

Während durch das Quetschen von Nerv und Muskel eine verstärkte Inflammation vorliegt, welche die Regeneration in der Anfangsphase protrahiert, aber nicht zur Atrophie führt, zeigt sich bei Tieren der Transsektions-Gruppe im Verlauf bis zum Tag 42 eine deutliche Abnahme der Muskelkraft bis auf 12%. Auch hier zeigte sich jedoch nach anfänglicher Reduktion bis zum Tag 14 eine daraufhin wieder ansteigende Muskelkraft um bis zu 9%. Dieser erneute Anstieg kann durch die Reinnervation des Muskels nach erfolgter Wallerdegeneration erklärt werden, wobei bekannt ist, dass keine vollständige Funktionswiederherstellung erreicht wird [Bisby 1995; Skouras et al. 2011].

Darüber hinaus werden höhere absolute Werte als auch ein größerer Kraftzuwachs der Kurzkontraktion gegenüber der Tetanie in allen Versuchsgruppen unabhängig vom Untersuchungstag deutlich. Eine Studie mit alleiniger Muskelkontusion konnte belegen, dass nach 1 Woche die Muskelkraft bei der tetanischen Kontraktion auf 23% und bei der Kurzkontraktion auf 50% abfiel. Die Kurzkontraktionskraft konnte sich auf ca. 66% nach 8 Wochen erholen, die tetanische Muskelkraft blieb noch 13% unter dieser. Eine Ursache liegt in der während Regenerationsprozessen auftretenden Fibrose, welche die Dehnbarkeit und Kontrahierbarkeit des Muskels wesentlich beeinflusst und zu Einbußen der tetanischen Kontraktion führen kann [Winkler et al. 2011].

Darüber hinaus wurde ein deutlicher Unterschied der Messwerte der direkten Stimulation gegenüber der indirekten Stimulation deutlich, was sich jedoch ab Tag 42 zugunsten der indirekten Stimulation erholte. Dies stellt wiederum die enorme Bedeutung einer optimalen Interaktion von nervalen und muskulärem Gewebe für die bestmögliche Kraftentwicklung heraus [Kuhn 2012].

#### **7.2.4. Nervenleitgeschwindigkeit: Regeneration des Nerven**

Die Untersuchungen zeigten sowohl bei der Sham- als auch bei der Crush-Gruppe eine Latenzzunahme bei proximaler Messung im Vergleich zur distalen Messung, da der zurückgelegte Weg bis zur Reizaufnahme länger ist. Die Transsektions-Gruppe wurde von dieser Messmethode ausgeschlossen, da entsprechend der Neurotmesis mit Durchtrennung der Nervenfasern keine verwertbaren Ableitungen erhalten werden konnten. Während bei der Sham-Gruppe die Latenz zu jedem Untersuchungszeitpunkt annähernd gleich bleibt, was somit einen Einfluss muskulärer Schädigungen auf die Nervenfunktion ausschließt, zeigt sich bei der Crush-Gruppe ein an- und wieder absteigender Kurvenverlauf.

Die hohen Latenzwerte bis zum Tag 7 spiegeln eine verminderte Leitungsfähigkeit elektrischer Impulse aufgrund der Nervenkontusion wider. Histomorphologische Grundlage bildet die Wallerdegeneration, da zunächst in der ersten Woche Nervengewebe abgebaut wird und somit die Leitungsfähigkeit über die Kontusionsstelle sinkt [Meyring & Strehlow 1999]. Da die Wallerdegeneration sich erst nach 2 Tagen vollständig ausprägt, weichen auch die Latenzen am Tag 1 nur gering von den Ausgangswerten ab [Gerlach & Bickel 2009].

Nach dieser Zeit kommt es zur Latenzabnahme, was im Konsens mit der Regeneration des nervalen Gewebes mit der zu diesem Zeitpunkt einsetzenden Myelinisierung steht [Belanger et al. 2011].

Auch die Arbeitsgruppe um Ronchi et al. konnten ab dem 12. posttraumatischen Tag eine funktionelle Regeneration nachweisen, die allerdings bis zum Tag 42 75-80% im Vergleich zu präoperativen Werten betrug [Ronchi et al. 2009]. Wie auch in der vorliegenden Arbeit konnte nach 6 Wochen und in weiteren Studien auch nach 8 Wochen keine vollständige Regeneration gezeigt werden [Varejão et al. 2004; Luis et al. 2007; Hadlock et al. 2005].

Andere Forschungsarbeiten zeigten, dass nach einem längerem Untersuchungszeitraum von 24 Wochen die Anzahl nervaler Fasern wieder einem physiologischen Wert entsprachen, jedoch Axon- und Faserdurchmesser sowie Myelindicke weiterhin reduziert waren [Muratori et al. 2012].

Von einer Rückkehr der Latenz auf Normwerte wird jedoch nach nervaler Transsektion und Reparation berichtet, sobald eine muskuläre Reinnervation stattfindet, die Nervenfasern also entsprechende motorische Endplatten aufgefunden haben [Davis et al. 1987].

### **7.2.5. Immunhistochemie: Muskelzellregeneration**

#### **7.2.5.1. Muskelzellapoptose**

Nach Schädigung von Muskelgewebe kommt es zunächst zu einer degenerativen, dann sich überlappend zu einer regenerativen Phase. Die anfängliche Destruktion des Gewebes beinhaltet die lytische und oxidative Wirkung inflammatorischer Zellen [Nigge E. 2007]. Im Zuge der einsetzenden Entzündungsreaktion wird die Ausdehnung des Gewebeschadens eingeschränkt, Gewebestrümmer und abgestorbene Zellen entfernt und damit die Voraussetzungen für eine Regeneration geschaffen.

Eine erhöhte Apoptoserate wurde in dieser Studie in allen Gruppen an Tag 1 nach Traumainduktion ermittelt.

Bei ähnlichen Crush-Modellen konnten noch am 7. Tag erhöhte Werte mit nur einer Reduktion um 14% erhalten werden [Kuhn 2012].

Durch die in der vorgelegten Studie erreichte Verminderung um 76% im Vergleich zu Tag 1 erreichten Kontrolltiere bereits am Tag 7 das Ausgangsniveau.

Die erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen bei zusätzlicher Nervenkontusion zeigt, dass eine hierdurch verstärkte Entzündungsreaktion einen anfänglich vermehrten Zelluntergang bedingt. Im Zusammenhang mit der Regeneration im Ablauf von entzündlichen Prozessen kommt es schließlich zum Rückgang der Apoptose [Rotter et al 2008; Kuhn 2012].

In der vorliegenden Studie zeigten Tiere, bei denen eine Muskelgewichts- und Muskelkraftabnahme vorlag, in der histomorphologischen Darstellung durch die TUNEL-Methode eine deutlich erhöhte Apoptoserate. Obwohl alle Tiere den gleichen Schweregrad des muskulären Traumas erhielten, unterscheiden sich die Ergebnisse bis zum Untersuchungstag 14 erheblich, was den Einfluss einer zusätzlichen Nervenläsion unterstreicht. Im Einklang mit einer Regeneration von Kontraktionskraft und Muskelgewicht kann bei Tieren der Crush-Gruppe auch eine abnehmende Anzahl Apoptose-positiver Zellen ermittelt werden. Die höchste Apoptoserate wurde bei Tieren der Transsektions-Gruppe beobachtet.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Kurzuntersuchungen keine erhöhte Apoptoserate von Muskelzellen nach Denervation vorliegt, jedoch das Faservolumen vermindert ist [Aravamudan et al. 2006; Bruusgaard & Gundersen 2008]. Bei langfristiger Atrophie sind die zugrundeliegenden Verhältnisse weniger klar. Während nach Denervation nach 4 Monaten bei Mäusen kein Verlust von Muskelzellen beobachtet wurde [Wada et al. 2002], konnte bei Ratten nach 7 Monaten eine reduzierte Anzahl ermittelt werden [Viguie et al. 1997]. Auch in der hier vorgelegten Studie konnte nach 6 Wochen keine erhöhte Apoptoserate der Gesamtzahl von Zellen als auch der Satellitenzellen nach Nerven-Transsektion festgestellt werden. Durch verschiedene Vorgehensweisen in der Isolation des Muskels (mechanisch, chemisch) und der Ungewissheit, ob die ausgewerteten Zellen tatsächlich Satellitenzellen beinhalten, kann es zu derartigen Diskrepanzen bei den Ergebnissen kommen [Bruusgaard & Gundersen 2008].

Darüber hinaus ergab sich eine vergleichsweise erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen nach 7 Tagen nach Denervation mit  $16 \pm 3$  pro  $\text{mm}^2$  [Bruusgaard & Gundersen 2008].

Die wie in der vorliegenden Studie ebenfalls ermittelte hohe Rate apoptotischer Zellen nach Denervation, die im gleichem Ausmaß wie die mitotische Aktivität anstieg [Hyatt et al. 2006], wird bereits seit 30 Jahren in der Literatur beschrieben. Es wird behauptet, dass eine Denervation eine Expansion an Satellitenzellen bewirkt, was jedoch bis heute weiterer Untersuchungen und Erklärungen bedarf [Virgule et al. 1997].

#### **7.2.5.2. Muskelzellregeneration**

Die Möglichkeit zu regenerativen Prozessen eines Muskels wird wesentlich durch die ihm umgebenden zellulären und azellulären Prozesse beeinflusst.

Die Neubildung von Muskelzellen erfolgt durch Satellitenzellen, die durch verschiedenste Reize aktiviert werden können [Muir et al. 1965; Bittner et al. 1999; Kuznetsov et al. 2001].

In der vorliegenden Studie kam es nach einem Muskeltrauma zum Anstieg der gesamten Zellproliferation inklusive der Satellitenzellen, was bereits in verschiedenen Forschungsgruppen belegt werden konnte [Schultz et al. 1985; Bischoff 1986; Hume et al. 1991]. Auffällig ist hierbei, dass bis zum Tag 42 Transsektionstiere eine weiterhin erhöhte und Crush-Tiere eine verminderte Zellproliferation im Vergleich zu Sham-Tieren zeigten. Die Arbeitsgruppe um Yoshimura et al. untersuchten denerviertes Muskelgewebe mit der Registrierung von Satellitenzellen posttraumatisch, wobei sich eine maximale Expression dieser Zellen 2-3 Wochen nach Denervation zeigte [Yoshimura & Harii 1999]. Dies deckt sich

mit den hier gewonnenen Ergebnissen für die Untersuchungszeit von 2 Wochen mit  $0,9 \pm 0,5$  Zellen/ mm<sup>2</sup>.

Wie durch wissenschaftliche Studien bereits bestätigt findet bei stärkerer Entzündungsreaktion auch eine verzögerte muskuläre Regeneration statt [Tidball 2005; Ha & Kim 2008; Temporin et al. 2008]. Im Gegensatz dazu zeigen Tiere unter Immunsuppression eine geringere Muskelatrophie nach Denervation [Feng & Yuan 2015]. Auch die Arbeitsgruppe um Rotter et al. konnte zeigen, dass durch EPO-Applikation und somit Reduktion der Entzündungsreaktion eine bessere Proliferation von Muskelzellen möglich ist [Rotter et al. 2008].

Daraus folgt, dass eine zusätzliche Nervenkontusion eine höhere Entzündungsreaktion bewirkt, was in einer Studie durch vermehrte T-Zell-Aktivierung nach einem nervalen Crush-Trauma herausgestellt werden konnte [Feng & Yuan 2015]. Die nervale Transsektion scheint einen Proliferationsreiz darzustellen, der jedoch auch in einer vermehrten Fibroblastenaktivierung liegen kann. Dies kann zu einer vermehrten Bildung von Narbengewebe nach Nerven-Transsektion führen. Zur Klärung der zugrundeliegenden Ursachen müssen weitere Studien folgen.

Durch das Ruhigstellen der Extremität und damit Funktionslosigkeit des Nerven konnte bereits eine stattfindende erhöhte Fibrosebildung dargestellt werden [Ferreira et al. 2006]. Dies wäre eine Erklärung für die wiederum ermittelte geringste Kontraktionskraft der Transsektions-Tiere gegenüber den Tieren in den anderen Gruppen.

Die Angleichung der Werte der Crush-Tiere mit denen der Sham-Tiere nach 2 Wochen macht die Kinetik von Entzündungsreaktion deutlich, da es hier zu einem Übergang in die Regenerationsphase kommt [Huard et al. 2003].

Somit zeigt sich hier nochmals der negative Effekt einer kombinierten Traumatisierung mit stärkerer Entzündungsreaktion.

#### **7.2.6. Muskelfeuchtgewicht**

Ein zu Beginn der Untersuchung am Tag 1 überdurchschnittliches hohes Gewicht des M. soleus stellt ein traumatisch entstandenes Ödem dar, wie es auch bei Ischämie-Reperfusionsschäden auftritt [Crisco et al. 1994; Rotter et al. 2012].

Tiere ohne Nervenläsion konnten nach kurzer Zeit physiologische Werte erreichen. Bei zusätzlicher Nervenkontusion zeigte sich bis zum 14. Tag eine Muskelgewichts-Reduktion bis auf ca. 50%. Die Arbeitsgruppe um Kou Y. et al. ermittelte nach alleiniger Nervenkontusion

(1 Minute Klemmen mit zusätzlicher 10.0 Nylon- Naht) nach 8 Wochen noch ein Muskelgewicht von  $67,26 \pm 3,67\%$  [Kou et al. 2013].

Eine Studie mit einem Transsektions-Modell mit Ligatur und Durchtrennung des Spinalnervens auf L5 ohne zusätzliches muskuläres Trauma konnte noch ein Muskelgewicht des M. soleus von 68% im Vergleich zur gesunden Seite ermitteln [Choe et al. 2011], was sich annähernd mit den erhaltenen Ergebnissen der Trans-Gruppe am Tag 14 deckt (~63%).

Bei Tieren der Transsektions-Gruppe stellte sich eine stetige Atrophie des Muskels deutlich dar. Das heißt, dass durch die Erholung des Nerven nach Traumatisierung in der Crush-Gruppe wieder der Muskelaufbau nach Reinnervation einsetzt, bei Muskeln nach Denervation dies jedoch zumindest bis zum Tag 42 nicht stattfindet [Lu et al. 1997; Dedkov et al. 2002].

#### **7.2.7. Vollblutanalyse**

Durch die Integration der Vollblutanalyse in die Studie konnte die Gleichwertigkeit der Versuchstiere bzgl. ihrer rheologischen Voraussetzung, der Veränderungen bzw. Kontinuität während der Studie und der Verhältnisse bei Beendigung der Untersuchung deutlich dargelegt werden.

### **7.3. Zusammenfassung, Ausblick und Grenzen**

Die hier vorliegende Arbeit hat ein Tiermodell zur Untersuchung von kombinierten Nerven-Muskeltraumata in Anlehnung an die im klinischen Alltag auftretenden komplexen Weichteilverletzungen etabliert. An diesem Modell wurde die Pathophysiologie von nervalen und muskulären Regenerationsprozessen mit Schwerpunkt auf histologischen und funktionellen Veränderungen untersucht.

Das sich hierbei ermittelte starke Regenerationspotential zwischen der 2. und 6. Woche bedarf genauerer Analysen, um gegebenenfalls für die Therapie derartiger Verletzungen nutzbare Schlussfolgerungen ziehen zu können.

Darüber hinaus sollte durch eine Erweiterung des Modells mit einem längeren Untersuchungszeitpunkt dargestellt werden, ob eine Regeneration zu physiologischen Werten nach kombinierten Nerven-Muskeltrauma realisierbar ist. Hierfür wäre das Hinzuziehen der histologischen Untersuchung des Nerven sowie die spezifische Analyse der im regenerierenden nervalen und muskulären Gewebe teilnehmenden Zellarten unterstützend möglich.

Weiterführende Untersuchungen mit der Frage des positiven Einflusses einer nervalen Traumatisierung auf geschädigtes Muskelgewebe sind denkbar.



Insgesamt ist die Regeneration u.a. limitiert durch die Bildung von Narbengewebe, Neurombildung, Hyperneurotisation und einem fehlenden nervalen targeting. Bei fehlender Stimulation des Muskels und Nerven atrophiert das entsprechende Gewebe. Daher könnten Untersuchungsmodelle mit spezifischer Stimulation der Versuchstiere derartige Forschungen erweitern.

Schlussfolgernd konnte diese Studie mit grundlegenden Parametern ein Tiermodell zur Analyse der Regenerationsprozesse bei kombinierten Nerven-Muskeltrauma mit aussagekräftigen Ergebnissen aufstellen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Ansselin AD, Fink T, Davey DF. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997;23(5):387-98.
2. Aravamudan B, Mantilla CB, Zhan WZ, Sieck GC. Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. *J Appl Physiol* (1985). 2006 May;100(5):1617-22. Epub 2006 Jan 12.
3. AWMF online-Leitlinien: Versorgung peripherer Nervenverletzungen. 06/2013. Registernummer: 005-010.
4. Bansal R, Agarwal MM, Modi M, Mandal AK, Singh SK. Urodynamic profile of diabetic patients with lower urinary tract symptoms: association of diabetic cystopathy with autonomic and peripheral neuropathy. *Urology.* 2011; 77(3):699-705. doi: 10.1016/j.urology.2010.04.062. Epub 2010 Dec 31.
5. Beilby MJ. Action potential in charophytes. *Int Rev Cytol.* 2007;257:43-82.
6. Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injuries: current treatment options. *J Am Acad Orthop Surg.* 2001; 9(4):227-37.
7. Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injury and myositis ossificans traumatica. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; (403 Suppl):S110-9.
8. Bélanger E, Henry FP, Vallée R, Randolph MA, Kochevar IE, Winograd JM, Lin CP, Côté D. In vivo evaluation of demyelination and remyelination in a nerve crush injury model. *Biomed Opt Express.* 2011; 2(9):2698-708. doi: 10.1364/BOE.2.002698. Epub 2011 Aug 24.
9. Bily W, Kern H. Diagnosis, first aid and classification of muscle injuries in sports medicine. *Sportverletz Sportschaden.* 1998 Sep;12(3):87-93.
10. Best TM, Hunter KD. Muscle injury and repair. *Phys Med Rehab Clin N Am.* 2000;11:251-266.
11. Bisby MA. Regeneration of peripheral nervous system axons. In: Waxman, S.G., Kocsis, J. D. , Stys. P. K. (Eds.), *The Axon.* Oxford University Press. Inc., New York, 1995, pp. 553- 578.
12. Bischoff R. A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Dev Biol.* 1986 May;115(1):140-7.
13. Bittner RE, Schöfer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freilinger M, Höger H, Elbe-Bürger A, Wachtler F. *Anat Embryol (Berl).* Recruitment

- of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. 1999;199(5):391-6.
14. Böhm I, Schild H: Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. In: Molecular imaging and biology. Band 5, Nummer 1, 2003 Jan-Feb, S. 2–14, ISSN 1536-1632. PMID 14499155.
  15. Bontioti EN, Kanje M, Dahlin LB. Regeneration and functional recovery in the upper extremity of rats after various types of nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 2003; 8(3):159-68.
  16. Borisov AB. Regeneration of skeletal and cardiac muscle in mammals: do nonprimate models resemble human pathology? *Wound Repair Regen.* 1999; 7:26-35.
  17. Brämer CH. Tierexperimentelle Untersuchung an Mausmutanten zur Funktion der endogenen Polysialinsäure bei der peripheren Nervenregeneration. 2009
  18. Brushart TM, Gerber J, Kessens P, Chen YG, Royall RM. Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. *J Neurosci.* 1998; 18(21):8674-81.
  19. Bruusgaard JC, Gundersen K. In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *J Clin Invest.* 2008 Apr;118(4):1450-7. doi: 10.1172/JCI34022.
  20. Bryan DJ, Wang KK, Chakalis-Haley DP. Effect of Schwann cells in the enhancement of peripheral-nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg.* 1996; 12(7):439-6.
  21. Buckwalter JA. Should bone, soft-tissue and joint injuries be treated with rest or activity ?. *J Orthop Res.* 1995 Mar;13(2):155-6.
  22. Bunn JR, Canning J, Burke G, Mushipe M, Marsh DR, Li G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle -a biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. *J Orthop Res.* 2004 Nov;22(6):1336-44.
  23. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 1994 Jul;53(1):55-63.
  24. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004; 84:209-238.
  25. Chen Y, Shen R, Zhang B, Zhang W. Regional tissue immune responses after sciatic nerve injury in rats. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(8):13408-13412.
  26. Choe MA, Kim KH, An GJ, Lee KS, Heitkemper M. Hindlimb muscle atrophy occurs from peripheral nerve damage in a rat neuropathic pain model. *Biol Res Nurs.* 2011; 13(1):44-54. Doi: 10.1177/1099800410382291.

27. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med.* 1994; 22(5):702-10.
28. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 1987; 51(6):987-1000.
29. De Kock M, Lavand'homme P, Waterloos H. The short-lasting analgesia and long-term antihyperalgesic effect of intrathecal clonidine in patients undergoing colonic surgery. *Anesth Analg.* 2005; 101(2):566-72, table of contents.
30. De Medinacelli L. Functional consequences of experimental nerve lesions: effects of reinnervation blend. *Exp Neurol.* 1988 Apr;100(1):166-78.
31. Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB, Carlson BM. Survival of Schwann cells in chronically denervated skeletal muscles. *Acta Neuropathol.* 2002; 103(6):565-74. Epub 2002 Feb 5.
32. den Dunnen WF, Stokroos I, Blaauw EH, Holwerda A, Pennings AJ, Robinson PH, Schakenraad JM. Light-microscopic and electron-microscopic evaluation of short-term nerve regeneration using a biodegradable poly(DL-lactide-epsilon-caprolacton) nerve guide. *J Biomed Mater Res.* 1996; 31(1):105-15.
33. Dietrich HH, Tyml K. Microvascular flow response to localized application of norepinephrine on capillaries in rat and frog skeletal muscle. *Microvasc Res.* 1992 Jan;43(1):73-86.
34. Dolene V. Microsurgical treatment of peripheral nerve injuries. *Zentralbl Neurochir.* 1977;38(2):185-90.
35. Duan H, Chai J, Sheng Z, Yao Y, Yin H, Liang L, Shen C, Lin J. Effect of burn injury on apoptosis and expression of apoptosis-related genes/proteins in skeletal muscles of rats. *Apoptosis.* 2009; 14:52-65.
36. Eldridge SR, Tilbury LF, Goldsworthy TL, Butterworth BE. Measurement of chemically induced cell proliferation in rodent liver and kidney: a comparison of 5-bromo-2'-deoxyuridine and [3H]thymidine administered by injection or osmotic pump. *Carcinogenesis.* 1990; 11(12):2245-51.
37. Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W (2005). "Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair". *Mol. Cell. Biol.* 25 (21): 9350–9359. doi:10.1128/MCB.25.21.9350-9359.2005. PMC 1265825. PMID 16227586.

38. Fansa H, Keilhoff G, Wolf G, Schneider W, Gold BG. Tissue Engineering of Peripheral Nerves: A Comparison of Venous and Acellular Muscle Grafts with Cultured Schwann Cells. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 107(2):495-496.
39. Feng X., Yuan W. Dexamethasone Enhanced Functional Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury in Rats. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 627923, 9 pages.
40. Ferreira R, Neuparth MJ, Ascensão A, Magalhães J, Vitorino R, Duarte JA, Amado F. Skeletal muscle atrophy increases cell proliferation in mice gastrocnemius during the first week of hindlimb suspension. *Eur J Appl Physiol*. 2006; 97(3):340-6. Epub 2006 Apr 25.
41. Fruhstorfer H. A simple technique for estimating the level of analgesia in regional anesthesia]. *Reg Anaesth*. 1991 Dec;14(6):106-7.
42. Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *J Neurosci*. 1995 May;15(5 Pt 2):3876-85.
43. Garg K, Corona BT, Walters TJ. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. *Front Pharmacol*. 2015; 6:87.
44. Garrett WE Jr, Seaber AV, Boswick J, Urbaniak JR, Goldner JL. Recovery of skeletal muscle after laceration and repair. *J Hand Surg*. 1984, 9:683-692.
45. Gerlach R & Bickel A. *Fallbuch Neurologie*. Stuttgart. 2009.
46. Gierer P, Mittlmeier T, Bordel R, Schaser KD, Gradl G, Vollmar B. Selective cyclooxygenase-2 inhibition reverses microcirculatory and inflammatory sequelae of closed soft-tissue trauma in an animal model. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Jan;87(1):153-60.
47. Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, Lassmann H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest*. 1994; 71(2):219-25.
48. Goldsworthy TL, Butterworth BE, Maronpot RR. Concepts, labeling procedures, and design of cell proliferation studies relating to carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 1993; 101 Suppl 5:59-65.
49. Golubev VG, Eskin NA, Krupatkin AI. New diagnostic technologies in peripheral nerve injuries. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2008;(8):40-4.
50. Gradl G, Gaida S, Finke B, Lindenblatt N, Gierer P, Menger MD, Mittlmeier T, Vollmar B. Supernatant traumatized muscle induces inflammation and pain, but not

- microcirculatory perfusion failure and apoptotic cell death. *Shock*. 2005; 24(3):219–225.
51. Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Model for muscle regeneration around fibrotic lesions in recurrent strain injuries. *Med Sci Sports Exerc*. 2010; 42(4):813-9. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181beeb52.
  52. Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev*. 2007; 16(5):857-68. Review.
  53. Gümüş B, Kuyucu E, Erbas O, Kazimoglu C, Oltulu F, Bora OA. Effect of oxytocin administration on nerve recovery in the rat sciatic nerve damage model. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* (2015) 10:161 DOI 10.1186/s13018-015-0301-x
  54. Guénard V, Kleitman N, Morrissey TK, Bunge RP, Aebischer P. Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci*. 1992; 12(9):3310-20.
  55. Guzinska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemon A, Czyzewska J. Correlation between Proliferation Markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and Antiapoptotic Protein Bcl-2 in Colorectal Cancer. *ANTICANCER RESEARCH* 29: 3049-3052. 2009
  56. Ha KY, Kim YH. Neuroprotective effect of moderate epidural hypothermia after spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008 Sep 1;33(19):2059-65. doi: 10.1097/BRS.0b013e31818018f6.
  57. Hadj-Saïd W, Bangratz M, Vignaud A, Chatonnet A, Gillian Butler-Browne, Sophie Nicole, Onnick Agbulut, Arnaud Ferry. Effect of locomotor training on muscle performance in the context of nerve-muscle communication dysfunction. *Muscle Nerve* 2012 Apr;45(4):567-77
  58. Hadlock TA, Heaton J, Cheney M, Mackinnon SE. Functional recovery after facial and sciatic nerve crush injury in the rat. *Arch Facial Plast Surg*. 2005; 7(1):17-20.
  59. Hägele S, Rolke R, Kraemer H, Pohl K, Scherer N, Treede RD, Birklein F, Vog T. Quantitative sensorische Testung bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom. *Akt Neurol* 2005; 32 - P76. DOI: 10.1055/s-2005-866653
  60. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne V, Culhane AC, Williams GT. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem*. 1996 May 1;237(3):884.
  61. Hawke TJ, Atkinson DJ, Kanatous SB, Van der Ven PF, Goetsch SC, Garry DJ. Xin, an actin binding protein, is expressed within muscle satellite cells and newly regenerated skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 293:C16361644.

62. Henrich M. Sciatic nerve: special topography and possibility of injuries in surgery of the hip joint (author's transl). *Langenbecks Arch Chir.* 1978 Dec 20;346(4):273-81.
63. Hövels AM. Der Einfluss des Karpaltunnelsyndroms auf autonome Oberflächenpotentiale. 2006.
64. Hollmann W & Strüder HK. Sportmedizin. Grundlage für körperliche Aktivität, Training und Präventivmedizin. Stuttgart. Schattauer Verlag. 2009
65. Honig CR. Hypoxia in skeletal muscle at rest and during the transition to steady work. *Microvasc Res.* 1977 May;13(3):377-98.
66. Huard J, Cao B, Qu-Petersen Z. Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003; 69(3):230-7.
67. Hume T, Kalimo H, Leto M, Jarvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc.* 1991; 23:801-810.
68. Hutchins PM, Bond RF, Green HD. Participation of oxygen in the local control of skeletal muscle microvasculature. *Circ Res.* 1974 Jan;34(1):85-93.
69. Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Wernig A, Edgerton VR. Activity-unrelated neural control of myogenic factors in a slow muscle. *Muscle Nerve.* 2006 Jan;33(1):49-60.
70. Iida H, Schmeichel AM, Wang Y, Schmelzer JD, Low PA. Orchestration of the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *J Peripher Nerv Syst.* 2007 Jun;12(2):131-8.
71. Irintchev A, Draguhn A, Wernig A. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation. *Neuroscience.* 1990;39(1):231-43.
72. Jalali N, Balali-Mood M, Jalali I, Shakeri MT. Electrophysiological changes in patients with acute organophosphorous pesticide poisoning. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011; 108(4):251-5. doi: 10.1111/j.1742-7843.2010.00652.x. Epub 2010 Dec 13.
73. Järvinen JL, Lamb TD. Inverted photocurrent responses from amphibian rod photoreceptors: role of membrane voltage in response recovery. *J Physiol.* 2005; 566:455-466.
74. Järvinen M, Lehto MUK. The effect of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries. *Sports Med.* 1993;15:78-89.
75. Järvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle, 2: a histological study of the effect of early mobilization and immobilization on the repair processes. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1975;83:269-282.

76. Järvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle, 4: effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. *Acta Chir Scand*. 1976;142:47-56.
77. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle Injuries: Biology and Treatment. *Am J Sports Med*. 2005; 33(5): 745-764.
78. Josza L, Kannus P. Histopathological findings in spontaneous tendo ruptures. *Scand J Med Sci Sports*. 1997 Apr;7(2):113-8.
79. Kakegawa A, Yokouchi K, Fukushima N, Fukuyama T, Moriizumi T. Motor neurons essential for normal sciatic function in neonatally nerve-injured rats. *Neuroreport*. 2006; 17(11):1149-52.
80. Kalender AM, Dogan A, Bakan V, Yildiz H, Gokalp MA, Kalender M. Effect of Zofenopril on regeneration of sciatic nerve crush injury in a rat model. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2009 Jun 9;4:6. doi: 10.1186/1749-7221-4-6.
81. Kannus P, Parkkari J, Jarvinen T L, Jarvinen T A, Jarvinen M. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sport injury. *Scand J Med Sci Sports*. 2003;13:150-154.
82. Kannus P, Jozsa L, Kvist M, Lehto M, Järvinen M. The effect of immobilization on myotendinous junction: an ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. *Acta Physiol Scand*. 1992; 144(3):387-94.
83. Klinke R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme Verlag. Stuttgart. 2005.
84. Klitzman B, Duling BR. Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *Am J Physiol*. 1979 Oct;237(4):H481-90.
85. Kou Y, Wang Z, Wu Z, Zhang P, Zhang Y, Yin X, Wong X, Qiu G, Jiang B. Epimedium extract promotes peripheral nerve regeneration in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:954798. doi: 10.1155/2013/954798. Epub 2013 Sep 17.
86. Kretschmer T, Antoniadis G, Assmus H. *Nervenchirurgie. Trauma, Tumor, Kompression*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. 2014.
87. Kuhn CS. Einfluss von Erythropoietin bei kombiniertem Nerven-Muskeltrauma an der Ratte. Rostock. Univ. Diss. 2012.
88. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001; 153(5):1133-40.
89. Labarca C, Paigen K . A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure, *Anal of Biochemistry* 2008. 102, 344-352



90. LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 2002; 111:589-601.
91. Lago N, Navarro X. Correlation between target reinnervation and distribution of motor axons in the injured rat sciatic nerve. *J Neurotrauma*. 2006 Feb;23(2):227-40.
92. Lanier TL, Berger EK, Eacho PI. Comparison of 5-bromo-2-deoxyuridine and [3H]thymidine for studies of hepatocellular proliferation in rodents. *Carcinogenesis*. 1989; 10(7):1341-3.
93. Lavand'homme P, De Kock M, Waterloos H. Intraoperative epidural analgesia combined with ketamine provides effective preventive analgesia in patients undergoing major digestive surgery. *Anesthesiology*. 2005 Oct;103(4):813-20.
94. Lavezzi AM, Ottaviani G, De Ruberto F, Fichera G and Matturri. Prognostic significance of different biomarkers (DNA content, PCNA, karyotype) in colorectal adenomas. *Anticancer Res* 22: 2077-2081, 2002.
95. Leterme D, Tyc F. Re-innervation and recovery of rat soleus muscle and motor unit function after nerve crush. *Exp Physiol*. 2004 Jul;89(4):353-61. Epub 2004 Apr 1.
96. Levi AD, Sonntag VK, Dickman C, Mather J, Li RH, Cordoba SC, Bichard B, Berens M. The role of cultured Schwann cell grafts in the repair of gaps within the peripheral nervous system of primates. *Exp Neurol*. 1997; 143(1):25-36.
97. Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec*. 1997; 248(3):355-65.
98. Ludin RW. *Theories and Systems of Psychology*, 2nd edn. Lexington, MA: D. C. Heath & Company. 1979.
99. Luís AL, Amado S, Geuna S, Rodrigues JM, Simões MJ, Santos JD, Fregnan F, Raimondo S, Veloso AP, Ferreira AJ, Armada-da-Silva PA, Varejão AS, Maurício AC. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurosci Methods*. 2007; 163(1):92-104. Epub 2007 Feb 21.
100. Lüllmann-Rauch R. *Histologie. Verstehen- Lernen- Nachschlagen*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 2003.
101. Mainwaring PN, Ellis PA, Detre S, Smith IE, Dowsett M. Comparison of in situ methods to assess DNA cleavage in apoptotic cells in patients with breast cancer. *J Clin Pathol*. 1998 Jan;51(1):34-7.

102. Master D, Cowan T, Narayan S, Kirsch R, Hoyen H. Involuntary, electrically excitable nerve transfer for denervation: results from an animal model. *J Hand Surg Am.* 2009; 34(3):479-487, 487.e1-3. doi: 10.1016/j.jhssa.2008.11.015.
103. Masuhr KF, Neumann M. *Duale Reihe Neurologie.* Thieme Verlag. Stuttgart. 2007.
104. Matziolis G, Winker T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, Perka C, Duda GN. Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue Eng.* 2006;12:361-367
105. McGeachie JK. Skeletal muscle regeneration after damage by needle penetration and trauma. *Ann R Australas Coll Dent Surg.* 2000 Oct;15:254-7.
106. Meyring S. & Strehlow K. *Klinische Neurologie.* Heidelberg. 1999.
107. Mittlmeier T, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Raschke M, Schaser KD. Small volume hypertonic hydroxyethyl starch reduces acute microvascular dysfunction after closed soft-tissue trauma. *J Bone Joint Surg Br.* 2003;85:126-132.
108. Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat.* 1965; 99(Pt 3):435-44.
109. Mumenthaler M, Stöhr M, Müller-Vahl H. *Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome.* Georg Thieme Verlag. 2007
110. Mummert H, Gradmann D. Action potentials in *Acetabularia*: measurement and simulation of voltage-gated fluxes. *J Membr Biol.* 1991 Dec;124(3):265-73.
111. Muratori L, Ronchi G, Raimondo S, Giacobini-Robecchi MG, Fornaro M, Geuna S. Can regenerated nerve fibers return to normal size? A long-term post-traumatic study of the rat median nerve crush injury model. 2012.
112. Mutschler W, Muth CM. Hyperbaric oxygen therapy in trauma surgery. *Unfallchirurg.* 2001 Feb;104(2):102-14.
113. Nakasa T, Ishikawa M, Shi M, Shibuya H, Adachi N, Ochi M. Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(10):2495-505. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00898.x.
114. Navarro X, Verdú E, Butí M. Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Exp Neurol.* 1994; 129(2):217-24.
115. Negoescu A, et al Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. In: *Biomed Pharmacother.* 1998;52(6):252-8. PMID 9755824

116. Ng JK, Richardson CA, Jull GA. Electromyographic amplitude and frequency changes in the iliocostalis lumborum and multifidus muscles during a trunk holding test. *Phys Ther.* 1997; 77(9):954-61.
117. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (3 June 1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry". *Journal of Immunological Methods* 139 (2): 271–279. doi:10.1016/0022-1759(91)90198-O. PMID 1710634.
118. Nigge E. Die Bedeutung des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 im Muskeltrauma. Hannover. Tierärztliche Hochschule. Diss. 2007
119. Nouri M, Rahimian R, Fakhfour G, Rasouli MR, Mohammadi-Rick S, Barzegar-Fallah A, Asadi-Amoli F, Dehpour AR. Ipsilateral common iliac artery plus femoral artery clamping for inducing sciatic nerve ischemia/reperfusion injury in rats: a reliable and simple method. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 2008 Dec 22;3:27. doi: 10.1186/1749-7221-3-27.
120. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol.* 1989;18:311-318.
121. Noyes FR. Functional properties of knee ligaments and alterations induced by immobilization: a correlative biomechanical and histological study in primates. *Clin Orthop Relat. Res.* 1977 Mar-April;(123):210-42.
122. Orchard J, Best TM. The management of muscle strain injuries: an early return versus the risk of recurrence. *Clin J Sport Med.* 2002 Jan;12(1):3-5.
123. Otte P, Wagenhauser FJ. Fortschritte in der Rheumatologie. Steinkopf Verlag. Zürich. 1980
124. Pipinos II, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA, Dodd SL. The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction. *Vasc Endovascular Surg.* 2007; 41:481-489.
125. Price HM, Howes EL Jr, Blumerg JM. Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers injured by cold. I. The acute degenerative changes. *Lab Invest.* 1964; 13:1264-78.
126. Price HM, Howes EL Jr, Blumerg JM. Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers injured by cold. II. Cells on the sarcolemmal tube: Observations on

- "discontinuous" regeneration and myofibril formation. *Lab Invest.* 1964 Oct;13:1279-302.
127. Pudupakkam S<sup>1</sup>, Harris KA, Jamieson WG, DeRose G, Scott JA, Carson MW, Schlag MG, Kvietys PR, Potter RF. Ischemic tolerance in skeletal muscle: role of nitric oxide. *Am J Physiol.* 1998 Jul;275(1 Pt 2):H94-9.
  128. Rafuse VF, Gordon T. Self-reinnervated cat medial gastrocnemius muscles. I. comparisons of the capacity for regenerating nerves to form enlarged motor units after extensive peripheral nerve injuries. *J Neurophysiol.* 1996 Jan;75(1):268-81.
  129. Reznik M. Autoradiographic study of striated muscle regeneration in vivo. *J Embryol Exp Morphol.* 1968 Apr;19(2):283-97.
  130. Riccardi C, Nicoletti I (9 November 2006). "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry". *Nature Protocols* 1 (3): 1458–1461. doi:10.1038/nprot.2006.238. PMID 17406435.
  131. Rodriguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discovery Today: Disease Models.* Volume 1, Issue 2. 2004; Pages 177–185
  132. Ronchi G, Nicolino S, Raimondo S, Tos P, Battiston B, Papalia I, Varejão AS, Giacobini-Robecchi MG, Perroteau I, Geuna S. Functional and morphological assessment of a standardized crush injury of the rat median nerve. *J Neurosci Methods.* 2009; 179(1):51-7. doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.01.011. Epub 2009 Jan 21.
  133. Rotter R, Menshykova M, Winkler T, Matziolis G, Stratos I, Schoen M, Bittorf T, Mittlmeier T, Vollmar B. Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue. *J Orthop Res.* 2008;26(12):1618-1626.
  134. Rotter R, Kuhn C, Stratos I, Beck M, Mittelmeier T, Vollmar B. Erythropoietin enhances the regeneration of traumatized tissue after combined muscle-nerve injury. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012; 72(6):1567-75. doi: 10.1097/TA.0b013e318246498f.
  135. Rutherford KMD. Assessing pain in animals. In: *Animal Welfare.* Band 11, Nr. 1, 2002, S. 31–53
  136. Salter RB, Hamilton HW, Wedge JH, Tile M, Torode IP, O'Driscoll SW, Murnaghan JJ, Saringer JH. Clinical application of basic research on continuous passive motion for disorders and injuries of synovial joints: a preliminary report of a feasibility study. *J Orthop Res.* 1984;1(3):325-42.

137. Schaumburg HH, Zotova E, Raine CS, Tar M, Arezzo J. The rat caudal nerves: a model for experimental neuropathies. *J Peripher Nerv Syst.* 2010 Jun;15(2):128-39. doi: 10.1111/j.1529-8027.2010.00262.x.
138. Schiaveto de Souza A, da Silva CA, Del Bel EA. Methodological evaluation to analyze functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurotrauma.* 2004; 21(5):627-35.
139. Schoenfeld BJ. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for exercise-induced muscle damage: implications for skeletal muscle development. *Sports Med.* 2012 Dec 1;42(12):1017-28. doi: 10.2165/11635190-000000000-00000.
140. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. In: *J. Cell. Physiol.* 182, Nr. 3, März 2000, S. 311–22. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9. PMID 10653597.
141. Schröder J-M. *Pathologie der Muskulatur.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1982; 6-7; 29-56; 131-139; 385-387
142. Schultz E, Jaryszak DL, Valliere CR. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve.* 1985; 8(3):217-22.
143. Shafiq SA, Gorycki MA. Regeneration in skeletal muscle of mouse: some electron-microscope observation. *J Pathol Bacteriol.* 1965 Jul;90(1):123-7.
144. Shatat J. *Sulcus-ulnaris-Syndrom: Einfache Dekompression oder subcutane Vorverlagerung?* Homburg. 2007.
145. Skouras E, Ozsoy U, Sarikcioglu L, Angelov DN. Intrinsic and therapeutic factors determining the recovery of motor function after peripheral nerve transection. *Ann Anat.* 2011; 193(4):286-303. doi: 10.1016/j.aanat.2011.02.014. Epub 2011 Mar 12. Review.
146. Sloper JC, Pegrum GD. Regeneration of crushed mammalian skeletal muscle and effects of steroids. *J Pathol Bacteriol.* 1967 Jan;93(1):47-63.
147. Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. Review. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med.* 2008; 38(11):947-69. doi: 10.2165/00007256-200838110-00005.
148. Soriano E, Del Rio JA. Simultaneous immunocytochemical visualization of bromodeoxyuridine and neural tissue antigens. *J Histochem Cytochem.* 1991 Mar;39(3):255-63
149. Strasser C & Ferrando-May E. *Der illustrierte Zelltod: zur Mikroskopie apoptotischer Prozesse.* Konstanz 2008.

150. Stratos I, Graff J, Rotter R, Mittlmeier T, Vollmar B. Open blunt crush injury of different severity determines nature and extent of local tissue regeneration and repair. *J Orthop Res*. 2010; 28(7):950-7. doi: 10.1002/jor.21063.
151. Stratos I, Rotter R, Eipel C, Mittlmeier T, Vollmar B. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. *J Appl Physiol* (1985). 2007; 103(5):1857-63. Epub 2007 Aug 23.
152. Sullivan SM, Johnson PC. Effect of oxygen on blood flow autoregulation in cat sartorius muscle. *Am J Physiol*. 1981 Dec;241(6):H807-15.
153. Sunderland S. Nerve and nerve injury. New York: Churchill Livingstone. 1987;173-176.
154. Suzuki G, Ochi M, Shu N, Uchio Y, Matsuura Y. Sensory neurons regenerate more dominantly than motoneurons during the initial stage of the regenerating process after peripheral axotomy. *Neuroreport*. 1998; 9(15):3487-92.
155. Swain DP, Pittman RN. Oxygen exchange in the microcirculation of hamster retractor muscle. *Am J Physiol*. 1989 Jan;256(1 Pt 2):H247-55.
156. Tang J, Hua Y, Su J, Zhang P, Zhu X, Wu L, Niu Q, Xiao H, Ding X. Expression of VEGF and neural repair after alprostadil treatment in a rat model of sciatic nerve crush injury. *Neurol India*. 2009; 57(4):387-94. doi: 10.4103/0028-3886.55583.
157. Tang Y, Zheng X, Ying T, Yuan Y, Li S. Nomodipine-mediated re-myelination after facial nerve crush injury in rats. *Journal of Clinical Neuroscience* 22 (2015) 1661–1668.
158. Taylor JH, Woods PS, Hughes WL: The organization and duplication of chromosomes as autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 43, Nr. 1, 1957, S. 122-138.
159. Temporin K, Tanaka H, Kuroda Y, Okada K, Yachi K, Moritomo H, Murase T, Yoshikawa H. Interleukin-1 beta promotes sensory nerve regeneration after sciatic nerve injury. *Neurosci Lett*. 2008 Aug 1;440(2):130-3. doi: 10.1016/j.neulet.2008.05.081. Epub 2008 May 27.
160. Tidball JG, Daniel TL. Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure and loading. *Cell Tissue Res*. 1986;245:315-322.
161. Tidball JG. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaption. *J Appl Physiol*. 2005;1900-1908.
162. Tiwari V, Kuhad A, Chopra K. Amelioration of functional, biochemical and molecular deficits by epigallocatechin gallate in experimental model of alcoholic neuropathy. *Eur J Pain*. 2010; in press.

163. Tyml K. Heterogeneity of microvascular flow in rat skeletal muscle is reduced by contraction and by hemodilution. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1991 Feb;10(1):75-86.
164. Tyml K, Groom AC. Regulation of blood flow in individual capillaries of resting skeletal muscle in frogs. *Microvasc Res*. 1980 Nov;20(3):346-57.
165. Tyml K, Mathieu-Costello O, Cheng L, Noble EG. Differential microvascular response to disuse in rat hindlimb skeletal muscles. *J Appl Physiol* (1985). 1999 Oct;87(4):1496-505.
166. Valero-Cabré A, Navarro X. Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair. *J Neurotrauma*. 2002 Nov;19(11):1475-85.
167. Valero-Cabré A, Tsironis K, Skouras E, Perego G, Navarro X, Neiss WF. Superior muscle reinnervation after autologous nerve graft or poly-L-lactide-epsilon-caprolactone (PLC) tube implantation in comparison to silicone tube repair. *J Neurosci Res*. 2001; 63(2):214-23.
168. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*. 2004; 21(11):1652-70.
169. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*. 2004; 21(11):1652-70.
170. Viguie CA, Lu DX, Huang SK, Rengen H, Carlson BM. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. *Anat Rec*. 1997 Jul;248(3):346-54.
171. von Frey M. Über den Gebrauch von Reizhaaren. In: *Untersuchungen über die Sinnesfunktionen der menschlichen Haut. Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz. Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königlich Sachsischen Gesellschaft der Wissenschaften* 1896; 23: 208-217.
172. Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development*. 2002 Jun;129(12):2987-95.
173. Waldeyer, W. Über Karyokinese und ihre Beziehungen zu den Befruchtungsvorgängen. In: *Arch. mikr. Anat.* 32. 1888

174. Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Schumann MR, Hahn S, Strube P, Stoltenburg-Didinger G, Perka C, Duda GN, Tohtz SV. Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma. *Acta Orthop*. 2011; 82(1):102-11. doi: 10.3109/17453674.2010.539498. Epub 2010 Dec 13.
175. Yoshimura K, Harii K. A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. *J Surg Res*. 1999 Feb;81(2):139-46.
176. Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*. 2006; 13:1351-1359.
177. Zhou L, Kambin P, Casey KF, Bonner FJ, O'Brien E, Shao Z, Ou S. Mechanism research of cryoanalgesia. *Neurol Res*. 1995; 17(4):307-11.



## 9. Thesen

Thema:

### **"LANGZEITUNTERSUCHUNGEN ZUR REGENERATION VON TRAUMATISIERTEM GEWEBE NACH KOMPLEXER NERVEN-MUSKELVERLETZUNG AN DER RATTE"**

1. Im unfallchirurgischen Alltag steht neben der Frakturversorgung auch die Behandlung von Weichteilverletzungen im Mittelpunkt.
2. Der Schweregrad der Weichteilschädigung bestimmt wesentlich die Prognose der oftmals möglichen residuellen Funktionseinschränkungen.
3. Nach einem isoliertem Weichteiltrauma mit Verletzung der Skelettmuskulatur kommt es zu einer unvollständigen Regeneration des Muskels.
4. Der Heilungsprozess verletzter Skelettmuskulatur durchläuft 4 spezifische Phasen mit Degeneration, Entzündung, Regeneration und Fibrosierung.
5. Ausgangspunkt für die Regeneration der Skelettmuskulatur auf zellulärer Ebene sind die Satellitenzellen.
6. Auch die neuronale Aktivität beeinflusst die Regeneration und Wiedererlangung der Funktion traumatisierter Skelettmuskulatur.
7. Je nach Ausmaß der Nervenschädigung kann eine Regeneration des Skelettmuskels stattfinden oder aber zu muskulären Funktionseinschränkungen oder letztlich Muskelatrophie führen.
8. Es findet eine Zunahme der Schmerzwahrnehmung während des Heilungsprozesses bei gleichzeitiger Kontusion des Muskels und Nerven bis zum Tag 14 statt, welche sich dann aber durch einen einsetzenden Regenerationsprozess von Schmerzfasern bis zum Ende der Untersuchungszeit (Tag 42) normalisiert.
9. Anhand der erst zunehmenden später wieder abnehmenden getesteten nervalen Latenz wird der Regenerationszeitpunkt des nervalen Gewebes mit motorischen Fasern nach der ersten Beobachtungswoche deutlich.
10. Die Muskelkraft stieg bei der biomechanischen Kraftmessung signifikant nach Tag 7 an, was auf den muskulären Regenerationsprozess, der gleichzeitig mit der nervalen Regeneration einsetzt, hinweist.

11. Das Muskelfeuchtgewicht nach muskulärer Traumatisierung kann als Maß der stattfindenden Atrophie bzw. Muskelregeneration genutzt werden.
12. Durch die histologische Untersuchung der Muskelzellen mittels BrdU und TUNEL können Regeneration oder aber Atrophie eines geschädigten Muskels dargelegt werden.
13. Bei komplexer Nerven-Muskelverletzung sollte immer eine Protektion des Nervengewebes angestrebt werden.

## **10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, Ulrike Becker, geboren am 02.11.1984 in Rostock, an Eides statt, dass die Dissertation:

**"LANGZEITUNTERSUCHUNGEN ZUR REGENERATION VON  
TRAUMATISIERTEM GEWEBE NACH KOMPLEXER NERVEN-  
MUSKELVERLETZUNG AN DER RATTE"**

ausschließlich von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe dritter Personen verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und dass alle Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, 25.04.2016

Ulrike Becker

**Kongressbeiträge / Abstract:**

Rotter R., Becker U., Stratos I., Graff J., Mittelmeier T., Vollmar B. Langzeituntersuchung zur Regeneration von traumatisiertem Gewebe nach komplexer Nerven-Muskelverletzung an der Ratte. 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. Berlin, 22.- 25.04. 2008

## **12. Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei all denen Menschen bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben haben, einen Einblick in die medizinische Forschung zu bekommen und mir durch Ihre Zeit und Mühe so viel an theoretischen Wissen und Fertigkeiten weitergegeben haben, dass es mir möglich war, selbstständig wissenschaftlich zu arbeiten. Nur dadurch konnte die vorliegende Arbeit entstehen und medizinischen Wert erhalten. An dieser Stelle richtet sich daher mein besonderer Dank an Fr. Prof. Dr. Vollmar, die mich an Ihrem Institut für Experimentelle Chirurgie in Ihr Forschungsteam für die Zeit der Doktorarbeit aufnahm und mit Ihrer Zielstrebigkeit und Beharrlichkeit das beste und möglichste an wissenschaftlichem Wert einer jeden Arbeit herausstellt. Außerdem bedanke ich mich bei meinen Betreuern Dr. Rotter und auch Dr. Stratos, die mir sowohl bei Auswahl und Bearbeitung der theoretischen Grundlagen und Literatur halfen, als auch mir in der Durchführung der Experimente stets zur Seite standen. Und mein Dank gebürt auch den medizinisch technischen Mitarbeitern Frau Blendow und Frau Butzlaff, durch die ich mich während der Versuche im Labor immer gut betreut wusste. Einen besonderer Dank möchte ich damit Frau Frenz geben, die sowohl mit großem Einsatz und Qualität die histologischen Schnitte der Präparate herstellte und mir bei der Auswertung half, als auch mir bei persönlichen Fragen beistand.