

Klinik für Anaesthesiologie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

Quantitative diaphragmale In-vivo-Elektromyographie nach Phrenikusdenervation und kollateraler Reinnervation

Veronika Lehmeyer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. H. Fink
2. Univ.-Prof. Dr. E. Kochs

Die Dissertation wurde am 27.06.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Das Zwerchfell als Hauptatemmuskel.....	6
1.1.1. Innervation und Aufbau des Zwerchfells	6
1.1.2. Klinische Relevanz der Zwerchfelllähmung	8
1.1.3. Symptome und Diagnostik der Zwerchfelllähmung	10
1.2. Grundlagen der Elektromyographie (EMG)	11
1.3. Verwendetes Tiermodell zur Untersuchung von De- und Reinnervation.....	12
1.4. Einführung der Entropie in die EMG-Analyse	15
2. Zielsetzung der Arbeit.....	17
3. Material und Methodik.....	18
3.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	18
3.2. Studienprotokoll	18
3.3. Anästhesie	19
3.4. Phrenikotomie	20
3.5. Elektromyographie und Datenerhebung.....	21
3.6. Bearbeitung der EMG-Daten	24
3.7. Berechnung der Permutationsentropie (PeEn)	25
3.8. Statistik.....	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Klinische Beurteilung der Reinnervation.....	29
4.2. EMG-Ableitungen.....	29
4.3. Beurteilung der Reinnervation anhand der Permutationsentropie	31
5. Diskussion	33
6. Zusammenfassung.....	39
7. Bibliographie.....	41

8. Danksagung	46
9. Publikation	47

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie (lat.: arteria)
C	Zervikalsegment der Spinalnervenwurzel
CMV	kontrollierte mechanische Beatmung (engl.: controlled mechanical ventilation)
EEG	Elektroenzephalographie
EKG	Elektrokardiographie
EMG	Elektromyographie
ICUAW	erworbene Muskelschwäche bei kritisch Kranken (engl.: intensive care unit-acquired weakness)
kl	kontralateral
M.	Muskel (lat.: musculus)
N.	Nerv (lat.: nervus)
NP	N. phrenicus
NPA	N. phrenicus accessorius
p	Wahrscheinlichkeit (engl.: probability)
PeEn	Permutationsentropie
V.	Vene (lat.: vena)
VIDD	ventilatorinduzierte diaphragmale Dysfunktion (engl.: ventilator-induced diaphragmatic dysfunction)

Verwendete Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
dB	Dezibel
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz [1 Hz = 1/s]
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
µg	Mikrogramm
min	Minute
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
ms/div	Empfindlichkeit des Verstärkers in Millisekunden pro Skalierungseinheit (engl.: millisecond per division)
s	Sekunde
V	Volt
V/div	Empfindlichkeit des Verstärkers in Volt pro Skalierungseinheit (engl.: volt per division)
Vol%	Volumenprozent

1. Einleitung

1.1. Das Zwerchfell als Hauptatemmuskel

1.1.1. Innervation und Aufbau des Zwerchfells

Das Zwerchfell leistet 75 - 80 % der inspiratorischen Ruheatemarbeit und ist damit der Hauptatemmuskel des Menschen (Wang 2011, S. 564-566).

Den größten Anteil an der Zwerchfellinnervation hat der paarig angelegte Nervus phrenicus (NP). Dieser entspringt beim Menschen aus den motorischen Vorderhornzellen der Zervikalsegmente C3 - C5 des Rückenmarks. Der NP liegt zervikal der Vorderfläche des M. scalenus anterior an und zieht zwischen A. und V. subclavia ventral des N. vagus in die Thoraxhöhle. Dort verläuft er zwischen Perikard und Pleura mediastinalis zum Zwerchfell, das er auf der rechten Seite lateral der V. cava superior erreicht, auf der linken Seite im Bereich der Herzspitze.

Eine weitere Innervation ist durch den N. phrenicus accessorius (NPA) möglich. Der NPA entspringt beim Menschen am häufigsten dem N. subclavius (61 %) oder der Ansa cervicalis entweder direkt (12 %) oder aus einem Nervenast zum M. sternohyoideus (7 %) (s. Abbildung 1A). Seltener entspringt er dem N. supraclavicularis, dem spinalen akzessorischen Nerven, dem N. hypoglossus oder direkt aus den Zervikalsegmenten C3 - C5 (Loukas 2006, S. 1870-1875). Die Inzidenz des NPA beträgt je nach Studienlage zwischen 53 - 62 % (Loukas 2006, S. 1870-1875; Nayak 2008, S. 181-184). Der NPA verläuft zunächst parallel mit den brachialen Plexusnerven. In einem Drittel der Fälle vereinigt er sich mit dem NP oberhalb der V. subclavia, ansonsten erst unterhalb, wobei er dann ventral der V. subclavia verläuft (Codesido 2008, S. 779-780). Während der NP den ventromedianen Pars sternalis, den lateralen Pares costalis und Teile des dorsalen

Pars lumbalis (Crus dextrum et sinistrum) des Zwerchfells innerviert (s. Abbildung 2), versorgt der NPA dorsale Zwerchfellanteile.

Bei Ratten entspringt der NP den Zervikalsegmenten C4 und C5, der NPA dem Zervikalsegment C6 (s. Abbildung 1B) (Gottschall 1977, S. 63-69). Die Inzidenz des NPA beträgt zwischen 84 % und 92 % (DeVries 1989, S. 88-90; Gottschall 1977, S. 63-69). Der NPA innerviert bei Ratten den dorsokostalen und laterokruralen Anteil des Zwerchfells.

Unter funktionellen Aspekten liegt die Besonderheit des Zwerchfells in seiner Kuppelkonstruktion. Die höher gelegene Sehnenplatte (Centrum tendineum) wird durch Kontraktion der randständig ansetzenden Muskeln nach unten gezogen, wodurch sich die Fläche des Zwerchfells verkleinert. Die dadurch gewonnene thorakale Volumenzunahme geht auf Kosten des Bauchraums, der bei Inspiration nach kaudal ausweichen muss und sich durch Erschlaffung der Bauchmuskulatur vorwölbt („Bauchatmung“). Neben der Atemarbeit unterstützt das Diaphragma den unteren Ösophagussphinkter bei der Refluxvorbeugung.

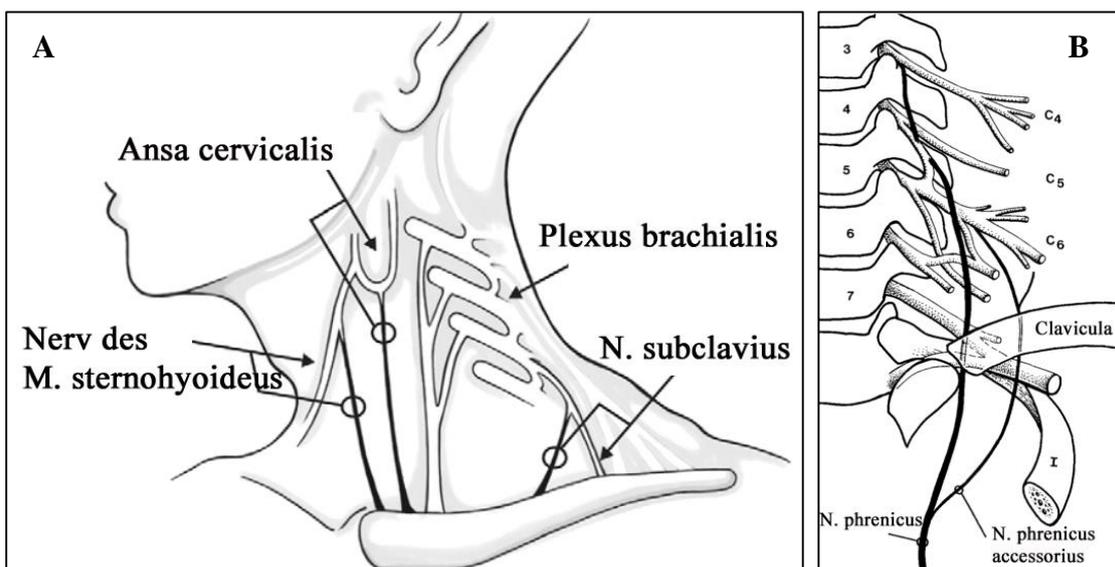


Abbildung 1A: Darstellung der häufigsten Ursprungsnerven (Pfeile) des N. phrenicus accessorius (Kreise) beim Menschen: N. subclavius, Ansa cervicalis und der N. des M. sternohyoideus (modifiziert nach Loukas 2006).

Abbildung 1B: Situs der zervikalen Spinalnervenwurzeln (C4 – C6) von Ratten. Ursprung und Verlauf von N. phrenicus und N. phrenicus accessorius. Beide Nerven vereinigen sich unterhalb der 1. Rippe (I). 3 – 7: Halswirbel; C4 – C6: zervikale Spinalnervenwurzeln (modifiziert nach Gottschall 1977).

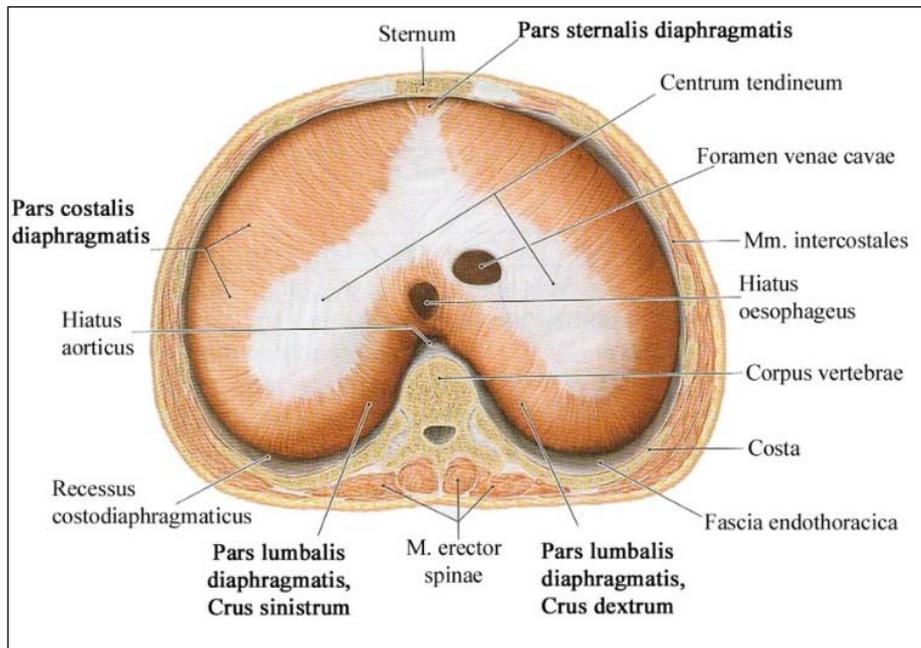


Abbildung 2: Darstellung des Zwerchfells beim Menschen von kranial (Wurzinger 2007). Die drei Hauptabschnitte des Diaphragmas sind Pars sternalis, costalis und lumbalis. Letzterer unterteilt sich in Crus sinistrum und dextrum.

1.1.2. Klinische Relevanz der Zwerchfelllähmung

Häufig führen periphere Erkrankungen des NP oder des Zwerchfells je nach Ausprägungsgrad zu Zwerchfellparese (unvollständige Lähmung), oder Zwerchfellparalyse (vollständige Lähmung).

Die häufigste Ursache für eine direkte Läsion des NP ist mit bis zu 36 % ein operativer Eingriff (Elefteriades 2008, S. 289-295). Iatrogene Ursachen sind meist Herzoperationen, Kopf-/Halsoperationen, anästhesiologische Nervenblockaden, Zentralvenenkatheter-Anlagen oder chiropraktische Manipulationen (Ko 2009, S. 501-510). Tumoren im Kopf- bzw. Halsbereich können primär zu Nervenkompression oder Nerveninfiltration führen oder sekundär durch Tumorresektion, Neck dissection oder Bestrahlung eine Nervenschädigung verursachen. Selten werden infektiöse Ursachen für die Affektion des NP diagnostiziert, wie Poliomyelitis, Herpes zoster, HIV, Tetanus und Lyme-Borreliose (Qureshi 2009, S. 315-320). Die Ursachen idiopathischer Zwerchfelllähmungen sind unklar; eine häufig undiagnostizierte virale Genese wird aber diskutiert (Crausman 2009,

S. 153-157). Zudem gibt es neuropathische Erkrankungen, die sich auf den NP auswirken können, wie Multiple Sklerose, Guillain-Barré-Syndrom, chronisch-inflammatorische demyelinisierende Neuropathie oder die diabetische Neuropathie. Auf pädiatrischen Intensivstationen sind die häufigsten Ursachen für periphere NP-Läsionen Operationen angeborener Herzfehler und Geburtsschäden durch Nervendehnung (Commare 1994, S. 187-193).

Daneben kann die erworbene Muskelschwäche bei kritisch Kranken (engl.: intensive care unit-acquired weakness, ICUAW) eine Zwerchfell- und/oder NP-Affektion hervorrufen (Zochodne 1987, S. 819-841). Die ICUAW ist eine intensivmedizinisch relevante Erkrankung, welche die Critical-Illness-Polyneuropathie, -Myopathie und -Polyneuromyopathie als Überbegriff umfasst (Ramsay 1993, S. 387-398). Bei der Critical-Illness-Polyneuropathie tritt eine primäre axonale Degeneration überwiegend distaler motorischer und sensorischer Nervenfasern auf (Zochodne 1987, S. 819-841). Bei der Critical-Illness-Myopathie sind primär proximale Muskeln betroffen (Helliwell 1991, S. 307-314). Hauptrisikofaktoren der ICUAW sind die Sepsis und das Multiorganversagen. Bis zu 70 % der Patienten entwickeln darunter eine ICUAW (Witt 1991, S. 176-184). Außerdem können Hyperglykämie, Immobilisation, eine Steroidtherapie, sowie der Einsatz von Muskelrelaxantien das Risiko daran zu erkranken erhöhen (de Jonghe 2009, S. S309-315).

Wird eine Zwerchfelllähmung durch eingeschränkte Ventilation und Dyspnoe symptomatisch, kann eine Beatmung indiziert sein. Dabei konnte gezeigt werden, dass die kontrollierte mechanische Beatmung (engl.: controlled mechanical ventilation, CMV) selbst zu einer ventilatorinduzierten diaphragmalen Dysfunktion (engl.: ventilator-induced diaphragmatic dysfunction, VIDD) führen kann (Levine 2008, S. 1327-1335). Die histologisch detektierte Muskelfaseratrophie ist proportional zur Beatmungsdauer und tritt isoliert im Zwerchfellmuskel auf. Patienten, die längere Zeit beatmet wurden,

lassen sich zunehmend schwerer vom Respirator entwöhnen, was mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden ist. Aus diesem Grund ist die frühzeitige Detektion und Therapie der Zwerchfelllähmung von hoher klinischer Relevanz auf Intensivstationen.

1.1.3. Symptome und Diagnostik der Zwerchfelllähmung

Eine unilaterale Zwerchfelllähmung ist häufig asymptomatisch oder von leichter Dyspnoe begleitet, bilaterale Denervierung äußert sich häufig mit Orthopnoe und paradoxer Atembewegung (Laghi 2003, S. 10-48). Alveoläre Hypoventilation, subsegmentale Atelektasenbildung und ein Missverhältnis von Ventilation zu Perfusion führen zu Hypoxämie und Erythrozytose. Besonders ausgeprägt sind die Symptome in Rückenlage, wenn die Bauchorgane auf das Zwerchfell drücken. Klinisch sind im Lungenfunktionstest Vitalkapazität, totale Lungenkapazität und Einsekundenkapazität bei unilateraler Lähmung um jeweils ca. 25 %, 15 % und 30 % erniedrigt, bei bilateraler Lähmung um jeweils ca. 55 %, 45 % und 50 % (Ko 2009, S. 501-510).

Zur bildgebenden Diagnostik können eine Röntgenthorax-Aufnahme (Chetta 2005, S. 39-44), die Fluoroskopie (dynamische Röntgendurchleuchtung) oder die Sonographie eingesetzt werden. Goldstandard ist die Methode der elektrischen oder magnetischen Nervenstimulation mit EMG-Aufzeichnung der Zwerchfellaktivität (Luo 1998, S. 2089-2099). Abgeleitete Muskelsummenaktionspotentiale in Form eines Interferenz-EMGs korrelierten dabei sehr gut mit den zugrunde liegenden Nervensignalen und geben damit Rückschlüsse auf die vorhandene Zwerchfellinnervation (Lourenco 1966, S. 527-533). Die Ableitelektroden können auf der Hautoberfläche im 7. - 9. Interkostalbereich der Axillarlinie oder im Ösophagus positioniert werden. Zusätzlich wird häufig auch der durch das Zwerchfell mechanisch ausgelöste transdiaphragmale Druck bei geschlossenen Atemwegen bestimmt (Qureshi 2009, S. 315-320). Invasivere Verfahren, wie kutan oder

laparoskopisch eingestochene Nadel-Elektroden sind zwar genauer, aber eher experimentellen Studien vorbehalten.

1.2. Grundlagen der Elektromyographie (EMG)

Die Elektromyographie (EMG) ist eine neurophysiologische Methode, die sich mit Entstehung, Aufzeichnung und Auswertung myoelektrischer Signale befasst. Sie zählt zu den wichtigsten elektrophysiologischen Untersuchungen zur Detektion neuromuskulärer Erkrankungen (Stevens 2009, S. S299-308).

Myoelektrische Signale haben ihren Ursprung in den α -Motorneuronen, die im Vorderhorn des Rückenmarkes liegen. Deren myelinisierte Axone treten über neuromuskuläre Synapsen mit den Zielmuskeln in Kontakt. Alle Skelettmuskelfasern, die von einem α -Motorneuron innerviert werden, bilden eine motorische Einheit und reagieren gleichzeitig auf neuronalen Input (Wöhrle 2011, S. 84-116). Die elektromechanische Koppelung führt zu Muskelkontraktion, deren Stärke durch die Modulation der Zahl rekrutierter motorischer Einheiten und durch Frequenzänderung bereits aktiver Motorneurone verändert wird. Geringe Muskelkraft wird eher durch Modulation der Zahl rekrutierter motorischer Einheiten variiert, große Muskelkraft eher durch Frequenzänderung (Milner-Brown 1975, S. 549-569). Entsprechend dem Rekrutierungsprinzip werden bei willkürlicher Muskelarbeit zuerst leichter erregbare kleinere Motorneurone aktiviert, die kleinere motorische Einheiten innervieren, bevor für größere Kraftanstrengungen größere Motorneurone und Muskeleinheiten hinzukommen (Henneman 1985, S. 105-112).

Auf zellulärer Ebene breitet sich die Depolarisation ausgehend von den Synapsen in der Innervationszone bidirektional mit einer Geschwindigkeit von 4 m/s (Zwarts 2003, S. 1-17) auf einer Strecke von 10 cm (Mensch) bzw. 2 cm (Ratte) aus (Drenckhahn 2003, S. 149-170; Gordon 1989, S. 131-143). Im Extrazellulärraum bilden sich wandernde Di-

und Tripole entlang der Muskelfasermembran, die elektrische Felder erzeugen (s. Abbildung 3).

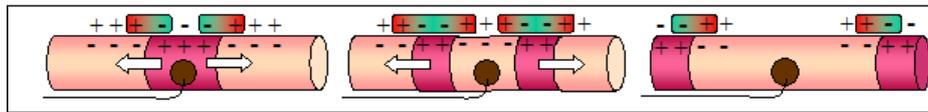


Abbildung 3: Räumliche Wanderung extrazellulärer Potentiale entlang der Muskelfaseroberfläche im Zeitverlauf.

Die Elektromyographie (EMG) bedient sich konzentrischer Nadelelektroden, die direkt in den Muskel eingebracht werden. Es können Spontanaktivitäten oder moderate und maximale Willküraktivierung gemessen werden (Buchthal 1982, S. 265-280).

Die Potentiale aller Muskelfasern einer motorischen Einheit imponieren elektromyographisch als Potential einer motorischen Einheit (Wöhrle 2011, S. 84-116).

In einer Ableitung per Nadelelektroden überlagern sich bei starker Muskelkontraktion zahlreiche Summenaktionspotentiale zum Interferenz-EMG (Daube 2009, S. 244-270).

Die elektrischen Spannungsänderungen im EMG spiegeln dabei den funktionellen Zustand der neuromuskulären Übertragung wieder.

1.3. Verwendetes Tiermodell zur Untersuchung von De- und Reinnervation

Die vorliegende Studie basiert auf der im Rattenmodell etablierten Methode der unilateralen Phrenikotomie (Gottschall 1977, S. 63-69; Lüllmann-Rauch 1971, S. 593-603). Hierbei wird unilateral ein zervikaler Abschnitt des NP reseziert und durch Kauterisation der proximalen und distalen Nervenenden eine direkte Reinnervation verhindert.

Durch die Phrenikotomie ist eine Weiterleitung neuronaler Aktivität der Zervikalsegmente C4 und C5 bis zum distalen phrenikalen Nervenstumpf vollständig unterbrochen. Der distale Nervenstumpf unterliegt damit der Wallerschen Degeneration, welche Axone und Myelinscheide betrifft und 24 - 48 h anhält. Die durch das Trauma

ausgelöste starke Entzündungsreaktion vermittelt die anterograde axonale Fragmentierung, apoptotische Zersetzung und Beseitigung des distalen Nervenstumpfes durch Makrophagen (Camara-Lemarroy 2012, S. 1-7). In vollständig denervierten Zwerchfellabschnitten erlischt die atemabhängige EMG-Aktivität komplett, wobei die nervale Deprivation zur Muskelatrophie und klinischer Muskelschwäche führt. Im Übergangsareal, das vom NP und NPA doppelt innerviert wird, findet sich bei maximaler Willkürspannung eine verminderte Rekrutierung motorischer Einheiten. Im Einzelfaser-EMG zeigt sich dies durch ein deutlich gelichtetes Interferenzmuster mit spärlichen, einzelnen Potentialentladungen (Hacke 2010, S. 113-117). Das einsetzende, instabile muskuläre Membranpotential führt dazu, dass Muskelfasern unabhängig voneinander ohne externe Stimulation spontan depolarisieren können (Daube 2009, S. 244-270). Im EMG treten im Gegensatz zum Normalbefund (s. Abbildung 4A) pathologische Spontanaktivitäten wie positive scharfe Wellen und Fibrillationspotentiale auf (s. Abbildung 4B) (Hacke 2010, S. 113-117). Ein progredienter Kapillargefäßverlust (Borisov 2000, S. 292-304) und atrophische Muskelfasern führen zur Zunahme der Bindegewebsbreite, was eine Veränderung von Widerstand und Kapazität der Muskelfasermembranen zur Folge hat.

Die nachfolgende Reinnervation eines Muskels kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen: durch direkte oder kollaterale Reinnervation. Bei der direkten Reinnervation sprosst ein neues Motoraxon nach distal mit einer Geschwindigkeit von 1 - 4 mm pro Tag aus (Rodrigues 2012, S. 1-10), falls die Fusion der separierten Nervenenden von einer teilweise erhaltenen Markscheide unterstützt wird (Sun 2010, S. 963-975). Die kollaterale Reinnervation, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, gelingt durch Verzweigung terminaler Axone, die von benachbarten intakten motorischen Einheiten zu den denervierten Muskelfasern auswachsen (Kugelberg 1970, S. 319-329). Länge und Durchmesser von Nervenenden sind während des

Reinnervationsvorganges ständigen Änderungen unterworfen und neue Endplatten werden auch außerhalb der regulären Innervationszonen gebildet. Da die neuen Axonenden zu Beginn noch unmyelinisiert sind, besitzen sie anfangs noch geringere Leitungsgeschwindigkeiten (Bischoff 2008, S. 92-97). Die Synchronität der Muskelfasern ist aufgehoben, im Einzelfaser-EMG zeigen sich vermehrt polyphasische, asynchrone Potenziale verlängerter Dauer (Daube 2009, S. 244-270).

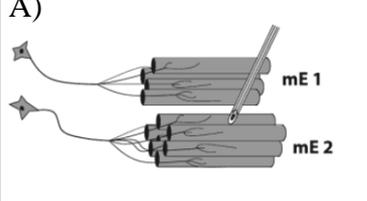
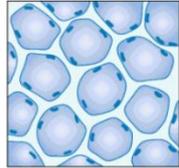
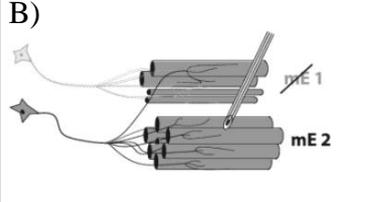
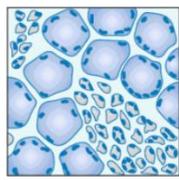
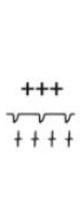
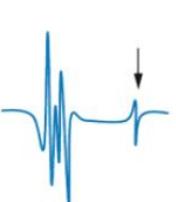
Motorische Einheiten mit EMG-Nadel (Schema)	Histologie (Schema)	Willküraktivität		
		Spontanaktivität	Einzelne Potentiale motorischer Einheiten	Aktivitätsmuster bei maximaler Willküraktivität
A) 		Keine		
B) 				

Abbildung 4: Morphologischer und elektromyographischer Vergleich von Normalmuskel mit neurogener Muskelatrophie. Links: Zwei innervierte motorische Einheiten, Mitte: Schema des histologischen Befundes, Rechts: EMG-Charakteristika.

A) Normalfall: Intakt innervierte motorische Einheiten. Histologie: polygonale Muskelfasern gleichen Kalibers. EMG: keine Spontanentladung, bi- bis triphasische Potentiale und dichtes, interferentes Aktivitätsmuster bei maximaler Willkürinnervation.

B) Neurogene Muskelatrophie: Ausfall einer motorische Einheit mit kollateraler Reinnervation. Histologisch feldförmig gruppierte Atrophie einzelner Fasern. EMG: pathologische Spontanaktivitäten in Form von positiven scharfen Wellen und Fibrillationen. Die Potentiale sind polyphasisch, amplitudenerhöht und verlängert. Das Aktivitätsmuster ist von hoher Amplitude, aber gelichtet (modifiziert nach Hacke 2010, S. 114).

Im Verlauf der Reinnervation steigt das Innervationsverhältnis der motorischen Einheiten verbliebener Muskelfasern (Bodine-Fowler 1994, S. 53-62), Zahl und Querschnitt der Muskelfasern nehmen zu, die Faserdichte erhöht sich (Finsterer 2002, S. 12-20) und die Bindegewebsbreite nimmt ab. Dadurch erhöht sich die Leitungsgeschwindigkeit (Bischoff 2008, S. 92-97) und der Gewebswiderstand sinkt (Daube 2009, S. 244-270).

Die erfolgreiche Reinnervation zeigt sich im Einzelfaser-EMG durch Resynchronisation, höhere Amplitude und längerer Dauer der Potentiale motorischer Einheiten.

1.4. Einführung der Entropie in die EMG-Analyse

Auf lineare Zeitreihen lassen sich Frequenzanalysen anwenden, die häufig auf dem durch die Fourier-Transformation berechneten Spektrum basieren. Durch dieses Verfahren werden Signale linear-parametrisch in ihre Frequenzkomponenten aufgeschlüsselt. Die ermittelten dominanten Frequenzen oder Frequenzschwerpunkte sind amplitudenabhängig und geben auf das EMG angewandt Auskunft über die linearen Eigenschaften der zugrundeliegenden komplexen neuromuskulären Dynamik. Dies ist aber nur bei vorhersagbaren (deterministischen) Signalen hoher zeitlicher Konstanz (Stationarität) sinnvoll, da für unterschiedliche Zeitabschnitte sonst stark divergierende Parameter errechnet werden. Der Erzeugungsprozess von EMG-Signalen lässt zwar vermuten, dass hochdimensionale deterministische Anteile enthalten sind, trotzdem zeigen EMG-Signale primär stochastische Eigenschaften niedriger Stationarität. Der Komplexitätsgrad von EMG-Signalen ist dabei unter maximaler Willkürkontraktion höher als unter dynamischer Muskularbeit (Padmanabhan 2004, S. 608-611).

Um konstante und damit vergleichbare Parameter für EMG-Signale von kurzer Dauer zu gewinnen ist daher die nichtlineare Zeitreihenanalyse geeigneter.

Zu den nichtlinearen Parametern zählt die Entropie, welche ursprünglich aus der Thermodynamik eingeführt wurde, um den Verteilungsgrad von Molekülen in Stoffen unterschiedlicher Aggregatzustände zu beschreiben (Bein 2006, S. 101-109). Mit zunehmender Molekülbeweglichkeit im dreidimensionalen Raum steigt die Entropie, z.B. beim Übergang eines Stoffes vom festen in einen flüssigen Aggregatzustand. Shannon adaptierte den Entropiebegriff 1948 auf die Informationstheorie (Shannon 1948, S. 623-656). Anhand der Entropie lässt sich der Ordnungsgrad kurzer Zeitabschnitte anhand des

Vergleiches von Signalmustern amplitudenunabhängig quantifizieren. Zeitreihen mit vielen repetitiven Signalmustern besitzen kleine Entropiewerte, zufällige Zeitreihen hohe Entropiewerte. Die Entropie bietet durch die Angabe des Ordnungsgrades zusätzliche Information über die ursprüngliche neuromuskuläre Netzwerkstruktur (Thakor 2004, S. 453-495), was durch Spektralanalyse allein nicht zu eruieren wäre. Außerdem sind für eine adäquate Analyse weniger Voraussetzungen an das Signal erforderlich, da auch sehr kurze Signalabschnitte und Daten mit großer Schwankungsbreite (= niedrige Stationarität) analysiert werden können. Aktuell gibt es zahlreiche verschiedene, dimensionslose Entropiemaße, welche ein Maß für Signalunregelmäßigkeit sind. Pincus führte 1991 die approximierte Entropie ein (Pincus 1991, S. 2297-2301), die mit der Fuzzy-Funktion zur fuzzy-approximierten Entropie optimiert wurde (Xie 2010, S. 1483-1496), um Monotonie und Robustheit gegenüber Störsignalen zu verbessern. Chen et al. führten die approximierte und die fuzzy-approximierte Entropien in die Oberflächen-EMG-Analyse ein (Chen 2007, S. 266-272).

Ebenfalls eine Weiterentwicklung nichtlinearer Parameter ist die Permutationsentropie (PeEn) (Bandt 2002, S. 1-4), welche durch einen ordinalen Analyseansatz (endliche Anzahl von Symbolen) besonders geeignet ist, dynamische Prozesse in kurzen, verrauschten Zeitreihen zu charakterisieren. Im Rahmen der EEG-Analyse wies die PeEn bereits eine höhere Vorhersagewahrscheinlichkeit als die approximierte Entropie auf, den Wachzustand vom Narkosezustand unter Sevoflurannarkose zu differenzieren (Li 2008, S. 448-456). Analog zur EEG-Analyse, wurde in der vorliegenden Arbeit die PeEn in die EMG-Analyse eingeführt, um die neuromuskuläre Komplexität von De- und Reinnervation zu untersuchen. Dabei ist zu vermuten, dass Denervation zu einer PeEn-Abnahme (Abnahme der Ordnung), kollaterale Reinnervation zu einer PeEn-Zunahme führt (Zunahme der Ordnung).

2. Zielsetzung der Arbeit

Die Quantifizierung der Zwerchfelllähmung im Rahmen von NP-Läsion, VIDD, ICUAW oder anderen Erkrankungen, die zur Affektion von NP und Zwerchfell führen, ist aufgrund therapeutischer Konsequenzen von hohem klinischen Interesse. Zu den wichtigsten diagnostischen Untersuchungsmethoden zählt die Elektromyographie (EMG). Die Permutationsentropie (PeEn), ein nichtlinearer Parameter, der bereits in der Elektroenzephalographie (EEG) etabliert wurde, scheint geeignet, Veränderungen neuromuskulärer Komplexität durch Denervation und Reinnervation im EMG zu quantifizieren. Dabei wird angenommen, dass Denervation zu PeEn-Abnahme und kollaterale Reinnervation zu PeEn-Zunahme führt. In der vorliegenden Arbeit wurde am Tiermodell der Ratte die nach unilateraler Phrenikotomie einsetzende kollaterale Reinnervation des Zwerchfells ausgehend vom dorsalen NPA mittels In-vivo-Zwerchfell-EMG untersucht.

Die Fragestellungen dieser Arbeit sind:

- (1) Welchen Zeitverlauf nimmt die Reinnervation von dorsal durch den NPA nach Phrenikotomie?
- (2) Kann die in der EEG-Analyse etablierte PeEn Denervation und Reinnervation des Zwerchfells im In-vivo-EMG quantifizieren?

3. Material und Methodik

3.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Nach Genehmigung des Tierversuchs (AZ 55.2-1-54-2531-115-08) durch die Regierung von Oberbayern, wurden 34 männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River GmbH, Kißlegg) mit einem Ausgangsgewicht von 280 - 330 g in die Haltung übernommen. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen Typ IV in Vierergruppen eingesetzt. Innerhalb von einer Woche konnten sie sich an den vollklimatisierten Raum mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden eingewöhnen.

Täglich wurden Raumtemperatur, Lichtintensität, Luftfeuchtigkeit und Luftwechsel kontrolliert und konstant gehalten. Es wurde stets darauf geachtet, dass genügend Wasser in Trinkflaschen und Futter (Altromin-Haltung 1324, Altromin GmbH, Lage) vorhanden und den Ratten zugänglich war. Einmal wöchentlich wurden Gewichtskontrollen durchgeführt.

3.2. Studienprotokoll

Um den Zeitverlauf einer möglichen Reinnervation des Zwerchfells ausgehend vom NPA zu untersuchen, wurden 34 phrenikotomierte Ratten randomisiert 5 Gruppen zugeteilt. Je nach Gruppe betrug die Erholungszeit nach der Denervierung 1 Tag (n = 6), 3 Tage (n = 6), 9 Tage (n = 6), 27 Tage (n = 6) und 81 Tage (n = 10).

An entsprechenden Versuchstagen wurden EMGs des ventralen, zentralen und dorsalen Zwerchfells abgeleitet (s. Abbildung 5). Ein Tier der 27-Tagesgruppe verstarb nach Phrenikotomie aus unklarer Ursache und es konnten keine EMG-Daten erhoben werden. Randomisiert wurden abwechselnd die rechte und linke Zwerchfelloberfläche phrenikotomiert („denerviert“). Die jeweils intakt verbliebene Zwerchfelloberfläche jedes Tieres diente zur Bestimmung der normalen Zwerchfell-Aktivität („nicht-denerviert“) als Kontrolle. Am

Ende der jeweiligen Versuchsreihe wurden die Tiere durch Entbluten in tiefer Narkose euthanasiert.

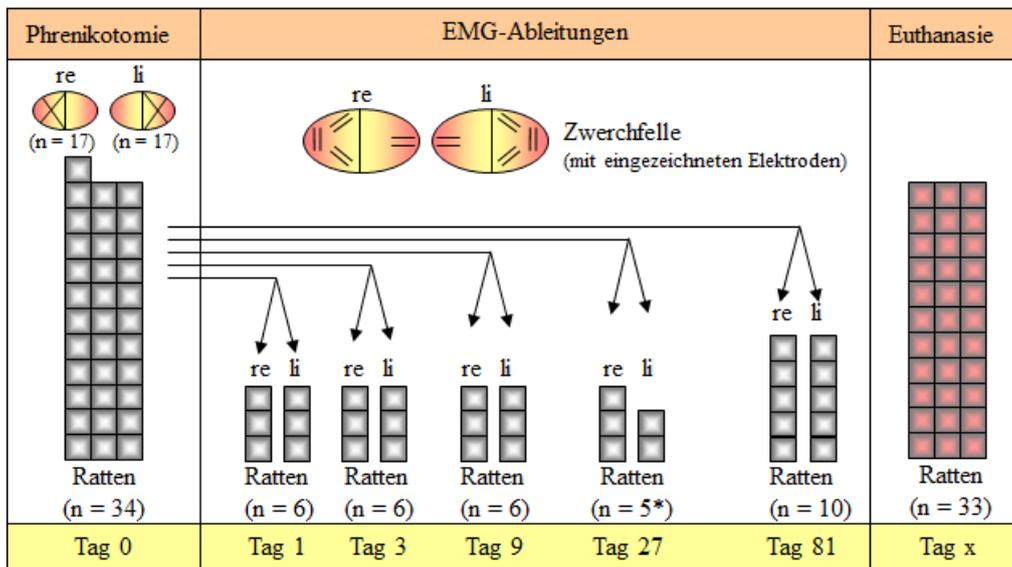


Abbildung 5: Denervierungsschema. Studiendesign: 34 Tiere wurden abwechselnd rechts (re) und links (li) phrenikotomiert. Nach unterschiedlich langen Zeitspannen an den Tagen 1, 3, 9, 27 und 81 wurden die Zwerchfell-EMGs abgeleitet. Im Anschluss an die Datenerhebung (Tag x) wurden die Tiere euthanasiert. *: 1 Tier verstarb aus unklarer Ursache.

3.3. Anästhesie

Am Tag der Phrenikotomie wurden die Ratten zur Einleitung in einer Ganzkörperkammer (Narkosebox aus Plexiglas) mit 5 Vol% Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) in reinem Sauerstoff narkotisiert. Die Ratten wurden spontanatmend endotracheal intubiert. Hierzu diente eine Venenverweilkanülen (Cavafix[®] Certo 1,5 x 2,0 mm / 16 G, 5 cm Fa. Braun AG, Melsungen) als Tubus.

Während der Versuchsdurchführung wurden die Ratten mit einem halboffenen Beatmungssystem volumenkontrolliert beatmet (Verhältnis Sauerstoff : Luft = 1 : 2, Small Animal Ventilator, Model 683, Harvard Apparatus Inc. South Natick, MA, USA). Die Narkose wurde mit 2,0 Vol% Isofluran aufrechterhalten. Zur Analgesie wurde den Tieren nach Narkoseeinleitung 50 µg/kg Fentanyl intravenös in die dorsale Penisvene injiziert. Postoperativ wurde die Haut im Inzisionsbereich mit Bupivacain (0,5 %) infiltriert und den Tieren zwei Tropfen Metamizol oral verabreicht.

Die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von Kohlenstoffdioxid, Sauerstoff, Isofluran, die Atemfrequenz und der Beatmungsdruck wurden apparativ überwacht (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland). Der endtidale Kohlenstoffdioxid-Partialdruck wurde durch Regulation des Atemminutenvolumens zwischen 32 mmHg und 42 mmHg konstant gehalten. Die Rektaltemperatur wurde mittels Temperatursonde kontrolliert und durch eine Wärmelampe zwischen 36,8 °C und 37,2 °C konstant gehalten.

3.4. Phrenikotomie

Zur Phrenikotomie wurde die zervikale Haut desinfiziert (Cutasept F, Fa. Bode, Hamburg) und auf ca. 2 cm Länge mit einem Skalpell inzidiert. Nach Durchtrennung des Platysmas und stumpfer Präparation der oberflächlichen und tiefen Halsmuskulatur wurde die Inzision in ausreichender Länge erweitert und durch Spreizen mit der Präparationsschere stumpf in die Tiefe ausgedehnt. Der NP wurde im Verlauf seiner ventralen Kreuzung des Plexus brachialis in einer Länge von 3 cm unterhalb des M. sternocleidomastoideus dargestellt und zur Vermeidung einer direkten Reinnervation in einer Länge von ca. 20 mm komplett reseziert. Um anatomische Einflüsse auszuschließen, wurden die Versuchstiere abwechselnd rechts und links phrenikotomiert. Das proximale und distale Nervenende wurde zusätzlich thermokoagulatorisch kauterisiert (Lüllmann-Rauch 1971, S. 593-603; Zhan 1997, S. 1145-1153). Während des Eingriffs blieb der NPA unversehrt. Die Wunde wurde sub- und intrakutan mit Einzelknopfnähten verschlossen (Ethicon® 7-0 Prolene, Fa. Ethicon-GmbH, Norderstedt) und mit einem Sprühverband vor Kontamination geschützt. Am Ende der Operation wurden die Tiere extubiert. Die Gesamtdauer des Eingriffs lag bei ca. 20 Minuten.

3.5. Elektromyographie und Datenerhebung

Am Tag der Elektromyographie wurden die Ratten erneut inhalativ mit 5 Vol% Isofluran unter Sauerstoffzufuhr eingeleitet und anschließend spontan atmend intubiert.

Die weitere Narkose mit entsprechendem Monitoring der Vitalparameter wurde wie im Abschnitt „3.3. Anästhesie“ beschrieben durchgeführt. Nach der Querlaparotomie des Oberbauches wurde der Processus xiphoideus mit einer Pinzette angehoben. Eine vorsichtige Leberfixierung mit einem Wattestäbchen gab den Blick auf das Zwerchfell frei. In dieses wurden für die In-vivo-EMG-Ableitung monopolare Nadelelektroden aus Platin (0,76 mm Stiftdurchmesser) bilateral eingestochen (Modell 515015, Schwarzer, München). Jeweils drei Elektrodenpaare wurden ventral, zentral und dorsal auf der phrenikotomierten Zwerchfellhälfte platziert, ein Elektrodenpaar zentral auf der kontralateralen Seite (s. Abbildung 6).

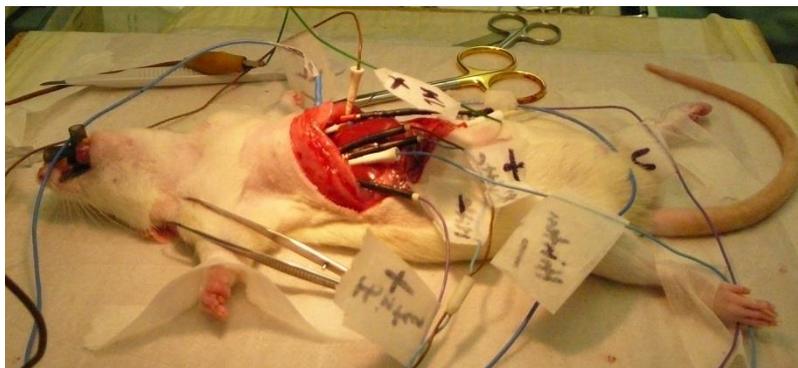


Abbildung 6: EMG-Ableitung des Rattenzwerchfells von kaudal mit vollständigem Elektroden-Besatz: je zwei ventrale, zentrale, dorsale auf der denervierten Seite und zwei zentrale auf der nicht-denervierten Seite. Darunter eine Referenzelektrode, eingestochen im Bindegewebe des unteren Schnittrandes.

Der Elektrodenabstand zueinander betrug nur wenige Millimeter und orientierte sich orthogonal zum Faserverlauf. Der Elektroden-Muskelfaser-Abstand wurde durch die intramuskuläre Lage möglichst gering gehalten. Als Referenz diente eine neunte Elektrode, die in der Bauchmuskulatur am unteren Schnitttrand positioniert wurde. Die gleichmäßige, sehr dünne kuppelförmige Aufspannung einer geringen Anzahl paralleler Faserschichten erlaubte eine gute Differenzierung der ventralen, zentralen und dorsalen

Abschnitte, sowie eine relativ konstante Platzierung von EMG-Elektroden, in Relation zu den innervierenden Zonen (Kupa 1995, S. 23-32).

Die Elektroden wurden über Kabel mit insgesamt vier Differentialverstärkern (AC/DC Strain Gage Amplifier, Modell P122 rackmount style, Grass Technologies, West Warwick, Rhode Island, USA) über die Wechselspannungseingänge verbunden (s. Abbildung 7). Die Gleichtaktunterdrückungsraten zur Elimination von Störspannungen betrug 20.000 : 1 bei 100 Hz (86 dB). Die Eingangssignale wurden 20.000-fach verstärkt und mit einer Frequenzbandbreite von 0,01 - 300 Hz gefiltert. Demzufolge waren auch Frequenzanteile $< 0,01$ Hz und > 300 Hz in den EMG-Aufzeichnungen enthalten, allerdings mit einem Amplitudenabfall von 20 dB pro Frequenzdekade, entsprechend einem Filter 1. Ordnung. Zur selektiven Elimination des unvermeidbaren Netzbrummens schlecht geerdeter externer Geräte mit maximaler Intensität bei 50 Hz, kam ein Line-Filter zum Einsatz.

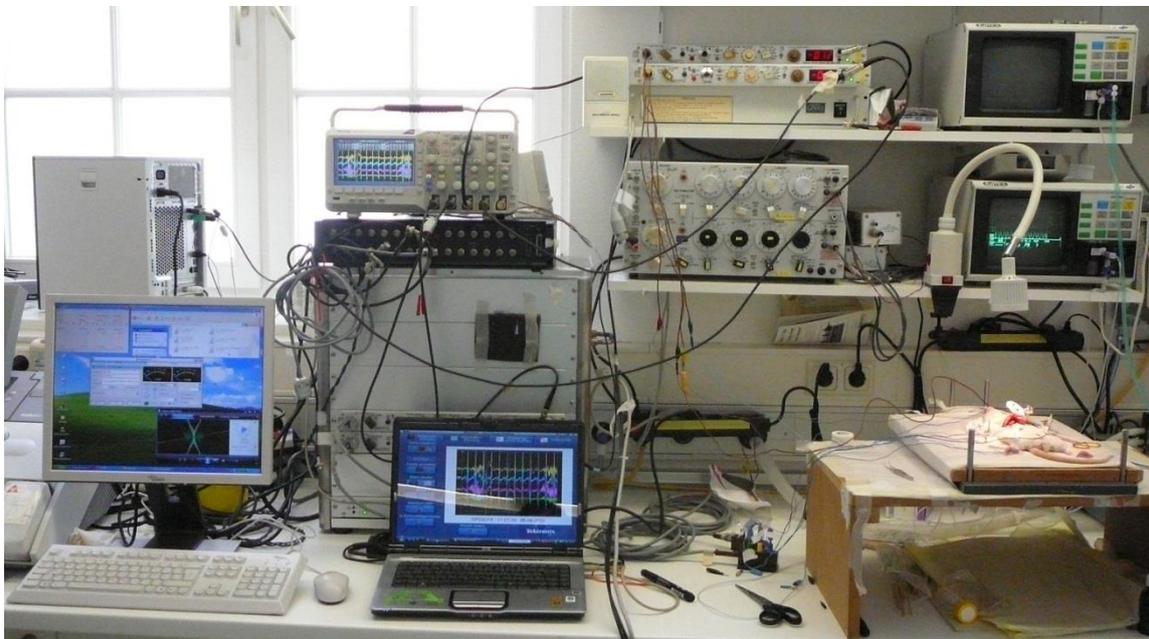


Abbildung 7: EMG-Versuchsaufbau (von links nach rechts):

- Computer mit No23-Rekorder: Wave-Aufzeichnung,
- Laptop: Darstellung des Oszilloskopbildes und des zugehörigen Datensatzes,
- Oszilloskop: visuelle Kontrolle der korrekten Elektrodenpositionen,
- 4 Vorverstärker,
- Operationsstus der Ratte mit Wärmelampe und Elektroden zur EMG-Ableitung,
- Beatmungsmonitor

Mit einem Oszilloskop (Digitales 4-Kanal-Oszilloskop, Modell DPO2014, Tektronix, Beaverton, Oregon, USA) wurden zur Kontrolle der korrekten Elektrodenlage die Spannungskurven graphisch dargestellt. Zum Auslesen der oszillographisch erfassten Daten wurde ein Laptop mit Windows Vista (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) mit der Software OpenChoice Desktop[®] Version 1.7 (Tektronix, Beaverton, Oregon, USA) verwendet. Die Audioaufzeichnung und Datenspeicherung der Messdaten als Wave-Datei erfolgte parallel mit einem Computer (Windows XP, Microsoft Corporation, Redmond, WA) durch den No23 Recorder[®] (Version 2.1.0.3, Autor: Bischof I., Massenhausen).

Die Narkose wurde mit 1 Vol% Isofluran und Fentanyl (50 µg/kg/Körpergewicht) aufrechterhalten. Dies führte bei bestehender Bewusstlosigkeit zum Einsetzen der Spontanatmung. Eine elektrische Stimulation des Zwerchfells war daher nicht nötig. Da Hypoxie und Hyperkapnie eine Zwerchfelldysfunktion bewirken können (Mantilla 2010, S. 101-106), wurden die EMG-Ableitungen bei konstant gehaltenen Parametern umgehend durchgeführt

Zur Datenerhebung per Oszilloskop wurden mittels einer 4-Kanal-Ableitung zeitgleich alle Zwerchfellaktivitäten gemessen und in einem Oszilloskopbild festgehalten. Die gewählten Einstellungen waren 400 ms/div für die x-Abszisse und 2 V/div für die y-Ordinate (engl.: div = division). Die Abtastfrequenz (engl.: sampling frequency) des Oszilloskops betrug 768 Hz (entsprechend 768 Messwerten pro Sekunde).

Vor Beginn der EMG-Aufzeichnung im Wave-Format wurden die Eingangssignale zuerst mit dem No23-Rekorder ausgepegelt, um die Daten durch Verzerrung (Nichtlinearität) nicht zu verfälschen. Daraufhin wurden vier Datensätze von den verschiedenen Zwerchfelllokalisationen einer Ratte mit dem No23-Rekorder mit einer Abtastfrequenz von 44,1 kHz für jeweils 20 Sekunden aufgenommen und abgespeichert.

Ein intakt innerviertes Zwerchfell weist rhythmische Atemaktionen (engl.: inspiratory bursts) auf, die mit der Inspiration korrelieren (O'Neal 2005, S. 1762-1775). Die Phasen dazwischen enthalten Störsignalabschnitte niedriger Amplitude. Ein denerviertes Zwerchfell zeigt keine inspiratorischen Bursts (s. Abbildung 8).

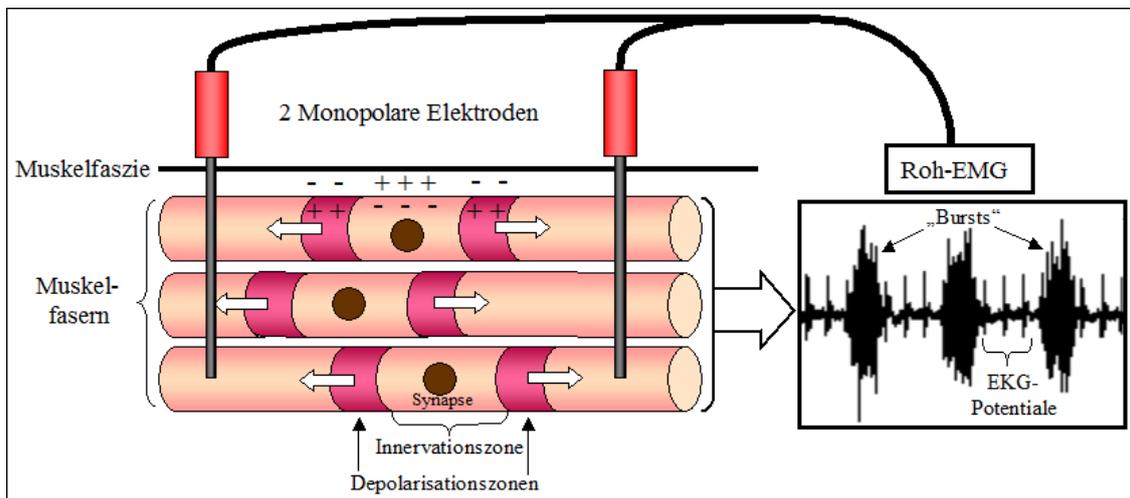


Abbildung 8: Prinzip der Nadel-EMG-Ableitung und Entstehung des Roh-EMGs.

Links: zwei intramuskulär eingestochene monopolare Elektroden. Ausgehend von den Synapsen in den Innervationszonen der Muskelfasern breiten sich die Depolarisationszonen aus (weiße Pfeile), deren extrazelluläre Potentialänderungen von den Elektroden erfasst werden. Rechts: diaphragmales Roh-EMG eines intakt innervierten Zwerchfells mit Atemaktionen („Bursts“), die klinisch mit einer Inspiration korrelieren. Überlagert wird das EMG von schmalen EKG-Signalen.

3.6. Bearbeitung der EMG-Daten

Die EMG-Daten der Oszilloskopbilder wurden mit dem Statistikprogramm R 2.10.0 (R Foundation for statistical computing, Wien, Österreich) quantitativ dargestellt.

Die EMG-Daten der Wave-Dateien wurden in das gleiche Programm eingelesen und in ein für die nachfolgende Bearbeitung kompatibles Format umgewandelt. Die in den EMG-Daten enthaltenen Bursts wurden visuell mittels LabVIEW 6.0 (National Instruments, Austin, Texas, USA) von den übrigen EMG-Sequenzen separiert (s. Abbildung 9A). Durch Kleben der Fragmente an Stellen gleicher Amplituden und Steigung entstanden Abschnitte mit einer Dauer von mehreren Sekunden, deren Amplitudenspektrum graphisch dargestellt wurde (s. Abbildung 9B und 9C). Dazu wurde

ein von der Arbeitsgruppe für „Biosignalanalyse“ (Klinik für Anaesthesiologie, Technische Universität München) erstelltes Programm (BurstLabel.vi) verwendet.

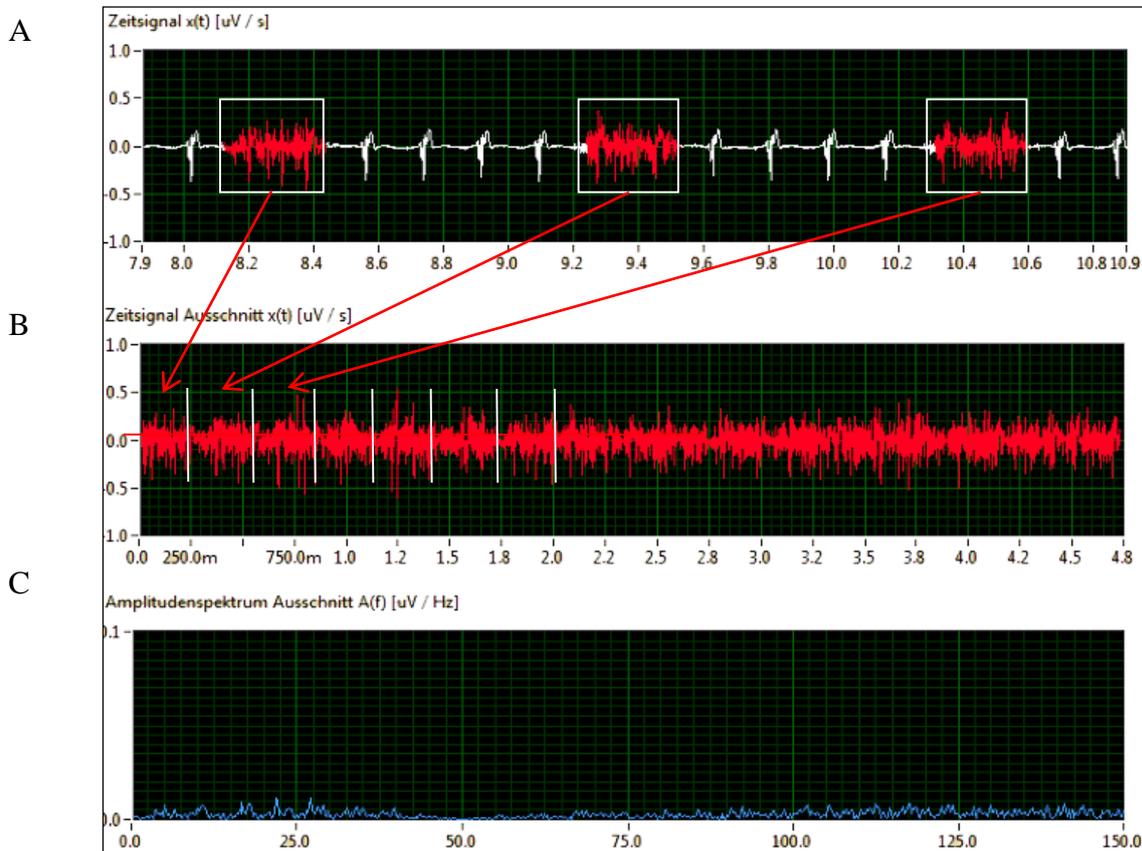


Abbildung 9: Ausschnitt der LabVIEW-Benutzeroberfläche des Programmes BurstLabel.vi mit exemplarischer Darstellung der Bearbeitung des Datensatzes einer Ratte der 81-Tagesgruppe (nicht-denervierte Zwerchfelhälfte).

- A) Verkürzte Original-Wave-Datei mit 3 markierten Atemphasen
- B) Sequenz aller extrahierten Atemabschnitte mit einer Dauer von mehreren Sekunden
- C) Amplitudenspektrum der in B gezeigten Sequenz

Für die Berechnung der PeEn wurde ein digitales Tiefpassfilter mit einer Grenzfrequenz von 400 Hz angewendet und die Abtastfrequenz auf die von Gottlieb et al. für die EMG-Aufzeichnung empfohlene Samplingrate von 1 kHz gesenkt (Gottlieb 1970, S. 142-146), um die Rechenzeit zu reduzieren.

3.7. Berechnung der Permutationsentropie (PeEn)

Die PeEn wurde als nichtlineares Maß für den Ordnungszustand in die EMG-Analyse eingeführt um die durch De- und Reinnervation induzierten Veränderungen zu

quantifizieren. Die Berechnungen wurde unter Benutzung von LabVIEW 6.0 (National Instruments, Austin, Texas, USA) auf einem Computer mit Windows XP (Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA) durchgeführt. Die in Abschnitt 3.6 visuell ausgewählten EMG-Signalabschnitte wurden mit Hilfe der PeEn in einem Frequenzband von 0,5 – 150 Hz und mit einer Einbettungsdimension $m = 10$ analysiert (Jordan 2008, S. 1014-1022).

Zum besseren Verständnis der PeEn-Berechnung folgt eine Beschreibung einer PeEn-Berechnung mit einer Dimension von $m = 3$. Dazu werden der jeweiligen Zeitreihe ($i =$ ursprüngliches Signal) jeweils 3 benachbarte Amplitudenwerte entnommen (x_i). Zur Abstrahierung der Amplitudenwerte wird jeder Gruppe eine Permutation π_k zugewiesen. Die Werte 0, 1 und 2 stehen dabei stellvertretend für den kleinsten, mittleren und größten Amplitudenwert und sorgen für Amplitudenunabhängigkeit. Insgesamt ergeben sich damit 6 mögliche Permutationen: (0 1 2), (0 2 1), (1 0 2), (1 2 0), (2 1 0) und (2 0 1). Gleiche Amplitudenwerte innerhalb einer Gruppe werden ausgeglichen durch die Addition kleiner zufälliger Störgrößen, was aufgrund der kontinuierlichen Amplitudenverteilung des EMG gerechtfertigt ist. Identische Werte werden nur selten gemessen, sodass diese Manipulation kaum ins Gewicht fällt. Anschließend werden die Wahrscheinlichkeiten $p(\pi_k)$ berechnet, mit denen die Permutation ($\pi_1, \pi_2, \pi_3, \pi_4, \pi_5, \pi_6$) auftreten. In diese Berechnung fließen die absoluten Häufigkeiten der Permutationen bezogen auf die Gesamtheit aller Wertetrios ein.

Als Letztes wird der Wert der PeEn (s. Abbildung 10) analog der Shannon-Entropie berechnet. Diese ist die Summe der Einzelwahrscheinlichkeiten $p(\pi_k)$ multipliziert mit deren Informationsgehalt $I(p) = -\log_2 p(\pi_k)$.

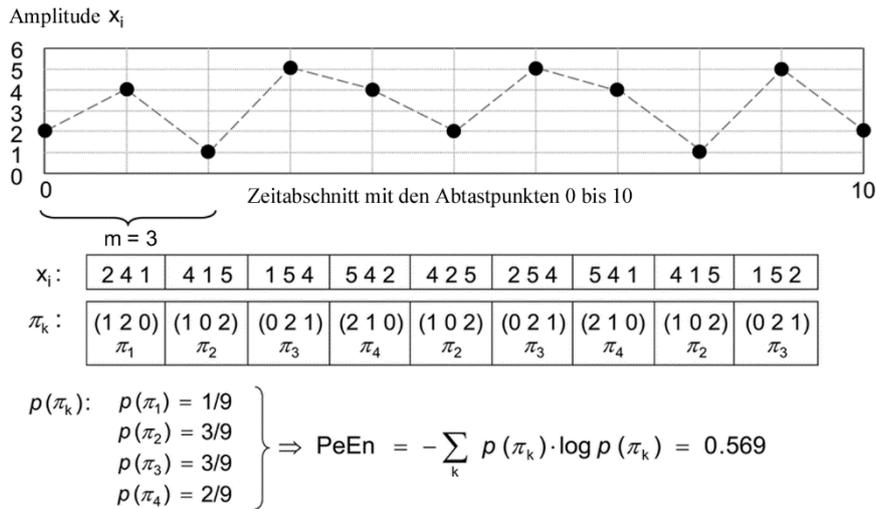


Abbildung 10: Berechnungsschema der PeEn (hier: Dimension $m = 3$) anhand einer exemplarischen Zeitreihe. Zuerst werden aus je 3 aufeinanderfolgenden Amplitudenwerten Gruppen gebildet. Danach erfolgt die Zuweisung von 0 für den kleinsten, 1 für den mittleren und 2 für den größten Amplitudenwert innerhalb einer Gruppe. Unter allen Wertetrios (x_i) befinden sich 4 verschiedene Permutationen π_{1-4} . Im Anschluss werden die Auftretenswahrscheinlichkeiten $p(\pi_k)$ bezogen auf die ursprünglichen Gruppen berechnet. Aus diesen lässt sich die PeEn ermitteln (modifiziert nach Jordan 2008).

Je seltener eine Permutation vorkommt, desto höher ist ihr Informationsgehalt und umgekehrt. Da die PeEn die Summe verschiedener Amplituden-Rankings π_k quantifiziert, nimmt PeEn den Wert 0 an, wenn nur ein Ranking-Typ auftritt und ist maximal, wenn alle Rankings gleich wahrscheinlich sind (s. Abbildung 11).

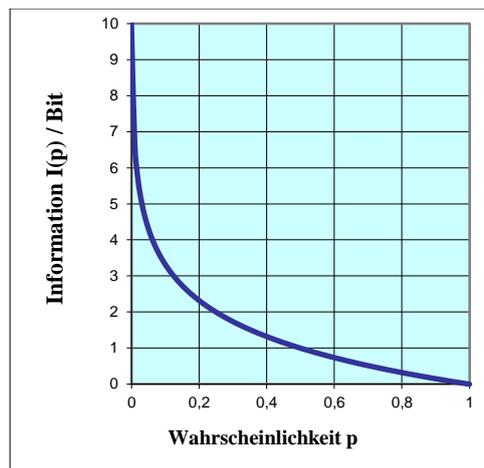


Abbildung 11: Darstellung des Informationsgehalts $I(p)$ in der Einheit Bit (engl.: binary digit) eines Wertes mit der Auftretenswahrscheinlichkeit p .

3.8. Statistik

Die Berechnungen wurden mittels SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) an einem Computer mit Windows XP durchgeführt. Aus den PeEn-Werten jeder Tagesgruppe wurden die Interquartilenbereiche, sowie die Medianwerte berechnet, die bei geringer Gruppengröße robust gegenüber Ausreißern sind. Der Nachweis von PeEn-Veränderungen durch De- und Reinnervation wurde unter Verwendung der quantilen Regression erbracht. Der quantilen Regression liegt das lineare Modell zugrunde, welches auf Medianwerten basiert. Mit dem Rang-Inversionsverfahren wurden die 95%-igen Konfidenzintervalle von PeEn und den Modell-Parametern (Ordinatenabschnitt und Steigung) berechnet (Koenker 2005, S. 1-366). Abweichungen der PeEn-Werte von denervierte Zwerchfellhälften des 1. Tages zu denervierten Zwerchfellhälften des 81. Tages bzw. mit nicht-denervierten Zwerchfellhälften aller Tagesgruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Betragen die ermittelten Wahrscheinlichkeiten $p < 0,05$ wurden sie als statistisch signifikant gewertet. Um die Kumulation des Alphafehlers (Fehler 1. Art) durch multiple Vergleiche zu vermeiden, wurde eine Dunnett-Korrektur angewandt.

4. Ergebnisse

4.1. Klinische Beurteilung der Reinnervation

Die nicht-denervierten Zwerchfellseiten zeigten bei der Laparotomie typische rhythmische Kontraktionsphasen. Jeweils 4 von 6 Tieren der 1-, 3- und 9-Tagesgruppen wiesen am Tag der Laparotomie verbliebene Kontraktionen des Hemidiaphragmas ausschließlich im dorsalen Bereich der denervierten Seite auf. Nach 27 Tagen zeigten sich bei 4 von 5 Tieren Kontraktionen des denervierten Hemidiaphragmas dorsal und zentral. Nach 81 Tagen unterschied sich das Kontraktionsverhalten der initial denervierten Seite bei 8 von 10 Ratten nicht von der nicht-denervierten Seite.

4.2. EMG-Ableitungen

Die Oszilloskopbilder gewährten einen Überblick über die quantitativen Intensitäts- bzw. Amplitudenunterschiede der Zwerchfell-EMGs. Grundsätzlich ließen sich die abgeleiteten EMG-Rohdaten in drei Gruppen unterteilen (s. Tabelle 1):

Zwerchfell	EMG Atemaktivität	EKG Herzaktivität
Intakt bzw. vollständig reinnerviert	regulär	regulär
Unvollständig reinnerviert	vermindert	regulär
Denerviert (ohne N. phrenicus accessorius)	nicht vorhanden	regulär

Tabelle 1: Zwerchfellzustände und daraus resultierende Signale von Atem- und Herzaktivität.

Die nachfolgend dargestellten EMG-Ableitungen repräsentativer Tiere zeigen eine nicht-denervierte Zwerchfellhälfte zentral (Abbildung 12A) und denervierte Zwerchfellhälften dorsal (12B) bzw. zentral (12C - G) zu verschiedenen Zeitpunkten.

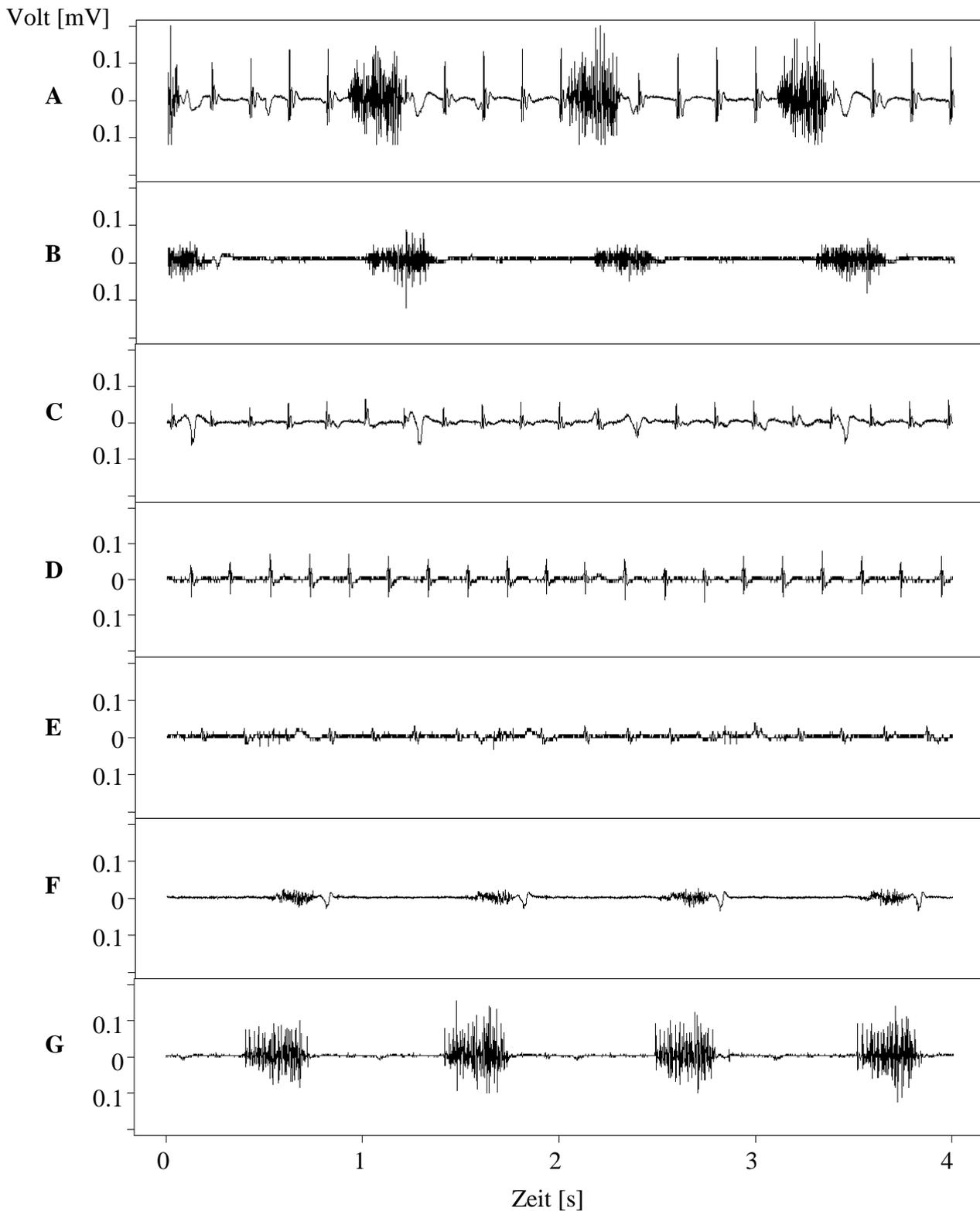


Abbildung 12: EMG-Ableitungen des Zwerchfells repräsentativer Tiere verschiedener Tagesgruppen. C - G wiesen dorsal eine Atemaktivität auf. Darstellung der Oszilloskopbilder mithilfe des Programms R.

- A) Nicht-denerviertes zentrales Zwerchfell mit regulärer Atemaktivität und EKG-Signalen
- B) Tag 1, denerviertes dorsales Zwerchfell mit verminderter, persistierender Atemaktivität
- C) Tag 1, denerviertes zentrales Zwerchfell ohne Atemaktivität
- D) Tag 3, denerviertes zentrales Zwerchfell ohne Atemaktivität
- E) Tag 9, denerviertes zentrales Zwerchfell mit diskreter Atemaktivität
- F) Tag 27, denerviertes zentrales Zwerchfell mit stärkerer Atemaktivität
- G) Tag 81, denerviertes zentrales Zwerchfell mit regenerierter Atemaktivität

Alle unter 12C - G aufgeführten Tiere wiesen dorsal eine Atemaktivität auf. Den EMGs der in C - D dargestellten Tiere fehlen zentrale Atemaktivitäten, die EMGs der unter E - G aufgeführten Tiere enthalten Atemaktivitäten in zunehmender Ausprägung.

4.3. Beurteilung der Reinnervation anhand der Permutationsentropie

An Tag 1 waren die PeEn-Werte der ventralen und zentralen Zwerchfellhälften signifikant reduziert, verglichen mit denen der nicht-denervierten Seiten, während die PeEn-Werte der dorsalen Bereiche unverändert waren. Während die PeEn-Werte der zentralen Regionen im Zeitverlauf signifikant zunahm, bis das Niveau der nicht-denervierten Seite am 81. Tag erreicht wurde, verblieben sie in der ventralen Region erniedrigt (s. Tabelle 2 und Abbildung 13).

	Tag 1 denerviert	Tag 3 denerviert	Tag 9 denerviert	Tag 27 denerviert	Tag 81 denerviert	Tage 1-81 Regression, O: Ordinatenabschnitt, S: Steigung	Nicht- denerviert
PeEn ventral	0,43 0,41-0,46# (p = 0,00)	0,48 0,44-0,49	0,48 0,47-0,48	0,48 0,45-0,50	0,48 0,47-0,50 (p = 0,66)	O: 0,45; 0,41-0,50 S: 0,009; -0,004-0,021	
PeEn zentral	0,43 0,41-0,45# (p = 0,00)	0,48 0,46-0,49	0,48 0,48-0,49	0,49 0,48-0,52	0,52 0,49-0,52§ (p = 0,01)	O: 0,45; 0,43-0,46 S: 0,016; 0,011-0,022*	0,53 0,52-0,54
PeEn dorsal	0,51 0,47-0,53 (p = 0,21)	0,51 0,48-0,52	0,51 0,46-0,53	0,51 0,50-0,51	0,51 0,50-0,52 (p = 1,00)	O: 0,50; 0,47-0,53 S: 0,002; -0,006-0,009	

Tabelle 2: PeEn-Werte der ventralen, zentralen und dorsalen Zwerchfellbereiche an den Tagen 1, 3, 9, 27 und 81 der denervierten und nicht-denervierten Seiten: Medianwerte und Interquartilenbereiche der PeEn. Tag 1 – 81 Regression: Ordinatenabstand (O) und Steigung (S) des quantilen Regressionsmodells, die das 95%-Konfidenzintervall einschließen. Aus den nicht-denervierten Zwerchfellhälften aller Tagesgruppen wurde ein gesamter Medianwert mit Interquartilenbereich berechnet. #: Signifikante Differenz zwischen den PeEn-Werten von Tag 1 und den PeEn-Werten der nicht-denervierten Zwerchfellhälfte (p < 0,05), §: Signifikante Differenz zwischen den PeEn-Werten von Tag 1 und 81 (p < 0,05), *: Signifikante Steigung der quantilen Regression zwischen der Zeit nach der Phrenikotomie und der Elektromyographie-Ableitung zur PeEn-Bestimmung (95%-Konfidenzintervall).

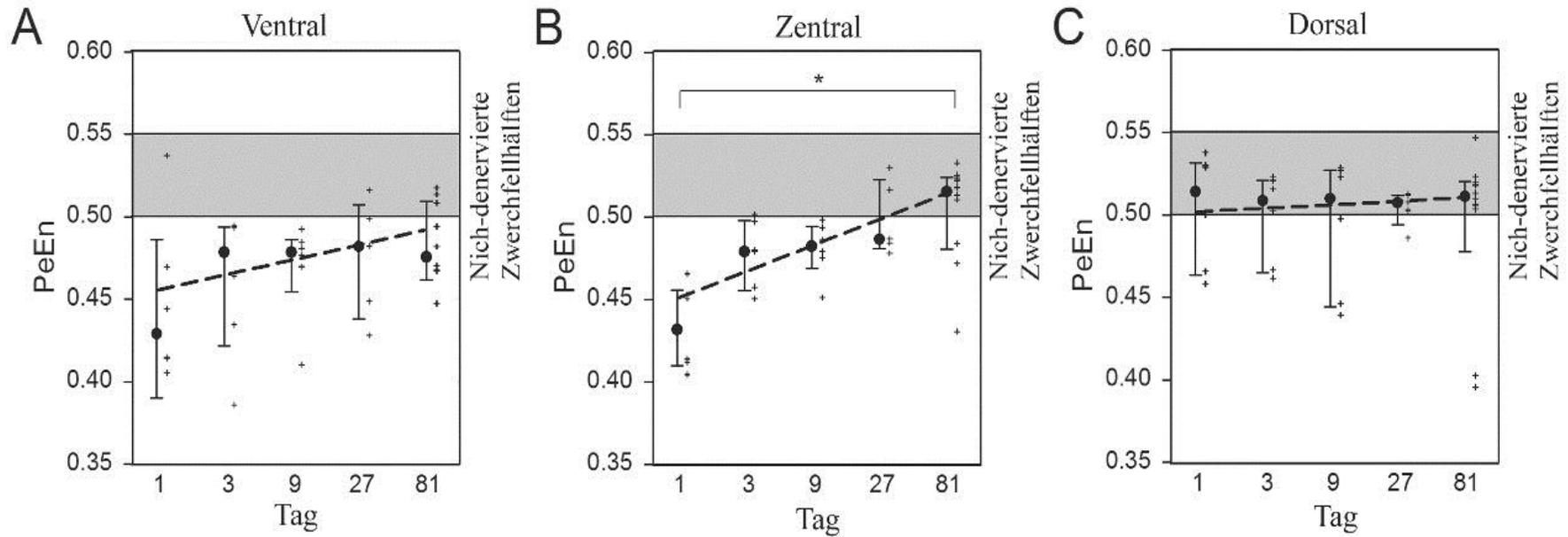


Abbildung 13: Medianwerte, Interquartilenabstände, Einzelwerte (+) und quantile Regression (gestrichelte Linie) der PeEn-Werte der ventralen (A), zentralen (B) und dorsalen (C) Zwerchfellabschnitte 1 – 81 Tage nach Phrenikotomie. Der grau eingezeichnete Bereich wird durch die PeEn-Werte der nicht-denervierten Zwerchfellhälften gebildet (Minimal- und Maximalwerte). * : Signifikanter Anstieg der PeEn-Werte von Tag 1 auf Tag 81 (quantile Regression, $p < 0,05$).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Zeitverlauf der Zwerchfellreinnervation nach Phrenikotomie mittels PeEn-Analyse des in-vivo EMGs bei Ratten untersucht. Denervation führte zu PeEn-Abnahme, Reinnervation zu einer PeEn-Zunahme. Dorsal wiesen die Zwerchfelle zu jedem Zeitpunkt eine intakte Innervation auf, zentral und ventral war es nach Phrenikotomie zu einer Zwerchfelldenervation gekommen. Im Zeitverlauf kam es zu einem progredienten Anstieg der PeEn-Medianwerte des zentralen und ventralen Bereichs, wobei sich nur die PeEn-Werte zentraler Abschnitte bis zum 81. Tag normalisierten, was der kollateralen NPA-Reinnervation entsprach (s. Abbildung 13A).

Bezüglich des Zeitverlaufs stellten Gottschall et al. 21 Tage nach unilateraler NP-Denervation mittels elektronenmikroskopischer und histochemischer Untersuchung nach Nervenstimulation eine Paralyse ventraler und mediokruraler Zwerchfellabschnitte bei 6 Tieren fest. Dorsokostale und laterokrurale Anteile zeigten eine Muskelkontraktion und intakte neuromuskuläre Endplatten, was auf die Innervation durch den NPA zurückzuführen war (Gottschall 1977, S. 63-69). Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Beobachtungen. Daneben untersuchte Lüllmann-Rauch ähnlich unserer Studie auch an fünf verschiedenen Zeitpunkten Rattenzwerchfelle nach unilateraler Phrenikotomie. Allerdings bewertete sie neuromuskuläre Endplatten histochemisch, licht- und elektronenmikroskopisch von lediglich 7 Ratten nach rechtsseitiger Denervierung (Lüllmann-Rauch 1971, S. 593-603). In dieser Studie wurde an den Tagen 21 und 28 nach unilateraler Phrenikotomie eine eindeutige diaphragmale Denervation nachgewiesen. An den Tagen 35 und 70 waren Zeichen beginnender Reinnervation feststellbar, am 168. Tag war das Zwerchfell vollständig reinnerviert. Anzumerken ist, dass in dieser Studie lediglich die kollaterale Reinnervation des Rattenzwerchfells

beschrieben wurde, ohne einen Nerven zu nennen, durch den diese stattfand. Die angegebenen Veränderungen im Zeitverlauf sind mit den Werten unserer Messungen vereinbar, wobei in unserer Studie bereits an Tag 81 ein signifikanter Nachweis der Reinnervation zentraler Zwerchfellabschnitte anhand der PeEn-Quantifizierung gelang. Analog ist auch in unserer Arbeit zu vermuten, dass Messungen zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. nach 168 Tagen) im ventralen Zwerchfellabschnitt ebenfalls Normwerte erbracht hätten.

Bezüglich der erfolgreichen erstmaligen Anwendungen der PeEn auf die EMG-Analyse finden sich auch in der in der Literatur bereits erste EMG-Analysen mittels Entropien. Beispielsweise zeigten Chen et al., dass von mehreren verschiedenen Entropien die Fuzzy-Entropie besonders gut zur Analyse des Oberflächen-EMGs geeignet ist, um vier verschiedene Bewegungen der Unterarmmuskulatur zu diskriminieren (Chen 2007, S. 266-272). Dabei ist der Optimierungsprozess der Entropien für die jeweiligen Anwendungsbereiche noch in vollem Gange. Entsprechend zahlreicher Einsatzgebiete gibt es viele verschiedene Entropieberechnungen in der Literatur, wobei noch kein Konsens bezüglich einer einheitlich empfohlenen Entropie für das EMG besteht. Die PeEn wurde bereits erfolgreich zur Detektion von Vigilanzveränderungen im EEG eingesetzt (Bruzzo 2008, S. 3-9). Da die Atemaktivität des Zwerchfell-EMGs mit den kurzen Zeitlatenzen und der niedrigen Signalstationarität den Signalen des EEGs ähnelt, wurde die Anwendung dieser Analysemethode in der vorliegenden Arbeit erstmals in der Literatur auf die EMG-Analyse angewandt. Um die Validität der PeEn zu bestimmen, wäre es allerdings sinnvoll für eine mögliche Folgestudie, PeEn-Ergebnisse mit denen von bereits etablierten klinischen EMG-Parametern zu vergleichen. Neben den nichtlinearen Entropie-Parametern, finden sich in der Literatur auch Anwendungen linearer Parameter zur EMG-Analyse. So detektierten Kupa et al. bei in-vitro untersuchten Rattenzwerchfellen nach Stimulation des NP im Oberflächen-EMG mit

einer Frequenzbandbreite von 20 – 2.000 Hz eine Medianfrequenz von ca. 158 Hz der orthodrom abgeleiteten Muskelsummenaktionspotentiale (Kupa 1995, S. 23-32). In einer Studie von Fuglsang-Frederiksen et al. an Patienten mit durchschnittlich seit vier Jahren bestehenden Neuropathien (darunter 6 von 11 Patienten mit peripheren Nervenläsionen im Bereich des Plexus brachialis bzw. der Zervikalnervenzwurzel) zeigte die Analyse des Powerspektrums von Nadel-EMG-Ableitungen des betroffenen M. biceps brachialis bei 64 % der Patienten entweder eine Abnahme des Anteils hoher Frequenzen bei 1.400 Hz oder eine Zunahme des Anteils niedrigerer Frequenzen bei 140 Hz oder beides (Fuglsang-Frederiksen 1990, S. 81-91). Trotz unterschiedlicher Methodik der beiden genannten Studien und der Untersuchung verschiedener Spezies (Mensch bzw. Ratte), wurde die Zunahme niedrigerer Frequenzen nach peripherer Neuropathie in der vorliegenden Arbeit auch für das EMG des Rattenzwerchfells angenommen. Zusammen mit der von Kupa et al. an Rattenzwerchfellen bestimmten Medianfrequenz waren diese beiden Studien Grundlage für die heuristisch gewählte Frequenzbandbreite zur PeEn-Berechnung. Diese Abweichung von der in der Literatur etablierten Frequenzbandbreite basierte auf der Annahme, dass wesentliche Veränderungen im Rahmen von Denervierung und Reinnervation in diesem niedrigen Spektrum erfassbar sein sollten. Es ist jedoch zu diskutieren, ob in unserer Studie dadurch entscheidende, durch höhere Frequenzanteile kodierte Informationen bei der PeEn-Analyse unberücksichtigt blieben. Für die EMG-Aufzeichnung beim Menschen ist allerdings vermutlich die Wahl höherer Frequenzen ratsam, da in-vivo abgeleitete, ventrale Zwerchfellanteile im Nadel-EMG des Menschen eine Medianfrequenz von ca. 233 Hz bei einer Frequenzbandbreite von 100 - 2.000 Hz besitzen (Chen 1996, S. 324-330).

Hinsichtlich der NPA-Inzidenz in vorherigen Untersuchungen wurden Werte von 84 % (16 von 19 Ratten) (Gottschall 1977, S. 63-69) bzw. 92 % (12 von 13 Ratten) (DeVries 1989, S. 88-90) festgestellt. Bei Gottschall et al. wurde der Nerv bilateral anatomisch

dargestellt, reseziert und die Anzahl der myelinisierten NPA-Axone nach histologischer Fixation durch direkte Phasenkontrastmikroskopie bestimmt, wobei nicht zwischen unilateraler und bilateraler Inzidenz differenziert wurde. DeVries et al. stellten den rechtsseitigen NPA anatomisch dar und werteten die Anzahl der durch Meerrettich-Peroxidase retrograd gefärbten Nervenkerne in den Zervikalsegmenten C5 – C6 in Mikrophotographieaufnahmen von Rückenmarks-Mikrotomschnitten aus. In beiden Untersuchungen wurde jedoch zusätzlich festgestellt, dass die Anzahl der Axone bzw. Motoneurone stark zwischen den einzelnen Tieren variiert. Gründe für die Unterschiede sind unklar. Unsere Versuche zeigten eine klinische Reinnervationsrate von 73 %. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist, dass Rattenzwerchfelle unserer Studie, die durch wenige NPA-Nervenkerne und -Axone dorsal innerviert wurden, sich nicht ausreichend kontrahiert haben und daher in der klinischen Beurteilung nicht erkannt wurden. Deshalb wurde die tatsächliche NPA-Inzidenz womöglich unterschätzt. Beim Menschen beträgt die durch Autopsie bestimmte unilaterale Inzidenz des NPA zwischen 53 % (48 von 90 Individuen) (Nayak 2008, S. 181-184) und 62 % (99 von 160 Proben beidseits bei 80 untersuchten Individuen) (Loukas 2006, S. 1870-1875). Bilateral beträgt sie zwischen 12 % (11 von 90 Individuen) (Nayak 2008, S. 181-184) und 39 % (31 von 80 Individuen) (Loukas 2006, S. 1870-1875). Ob dieser Inzidenzunterschied der uni- bzw. bilateralen Innervation auch auf die Ratte übertragbar ist und eventuell auch ein Grund für die niedrigere Inzidenz unserer Studie ist, bleibt fraglich. Eine exakte Erhebung der uni- und bilateralen Inzidenzen des NPA bei Ratten könnte eine in der Literatur noch bestehende Lücke schließen. Die deutlichen Unterschiede zwischen uni- und bilateralen NPA-Inzidenzen beim Menschen, sowie die bei Ratten stark variierende Anzahl der NPA-Motoneurone lässt ein sehr variables diaphragmales Rehabilitationspotential nach irreversibler Verletzung des NP vermuten. Die erfolgreiche diaphragmale Reinnervation ist daher womöglich stark von der NPA-

Existenz der jeweiligen Seite und die Dauer des Vorgangs von der Anzahl der Motorneurone abhängig.

Zur Induktion der Zwerchfellparalyse wurde das Tiermodell der Phrenikotomie (Gottschall 1977, S. 63-69; Lüllmann-Rauch 1971, S. 593-603) gewählt. Einerseits war die plane Geometrie des Zwerchfells ideal dafür geeignet, den Zeitverlauf der kollateralen NPA-Reinnervation von dorsal nach ventral zu verfolgen. Andererseits war die direkte Reinnervation durch den NP durch Kauterisation der proximalen und distalen Nervenenden ausgeschlossen. Auch konnten keine kollaterale Reinnervation durch Interkostalnerven auf gleicher Höhe (Gottschall 1977, S. 63-69) oder durch den kontralateralen NP wegen der zentral separierenden Sehnenplatte stattfinden (Gibson 1989, S. 960-970). Zwar werden in der Literatur auch andere Tiermodelle zur Induktion der Zwerchfellparalyse genannt, u.a. die Zervikalmark-Hemisektion auf Höhe von C2 (Vinit 2006, S. 1137-1146), die Tetrodotoxin-Nervenblockade (Miyata 1995, S. 1640-1649), sowie die CMV (Gayan-Ramirez 2002, S. 1579-1586), diese schienen allerdings für unsere Fragestellung ungeeignet. So führt die Zervikalmark-Hemisektion zu vollständiger Inaktivität von NP und NPA, weshalb keine periphere Erholung des Zwerchfells durch den NPA detektierbar gewesen wäre. Durch die tetrodotoxinvermittelte Inhibition von Natriumkanälen des peripheren NP wird zwar die Ausbreitung von Aktionspotentialen zum Zwerchfell verhindert, der axoplasmatische Transport neuro- und muskultropher Signalstoffe bleibt aber erhalten (Mantilla 2009, S. 133-140), weshalb eine Beeinflussung der Reinnervation durch Signalstoffe nicht auszuschließen gewesen wäre. Bei der CMV bleibt eine vollständige Zwerchfellinnervation durch NP und NPA bestehen, wodurch keine kollaterale Reinnervation induziert worden wäre. Insgesamt betrachtet erwies sich das Phrenikotomiemodell daher ideal geeignet, eine kollaterale Reinnervation durch den NPA zu induzieren und diese ohne Beeinflussung

durch neuro- oder muskulotrophe Signalstoffe des NP im Zeitverlauf verfolgen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Tiermodell der Ratte nach Phrenikotomie eine signifikante Reinnervation zentraler Zwerchfellabschnitte innerhalb von 81 Tagen detektiert werden kann. Dabei korrelierten die klinisch beobachteten Veränderungen der Zwerchfellkontraktilität bei De- und Reinnervation mit entsprechenden PeEn-Abnahmen und -Zunahmen. Aus diesem Grund scheint die PeEn-Analyse zur Quantifizierung von EMG-Signalen eine neue vielversprechende Bewertungsmethode zu sein, um intramuskuläre Prozesse adäquat charakterisieren zu können.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Quantifizierung der Zwerchfelllähmung im Rahmen der Läsion des N. phrenicus (NP), der Erkrankung von NP oder Zwerchfell, der ventilatorinduzierten diaphragmalen Dysfunktion oder der erworbenen Muskelschwäche bei kritisch Kranken ist von hohem klinischem Interesse. Da das überwiegend durch den NP innervierte Zwerchfell häufig auch durch den N. phrenicus accessorius (NPA) innerviert ist, kann im Rattenmodell nach Phrenikotomie eine kollaterale Reinnervation von dorsal durch die Elektromyographie (EMG) untersucht werden. Die Permutationsentropie (PeEn), welche als nichtlinearer Parameter in der Elektroenzephalographie etabliert wurde, scheint geeignet, den Komplexitätsgrad elektromyographischer Signale zu quantifizieren.

Methoden: Nach Genehmigung durch die Tierschutzkommission wurden 34 männliche Sprague-Dawley Ratten unilateral zervikal phrenikotomiert. Nach 1, 3, 9, 27 und 81 Tagen wurden unter Narkose in Spontanatmung bei 33 Tieren diaphragmale in-vivo EMG-Aktivitäten der ventralen, zentralen und dorsalen Anteile der denervierten Seite, sowie der zentrale Abschnitte der kontralateralen Seiten gemessen. Aus den EMG-Signalen wurden die PeEn-Werte berechnet.

Ergebnisse: Die elektromyographisch bestimmte Inzidenz reinnervierter Zwerchfellhälften betrug 73 % (24 von 33 Ratten). Einen Tag nach der Phrenikotomie waren die PeEn-Werte in den ventralen (Medianwert: 0,43; Interquartilenbereich: 0,41 – 0,46) und zentralen Bereichen (0,43; 0,41 - 0,45) signifikant erniedrigt ($p < 0,05$), verglichen mit der nicht-denervierten Seite (0,53; 0,52 – 0,54). In den dorsalen Abschnitten, die durch den NPA innerviert wurden, blieben die PeEn-Werte unverändert (0,51; 0,47 – 0,53). Innerhalb von 81 Tagen normalisierten sich die PeEn-Werte der

zentralen Bereiche (0,52; 0,49 – 0,52), während sie in den ventralen Abschnitten erniedrigt blieben (0,48; 0,47 – 0,50).

Schlussfolgerung: Nach Phrenikotomie kann eine kollaterale Reinnervation, von dorsal ausgehend, eine Zwerchfellaktivität wiederherstellen. Die Anwendung der PeEn auf das EMG scheint eine neue vielversprechende Bewertungsmethode zu sein, anhand derer auch diskrete EMG-Unterschiede deutlich gemacht werden können. Dadurch ist es möglich, intramuskuläre Veränderungen zu charakterisieren, die durch Denervation und Reinnervation induziert werden.

7. Bibliographie

1. **Bandt, C., Pompe, B.:** Permutation entropy: a natural complexity measure for time series. *Phys Rev Lett* 88 (2002): 1-4
2. **Bein, B.:** Entropy. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 20 (2006): 101-109
3. **Bischoff, C.** Axonale Läsionen. In: "Elektromyographie, Nervenleitungsuntersuchungen: EMG, NLG", Bischoff, C., Dengler, R., Hopf, H.C. (Hrsg.). Georg Thieme-Verlag, Stuttgart-New York, 2008, 2. Auflage, 92-97
4. **Bodine-Fowler, S.:** Skeletal muscle regeneration after injury: an overview. *J Voice* 8 (1994): 53-62
5. **Borisov, A.B., Huang, S.K., Carlson, B.M.:** Remodeling of the vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. *Anat Rec* 258 (2000): 292-304
6. **Bruzzo, A.A., Gesierich, B., Santi, M., Tassinari, C.A., Birbaumer, N., Rubboli, G.:** Permutation entropy to detect vigilance changes and preictal states from scalp EEG in epileptic patients. A preliminary study. *Neurol Sci* 29 (2008): 3-9
7. **Buchthal, F., Kamieniecka, Z.:** The diagnostic yield of quantified electromyography and quantified muscle biopsy in neuromuscular disorders. *Muscle Nerve* 5 (1982): 265-280
8. **Camara-Lemarroy, C.R., Gonzalez-Moreno, E.I., Guzman-de la Garza, F.J., Fernandez-Garza, N.E.:** Arachidonic Acid derivatives and their role in peripheral nerve degeneration and regeneration. *ScientificWorldJournal* 2012 (2012): 1-7
9. **Chen, R., Collins, S.J., Remtulla, H., Parkes, A., Bolton, C.F.:** Needle EMG of the human diaphragm: power spectral analysis in normal subjects. *Muscle Nerve* 19 (1996): 324-330
10. **Chen, W., Wang, Z., Xie, H., Yu, W.:** Characterization of surface EMG signal based on fuzzy entropy. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 15 (2007): 266-272
11. **Chetta, A., Rehman, A.K., Moxham, J., Carr, D.H., Polkey, M.I.:** Chest radiography cannot predict diaphragm function. *Respir Med* 99 (2005): 39-44
12. **Codesido, M., Guerri-Guttenberg, R.A.:** Right accessory phrenic nerve passing through an annulus of the subclavian vein. *Clin Anat* 21 (2008): 779-780
13. **Commare, M.C., Kurstjens, S.P., Barois, A.:** Diaphragmatic paralysis in children: a review of 11 cases. *Pediatric pulmonology* 18 (1994): 187-193
14. **Crausman, R.S., Summerhill, E.M., McCool, F.D.:** Idiopathic diaphragmatic paralysis: Bell's palsy of the diaphragm? *Lung* 187 (2009): 153-157
15. **Daube, J.R., Rubin, D.I.:** Needle electromyography. *Muscle Nerve* 39 (2009): 244-270

16. **de Jonghe, B., Lacherade, J.C., Sharshar, T., Outin, H.:** Intensive care unit-acquired weakness: risk factors and prevention. *Crit Care Med* 37 (2009): S309-315
17. **DeVries, K.L., Goshgarian, H.G.:** Spinal cord localization and characterization of the neurons which give rise to the accessory phrenic nerve in the adult rat. *Exp Neurol* 104 (1989): 88-90
18. **Drenckhahn, D.** Allgemeine Gewebelehre: Muskelgewebe. In: "Anatomie (Band 1)", Drenckhahn, D. (Hrsg.). Urban & Fischer Verlag, Jena, 2003, 16. Auflage, 149-170
19. **Elefteriades, J., Singh, M., Tang, P., Siegel, M.D., Kenney, B., Pandey, A., Kopf, G.S.:** Unilateral diaphragm paralysis: etiology, impact, and natural history. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 49 (2008): 289-295
20. **Finsterer, J.:** Klinische Anwendungen der Einzelfaser-Elektromyographie. *J Neurol Neurochir Psychiatr* 3 (2002): 12-20
21. **Fuglsang-Frederiksen, A., Ronager, J.:** EMG power spectrum, turns-amplitude analysis and motor unit potential duration in neuromuscular disorders. *J Neurol Sci* 97 (1990): 81-91
22. **Gayan-Ramirez, G., Decramer, M.:** Effects of mechanical ventilation on diaphragm function and biology. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 20 (2002): 1579-1586
23. **Gibson, G.J.:** Diaphragmatic paresis: pathophysiology, clinical features, and investigation. *Thorax* 44 (1989): 960-970
24. **Gordon, D.C., Hammond, C.G., Fisher, J.T., Richmond, F.J.:** Muscle-fiber architecture, innervation, and histochemistry in the diaphragm of the cat. *J Morphol* 201 (1989): 131-143
25. **Gottlieb, G.L., Agarwal, G.C.:** Filtering of electromyographic signals. *Am J Phys Med* 49 (1970): 142-146
26. **Gottschall, J., Gruber, H.:** The accessory phrenic nerve in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 151 (1977): 63-69
27. **Hacke, W.** Neurologische Untersuchung und Diagnostik: Apparative und laborchemische Diagnostik (EMG). In: "Neurologie", Poeck, K. (Hrsg.). Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010, 13. Auflage, 113-117
28. **Helliwell, T.R., Coakley, J.H., Wagenmakers, A.J., Griffiths, R.D., Campbell, I.T., Green, C.J., McClelland, P., Bone, J.M.:** Necrotizing myopathy in critically-ill patients. *J Pathol* 164 (1991): 307-314
29. **Henneman, E.:** The size-principle: a deterministic output emerges from a set of probabilistic connections. *J Exp Biol* 115 (1985): 105-112

30. **Jordan, D., Stockmanns, G., Kochs, E.F., Pilge, S., Schneider, G.:** Electroencephalographic order pattern analysis for the separation of consciousness and unconsciousness: an analysis of approximate entropy, permutation entropy, recurrence rate, and phase coupling of order recurrence plots. *Anesthesiology* 109 (2008): 1014-1022
31. **Ko, M.A., Darling, G.E.:** Acquired paralysis of the diaphragm. *Thorac Surg Clin* 19 (2009): 501-510
32. **Koenker, R.** Quantile Regression (Econometric Society Monographs). edited by Chesher, A., Jackson, M. Cambridge: Cambridge University Press, 2005, p. 1-366
33. **Kugelberg, E., Edstrom, L., Abbruzzese, M.:** Mapping of motor units in experimentally reinnervated rat muscle. Interpretation of histochemical and atrophic fibre patterns in neurogenic lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 33 (1970): 319-329
34. **Kupa, E.J., Roy, S.H., Kandarian, S.C., De Luca, C.J.:** Effects of muscle fiber type and size on EMG median frequency and conduction velocity. *J Appl Physiol* 79 (1995): 23-32
35. **Laghi, F., Tobin, M.J.:** Disorders of the respiratory muscles. *American journal of respiratory and critical care medicine* 168 (2003): 10-48
36. **Levine, S., Nguyen, T., Taylor, N., Friscia, M.E., Budak, M.T., Rothenberg, P., Zhu, J., Sachdeva, R., Sonnad, S., Kaiser, L.R., Rubinstein, N.A., Powers, S.K., Shrager, J.B.:** Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med* 358 (2008): 1327-1335
37. **Li, X., Cui, S., Voss, L.J.:** Using permutation entropy to measure the electroencephalographic effects of sevoflurane. *Anesthesiology* 109 (2008): 448-456
38. **Loukas, M., Kinsella, C.R., Jr., Louis, R.G., Jr., Gandhi, S., Curry, B.:** Surgical anatomy of the accessory phrenic nerve. *Ann Thorac Surg* 82 (2006): 1870-1875
39. **Lourenco, R.V., Cherniack, N.S., Malm, J.R., Fishman, A.P.:** Nervous output from the respiratory center during obstructed breathing. *Journal of applied physiology* 21 (1966): 527-533
40. **Lüllmann-Rauch, R.:** The regeneration of neuromuscular junctions during spontaneous re-innervation of the rat diaphragm. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 121 (1971): 593-603
41. **Luo, Y.M., Polkey, M.I., Johnson, L.C., Lyall, R.A., Harris, M.L., Green, M., Moxham, J.:** Diaphragm EMG measured by cervical magnetic and electrical phrenic nerve stimulation. *J Appl Physiol* 85 (1998): 2089-2099
42. **Mantilla, C.B., Seven, Y.B., Zhan, W.Z., Sieck, G.C.:** Diaphragm motor unit recruitment in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 173 (2010): 101-106

43. **Mantilla, C.B., Sieck, G.C.:** Neuromuscular adaptations to respiratory muscle inactivity. *Respir Physiol Neurobiol* 169 (2009): 133-140
44. **Milner-Brown, H.S., Stein, R.B.:** The relation between the surface electromyogram and muscular force. *The Journal of physiology* 246 (1975): 549-569
45. **Miyata, H., Zhan, W.Z., Prakash, Y.S., Sieck, G.C.:** Myoneural interactions affect diaphragm muscle adaptations to inactivity. *Journal of applied physiology* 79 (1995): 1640-1649
46. **Nayak, S.R., Krishnamurthy, A., Prabhu, L.V., Ramanathan, L., Pai, M.M., Potu, B.K., Das, S.:** Incidence of accessory phrenic nerve and its clinical significance: a cadaveric study. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 51 (2008): 181-184
47. **O'Neal, M.H., 3rd, Spiegel, E.T., Chon, K.H., Solomon, I.C.:** Time-frequency representation of inspiratory motor output in anesthetized C57BL/6 mice in vivo. *J Neurophysiol* 93 (2005): 1762-1775
48. **Padmanabhan, P., Puthusserypady, S.:** Nonlinear analysis of EMG signals - a chaotic approach. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1 (2004): 608-611
49. **Pincus, S.M.:** Approximate entropy as a measure of system complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991): 2297-2301
50. **Qureshi, A.:** Diaphragm paralysis. *Semin Respir Crit Care Med* 30 (2009): 315-320
51. **Ramsay, D.A., Zochodne, D.W., Robertson, D.M., Nag, S., Ludwin, S.K.:** A syndrome of acute severe muscle necrosis in intensive care unit patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 52 (1993): 387-398
52. **Rodrigues, M.C., Rodrigues, A.A., Jr., Glover, L.E., Voltarelli, J., Borlongan, C.V.:** Peripheral nerve repair with cultured schwann cells: getting closer to the clinics. *ScientificWorldJournal* 2012 (2012): 1-10
53. **Shannon, C.E.:** A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27 (1948): 623-656
54. **Stevens, R.D., Marshall, S.A., Cornblath, D.R., Hoke, A., Needham, D.M., de Jonghe, B., Ali, N.A., Sharshar, T.:** A framework for diagnosing and classifying intensive care unit-acquired weakness. *Crit Care Med* 37 (2009): S299-308
55. **Sun, F., Cavalli, V.:** Neuroproteomics approaches to decipher neuronal regeneration and degeneration. *Mol Cell Proteomics* 9 (2010): 963-975
56. **Thakor, N.V., Tong, S.:** Advances in quantitative electroencephalogram analysis methods. *Annu Rev Biomed Eng* 6 (2004): 453-495
57. **Vinit, S., Gauthier, P., Stamegna, J.C., Kastner, A.:** High cervical lateral spinal cord injury results in long-term ipsilateral hemidiaphragm paralysis. *Journal of neurotrauma* 23 (2006): 1137-1146

58. **Wang, C., Yuan, W., Zhou, X.H., Shi, S., Wang, X.:** Neurotization of the phrenic nerve with accessory nerve: a new strategy for high cervical spinal cord injury with respiratory distress. *Med Hypotheses* 76 (2011): 564-566
59. **Witt, N.J., Zochodne, D.W., Bolton, C.F., Grand'Maison, F., Wells, G., Young, G.B., Sibbald, W.J.:** Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure. *Chest* 99 (1991): 176-184
60. **Wöhrle, J.C.** Neurophysiologische Diagnostik. In: "Klinische Neurologie", Berlit, P. (Hrsg.). Springer Medizin Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2011, 3. Auflage, 84-116
61. **Xie, H.B., Guo, J.Y., Zheng, Y.P.:** Fuzzy approximate entropy analysis of chaotic and natural complex systems: detecting muscle fatigue using electromyography signals. *Ann Biomed Eng* 38 (2010): 1483-1496
62. **Zhan, W.Z., Miyata, H., Prakash, Y.S., Sieck, G.C.:** Metabolic and phenotypic adaptations of diaphragm muscle fibers with inactivation. *J Appl Physiol* 82 (1997): 1145-1153
63. **Zochodne, D.W., Bolton, C.F., Wells, G.A., Gilbert, J.J., Hahn, A.F., Brown, J.D., Sibbald, W.A.:** Critical illness polyneuropathy. A complication of sepsis and multiple organ failure. *Brain : a journal of neurology* 110 (Pt 4) (1987): 819-841
64. **Zwarts, M.J., Stegeman, D.F.:** Multichannel surface EMG: basic aspects and clinical utility. *Muscle Nerve* 28 (2003): 1-17

8. Danksagung

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. Eberhard Kochs, Direktor der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung erstellen zu dürfen.

Ganz herzlich danke ich meiner Doktormutter Frau Dr. Heidrun Fink für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Critical Illness Polyneuromyopathie“, die Vergabe des Themas, sowie die finale Durchsicht der Arbeit.

Hervorheben möchte ich die exzellente Betreuung durch Herrn Dr. Christopher Kramer während aller Arbeitsphasen von Planung und Durchführung der Experimente, bis zur Korrektur dieser Arbeit.

Ebenfalls sehr großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Manfred Blobner für seine fundierten Anregungen während der Auswertungsphase.

Ganz besonderes Lob verdient Herr Dr. Denis Jordan, Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Biosignalanalyse“ an der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München für seine Mithilfe bei der Erstellung von Grafiken, Berechnungen und statistischen Auswertungen.

Meinem Vordoktoranden, Herrn Dr. Alexander Kretschmer danke ich für die Einweisung in die Versuchstierpflege.

Herrn Tobias Meindl und Herrn Martin Schwab danke ich für ihre engagierte Einführung in das Statistikprogramm R, wodurch mir die Datenauswertung und Graphikdarstellung ermöglicht wurde.

Der abschließende Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium ermöglichte und mir mit großer Hilfsbereitschaft und Geduld jederzeit zur Seite steht.

9. Publikation

1. **Kramer, C., Jordan, D., Kretschmer, A., Lehmeier, V., Kellermann, K., Schaller, S.J., Blobner, M., Kochs, E.F., Fink, H.:** Electromyographic permutation entropy quantifies diaphragmatic denervation and reinnervation. PLoS One 9 (2014): e115754