

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung

Universitätsmedizin Rostock

Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar



# **Die Kombination von Weichteiltrauma und temporärer Nervenläsion führt im CRPS-Tiermodell zu einer lokalen Osteopenie**

Inauguraldissertation zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin  
Rostock

vorgelegt von  
Andy Schiebold, geboren am 30.01.1987 in Borna,  
aus Groitzsch bei Leipzig

Rostock, August 2016

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Vollmar (Universitätsmedizin Rostock)
2. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Mittlmeier (Universitätsmedizin Rostock)
3. Gutachter: PD Dr. med. P. Schwabe (Charité Berlin)

Datum der Einreichung: 15.08.2016

Datum der Verteidigung: 04.04.2017



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Historischer Rückblick . . . . .	5
1.2	Definition und Diagnosekriterien . . . . .	6
1.3	Epidemiologie und Prognose . . . . .	6
1.4	Klinisches Erscheinungsbild . . . . .	8
1.4.1	Schmerzen . . . . .	8
1.4.2	Sensorische Störungen . . . . .	8
1.4.3	Vasomotorische Störungen . . . . .	9
1.4.4	Sudomotorische Störungen und Ödem . . . . .	9
1.4.5	Motorische und trophische Veränderungen . . . . .	9
1.4.6	Veränderungen der Knochenstruktur . . . . .	9
1.5	Therapie . . . . .	10
1.5.1	Physikalische Therapie - Physio- und Ergotherapie . . . . .	10
1.5.2	Medikamentöse Therapie . . . . .	10
1.5.3	Blockade des Sympathikus . . . . .	11
1.6	Pathophysiologie . . . . .	11
1.6.1	Periphere Sensibilisierung von Nervenendigungen . . . . .	11
1.6.2	Zentrale Sensibilisierung . . . . .	11
1.6.3	Neurogene Entzündung . . . . .	12
1.6.4	Sympathische Dysfunktion . . . . .	13
1.6.5	Genetische Faktoren . . . . .	13
1.7	Tiermodelle . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Ziel der Studie</b>	<b>16</b>
2.1	Fragestellung . . . . .	16
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1	Versuchstiere und -haltung . . . . .	17
3.2	Versuchsgruppen und zeitlicher Ablauf der Versuche . . . . .	17

3.3	Untersuchungstechniken . . . . .	18
3.3.1	Spontanschmerz, Wärme-, Kälteallodynie und mechanische Hyperalgesie .	18
3.3.2	Messung von Körpergewicht, Temperatur und Volumen der Hinterpfoten .	19
3.4	Chirurgische Interventionen . . . . .	20
3.4.1	Weichteiltrauma des M. soleus . . . . .	20
3.4.2	Anlage der Ligaturen um den N. ischiadicus (CCI-Modell) . . . . .	21
3.4.3	Entfernung der Nervenligaturen (INI-Modell) . . . . .	22
3.4.4	Messung der Latenzzeit des N. ischiadicus . . . . .	23
3.5	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	24
3.5.1	Tracheotomie und Katheterisierung der A. carotis communis . . . . .	24
3.5.2	Präparation des M. soleus . . . . .	25
3.5.3	Methodik der Mikroskopie . . . . .	26
3.5.4	Auswertung der Mikroskopie mit dem Programm „CapImage“ . . . . .	29
3.6	Postmortale Bestimmung des Muskelödems . . . . .	30
3.7	Beurteilung von Knochendichte und Mikroarchitektur des Knochens . . . . .	30
3.8	Histologische Bestimmung der Apoptoserate mit Cleaved Caspase 3 . . . . .	32
3.9	Statistik . . . . .	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
4.1	Ergebnisse der Verhaltenstests . . . . .	34
4.1.1	Spontanschmerzverhalten und Wärme-/Kälteallodynie . . . . .	34
4.1.2	Mechanische Hyperalgesie . . . . .	36
4.1.3	Messung des Pfotenvolumens und der -temperatur . . . . .	40
4.2	Ergebnisse der Latenz in der nervalen Erregungsleitung . . . . .	41
4.3	Ergebnisse der postmortalen Bestimmung des Muskelödems . . . . .	42
4.4	Ergebnisse der mikroskopischen Messungen . . . . .	43
4.4.1	NADH-Autofluoreszenz . . . . .	44
4.4.2	Funktionelle kapilläre Dichte . . . . .	45
4.4.3	Prozentualer Anteil sich langsam bewogender Leukozyten . . . . .	45
4.4.4	Anzahl am Endothel adhärenter Leukozyten . . . . .	46

4.4.5	Makromolekulare Plasmaextravasation . . . . .	46
4.5	Ergebnisse der Knochendichtemessung und Analyse der Mikroarchitektur des Knochens . . . . .	47
4.5.1	Ergebnisse der Knochendichtemessung . . . . .	47
4.5.2	Ergebnisse der Analyse des trabekulären Knochens . . . . .	49
4.5.3	Ergebnisse der Analyse des kortikalen Knochens . . . . .	52
4.6	Ergebnisse der histologischen Bestimmung der Muskelzellapoptose . . . . .	54
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
5.1	Diskussion von Material und Methoden . . . . .	56
5.1.1	Diskussion der Modelle . . . . .	56
5.1.2	Diskussion der Untersuchungstechniken . . . . .	58
5.1.3	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	59
5.1.4	Diskussion der Knochenanalyse im Micro-CT . . . . .	61
5.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	62
5.3	Schlussfolgerung . . . . .	68
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>85</b>
7.1	Diagramme der CCI- und INI-Gruppen (2 und 7 Tage Beobachtung) . . . . .	85
7.1.1	Spontanschmerzverhalten und Wärme-/Kälteallodynie . . . . .	85
7.1.2	Mechanische Hyperalgesie . . . . .	88
7.1.3	Pfotenvolumen . . . . .	90
7.1.4	Pfotentemperatur . . . . .	91
7.1.5	Knochenanalyse . . . . .	92
7.2	Lebenslauf . . . . .	93
7.3	Kongressbeiträge . . . . .	94
7.4	Selbstständigkeitserklärung . . . . .	95
7.5	Thesen . . . . .	96
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>97</b>

<b>9</b>	<b>Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>98</b>
----------	---	-----------

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Historischer Rückblick

Bereits im amerikanischen Bürgerkrieg 1864 formte Silas Weir Mitchell den Begriff der *Kausalgie* (Mitchell, 1864), als er Soldaten nach Schussverletzungen untersuchte. Einige der Betroffenen entwickelten Symptome, wie brennende Schmerzen, Überwärmung, Schwellung oder Rötung, die nicht mit dem initialen Trauma der Schussverletzung erklärt werden konnten. Das Wort Kausalgie entstand aus der Kombination von Kausos (griechisch für Wärme oder Brennen) und Algos (griechisch für Schmerz), den beiden Hauptsymptomen, die der Arzt aus Philadelphia fand. Die Schmerzen beschreibt Mitchell als brennend, „senfrot glühend“ oder „wie eine rot glühende Feile, die die Haut aufkratzt“ (Mitchell, 1864). Aufgrund der Stärke und des Charakters der Schmerzen verweigerten die Soldaten oft eine weitere Untersuchung (Lau & Chung, 2004). Mitchell versuchte verschiedene Therapien, darunter Blutegel, Elektrostimulation und Massagen, doch nichts konnte die Schmerzen beseitigen.

Knapp 40 Jahre später prägte der Hamburger Chirurg Paul Sudeck den Begriff der *entzündlichen Knochenatrophie*. Er beschrieb ein Krankheitsbild bestehend aus posttraumatischen Schmerzen, Weichteilschwellungen (Ödeme) und Knochenatrophie. Letztere war seiner Meinung nach durch eine Entzündung verursacht und unterscheidet sich von einer Atrophie, wie sie im Alter oder bei Nichtbenutzen einer Extremität auftritt (Sudeck, 1900).

Der französische Chirurg Leriche schlussfolgerte Anfang des 20. Jahrhunderts, dass eine Irritation des sympathischen Nervensystems vorliegen muss, weil viele Patienten durch eine Sympathektomie erfolgreich behandelt wurden. Im Jahr 1946, basierend auf den Erkenntnissen von Leriche, nannte Evans das vorliegende Krankheitsbild *Sympathische Reflexdystrophie* (Schott, 2001). Den Begriff der Kausalgie sah er als veraltet an, denn obwohl viele Patienten die charakteristischen, brennenden Schmerzen verspürten, wären andere Symptome federführend. Hierzu gehörten Rötung oder Blässe (oder beides zugleich), Schwellungen, Schwitzen und auch hier eine zystische Atrophie des Knochens (Evans, 1946).

Im Oktober 1993 organisierte die International Association for the Study of Pain (IASP) einen Workshop, der sich zum Ziel setzte, die uneinheitliche Terminologie zu beseitigen, denn wie Evans bereits einige Jahre zuvor feststellte, war der Begriff der *Kausalgie* nicht zielführend (Stanton-

Hicks et al., 1995). Auch die *Sympathische Reflexdystrophie* fand man nun als nicht mehr gebräuchlich, denn die Verbindung zwischen sympathischem Nervensystem und nozizeptiven Neuronen ist unbeständig, weil die sympathische Blockade nur einem Teil der Patienten helfen konnte. Ein Jahr später wurde der Begriff des *komplexen regionalen Schmerzsyndroms* (Complex Regional Pain Syndrome, CRPS) mit neuen diagnostischen Kriterien durch die IASP eingeführt (Stanton-Hicks et al., 1995).

## 1.2 Definition und Diagnosekriterien

Das komplexe regionale Schmerzsyndrom ist eine chronische Erkrankung, die durch neuropathische Schmerzen, sensorische und motorische Defizite, Schwellungen, Temperaturunterschiede in den Extremitäten sowie sudomotorische und trophische Veränderungen charakterisiert ist.

CRPS Typ 1, früher Sympathische Reflexdystrophie oder Sudeck'sche Atrophie genannt, entwickelt sich nach einem Trauma ohne Nervenverletzung und ist in seiner Klinik unverhältnismäßig zu diesem auslösenden Ereignis.

CRPS Typ 2 dagegen, früher bekannt als Kausalgie, tritt ausschließlich nach einem Trauma mit Nervenverletzung auf und ist nicht auf das innervierte Areal des Nerven beschränkt (Stanton-Hicks et al., 1995).

Die Diagnose CRPS erfolgt nach anamnestischen und klinischen Kriterien. Dazu wurden 2003 die Budapest-Kriterien entwickelt (Tabelle 1). Die ursprünglichen IASP-Kriterien führten aufgrund ihrer geringen Spezifität (0,41) häufig zur Überdiagnose, zudem wurden motorische Störungen nicht berücksichtigt. Eine abgewandelte Form der Budapest-Kriterien mit einer noch höheren Spezifität (0,79) wurde für Forschungszwecke entwickelt (Harden et al., 2010).

## 1.3 Epidemiologie und Prognose

Das komplexe regionale Schmerzsyndrom entwickelt sich typischerweise nach einem Trauma oder einer Operation. Dertwinkel et al. (1998) berichteten von 15.000 neuen CRPS-Fällen jedes Jahr in Deutschland (entspricht einer Inzidenz von 18,75/100.000). Aktuelle Studien bewegen sich zwischen 5,5 (Sandroni et al., 2003) und 26,2/100.000 (De Mos et al., 2007). Besonders häufig finden sich Unterarmfrakturen in der Anamnese der Patienten. Nach distalen Radiusfrakturen (Colles Typ)

**Budapest-Kriterien zur Diagnose eines CRPS**

(1) Anhaltende Schmerzen, die im Vergleich zum initialen Trauma unverhältnismäßig sind.
(2) In der Anamnese muss mindestens 1 Symptom in 3 der folgenden 4 Kategorien vorliegen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensorisch: Hyperästhesie und/oder Allodynie</li> <li>• Vasomotorisch: Asymmetrie der Hauttemperatur und/oder Veränderung in der Hautfarbe</li> <li>• Sudomotorisch/Ödem: Ödem und/oder Veränderung/Asymmetrie im Schwitzen</li> <li>• Motorisch/trophisch: Bewegungseinschränkung und/oder motorische Dysfunktion wie Schwäche, Tremor oder Dystonien und/oder trophische Veränderungen (Haare, Nägel, Haut)</li> </ul>
(3) Zum Zeitpunkt der Untersuchung muss mindestens 1 Symptom in 2 oder mehr der folgenden Kategorien vorliegen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensorisch: Hyperalgesie auf spitze Reize (z.B. Nadelstiche) und/oder Allodynie auf leichte Berührung und/oder tiefen, somatischen Druck und/oder Gelenkbewegungen</li> <li>• Vasomotorisch: Asymmetrie der Hauttemperatur und/oder Veränderung/Assymetrie in der Hautfarbe</li> <li>• Sudomotorisch: Ödem und/oder Veränderung/Asymmetrie im Schwitzen</li> <li>• Motorisch/trophisch: Bewegungseinschränkung und/oder motorische Dysfunktion wie Schwäche, Tremor oder Dystonien und/oder trophische Veränderungen (Haare, Nägel, Haut)</li> </ul>
(4) Es gibt keine bessere Erklärung für die vorliegenden Symptome.

Tabelle 1: Budapest-Kriterien zur Diagnose des CRPS (Harden et al., 2010)

entwickelt sich je nach Literatur in 8 bis 25 % der Fälle ein komplexes regionales Schmerzsyndrom (Gradl et al., 2003; Herlyn et al., 2010; Thomson McBride et al., 2008). Den volkswirtschaftlichen Schaden bezifferten Dertwinkel et al. (1998) auf über 100 Mio. Euro pro Jahr allein in Deutschland. In den Niederlanden schätzt man die jährlichen Kosten eines einzelnen CRPS-Patienten (ohne Physiotherapie, Stand 1998) auf 5.700 € (Goebel, 2011).

De Mos et al. (2009) untersuchten 102 CRPS-Patienten im Durchschnitt nach knapp 6 Jahren nach persistierenden klinischen Symptomen. 64 % davon erfüllten immer noch die IASP-Kriterien für ein komplexes regionales Schmerzsyndrom. Selbsteinschätzungen zufolge bezifferten sich 30 % der Betroffenen als geheilt und 54 % als stabil. 16 % jedoch berichteten über ein Fortschreiten der Erkrankung. 54 Patienten übten vor ihrer Erkrankung einen Beruf aus, 41 % davon konnten in ihren Beruf vollständig zurückkehren, 28 % mit Einschränkungen und 31 % waren seit Erkrankungsbeginn unfähig zu arbeiten.

Die Tatsache, dass knapp ein Drittel der Erkrankten zumindest für eine lange Zeit oder sogar

lebenslang nicht wieder arbeiten kann, die hohe finanzielle Belastung durch aufwendige Therapien und nicht zuletzt der Leidensdruck der Patienten durch jahrelange, persistierende Symptome oder sogar eine Verschlimmerung des Krankheitsbildes stellen einen weiteren Anreiz dar, weiterhin nach der Ursache zu forschen und einen Behandlungsansatz zu finden.

## **1.4 Klinisches Erscheinungsbild**

Die frühen Symptome des CRPS sind häufig relativ unspezifisch. So treten zwar Schmerzen, Taubheit, Schwellungen oder sogar eine Steifheit von Gelenken auf, dies ist jedoch nach Operationen oder Traumata relativ häufig, ohne dass sich ein CRPS entwickelt. Demzufolge ist die Gefahr der Fehlinterpretation relativ hoch und ein komplexes regionales Schmerzsyndrom kann leicht übersehen werden (Li et al., 2010).

### **1.4.1 Schmerzen**

Schon Silas Weir Mitchell beschrieb die Schmerzen als brennend, was noch heute eines der Hauptkriterien des CRPS darstellt. Anhaltende Schmerzen, die im Vergleich zum ursächlichen Trauma unverhältnismäßig hoch sind, sind ebenfalls charakteristisch. Der Schmerz entwickelt sich typischerweise in der Nähe des ursächlichen Traumas, kann im Verlauf aber wandern und sogar die gesamte Extremität befallen. In besonders schweren Verläufen kann der Schmerz auch in andere Extremitäten wandern (van Rijn et al., 2011).

### **1.4.2 Sensorische Störungen**

Zu den sensorischen Störungen zählt vor allem die überschießende Reaktion auf Schmerzreize. Hierbei unterscheidet man zwischen Allodynie, eine schmerzhaft Reaktion auf normalerweise nicht schmerzhaft Reize, wie eine leichte Berührung oder nicht schmerzhaft thermische Stimulation, und Hyperalgesie, eine überschießende Schmerzreaktion auf normalerweise leicht schmerzhaft Reize (Harden et al., 2007).



### **1.4.3 Vasomotorische Störungen**

Die Unterschiede der Hauttemperatur sind abhängig vom Stadium. Birklein et al. (2000a) fanden erhöhte Werte in der betroffenen Extremität vor allem im akuten Stadium des CRPS, wohingegen im chronischen Verlauf das betroffene Hautareal meist kälter als die nicht betroffene Gegenseite war. Außerdem fanden sie 3 verschiedene Arten der Hautfarbe: weiß, rot und bläulich. Auch hier gilt, dass dies abhängig vom Stadium ist. Eine Rotfärbung tritt häufig im akuten Zustand auf, die bläuliche Farbe dagegen in chronischen Verläufen (Birklein et al., 2000a).

Es werden aber auch Verläufe beschrieben, in denen die betroffene Extremität von Beginn an kälter als die Gegenseite ist und sich bläulich verfärbt (Veldman et al., 1993).

### **1.4.4 Sudomotorische Störungen und Ödem**

Sudomotorische Störungen wie beispielsweise Schwitzen gehören ebenfalls zu häufigen Symptomen beim CRPS. Eine Hyperhidrose in der betroffenen Extremität findet sich dabei häufiger als ein vermindertes Schwitzen (Birklein et al., 1997). Im akuten Stadium entwickelt sich oft ein subkutanes Ödem, was eine Beurteilung von Muskelatrophie und Subkutangewebe erschwert. Dieses Ödem verschwindet im Verlauf (Veldman et al., 1993; Birklein et al., 2000a).

### **1.4.5 Motorische und trophische Veränderungen**

Typische motorische Störungen beim CRPS sind Schwäche, Tremor und Dystonien (Birklein et al., 2000a). Das Nagel- und Haarwachstum im betroffenen Areal ist oft gestört und in chronischen Stadien treten Muskel- und Hautatrophien sowie Kontrakturen auf. Aufgrund der Schmerzen, des Ödemes und der Kontrakturen kommt nicht selten auch eine eingeschränkte Beweglichkeit vor (Veldman et al., 1993).

### **1.4.6 Veränderungen der Knochenstruktur**

Schon Paul Sudeck fand zu Beginn des letzten Jahrhunderts eine Knochenatrophie beim CRPS. Heute sind eine bleistiftlinienartige Kortikaliszeichnung, gelenknahe, fleckenförmige Entkalkungen und eine lokale Osteopenie oder -porose wichtige radiologische Zeichen bei der Diagnose eines komplexen regionalen Schmerzsyndroms (Scola, 2006).

## **1.5 Therapie**

Aufgrund der nicht vollends verstandenen pathophysiologischen Ursache des CRPS ist eine kura- tive Therapie bislang nicht bekannt. Die aktuelle Behandlung dient der Symptomkontrolle und der Rehabilitation des Patienten. Umso wichtiger ist es, die Diagnose des CRPS frühzeitig zu stellen, damit möglichst rasch mit einer Therapie begonnen werden kann.

### **1.5.1 Physikalische Therapie - Physio- und Ergotherapie**

Physikalische Therapie ist eine häufig benutzte Therapieform beim CRPS und sollte immer die erste Linie der Therapie darstellen (Lee et al., 2002). Wichtig hierbei ist, dass dies immer unterhalb der Schmerzgrenze geschieht, da schmerzhafte Reize einen Ausbruch oder eine Aggravierung der Krankheit auslösen können (Lee et al., 2002; Dowd et al., 2007). Die physikalische Therapie kann nachweislich trophische Veränderungen wie Kontrakturen verringern und damit zur Schmerzreduktion und zum Funktionserhalt beitragen (Lee et al., 2002).

Krankengymnastische Übungen sind nach frischen Verletzungen unerlässlich. Jedoch sollte man dies im akuten Entzündungsstadium (mit Symptomen wie Rötung, Ödem und Schwellung) vermeiden. Hier bieten sich Lymphdrainage, Ruhigstellung der betroffenen Extremität, Analgesierung und lokale Kühlung an (Dowd et al., 2007). Auch Spiegeltherapie kann helfen, aufgetretene Symptome zu lindern (Moseley & Wiech, 2009).

### **1.5.2 Medikamentöse Therapie**

Laut Leitlinien der AWMF haben Bisphosphonate, Steroide (z.B. Prednisolon), die atypischen Analgetika Gabapentin und Ketamin, sowie die topische Anwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) in kontrollierten, randomisierten Studien einen positiven Effekt bei der Behandlung von neuropathischen Schmerzen erzielt (Birklein, 2012). Opioide können vor allem im akuten Stadium eingesetzt werden, bei chronischen Schmerzzuständen sind sie weniger effektiv (Delleijm, 1999). Antidepressiva können einerseits neuropathische Schmerzen lindern, gleichzeitig Nebensymptome wie Depressionen oder Schlafstörungen heilen (Sindrup & Jensen, 1999). Neben der medikamentösen Schmerzbehandlung spielen NSARs eine wichtige Rolle vor allem bei der Therapie von lokalen Entzündungserscheinungen wie Rötung, Schwellung und Überwärmung des betroffenen Areals.

### 1.5.3 Blockade des Sympathikus

Einige Patienten mit einem komplexen regionalen Schmerzsyndrom können mit einer Blockade des Sympathikus behandelt werden. Die Therapie ist vor allem bei Patienten mit sympathisch unterhaltenen Schmerzen (SMP) erfolgreich, wohingegen Patienten mit sympathikusunabhängigen Schmerzen (SIP) davon nicht profitieren (Arnér, 1991). Eine Sympathikusblockade sollte mit physikalischer Therapie kombiniert werden.

## 1.6 Pathophysiologie

Trotz der Erstbeschreibung durch Silas Weir Mitchell und Paul Sudeck vor mehr als einem Jahrhundert, ist die Pathophysiologie des komplexen regionalen Schmerzsyndromes noch immer ungeklärt. Dutzende Studien wurden im vergangenen Jahrhundert durchgeführt, doch keine konnte eine genaue Ursache, wie es zum Vollbild der Erkrankung kommt, finden. Es wird allgemein vermutet, dass mehrere unterschiedliche Faktoren in der Ätiologie eine Rolle spielen.

### 1.6.1 Periphere Sensibilisierung von Nervenendigungen

Ein initiales Trauma kann eine periphere Sensibilisierung von Nervenendigungen hervorrufen oder verstärken. Die primären, afferenten Nozizeptoren oder die Schwann-Zellen der verletzten Nerven sezernieren Neuropeptide wie das Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), Substanz P (SP) und verschiedene inflammatorische Faktoren wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-6 (Cheng & Ji, 2008). Eine ständige periphere Reizung der Nozizeptoren führt zur zentralen Sensibilisierung (Lee et al., 2009).

### 1.6.2 Zentrale Sensibilisierung

Die zentrale Sensibilisierung beschreibt eine erhöhte Erregbarkeit von nozizeptiven Nervenzellen im Rückenmark oder zentralen Nervensystem. Das Schmerzsignal, welches durch das initiale Trauma erzeugt wird, gelangt durch afferente, periphere Nervenfasern ins Rückenmark und führt dort zur Ausschüttung von Neuropeptiden (SP, Bradykinin und CGRP) und dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat (Ji & Woolf, 2001). Diese Peptide und Transmitter binden an ihre spezifischen Rezeptoren der nozizeptiven Neuronen im Rückenmarkhinterhorn und erhöhen deren Erregbar-

keit. Die Rückenmarkneurone erhöhen daraufhin ihre Spontanaktivität und senken ihre Erregungsschwelle auf periphere Reize (Wall & Woolf, 1984). Diese erhöhte Aktivität lässt die Neuronen im Hinterhorn wie einen Verstärker für nozizeptive Reize wirken und führt zur Allodynie und Hyperalgesie (Ji & Woolf, 2001; Wang et al., 2005). Das initiale Trauma kann folglich zur peripheren Sensibilisierung führen, welche wiederum in einer zentralen Sensibilisierung münden kann. Wahrscheinlich treten beide Phänomene als Co-Faktoren gleichzeitig bei der Entstehung eines CRPS auf.

### 1.6.3 Neurogene Entzündung

Entzündungsähnliche Symptome, wie Rötung, Schwellung oder Überwärmung, findet man häufig vor allem im akuten Stadium des CRPS. Wie bereits unter „*Periphere Sensibilisierung von Nervenendigungen*“ erwähnt, haben die primär afferenten Nervenfasern ebenfalls eine efferente, sekretorische Funktion und können nach ihrer Verletzung Neuropeptide (SP und CGRP) und TNF- $\alpha$  sezernieren (Herbert & Holzer, 2002). Maihöfner et al. (2005) und Schinkel et al. (2006) fanden eine Hochregulierung der Neuropeptide und TNF- $\alpha$  in den betroffenen Extremitäten bei CRPS-Patienten.

Substanz P führt zu Extravasation von Blutplasmae Proteinen und daraufhin zum Gewebsödem (Herbert & Holzer, 2002). CGRP kann Temperatur- und Farbveränderungen hervorrufen, da es ein potenter Vasodilatator ist (McLatchie et al., 1998). TNF- $\alpha$ , als proinflammatorisches Zytokin, kann die Sekretion von Entzündungsmediatoren hervorrufen und außerdem am TNF Rezeptor-1 der Nozizeptoren binden und deren Erregbarkeit erhöhen (Sabsovich et al., 2008).

Allerdings gibt es zahlreiche Studien, die das Vorhandensein von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei CRPS-Patienten untersuchten und interessanterweise dabei keinen Unterschied zwischen CRPS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen fanden (Munts et al., 2008; Ribbers et al., 1998; van de Beek et al., 2001). Weiterhin treten Entzündungssymptome (Ödem, Schwellung und Überwärmung der Extremität) meist nur im akuten Stadium auf, bei chronischen Verläufen findet man sie selten. Der Schmerz persistiert aber weiterhin (Sandroni et al., 2003), was vermuten lässt, dass er sich entweder unabhängig von der neurogenen Entzündung entwickelt oder sich mit zunehmender Dauer von der Entzündungsreaktion löst.

#### 1.6.4 Sympathische Dysfunktion

Die teilweise erfolgreiche Anwendung der Sympathikusblockade lässt den Schluss zu, dass einige Symptome des CRPS mit einer Fehlfunktion des sympathischen Nervensystems erklärt werden können. Im frühen, akuten Stadium ist die Aktivität des Sympathikus gehemmt, was zur Vasodilatation der Hautgefäße führt (Wasner et al., 1999). Die häufigen Symptome Rötung und Überwärmung können somit auch mit einer sympathischen Dysfunktion erklärt werden. Um die Minderung der sympathischen Aktivität zu kompensieren, wird die Erregbarkeit und Dichte von Adrenozeptoren erhöht (Drummond et al., 1996; Maihöfner & Birklein, 2007). Wasner et al. (2001) berichteten, dass im chronischen Stadium die betroffene Extremität entweder signifikant wärmer oder kälter als die gesunde Gegenseite ist, wobei aber die Sympathikusaktivität in beiden Fällen überraschenderweise niedrig bleibt. Dies könnte durch eine überschießende sympathische Reaktion hervorgerufen werden, ausgelöst durch eine kompensatorische Hochregulierung von Adrenozeptoren. Dieser Prozess kann somit erklären, warum eine warme Extremität im chronischen Verlauf kälter wird.

Eine starke Vasokonstriktion führt zur lokalen Minderdurchblutung und damit zur verminderten Sauerstoffversorgung. Dies wiederum führt zur Gewebshypoxie und Azidose, was eine Schmerzentwicklung erklären kann (Birklein et al., 2000b). Da Adrenozeptoren hochreguliert sind, kann das zirkulierende Adrenalin diese direkt aktivieren und zu einem sympathisch aufrecht erhaltenen Schmerz führen (Bruehl, 2010).

Eine sympathische Dysfunktion kann folglich einige der Symptome eines CRPS erklären, aber die Tatsache, dass nur wenige Patienten von einer Blockade des Sympathikus profitieren, lässt den Schluss zu, dass noch andere Mechanismen an der Entstehung des Krankheitsbildes beteiligt sein müssen (Cepeda et al., 2002).

#### 1.6.5 Genetische Faktoren

Es wird allgemein angenommen, dass auch genetische Faktoren in der Entwicklung eines CRPS eine Rolle spielen. Herlyn et al. (2010) fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem  $\alpha 1$ -Adrenozeptor und CRPS Typ 1, welches sich nach Radiusfrakturen entwickelte. Zahlreiche weitere Studien beschäftigten sich mit genetischen Ursachen des CRPS, aber keine konnte einen einzelnen Faktor finden, der zum Vollbild des CRPS führt.

Auch andere Ursachen, wie psychologische Faktoren oder eine kortikale Umorganisation wurden in der Vergangenheit berichtet (Birklein, 2005; Zollinger et al., 2007), jedoch bleiben auch diese Faktoren bislang nur Vermutungen.

## 1.7 Tiermodelle

Eines der Hauptsymptome des CRPS ist der neuropathische Schmerz, welcher alleine durch eine körperliche Untersuchung oder bei Berührung ausgelöst oder sogar verstärkt werden kann (Dowd et al., 2007). Bereits eine Vielzahl von Tierstudien versuchte diese neuropathischen Schmerzen und weitere Symptome des CRPS nachzustellen. Zum CRPS 1 existieren bereits zahlreiche Tiermodelle. Guo et al. (2004) schufen ein Modell bei Nagetieren, wobei sie eine Fraktur der Tibia mit einer voreingestellten Zange induzierten. Posttraumatisch erhielten die Tiere einen Castverband. Bei einer zweiten Gruppe, ohne Tibiafraktur, wurde ebenfalls ein Hinterlauf geschient, so dass diese als Kontrollgruppe dienen konnte. Die Tibiafraktur und die Immobilisierung über 4 Wochen brachte CRPS-ähnliche Symptome wie Allodynie, Ödem oder periartikuläre Osteoporose hervor. Interessanterweise fanden Guo et al. diese Symptome aber ebenfalls in der Kontrollgruppe ohne Fraktur. Dies zeigt, dass allein eine Immobilisierung einer Extremität durch einen Castverband ausreicht, um CRPS-ähnliche Symptome zu entwickeln. Gleichzeitig kann damit aber nicht gesagt werden, was die Tibiafraktur in diesem Modell auslöst (Guo et al., 2004). Coderre et al. (2004) konnten mit ihrem postischämischen Schmerzmodell durch Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens an den hinteren Extremitäten von Ratten ein gesteigertes Schmerzverhalten nachweisen. Ein Jahr später zeigten Gradl et al. (2005), dass eine lokale intraarterielle Applikation von mediatorreichen Überständen eines zuvor traumatisierten Muskels zur lokalen Entzündung und einem CRPS-ähnlichen Schmerzsyndrom führt, welches aber bereits nach 4 Tagen verschwand. Auch bei der Kombination aus geschlossenem Weichteiltrauma und „Minimal Nerve Injury“ von Wang (2012) ließen sich CRPS-ähnliche Symptome nur über einen kurzen Zeitraum nachweisen. Aktuell existiert kein Tiermodell zum CRPS I, welches alle Facetten der Erkrankung und vor allem einen chronischen Verlauf widerspiegeln kann.

Für die Induktion eines CRPS II, welches mit einem Nervenschaden einhergeht, wurden in der Vergangenheit mehrere Tiermodelle entwickelt, die auch heute noch gültig und allgemein anerkannt sind. Bennett & Xie (1988) entwickelten ein Modell, bei dem der N. ischiadicus vom darum

liegenden Gewebe befreit und 4 lose Ligaturen darum gelegt wurden, um einen kontinuierlichen Druck auf den Nerven auszuüben. In den folgenden Verhaltensuntersuchungen an den operierten Tiere entstanden die klassischen Symptome, wie Spontanschmerz, Kälte- und Wärmeallodynie oder Hyperalgesie auf taktile Reize (Bennett & Xie, 1988). Das Modell der Chronic Constriction Injury (CCI) entwickelte sich daraufhin als eines der klassischen Tiermodelle zum neuropathischen Schmerz und seinen Langzeiteffekten, jedoch konnte es nicht die bei Patienten häufig vorliegende lokale Entzündungsreaktion nachstellen.

Kim & Chung (1992) legten feste Ligaturen um die Spinalnerven L5 und L6, was ebenfalls neuropathische Schmerzen, Allodynie und autonome Störungen, wie Veränderungen der Hauttemperatur und Ödem, hervorruft. Im Gegensatz zum CCI-Modell von Bennett und Xie kommt es aber bei den festen Ligaturen zu motorischen und sensiblen Ausfällen. Ähnlich verhält es sich beim Modell von Shir & Seltzer (1990), die eine feste Ligatur um den N. ischiadicus legten. Eine minimalere Variante wählte Oaklander (2010), indem sie den N. ischiadicus mit Nadelstichen penetrierte. Auch hier fanden sich postoperativ eine mechanische Hyperalgesie und ein erhöhtes Spontanschmerzverhalten. Bemerkenswert bei diesem Modell ist, dass nur einige der Tiere diese Symptome entwickelten, die meisten jedoch nicht. Diese Tatsache spiegelt den klinischen Alltag weitaus besser wider, denn die meisten Patienten entwickeln kein CRPS nach einem Trauma oder einer Nervenverletzung. Nachteil im Modell der Nadelstichverletzung ist, dass die Symptome bei vielen Tieren nach 14 Tagen bereits verschwanden. Bei chronischen CRPS-Patienten persistiert vor allem der Schmerz aber über einen weitaus längeren Zeitraum. Hier sind Verläufe über mehrere Jahre oder sogar Jahrzehnte nicht selten.



---

## 2 Ziel der Studie

Tiermodelle zum CRPS helfen die Pathophysiologie des Krankheitsbildes besser zu verstehen, jedoch ist kein Modell geeignet, das Vollbild der Erkrankung darzustellen. Das geschlossene Weichteiltrauma von Gradl et al. (2005) auf den Hinterlauf der Ratte erzeugt zwar eine lokale Entzündung, jedoch keine chronischen Schmerzen, wie sie beim CRPS häufig auftreten. Beim CCI-Modell nach Bennett & Xie (1988) konnten zwar chronische Schmerzzustände nachgewiesen werden, jedoch fehlte hier die inflammatorische Komponente.

Wir kombinierten das geschlossene Weichteiltrauma mit den Ligaturen um den N. ischiadicus (CCI-Modell) mit der Vermutung, dass eine akute, lokale Entzündung durch den gleichzeitigen Nervenschaden chronisch werden könnte.

Außerdem entwickelten wir das Modell der Intermediate Nerve Injury (INI), bei dem analog zum CCI-Modell Ligaturen um den N. ischiadicus gelegt werden, diese jedoch am 4. postoperativen Tag entfernt wurden. Field et al. (1994) postulierten, dass sich durch zu eng angelegte Casts ein CRPS entwickeln kann. Dabei kann auch ein peritraumatisches Ödem, welches typischerweise 4 Tage persistiert, nach Castanlage dazu führen, dass der Nerv komprimiert wird (Luo et al., 2013). Im INI-Modell sollte untersucht werden, ob die 2 kurzen Traumata (Weichteilschädigung und Nervenreizung) zu langanhaltenden Schmerzen führen können.

Des Weiteren wurden in postmortalen Knochenscans die Auswirkungen der Modelle auf die Knochendichte und die Mikroarchitektur des kortikalen und trabekulären Knochen untersucht.

### 2.1 Fragestellung

- Führt die Kombination aus einem stumpfen, geschlossenen Weichteiltrauma und dem CCI-Modell zu chronischen Schmerzen und CRPS-ähnlicher Symptomatik?
- Reicht eine Intermediate Nerve Injury aus, um ein CRPS-Vollbild zu erzeugen?
- Lässt sich durch die genannten Modelle die beim Menschen beobachtete Osteopenie erzeugen?



---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere und -haltung

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden artgerecht nach den gültigen Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in einem klimatisierten Raum des Instituts der Experimentellen Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock (Tierschutzbeauftragter Dr. rer. nat. D. Zechner) mit 12 stündigem Tag-/Nachtrhythmus in Einzelkäfigen mit darin liegender Streu und Metallgitterabdeckung gehalten. Ständiger Zugang zu frischem Wasser und Nahrung in Form von Pellets wurde gewährleistet. Die Tierversuche waren nach dem Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei MV genehmigt (Nr. 7221.3.1.1-090/10).

### 3.2 Versuchsgruppen und zeitlicher Ablauf der Versuche

Gruppen	Tiermodell	postoperativer Tag							
		0	2	4	5	7	11	14 & 21	28
1 & 6	CCI/INI 2d	VT, WT, aNL	VT, MNL, IVM	-	-	-	-	-	-
2 & 7	INI 7d	VT, WT, aNL	VT	VT, eNL	VT	VT, MNL, IVM	-	-	-
3 & 8	INI 28d	VT, WT, aNL	VT	VT, eNL	VT	VT	VT	VT	VT, MNL, IVM
4 & 9	CCI 7d	VT, WT, aNL	VT	VT	-	VT, MNL, IVM	-	-	-
5 & 10	CCI 28d	VT, WT, aNL	VT	VT	-	VT	-	VT	VT, MNL, IVM

Tabelle 2: VT=Verhaltenstests (Spontan-, Wärme- und Kälteallodynetestung, mechanische Hyperalgesietestung, Volumen- und Temperaturmessung der Hinterpfoten), WT=stumpfes, geschlossenes Weichteiltrauma des M. soleus, aNL=Anlage der losen Nervenligaturen, eNL=Entfernung der losen Nervenligaturen, MNL=Messung der nervalen Latenz des N. ischiadicus, IVM=Intravitale Fluoreszenzmikroskopie des M. soleus

Die Versuchsgruppen 1 bis 5 stellen die Verum-Gruppen (Tiere mit Nervenligatur) dar, wohingegen die Gruppen 6 bis 10 Kontrollgruppen zu den jeweiligen Versuchsanordnungen sind. Bei den Tieren mit einer Intermediate Nerve Injury befanden sich die Nervenligaturen 4 Tage um den N. ischiadicus, bei der Chronic Constriction Injury dagegen über die volle Zeitdauer des Versuches. Je Versuchsgruppe wurden die Ergebnisse von jeweils 7 Tieren ausgewertet.

### 3.3 Untersuchungstechniken

#### 3.3.1 Spontanschmerz, Wärme-, Kälteallodynie und mechanische Hyperalgesie

Die Tiere wurden in einem 22 x 16 x 15 cm großen Plexiglkäfig mit Lüftungsschlitzen und austauschbarem Untergrund (Eigenbau, Universität Rostock, Deutschland) auf das Spontan-, Wärme- und Kälteschmerzverhalten sowie auf die mechanische Hyperalgesie getestet.

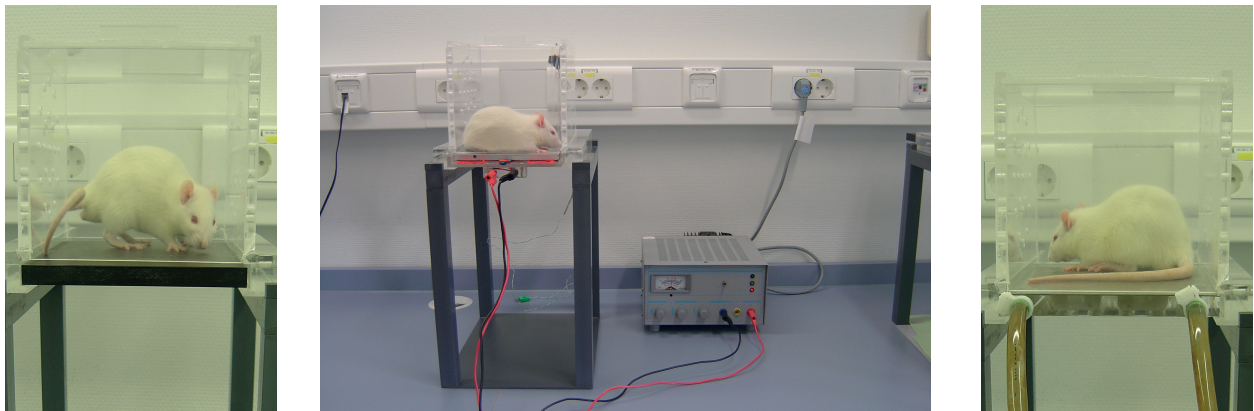


Abbildung 1: Testung des Spontanschmerzverhaltens auf einer thermoneutralen Platte (links) und der Wärme- und Kälteallodynie auf einer durchflussgekühlten bzw. elektrisch beheizten Metallplatte (rechts und Mitte).

Dabei wurde die Haltung der rechten Hinterpfote, nach 10-minütiger Eingewöhnungsphase an das neue Umfeld, beobachtet. Folgende Kategorien nach Attal et al. (1990) kamen bei der Verhaltenstestung zur Anwendung:

Kategorie 0 - das Tier legt die Pfote flach auf den Boden auf; Kategorie 1 - die Zehen der Pfote sind gebeugt, haben aber alle stets Kontakt zum Boden; Kategorie 2 - die Zehen sind gebeugt, zusätzlich befindet sich die gesamte Pfote in Pronationsstellung, d.h. dass mindestens die Kleinzehne angehoben ist; Kategorie 3 - die Pfote liegt nur auf der Ferse auf; Kategorie 4 - die Pfote ist vollständig angehoben; Kategorie 5 - die Ratte leckt an der Pfote.

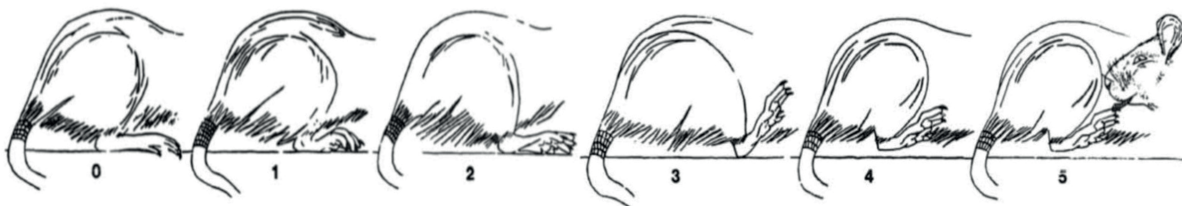


Abbildung 2: Schmerzverhalten nach Attal et al. (1990). Die Abbildung zeigt 6 verschiedene Stellungen der betroffenen Hinterpfote.

Die gesamte Beobachtungszeit dauerte 15 Minuten und es wurde die Zeit gemessen, in der das Tier die Pfote in der jeweiligen Stellung hielt. Der Schmerzindex berechnet sich nach folgender Formel:

$$X = \frac{(0 * t_0) + (1 * t_1) + (2 * t_2) + (3 * t_3) + (4 * t_4) + (5 * t_5)}{900 s}$$

wobei  $t_x$  die Zeit beschreibt, in der das Tier die Pfote in der jeweiligen Stellung gehalten hat.

Nach der Beobachtung des Spontanschmerzes bei Raumtemperatur auf einer Kunststoffplatte im Käfig folgte analog dazu die gleiche Beobachtung der Haltung der Hinterpfote auf einer elektrisch beheizbaren (40°C, Netzgerät: Laboratory Power Supply PS-302A, Platte: Eigenbau der Universität Rostock) und einer durchflussgekühlten (4°C, Thermostatic Circulator: Multitemp II 2219, LKB Bromma, Schweden, Platte: Eigenbau der Universität Rostock) Metallplatte im Sinne einer Wärme- und Kälteallodynietestung nach jeweils 10-minütiger Eingewöhnungszeit.

Anschließend wurde die Schmerzempfindlichkeit im Sinne einer mechanischen Hyperalgesietestung geprüft. Dazu wurde ein Metallgitter als Untergrund in den Käfig geschoben und 6 Semmes-Weinstein-Filamente (Touch-Test®-Filamente, North Coast Medical Inc., Morgan Hill, CA, USA) der Stärken 0,6 g, 1,4 g, 2 g, 6 g, 10 g und 15 g verwendet. Nach ebenfalls 10-minütiger Eingewöhnungszeit an das Gitter wurde pro Durchgang mit jedem Filament 6-mal nacheinander im Abstand von ca. einer Sekunde auf die Unterseite der linken Pfote der Ratte gedrückt, bis sich das jeweilige Filament durchbog und so den maximalen Druck ausübte. Nach jeder Serie von 6-mal 6 Testungen wurde 3 Minuten pausiert, bis wieder mit dem 0,6 g-Filament begonnen wurde. Diese Prozedur wurde insgesamt 5-mal durchgeführt, sodass jedes einzelne Filament pro Messung 30-mal zum Einsatz kam.

### **3.3.2 Messung von Körpergewicht, Temperatur und Volumen der Hinterpfoten**

An allen Beobachtungstagen, an denen keine Operation in Vollnarkose erfolgte, wurden die Tiere nach den Verhaltenstests mit Isofluran narkotisiert, um das Körpergewicht, die Temperatur und das Volumen der Hinterpfoten zu messen. Die Ratten wurden dazu in einen Plexiglaskäfig mit Zu- und Abluftanschlüssen (Knock-out-Box) gesetzt, der initial mit 1,5 l/min Sauerstoff und 5 % Isofluran durchströmt wurde. Sobald die Gasnarkose begann Wirkung zu zeigen, wurde der Gasanteil auf 2 % reduziert, um die Narkose aufrecht zu erhalten.

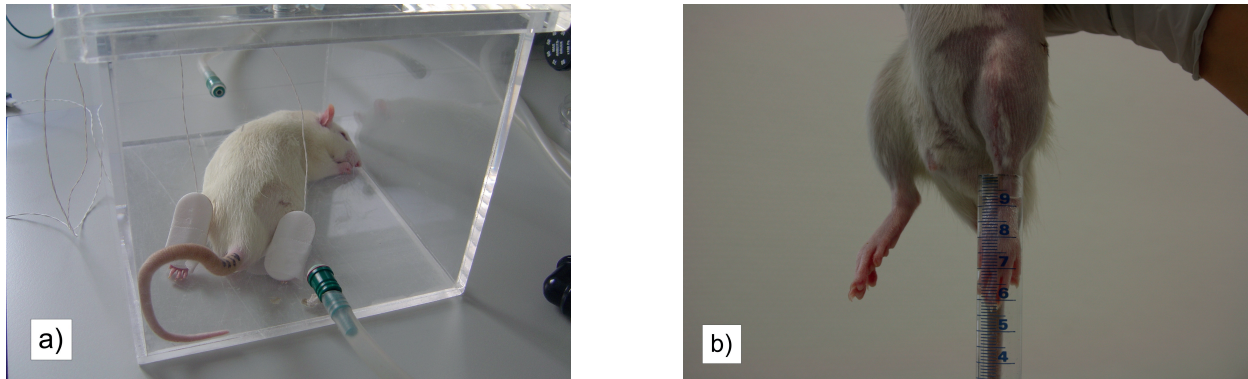


Abbildung 3: a) Tier in Knock-out-Box mit Klebemessfühlern an den Hinterpfoten zur Temperaturbestimmung  
b) Messung des Pfootenvolumens durch Wasserverdrängung

Die Temperaturen der Hinterpfoten wurden mit zwei Klebemessfühlern (Mon-a-therm Hauttemperaturfühler 90045, Mallinckrodt Medical, St. Louis, USA), die auf die Plantarseiten der Pforten geklebt wurden, gemessen. Die Klebeelektroden wurden mit einem EKG-Monitorsystem (Sirecust 1260, Siemens, Deutschland) verbunden und die Temperatur durch Umstecken der Messfühler am Gerät kurz nacheinander abgelesen. Das Körpergewicht wurde mit einer digitalen Waage (Genauigkeit  $\pm 1$  g, Soehnle, Nassau, Deutschland) gemessen. Als Letztes erfolgte die Volumensmessung der Hinterpfoten. Dazu wurde ein 10 ml-Messzylinder bis zu einer vordefinierten Höhe mit Wasser gefüllt, dann die beiden Hinterpfoten nacheinander bis zur Ferse in den Zylinder eingetaucht und die Wasserverdrängung abgelesen.

### 3.4 Chirurgische Interventionen

#### 3.4.1 Weichteiltrauma des M. soleus

Alle Tiere der gesamten Versuchsreihe wurden an Tag 0, nach den Ausgangsmessungen, mit intraperitoneal verabreichtem, 6 %-igen Pentobarbital-Natrium (Narcoren, Merial GmbH, Halbergmoos, 55 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Nach der Messung des Körpergewichtes, der Temperatur und des Volumens der Hinterpfoten wurde der linke Ober- und Unterschenkel dorsalseitig mit einer elektrischen Kleintierschermaschine (Aesculap Favorita II GT-104, Braun, Melsungen, Deutschland) trocken rasiert. Danach wurde computergesteuert mit einem druckluft-

betriebenen Stoßbolzen ein standardisiertes, stumpfes, geschlossenes Weichteiltrauma am linken tibialen Muskelkompartiment nach Gradl et al. (2006) gesetzt. Dazu wurden ein Pneumatic Impact Controller, eine Quelle für Druckluft und ein verstellbarer Tisch und Stößel (teilweise Eigenbau Universität Rostock) verwendet. Auf dem Tisch befand sich eine dem Hinterlauf der

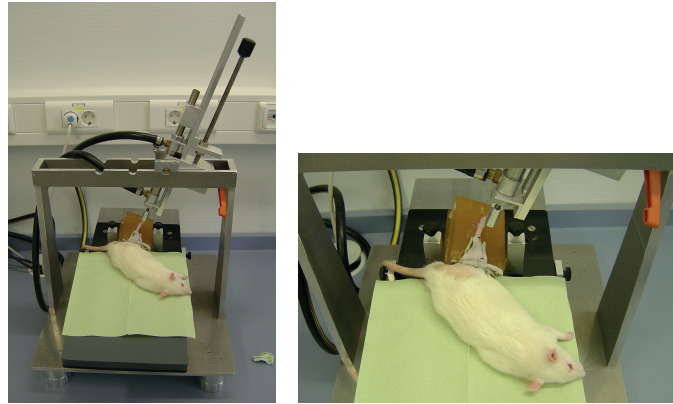


Abbildung 4: stumpfes, geschlossenes Weichteiltrauma

Tiere angepasste Gussform aus Plastik, in welche die Pfote eingespannt wurde. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass durch das Einspannen keine Schäden an Haut oder Muskulatur entstanden. Der Metallstößel wurde so eingestellt, dass das Trauma mittig zwischen Caput fibulae und Malleolus lateralis mit einer Eindringtiefe von 0,5 cm gesetzt werden konnte. Das Trauma wurde mit einem Druck von 100 psi appliziert. Ein deutliches Hämatom zeigte den Weichteilschaden unmittelbar nach dem Trauma an.

### 3.4.2 Anlage der Ligaturen um den N. ischiadicus (CCI-Modell)

Die Tiere befanden sich während der Operation auf einer 37°C warmen Metallplatte, um die Körpertemperatur während der Narkose konstant zu halten. Die folgenden chirurgischen Eingriffe erfolgten unter nicht sterilen, aber aseptischen Bedingungen. Nach Desinfektion der Haut am Oberschenkel mit Braunoderm® (Braun, Melsungen, Deutschland) wurde ein ca. 1 cm langer Zugang parallel zum Femur mit einer Schere gesetzt. Durch stumpfes Spreizen mit der Schere wurden Haut und Muskelfaszie voneinander getrennt. Zwischen dem M. gluteus medius und dem M. biceps femoris war bei den Tieren eine gelbliche Raphe entlang der Faszie erkennbar, an der der Zugang in die Tiefe erfolgte. Ein ebenfalls parallel zum Femur verlaufender Schnitt eröffnete die Faszie und beide Muskeln konnten stumpf voneinander getrennt werden. Durch erneutes Spreizen mit der Schere gelangte man in die Tiefe, bis der N. ischiadicus sichtbar wurde (Abbildung 5, links). Dieser wurde vom umliegenden Gewebe befreit, sodass er mit einer stumpfen, gebogenen Pinzette umfahren werden konnte.



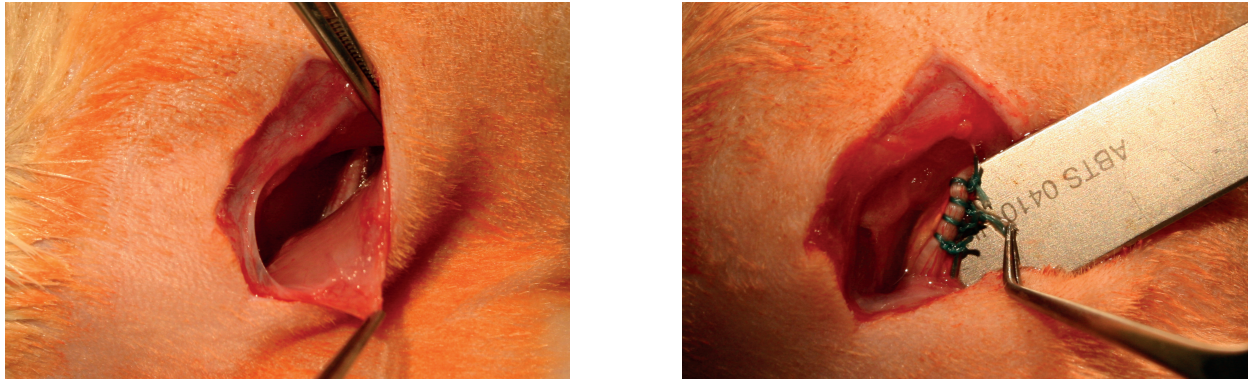


Abbildung 5: Atraumatische Präparation des N. ischiadicus und Anlage der 4 losen Nervenligaturen

Nun wurde mit einer anatomischen Pinzette ein geflochtener, nicht resorbierbarer Faden (USP 4/0 Dermafil Green Polyester, SMI, St. Vith, Belgien) an den Nerv gelegt und mit der gebogenen Pinzette darunter durchgezogen. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass der Faden nicht direkt am Nerv entlangglitt, um eine Manipulation und mögliche Schäden am N. ischiadicus zu vermeiden. Ein einfacher Knoten wurde leicht angezogen, bis gerade eine motorische Reaktion an der Hinterpfote der Ratte sichtbar wurde. Zwei weitere gegenläufige Knoten sollten verhindern, dass sich die Ligatur lösen konnte. Diese Prozedur wurde mit 3 weiteren Ligaturen, jeweils im Abstand von ca. 1 mm, wiederholt (Abbildung 5, rechts). Nach dem Anbringen der Ligaturen proximal der Trifurkation des Nerven wurde zuerst die Faszie der Muskulatur mit einem resorbierbaren, geflochtenen und antibiotisch beschichteten Faden (3/0, Vicryl®Plus Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland), danach die Haut durch Einzelknopfnähte verschlossen. Als Letztes wurde die Wunde erneut desinfiziert und mit Pflasterspray (Opsite, Smith & Nephew Medical Ltd., England) zusätzlich gesichert. Die Tiere wurden nach der Operation auf eine Papierunterlage in den Käfig zurückgelegt und es wurde darauf geachtet, dass die Atemwege stets frei waren. Bei den Tieren der Kontrollgruppen 6 bis 10 wurde der N. ischiadicus lediglich freigelegt und dargestellt, ansonsten analog zur Verum-Gruppe vorgegangen. Anschließend wurde die Wunde schichtweise durch Einzelknopfnähte verschlossen.

### 3.4.3 Entfernung der Nervenligaturen (INI-Modell)

In den beiden Gruppen 2 und 3 (INI-Modell) wurden am 4. postoperativen Tag die Ligaturen entfernt. Dazu wurden die Tiere nach den Verhaltenstests in Pentobarbitalnarkose gelegt, das Kör-

pergewicht, die Temperatur und das Volumen der Hinterpfoten gemessen und die zu operierende Stelle am linken Hinterlauf trocken rasiert. Nach der Desinfektion wurde die Wunde erneut eröffnet. Nachdem alle Fäden entfernt wurden, konnte durch stumpfes Spreizen der N. ischiadicus mit den 4 Ligaturen erneut frei präpariert werden. Danach wurden mit einer mikrochirurgischen Schere die 4 Ligaturen vorsichtig entfernt, ohne dabei den Nerv zu schädigen. Die Tiere der Gruppe 7 und 8 erhielten am 4. postoperativen Tag ebenfalls eine Operation zur Kontrolle. Bei ihnen wurde lediglich der N. ischiadicus freigelegt und dargestellt. Anschließend erfolgte wieder ein schichtweiser Wundverschluss mit Einzelknopfnähten.

#### **3.4.4 Messung der Latenzzeit des N. ischiadicus**

Am letzten Versuchstag der jeweiligen Gruppe (Tag 2, 7 oder 28) wurde nach i.p. Pentobarbitalnarkose und atraumatischer Freilegung des N. ischiadicus die Latenz der Nervenleitung (Zeitspanne zwischen nervaler Reizung mit einer Elektrode und muskulärer Kontraktionsantwort) gemessen. Dazu wurden insgesamt 5 Nadelelektroden verwendet (Abbildung 6a): Die Kathode (Reizelektrode) wurde jeweils proximal und distal der losen Ligaturen an den N. ischiadicus gehalten und die Anode an der Muskelfaszie am Wundrand angebracht. Weiterhin wurden eine Ableitelektrode in den M. tibialis anterior und die Referenzelektrode in das Weichteilgewebe zwischen Os metatarsale III und IV der betroffenen Seite positioniert. Die Erdung erfolgte über eine subkutane Elektrode ebenfalls am Wundrand. Mit einer Stromstärke von 0,2 mA wurde der Nerv mit 5 Rechteckstromstößen (Isostim A320, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) im Abstand von einer Sekunde gereizt. Blieb eine Kontraktionsantwort des Muskels aus, wurde die Stärke der Reizung bis auf maximal 2mA angepasst. Verstärkt wurde das aufgenommene Signal der Ableitelektrode mit 1 V/mV (Typ EXT-10C, Npi Electronics, Tamm, Deutschland) und im Bereich zwischen 30 Hz und 1,3 kHz selektiert.

Am Computer erfolgte die Anzeige des gemessenen Muskelsummenpotentials mittels einer LabView-Software (National Instruments, Austin, Texas). Jeweils am positiven Scheitelpunkt wurde die Zeit notiert und aus distaler und proximaler Reizung eine Differenz gebildet, welche die Latenzzeit der nervalen Reizung darstellt (Abbildung 6b, blaue Linie).

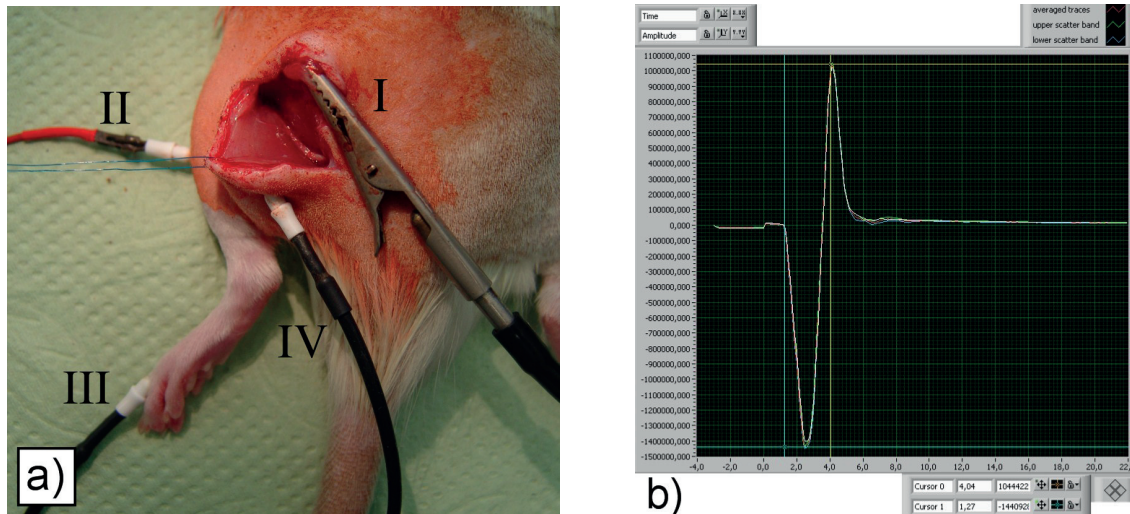


Abbildung 6: Messung der Latenzzeit des N. ischiadicus: a) Anordnung der Elektroden: Anode (I), Ableitelektrode (II), Erdung (III), Referenzelektrode (IV); b) Grafische Darstellung des Muskelsummenpotentials

### 3.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.5.1 Tracheotomie und Katheterisierung der A. carotis communis

Am letzten Beobachtungstag (Tag 2, 7 oder 28) wurde eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie des M. soleus, als Endpunkt des *in vivo* Untersuchungszeitraumes, durchgeführt. Nach den Verhaltens-tests wurden die Tiere erneut in Pentobarbitalnarkose gelegt, das Körpergewicht, die Temperatur und das Volumen der Hinterpfoten gemessen. Danach wurden der linke Oberschenkel dorsalseitig und die ventrale Seite des Halses trocken rasiert.

Zur Standardisierung der Messungen wurden die Tiere während der intravitale Fluoreszenzmikroskopie durchgängig beatmet. Dazu erfolgte die Lagerung der Tiere auf dem Rücken auf einer Wärmeplatte (37°C). Nach Desinfektion der ventralen Halsregion wurde die Haut mit einem ca. 2,5 cm langen, längs zur Körperachse verlaufenden Schnitt eröffnet. Durch stumpfes Spreizen konnten Unterhautfett-, Drüsen- und Muskelgewebe getrennt und die Trachea freigelegt werden. Diese wurde vom dorsal anliegenden Ösophagus getrennt und ventral zwischen zwei Knorpelspannen eröffnet. Danach wurde ein Tubus (Abbildung 7) in die Trachea eingeführt und die Tiere mit Hilfe eines Beatmungsgerätes (TSE Respiration Pump, TSE Systems, Kronberg, Deutschland) mit einem Tidalvolumen von 1,1 ml/Kg Körpergewicht Raumluft und einer Atemfrequenz von ca. 25 pro Minute beatmet. Nachdem die Beatmung sichergestellt war, erfolgte eine arterielle Katheterisierung, um eine Vollblut- und Blutgasanalyse und die Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen



zu ermöglichen. Dazu wurde die rechte A. carotis communis durch stumpfes Spreizen freigelegt. Da an diesem Gefäß der N. vagus anliegt, musste dieser vorsichtig von der Arterie getrennt werden. Die Arterie wurde auf eine Metallpinzette aufgespannt und am herzfernen Ende durch eine Ligatur mit geflochtenem Faden (USP 3/0 Dermafil Green Polyester, SMI, St. Vith, Belgien) ligiert, um einen späteren Rückfluss von Blut zu vermeiden. Mit einer mikrochirurgischen Federschere (120 mm, Braun, Tuttlingen, Deutschland) wurde die Arterie ventral eröffnet und ein Katheter (Fine Bore Polythene Tubing, Smiths Medical Ltd., Kent, UK) ca. 1 cm tief in das Gefäß eingeführt. Dieser wurde mit zwei weiteren Ligaturen um das Gefäß fixiert, sodass ein Herausrutschen unmöglich war. Der arterielle Katheter war so konzipiert, dass jederzeit eine Blutentnahme zur Kontrolle der Beatmung über einen 3-Wege-Hahn möglich war. Dazu wurde ein Kapillarröhrchen (200 µl, Inhalt: 150-200 IE/ml Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Heparin; Siemens Healthcare Diagnostics, NY, USA) mit arteriellem Blut gefüllt. Am Analysegerät (Rapidlab 348, Bayer Vital, Fernwald, Deutschland) wurde das Blut auf pH, pCO<sub>2</sub> und pO<sub>2</sub> untersucht und gegebenenfalls das Beatmungsregime über das Tidalvolumen oder die Beatmungsfrequenz angepasst.

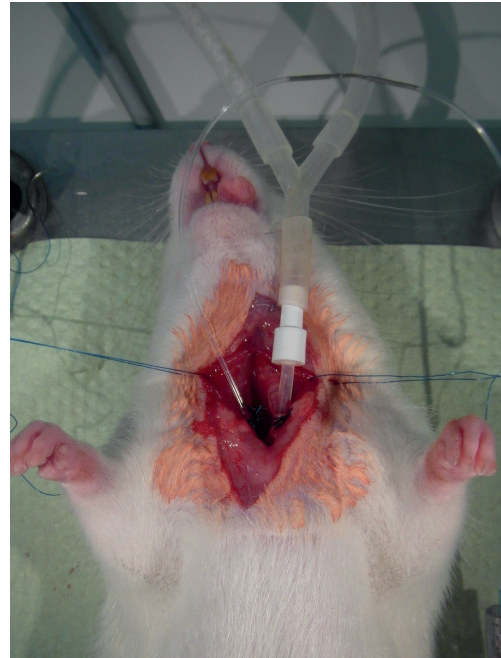


Abbildung 7: Maschinell beatmetes und arteriell-katheterisiertes Versuchstier vor der Mikroskopie

#### 3.5.2 Präparation des M. soleus

Nach der Katheterisierung wurden die Tiere auf einer mit Aluminiumfolie überzogenen Styroporplatte auf dem Bauch gelagert. Die linke Hinterpfote wurde mit einer durch die Haut an der Plantarseite der Ferse gestochenen Kanüle fixiert und der Muskel dadurch langgezogen. Durch einen Hautschnitt entlang der Tibiakante erfolgte der Zugang zur Muskulatur. Die Faszie wurde mit einem elektrischen Hochtemperatur-Kauter (Servoprax, Wesel, Deutschland) eröffnet, um Blutungen zu vermeiden. Anschließend konnte die Faszie an der lateralen Seite so aufgezo-gen werden, dass zuerst der M. gastrocnemius und danach der M. soleus sichtbar wurden. Die Faszie und die Haut

wurden mit Haltefäden auf der Styroporplatte fixiert. Der zu mikroskopierende Muskel wurde von weiteren dünnen Faszien befreit, flach aufgespannt und mit einem Deckglas bedeckt. Zwischen Deckglas und Muskel wurde 0,9 %-ige Kochsalzlösung gespritzt, um Lufteinschlüsse zu entfernen und eine Mikroskopie zu ermöglichen.

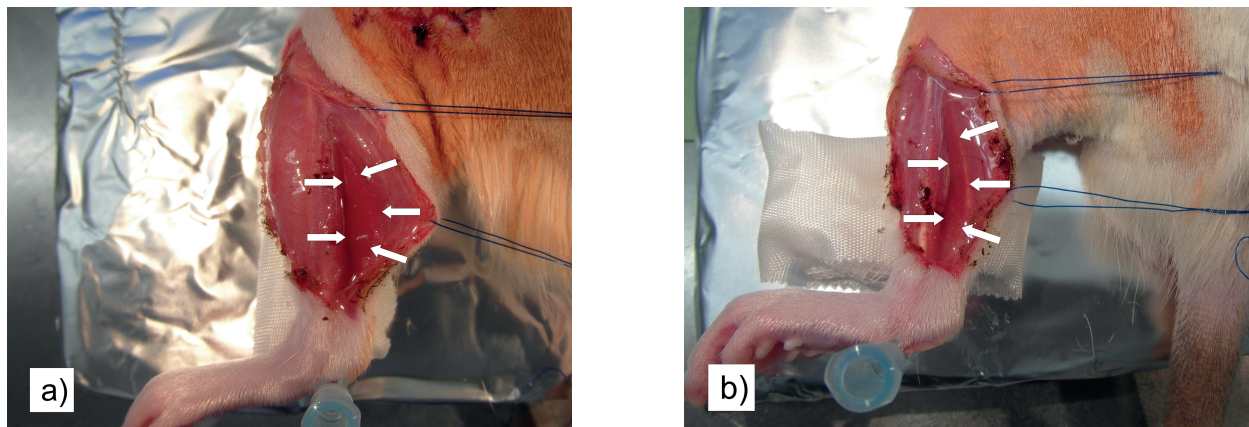


Abbildung 8: Für die Mikroskopie präparierter M. soleus an einem a) sham-operierten und einem b) CCI-Tier am 28. postoperativen Tag. Die Unterschenkelmuskulatur des CCI-Tieres ist dabei deutlich atroph (die Pfeile markieren die Grenze des M. soleus).

#### 3.5.3 Methodik der Mikroskopie

Nach der Präparation des M. soleus wurde an den arteriellen Katheter ein EKG-Monitorsystem (Si-recust 1261, Siemens, Berlin, Deutschland) angeschlossen. Dies erlaubte eine intraarterielle Puls- und Blutdruckbeurteilung und -überwachung zur Standardisierung der Messungen. Es wurde ein Epifluoreszenzmikroskop (Axiotech Vario, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland), als Lichtquelle eine 120 W Quecksilberdampf Lampe (HXP-120, Kübler, Villingen, Deutschland) und Filtersets zur blauen (Exzitation/Emission: 465-495 / >505 nm), grünen (510-560 / >575 nm) und ultravioletten (340-380 / >400 nm) Epiillumination verwendet. Durch den Einsatz von Wasserimmersionsobjektiven (Achromplan 20x / 0,50 WPh2 und 40x / 0,80 W, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) wurde eine 306- bzw. 630-fache Vergrößerung erreicht. Während die Aufnahme der NADH-Messung und der funktionellen kapillären Dichte (FKD) in 630-facher Vergrößerung erfolgte, wurde die Messung der Leukozytenzahl und die Beurteilung der Sammelvenolen in 306-facher Vergrößerung durchgeführt. Die einzelnen stabilen und frei von Bewegungsartefakten erstellten Aufnahmen wurden randomisiert am gesamten M. soleus aufgezeichnet. Eine Videokamera (FK-CM-2412-2-01-IQ-R4, Pieper GmbH, Schwerte, Deutschland) zeichnete unter Zwischenschaltung eines externen Zeitgenerators

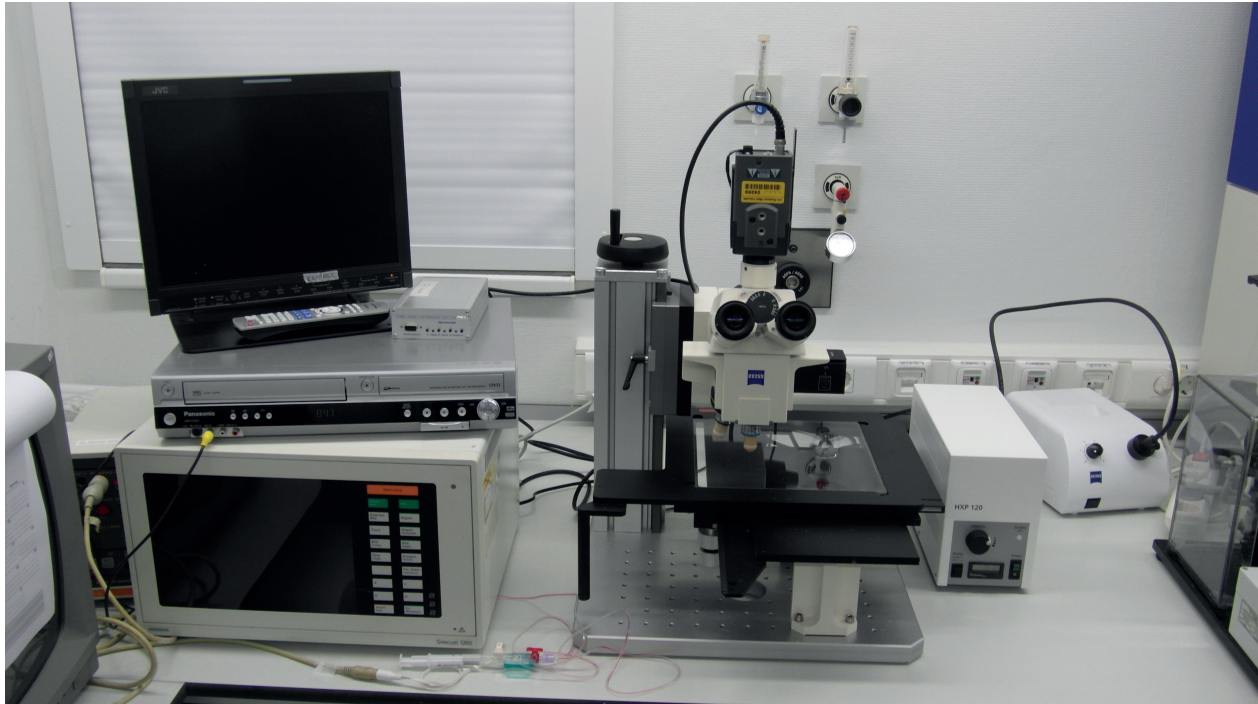


Abbildung 9: Zeiss Epifluoreszenzmikroskop mit Lichtquelle, Videokamera, VHS-Rekorder und EKG-Monitor

(TCI-70 RTV, Alpermann/Velte, Hamburg, Deutschland) über einen VHS-Rekorder (DMR-ES35V, Panasonic, Osaka, Japan) auf eine Videokassette auf. Das Livebild sowie die Aufnahme waren jederzeit am LCD-Monitor zu sehen.

Im mikroskopischen Bild der quergestreiften Muskulatur waren Kapillaren, postkapilläre Venolen, terminale Arteriolen und Sammelvenolen sichtbar. Arterielle Gefäße waren an der schnellen Fließgeschwindigkeit des Blutes, einem geradlinigen Verlauf und der Verzweigung in Flussrichtung ( $120\text{--}150^\circ$ ) erkennbar. Sammelvenolen, postkapilläre Venolen und auch Kapillaren stellten sich dagegen meist geschlängelt dar. Mehrere Venolen ( $\varnothing 30\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$ ) flossen in eine größere Sammelvenole ( $\varnothing 40\text{--}120\text{ }\mu\text{m}$ ) zusammen und die Fließgeschwindigkeit war insgesamt wesentlich langsamer als in arteriellen Gefäßen. Kapilläre Gefäße hatten einen Durchmesser von ca.  $5\text{--}8\text{ }\mu\text{m}$  und schlossen sich an die terminale Arteriolen ( $\varnothing 10\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$ ) an. Begonnen wurde mit der Aufnahme des Gefäßsystems in 630-facher Vergrößerung zur späteren Messung der NADH-Autofluoreszenz. Dazu wurde die Lichtquelle auf maximale Intensität gestellt und das ultraviolette Filterset verwendet. Über eine Dauer von 10 Sekunden wurde ein Bereich mit mehreren Venolen aufgezeichnet (Abbildung 10a). Die NADH-Autofluoreszenz diente als Indikator des Redoxstatus des Skelettmuskels.



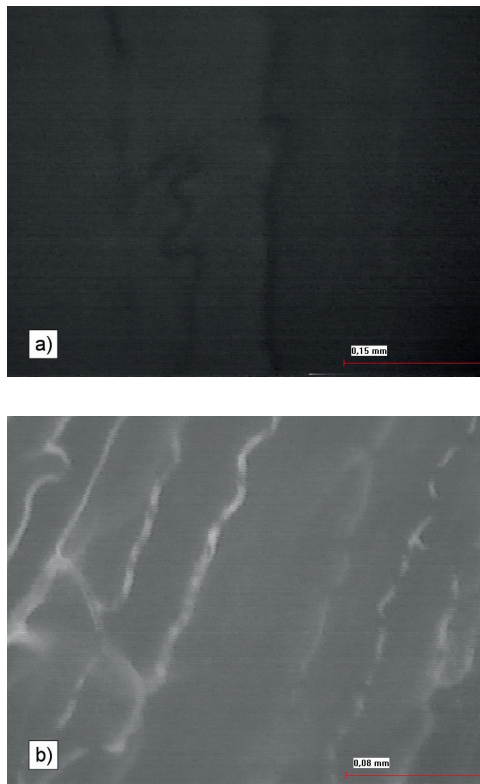


Abbildung 10: Kapillaren a) vor (NADH-) und b) nach Gabe von FITC-Dextran (FKD-Messung)

Nach der Aufnahme von 5 verschiedenen Bereichen schloss sich die Beurteilung der funktionellen kapillären Dichte (FKD) an. Dazu wurden über den arteriell liegenden Katheter 0,1 ml 2 %-iges FITC-Dextran verabreicht, um eine Fluoreszenz des Blutplasmas zu erreichen und diese unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Auch hier wurden 5 Aufnahmen getätigt, wobei bei jeder Aufnahme langsam durch die verschiedenen Schichten der Muskulatur fokussiert wurde, um auch in der Tiefe liegende Gefäße erfassen zu können. Zur Darstellung der fluoreszierenden Gefäße wurde das blaue Filterset verwendet. Die funktionelle kapilläre Dichte erfasste die Gesamtlänge der perfundierten Kapillaren pro mikroskopischen Gesichtsfeld ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ , Abbildung 10b).

Nun wurde 0,1 ml Rhodamin (1 %) zur Anfärbung von Leukozyten arteriell appliziert. In 306-facher Vergrößerung wurden gezielt 5 Sammelvenolen ( $20\text{--}40\text{ }\mu\text{m}$ ) auf-

gesucht (Abbildung 11) und zuerst mit dem blauen Filterset für 15 Sekunden und danach mit dem grünen Filterset für 35 Sekunden aufgenommen. Dadurch war später in der Auswertung eine Bestimmung der Fließgeschwindigkeit des Blutes, der Größe des Gefäßes, eine eventuell vorhandene Plasmaextravasation und die Differenzierung zwischen schnellen, am Gefäß entlang gleitenden und daran haftenden Leukozyten möglich. Aufgrund des hohen Molekulargewichts (150 kDa) verbleibt FITC-Dextran unter physiologischen Bedingungen im Gefäßsystem und tritt nur bei einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität in den Extravasalraum über. Durch die Messung von Grauwerten intra- und extravasal ist die Berechnung eines Quotienten (extra-/intravasal) möglich, welcher unter physiologischen Bedingungen  $<1$  und bei pathologischer Permeabilität des Gefäßsystems  $>1$  ist.

Die angefärbten Leukozyten wurden in 3 Gruppen unterteilt: sich schnell bewegende, langsam am Endothel entlang rollende und permanent adhären te weiße Blutkörperchen. Sich schnell bewegende Leukozyten wurden als solche definiert, wenn sie den Gefäßabschnitt ohne Interaktion mit dem Endothel passierten. Rollende Leukozyten passierten den Bereich mit 40 % der Zentralstrom-

geschwindigkeit und waren temporär adhären. Fest am Endothel haftende Leukozyten wurden als permanent adhären bezeichnet. Die Ergebnisse wurden in  $\text{n/mm}^2$  Endotheloberfläche angegeben, wobei sich die Fläche aus dem Gefäßdurchmesser und der Länge berechnet ( $F = l \times \pi \times d$ ).



Abbildung 11: Sammelvenole mit am Endothel haftenden (Pfeile oben links) und sich schnell bewegend Leukozyten (Pfeile unten)

#### 3.5.4 Auswertung der Mikroskopie mit dem Programm „CapImage“

Zur weiteren Analyse wurde die Aufnahme nach Abschluss der Fluoreszenzmikroskopie über einen VHS-Player (AG-7350, Panasonic, Osaka, Japan) mit der Software „CapImage“ (Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) digital analysiert. Dabei wurde für die funktionelle kapilläre Dichte in einem Standbild alle perfundierte Kapillaren nachgezeichnet und so deren Gesamtlänge bestimmt. Leukozyten wurden an 5 Stellen auf einer Gefäßlänge von 100  $\mu\text{m}$  in 30 Sekunden gezählt und für die NADH-Messung und die Bestimmung der makromolekularen Plasmaextravasation im Gefäßlumen und daneben die Grauwerte bestimmt (Abbildung 12).

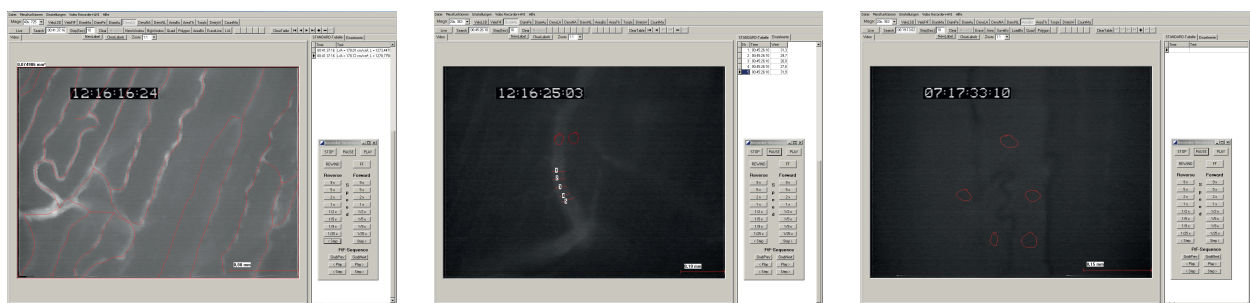


Abbildung 12: Auswertung mit dem Programm „CapImage“: links: FKD, Mitte: makromolekulare Plasmaextravasation (Kreise) und Messung des Durchmessers (Linien 1-5), rechts: NADH

### 3.6 Postmortale Bestimmung des Muskelödems

Zur Bestimmung des Muskelödems wurde den Tieren postmortal beidseitig der M. tibialis anterior entnommen und dessen Feuchtgewicht mit einer Präzisionswaage (Genauigkeit  $\pm 1$  mg, Acculab VIC-123, Precision Weighing Balances, Bradford, UK) bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 65°C in einem Ofen, wurde das Trockengewicht gemessen und aus dem Quotient aus Feucht- und Trockengewicht ein Index zur Beurteilung des intramuskulären Ödems errechnet.

### 3.7 Beurteilung von Knochendichte und Mikroarchitektur des Knochens

Anschließend wurde den Tieren beide Tibiae entnommen und bei 6-8°C in 70 %-igem Alkohol konserviert aufbewahrt. Zeitnah nach Entnahme wurden die Knochen in einem Mikro-Computertomographen (Micro-CT, Skyscan 1076, Skyscan/Bruker, Kontich, Belgien; Abbildung ??) analysiert.

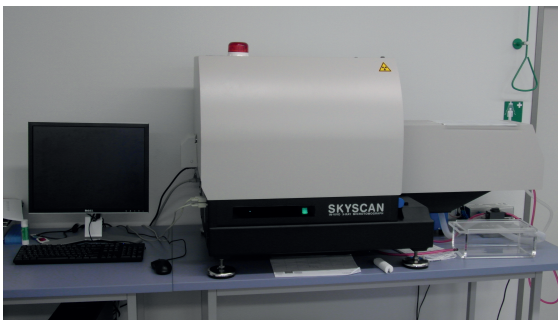


Abbildung 13: Skyscan Micro-Computertomograph 1076

Vor dem Scan wurden die Knochen für 24 h in 0,9 %-iger Natriumchlorid-Lösung gelagert, um Rückstände des Alkohols am Knochen auszuwaschen. Beide Unterschenkelknochen wurden in Frischhaltefolie eingewickelt und zum Scannen so in einem Plastikröhrchen fixiert, dass keine Bewegung möglich war. Als Scansoftware wurde Skyscan1076 v.4.2 (Skyscan, Kontich, Belgien) verwendet.

Mit dem Programm NRecon (Skyscan, Kontich, Belgien) wurden die angefertigten Aufnahmen anschließend dreidimensional rekonstruiert (Abbildung 14)

Parameter	Wert
Schichtdicke/Auflösung:	9 $\mu\text{m}$
Rotational Step:	0,4°
Filter:	Aluminium 0,5 mm
Rotation:	180°
Grauwerte (kortikal):	100-255
Grauwerte (trabekulär):	64-255

Tabelle 3: Verwendete Parameter für die Knochenanalyse

Scan- und Rekonstruktionsartefakte wurden mit der Software korrigiert (Beam hardening 30,

Defect Pixel Masking 20 %, Ring Artefact Reduction 6). Da es nicht möglich war, jeden Knochen in derselben Position im Plastikröhrchen zu scannen, wurden alle bereits dreidimensional rekonstruierten Knochen axial ausgerichtet, sodass eine Standardisierung der späteren Auswertung möglich war. Dies erfolgte im „Data Viewer“ (Skyscan, Kontich, Belgien).

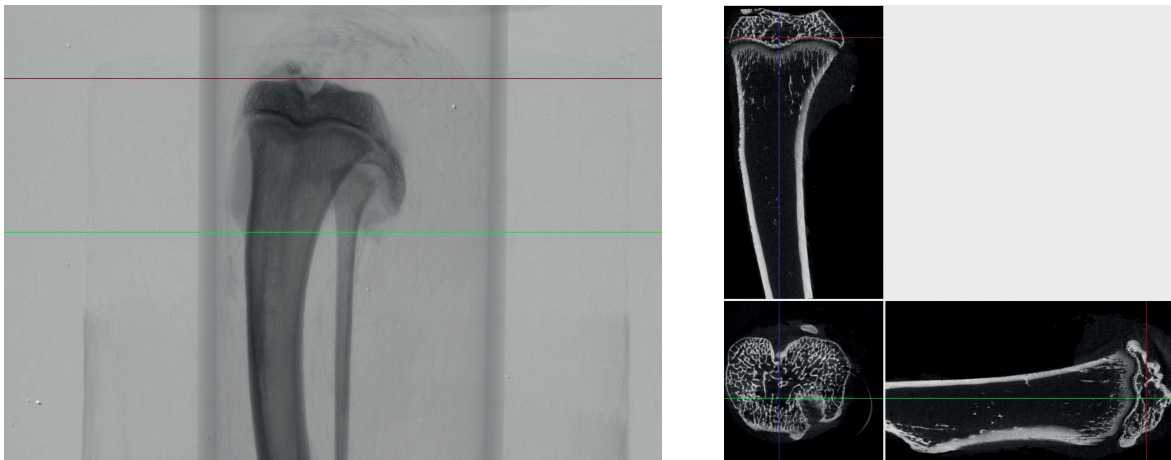


Abbildung 14: links: inverses Röntgenbild während des Scans; rechts: rekonstruierter und axial ausgerichteter Knochenquerschnitt

Anschließend wurden die ausgerichteten Bilder in die CT-Analyzer-Software (Skyscan, Kontich, Belgien) geladen. Hier wurde als Referenzpunkt der proximale Beginn der Epiphysenfuge definiert. Jeweils 200 Schichtbilder (entspricht ca. 1,8 mm) distal wurde die obere Begrenzung des trabekulären Knochenanteils festgelegt, welcher analysiert werden sollte, 700 Bilder (ca. 6,3 mm) unterhalb des Referenzpunktes der untere Begrenzungspunkt des Analyseareals, sodass insgesamt ein Bereich von 501 Bildern (ca. 4,5 mm) des Knochens ausgewählt wurde. In diesem Bereich wurde an repräsentativen Schnitten frei Hand die „Region of Interest“ eingezeichnet und von Schicht zu Schicht mittels der „Morphing-Funktion“ interpoliert. Diese entsprach dem gesamten Bereich des trabekulären Knochens unter Aussparung der Kortikalis (Abbildung 15). Nach demselben Prinzip wurde mit der Analyse des kortikalen Knochens verfahren. Hier lag der obere Punkt der Auswahl 1000 Bilder (ca. 9 mm) distal des Beginns der Epiphysenfuge und ein Bereich von 201 Bildern (1,8 mm) wurde analysiert.



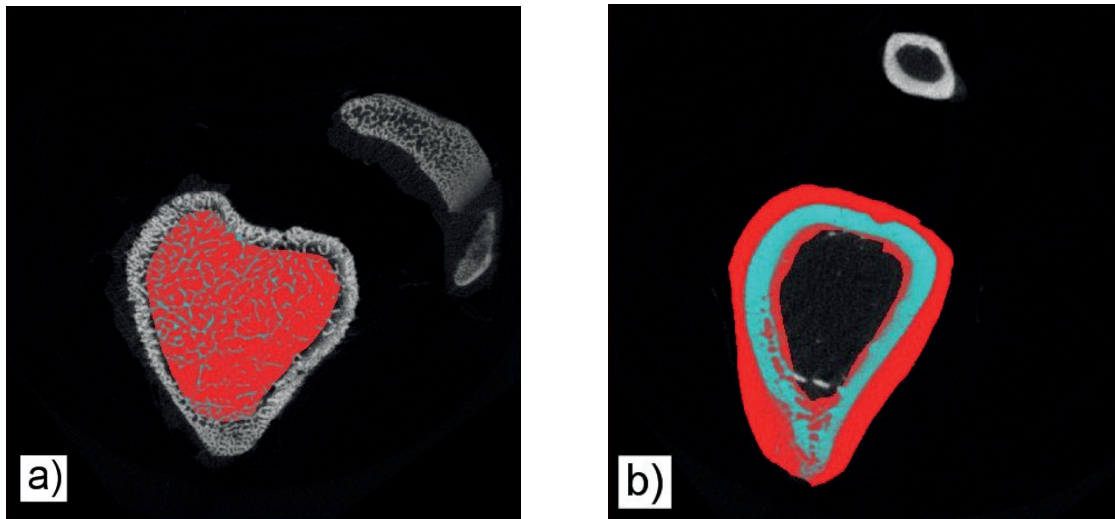


Abbildung 15: Eingezeichnete „Region of Interest“ (rot) im a) trabekulären und b) kortikalen Knochen

Innerhalb der jeweiligen „Region of Interest“ errechnete das Programm die Knochendichte, den Knochen-Volumen-Anteil, die Anzahl der Trabekel, sowie deren Dicke und Separation (entspricht dem Abstand der Trabekel) für den trabekulären Knochen. Für den kortikalen Knochenanteil wurde ebenfalls die Knochendichte bestimmt, außerdem die gesamte Querschnitt- und Knochenfläche und die Dicke der kortikalen Knochenschicht. Bei der Analyse wurden für beide Knochenanteile unterschiedliche Graugrenzwerte festgelegt (Thresholding: trabekulär: 64-255, kortikal 100-255). Dies erlaubte eine genauere Differenzierung zwischen Knochen- und Weichteilgewebe und damit exaktere Messergebnisse (Bouxsein et al., 2010). Als Referenzwerte für die Knochendichtemessung wurden 2 Hydroxylapatit-Phantome mit einer Dichte von 0,25 und 0,75 g/cm<sup>3</sup> zur Kalibrierung des Gerätes gescannt.

### 3.8 Histologische Bestimmung der Apoptoserate mit Cleaved Caspase 3

Nach Abschluss der mikroskopischen Untersuchung wurde den Tieren neben den beiden Tibiae und Mm. tibiales anteriores der linke M. soleus entnommen und in 4 %-iger Formalin-Lösung für 3 Tage fixiert. Zur Erstellung von Gewebeschnitten wurden die Proben eingebettet und aus den Gewebestücken Serien von Dünnschnitten erstellt. Diese wurden mit einem Anti-Cleaved Caspase 3 Antikörper (1:400, Nr. 9661, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) angefärbt. Als Chromogen wurde 3,30-Diaminobenzidin verwendet.

Im Auflichtmikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) wurden bei 400facher



Vergrößerung (40er Objektiv, Achroplan, Zeiss) die Cleaved Caspase 3-positiven apoptotischen Muskelzellen in 25 Gesichtsfeldern (High power field, HPF) analog der Methode von Stratos et al. (2012) ausgezählt (Abbildung 16). Dabei wurden nur Zellkerne, die innerhalb der Muskelzelle liegen (Myozyten), gezählt. Cleaved Caspase 3-positive Zellen im Interstitium wurden nicht gewertet, da es sich hierbei nicht um Zellkerne des Muskels, sondern um Endothel- oder Blutzellen handelte. Die Auswertung erfolgte verblindet.

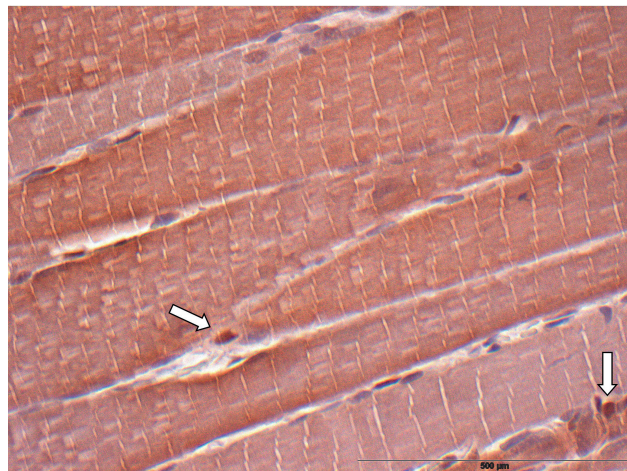


Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahme der durch Cleaved Caspase 3 angefärbten Muskelzellen im Dünnschnittpräparat. Pfeil links: Cleaved Caspase 3 positiver Myozyt, Pfeil rechts: Cleaved Caspase 3 positive Zelle im Interstitium

### 3.9 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) angegeben. Nachdem die Normalverteilung der Resultate bestätigt wurde, erfolgte ein Vergleich der Werte mittels Two Way ANOVA. Lag keine Normalverteilung vor, wurden die Daten mittels Holm-Sidak-Test verglichen. Sämtliche Unterschiede wurden bei  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

Alle statistischen Tests wurden mit dem Softwarepaket SigmaStat, die Erstellung der Graphen mit SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt.

---

## 4 Ergebnisse

Sowohl bei der Kombination aus geschlossenem Weichteiltrauma und chronischer Nervenligatur wie auch bei der Kombination aus Weichteiltrauma und INI-Modell war ein CRPS-ähnliches Schmerzsyndrom mit Spontanschmerz, Wärme- und Kälteallodynie, mechanischer Hyperalgesie, lokaler Entzündungsreaktion, Pfotenödem und Temperaturunterschieden zu sehen.

### 4.1 Ergebnisse der Verhaltenstests

Die nachfolgenden Ergebnisse in diesem Abschnitt beziehen sich aufgrund der besseren Übersichtlichkeit und höheren Aussagekraft ausschließlich auf die Gruppen 3 bzw. 8 und 5 bzw. 10 (INI und CCI 28 Tage). Die Diagramme der anderen Gruppen (INI und CCI 2 und 7 Tage) befinden sich im Anhang.

#### 4.1.1 Spontanschmerzverhalten und Wärme-/Kälteallodynie

##### **Chronic Constriction Injury**

In der Verum-Gruppe der Chronic Constriction Injury fand sich ab dem 2. postoperativen Tag ein Schmerzverhalten in allen untersuchten Qualitäten, wobei das Maximum zwischen Tag 7 und 14 zu liegen schien. In der Kontrollgruppe des CCI-Modells zeigten die Tiere am 2. postoperativen Tag ebenfalls ein signifikantes Spontanschmerzverhalten, welches sich bereits am 4. postoperativen Tag vollständig auf Ausgangsniveau zurückgebildet hatte und im Beobachtungszeitraum nicht wieder auftrat. Bei der Beurteilung der Wärmeallodynie war Ähnliches zu sehen. Hier hielt das Schmerzverhalten bis zum 4. Tag an und bildete sich in der Folge wieder zurück. Bei der Kälteallodynie war im gesamten Beobachtungszeitraum nur ein geringes Schmerzverhalten zu sehen (Abbildung 17).

##### **Intermediate Nerve Injury**

In der Gruppe mit Nervenligaturanlage und Entfernung am 4. postoperativen Tag fanden sich initial ähnlich hohe Indizes wie bei der Chronic Constriction Injury. In allen 3 Qualitäten bildete

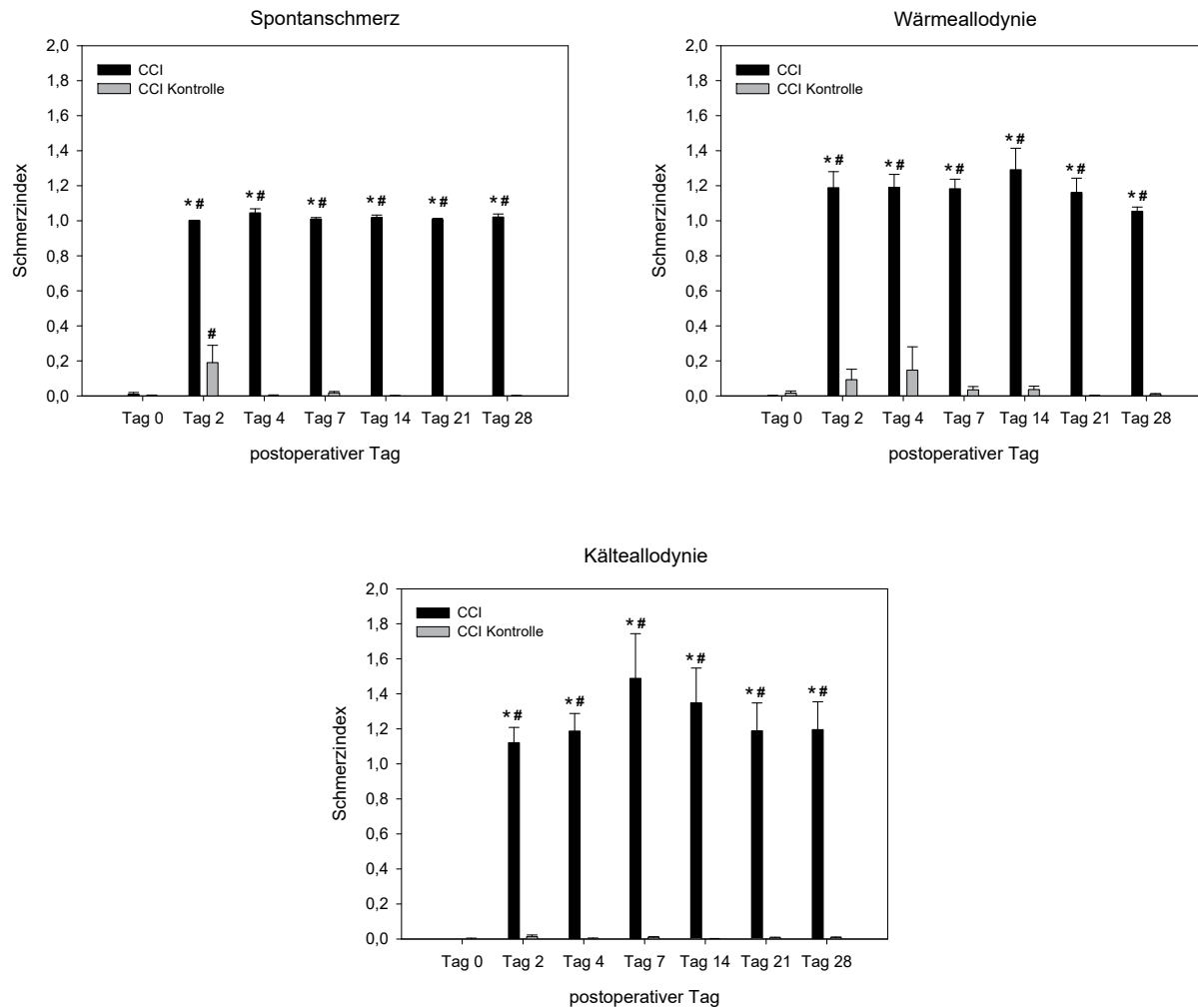


Abbildung 17: Spontanschmerzverhalten und Wärme- bzw. Kälteallodynie bei Chronic Constriction Injury mit Weichteilschaden. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

sich das Schmerzverhalten aber am 21. Tag nach Anlage der Ligaturen zurück und erreichte an Tag 28 der Untersuchungen nahezu Ausgangsniveau. Vier Wochen nach Anlage (entspricht 24 Tage nach Entfernung) der Ligaturen war kein Unterschied, bezogen auf den Ausgangswert vor allen Interventionen, im Schmerzindex aller 3 untersuchten Qualitäten erkennbar.

In der Kontrollgruppe der Intermediate Nerve Injury war im Spontanschmerzverhalten und in der Untersuchung der Wärmeallodynie jeweils am zweiten postoperativen Tag der größte Schmerzindex zu sehen, bildete sich an den folgenden Untersuchungstagen aber wieder vollständig zurück. Bei der Kälteallodynie war kein Ausschlag des Indexes zu beobachten (Abbildung 18).

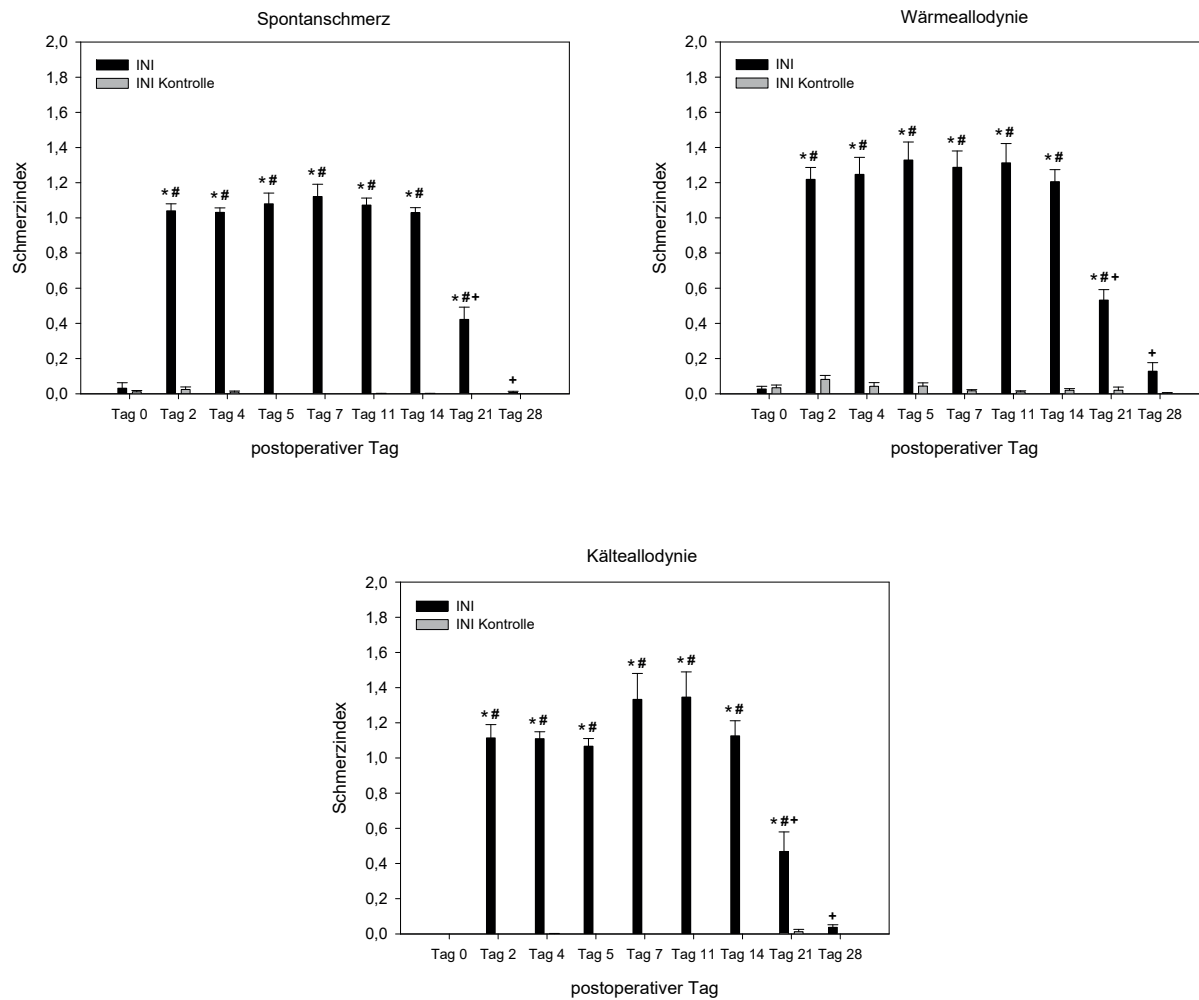


Abbildung 18: Spontanschmerzverhalten und Wärme- bzw. Kälteallodynie bei Intermediate Nerve Injury mit Weichteilschaden. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, + vs. vorherigen Untersuchungstag (Tag 14 bzw. 21), MW  $\pm$  SEM, n=7.

#### 4.1.2 Mechanische Hyperalgesie

##### Chronic Constriction Injury

Die positiven Reaktionen auf die Testung mit den Semmes-Weinstein-Filamenten lagen vor dem Setzen des Weichteiltraumas und Anlegen der losen Nervenligaturen in beiden Gruppen auf einem ähnlich niedrigen Niveau (Abbildung 19). Am 2. postoperativen Tag nahm der Schmerzindex in den Filamentstärken 2 g, 6 g und 15 g zu und erreichte 4 Wochen nach Ligaturanlage ein Maximum. In der Kontrollgruppe hingegen blieben die Werte über den gesamten Beobachtungszeitraum auf einem gleichbleibenden Niveau.

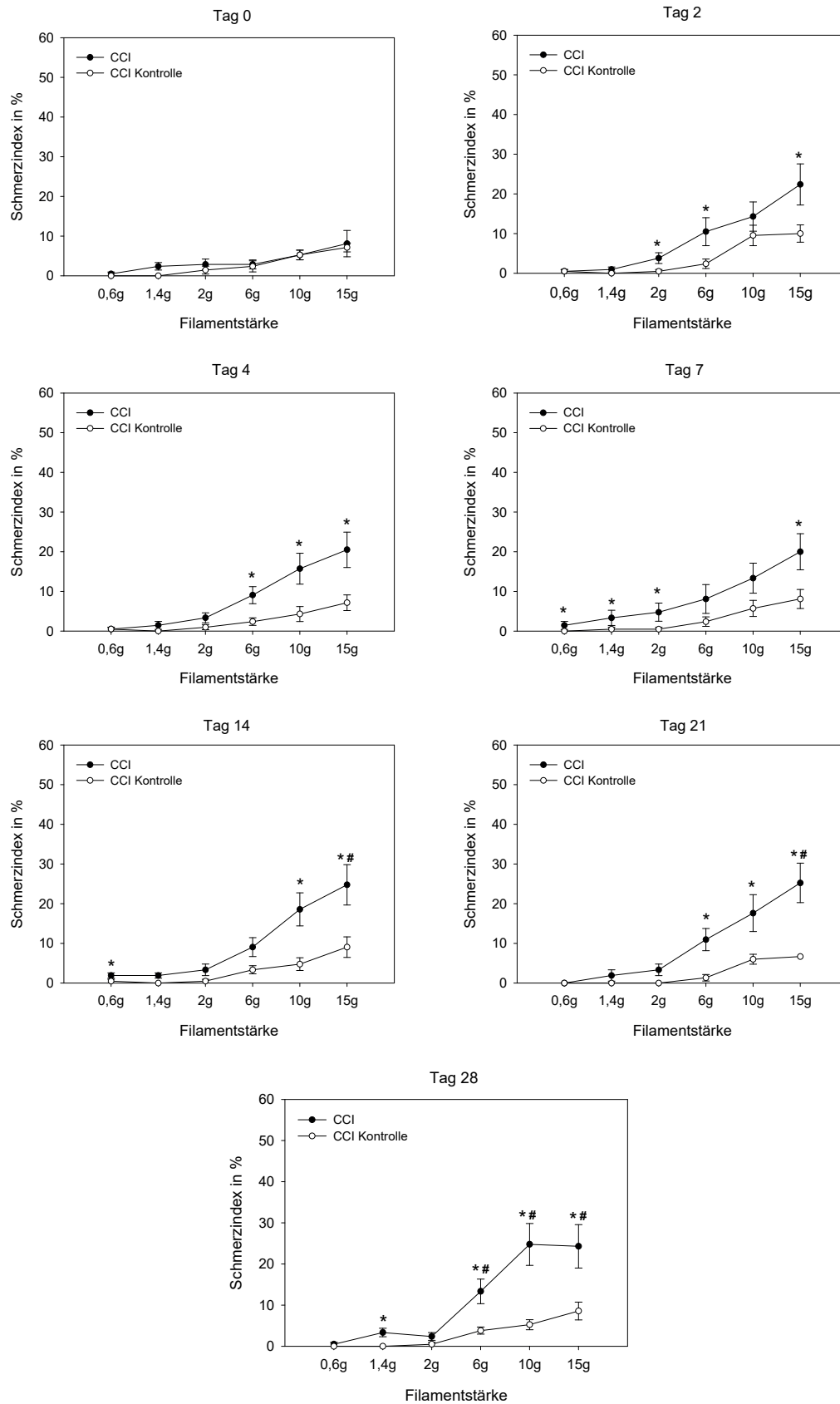


Abbildung 19: Mechanische Hyperalgesietestung bei Chronic Constriction Injury mit Weichteilschaden. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

### Intermediate Nerve Injury

Auch in der INI-Gruppe lagen die positiven Reaktionen auf mechanische Reize an Tag 0 auf einem ähnlich niedrigen Niveau (Abbildung 20). In der Kontrollgruppe blieb der Schmerzindex über den gesamten Beobachtungszeitraum auf diesem niedrigen Niveau, wohingegen dieser in der Verum-Gruppe bis zum 7. postoperativen Tag anstieg und sich in der Folge wieder zurückbildete, sodass am 28. postoperativen Tag kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mehr vorlag.

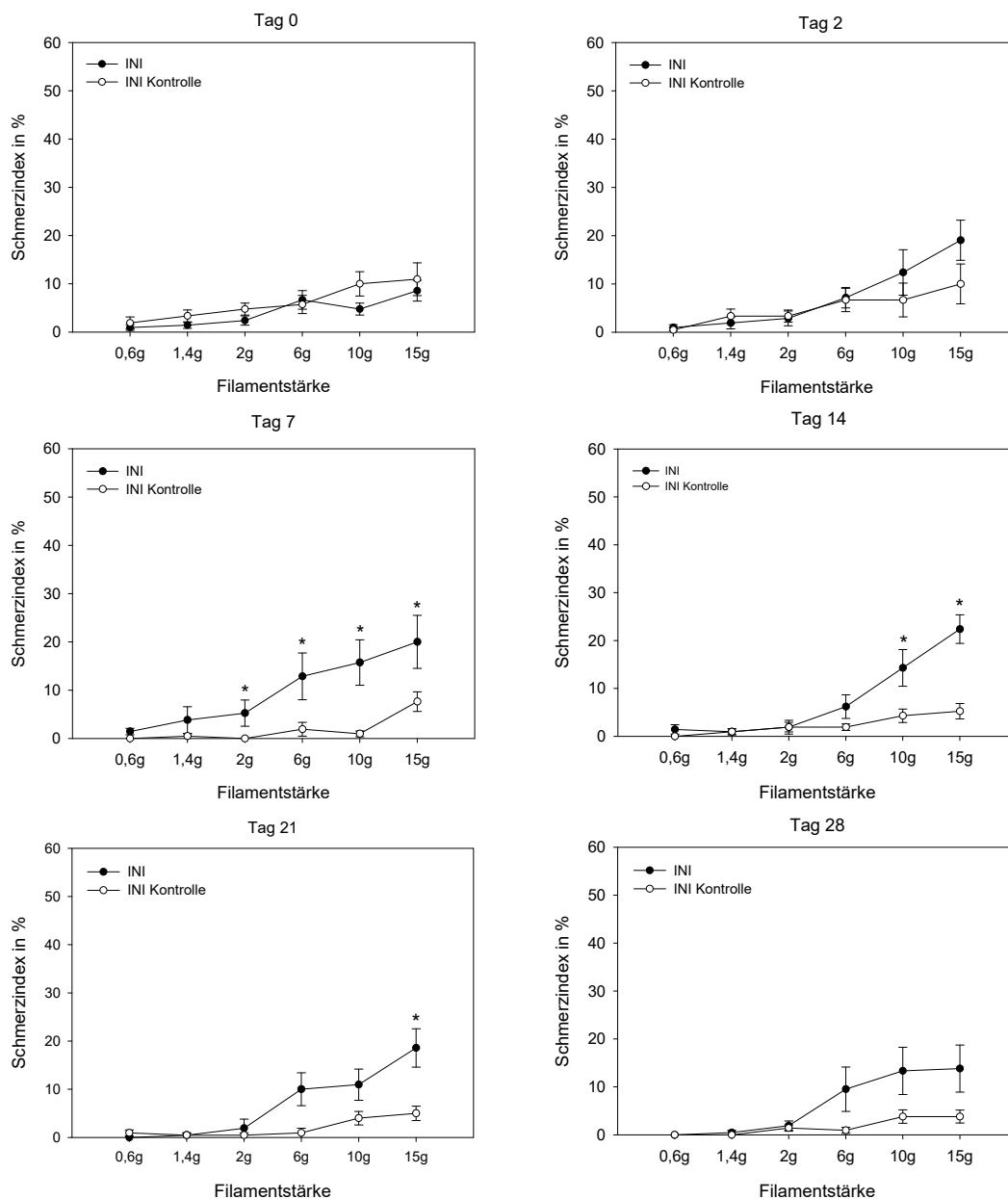


Abbildung 20: Mechanische Hyperalgesietestung bei Intermediate Nerve Injury mit Weichteilschaden. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

### Vergleich zwischen INI und CCI

Auch der Vergleich der mechanischen Hyperalgesie zwischen Chronic Constriction und Intermediate Nerve Injury machte deutlich, dass sich in der Gruppe mit intermediärer Nervenligatur der Schmerzindex 4 Wochen postoperativ dem Ausgangsniveau anzunähern schien und eine signifikante Verringerung im 10 g-Wert zeigte (Abbildung 21).

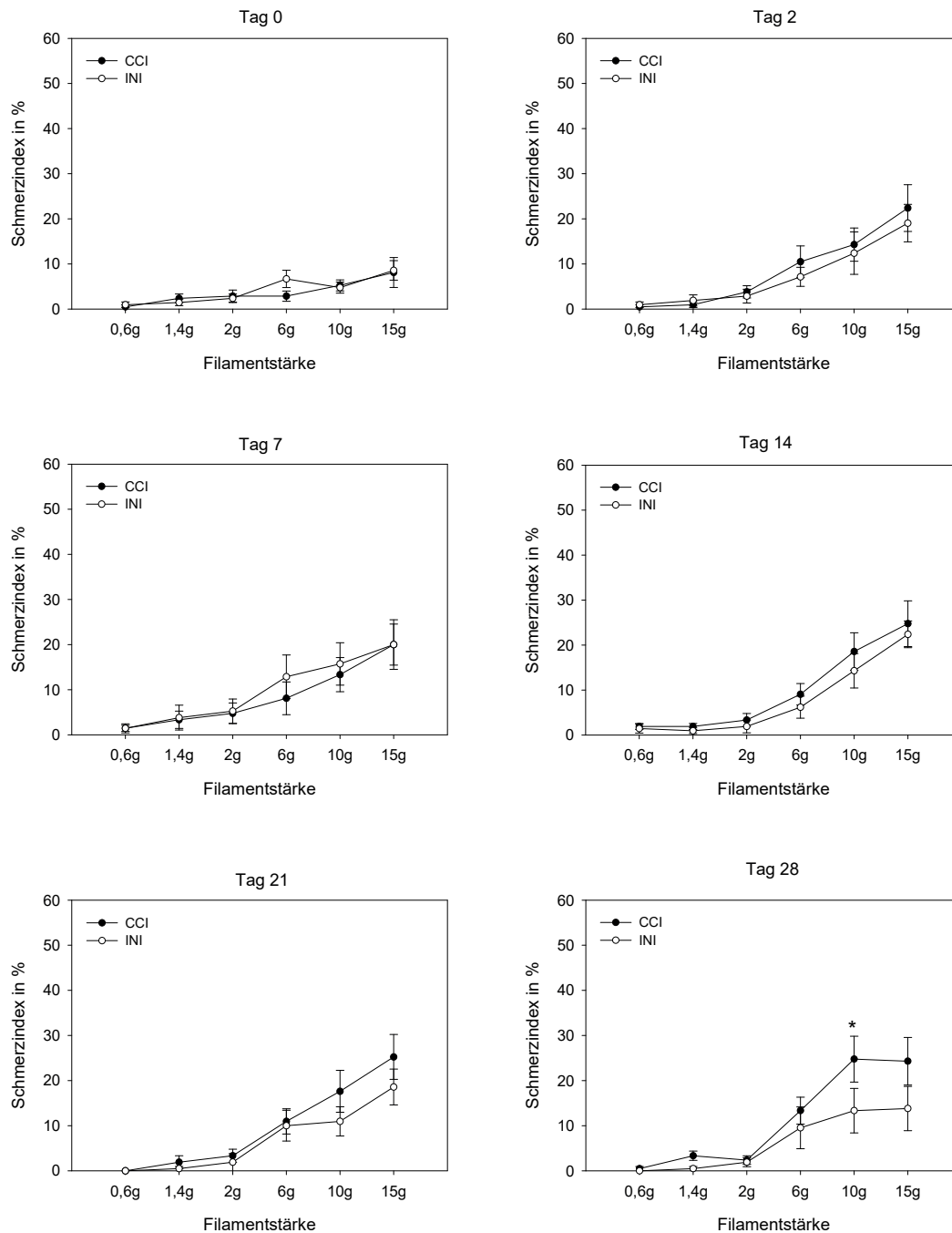


Abbildung 21: Vergleich der mechanischen Hyperalgesietestung (CCI vs. INI). \* vs. INI, MW  $\pm$  SEM, n=7.

### 4.1.3 Messung des Pfotenvolumens und der -temperatur

Auch bei den Messungen des Pfotenvolumens und der -temperatur fanden sich in beiden Tiermodellen CRPS-ähnliche Symptome.

#### Pfotenvolumen

Sowohl in der CCI- wie auch in der INI-Gruppe war an Tag 2 nach Weichteiltrauma und Anlage der Ligaturen ein erhöhtes Volumen der linken Hinterpfote im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe und zum präoperativen Zustand zu sehen (Abbildung 22). Diese Schwellung des Hinterlaufes bildete sich rasch zurück und ging in eine negative Volumendifferenz über. In der Gruppe der Chronic Constriction Injury nahm die Volumendifferenz zwischen beiden Pfoten immer weiter ab, sodass am letzten Beobachtungstag die größte Differenz zu sehen war. Hingegen erreichte der Unterschied in den Pfotenvolumina in der Gruppe der Intermediate Nerve Injury am 14. und 21. postoperativen Tag die größte Ausprägung und begann sich anschließend wieder dem Ausgangswert anzunähern.

In den Kontrollgruppen nahm das Volumen der betroffenen linken Hinterpfote ab dem 2. postoperativen Tag zu und bildete sich anschließend auf Ausgangsniveau zurück. Hierbei waren aber keine signifikanten Unterschiede zu sehen.

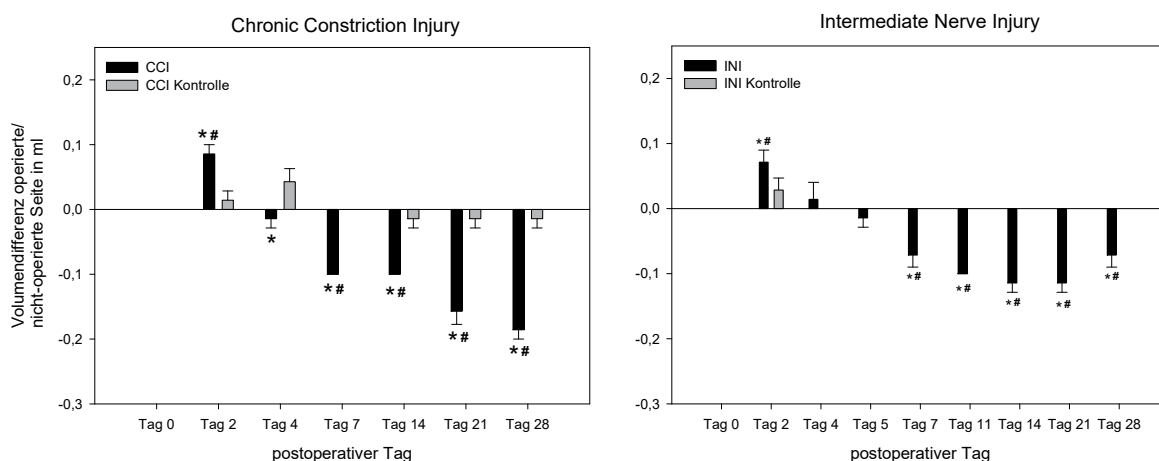


Abbildung 22: Ergebnisse der Messung des Pfotenvolumens. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

#### Pfotentemperatur

In der Gruppe mit chronischer Nervenligatur war bis zum 7. postoperativen Tag ein Anstieg der



Temperaturdifferenz zu beobachten (Abbildung 23). Diese Differenz reduzierte sich in der Folge, sodass kein Unterschied, weder zum präoperativen Zustand noch zur Kontrollgruppe, mehr vorhanden war.

In der Gruppe der Intermediate Nerve Injury war initial ein ähnlicher Anstieg der Pfotemperaturdifferenz mit der höchsten Ausprägung am 7. Tag nach Weichteil- und Nerventrauma zu beobachten. An Tag 11 reduzierte sich die Temperaturdifferenz wieder und war nicht mehr signifikant erhöht. An den darauffolgenden Messtagen stieg die Differenz im Vergleich zur Kontrollgruppe aber wieder an und erreichte 4 Wochen nach Operation ein zweites Maximum. In beiden Kontrollgruppen ließ sich dagegen im gesamten Beobachtungszeitraum kein signifikanter Anstieg oder Abfall der Pfotemperatur feststellen.

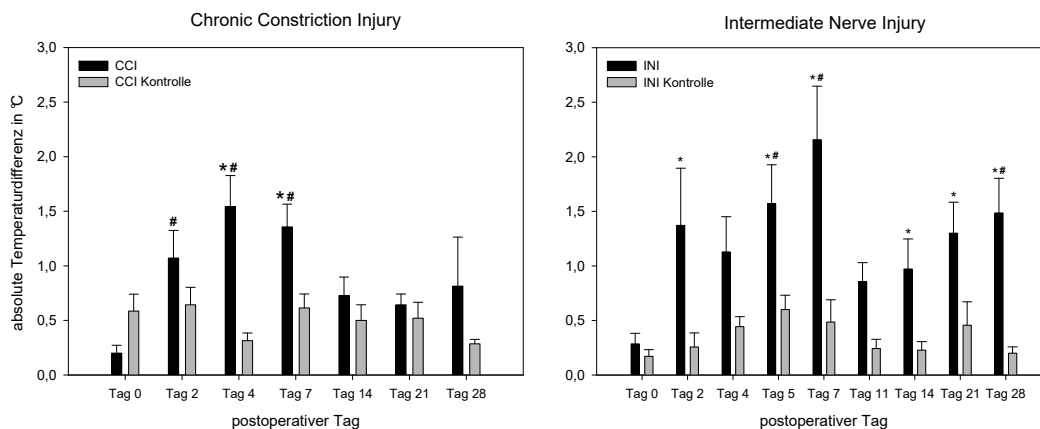


Abbildung 23: Ergebnisse der Messung der Pfotemperatur. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

## 4.2 Ergebnisse der Latenz in der nervalen Erregungsleitung

Am 2. Tag nach Weichteil- und Nerventrauma war die Erregungsleitungslatenz des N. ischiadicus in beiden Modellen gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe deutlich verlängert (Abbildung 24) und nahm am 7. postoperativen Tag signifikant ab. Auch 4 Wochen postoperativ war die Latenz in beiden Gruppen länger als die der Kontrollgruppen, fiel aber im Vergleich zu Tag 7 nicht weiter ab.

Zwischen der Chronic Constriction und der Intermediate Nerve Injury waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen. Tendenziell (Abbildung 24, CCI vs. INI) schien aber die Latenz der Chronic Constriction Injury am 28. Tag unverändert zu bleiben, wohingegen sich die Latenz im Intermediate Nerve Injury-Modell weiter verringerte und sich dem Ausgangsniveau annäherte, ohne dass die Werte signifikant unterschiedlich waren.

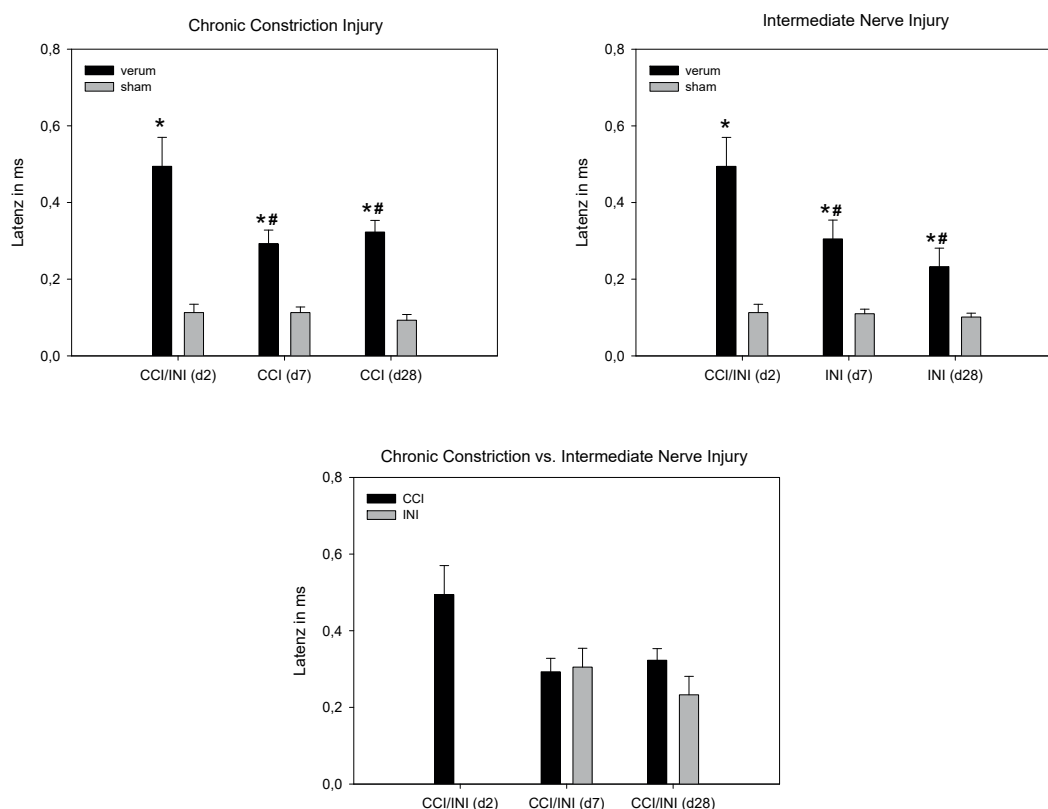


Abbildung 24: Latenz der Erregungsleitung des N. ischiadicus. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 2, MW  $\pm$  SEM, n=7.

### 4.3 Ergebnisse der postmortalen Bestimmung des Muskelödems

#### Chronic Constriction Injury

Im Modell der Chronic Constriction Injury war an allen Untersuchungstagen ein signifikantes Ödem des M. tibialis anterior im Vergleich zur Gegenseite zu sehen (Abbildung 25). An Tag 7 und 28 war das Ödem der linken Seite außerdem signifikant höher gegenüber der Kontrollgruppe und nahm mit zunehmender Versuchsdauer ebenfalls zu. In den Kontrollgruppen lag nur an Tag 2 ein Unterschied zur Gegenseite vor. Am 7. und 28. postoperativen Tag war der Wassergehalt des linken Muskels sogar geringer als der der rechten Seite.

#### Intermediate Nerve Injury

Auch im Tiermodell der Intermediate Nerve Injury lag ein signifikantes Ödem des untersuchten Muskels an allen 3 Untersuchungstagen vor, auch hier stieg der Wassergehalt mit Dauer der Versuchsreihe an. In den Kontrollgruppen lag ebenfalls am 2. postoperativen Tag ein signifikantes

Ödem vor, welches im weiteren Beobachtungsverlauf wieder verschwand.

Im direkten Vergleich zwischen beiden Modellen lagen die Muskelwassergehalte der Intermediate Nerve Injury eine Woche und vier Wochen nach den Interventionen unter denen der Chronic Constriction Injury. Am letzten Untersuchungstag waren diese signifikant verschieden.

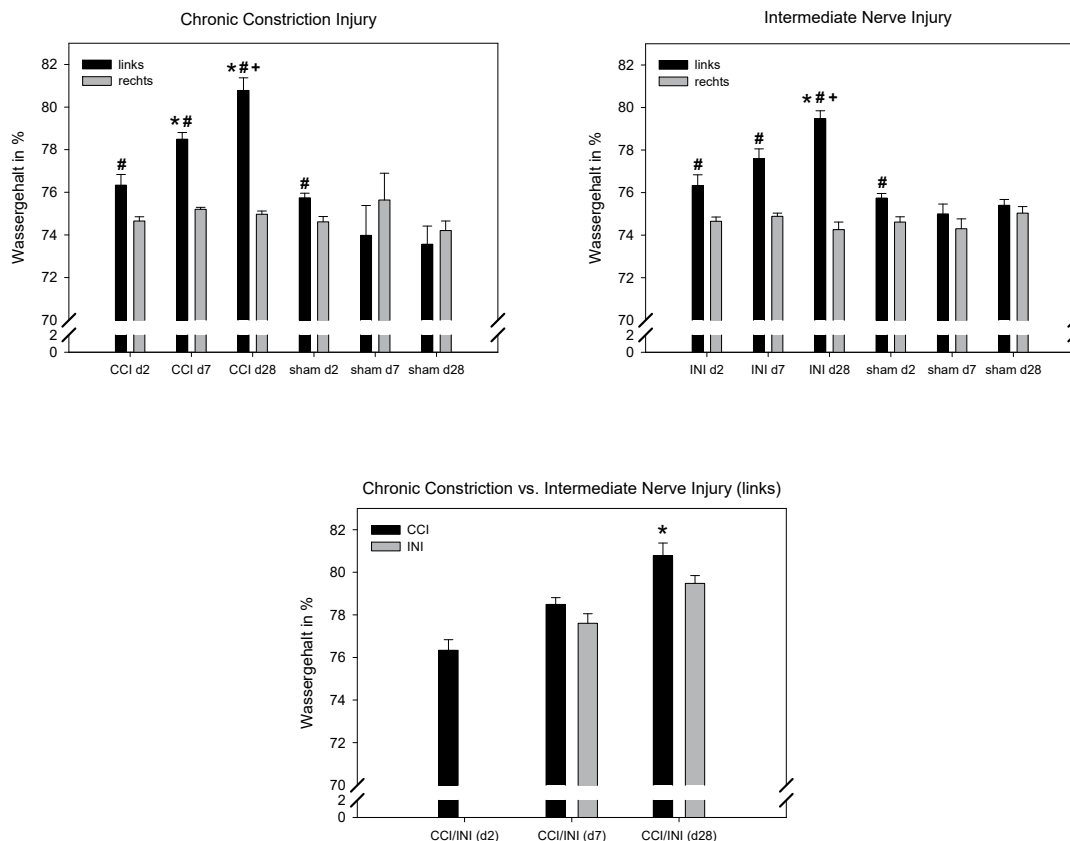


Abbildung 25: Ödem des M. tibialis anterior. \* vs. Kontrollgruppe (sham oder INI), # vs. rechts, + vs. Tag 7, MW  $\pm$  SEM, n=7.

#### 4.4 Ergebnisse der mikroskopischen Messungen

Um eine Standardisierung der Messungen zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass die Tiere zu Beginn der Versuchsreihe gleich alt und gleich schwer waren. Außerdem wurde vor Beginn der mikroskopischen Analyse der mittlere arterielle Druck (MAD) und der Puls bestimmt. Eine Blutgasanalyse gewährleistete die Sicherstellung der suffizienten maschinellen Beatmung. Tabelle 4 zeigt diese Werte für alle Tiergruppen. Dabei war bei keinem der gemessenen Parameter ein signifikanter Unterschied zu finden.

Gruppe	Modell	Gewicht an d0 (Gramm)	MAD (mmHg)	Puls (x/Minute)	pCO2 (mmHg)	pO2 (mmHg)	pH
0	unbehandelt	281,2±11,2	113,1±3,0	306,1±40,2	41,8±1,4	86,1±2,9	7,45±0,01
1	CCI/INI d2	299,7±9,1	112,4±2,9	304,7±47,0	44,4±1,3	83,3±3,0	7,47±0,01
2	INI d7	292,7±9,8	113,2±2,5	305,4±54,2	40,3±0,3	86,0±2,3	7,46±0,01
3	INI d28	295,3±10,5	115,7±3,0	285,1±41,1	40,3±1,7	84,3±2,1	7,48±0,01
4	CCI d7	284,3±9,0	111,7±3,1	288,2±43,2	40,3±1,5	87,0±4,8	7,48±0,01
5	CCI d28	273,3±15,5	112,1±2,7	313,7±47,6	39,4±0,4	81,0±1,5	7,47±0,01
6	CCI/INI d2	291,0±17,1	113,9±3,1	294,2±44,0	42,3±0,9	84,6±2,2	7,44±0,01
7	INI d7	303,0±12,0	114,6±3,4	310,6±45,3	40,7±1,1	79,5±2,3	7,46±0,01
8	INI d28	269,6±8,6	118,7±2,0	312,2±53,7	39,7±1,2	79,5±1,3	7,47±0,01
9	CCI d7	305,6±13,6	116,7±4,6	324,3±51,7	39,5±2,2	86,1±5,1	7,46±0,02
10	CCI d28	289,3±18,0	108,4±3,9	294,2±44,5	39,3±2,6	89,7±4,8	7,48±0,01

Tabelle 4: Basisvitaldaten der Versuchstiere zur IVFM, MW ± SEM, n=7.

#### 4.4.1 NADH-Autofluoreszenz

In der Verum- und Sham-Gruppe stieg am 2. postoperativen Tag die NADH-Autofluoreszenz signifikant an (Abbildung 26). Dieser Anstieg reduzierte sich in der Folge, stieg aber in der Gruppe mit echter Nervenligatur 4 Wochen nach den Traumata wieder an und war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. In der Gruppe der Intermediate Nerve Injury war keine signifikante Änderung der Autofluoreszenz zu sehen, auch wenn diese am 7. postoperativen Tag abfiel und sich an Tag 28 wieder auf das Niveau des zweiten Tages erhöhte.

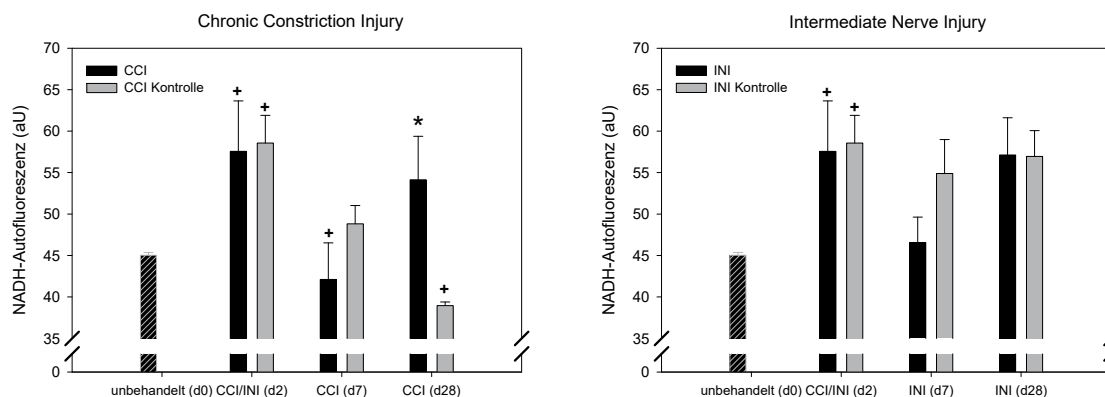


Abbildung 26: NADH-Autofluoreszenz; \* vs. Kontrollgruppe, + vs. vorherigen Tag (Tag 0, 2 oder 7), MW ± SEM, n=7.

#### 4.4.2 Funktionelle kapilläre Dichte

Die funktionelle kapilläre Dichte reduzierte sich in allen untersuchten Gruppen am 2. postoperativen Tag auf ungefähr 2/3 des Ausgangswertes (Abbildung 27). In der Gruppe der chronischen Nervenligatur nahm diese in der Folge nur langsam zu und war an Tag 7 und 28 signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Sham-Gruppe war bereits eine Woche nach den Interventionen kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Gruppe mehr zu sehen. Dies war in der Gruppe mit den echten Nervenligaturen erst 4 Wochen nach den Traumata erkennbar.

In der Gruppe der Intermediate Nerve Injury reduzierte sich die Dichte der perfundierten Kapillaren ebenfalls nach Weichteil- und Nerventrauma. Die Zunahme war in beiden Gruppen jedoch größer als die in der Gruppe der chronischen Nervenligatur, sodass bereits an Tag 7 kein signifikanter Unterschied zum Ausgangsniveau und zur Vergleichsgruppe mehr zu sehen war.

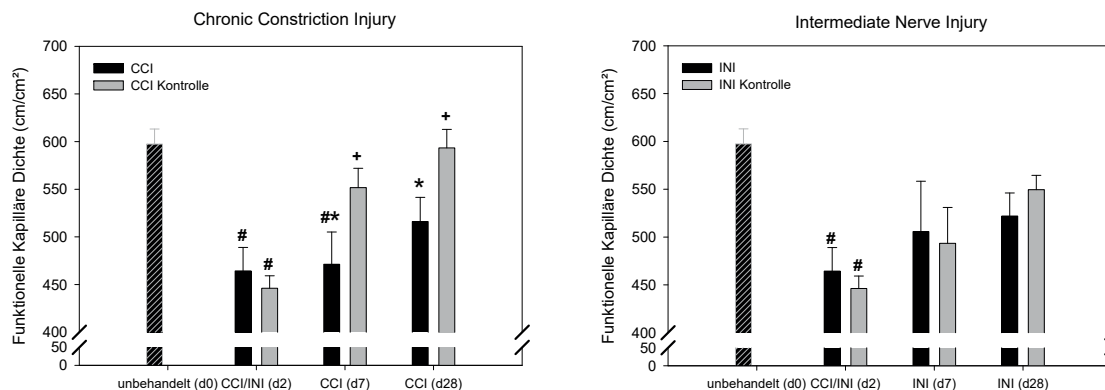


Abbildung 27: Funktionelle kapilläre Dichte; \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, + vs. vorherigen Tag (Tag 2 oder 7), MW  $\pm$  SEM, n=7.

#### 4.4.3 Prozentualer Anteil sich langsam bewegender Leukozyten

In der Verum-Gruppe nahm der prozentuale Anteil sich langsam am Endothel entlang gleitender Leukozyten am 2. postoperativen Tag signifikant gegenüber den unbehandelten Tieren zu (Abbildung 28). Gleiches galt auch für die sham-operierten Tiere. Sowohl in der Gruppe der Chronic Constriction Injury als auch im INI-Modell näherten sich die Werte nach initialem Anstieg wieder dem Ausgangswert an. Es war weder ein Unterschied zur Kontrollgruppe noch zwischen CCI- und INI-Modell feststellbar.

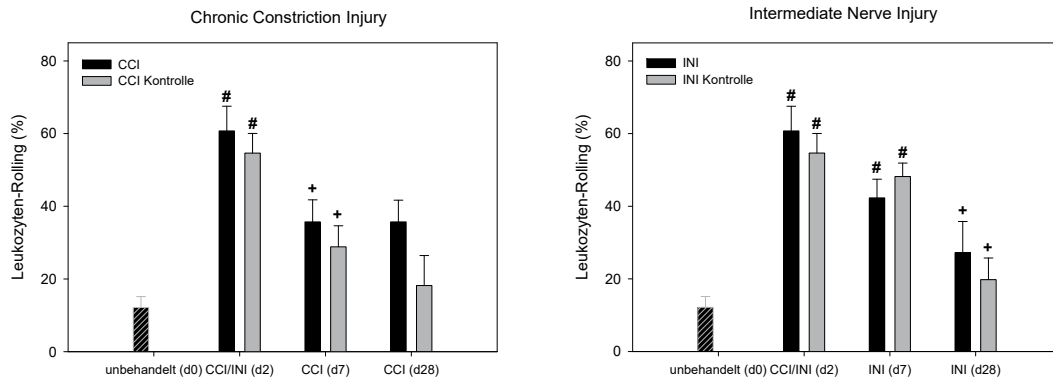


Abbildung 28: Prozentualer Anteil langsam am Endothel entlang rollender Leukozyten; \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, + vs. vorherigen Tag (Tag 2 oder 7), MW  $\pm$  SEM, n=7.

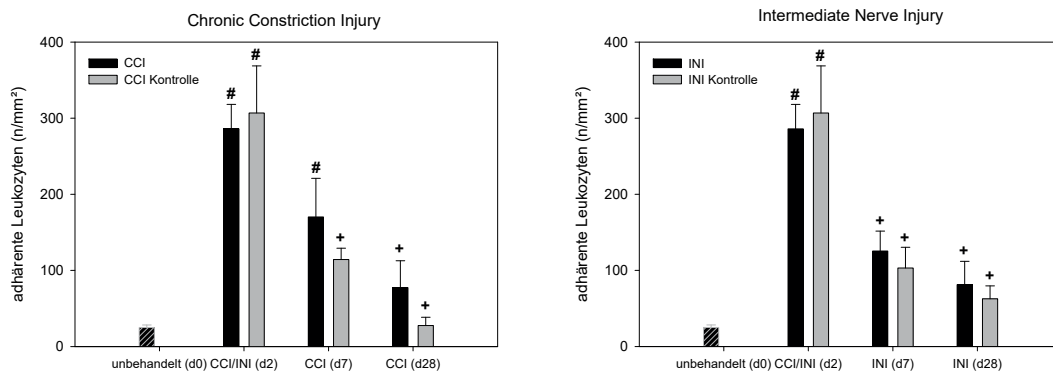


Abbildung 29: Anzahl am Endothel fest adhärenter Leukozyten; # vs. Tag 0, + vs. vorherigen Tag (Tag 2 oder 7), MW  $\pm$  SEM, n=7.

### 4.4.4 Anzahl am Endothel adhärenter Leukozyten

Ähnliches war auch bei der Auswertung der Anzahl fest am Endothel adhärenter Leukozyten zu sehen (Abbildung 29). Eine signifikante Erhöhung dieses Parameters fand sich in beiden Gruppen an Tag 2, sowohl in der Verum- als auch in der Sham-Gruppe. In der Folge nahm die Anzahl der adhärenter Leukozyten ab und näherte sich 4 Wochen nach den Traumata in beiden Gruppen dem Ausgangsniveau an. 4 Wochen postoperativ war in keinem Modell ein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert un behandelter Tiere mehr zu sehen.

### 4.4.5 Makromolekulare Plasmaextravasation

Bei der Auswertung der makromolekularen Plasmaextravasation war initial kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abbildung 30). Einzig an Tag 28 war in der Verum-Gruppe der Chronic

Constriction Injury ein Anstieg des Quotienten auf Werte >1 zu sehen. Dieser Anstieg war im Vergleich zur Gruppe der Intermediate Nerve Injury und zur Kontrollgruppe der Chronic Constriction Injury signifikant.

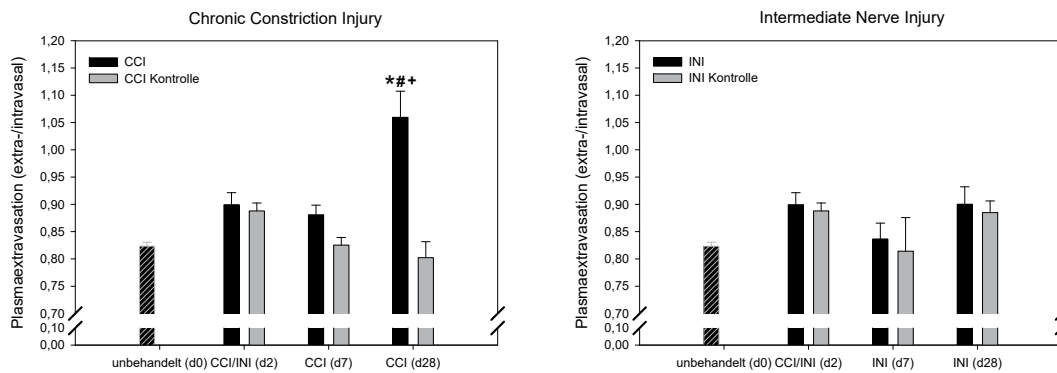


Abbildung 30: Makromolekulare Plasmaextravasation; \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, + vs. vorherigen Tag (Tag 7), MW  $\pm$  SEM, n=7.

#### 4.5 Ergebnisse der Knochendichtemessung und Analyse der Mikroarchitektur des Knochens

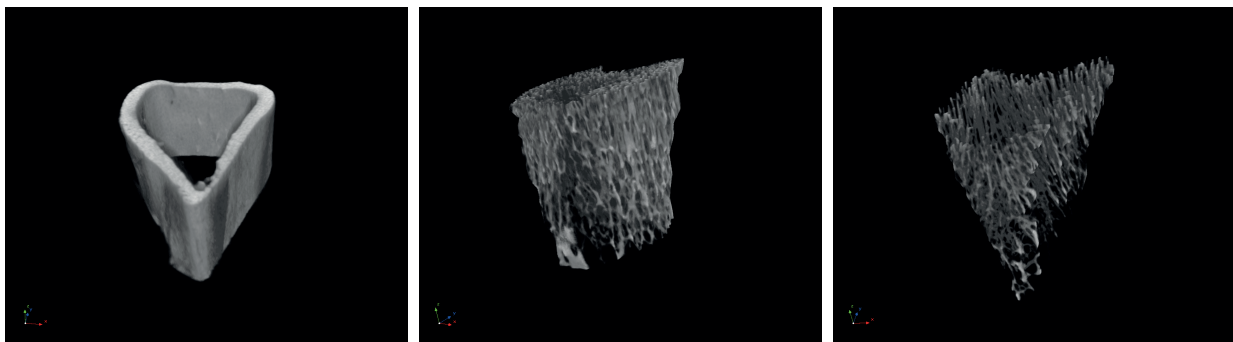


Abbildung 31: Dreidimensional rekonstruierte „Region of Interest“ des kortikalen (links: CCI verum 28 d) und trabekulären (Mitte: CCI sham 28 d und rechts: CCI verum 28 d) Knochens bei identischen Scan-, Rekonstruktions- und Darstellungsparametern.

##### 4.5.1 Ergebnisse der Knochendichtemessung

###### Trabekulärer Knochen

Bei der Analyse der Knochendichte des trabekulären Knochens lagen am 2. postoperativen Tag in der Verum- und Sham-Gruppe weder im Vergleich links/rechts noch im Bezug zur Kontrollgruppe signifikante Unterschiede vor (Abbildung 32). Sowohl in der Gruppe der Chronic Constriction

Injury als auch in der Gruppe mit entfernter Nervenligatur am 4. postoperativen Tag reduzierte sich die Knochendichte auf der behandelten Seite am 7. und 28. Tag gegenüber der unbehandelten Seite derselben Tiergruppe und gegenüber der behandelten Seite der Kontrollgruppe. Schon die dargestellte dreidimensionale Rekonstruktion des analysierten Areals (Abbildung 31) lässt dies rein makroskopisch erkennen.

In der Knochenanalyse der unbehandelten Seite blieben in beiden Verum-Tiermodellen die Werte der Knochendichte auf einem ähnlich hohen Niveau. Die Knochendichte der sham-operierten Tiere stieg aber im Verlauf etwas an, ohne jedoch signifikant zu sein. Es ließen sich darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede zwischen den trabekulären Dichtewerten der Chronic Constriction Injury und der Intermediate Nerve Injury feststellen.

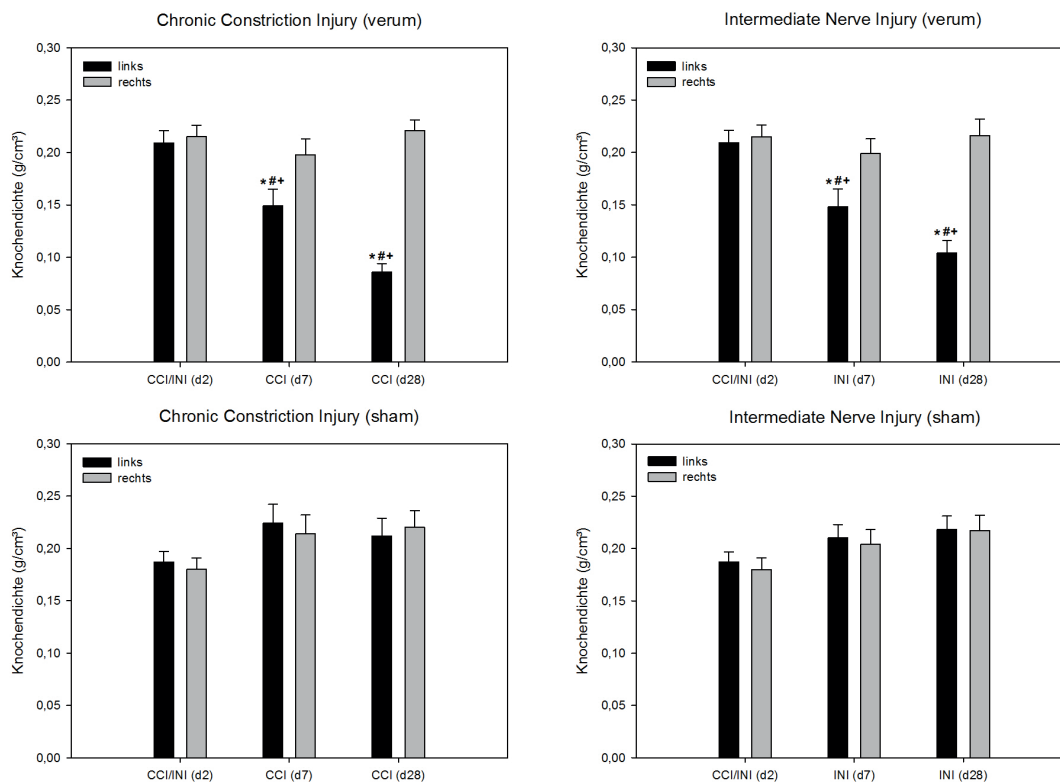


Abbildung 32: Knochendichte des trabekulären Knochens. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. vorherigen Tag (2 oder 7), + vs. rechts, MW  $\pm$  SEM, n=7.

### Kortikaler Knochen

Im Gegensatz zum trabekulären Knochen war in der Verum-Gruppe bei der Analyse des kortikalen Knochens am 2. postoperativen Tag ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zu sehen



(Abbildung 33). Die Knochendichtewerte blieben auf der behandelten und auch auf der unbehandelten Seite in den Verum-Gruppen beider Tiermodelle relativ konstant. In den Kontrollgruppen nahmen diese hingegen auf beiden Seiten nach 7 Tagen signifikant zu und erreichten nach 4 Wochen ungefähr die Werte der Verum-Gruppen. Auch bei der Analyse der Knochendichte des kortikalen Knochens waren zwischen chronischer Nervenligatur und Intermediate Nerve Injury keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

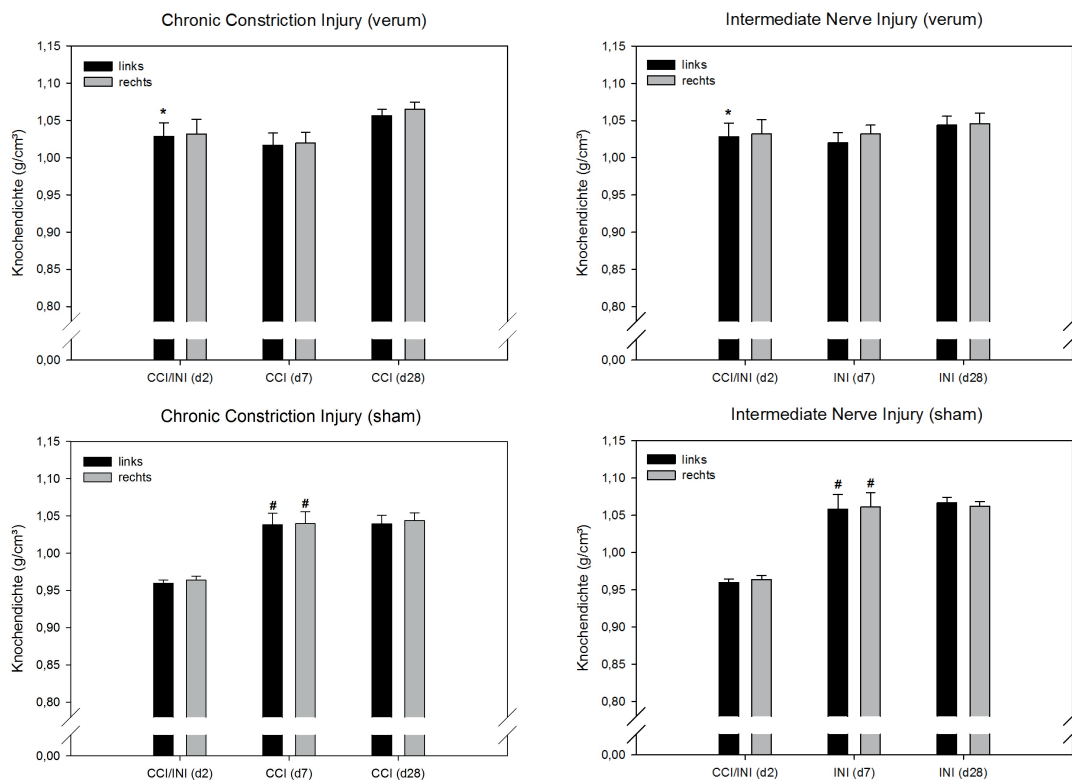


Abbildung 33: Knochendichte des kortikalen Knochens. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. vorherigen Tag (2 oder 7), + vs. rechts, MW  $\pm$  SEM, n=7.

#### 4.5.2 Ergebnisse der Analyse des trabekulären Knochens

**Anteil Knochen- am Gesamtvolumen** Der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen der „Region of Interest“ verringerte sich in der behandelten Extremität der Verum-Gruppe kontinuierlich mit Dauer der Versuchsreihe (Abbildung 34). Innerhalb der Kontrollgruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen. Hier blieb das Verhältnis Knochenvolumen/Gesamtvolumen konstant (siehe Anhang). Auch wenn der Anteil in der CCI-Gruppe 4 Wochen nach den Interventionen geringer als in der INI-Gruppe ausfiel, war dieser Unterschied nicht signifikant.

#### 4.5 Ergebnisse der Knochendichtemessung und Analyse der Mikroarchitektur des Knochens

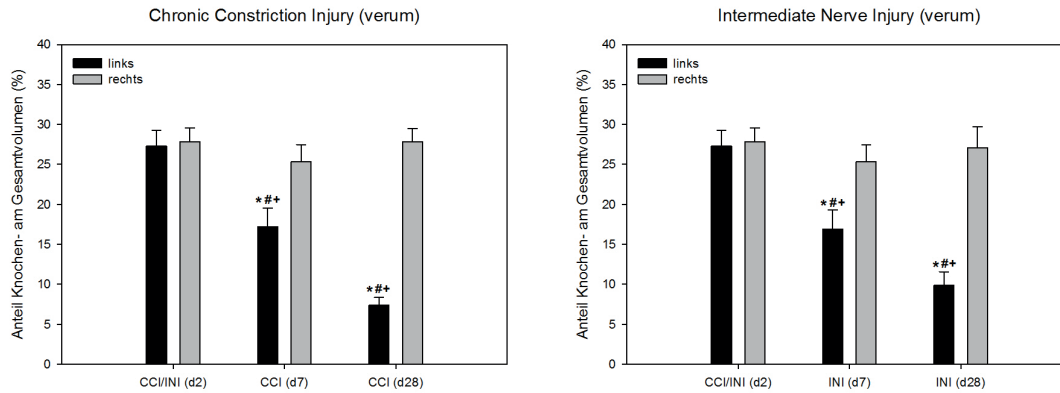


Abbildung 34: Anteil Knochen- am Gesamtvolumen. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. vorherigen Tag (2 oder 7), + vs. rechts, MW  $\pm$  SEM, n=7.

**Anzahl Knochentrabekel pro mm** Bei der Analyse der Knochentrabekelanzahl war Ähnliches zu sehen (Abbildung 35). Auch hier reduzierte sich die Zahl der Trabekel bei beiden Tiermodellen an Tag 7 und 28. An diesen beiden Tagen war eine Signifikanz im Vergleich zur rechten Seite, zur Kontrollgruppe und zum vorherigen Tag zu sehen. Zwischen der Chronic Constriction und der Intermediate Nerve Injury lag hingegen kein signifikanter Unterschied vor.

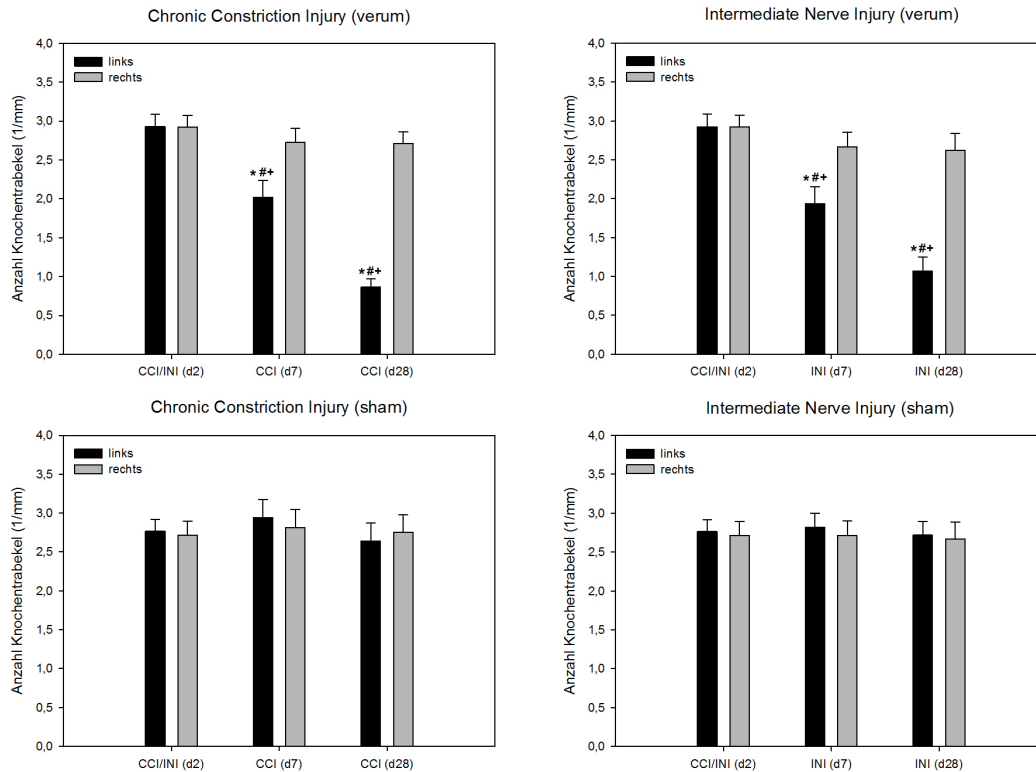


Abbildung 35: Anzahl der Knochentrabekel pro mm. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. vorherigen Tag (2 oder 7), + vs. rechts, MW  $\pm$  SEM, n=7.

**Trabekuläre Dicke** Die Dicke der Trabekel nahm an Tag 7 und 28 in den Kontrollgruppen bei beiden Tiermodellen sowohl auf der linken, behandelten als auch auf der rechten, unbehandelten Seite zu (Abbildung 36). In der Verum-Gruppe des CCI-Modells nahm die Breite der Knochenbälkchen über den gesamten Zeitraum ab, wohingegen dieser Wert im INI-Modell an Tag 28 bereits wieder gestiegen war. Vier Wochen nach den Traumata lag deshalb auch ein signifikanter Unterschied zwischen chronischer und intermediärer Nervenligatur vor.

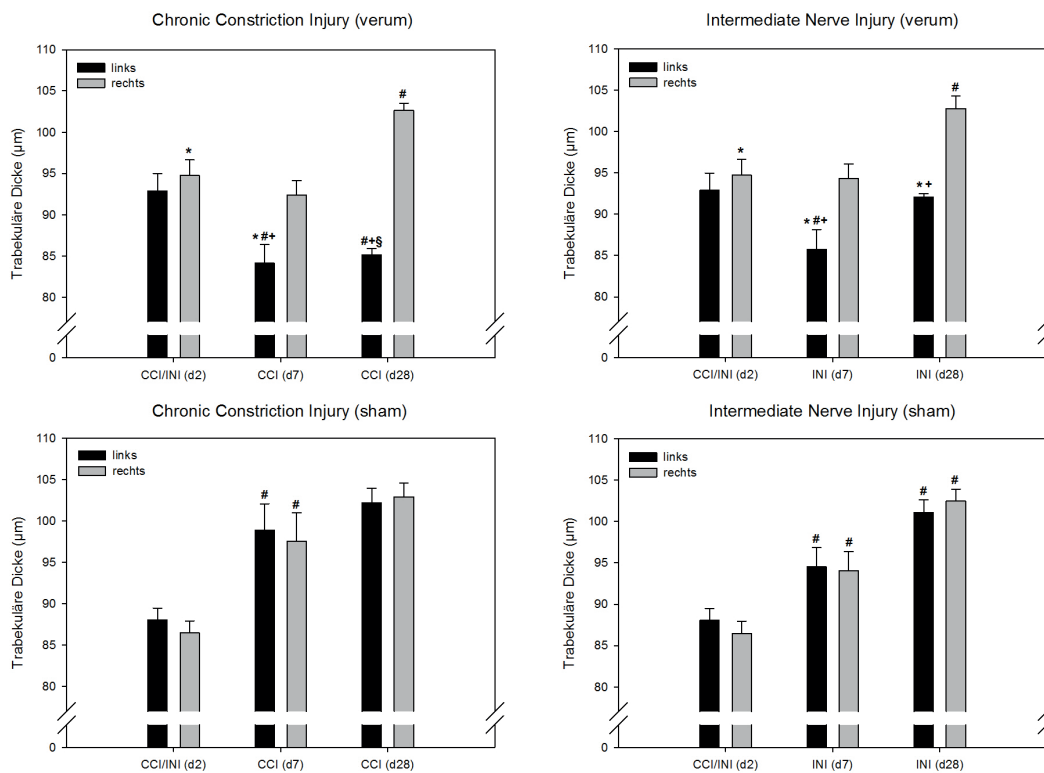


Abbildung 36: Trabekuläre Dicke. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. vorherigen Tag (2 oder 7), + vs. rechts, § vs. INI, MW  $\pm$  SEM, n=7.

**Separation der Trabekel** Die Separation der Knochen trabekel (entspricht dem Abstand zwischen den Knochenbälkchen) nahm in beiden Tiermodellen auf mehr als das Doppelte zu (verum, links). An Tag 28 waren diese Erhöhungen signifikant, ohne dass dabei aber ein Unterschied zwischen dem CCI und INI-Modell vorlag (Abbildung 37). In den Kontrollgruppen und auf der rechten Seite der Verum-Gruppen nahm die Separation nur geringfügig zu bzw. nahm sogar etwas ab, ohne dass ein signifikanter Unterschied feststellbar war.

## 4.5 Ergebnisse der Knochendichtemessung und Analyse der Mikroarchitektur des Knochens

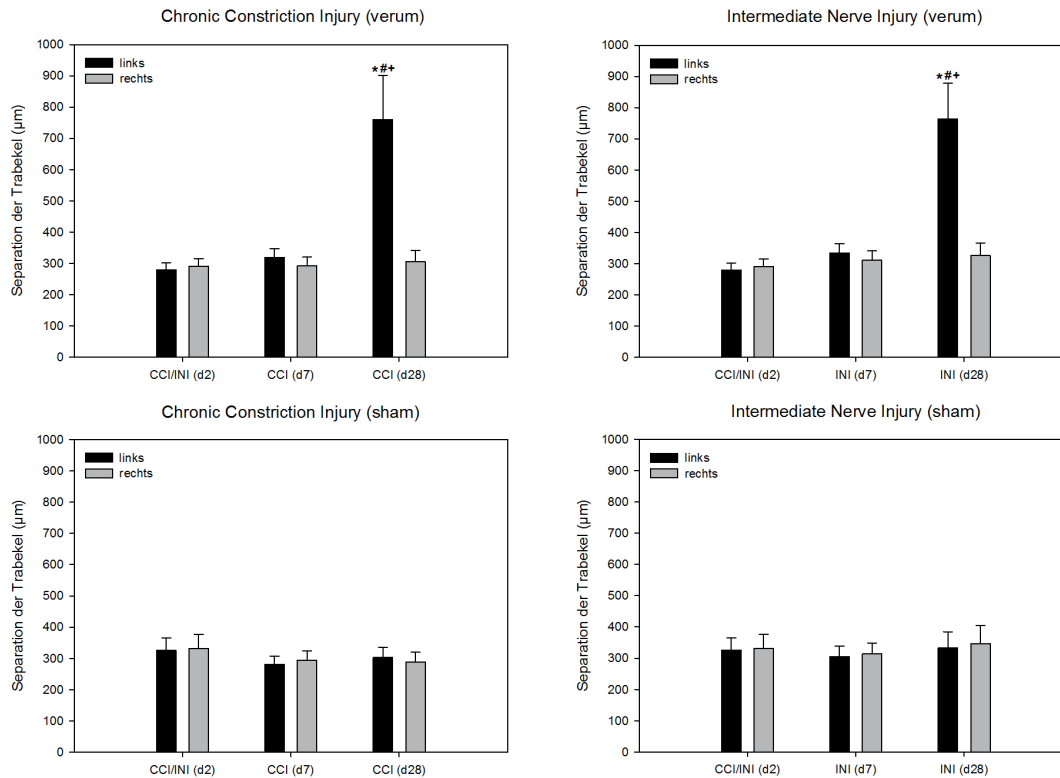


Abbildung 37: Separation der Knochentrabekel. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. vorherigen Tag (2 oder 7), + vs. rechts, MW  $\pm$  SEM, n=7.

### 4.5.3 Ergebnisse der Analyse des kortikalen Knochen

**Gesamte Querschnittsfläche** Die gesamte Querschnittsfläche war an Tag 2 beidseits signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 38). In der Sham-Gruppe nahm diese bei beiden Modellen bis zum Tag 28 weiter zu. In der Verum-Gruppe war dies im INI-Modell beidseits und im CCI-Modell rechts ebenfalls zu sehen. Auf der linken Seite blieb diese nahezu unverändert und war somit signifikant geringer im Vergleich zur rechten Seite, zur linken Seite der Sham-Gruppe und zur linken Seite des INI-Modells.

**Knochenoberfläche** Die Knochenoberfläche verringerte sich in der Verum-Gruppe im CCI-Modell der linken Extremität signifikant gegenüber der rechten Seite derselben Gruppe und der linken Seite der Sham-Gruppe (Abbildung 39). Im INI-Modell nahm diese ebenfalls ab, ohne signifikant zu sein. In beiden Kontrollgruppen blieb die Knochenoberfläche über die gesamte Versuchsdauer auf einem gleichbleibenden Niveau, ohne dass signifikante Unterschiede feststellbar waren.

## 4.5 Ergebnisse der Knochendichtemessung und Analyse der Mikroarchitektur des Knochens

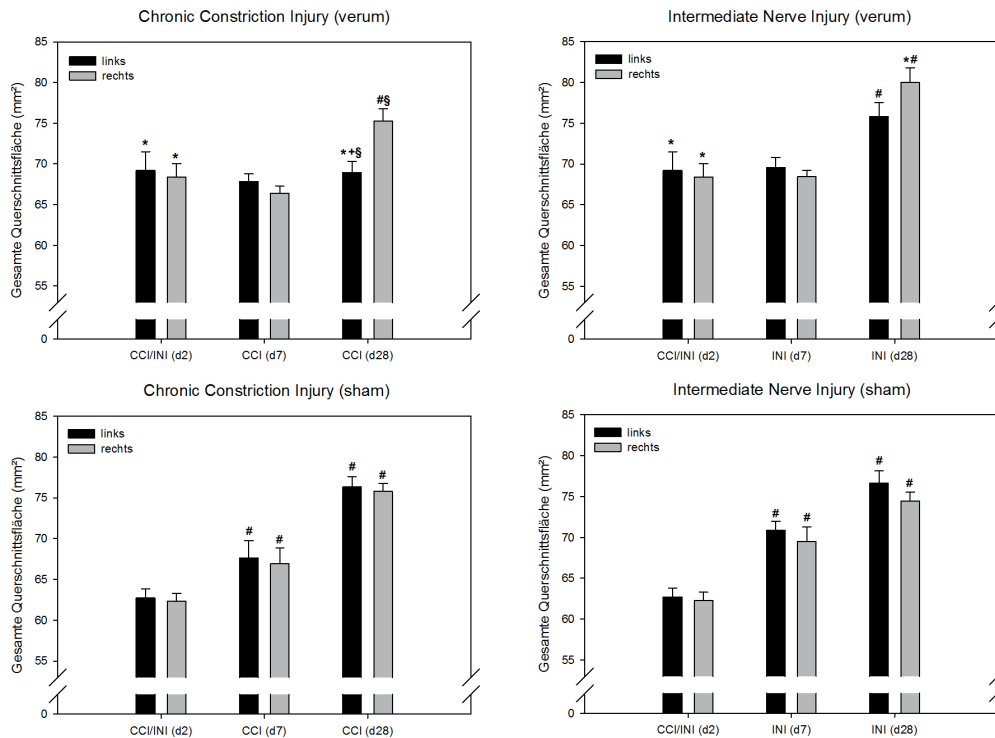


Abbildung 38: Gesamte Querschnittsfläche. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. vorherigen Tag (2 oder 7), + vs. rechts, § vs. INI, MW ± SEM, n=7.

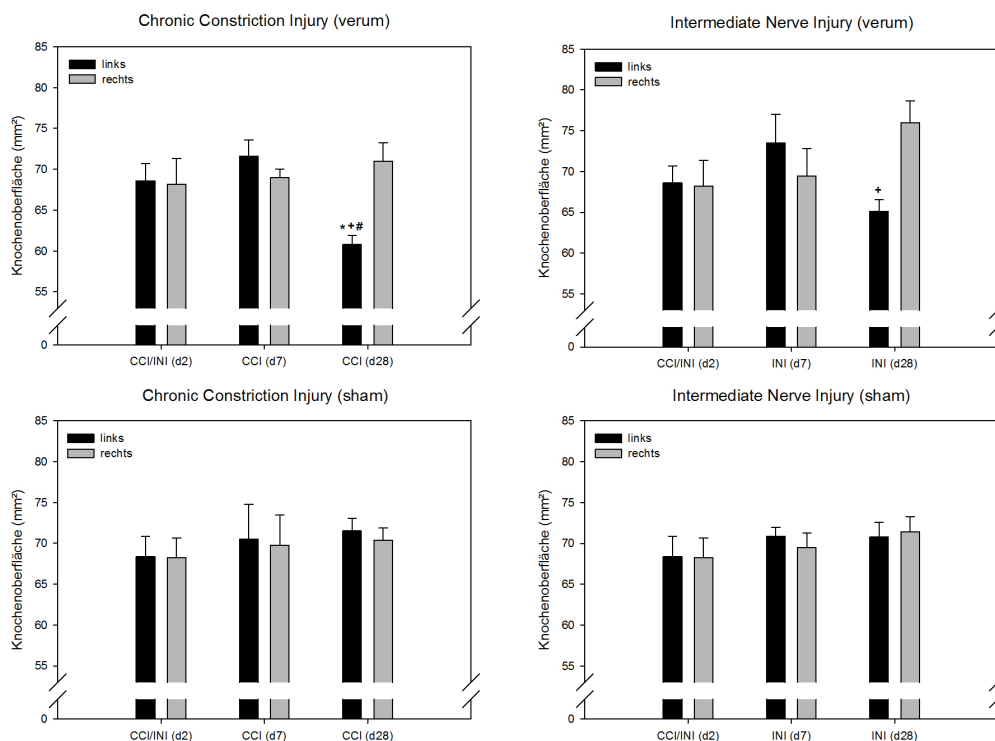


Abbildung 39: Knochenoberfläche. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. vorherigen Tag (2 oder 7), + vs. rechts, MW ± SEM, n=7.

**Kortikalisdicke** Die Dicke der Kortikalis des Knochens nahm in den Sham-Gruppen beider Modelle bereits nach 7 Tagen signifikant zu (Abbildung 40). Auf der rechten Seite der Verum-Gruppe blieb diese in beiden Modellen an Tag 7 im Vergleich zum Tag 2 nahezu unverändert und nahm erst bis zum Tag 28 zu. Links blieb diese im CCI-Modell im Verlauf ohne signifikante Änderung, im INI-Modell nahm die Dicke der Knochenkortikalis bis Tag 7 leicht ab und anschließend bis zum Tag 28 wieder zu, ohne die Werte der Sham-Gruppe zu erreichen.

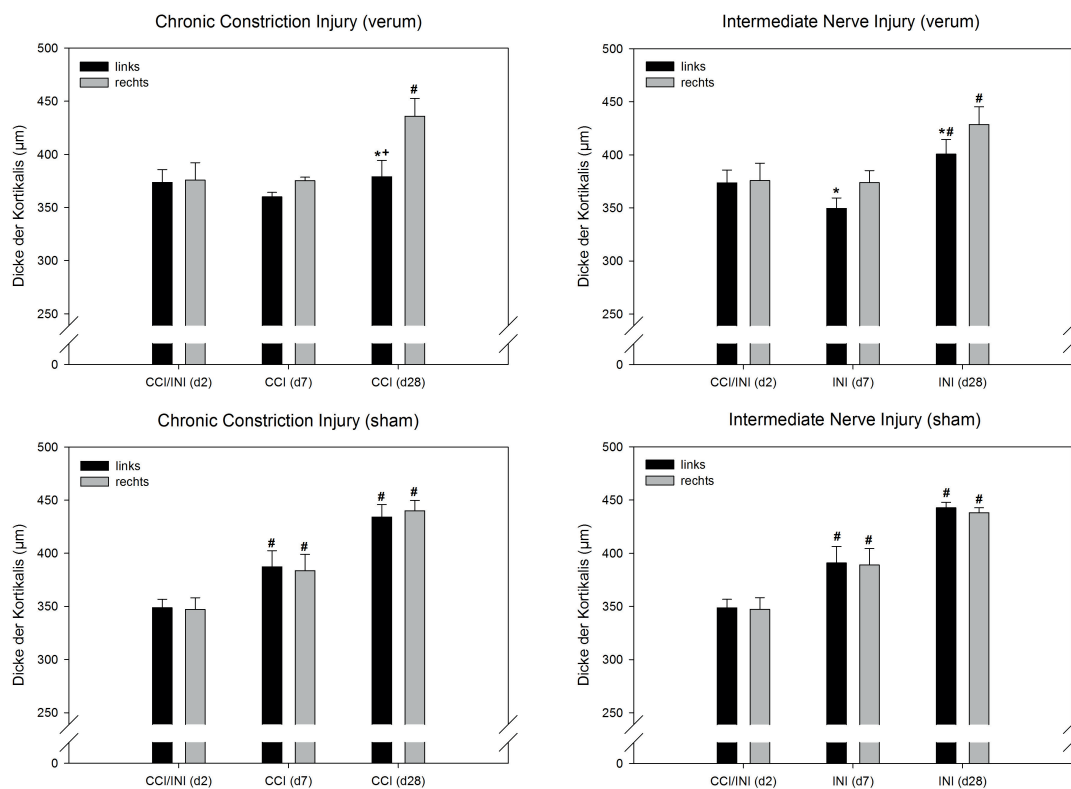


Abbildung 40: Kortikalisdicke. \* vs. Kontrollgruppe, # vs. vorherigen Tag (2 oder 7), + vs. rechts, MW  $\pm$  SEM, n=7.

## 4.6 Ergebnisse der histologischen Bestimmung der Muskelzellapoptose

Die Rate der Cleaved Caspase 3-positiven und damit apoptotischen Myozyten nahm in der Verum-Gruppe des CCI-Modells kontinuierlich zu, im INI-Modell 4 Wochen postoperativ aber wieder ein wenig ab (Abbildung 41). Nichtsdestotrotz war diese im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe an Tag 7 (INI-Gruppe) und Tag 28 (CCI- und INI-Gruppe) signifikant erhöht. Im direkten Vergleich zwischen INI- und CCI-Modell waren allerdings, weder in der Verum- noch in der Sham-Gruppe, signifikante Unterschiede feststellbar.

## 4.6 Ergebnisse der histologischen Bestimmung der Muskelzellapoptose

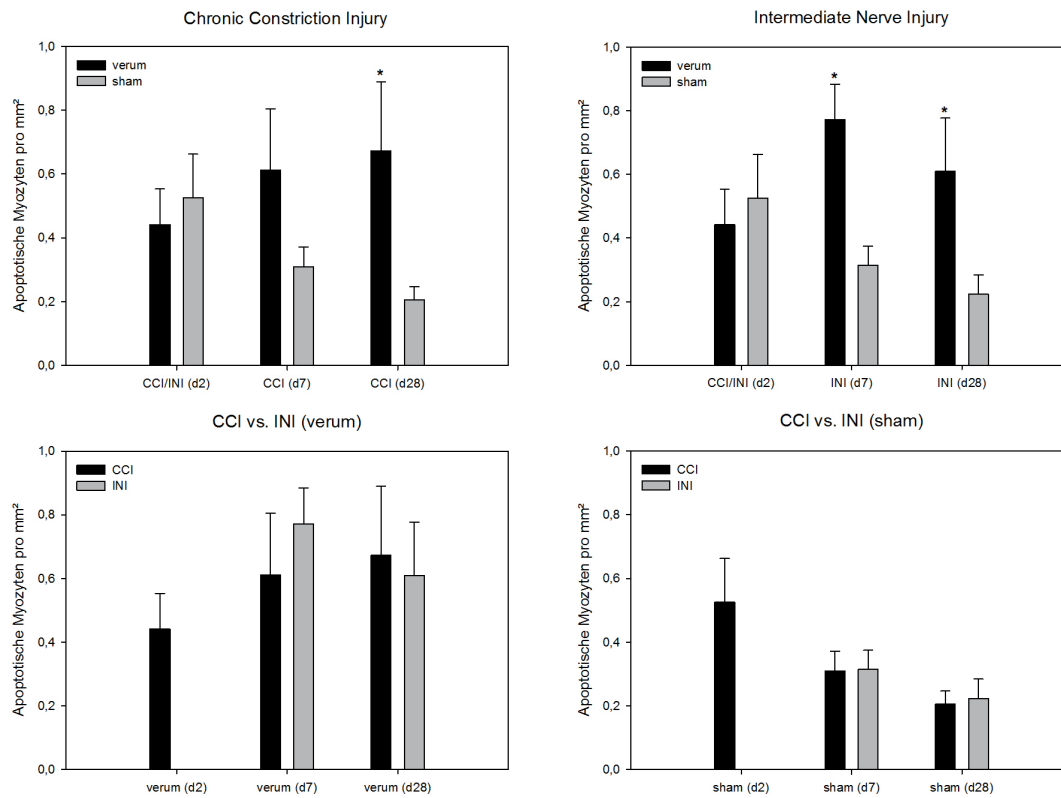


Abbildung 41: Cleaved Caspase 3-positive Myozyten. \* vs. Kontrollgruppe, MW  $\pm$  SEM, n=7.

---

## 5 Diskussion

Obwohl zahlreiche Tiermodelle zum CRPS existieren, konnte bislang keines alle Aspekte des Krankheitsbildes widerspiegeln. Field et al. (1994) berichtete, dass ein zu eng angelegter Cast zu einem komplexen regionalen Schmerzsyndrom führen kann. Um eine temporäre Nervenschädigung, wie sie bei zu eng angelegten Casts oder durch ein peritraumatisches Ödem entstehen kann, abzubilden, wurde das Modell der Intermediate Nerve Injury entwickelt. Das gleichzeitig applizierte Trauma der Wade soll ein Weichteiltrauma, wie es bei Frakturen häufig vorkommt, nachbilden. Die Kombination aus geschlossenem Weichteiltrauma und CCI- bzw. INI-Modell führte in der vorliegenden Studie zum Spontanschmerz, zur Wärme- und Kälteallodynie, Hyperalgesie, zu Temperaturunterschieden der Extremitäten, zur Ödembildung, lokalen Entzündung und Knochenatrophie. Diese CRPS-ähnlichen Symptome verschwanden im INI-Modell 4 Wochen postoperativ, einzig die Knochenatrophie blieb bestehen.

### 5.1 Diskussion von Material und Methoden

#### 5.1.1 Diskussion der Modelle

##### **Modell der chronischen Nervenligatur mit kombiniertem, geschlossenem Weichteiltrauma**

Im Jahr 1979 entwickelten Wall et al. ein tierexperimentelles Modell, wobei sie den N. ischiadicus und den N. saphenus resezierten und eine permanente Anästhesie der betroffenen Extremität beobachteten. Hyperalgesie und Allodynie, wie sie bei CRPS-Patienten üblich sind, konnte die Arbeitsgruppe nicht beobachten (Wall et al., 1979). Komplette Nervendurchtrennungen werden bei Patienten mit CRPS-Symptomen nur sehr selten gesehen. Knapp 10 Jahre später konnten die CRPS-üblichen Symptome erstmals im Tiermodell durch Bennett & Xie erzeugt werden. Sie legten eine vierfache lose Ligatur um den N. ischiadicus proximal der Trifurkation an der hinteren Extremität von Ratten und beobachteten bei den Tieren ein Spontanschmerzverhalten, sowie eine mechanische Hyperalgesie und Allodynie auf thermische Reize. Die betroffene Extremität war außerdem kälter oder wärmer als die unbehandelte Gegenseite (Bennett & Xie, 1988). Bei dieser losen Ligatur handelt es sich um eine partielle Nervenläsion, bei der dicke, myelinisierte Fasern teilweise unterbrochen werden, dünnere und nicht myelinisierte Fasern aber intakt bleiben (Jänig, 1991). Die sensorischen Reize werden hauptsächlich über A $\delta$ - und C-Fasern vermittelt, welche



dünn und myelinisiert oder nicht myelinisiert sind und die Reizweiterleitung durch das CCI-Modell somit kaum beeinträchtigt wird. Shir & Seltzer (1990) zeigten, dass nach einer engen Ligatur des halben N. ischiadicus die thermische Allodynie durch die Gabe von Capsaicin, welches vor allem C-Fasern und nur einen Teil A $\delta$ -Fasern hemmt, aufgehoben werden konnte. Diese Allodynie wird folglich hauptsächlich über C-Fasern vermittelt (Shir & Seltzer, 1990). Torebjörk et al. (1995) stellten ebenso fest, dass das Spontanschmerzverhalten und die Wärmeallodynie bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen über unmyelinisierte Afferenzen, die mechanische Hyperalgesie und Kälteallodynie über myelinisierte Fasern geleitet wird.

Das Modell der losen Nervenligaturen von Bennett & Xie (1988) wurde bereits in einer Vielzahl von Studien zur Erzeugung neuropathischer Schmerzen an Ratten eingesetzt (Attal et al., 1990; Jänig, 1991; Munglani et al., 1996; Yonehara, 2001) und fand auch in der vorliegenden Studie Verwendung unter Kombination mit einem geschlossenen Weichteiltrauma der Wade (Gierer et al., 2004, 2005). Dabei sollten die Begleitverletzungen einer Knochenfraktur, wie Nervenschaden und Weichteiltrauma, erzeugt werden, ohne dass eine Fraktur selbst vorliegt. Eine Fraktur ist zwar häufig ein auslösender Faktor des CRPS, jedoch werden aktuell auch andere Ätiologien diskutiert (Atkins, 2003). Guo et al. zeigten im Jahr 2004, dass es bei Ratten mit 4-wöchiger Ruhigstellung des Unterschenkels in einem Cast sowohl in der Gruppe mit Tibiafraktur, als auch in der Gruppe ohne Fraktur und alleiniger Schienung zu CRPS-ähnlichen Symptomen kam. Um dieser Entwicklung der Symptome durch die Ruhigstellung der betroffenen Extremität entgegen zu wirken, wurde ein Tiermodell ohne Tibiafraktur verwendet.

### **Modell der intermediären Nervenligatur mit kombiniertem, geschlossenem Weichteiltrauma**

Im Gegensatz zum Modell der chronischen Nervenligatur, welches eine dauerhafte Schädigung des peripheren Nervens widerspiegelt, wurden beim Modell der intermediären Nervenligatur die losen Ligaturen am 4. postoperativen Tag entfernt. Damit sollte eine nur vorübergehende Schädigung des N. ischiadicus induziert werden, wie sie beispielsweise nach einer Fraktur mit Ödembildung auftritt. Luo et al. (2013) zeigten, dass ein Ödem nach einer Unterschenkelfraktur im Mittel bis zum 4. Tag persistiert.

### 5.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

**Testung des Spontanschmerzverhaltens und der Wärme-/Kälteallodynie** Die neurophysiologische Testung des Spontanschmerzverhaltens, der mechanischen Hyperalgesie und der Wärme- und Kälteallodynie geht auf die Studien von Attal et al. (1990) zurück. Ohne Intervention des Beobachters wird dabei die schmerzbedingte Schonhaltung der Hinterpfote des Tieres in einem Plexigaskäfig beobachtet und ein Schmerzquotient gebildet (Attal et al., 1990; van der Laan et al., 1998). Dies geschieht zur Testung des Spontanschmerzverhaltens auf einer Metallplatte mit Raumtemperatur. Die Beobachtungen zur Wärmeallodynie bei 40°C erfolgten nach den Studien von Kingery et al. (1999) und Meert et al. (2003). Attal et al. (1990) tauchten die betroffene Extremität in warmes Wasser und verwendeten außerdem etwas höhere Temperaturen ( $41,5 \pm 1,3^\circ\text{C}$ ). Doch genau wie Guilbaud et al. (1989) beobachteten sie hierzu nicht die Stellung der Hinterpfote, sondern nutzten einen sogenannten „Vocalisation threshold“, warteten also auf eine schmerzbedingte vokale Reaktion des Tieres. Eine Beeinflussung durch den Untersucher ist im Gegensatz zur Beobachtung der Schonhaltung der Pfote im Plexigaskäfig nötig und kann nicht vermieden werden. Bei der Kälteallodynie fanden in der Literatur ebenfalls unterschiedliche Temperaturen Anwendung. Bennett & Xie (1988) fanden durch ihre Untersuchungen heraus, dass eine Temperatur von 4°C als nicht schmerzhaft einzustufen ist und dieses Schmerzempfinden als Allodynie (= Schmerzempfinden auf nicht schmerzhaft Reize) und nicht als Hyperalgesie (= gesteigertes Schmerzempfinden auf schmerzhaft Reize) zu werten ist. Auch die Arbeitsgruppe um Simone & Kajander (1996) fand heraus, dass erst eine Temperatur unterhalb von 0°C als schmerzhaft gilt, aber bereits bei 4°C einige Nozizeptoren aktiv sind. Jasmin et al. (1998) führten die Untersuchungen mit einer 5°C kalten Platte durch und beurteilten dies als vergleichbare Methode, um ein nozizeptives Schmerzverhalten zu bestimmen. Eine weitere Möglichkeit der Schmerztestung ist das Nutzen eines Wärmestrahlers, hierbei sind aber nur Temperaturen oberhalb der Umgebungstemperatur möglich (Hargreaves et al., 1987). Choi et al. (1994) nutzten Aceton-Tropfen, um die Kälteallodynie bei den Tieren zu testen. Das in der vorliegenden Studie durchgeführte Beobachten der Stellung der betroffenen Hinterpfote beim Spontanschmerzverhalten, der Wärme- und der Kälteallodynie hat den Vorteil, dass ein einheitlicher Schmerzindex für alle 3 Schmerzqualitäten gebildet werden kann, die Ergebnisse untereinander gut vergleichbar und die Tests relativ beobachterunabhängig sind, da diese immer durch denselben Beobachter und unter denselben Bedingungen durchgeführt werden.

**Testung der mechanischen Hyperalgesie** Die Testung der Hyperalgesie auf mechanische Reize erfolgte mit sogenannten von-Frey-Filamenten (Semmes-Weinstein-Filamente), die der österreichische Physiologe Maximilian von Frey 1896 entwickelt hat. Diese Filamente finden noch heutzutage eine breite Anwendung in der Untersuchung der Sensibilität von Patienten (Wallace et al., 2000). Kim & Chung etablierten 1992 die Schmerztestung mit den von-Frey-Haaren an der Ratte und Chaplan et al. (1994) zeigten, dass die Methode reproduzierbar und nicht von der Erfahrung des Untersuchers abhängig ist. Die maximale Kraft von 15 g wurde gewählt, da es bei größeren Werten unweigerlich zur passiven Anhebung der Pfote der Ratte kommt. Ein Wegziehen der Pfote durch das Tier wurde als Schmerz gewertet und ein häufigeres Anheben zeigte ein gesteigertes Schmerzverhalten an.

**Temperatur- und Ödemmessung** Wasner et al. (2003) beschrieben die Messung eines Ödems bei Patienten mit Hilfe der Wasserverdrängungsmethode, bei der die betroffene Extremität in Wasser getaucht und so das Volumen bestimmt wird. Diese Möglichkeit der Ödembestimmung fand auch in der vorliegenden Studie Anwendung. Genau wie die Messung der Pfortemperatur mit Mon-a-therm Klebemessfühlern wurde diese schon 2007 durch Gradl et al. beschrieben.

### 5.1.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

**Vorbereitungen** Die operativen Vorbereitungen zur Fluoreszenzmikroskopie setzen eine adäquate Narkose des Tieres voraus. Diese wurde mit der intraperitonealen Applikation von Pentobarbital eingeleitet und nach Anlage eines intraarteriellen Katheters gegebenenfalls durch intraarterielle Gabe aufrecht erhalten. Pentobarbital wird in der Leber verstoffwechselt (Hoetzel et al., 2006) und reduziert im Vergleich zu Isofluran den Sauerstoffverbrauch des Gewebes. Da eine Narkose im Allgemeinen zur Vasodilatation führt und damit die Gefahr der Hypothermie und der Minderperfusion der Muskulatur besteht, wurde das Tier kontinuierlich auf einer Wärmeplatte gelagert, um die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten.

Zur direkten Visualisierung des Muskelgewebes existieren seit Jahren eine Vielzahl an Tiermodellen an unterschiedlichen Muskeln. So nutzten beispielsweise Damon & Duling (1987) den M. tibialis anterior des Hamsters, Dietrich & Tyml (1992) und Tyml & Groom (1980) den M. sartorius des Frosches, Klitzman & Duling (1979) den M. cremaster des Hamsters, Lee et al. (2005) den

M. cremaster der Ratte, Sullivan & Johnson (1981) den M. sartorius der Katze und Lindenblatt et al. (2005) den M. cremaster der Maus. Eine erhebliche Anzahl an Studien findet sich zum M. extensor digitorum longus (kurz: EDL) der Ratte (Pudupakkam et al., 1998; Schaser et al., 1999; Tyml & Budreau, 1991; Tyml et al., 1999; Zhang et al., 2003). Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie macht durch die operative Freilegung des zu untersuchenden Muskels in den meisten Fällen eine Manipulation desselbigen unumgänglich. Tyml & Budreau beschrieben 1991 die Präparation des EDL-Muskels als atraumatisch, frei von mechanischer Manipulation während der Freilegung und der offenen Exposition. Weiterhin ist keine oberflächliche Perfusion nötig und die Sichtbarkeit der Mikrozirkulation ist unabhängig von dem Alter und der Größe der Ratte (Tyml & Budreau, 1991). Diese Vorteile der Präparation nutzten auch Badhwar et al. (2003) und Gierer et al. (2004). Sie machten die Mikrozirkulation des Muskelgewebes im M. soleus sichtbar, welcher im Vergleich zum M. extensor digitorum longus den Vorteil bietet, dass er genauso atraumatisch zu präparieren ist, aufgrund seiner Größe aber eine viel größere Fläche zur Mikroskopie bietet.

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine *in vivo* Untersuchung des Muskels. Leukozyten können beispielsweise auch *ex vivo* kultiviert werden, wobei dabei aber Oberflächenantigene hochreguliert werden (Hamblin et al., 1992) und die Fließeigenschaften der weißen Blutkörperchen verändert werden können (Kirkpatrick et al., 1998; Nash et al., 1988). Nach intraarterieller Katheter-einlage ist es möglich, dynamische Parameter wie die Leukozyten-Endothel-Interaktion als Maß für eine lokale Entzündungsreaktion zu beurteilen. Die IVFM ist eine geeignete Methode, um Veränderungen im Gewebe und im Gefäßsystem als Hinweis auf eine lokale Entzündungsreaktion zu beurteilen.

**Mikroskopie** Als direkte Methode der Visualisierung wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Epiillumination gewählt. Bei dieser Methode ist es möglich am lebenden Muskel verschiedene Parameter wie die Fließeigenschaften des Blutes in Arteriolen, Kapillaren und postkapillärer Venolen, den Redoxstatus und damit die Versorgung mit Sauerstoff des Gewebes oder eine eventuell vorhandene Plasmaextravasation direkt zu beurteilen. Deswegen ist diese Technik der Analyse einigen indirekten Verfahren, wie zum Beispiel der Mikrosphärentechnik (Anetzberger et al., 2004; Vincent et al., 2001; Vollmar et al., 1992), der H<sub>2</sub>-Clearance-Messung (Young, 1980) oder der Laser-Doppler-Flowmetrie (Binzoni et al., 2003; Clark et al., 2001; Schaser et al., 2005),

überlegen.

Nach Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran werden vor allem terminale Arteriolen, Kapillaren und postkapilläre Venolen, aber auch größere Sammelvenolen sichtbar gemacht. Das verwendete Dextran hat dabei einen protektiven Einfluss auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die funktionell kapilläre Dichte, nicht aber auf die makromolekulare Plasmaextravasation. Das in dieser Studie verwendete hochmolekulare Dextran mit einem Molekulargewicht von 60.000 Dalton hat dabei aber einen wesentlich geringeren Einfluss als niedermolekulares Dextran (Steinbauer et al., 1997, 1998). Rhodamin 6G wurde genutzt, um Leukozyten anzufärben. Dabei werden Mitochondrien und Kernstrukturen lebender Leukozyten (insbesondere Granulozyten und Monozyten, aber zu einem geringeren Teil auch Lymphozyten) angefärbt (Horobin & Rashid, 1990), sodass deren Bewegung am Fluoreszenzmikroskop nachvollzogen werden konnte. Springer (1994) unterteilte die sich im Blut befindlichen Leukozyten erstmals in 3 Gruppen: sich schnell bewegende, langsam am Endothel gleitende und fest adhärenente Leukozyten. Da die weißen Blutzellen durch Aktivierung und Rekrutierung am Gefäßendothel gebunden werden (Springer, 1994), lässt sich somit die Leukozyten-Endothel-Interaktion beurteilen und die lokale Entzündungsreaktion des Muskels bestimmen. Über den Zustand der Sauerstoffversorgung des Muskels gibt das anfallende NADH Auskunft. Dieses transportiert Energie vom Citratzyklus zur Atmungskette und kumuliert bei Sauerstoffmangel im Gewebe (Vollmar et al., 1997). Ist der NADH-Gehalt im Muskel niedrig, kann von einer intakten Sauerstoffversorgung ausgegangen werden.

Die Messung der funktionellen kapillären Dichte mittels FITC-Dextran, die Beurteilung der lokalen Entzündungsreaktion durch Anfärben von Leukozyten durch Rhodamin und die Messung des Redoxstatus des Muskelgewebes führten schon eine Reihe von Arbeitsgruppen analog der hier geschilderten Art und Weise durch (bspw. Gierer et al. (2005) und Gradl et al. (2004)).

#### **5.1.4 Diskussion der Knochenanalyse im Micro-CT**

Bereits Paul Sudeck beschrieb um 1900 eine Knochenatrophie bei Patienten mit CRPS-ähnlichen Symptomen, wie Entzündung, Schmerzen und eine Temperaturdifferenz der Extremitäten (Sudeck, 1900). Um diese Atrophie darzustellen, nutzte er Röntgenbilder, auf denen dies rein makroskopisch beurteilt wurde. Auch heutzutage ist eine Knochenatrophie bei CRPS-Patienten ein wichtiges Diagnosekriterium und hilft bei der Wahl der Therapie (Otake et al., 1998). Die charakteristische loka-

le Osteopenie, eine gelenknahe fleckige Entkalkung und bleistiftlinienartige Kortikaliszeichnung sind Hinweise auf ein CRPS im Röntgenbild. Eine Knochendichtemessung kann heute ebenso mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie (kurz: DEXA oder DXA) durchgeführt werden. Die DEXA-Messung liefert jedoch keine detaillierten Informationen über die Struktur und den Aufbau des Knochens und wird zur Diagnose des CRPS kaum verwendet. Um die trabekuläre Struktur abzubilden, wurden in der vorliegenden Studie die Schienbeinknochen der Ratten im Micro-CT analysiert. Da dies noch eine relativ „neue“ Methode ist, gibt es eine Vielzahl von Studien, die unterschiedlichste Parameter an verschiedenen Spezies gemessen haben. Bouxsein et al. fassten diese im Jahr 2010 zusammen und schufen einen Leitfaden für die Analyse von Nagetierknochen. Sie forderten, dass sich beispielsweise die „Region of Interest“ standardisiert an immer dergleichen Stelle befinden muss (Bouxsein et al., 2010). Bei der Analyse des trabekulären Knochens muss darauf geachtet werden, dass die ROI keinen Anteil der Kortikalis berührt, aber gleichzeitig möglichst viele Trabekel der Spongiosa eingeschlossen werden. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, wurde dem durch eine jeweils von Hand eingezeichnete ROI Rechnung getragen. Außerdem wurde in der Sagitalebene stets der gleiche Bereich ausgewählt, indem der Beginn der „Region of Interest“ 200 bzw. 1000 Schichtbilder distal der Epiphysenfuge festgelegt wurde. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, müssen bestimmte Parameter ausgegeben und diese in allen Studien gleich benannt werden (Bouxsein et al., 2010). Dazu gehören für den kortikalen Knochen die Gesamtfläche, die Knochenfläche und die Kortikalisdicke und für den trabekulären Knochen der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen, die Anzahl der Knochentrabekel, die trabekuläre Dicke und die Separation der Trabekel.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

**Temperaturmessung und Ödem** Schon Bennett & Xie (1988) fanden bei ihrem CCI-Modell eine signifikante Temperaturdifferenz zwischen beiden Hinterpfoten der Ratte. Bei 11 von 30 Tieren lag diese über 1°C, in der Kontrollgruppe fand sich lediglich ein Tier von 30 Untersuchten, welches eine so hohe Temperaturdifferenz der Pfoten aufwies. Im Gegensatz dazu war in der Studie von Gradl et al. (2006) zwar ein geringer, aber nicht signifikanter Unterschied zu finden. Da die betroffene Pfote sowohl pathologisch wärmer als auch kälter als die nicht betroffene Seite sein kann, wurde in der vorliegenden Studie nur der Betrag der Temperaturdifferenz verwendet und nicht nach



wärmer oder kälter unterteilt, um die verschiedenen Tiere besser miteinander vergleichen zu können. In der CCI- und der INI-Gruppe fand sich eine signifikante Differenz an den Tagen 2 bis 7. Während in der CCI-Gruppe an den folgenden Untersuchungstagen kein Unterschied mehr feststellbar war, nahm die Temperaturdifferenz in der INI-Gruppe wieder zu. Da die Ergebnisse der IVFM keinen Anhalt für eine fortdauernde Entzündungsreaktion lieferten, muss hier eine Messungengenauigkeit in Betracht gezogen werden.

In der vorliegenden Studie zeigte sich sowohl in der CCI- wie auch in der INI-Gruppe auf der behandelten Seite in der Messung des Feucht-/Trockengewichts ein Ödem des M. tibialis anterior an allen postoperativen Untersuchungstagen. Da sich aber in der INI-Gruppe auch bei den sham-operierten Tieren ein signifikantes Ödem des Muskels zeigte, liegt es nahe, dass dies auf das geschlossene Weichteiltrauma zurückzuführen ist. In der Sham-CCI-Gruppe lag nur an Tag 2 ein signifikantes Muskelödem vor, sodass die zweite Sham-Operation in der INI-Gruppe ein weiterer Stimulator für ein Ödem zu sein scheint. Ein signifikantes Pfotenödem zeigte sich vor allem an Tag 2 in beiden Gruppen (CCI und INI). Danach nahm das Volumen der betroffenen Pfote kontinuierlich ab, was auf eine Atrophie des Weichteilgewebes der Pfote hinweisen könnte. In der INI-Gruppe erhöhte sich das Pfotenvolumen der betroffenen Extremität an Tag 28 wieder und schien sich der unbetroffenen Seite anzunähern. Auch hier fand sich in der sham-operierten Gruppe vor allem zu Beginn der Untersuchungen (Tag 2 bzw. 4) ein Pfotenödem, welches am ehesten auf das geschlossene Weichteiltrauma zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der makromolekularen Plasmaextravasion legen nahe, dass vor allem das Modell der Chronic Constriction Injury im Langzeitverlauf nach 28 Tagen zur venulären Durchlässigkeit und damit zum Ödem führt. Beim INI-Modell waren keinerlei signifikante Unterschiede zu sehen. Alles in allem lässt sich schlussfolgern, dass ein muskuläres Ödem vor allem durch das Weichteiltrauma begründet zu sein scheint und dass eine chronische Nervenligatur zur Atrophie und nicht zum Ödem führt (Bennett & Xie, 1988). Dazu passen auch die Untersuchungen von Goris (1998) und Daemen et al. (1998), die einen Temperaturanstieg und eine Ödembildung als Entzündungsreaktion, sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen, beschrieben.

**Ergebnisse des Schmerzverhaltens** Die Kombination aus geschlossenen Weichteiltrauma und CCI-Modell führte in der vorliegenden Studie über einen Zeitraum von 4 Wochen zu klassischen

Symptomen des neuropathischen Schmerzes der betroffenen Extremität. Gleiches fand sich auch zu Beginn der Untersuchungen im INI-Modell, wobei aber knapp 4 Wochen postoperativ keine dieser Symptome mehr feststellbar waren und ein chronischer Verlauf ausgeschlossen werden konnte.

Bereits eine Vielzahl anderer Studien zeigte, dass die lose Ligatur des N. ischiadicus zur Entwicklung von Spontanschmerz, Kälte- und Wärmeallodynie sowie Hyperalgesie führt (Attal et al., 1990; Munglani et al., 1996; Yonehara & Yoshimura, 2001), welches typische Symptome beim CRPS sind (Baron & Wasner, 2001). Die Arbeitsgruppe um Baron & Wasner (2001) beschrieb außerdem, dass das Hauptsymptom der Schmerz ist, welcher bei 90 % der betroffenen Patienten auftritt. Allodynien kommen bei 65 % der Betroffenen und Hyperalgesien in 70 % der Fälle vor. Im Modell der Chronic Constriction Injury blieben alle 3 Symptome bis einschließlich zum letzten, 28. Untersuchungstag auf einem gleichmäßig hohem Niveau. Hier lag ein chronischer Schmerzverlauf vor. Im INI-Modell hingegen begannen sich ungefähr eine Woche nach Entfernung der Ligaturen das Spontanschmerzverhalten, sowie die Wärme- und Kälteallodynie und auch die mechanische Hyperalgesie zurückzubilden und sich dem Ausgangsniveau anzunähern. Somit konnte die Kombination aus geschlossenem Weichteiltrauma und Intermediate Nerve Injury zwar neuropathische Schmerzen und damit die Kardinalsymptome des CRPS widerspiegeln, aber nicht zu einer Verselbstständigung führen und damit keine chronischen Schmerzen verursachen. Hier scheinen weitere Faktoren in der Ätiologie eine Rolle zu spielen.

Das alleinige Weichteiltrauma, wie es bei den sham-operierten Tieren erzeugt wurde, führte in der vorliegenden Studie zwar zu einem initialen Schmerzanstieg (Spontanschmerz sowie Wärme- und Kälteallodynie), bildete sich aber bereits nach 4 Tagen vollständig zurück. Diese Untersuchungen führen zu dem Schluss, dass zwar auch ein alleiniges Muskeltrauma zu einer neuropathischen Schmerzsymptomatik führt, aber bei weitem keinen chronischen Verlauf erzeugen kann.

**Mikroskopische Messungen/Entzündung** In der vorliegenden Studie konnten erhöhte NADH-Werte bei der Analyse mittels *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie des M. soleus in beiden Modellen (2 und 28 Tage) nachgewiesen werden. Dies spricht für eine gestörte Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff (Gierer et al., 2005; Gradl et al., 2004; Vollmar et al., 1997). NADH staut sich bei Hemmung der Atmungskette (z.B. durch Sauerstoffmangel) im Gewebe an und ist einer der wichtigsten Energieträger im Citratzyklus (Vollmar et al., 1997). In der Gruppe der Chronic Constriction Injury



fielen die NADH-Werte nach initialem Anstieg wieder ab, auch wenn nach 28 Tagen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen war. Im INI-Modell hingegen blieben diese auf einem ähnlich hohen Niveau, ohne dass ein Unterschied zur Kontrollgruppe vorlag. Finke (2008) fand im alleinigen CCI-Modell nach 4 Tagen keine signifikanten Unterschiede der NADH-Werte zur Kontrollgruppe, jedoch wurden keine Ausgangswerte unbehandelter Tiere bestimmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass nach der Kombination aus geschlossenem Weichteiltrauma und CCI- bzw. INI-Modell die Versorgung des Muskels mit Sauerstoff gestört war. Bis auf Tag 28 im CCI-Modell lagen aber keine Unterschiede zur Kontrollgruppe vor, sodass das geschlossene Weichteiltrauma als Ursache anzusehen ist, die chronische Nervenligatur aber den Heilungsverlauf verzögern oder sogar verhindern kann. Im INI-Modell schien außerdem die zweite Operation einen erneuten Trigger darzustellen und eine lokale Entzündung aufrecht zu erhalten.

Durch die Analyse der Leukozyten-Endothel-Interaktion konnte gezeigt werden, dass die Chronic Constriction Injury eine, wenn auch geringe, lokale Entzündung aufrecht zu erhalten schien, da 4 Wochen postoperativ die Anzahl der am Endothel langsam entlang gleitenden Leukozyten auf einem hohen Niveau blieb. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der fest adhärenen Leukozyten aber wieder auf das Ausgangsniveau gesunken. Im INI-Modell scheint die zweite Operation zur Entfernung der Ligaturen ein erneuter Entzündungstrigger zu sein, denn 7 Tage postoperativ fanden sich immer noch erhöhte Leukozytenwerte, welche aber nach 4 Wochen nahezu auf Ausgangsniveau sanken. Dass das geschlossene Weichteiltrauma zur lokalen Entzündungsreaktion führt, ist unbestreitbar. Die durch die Leukozyten-Endothel-Interaktion dargestellte Entzündung klingt in der Regel aber nach wenigen Tagen wieder ab, wie es auch bei den sham-operierten Tieren der Fall war. Die chronische Nervenligatur schien dieses Abklingen zu verlangsamen oder sogar die komplette Remission zu verhindern. Eine Intermediate Nerve Injury hingegen hatte kaum Einfluss auf die Resolution der Entzündung. Die Analyse der funktionellen kapillären Dichte lieferte ähnliche Ergebnisse. Am zweiten postoperativen Tag war eine klare Minderperfusion des Muskels zu sehen, welche im Verlauf wieder zunahm, aber im CCI-Modell nicht die Ausgangswerte erreichte. Auch hier scheint die chronische Nervenligatur einen Heilungsverlauf zu verzögern oder ganz zu stoppen, was auch schon die Ergebnisse der NADH-Messung zeigten.

Daemen et al. (1998) fanden eine Leukozytenkumulation im Muskel mittels Laser-Doppler-Flowmetrie im CCI-Modell, indem sie eine kutane Hyperperfusion und einen erhöhten Myelo-

peroxidasegehalt im Gewebe nachwiesen. Auch diese Studie stützt die Theorie der entzündlichen Komponente sowohl im CCI-Modell, wie auch bei CRPS-Patienten. Im Gegensatz dazu schlussfolgerte Finke (2008), dass das alleinige CCI-Modell dem Erkrankungsbild des CRPS beim Menschen nicht gerecht wird. Hier fehlte vor allem die entzündliche Komponente, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass die Entzündung vermutlich durch das Weichteiltrauma bedingt ist und durch die Nervenligatur nur aufrecht erhalten, nicht aber dadurch ausgelöst wird. Bereits Paul Sudeck diskutierte eine entzündliche Genese beim komplexen regionalen Schmerzsyndrom (Sudeck, 1900) und auch eine Vielzahl weiterer Autoren griff diese These immer wieder auf (Goris, 1998; Heerschap et al., 1993). Diese entzündliche Komponente konnte in mehreren klinischen Studien an Erkrankten nachgewiesen werden (Birklein et al., 2000b; Goris, 1998; Oyen et al., 1993; van der Laan et al., 1998).

**Analyse der Knochenstruktur** Der Hamburger Chirurg Paul Sudeck beschrieb Anfang des 20. Jahrhunderts eine *entzündliche Knochenatrophie* nach Traumata (Sudeck, 1900). Er äußerte weiterhin den Verdacht, dass eine derartige Atrophie nicht nur vom alleinigen Nichtbenutzen einer Extremität kommt. In der vorliegenden Studie konnte man im 3D-rekonstruierten Scan des trabekulären Knochens schon makroskopisch einen massiven Knochenschwund feststellen. Auch die genaue Analyse der einzelnen Parameter sowohl für den trabekulären wie auch für den kortikalen Knochen zeigte im CCI- und im INI-Modell eine ausgesprochene Atrophie im Vergleich zur unbehandelten Seite und auch zur Kontrollgruppe. Da kein signifikanter Unterschied zwischen INI- und CCI-Modell vorlag, reichen entweder knapp 4 Wochen nach Entfernung der Ligaturen nicht aus, um die Knochenstruktur wieder herzustellen oder eine 4-tägige Ligatur des N. ischiadicus führt bereits zur chronischen Knochenatrophie. Dass die betroffene Extremität weniger belastet wurde als die nicht-operierte Seite konnte mehrfach beobachtet werden. Im CCI- und INI-Modell kommt es dabei aber zu keiner motorischen Lähmung der Extremität. Negri et al. (2006) beschrieben einen Hyperflow des Knochens, bei dem es zu einer gesteigerten Durchblutung kommt und der Knochen ausgewaschen wird. Auch die alleinige Inaktivität einer Extremität kann zur Knochendichteminderung führen (Lacerda et al., 2015). Da sich die Tiere aufgrund der Schmerzen aber insgesamt weniger bewegten als sham-operierte Ratten und auf den unbehandelten Seiten der Verum- und Sham-Gruppen kein Unterschied bestand, liegt der Schluss nahe, dass das Nicht- oder Wenigerbenutzen der Extremität nicht diese massive Atrophie erklären kann. Hier scheint die Kombination

aus Weichteiltrauma und Nervenligatur ein entscheidender Faktor zu sein. Auch Whiteside et al. (2006) kamen zu dem Schluss, dass eine Osteopenie bei neuropathischen Schmerzen nicht allein durch die Schonung einer Extremität hervorgerufen wurde, sondern zusätzlich eine Veränderung im Knochen-Nerv-Signalweg ursächlich sein muss.

**Apoptose und Nervenleitlatenz** Tews & Goebel (1997) beschrieben eine Apoptose als Folge einer gestörten Muskelinnervation (Denervation). Die Ergebnisse der Nervenleitlatenz zeigen in beiden Tiermodellen eine Schädigung des Nerven an. Da die motorischen wie auch die sensorischen Fähigkeiten aber weitestgehend erhalten blieben und die Latenz der Erregungsleitung zunahm und nicht völlig unterbrochen wurde, war der Nerv in seiner Struktur zwar geschädigt, aber trotzdem noch funktionstüchtig, wie es beim CRPS-Vollbild auch zu sein scheint. Komplette Nervendurchtrennungen sind hierbei extrem selten (Wall et al., 1979). Gradl et al. (2005) zeigten, dass die kontinuierliche Applikation eines Überstandes aus traumatisiertem Muskelgewebe zwar zu CRPS-ähnlichen Symptomen führt, es aber nicht zur Muskelzellapoptose kommt. Wie schon Finke (2008) zeigte, ist dies bei der Chronic Constriction Injury anders. In der Kombination aus stumpfem, geschlossenen Weichteiltrauma und CCI-Modell, wie auch in der Kombination aus Weichteiltrauma und INI-Modell, nahm die Anzahl der mittels Cleaved Caspase 3 angefärbten Myozyten schon nach 7 Tagen signifikant zu. Der Vorteil der Färbung der apoptotischen Myozyten mittels Cleaved Caspase 3 gegenüber der intravitalen Anfärbung von Muskelzellen mittels Bisbenzimid (Finke, 2008) liegt darin, dass zum einen verblindet gearbeitet werden kann, zum anderen wesentlich genauer zwischen intramuskulär und um die Muskelzelle herum liegenden Zellen unterschieden werden konnte. Dies ist in der *in vivo* Mikroskopie oft nicht zweifelsfrei möglich, da auch unter anderem apoptotische Erythrozyten angefärbt und mit Myozyten verwechselt werden können. Erstmals wurde gezeigt, dass im INI-Modell nach 28 Tagen die Latenz der Erregungsleitung und auch die Muskelzellapoptose auf einem hohen Niveau blieben. Dies legt den Schluss nahe, dass der Nerv auch nach früher Dekompressionsbehandlung entweder dauerhaft geschädigt bleibt oder einen noch längeren Zeitraum braucht, um sich vollständig zu regenerieren.

### 5.3 Schlussfolgerung

Die experimentelle Anordnung wurde gewählt, um einerseits eine chronische Nervenschädigung herbeizuführen und andererseits eine nur kurz währende Nervenkompression, wie sie in der Klinik bei zu eng angelegten Casts vorkommen kann (Field et al., 1994), zu erzeugen. Auch ein peritraumatisches Ödem kann, ohne dass eine Schienung der Extremität erfolgte, zu einer vorübergehenden Nervenschädigung führen (Luo et al., 2013). Damit wurde ein experimentelles Tiermodell entwickelt, bei dem sich Parameter wie Schmerzen, sudomotorische Störungen, lokale Entzündung und Veränderungen der Mikroarchitektur des Knochens studieren ließen.

In beiden Tiermodellen, sowohl bei der Chronic Constriction Injury als auch bei der Intermediate Nerve Injury, kam es nach der Kombination mit einem stumpfen, geschlossenen Weichteiltrauma zu CRPS-ähnlichen Symptomen, wie Spontanschmerz, Hyperalgesie, Wärme- und Kälteallodynie, Temperaturunterschieden der Extremitäten und Ödembildung. Eine lokale Entzündungsreaktion im betroffenen M. soleus schien durch das initiale Weichteiltrauma bedingt, aber durch die chronische Nervenligatur aufrecht erhalten zu werden. Im Modell der Intermediate Nerve Injury verschwand diese 4 Wochen postoperativ wieder. Im Gegensatz dazu führten beide Modelle zur Muskelzellapoptose und Latenz in der nervalen Erregungsleitung. Das machte deutlich, dass sich der Nerv auch im INI-Modell nach 28 Tagen noch nicht wieder vollständig erholt hatte. Bei den sham-operierten Tieren fanden sich nur gering ausgeprägte Symptome, welche nach kurzer Zeit verschwanden. Paul Sudeck beschrieb als Erster das Krankheitsbild der *entzündlichen Knochenatrophie* (Sudeck, 1900). Dabei berichtete er von Verläufen, wo der Schmerz verschwand, Veränderungen im Knochen aber persistierten. Auch in der vorliegenden Studie fanden sich deutliche Veränderungen der Dichte und Mikroarchitektur des Knochens. Auch wenn diese im INI-Modell Heilungstendenzen aufwiesen, persistierten sie auch knapp 4 Wochen nach Entfernung der Ligaturen noch. Somit konnte mit der Intermediate Nerve Injury ein neues tierexperimentelles Modell geschaffen werden, welches akute CRPS-ähnliche Symptome hervorrufen konnte und darüber hinaus zur deutlichen Knochenatrophie und Veränderungen der Mikroarchitektur des Knochens führte. Schlussendlich reichte aber die Kombination aus Weichteiltrauma und Intermediate Nerve Injury nicht aus, um das Vollbild des CRPS auf Dauer zu erzeugen. Beim Menschen existieren völlig unterschiedliche Verläufe. Chronische Beschwerden, die von 1 bis über 10 Jahre persistieren sind zwar selten, kommen aber vor (Bickerstaff & Kanis, 1994). Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgestellt wer-

den. Jedoch zeigen die Ergebnisse des INI-Modells deutlich, dass es nach einer Fraktur zu CRPS-ähnlichen Symptomen kommen kann und man im klinischen Alltag zum Beispiel zu enge Casts oder Gipsverbände vermeiden sollte, da die Nervenkompression auch über einen kurzen Zeitraum zu anhaltenden und vielleicht sogar chronischen Beschwerden führen kann.

---

## 6 Literatur

- [Anetzberger et al. 2004] ANETZBERGER, H. ; THEIN, E. ; BECKER, M. ; ZWISSLER, B. ; MESSMER, K.: Microspheres accurately predict regional bone blood flow. In: *Clin Orthop Relat Res* 1 (2004), Jul, Nr. 424, S. 253–265
- [Arnér 1991] ARNÉR, S.: Intravenous phentolamine test: diagnostic and prognostic use in reflex sympathetic dystrophy. In: *Pain* 46 (1991), Jul, Nr. 1, S. 17–22
- [Atkins 2003] ATKINS, R. M.: Complex regional pain syndrome. In: *J Bone Joint Surg Br* 85 (2003), Nov, Nr. 8, S. 1100–1106
- [Attal et al. 1990] ATTAL, N. ; JAZAT, F. ; KAYSER, V. ; GUILBAUD, G.: Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. In: *Pain* 41 (1990), May, Nr. 2, S. 235–251
- [Badhwar et al. 2003] BADHWAR, A. ; DUNGEY, A. A. ; HARRIS, K. A. ; SCOTT, J. A. ; MCCARTER, S. D. ; SCOTT, J. R. ; FORBES, T. L. ; POTTER, R. F.: Limitations of ischemic tolerance in oxidative skeletal muscle: perfusion vs tissue protection. In: *J Surg Res* 109 (2003), Jan, Nr. 1, S. 62–67
- [Baron & Wasner 2001] BARON, R. ; WASNER, G.: Complex regional pain syndromes. In: *Curr Pain Headache Rep* 5 (2001), Apr, Nr. 2, S. 114–123
- [Bennett & Xie 1988] BENNETT, G. J. ; XIE, Y. K.: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. In: *Pain* 33 (1988), Apr, Nr. 1, S. 87–107
- [Bickerstaff & Kanis 1994] BICKERSTAFF, D. R. ; KANIS, J. A.: Algodystrophy: an under-recognized complication of minor trauma. In: *Br J Rheumatol* 33 (1994), Mar, Nr. 3, S. 240–248
- [Binzoni et al. 2003] BINZONI, T. ; LEUNG, T. S. ; BOGGETT, D. ; DELPY, D.: Non-invasive laser

- 
- Doppler perfusion measurements of large tissue volumes and human skeletal muscle blood RMS velocity. In: *Phys Med Biol* 48 (2003), Aug, Nr. 15, S. 2527–2549
- [Birklein 2005] BIRKLEIN, F.: Complex regional pain syndrome. In: *J Neurol* 252 (2005), Feb, Nr. 2, S. 131–138
- [Birklein 2012] BIRKLEIN, F.: Diagnostik und Therapie komplexer regionaler Schmerzsyndrome. In: *Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien für Diagnostik und Therapie Kapitel Kopfschmerzen und andere Schmerzen* (2012), S. 1–15
- [Birklein et al. 2000a] BIRKLEIN, F. ; RIEDL, B. ; SIEWEKE, N. ; WEBER, M. ; NEUNDÖRFER, B.: Neurological findings in complex regional pain syndromes—analysis of 145 cases. In: *Acta Neurol Scand* 101 (2000), Apr, Nr. 4, S. 262–269
- [Birklein et al. 1997] BIRKLEIN, F. ; SITTL, R. ; SPITZER, A. ; CLAUS, D. ; NEUNDÖRFER, B. ; HANDWERKER, H. O.: Sudomotor function in sympathetic reflex dystrophy. In: *Pain* 69 (1997), Jan, Nr. 1-2, S. 49–54
- [Birklein et al. 2000b] BIRKLEIN, F. ; WEBER, M. ; NEUNDÖRFER, B.: Increased skin lactate in complex regional pain syndrome: evidence for tissue hypoxia? In: *Neurology* 55 (2000), Oct, Nr. 8, S. 1213–1215
- [Bouxsein et al. 2010] BOUXSEIN, M. L. ; BOYD, S. K. ; CHRISTIANSEN, B. A. ; GULDBERG, R. E. ; JEPSEN, K. J. ; MÜLLER, R.: Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. In: *J Bone Miner Res* 25 (2010), Jul, Nr. 7, S. 1468–1486
- [Bruehl 2010] BRUEHL, S.: An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome. In: *Anesthesiology* 113 (2010), Sep, Nr. 3, S. 713–725
- [Cepeda et al. 2002] CEPEDA, M. S. ; LAU, J. ; CARR, D. B.: Defining the therapeutic role of local anesthetic sympathetic blockade in complex regional pain syndrome: a narrative and systematic review. In: *Clin J Pain* 18 (2002), Nr. 4, S. 216–233
- [Chaplan et al. 1994] CHAPLAN, S. R. ; BACH, F. W. ; POGREL, J. W. ; CHUNG, J. M. ; YAKSH, T. L.: Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. In: *J Neurosci Methods* 53 (1994), Jul, Nr. 1, S. 55–63



- 
- [Cheng & Ji 2008] CHENG, J.-K. ; JI, R.-R.: Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. In: *Neurochem Res* 33 (2008), Oct, Nr. 10, S. 1970–1978
- [Choi et al. 1994] CHOI, Y. ; YOON, Y. W. ; NA, H. S. ; KIM, S. H. ; CHUNG, J. M.: Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. In: *Pain* 59 (1994), Dec, Nr. 3, S. 369–376
- [Clark et al. 2001] CLARK, A. D. ; BARRETT, E. J. ; RATTIGAN, S. ; WALLIS, M. G. ; CLARK, M. G.: Insulin stimulates laser Doppler signal by rat muscle in vivo, consistent with nutritive flow recruitment. In: *Clin Sci (Lond)* 100 (2001), Mar, Nr. 3, S. 283–290
- [Coderre et al. 2004] CODERRE, T. J. ; XANTHOS, D. N. ; FRANCIS, L. ; BENNETT, G. J.: Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. In: *Pain* 112 (2004), Nov, Nr. 1-2, S. 94–105
- [Daemen et al. 1998] DAEMEN, M. A. ; KURVERS, H. A. ; KITSLAAR, P. J. ; SLAAF, D. W. ; BULLENS, P. H. ; VAN DEN WILDENBERG, F. A.: Neurogenic inflammation in an animal model of neuropathic pain. In: *Neurol Res* 20 (1998), Jan, Nr. 1, S. 41–45
- [Damon & Duling 1987] DAMON, D. H. ; DULING, B. R.: Are physiological changes in capillary tube hematocrit related to alterations in capillary perfusion heterogeneity? In: *Int J Microcirc Clin Exp* 6 (1987), Dec, Nr. 4, S. 309–319
- [De Mos et al. 2007] DE MOS, M. ; DE BRUIJN, A. G. J. ; HUYGEN, F. J. P. M. ; DIELEMAN, J. ; STRICKER, B. H. C. ; STURKENBOOM, M. C. J. M.: The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. In: *Pain* 129 (2007), May, Nr. 1-2, S. 12–20
- [De Mos et al. 2009] DE MOS, M. ; HUYGEN, F. J. P. M. ; VAN DER HOEVEN-BORGMAN, M. ; DIELEMAN, J. P. ; CH STRICKER, B. H. ; STURKENBOOM, M. C. J. M.: Outcome of the complex regional pain syndrome. In: *Clin J Pain* 25 (2009), Sep, Nr. 7, S. 590–597
- [Dellemiijn 1999] DELLEMIJN, P.: Are opioids effective in relieving neuropathic pain? In: *Pain* 80 (1999), Apr, Nr. 3, S. 453–462

- 
- [Dertwinkel et al. 1998] DERTWINKEL, R. ; STRUMPF, M. ; ZENZ, M.: Sympathetic reflex dystrophy and phantom pain. Diagnosis, therapy and prognosis. In: *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* 92 (1998), Jan, Nr. 1, S. 35–40
- [Dietrich & Tyml 1992] DIETRICH, H. H. ; TYML, K.: Microvascular flow response to localized application of norepinephrine on capillaries in rat and frog skeletal muscle. In: *Microvasc Res* 43 (1992), Jan, Nr. 1, S. 73–86
- [Dowd et al. 2007] DOWD, G. S. E. ; HUSSEIN, R. ; KHANDUJA, V. ; ORDMAN, A. J.: Complex regional pain syndrome with special emphasis on the knee. In: *J Bone Joint Surg Br* 89 (2007), Mar, Nr. 3, S. 285–290
- [Drummond et al. 1996] DRUMMOND, P. D. ; SKIPWORTH, S. ; FINCH, P. M.: Alpha 1-adrenoceptors in normal and hyperalgesic human skin. In: *Clin Sci (Lond)* 91 (1996), Jul, Nr. 1, S. 73–77
- [Evans 1946] EVANS, J. A.: Reflex sympathetic dystrophy. In: *Surg Clin North Am* 26 (1946), Jun, S. 780–790
- [Field et al. 1994] FIELD, J. ; PROTHEROE, D. L. ; ATKINS, R. M.: Algodystrophy after Colles fractures is associated with secondary tightness of casts. In: *J Bone Joint Surg Br* 76 (1994), Nov, Nr. 6, S. 901–905
- [Finke 2008] FINKE, B.: Tiermodelle zum 'complex regional pain syndrome' (CRPS). Neurophysiologische und intravitalfluoreszenzmikroskopische Studien an der Ratte. In: *Universitätsbibliothek Rostock, Inauguraldissertation urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0059-7* (2008), S. 62
- [Gierer et al. 2005] GIERER, P. ; MITTLMEIER, T. ; BORDEL, R. ; SCHASER, K. ; GRADL, G. ; VOLLMAR, B.: Selective cyclooxygenase-2 inhibition reverses microcirculatory and inflammatory sequelae of closed soft-tissue trauma in an animal model. In: *J Bone Joint Surg Am* 87 (2005), Jan, Nr. 1, S. 153–160
- [Gierer et al. 2004] GIERER, P. ; VOLLMAR, B. ; SCHASER, K. ; ANDREAS, C. ; GRADL, G. ; MITTLMEIER, T.: Efficiency of small-volume resuscitation in restoration of disturbed skeletal

- 
- muscle microcirculation after soft-tissue trauma and haemorrhagic shock. In: *Langenbecks Arch Surg* 389 (2004), Feb, Nr. 1, S. 40–45
- [Goebel 2011] GOEBEL, A.: Complex regional pain syndrome in adults. In: *Rheumatology (Oxford)* 50 (2011), Oct, Nr. 10, S. 1739–1750
- [Goris 1998] GORIS, R. J.: Reflex sympathetic dystrophy: model of a severe regional inflammatory response syndrome. In: *World J Surg* 22 (1998), Feb, Nr. 2, S. 197–202
- [Gradl et al. 2007] GRADL, G. ; FINKE, B. ; SCHATTNER, S. ; GIERER, P. ; MITTLMEIER, T. ; VOLLMAR, B.: Continuous intra-arterial application of substance P induces signs and symptoms of experimental complex regional pain syndrome (CRPS) such as edema, inflammation and mechanical pain but no thermal pain. In: *Neuroscience* 148 (2007), Sep, Nr. 3, S. 757–765
- [Gradl et al. 2006] GRADL, G. ; GAIDA, S. ; FINKE, B. ; GIERER, P. ; MITTLMEIER, T. ; VOLLMAR, B.: Exaggeration of tissue trauma induces signs and symptoms of acute CRPS I, however displays distinct differences to experimental CRPS II. In: *Neurosci Lett* 402 (2006), Jul, Nr. 3, S. 267–272
- [Gradl et al. 2005] GRADL, G. ; GAIDA, S. ; FINKE, B. ; LINDENBLATT, N. ; GIERER, P. ; MENDER, M. D. ; MITTLMEIER, T. ; VOLLMAR, B.: Supernatant of traumatized muscle induces inflammation and pain, but not microcirculatory perfusion failure and apoptotic cell death. In: *Shock* 24 (2005), Sep, Nr. 3, S. 219–225
- [Gradl et al. 2004] GRADL, G. ; GAIDA, S. ; GIERER, P. ; MITTLMEIER, T. ; VOLLMAR, B.: In vivo evidence for apoptosis, but not inflammation in the hindlimb muscle of neuropathic rats. In: *Pain* 112 (2004), Nov, Nr. 1-2, S. 121–130
- [Gradl et al. 2003] GRADL, G. ; STEINBORN, M. ; WIZGALL, I. ; MITTLMEIER, T. ; SCHÜRMANN, M.: Acute CRPS I (morbus sudeck) following distal radial fractures—methods for early diagnosis. In: *Zentralbl Chir* 128 (2003), Dec, Nr. 12, S. 1020–1026
- [Guilbaud et al. 1989] GUILBAUD, G. ; BENOIST, J. M. ; ESCHALIER, A. ; KAYSER, V. ; GAUTRON, M. ; ATTAL, N.: Evidence for central phenomena participating in the changes of responses

- 
- of ventrobasal thalamic neurons in arthritic rats. In: *Brain Res* 484 (1989), Apr, Nr. 1-2, S. 383–388
- [Guo et al. 2004] GUO, T.-Z. ; OFFLEY, S. C. ; BOYD, E. A. ; JACOBS, C. R. ; KINGERY, W. S.: Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. In: *Pain* 108 (2004), Mar, Nr. 1-2, S. 95–107
- [Hamblin et al. 1992] HAMBLIN, A. ; TAYLOR, M. ; BERNHAGEN, J. ; SHAKOOR, Z. ; MAYALL, S. ; NOBLE, G. ; MCCARTHY, D.: A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins. In: *J Immunol Methods* 146 (1992), Feb, Nr. 2, S. 219–228
- [Harden et al. 2010] HARDEN, R. N. ; BRUEHL, S. ; PEREZ, R. S. G. M. ; BIRKLEIN, F. ; MARINUS, J. ; MAIHOFNER, C. ; LUBENOW, T. ; BUVANENDRAN, A. ; MACKEY, S. ; GRACIOSA, J. ; MOGILEVSKI, M. ; RAMSDEN, C. ; CHONT, M. ; VATINE, J.-J.: Validation of proposed diagnostic criteria (the "Budapest Criteria") for Complex Regional Pain Syndrome. In: *Pain* 150 (2010), Aug, Nr. 2, S. 268–274
- [Harden et al. 2007] HARDEN, R. N. ; BRUEHL, S. ; STANTON-HICKS, M. ; WILSON, P. R.: Proposed new diagnostic criteria for complex regional pain syndrome. In: *Pain Med* 8 (2007), Nr. 4, S. 326–331
- [Hargreaves et al. 1987] HARGREAVES, K. M. ; TROULLOS, E. S. ; DIONNE, R. A.: Pharmacologic rationale for the treatment of acute pain. In: *Dent Clin North Am* 31 (1987), Oct, Nr. 4, S. 675–694
- [Heerschap et al. 1993] HEERSCHAP, A. ; DEN HOLLANDER, J. A. ; REYNEN, H. ; GORIS, R. J.: Metabolic changes in reflex sympathetic dystrophy: a <sup>31</sup>P NMR spectroscopy study. In: *Muscle Nerve* 16 (1993), Apr, Nr. 4, S. 367–373
- [Herbert & Holzer 2002] HERBERT, M. K. ; HOLZER, P.: Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology. In: *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 37 (2002), Jun, Nr. 6, S. 314–325

- 
- [Herlyn et al. 2010] HERLYN, P. ; MÜLLER-HILKE, B. ; WENDT, M. ; HECKER, M. ; MITTLMEIER, T. ; GRADL, G.: Frequencies of polymorphisms in cytokines, neurotransmitters and adrenergic receptors in patients with complex regional pain syndrome type I after distal radial fracture. In: *Clin J Pain* 26 (2010), Nr. 3, S. 175–181
- [Hoetzel et al. 2006] HOETZEL, A. ; LEITZ, D. ; SCHMIDT, R. ; TRITSCHLER, E. ; BAUER, I. ; LOOP, T. ; HUMAR, M. ; GEIGER, K. K. ; PANNEN, B. H. J.: Mechanism of hepatic heme oxygenase-1 induction by isoflurane. In: *Anesthesiology* 104 (2006), Jan, Nr. 1, S. 101–109
- [Horobin & Rashid 1990] HOROBIN, R. W. ; RASHID, F.: Interactions of molecular probes with living cells and tissues. Part 1. Some general mechanistic proposals, making use of a simplistic Chinese box model. In: *Histochemistry* 94 (1990), Nr. 2, S. 205–209
- [Jasmin et al. 1998] JASMIN, L. ; KOHAN, L. ; FRANSSEN, M. ; JANNI, G. ; GOFF, J. R.: The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. In: *Pain* 75 (1998), Apr, Nr. 2-3, S. 367–382
- [Ji & Woolf 2001] JI, R. R. ; WOOLF, C. J.: Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. In: *Neurobiol Dis* 8 (2001), Feb, Nr. 1, S. 1–10
- [Jänig 1991] JÄNIG, W.: Experimental approach to reflex sympathetic dystrophy and related syndromes. In: *Pain* 46 (1991), Sep, Nr. 3, S. 241–245
- [Kim & Chung 1992] KIM, S. H. ; CHUNG, J. M.: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. In: *Pain* 50 (1992), Sep, Nr. 3, S. 355–363
- [Kingery et al. 1999] KINGERY, W. S. ; CASTELLOTE, J. M. ; MAZE, M.: Methylprednisolone prevents the development of autotomy and neuropathic edema in rats, but has no effect on nociceptive thresholds. In: *Pain* 80 (1999), Apr, Nr. 3, S. 555–566
- [Kirkpatrick et al. 1998] KIRKPATRICK, U. J. ; ADAMS, R. A. ; LARDI, A. ; MCCOLLUM, C. N.: Rheological properties and function of blood cells in stored bank blood and salvaged blood. In: *Br J Haematol* 101 (1998), May, Nr. 2, S. 364–368

- 
- [Klitzman & Duling 1979] KLITZMAN, B. ; DULING, B. R.: Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. In: *Am J Physiol* 237 (1979), Oct, Nr. 4, S. H481–H490
- [Lacerda et al. 2015] LACERDA, D. R. ; SERAKIDES, R. ; DE MELO OCARINO, N. ; FERREIRA, A. V. M. ; MORAES, M. M. ; BOELONI, J. N. ; SILVA, J. F. ; DE OLIVEIRA, M. C. ; DE BARCELLOS, L. A. M. ; RODRIGUES, L. O. C. ; SOARES, D. D.: Osteopetrosis in obese female rats is site-specifically inhibited by physical training. In: *Exp Physiol* 100 (2015), Jan, Nr. 1, S. 44–56
- [Lau & Chung 2004] LAU, F. H. ; CHUNG, K. C.: Silas Weir Mitchell, MD: the physician who discovered causalgia. In: *J Hand Surg Am* 29 (2004), Mar, Nr. 2, S. 181–187
- [Lee et al. 2002] LEE, B. H. ; SCHARFF, L. ; SETHNA, N. F. ; MCCARTHY, C. F. ; SCOTT-SUTHERLAND, J. ; SHEA, A. M. ; SULLIVAN, P. ; MEIER, P. ; ZURAKOWSKI, D. ; MASEK, B. J. ; BERDE, C. B.: Physical therapy and cognitive-behavioral treatment for complex regional pain syndromes. In: *J Pediatr* 141 (2002), Jul, Nr. 1, S. 135–140
- [Lee et al. 2005] LEE, H. ; NATSUI, H. ; AKIMOTO, T. ; YANAGI, K. ; OHSHIMA, N. ; KONO, I.: Effects of cryotherapy after contusion using real-time intravital microscopy. In: *Med Sci Sports Exerc* 37 (2005), Jul, Nr. 7, S. 1093–1098
- [Lee et al. 2009] LEE, J. W. ; SIEGEL, S. M. ; OAKLANDER, A. L.: Effects of distal nerve injuries on dorsal-horn neurons and glia: relationships between lesion size and mechanical hyperalgesia. In: *Neuroscience* 158 (2009), Jan, Nr. 2, S. 904–914
- [Li et al. 2010] LI, Z. ; SMITH, B. P. ; TUOHY, C. ; SMITH, T. L. ; ANDREW KOMAN, L.: Complex regional pain syndrome after hand surgery. In: *Hand Clin* 26 (2010), May, Nr. 2, S. 281–289
- [Lindenblatt et al. 2005] LINDENBLATT, N. ; MENDER, M. D. ; KLAR, E. ; VOLLMAR, B.: Sustained hypothermia accelerates microvascular thrombus formation in mice. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289 (2005), Dec, Nr. 6, S. H2680–H2687
- [Luo et al. 2013] LUO, Y. ; DENG, Z.-S. ; YAO, G.-H.: Clinical research of modified taohe chengqi granule combined mannitol for treating complicated edema in affected limbs of patients after

- 
- tibiofibulas double fracture operation. In: *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 33 (2013), Jan, Nr. 1, S. 56–59
- [Maihöfner & Birklein 2007] MAIHÖFNER, C. ; BIRKLEIN, F.: Complex regional pain syndromes: new aspects on pathophysiology and therapy. In: *Fortschr Neurol Psychiatr* 75 (2007), Jun, Nr. 6, S. 331–342
- [Maihöfner et al. 2005] MAIHÖFNER, C. ; HANDWERKER, H. O. ; NEUNDÖRFER, B. ; BIRKLEIN, F.: Mechanical hyperalgesia in complex regional pain syndrome: a role for TNF-alpha? In: *Neurology* 65 (2005), Jul, Nr. 2, S. 311–313
- [McLatchie et al. 1998] MCLATCHIE, L. M. ; FRASER, N. J. ; MAIN, M. J. ; WISE, A. ; BROWN, J. ; THOMPSON, N. ; SOLARI, R. ; LEE, M. G. ; FOORD, S. M.: RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. In: *Nature* 393 (1998), May, Nr. 6683, S. 333–339
- [Meert et al. 2003] MEERT, T. F. ; VISSERS, K. ; GEENEN, F. ; KONTINEN, V. K.: Functional role of exogenous administration of substance P in chronic constriction injury model of neuropathic pain in gerbils. In: *Pharmacol Biochem Behav* 76 (2003), Aug, Nr. 1, S. 17–25
- [Mitchell 1864] MITCHELL, S. W.: *Civil War Papers*. [http://www.collegeofphysicians.org/FIND\\_AID/hist/histswm1.htm#correspondence](http://www.collegeofphysicians.org/FIND_AID/hist/histswm1.htm#correspondence). Version: 1864
- [Moseley & Wiech 2009] MOSELEY, G L. ; WIECH, Katja: The effect of tactile discrimination training is enhanced when patients watch the reflected image of their unaffected limb during training. In: *Pain* 144 (2009), Aug, Nr. 3, S. 314–319. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2009.04.030>. – DOI 10.1016/j.pain.2009.04.030
- [Munzlani et al. 1996] MUNGLANI, R. ; HARRISON, S. M. ; SMITH, G. D. ; BOUNTRA, C. ; BIRCH, P. J. ; ELLIOT, P. J. ; HUNT, S. P.: Neuropeptide changes persist in spinal cord despite resolving hyperalgesia in a rat model of mononeuropathy. In: *Brain Res* 743 (1996), Dec, Nr. 1-2, S. 102–108
- [Munts et al. 2008] MUNTS, A. G. ; ZIJLSTRA, F. J. ; NIBBERING, P. H. ; DAHA, M. R. ; MARINUS, J. ; DAHAN, A. ; VAN HILTEN, J. J.: Analysis of cerebrospinal fluid inflammatory mediators in



- 
- chronic complex regional pain syndrome related dystonia. In: *Clin J Pain* 24 (2008), Jan, Nr. 1, S. 30–34
- [Nash et al. 1988] NASH, G. B. ; JONES, J. G. ; MIKITA, J. ; CHRISTOPHER, B. ; DORMANDY, J. A.: Effects of preparative procedures and of cell activation on flow of white cells through micropore filters. In: *Br J Haematol* 70 (1988), Oct, Nr. 2, S. 171–176
- [Negri et al. 2006] NEGRI, G. ; GRASSI, S. ; ZAPPIA, M. ; CAPPABIANCA, S. ; RAMBALDI, P.F. ; MANSI, L.: A new hypothesis for the bone marrow edema pathogenesis during transient osteoporosis. In: *J Orthopaed Traumatol* 7 (2006), Dec, Nr. 4, S. 176–181. – ISSN 1590–9999
- [Oaklander 2010] OAKLANDER, A. L.: Role of minimal distal nerve injury in complex regional pain syndrome-I. In: *Pain Med* 11 (2010), Aug, Nr. 8, S. 1251–1256
- [Otake et al. 1998] OTAKE, T. ; IESHIMA, H. ; ISHIDA, H. ; USHIGOME, Y. ; SAITO, S.: Bone atrophy in complex regional pain syndrome patients measured by microdensitometry. In: *Can J Anaesth* 45 (1998), Sep, Nr. 9, S. 831–838
- [Oyen et al. 1993] OYEN, W. J. ; ARNTZ, I. E. ; CLAESSENS, R. M. ; VAN DER MEER, J. W. ; CORSTENS, F. H. ; GORIS, R. J.: Reflex sympathetic dystrophy of the hand: an excessive inflammatory response? In: *Pain* 55 (1993), Nov, Nr. 2, S. 151–157
- [Pudupakkam et al. 1998] PUDUPAKKAM, S. ; HARRIS, K. A. ; JAMIESON, W. G. ; DEROSE, G. ; SCOTT, J. A. ; CARSON, M. W. ; SCHLAG, M. G. ; KVIETYS, P. R. ; POTTER, R. F.: Ischemic tolerance in skeletal muscle: role of nitric oxide. In: *Am J Physiol* 275 (1998), Jul, Nr. 1 Pt 2, S. H94–H99
- [Ribbers et al. 1998] RIBBERS, G. M. ; OOSTERHUIS, W. P. ; VAN LIMBEEK, J. ; DE METZ, M.: Reflex sympathetic dystrophy: is the immune system involved? In: *Arch Phys Med Rehabil* 79 (1998), Dec, Nr. 12, S. 1549–1552
- [Sabsovich et al. 2008] SABSOVICH, I. ; GUO, T.-Z. ; WEI, T. ; ZHAO, R. ; LI, X. ; CLARK, D. J. ; GEIS, C. ; SOMMER, C. ; KINGERY, W. S.: TNF signaling contributes to the development of nociceptive sensitization in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I. In: *Pain* 137 (2008), Jul, Nr. 3, S. 507–519

- 
- [Sandroni et al. 2003] SANDRONI, P. ; BENRUD-LARSON, L. M. ; MCCLELLAND, R. L. ; LOW, P. A.: Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study. In: *Pain* 103 (2003), May, Nr. 1-2, S. 199–207
- [Schaser et al. 2005] SCHASER, K.-D. ; BAIL, H. J. ; SCHEWIOR, L. ; STOVER, J. F. ; MELCHER, I. ; HAAS, N. P. ; MITTLMEIER, T.: Acute effects of N-acetylcysteine on skeletal muscle microcirculation following closed soft tissue trauma in rats. In: *J Orthop Res* 23 (2005), Jan, Nr. 1, S. 231–241
- [Schaser et al. 1999] SCHASER, K. D. ; VOLLMAR, B. ; MENDER, M. D. ; SCHEWIOR, L. ; KROP-PENSTEDT, S. N. ; RASCHKE, M. ; LÜBBE, A. S. ; HAAS, N. P. ; MITTLMEIER, T.: In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury. In: *J Orthop Res* 17 (1999), Sep, Nr. 5, S. 678–685
- [Schinkel et al. 2006] SCHINKEL, C. ; GAERTNER, A. ; ZASPEL, J. ; ZEDLER, S. ; FAIST, E. ; SCHUERMANN, M.: Inflammatory mediators are altered in the acute phase of posttraumatic complex regional pain syndrome. In: *Clin J Pain* 22 (2006), Nr. 3, S. 235–239
- [Schott 2001] SCHOTT, G. D.: Reflex sympathetic dystrophy. In: *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71 (2001), Sep, Nr. 3, S. 291–295
- [Scola 2006] SCOLA, E.: Diagnostik und Therapie der Algodystrophie. In: *Trauma Berufskrankh* 8 (2006), Aug, Nr. S02, S. S225–S228. – ISSN 1436–6282
- [Shir & Seltzer 1990] SHIR, Y. ; SELTZER, Z.: A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. In: *Neurosci Lett* 115 (1990), Jul, Nr. 1, S. 62–67
- [Simone & Kajander 1996] SIMONE, D. A. ; KAJANDER, K. C.: Excitation of rat cutaneous nociceptors by noxious cold. In: *Neurosci Lett* 213 (1996), Jul, Nr. 1, S. 53–56
- [Sindrup & Jensen 1999] SINDRUP, S. H. ; JENSEN, T. S.: Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. In: *Pain* 83 (1999), Dec, Nr. 3, S. 389–400

- 
- [Springer 1994] SPRINGER, T. A.: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. In: *Cell* 76 (1994), Jan, Nr. 2, S. 301–314
- [Stanton-Hicks et al. 1995] STANTON-HICKS, M. ; JÄNIG, W. ; HASSENBUSCH, S. ; HADDOX, J. D. ; BOAS, R. ; WILSON, P.: Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. In: *Pain* 63 (1995), Oct, Nr. 1, S. 127–133
- [Steinbauer et al. 1998] STEINBAUER, M. ; HARRIS, A. G. ; LEIDERER, R. ; ABELS, C. ; MESSMER, K.: Impact of dextran on microvascular disturbances and tissue injury following ischemia/reperfusion in striated muscle. In: *Shock* 9 (1998), May, Nr. 5, S. 345–351
- [Steinbauer et al. 1997] STEINBAUER, M. ; HARRIS, A. G. ; MESSMER, K.: Effects of dextran on microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle. In: *Am J Physiol* 272 (1997), Apr, Nr. 4 Pt 2, S. H1710–H1716
- [Stratos et al. 2012] STRATOS, I. ; LI, Z. ; ROTTER, R. ; HERLYN, P. ; MITTLMEIER, T. ; VOLLMAR, B.: Inhibition of caspase mediated apoptosis restores muscle function after crush injury in rat skeletal muscle. In: *Apoptosis* 17 (2012), Mar, Nr. 3, S. 269–277
- [Sudeck 1900] SUDECK, P.: On acute inflammatory bone atrophy. In: *Archiv für klinische Chirurgie* 62 (1900), S. 147–156
- [Sullivan & Johnson 1981] SULLIVAN, S. M. ; JOHNSON, P. C.: Effect of oxygen on blood flow autoregulation in cat sartorius muscle. In: *Am J Physiol* 241 (1981), Dec, Nr. 6, S. H807–H815
- [Tews & Goebel 1997] TEWS, D. S. ; GOEBEL, H. H.: DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in muscular dystrophies. In: *Neuropathol Appl Neurobiol* 23 (1997), Aug, Nr. 4, S. 331–338
- [Thomson McBride et al. 2008] THOMSON MCBRIDE, A. R. ; BARNETT, A. J. ; LIVINGSTONE, J. A. ; ATKINS, R. M.: Complex regional pain syndrome (type 1): a comparison of 2 diagnostic criteria methods. In: *Clin J Pain* 24 (2008), Sep, Nr. 7, S. 637–640
- [Torebjörk et al. 1995] TOREBJÖRK, E. ; WAHREN, L. ; WALLIN, G. ; HALLIN, R. ; KOLTZENBURG, M.: Noradrenaline-evoked pain in neuralgia. In: *Pain* 63 (1995), Oct, Nr. 1, S. 11–20

- 
- [Tyml & Budreau 1991] TYML, K. ; BUDREAU, C. H.: A new preparation of rat extensor digitorum longus muscle for intravital investigation of the microcirculation. In: *Int J Microcirc Clin Exp* 10 (1991), Nov, Nr. 4, S. 335–343
- [Tyml & Groom 1980] TYML, K. ; GROOM, A. C.: Regulation of blood flow in individual capillaries of resting skeletal muscle in frogs. In: *Microvasc Res* 20 (1980), Nov, Nr. 3, S. 346–357
- [Tyml et al. 1999] TYML, K. ; MATHIEU-COSTELLO, O. ; CHENG, L. ; NOBLE, E. G.: Differential microvascular response to disuse in rat hindlimb skeletal muscles. In: *J Appl Physiol* (1985) 87 (1999), Oct, Nr. 4, S. 1496–1505
- [van de Beek et al. 2001] VAN DE BEEK, W. J. ; REMARQUE, E. J. ; WESTENDORP, R. G. ; VAN HILTEN, J. J.: Innate cytokine profile in patients with complex regional pain syndrome is normal. In: *Pain* 91 (2001), Apr, Nr. 3, S. 259–261
- [van der Laan et al. 1998] VAN DER LAAN, L. ; KAPITEIN, P. ; VERHOFSTAD, A. ; HENDRIKS, T. ; GORIS, R. J.: Clinical signs and symptoms of acute reflex sympathetic dystrophy in one hindlimb of the rat, induced by infusion of a free-radical donor. In: *Acta Orthop Belg* 64 (1998), Jun, Nr. 2, S. 210–217
- [van Rijn et al. 2011] VAN RIJN, M. A. ; MARINUS, J. ; PUTTER, H. ; BOSSELAAR, S. R. J. ; MOSELEY, G. L. ; VAN HILTEN, J. J.: Spreading of complex regional pain syndrome: not a random process. In: *J Neural Transm* 118 (2011), Sep, Nr. 9, S. 1301–1309
- [Veldman et al. 1993] VELDMAN, P. H. ; REYNEN, H. M. ; ARNTZ, I. E. ; GORIS, R. J.: Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: prospective study of 829 patients. In: *Lancet* 342 (1993), Oct, Nr. 8878, S. 1012–1016
- [Vincent et al. 2001] VINCENT, M. A. ; RATTIGAN, S. ; CLARK, M. G.: Size-dependent effects of microspheres on vasoconstrictor-mediated change in oxygen uptake by perfused rat hindlimb. In: *Microvasc Res* 62 (2001), Nov, Nr. 3, S. 306–314
- [Vollmar et al. 1997] VOLLMAR, B. ; BURKHARDT, M. ; MINOR, T. ; KLAUKE, H. ; MENDER, M. D.: High-resolution microscopic determination of hepatic NADH fluorescence for in vivo

- 
- monitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation. In: *Microvasc Res* 54 (1997), Sep, Nr. 2, S. 164–173
- [Vollmar et al. 1992] VOLLMAR, B. ; CONZEN, P. F. ; KERNER, T. ; HABAZETTL, H. ; VIERL, M. ; WALDNER, H. ; PETER, K.: Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. In: *Anesth Analg* 75 (1992), Sep, Nr. 3, S. 421–430
- [Wall et al. 1979] WALL, P. D. ; SCADDING, J. W. ; TOMKIEWICZ, M. M.: The production and prevention of experimental anesthesia dolorosa. In: *Pain* 6 (1979), Apr, Nr. 2, S. 175–182
- [Wall & Woolf 1984] WALL, P. D. ; WOOLF, C. J.: Muscle but not cutaneous C-afferent input produces prolonged increases in the excitability of the flexion reflex in the rat. In: *J Physiol* 356 (1984), Nov, S. 443–458
- [Wallace et al. 2000] WALLACE, M. S. ; RIDGEWAY, B. M. ; LEUNG, A. Y. ; GERAYLI, A. ; YAKSH, T. L.: Concentration-effect relationship of intravenous lidocaine on the allodynia of complex regional pain syndrome types I and II. In: *Anesthesiology* 92 (2000), Jan, Nr. 1, S. 75–83
- [Wang et al. 2005] WANG, H. ; KOHNO, T. ; AMAYA, F. ; BRENNER, G. J. ; ITO, N. ; ALLCHORNE, A. ; JI, R.-R. ; WOOLF, C. J.: Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. In: *J Neurosci* 25 (2005), Aug, Nr. 35, S. 7986–7992
- [Wang 2012] WANG, Z.: The role of minimal nerve injury in a new animal model for CRPS. In: *Universitätsbibliothek Rostock, Inauguraldissertation* 1 (2012), S. 20
- [Wasner et al. 1999] WASNER, G. ; HECKMANN, K. ; MAIER, C. ; BARON, R.: Vascular abnormalities in acute reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): complete inhibition of sympathetic nerve activity with recovery. In: *Arch Neurol* 56 (1999), May, Nr. 5, S. 613–620
- [Wasner et al. 2003] WASNER, G. ; SCHATTSCHNEIDER, J. ; BINDER, A. ; BARON, R.: Complex regional pain syndrome—diagnostic, mechanisms, CNS involvement and therapy. In: *Spinal Cord* 41 (2003), Feb, Nr. 2, S. 61–75

- 
- [Wasner et al. 2001] WASNER, G. ; SCHATTSCHEIDER, J. ; HECKMANN, K. ; MAIER, C. ; BARON, R.: Vascular abnormalities in reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): mechanisms and diagnostic value. In: *Brain* 124 (2001), Mar, Nr. Pt 3, S. 587–599
- [Whiteside et al. 2006] WHITESIDE, Garth T. ; BOULET, Jamie M. ; SELLERS, Rani ; BUNTON, Tracie E. ; WALKER, Katharine: Neuropathy-induced osteopenia in rats is not due to a reduction in weight born on the affected limb. In: *Bone* 38 (2006), Mar, Nr. 3, S. 387–393
- [Yonehara 2001] YONEHARA, N.: Influence of serotonin receptor antagonists on substance P and serotonin release evoked by tooth pulp stimulation with electro-acupuncture in the trigeminal nucleus caudalis of the rabbit. In: *Neurosci Res* 40 (2001), May, Nr. 1, S. 45–51
- [Yonehara & Yoshimura 2001] YONEHARA, N. ; YOSHIMURA, M.: Influence of painful chronic neuropathy on neurogenic inflammation. In: *Pain* 92 (2001), May, Nr. 1-2, S. 259–265
- [Young 1980] YOUNG, W.: H<sub>2</sub> clearance measurement of blood flow: a review of technique and polarographic principles. In: *Stroke* 11 (1980), Nr. 5, S. 552–564
- [Zhang et al. 2003] ZHANG, L. ; BAIL, H. ; MITTLMEIER, T. ; HAAS, N. P. ; SCHASER, K.-D.: Immediate microcirculatory derangements in skeletal muscle and periosteum after closed tibial fracture. In: *J Trauma* 54 (2003), May, Nr. 5, S. 979–985
- [Zollinger et al. 2007] ZOLLINGER, P. E. ; TUINBREIJER, W. E. ; BREEDERVELD, R. S. ; KREIS, R. W.: Can vitamin C prevent complex regional pain syndrome in patients with wrist fractures? A randomized, controlled, multicenter dose-response study. In: *J Bone Joint Surg Am* 89 (2007), Jul, Nr. 7, S. 1424–1431

## 7 Anhang

### 7.1 Diagramme der CCI- und INI-Gruppen (2 und 7 Tage Beobachtung)

#### 7.1.1 Spontanschmerzverhalten und Wärme-/Kälteallodynie

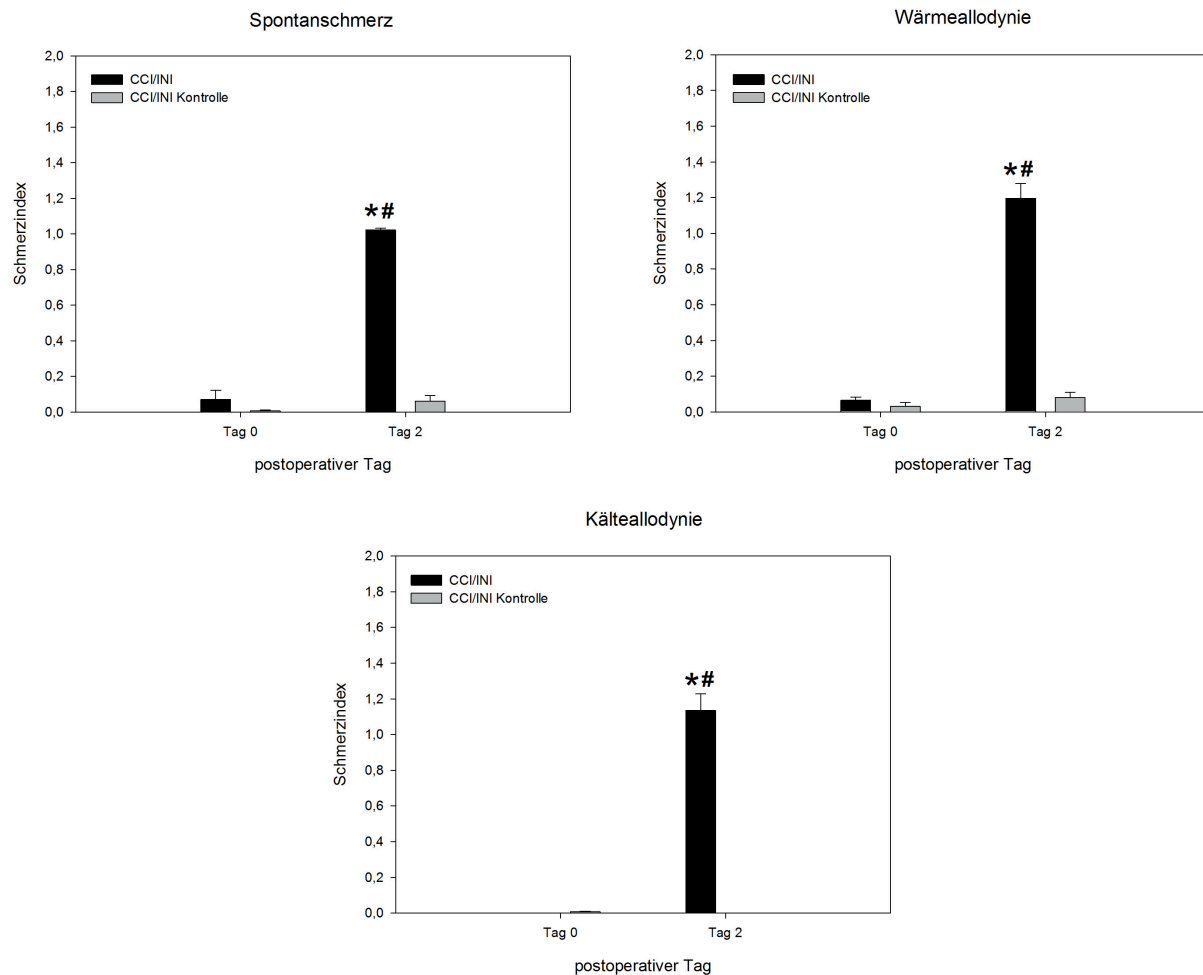


Abbildung 42: Spontanschmerzverhalten und Wärme- bzw. Kälteallodynie (CCI/INI 2 Tage Beobachtung). \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.



## 7.1 Diagramme der CCI- und INI-Gruppen (2 und 7 Tage Beobachtung)

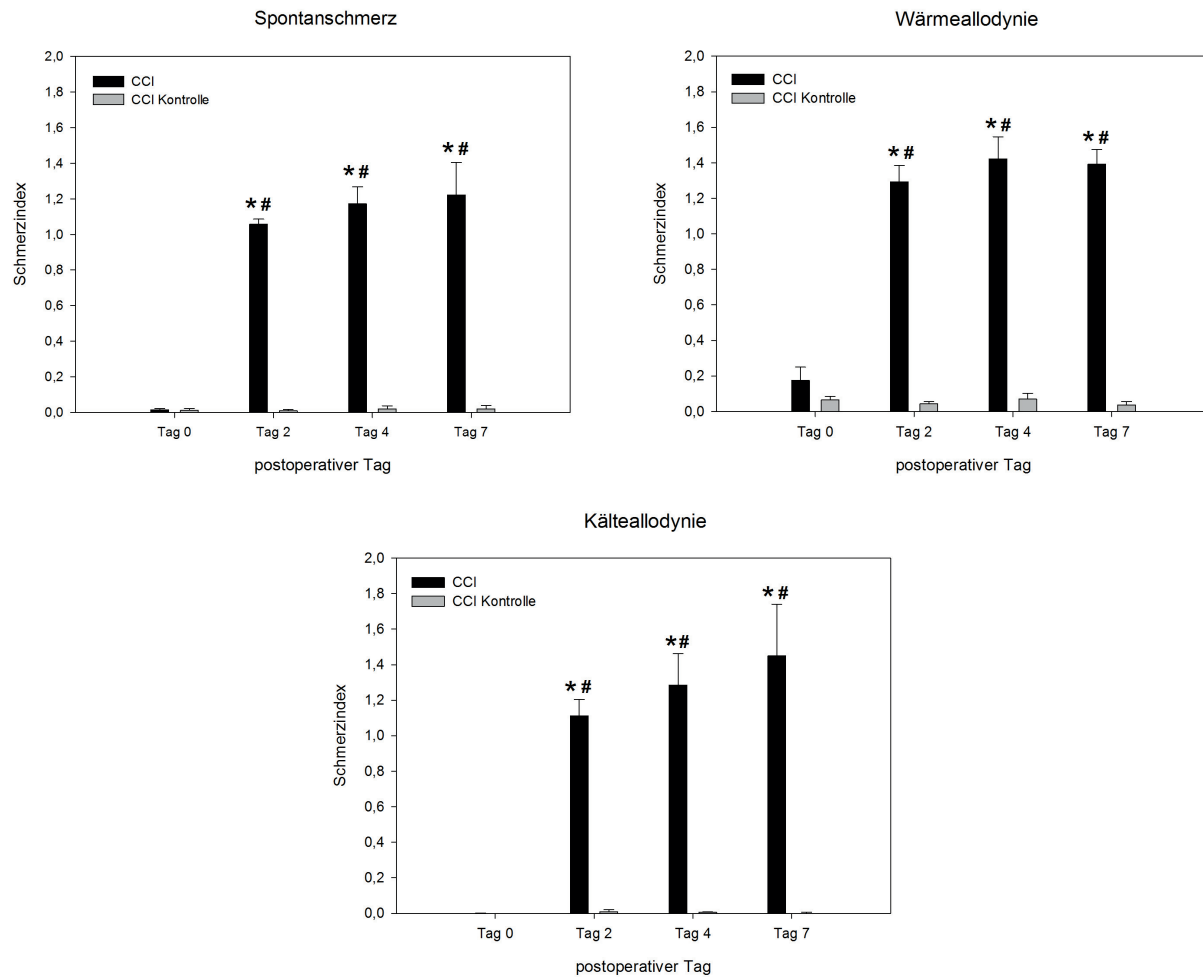


Abbildung 43: Spontanschmerzverhalten und Wärme- bzw. Kälteallodynie (CCI 7 Tage Beobachtung). \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

## 7.1 Diagramme der CCI- und INI-Gruppen (2 und 7 Tage Beobachtung)

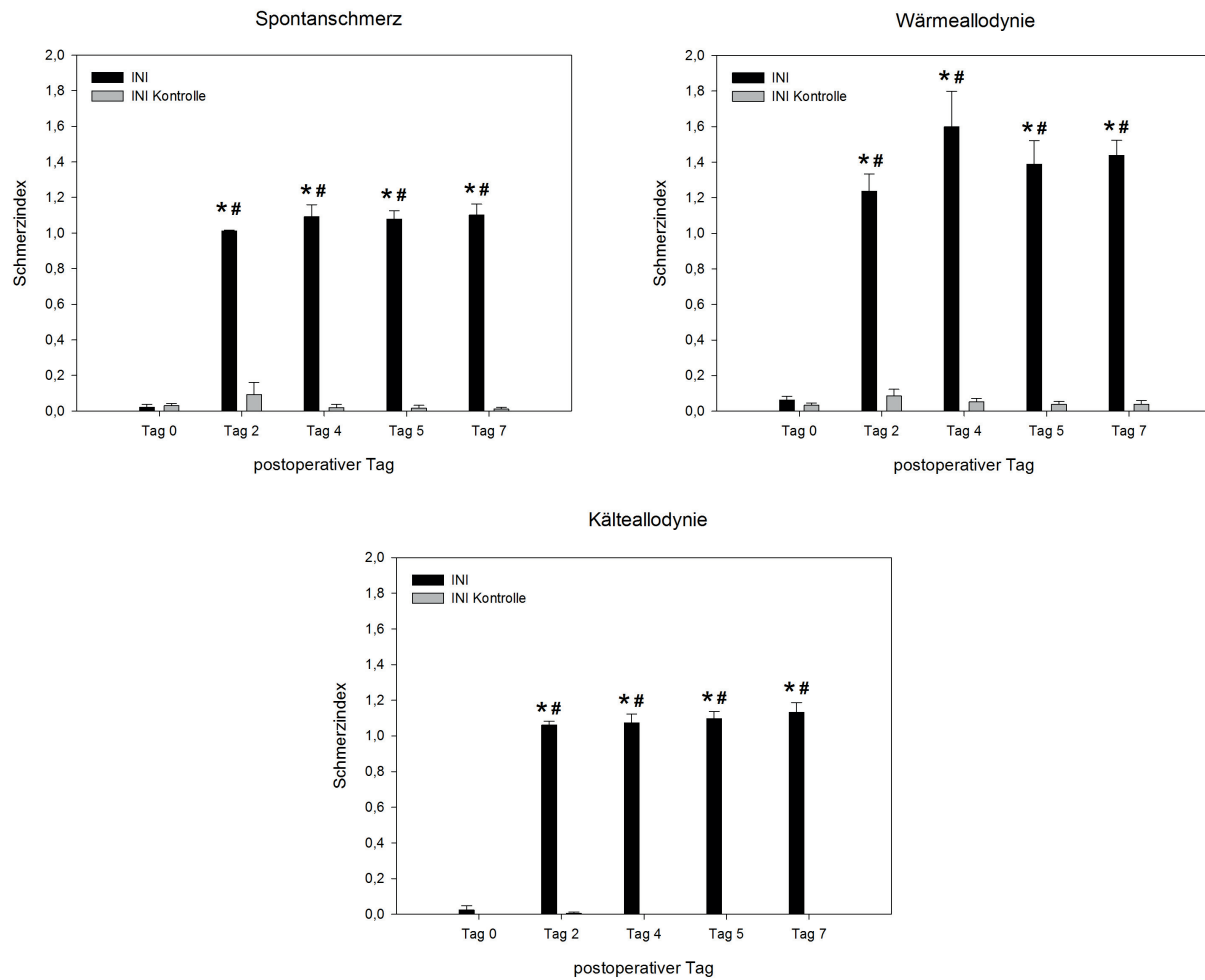


Abbildung 44: Spontanschmerzverhalten und Wärme- bzw. Kälteallodynie (INI 7 Tage Beobachtung). \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

### 7.1.2 Mechanische Hyperalgesie

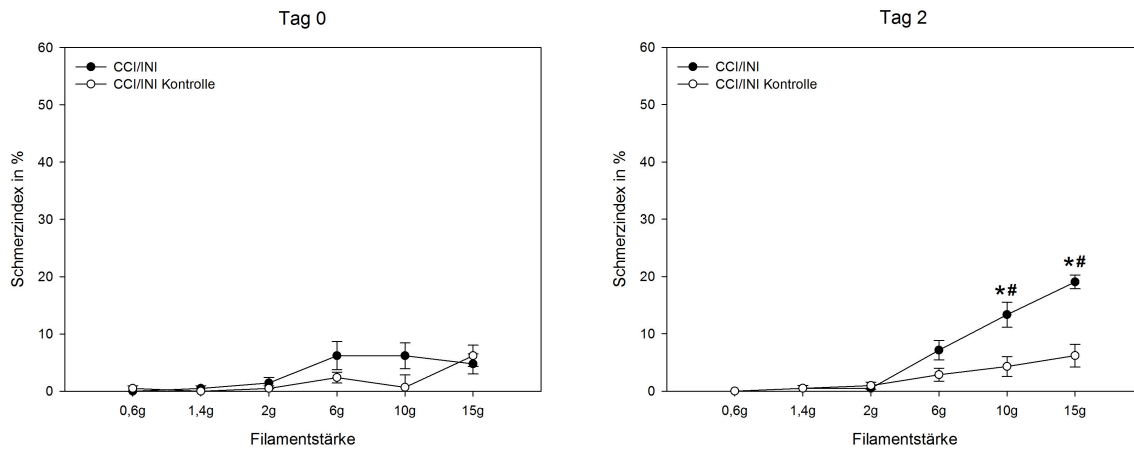


Abbildung 45: Mechanische Hyperalgesietestung (CCI/INI 2 Tage). \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

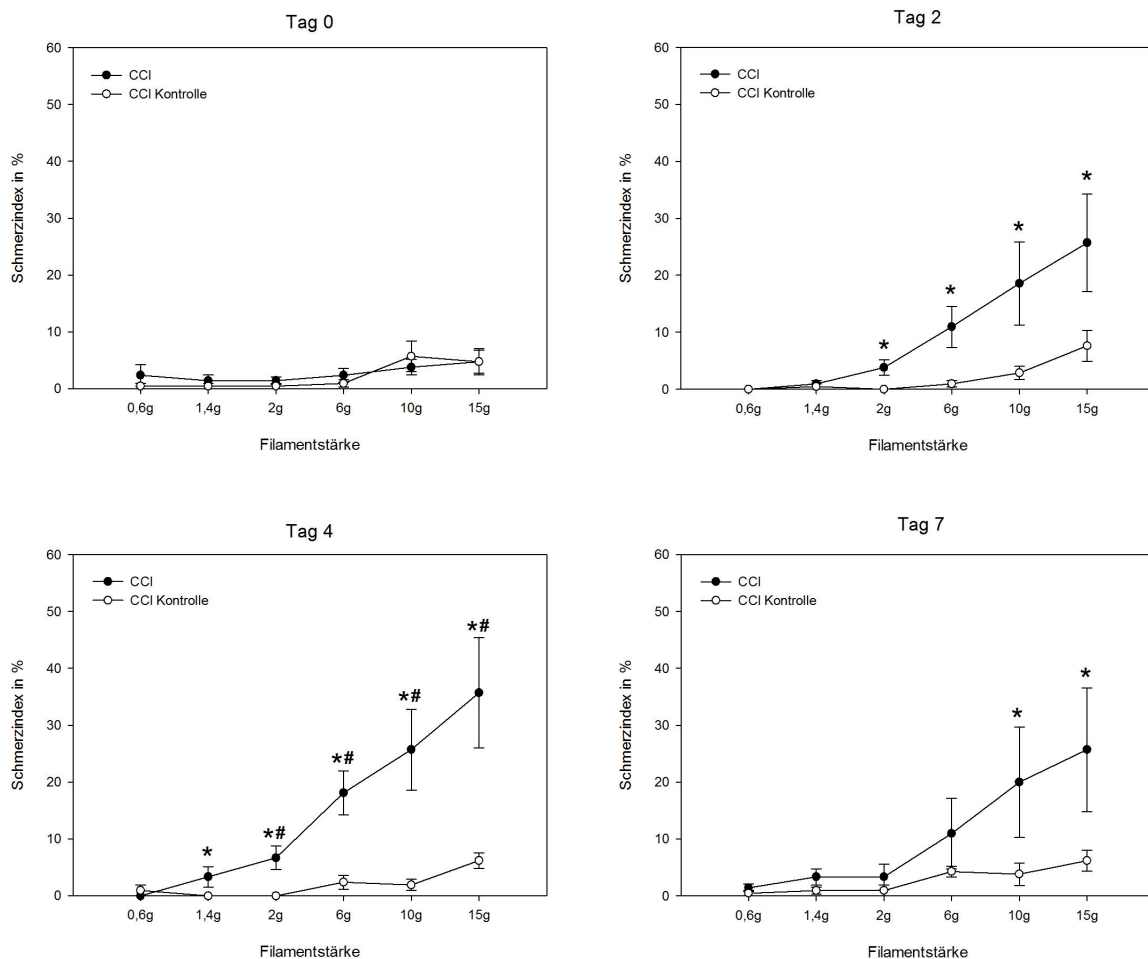


Abbildung 46: Mechanische Hyperalgesietestung (CCI 7 Tage). \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

## 7.1 Diagramme der CCI- und INI-Gruppen (2 und 7 Tage Beobachtung)

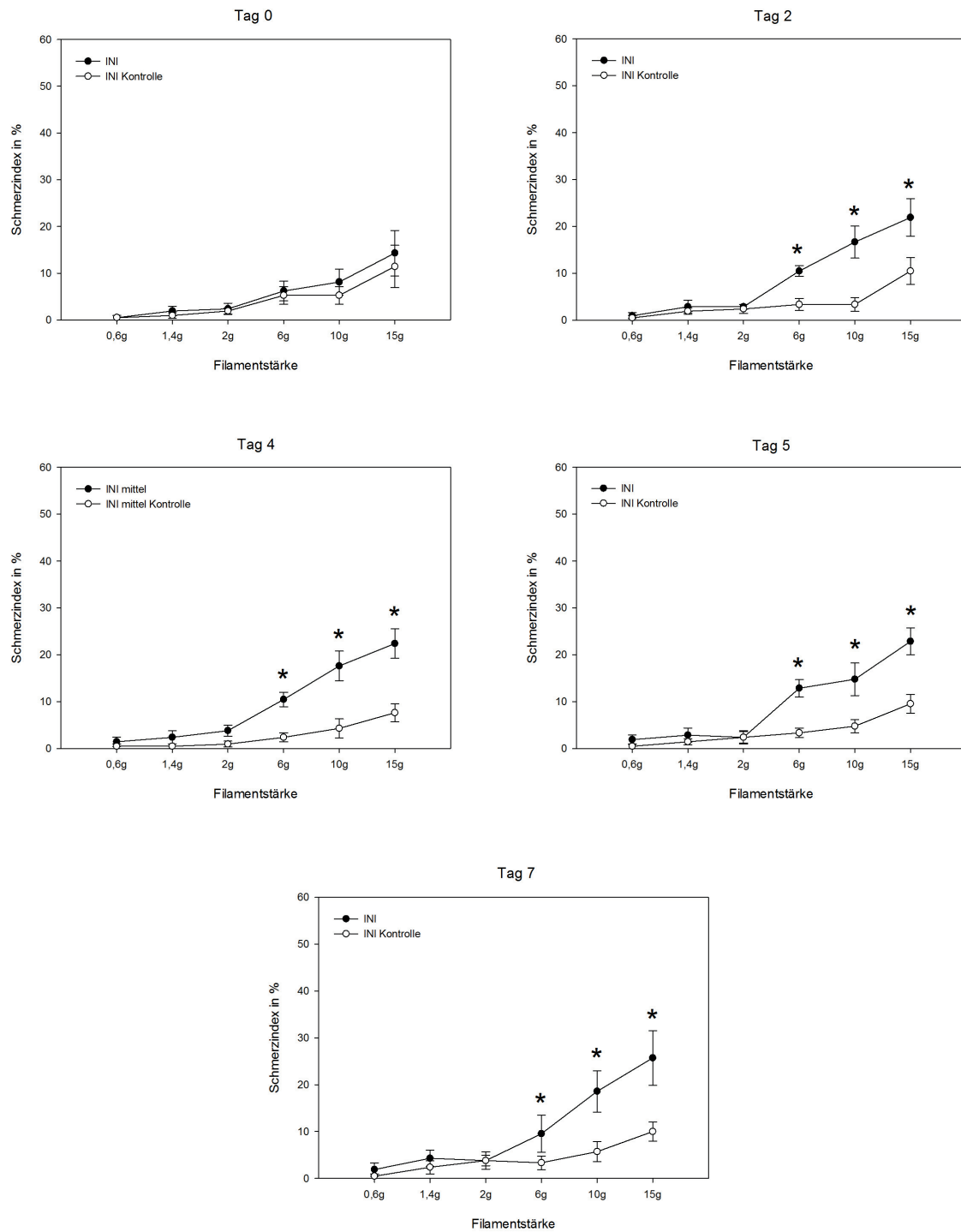


Abbildung 47: Mechanische Hyperalgesietestung (INI 7 Tage). \* vs. Kontrollgruppe, MW  $\pm$  SEM, n=7.

### 7.1.3 Pfotenvolumen

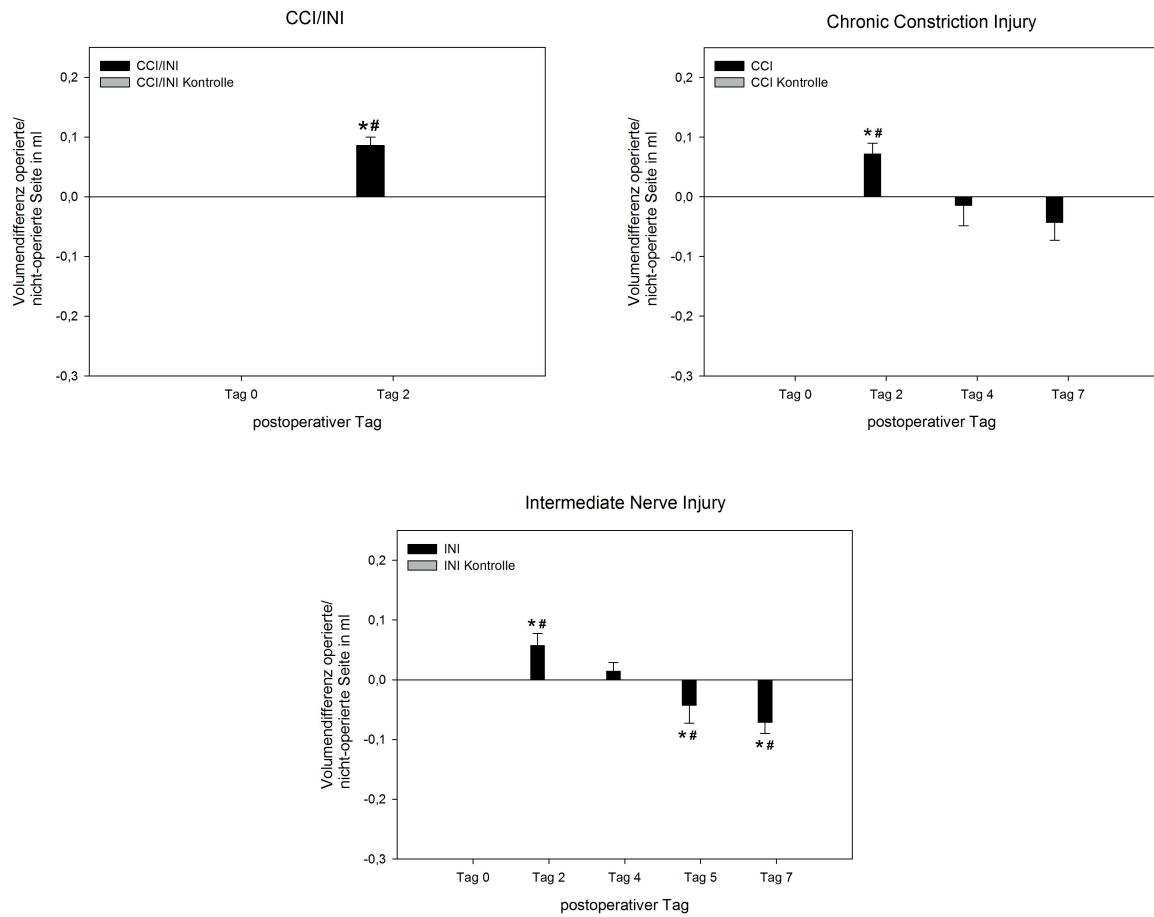


Abbildung 48: Pfotenvolumen (CCI/INI 2 Tage, CCI 7 Tage und INI 7 Tage). \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

### 7.1.4 Pfotemperatur

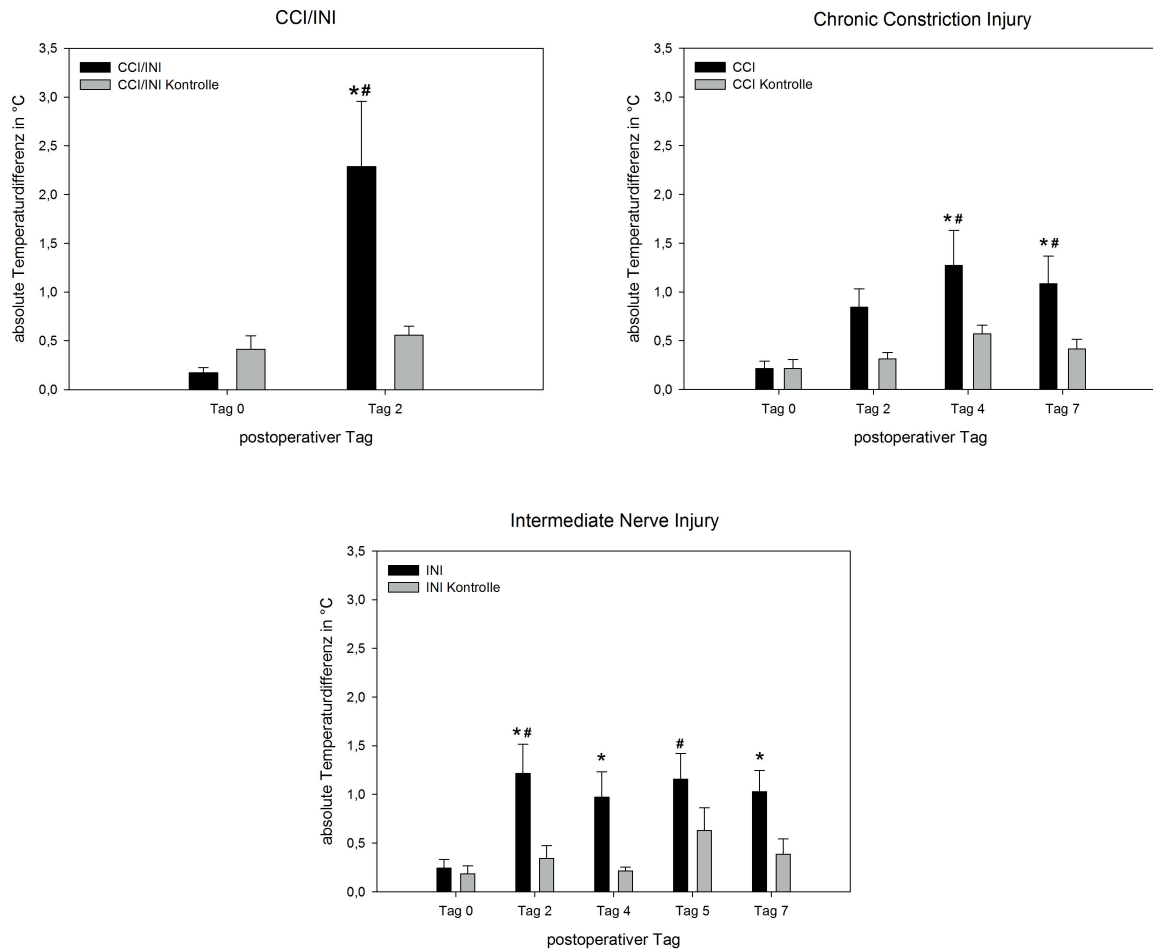


Abbildung 49: Pfotemperatur (INI 7 Tage). \* vs. Kontrollgruppe, # vs. Tag 0, MW  $\pm$  SEM, n=7.

### 7.1.5 Knochenanalyse

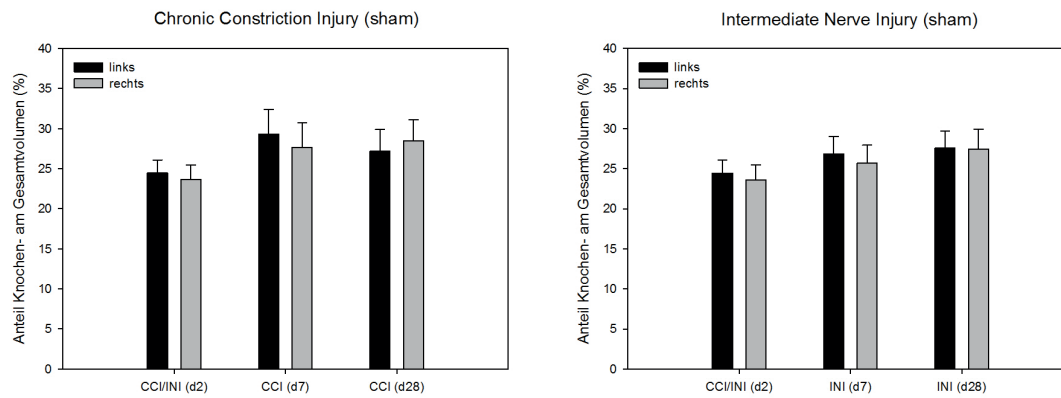


Abbildung 50: Anteil Knochen- am Gesamtvolumen der Sham-Gruppen, MW  $\pm$  SEM, n=7.



## 7.2 Lebenslauf

Name: Andy Schiebold

Geburtsdatum/-ort: 30.01.1987 in Borna bei Leipzig

### Ausbildung

Seit Januar 2016 Assistenzarzt in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie des Carl-von-Basedow-Klinikums Merseburg

Juli bis Dezember 2015 Assistenzarzt in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie der Asklepios Klinik Weißenfels

Dezember 2013 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Rostock

April bis Juli 2013 PJ-Tertial Innere Medizin im Hospital del Mar, Barcelona (Spanien)

Dezember 2012 bis März 2013 PJ-Tertial Chirurgie im Universitätsspital Zürich (Schweiz)

August bis Dezember 2012 PJ-Tertial Orthopädie im Park-Krankenhaus Leipzig

August 2011 Famulatur Orthopädie im Kantonsspital Luzern (Schweiz)

Juni bis Oktober 2011 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

August 2010 & Februar 2011 Famulatur Unfallchirurgie und Anästhesie in der Universitätsklinik Rostock

Februar 2010 Famulatur Unfallchirurgie in der Notfallambulanz der Helios-Klinik Borna

September 2009 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Rostock

Oktober 2006 Studienbeginn an der Universität Rostock

## 7.3 Kongressbeiträge

- Oktober 2015     Herlyn P\*, **Schiebold A**, Eschler A, Mittlmeier T, Vollmar B, Gradl G.  
Die Kombination von Weichteiltrauma und temporärer Nervenläsion führt im  
CRPS-Tiermodell zu einer lokalen Osteopenie. Deutscher Kongress für  
Orthopädie und Unfallchirurgie 2015, Berlin.
- Oktober 2013     Herlyn P\*, Wichelhaus A, Eschler A, Wang Z, **Schiebold A**, Mittlmeier T,  
Vollmar B, Gierer P. Die Kombination von Weichteiltrauma und Nervenläsion  
führt im Tiermodell nicht zu einem CRPS Vollbild. 54. Kongress der  
Deutschen Gesellschaft für Handchirurgie, Düsseldorf.
- Oktober 2012     **Schiebold A\***, Gradl G, Mittlmeier T, Vollmar B, Herlyn P. CRPS:  
Frühe Dekompressionsbehandlung in einem Rattenmodell. 16. Chirurgische  
Forschungstage, Regensburg.
- September 2012   **Schiebold A\***, Gradl G, Mittlmeier T, Vollmar B, Herlyn P.  
Early decompression treatment in a rat model of neuropathic pain.  
Osteosynthese International 2012, Rostock. Injury Volume 43: September  
2012

\*Vortragender

## 7.4 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich

- die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt,
- die verwendeten Daten und Ergebnisse anderer vollständig angegeben und korrekt zitiert,
- sowie eine weitere Mitwirkung Dritter offengelegt habe.

Andy Schiebold, Rostock im August 2016

## 7.5 Thesen

1. Ein geschlossenes Weichteiltrauma in Kombination mit einer Sham-Operation führt zwar kurzzeitig zu CRPS-ähnlichen Symptomen, wie Spontanschmerz, Kälte- und Wärmeallodynie, mechanische Hyperalgesie, Temperaturdifferenzen der Extremitäten und ein lokales Pfotenödem, aber zu keinem CRPS-Vollbild.
2. Tiere, die eine Kombination von einer Chronic Constriction Injury mit einem geschlossenen Weichteiltrauma erhielten, zeigten über mindestens 28 Tage Symptome, die für das CRPS typisch sind.
3. Eine Intermediate Nerve Injury in Kombination mit einem geschlossenen Weichteiltrauma führt genau wie die Chronic Constriction Injury zu CRPS-ähnlichen Symptomen, zeigt aber im Verlauf Heilungstendenzen und somit keinen chronischen Verlauf.
4. Beide Modelle, CCI wie INI, führen im M. soleus zur Muskelzellapoptose.
5. Die chronische Nervenligatur um den N. ischiadicus führt zur ausgesprochenen Knochendichteminderung und einer Umorganisation der kortikalen bzw. trabekulären Knochenstruktur.
6. Ähnliches gilt für das INI-Modell, wobei nach 4 Wochen Heilungstendenzen im Sinne einer erneuten Knochendichtezunahme zu sehen waren.
7. Die verwendeten Tiermodelle unterstreichen die These von Field et al. (1994), dass ein zu angelegter Cast zu neuropathischen Schmerzen führen kann.

---

## 8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. B. Vollmar, die uns als Institutsleiterin nicht nur die nötigen Räumlichkeiten und Materialien zur Verfügung stellte, sondern jederzeit ein offenes Ohr für angefallene Fragen hatte und unserer Arbeitsgruppe im Allgemeinen und mir im Speziellen immer mit Rat und Tat zur Seite stand, dies auch oft an Wochenenden, was nicht selbstverständlich ist. Weiterhin danke ich recht herzlich Herrn Prof. Dr. med. T. Mittlmeier und Herrn Prof. Dr. med. G. Gradl für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit sowohl in der Entwicklung des Themas als auch bei der Hilfe zur Anfertigung von Kongressbeiträgen. Vielen Dank, dass ich auf dem Kongress “Osteosynthese International 2012” einen Vortrag über meine Arbeit in Englisch halten konnte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe um Susanne Schwassmann, Franziska Timm, Zi Wang und vor allem Philipp Herlyn, die mir die nötigen Techniken beigebracht haben, mir halfen aufgetretene Probleme zu lösen und zu Freunden geworden sind, mit denen ich auch außerhalb des Labors eine wunderbare Zeit in Rostock verbracht habe.

Ich danke den medizinisch-technischen Assistentinnen des Instituts für Experimentelle Chirurgie Berit Blendow, Doris Butzlaff, Maren Nerowski und Dorothea Frenz, die mir immer freundlich halfen, wenn ich Fragen oder Probleme hatte. Insbesondere vielen Dank an Dorothea Frenz für das Anfertigen der histologischen Muskelschnitte und bei der Hilfe der Auswertung selbiger. Vielen Dank auch an die Tierpfleger des Instituts, stellvertretend seien hier Kathrin Sievert-Küchenmeister und Reinhard Schwärmer genannt, die mir den richtigen Umgang mit den Tieren beigebracht haben.

Danken möchte ich ebenfalls Anna Unger, Anja Audien und Nils Richter, die mir während unseres gemeinsamen Studiums sehr geholfen haben, zu engen Freunden geworden sind und meine Zeit in Rostock extrem angenehm gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester und ihrem Mann, die den Grundstein für meinen Werdegang gelegt und mich stetig unterstützt haben. Danke für euer Verständnis, denn nicht alle Entscheidungen meinerseits waren auf den ersten Blick nachvollziehbar.

---

## 9 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	Arteria
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCI	Chronic Constriction Injury
cm	Zentimeter
CRPS	Complex Regional Pain Syndrome
d	Tage
d.h.	das heißt
DEXA (DXA)	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
EDL	Musculus extensor digitorum longus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
g	Gramm
Gr.	Gruppe(n)

---

h	Stunden
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
INI	Intermediate Nerve Injury
inkl.	inklusive
IVFM	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
M.	Musculus
MAD	mittlerer arterieller Druck
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N.	Nervus
NaCl	Natrium-Chlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
ROI	Region of Interest



---

s	Sekunden
SCS	Spinal Cord Stimulation
SEM	Standard Error of the Mean
SIP	Sympathetically Independent Pain
SMP	Sympathetically Maintained Pain
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus
W	Watt

## Abbildungsverzeichnis

1	Testung des Spontanschmerzverhaltens und der Wärme-/Kälteallodynie . . . . .	18
2	Kategorien des Schmerzverhaltens nach Attal et al. (1990) . . . . .	18
3	Messung der Pfotentemperatur und des Pfotenvolumens . . . . .	20
4	Setzen des stumpfen, geschlossenen Weichteiltraumas . . . . .	21
5	Atraumatische Präparation des N. ischiadicus und Anlage der 4 losen Nervenligaturen	22
6	Messung der nervalen Latenzzeit . . . . .	24
7	Maschinell beatmetes und arteriell-katheterisiertes Versuchstier vor der Mikroskopie	25
8	Für die Mikroskopie präparierter M. soleus . . . . .	26
9	Zeiss Epifluoreszenzmikroskop . . . . .	27
10	NADH- und FKD-Messung . . . . .	28
11	Sammelvenole mit Leukozyten . . . . .	29
12	Auswertung mit dem Programm „CapImage“ . . . . .	29
13	Skyscan Micro-Computertomograph 1076 . . . . .	30
14	Gescannter und rekonstruierter Unterschenkelknochen . . . . .	31
15	Eingezeichnete „Region of Interest“ im Knochenscan . . . . .	32
16	Lichtmikroskopische Aufnahme der durch Cleaved Caspase 3 angefärbten Muskelzellen im Dünnschnittpräparat . . . . .	33
17	Spontanschmerzverhalten und Wärme- bzw. Kälteallodynie bei Chronic Constriction Injury . . . . .	35
18	Spontanschmerzverhalten und Wärme- bzw. Kälteallodynie bei Intermediate Nerve Injury . . . . .	36
19	Mechanische Hyperalgesietestung bei Chronic Constriction Injury . . . . .	37
20	Mechanische Hyperalgesietestung bei Intermediate Nerve Injury . . . . .	38
21	Vergleich der mechanischen Hyperalgesietestung (CCI vs. INI) . . . . .	39
22	Messung des Pfotenvolumens . . . . .	40
23	Messung der Pfotentemperatur . . . . .	41
24	Latenz der nervalen Erregungsleitung . . . . .	42
25	Ödem des M. tibialis anterior . . . . .	43

26	NADH-Autofluoreszenz . . . . .	44
27	Funktionelle kapilläre Dichte . . . . .	45
28	Prozentualer Anteil sich langsam bewogender Leukozyten . . . . .	46
29	Anzahl am Endothel fest adhärenter Leukozyten . . . . .	46
30	Makromolekulare Plasmaextravasation . . . . .	47
31	3D-Rekonstruktion der „Region of Interest“ im Knochenscan . . . . .	47
32	Knochendichte des trabekulären Knochens . . . . .	48
33	Knochendichte des kortikalen Knochens . . . . .	49
34	Anteil Knochen- am Gesamtvolumen . . . . .	50
35	Anzahl der Knochentrabekel . . . . .	50
36	Trabekuläre Dicke . . . . .	51
37	Separation der Knochentrabekel . . . . .	52
38	Gesamte Querschnittsfläche . . . . .	53
39	Knochenoberfläche . . . . .	53
40	Kortikalisdicke . . . . .	54
41	Analyse der Cleaved Caspase 3-positiven Myozyten . . . . .	55
42	Spontanschmerzverhalten und Wärme- bzw. Kälteallodynie (CCI/INI 2 Tage) . . .	85
43	Spontanschmerzverhalten und Wärme- bzw. Kälteallodynie (CCI 7 Tage) . . . .	86
44	Spontanschmerzverhalten und Wärme- bzw. Kälteallodynie (INI 7 Tage)) . . . .	87
45	Mechanische Hyperalgesietestung (CCI/INI 2 Tage) . . . . .	88
46	Mechanische Hyperalgesietestung (CCI 7 Tage) . . . . .	88
47	Mechanische Hyperalgesietestung (INI 7 Tage) . . . . .	89
48	Pfotenvolumen (CCI/INI 2 Tage, CCI 7 Tage und INI 7 Tage) . . . . .	90
49	Pfotemperatur (CCI/INI 2 Tage, CCI 7 Tage und INI 7 Tage) . . . . .	91
50	Anteil Knochen- am Gesamtvolumen (Sham) . . . . .	92

## Tabellenverzeichnis

1	Budapest-Kriterien zur Diagnose des CRPS . . . . .	7
2	Versuchsanordnung und -gruppen . . . . .	17

3	Parameter der Knochenanalyse . . . . .	30
4	Basisvitaldaten der Versuchstiere zur IVFM . . . . .	44