TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie
Klinikum rechts der Isar
und
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung

Periphere Nervenregeneration durch muskelgefüllte Kollagenschienen am Modell experimentell erzeugter Ischiasnervendefekte in der Ratte

Andreas Maximilian Fichter

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

Doktors der Medizin

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:
1. apl. Prof. Dr. N. Papadopulos
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. T. R. Tölle
3. Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer

Die Dissertation wurde am 19.11.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.10.2011 angenommen.

Für meine Familie

Teile der Arbeit wurden vorgetragen bzw. veröffentlicht in:

1 – Peripheral Nerve Reconstruction With Collagen Tubes Filled With Denatured Autologous Muscle Tissue in the Rat Model. *Fichter AM and Dornseifer U*, Leichtle S, Wilson A, Rupp A, Ninkovic M, Biemer E, Machens HG, Matiasek K, Papadopulos NA,* Microsurgery. 2011 Nov;31(8):632-41. doi: 10.1002/micr.20926. Epub 2011 Aug 24.
*both authors contributed equally as first authors

2 – Der Einfluss modifizierter azellulärer Skelettmuskulatur auf den funktionellen und strukturellen Regenerationserfolg durch Kollagenschienen nach Ischiasläsion in der adulten Ratte. *Fichter MA, Dornseifer U, Matiasek K, Leichtle S, Wilson A, Rupp A, Ninkovic M, Biemer E, Machens HG, Papadopulos NA,* 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen e.V., Hannover 2009.

3 – Bridging a 14 mm gap of the sciatic nerve with a modified collagenous conduit in the rat. *Fichter MA, Dornseifer U, Rodenacker K, Hapfelmeier A, Matiasek K, Papadopulos NA,* 4th International Bernd-Spiessl-Symposium 2008, Basel, Schweiz.
Ausgezeichnet mit dem Bernd-Spiessl-Award for Students für das beste Poster

4 – Electrophysiological Evaluation Following Sciatic Nerve Reconstruction in the Rat: A Word of Caution Concerning the Recordings from the Gastrocnemius Muscle. *Dornseifer U, Rupp A, Fischer A, Rodenacker K, Jütting U, Gais P, Ninkovic M, Biemer E, Schmahl W, Matiasek K, Papadopulos NA,* IV. Congress of the World Society for Reconstructive Microsurgery, Athen, Griechenland 2007.

5 – Combination of Collagen Tubes and Denatured Muscle Tissue to Bridge Peripheral Nerve Defects in the Rat. *Dornseifer U, Matiasek K, Fichter MA, Rupp A, Kovacs L, Ninkovic M, Biemer E, Papadopulos NA,* IV. Congress of the World Society for Reconstructive Microsurgery, Athen, Griechenland 2007.

6 – Kombination von Kollagenschiene und denaturierter Muskulatur als Leitschiene zur Überbrückung größerer Nervendefekte am Ratten-Modell. *Dornseifer U, Matiasek K, Fichter MA, Rupp A, Ninkovic M, Biemer E, Papadopulos NA,* 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen e.V., Aachen 2006.

7 – Combination of collagen tubes and denatured muscle tissue to bridge peripheral nerve defects in the rat. *Dornseifer U, Matiasek K, Fichter MA, Rupp A, Ninkovic M, Biemer E, Papadopulos NA,* The combined annual meeting of the hellenic society for reconstructive microsurgery and the hellenic society for surgery of the hand. Killini, Griechenland 2006.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung 1

1.1 Grundlagen der peripheren Nervenregeneration 2

1.1.1 Aufbau und Funktion eines peripheren Nerven 2

1.1.2 Neuronale Regeneration im peripheren Nervensystem 4

1.1.3 Nervenregeneration auf molekularer Ebene 6

1.1.4 Anpassungsvorgänge im ZNS 8

1.2 Therapie peripherer Nervenverletzungen 9

1.2.1 Klinische Einteilung der Nervenverletzungen 9

1.2.2 Therapieproblematik 10

1.2.3 Historie der Behandlung peripherer Nervenverletzungen 10

1.2.4 Aktuelle Therapieansätze 11

1.2.5 Axonale Regeneration durch Nervenleitschienen 18

1.3 Basis und Ziele der vorliegenden Arbeit 20

1.3.1 Kollagen als Schienenmaterial 20

1.3.2 Die Bedeutung einer geeigneten Füllmatrix 21

1.3.3 Denaturierte Muskulatur als Schienenmatrix 22

1.3.4 Zielsetzung 23

2 Material und Methodik 25

2.1 Versuchsmodell 25

2.2 Studienaufbau 25

2.2.1 Versuchstiere und Haltung 25

2.2.2 Experimentelles Protokoll 25

2.3 Methodik im Tierversuch 28

2.3.1 Operative Methoden 28

2.3.2 Gewebeentnahme und strukturelle Untersuchungen 32

2.3.3 Morphometrische Analyse 35

2.3.4 Volumenbestimmung der Wadenmuskulatur 40

2.3.5 Elektrophysiologische Reizmessung 41

2.3.6 Funktionelle Kontrolle der Nervenregeneration 43

2.3.7 Statistische Auswertung 47

2.4 Materialien und Geräte 49

2.4.1 Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen 49

2.4.2 Tierexperimente 51

2.4.3 Geräte und Software 51

3 Ergebnisse 53
3.1 Allgemeinzustand der Versuchstiere 53
3.2 Strukturelle Untersuchungen 53
3.2.1 Denaturierungsprozess der autologen Muskulatur 53
3.2.2 Morphologische Untersuchung der Regenerate 54
3.2.3 Morphometrische Auswertung der Nervenpräparate 58
3.2.4 Gastrocnemius-Volumen 65
3.2.5 Muskelfaserquerschnittsfläche 66
3.3 Elektrophysiologische Reizmessung 69
3.4 Evaluation des in vivo Regenerationsverlaufs 71
3.4.1 Fußspannenanalyse 71
3.4.2 Video-Ganganalyse 74
3.5 Korrelationsanalyse 79
4 Diskussion 81
4.1 Problemstellung 81
4.1.1 Defektmodell 81
4.1.2 Beobachtungszeitraum 83
4.1.3 Wahl des Interponats 84
4.2 Evaluation des Regenerationserfolgs 92
4.2.1 Beurteilung des Denaturierungsprozesses 92
4.2.2 Morphologische Beurteilung des Regenerats 95
4.2.3 Beurteilung der Reinnervation der Zielmuskulatur 105
4.2.4 Elektrophysiologische Beurteilung des Regenerationserfolgs 107
4.2.5 Beurteilung des funktionellen Regenerationserfolgs 111
4.3 Zusammenfassende Beurteilung 116
4.4 Neue Perspektiven durch modifizierte Nervenschienen 118
Zusammenfassung 123
Summary 125
Literaturverzeichnis 126
Anhang 142

1 EINLEITUNG

Trotz 150 Jahren Erfahrung mit modernen chirurgischen Behandlungsmethoden peripherer Nerven, bleibt die Rekonstruktion von Nervendefekten ein großes Problem für den Mikrochirurgen und kann zu hochgradiger Behinderung und lebenslanger Morbidität führen (NOBLE *et al.*, 1998). Damit ein peripherer Nerv nach vollständiger Durchtrennung regenerieren kann, muss die Kontinuität des Nervs über epineurale oder faszikuläre Naht wiederhergestellt werden. Größere Substanzdefekte erfordern die Interposition eines Interponats. Der „Goldstandard" für die Überbrückung von Nervenlücken beinhaltet die Entnahme eines (rein sensiblen) Spendernervs, der anschließend als autologes Transplantat (= Autograft) zwischen die beiden Nervenenden genäht wird (BELLAMKONDA, 2006; JOHNSON *et al.*, 2005). Diese Technik ist aber mit erheblichen Nachteilen verbunden. So verursacht die Methode grundsätzlich einen Hebedefekt mit sensiblem Funktionsverlust, Narbenbildung und der Gefahr einer schmerzhaften Neurombildung (FIELDS *et al.*, 1989). Die Therapie ist wegen der Knappheit an Spendernerven und Kaliberunterschieden von Spendernerv und verletztem Nerv gerade bei der Versorgung ausgedehnter Nervendefekte problematisch (SCHALLER und BERGER, 1987), und selbst unter optimalen Umständen ist eine vollständige Wiederherstellung der Funktion nur selten zu erreichen (BELLAMKONDA, 2006; CHALFOUN *et al.*, 2006).

Aus der Notwendigkeit heraus alternative Therapiemethoden zu finden, die bei vergleichbaren oder besseren Ergebnissen von großer klinischer Bedeutung wären, haben sich allein in den letzten fünf Jahren über 750 wissenschaftliche Arbeiten mit der Problematik der peripheren Nervenrekonstruktion beschäftigt[1]. Von großem wissenschaftlichen Interesse sind artifizielle Nervenschienen aus verschiedenen synthetischen und biologischen Materialien. Dabei handelt es sich um meist röhrenförmige Strukturen, die entwickelt wurden, um (1) die Lücke zwischen den Nervenenden zu überbrücken, (2) den Nerven vor der Kompression durch Narbengewebe zu schützen und (3) regenerierende Axone auf dem Weg zum distalen Stumpf zu lenken. Unabhängig vom Typ der verwendeten Nervenersatzschiene wurde jedoch bald die Bedeutung der Schwann-Zellen (SZ) klar, die in einer ausreichenden Konzentration über die gesamte Länge des Interponats vorhanden sein müssen, um eine erfolgreiche Regeneration zu gewährleisten. Zwar kommt es nach Verwendung konventioneller Nervenschienen aus beiden Stumpfenden zu einer Migration von SZ in das Interponat (WILLIAMS *et al.*, 1983). Allerdings reicht die Anzahl an eingewanderten SZ oft nicht aus, besonders dann, wenn lange Distanzen überbrückt werden müssen. Die klinische Anwendung konventioneller Nervenschienen ist daher auf kurze Nervendefekte (<3 cm) und kleinkalibrige Nerven beschränkt (MEEK und COERT, 2002). Eine Anreicherung der Schienen mit SZ kann de-

[1] Quelle: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/. Recherche vom 01.04.2009. Verwendete Stichwörter: ("2004/01/01"[Publication Date] : "3000"[Publication Date]) AND (peripheral nerve reconstruction)

ren Effektivität erhöhen (ANSSELIN *et al.*, 1997); diese Strategie hat jedoch noch experimentellen Charakter und ist in Hinblick auf eine klinische Anwendung zu zeit- und kostenintensiv. Eine interessante Alternative stellt die Verwendung von (vorbehandeltem) Muskelgewebe dar (BRUNELLI *et al.*, 1993; GEUNA *et al.*, 2004; MEEK *et al.*, 1999a), da gezeigt werden konnte, dass Skelettmuskelfasern eine frühzeitige Migration, Kolonisation (FORNARO *et al.*, 2001), und aktive Proliferation (GEUNA *et al.*, 2003) von SZ ermöglichen. Mit zunehmender Denervationsdauer kommt es normalerweise zu einer progredienten Degenerierung der Schwann-Zellen; in muskelgefüllten Interponaten hingegen überleben SZ über einen langen Zeitraum auch ohne axonalen Kontakt (RAIMONDO *et al.*, 2005) und halten ein neurotropes Milieu aufrecht (PAGNOTTA *et al.*, 2002). Skelettmuskelgewebe enthält zudem longitudinal angeordnete Basallamina-Schläuche und Komponenten der ECM, die das Wachstum regenerierender Nervenfasern (NF) fördern und lenken. Reine Muskelinterponate neigen allerdings *in vivo* zu einer raschen Resorption und bergen zudem die Gefahr, dass Nervenfasern aus dem Interponat herauswachsen und eine Neuromentstehung begünstigen. Dies kann möglicherweise verhindert werden, in dem das Muskelgewebe von einer Nervenschiene umhüllt wird. In Hinblick auf die bisherigen experimentellen und klinischen Erfolge solcher Muskelinterponate (MEEK *et al.*, 1999a; NORRIS *et al.*, 1988; PEREIRA *et al.*, 2008) zielt die vorliegende Studie darauf ab, das Potenzial muskelgefüllter Nervenschienen im Rattenmodell näher zu untersuchen und bei der Überbrückung größerer Nervendefekte im Rattenmodell mit herkömmlichen Methoden zu vergleichen.

1.1 GRUNDLAGEN DER PERIPHEREN NERVENREGENERATION

Grundsätzlich kann zwischen einer Regeneration im *zentralen* (ZNS) und im *peripheren* Nervensystem (PNS) unterschieden werden. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf Regenerationsvorgänge im PNS. Dabei darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass die periphere Nervenregeneration mit komplexen Anpassungsvorgängen auf zentraler Ebene stets Hand in Hand geht.

1.1.1 AUFBAU UND FUNKTION EINES PERIPHEREN NERVEN

Periphere Nerven stellen eine dauerhafte Verbindung zwischen ZNS und Zielgebiet her. Es handelt sich aber nicht nur um passive Leitungsbahnen, sondern um komplexe morphologische Einheiten mit vielschichtigen Funktionen, die in ihrer Komplexität bisher nur fragmentarisch bekannt sind (GILLEN *et al.*, 1997). Dazu zählen die Produktion und der Transport von Transmittern und Botenstoffen, die Übermittlung biologischer Interaktionen, sowie die Modulation von Wachstum und Reifung der zugehörigen Neurone. Bereits im 3. Jhd. v. Chr. beschrieb HEROPHILUS die Nerven im menschlichen Körper und stellte eine Verbindung zum Rückenmark fest. Auf ihn geht auch die Einteilung in sensible und motorische Nerven zurück (z.i. SUNDERLAND, 1992). Eine umfassende Beschreibung des peripheren Nervensystems

inklusive der digitalen Nerven liefert GALEN (131 - 201 v. Chr.), der auch berichtet, er habe gesehen und gehört, dass Nerven durchtrennt und mit „unglaublichen Ergebnissen“ wieder verbunden wurden. Von GALEN selbst sind allerdings keine solchen Versuche überliefert (z.i. SUNDERLAND, 1992).

Ein peripherer Nerv (Abb. 1-1A) besteht aus einem kabelartigen Strang aus Faszikeln, die durch eine gemeinsame bindegewebige Hülle, das Epineurium, vom umgebenden Gewebe abgegrenzt sind. Jeder Faszikel enthält eine Vielzahl paralleler NF und ist ebenfalls von einer bindegewebigen Hülle, dem Perineurium, umgeben. Bei den NF handelt es sich um markhaltige oder marklose Axone, die Fortsätze motorischer oder sensibler Neurone darstellen. Befinden sich sowohl motorische als auch sensible Fasern in einem Nerv, so spricht man von einem gemischten Nerv. Schwann-Zellen (SZ), eine spezielle Form der Gliazellen, agieren als Hüll- und Stützzellen, die das Axon einer peripheren Nervenzelle umhüllen und markhaltige Fasern durch eine Myelinhülle elektrisch isolieren. Dabei wickelt sich die Zelle vielfach um ein Axon, bis eine elektrisch isolierende Schicht aus Membranlipiden, die sog. Myelinscheide, die Axonmembran umgibt. Der freiliegende Abschnitt eines Axons zwischen zwei SZ wird als Ranvier’scher Schnürring bezeichnet (Abb. 1-1B).

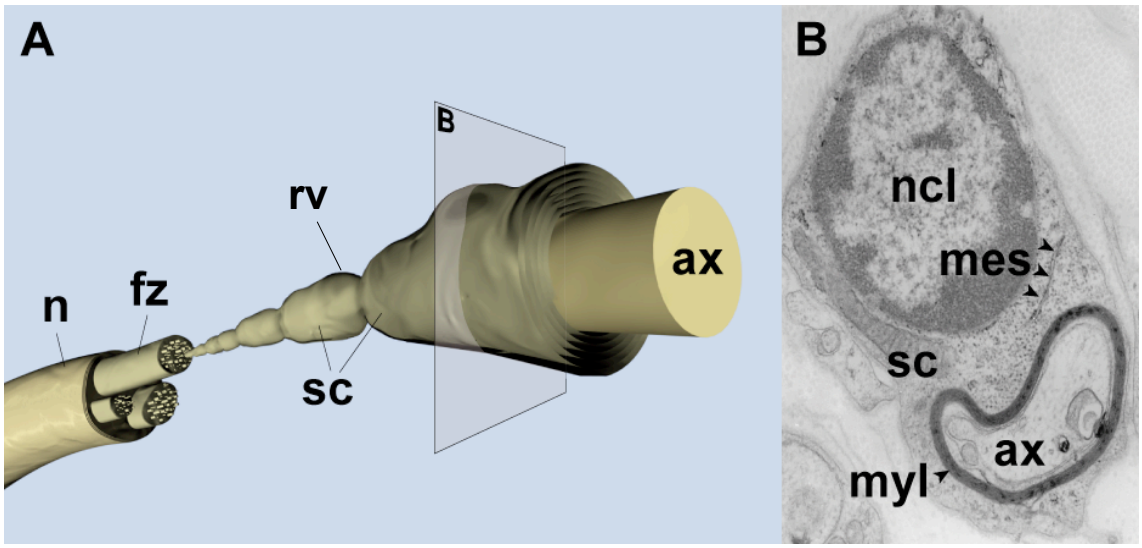

Abb. 1-1: Aufbau eines peripheren Nerven
(A) Schematische Darstellung. Der Nerv (n) besteht aus mehreren Faszikeln (fz), die wiederum zahlreiche Axone (ax) enthalten. Die Axone werden einzeln oder gebündelt von Schwann-Zellen (Sc) ummantelt. Der freiliegende Teil des Axons zwischen zwei Schwann-Zellen wird als Ranvier’scher Schnürring (rv) bezeichnet; (B) Querschnitt durch ein myelinisiertes (myl) Axon (ax) (elektronenmikroskopisches Präparat, Vergr. 5000x). Deutlich sichtbar sind die Lamellen der Markscheide und das äußere Mesaxon (mes), an der Stelle an der sich das Zytoplasma der Schwann-Zelle (sc) um das Axon gewickelt hat und der prominente Nukleus (ncl) der Schwann-Zelle.

1.1.2 NEURONALE REGENERATION IM PERIPHEREN NERVENSYSTEM

Regenerationsvorgänge im peripheren Nervensystem beruhen auf einem komplexen Zusammenspiel zellulärer und molekularer Komponenten, das nach axonaler Verletzung in einem stereotypen, reproduzierbaren Muster aus degenerativen und regenerativen Vorgängen abläuft. Die erste Voraussetzung für einen Regenerationserfolg ist das Überleben der Nervenzelle (Neuron), die dann für die Regeneration wichtige Stoffwechselvorgänge einleiten kann. Das distal der Verletzung gelegene Axon muss ideale Bedingung für die von proximal aussprießenden Fasern schaffen, die wiederum ihren Weg zum richtigen Endorgan finden müssen. Das Endorgan muss schließlich in der Lage sein, reinnerviert zu werden und seine Funktion wieder aufnehmen zu können. Zusätzlich müssen auf zentraler Ebene Anpassungsvorgänge stattfinden, die fehlende oder falsche Reinnervationen zumindest teilweise kompensieren können.

Das Neuron

Das Überleben des Neurons ist neben Alter und Typ der Nervenzelle, Verletzungsart und Distanz zwischen Läsion und Zellsoma insbesondere von dem Zeitraum zwischen Trauma und Wiederherstellung einer Verbindung zum Endorgan abhängig. Je schneller ein durchtrennter Nerv wiederhergestellt wird, desto geringer fällt der neuronale Zelltod aus (FU und GORDON, 1997). Deshalb ist eine frühzeitige Rekonstruktion der axonalen Kontinuität für den späteren Regenerationserfolg von großer Bedeutung.

Das überlebende Neuron stellt nach Durchtrennung seines Axons seine Funktion durch eine Reihe von morphologischen, physiologischen und molekularen Veränderungen von ruhender zu auswachsender Nervenzelle um. Das morphologische Korrelat, eine Auflösung der Nissl-Substanz und Exzentrierung des Nukleus, wird als Chromatolyse bezeichnet (SUNDERLAND, 1992). Es kommt zu einer Umstellung der Proteinbiosynthese, wobei vorrangig Substanzen gebildet werden, die für das Auswachsen der Axone erforderlich sind, wie das wachstumsassoziierte Protein 43 (growth-associated protein, GAP-43) (BORMANN *et al.*, 1998) und Zytoskelettproteine wie Aktin und Tubulin (OLSON, 2002; ZHENG *et al.*, 2001). GAP-43 ist ein Phosphoprotein, das vorwiegend an der Innenseite der Axonmembran lokalisiert ist und dem wachsenden Axon bei der Orientierung hilft, die richtige Leitstruktur zu finden (KWON *et al.*, 2002; PLUNET *et al.*, 2002). Auch die Zytoskelettproteine beeinflussen die Richtung des axonalen Wachstums (XU *et al.*, 2002). Die Synthese von Neurofilamenten (NF-L, NF-M, NF-H) hingegen wird reduziert, was über eine erhöhte Fluidität des Axoplasmas den axonalen Transport erleichtert (MCGRAW *et al.*, 2002). Zytokine und Neuropeptide wie Interleukin 1 und 6 (IL-1, IL-6), Tumornekrosefaktor α und β (TNF-α, TNF-β) und Interferon γ (IFN-γ) wirken proliferationsfördernd auf SZ und stimulieren die Synthese des Nervenwachstumsfaktors (nerve growth factor, NGF) (SHI *et al.*, 2001; STOLL und MULLER, 1999). Gliale Wachstums-

faktoren (glial growth factors, GGF) regulieren das Überleben, die Proliferation und die Reifung der SZ (DONG *et al.*, 1995).

Anterograde Degeneration am distalen Stumpf und die Rolle der Schwann-Zellen

Die Schaffung optimaler Wachstumsbedingungen im distalen Stumpf ist eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche axonale Regeneration. Nach einer Latenzzeit von ein bis zwei Tagen kommt es zu einer anterograden Degeneration des distalen Axonabschnitts, die auch als Waller'sche Degeneration bezeichnet wird (WALLER, 1850). Mit der Auflösung der Axone kommt es auch zu einem Zerfall der Markscheide. Innerhalb des der Lamellen der Markscheiden zerfallender NF bleiben SZ zurück, die sich nach dem Verlust des axonalen Kontaktes dedifferenzieren und von myelinproduzierenden zu regenerationsfördernden Zellen umstellen (DEZAWA, 2000). Diese SZ unterstützen die Nervenregeneration auf autokrine (auf sich selbst gerichtete) und parakrine (auf andere Zellen und direkt auf die Axone gerichtete) Weise (FU und GORDON, 1997). Wachstumsfaktorrezeptoren wie der niederaffine p75 NGF-Rezeptor (NGF-R), das saure gliafibrilläre Protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP), der Gliareifefaktor (glial maturation factor β) und GAP-43 werden vermehrt exprimiert (GEORGIOU und CHARLTON, 1999; YOU *et al.*, 1997). Gleichzeitig wird die Produktion mancher Proteine, die ausschließlich bei der Myelinproduktion benötigt werden, wie z.B. das basische Myelinprotein (MBP), vermindert (YIN *et al.*, 2001). Auch bilden SZ vermehrt Kollagen IV und Laminin als wichtige Komponenten für die Basallamina der NF (YIN *et al.*, 1998). In den ersten zwei Tagen sind die SZ hauptverantwortlich für die Phagozytose des myelinalen Debris (DEZAWA, 2000). Anschließend dedifferenzieren die SZ, proliferieren und bilden längsorientierte Zellsäulen, die sog. (Hanken-)Büngner-Bänder aus, die später als Leitschiene für von proximal aussprießende Axone dienen (IDE, 1996). Sobald die Schwann-Zelle Kontakt zum auswachsenden Axon erhält, wird der Stoffwechsel wieder auf Myelinproduktion umgestellt.

Ab dem zweiten Tag nach der Verletzung wandern dann vermehrt hämatogene Makrophagen in das Läsionsgebiet ein und unterstützen die SZ beim Abbau der Axonsubstanz. Diese Makrophagen sezernieren Mitogene wie platelet derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) und transforming growth factor β (TGF-β), die alle proliferationsfördernd auf SZ wirken (GROTHE und NIKKHAH, 2001). Auch scheinen von Makrophagen sezernierte Faktoren einen Einfluss auf die regenerierenden NF zu haben; so konnte durch externe Applikation von Makrophagen das axonale Aussprießen gesteigert werden (MIYAUCHI *et al.*, 1997).

Retrograde Degeneration am proximalen Stumpf

Gleichzeitig mit der anterograd gerichteten Waller'schen Degeneration kommt es am proximalen Stumpf zu einer retrograden Degeneration, die sich in der Regel aber zunächst nur über wenige Segmente erstreckt. Am proximalen Stumpf bilden sich auf Höhe eines läsionsnahen Ranvier'schen Schnürrings innerhalb weniger Stunden nach Verletzungen Wachstumskegel, aus denen in der Regel mehrere kollaterale Axonsprossen auswachsen (engl. *axonal sprouting*). Das weitere Wachstum der Axone orientiert sich an den Büngner-Bändern und erfolgt mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 1-2 mm/d (MUMENTHALER *et al.*, 1998) in Richtung auf den distalen Stumpf und von dort aus weiter entlang der Binnenstruktur des distalen Nervenanteils in Richtung Zielorgan. Bei ausbleibender Regeneration kommt es auch an diesem Stumpfende zu einem Fortschreiten der Degeneration.

1.1.3 NERVENREGENERATION AUF MOLEKULARER EBENE

Im Rahmen der Regeneration wird eine große Vielzahl verschiedener Moleküle reguliert, die an der Steuerung und Aufrechterhaltung einer gerichteten Nervenregeneration beteiligt sind. Diese Substanzen lassen sich in mechanisch-topische Komponenten, sog. „Pathway-Markers", Wachstumsfaktoren und Proteine der ECM unterteilen. Im Folgenden sollen die wichtigsten dieser Faktoren und deren Funktion erläutert werden. Die Vielfalt der beteiligten Komponenten kann in dieser Arbeit aber bestenfalls exemplarisch erfolgen, eine ausführliche Aufstellung findet sich bei (FANSA und KEILHOFF, 2003).

Wachstumsfaktoren

Schon zu Beginn des 20. Jhds. vermutete RAMÓN Y CAJAL (z.i. RAMÓN Y CAJAL *et al.*, 1991), dass regenerierende Axone verletzter Nerven durch neuronale Wachstumsfaktoren gelenkt werden. Dies konnte 1951 durch LEVI-MONTALCINI und HAMBURGER bewiesen werden. Rita LEVI-MONTALCINI, zu deren Arbeit unter anderem auch die Entdeckung des Nervenwachstumsfaktors (Nerve growth factor, NGF) gehörte, wurde 30 Jahre später zusammen mit Ihrem Laborkollegen Stanley COHEN für Ihre Pionierarbeit mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Der NGF und der vom Gehirn stammende Neurotrophische Faktor (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) gehören zur Familie der Neutrophine (BARDE, 1990), einer Gruppe von neurotrophischen Wachstumsfaktoren, zu denen auch die Neurotrophine 3, 4/5, 6 und 7 (NT-3, NT-4/5, NT-6, NT-7) gezählt werden (THOENEN, 1995; YIN *et al.*, 1998). Diese Neutrophine werden im Rahmen von Regenerationsvorgängen vermehrt im distalen Stumpf produziert, am proximalen Stumpf aufgenommen und über retrograden Transport in den neuronalen Zellkern transportiert, wo sie über eine Regulierung von Transkriptionsfaktoren auf die zelluläre Genexpression Einfluss nehmen (BUTTE, 2001; HEERSSEN und SEGAL, 2002). Experimentell lässt sich der Einfluss von Wachstumsfaktoren eindrucksvoll an Y-förmigen Prothesen beobachten (TOS *et al.*, 2000), bei denen proximaler und distaler Stumpf in entgegenge-

setzte Schenkel der Y-Prothese eingeführt werden und der dritte Schenkel blind endet. In dieser Anordnung erfolgt das Neuritenwachstum bevorzugt durch den Schenkel, der mit dem distalen Nervenende adaptiert ist, was sich durch die am proximalen und in erhöhter Konzentration am distalen Stumpf gebildeten Wachstumsfaktoren erklären lässt. Gerade dieses Konzentrationsgefälle scheint den NF die Orientierung auf ihrem Weg zum distalen Stumpf zu ermöglichen (ANAND *et al.*, 1997; HEUMANN *et al.*, 1987). Das Maximum der NGF-Konzentration liegt zwischen dem zweiten und dritten Tag nach axonaler Schädigung und fällt damit mit dem Einwandern hämatogener Makrophagen zusammen, die ihrerseits über Interleukin-1 direkt auf die NGF-Synthese Einfluss nehmen (LINDHOLM *et al.*, 1987).

Auch die Synthese der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren I und II (Insulin-like growth factors, IGF-I/-II) aus der Insulinfamilie werden nach axonalen Verletzungen im distalen Stumpf hochreguliert (ISHII *et al.*, 1994). IGF-1 wirkt auf Synapsen, Neuronen, Muskelzellen, Makrophagen und SZ gleichermaßen (CAMPANA *et al.*, 1999; KIMPINSKI und MEAROW, 2001; TIANGCO *et al.*, 2001) und unterstützt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Nervenregeneration (FANSA *et al.*, 2002).

Transformierende Wachstumsfaktoren (TGF-β) und die strukturell sehr ähnliche Familie der glialen neurotrophischen Faktoren (Glial cell-line derived neurotrophic factors, GDNF) sind multifunktionale Zytokine, die modulierend in die Prozesse der Nervenregeneration eingreifen und sowohl proliferations- und überlebenshemmend wie -fördernd wirken (BOTTNER *et al.*, 2000; TAKAHASHI, 2001) und darüber hinaus Einfluss auf die Zelldifferenzierung nehmen können (KRIEGLSTEIN *et al.*, 2002). Ihre regenerationsfördernde Wirkung entfalten sie indirekt [oder im Falle der GDNF direkt (SAARMA, 2000)] über Regulation der glialen Synthese von Matrixmolekülen wie Laminin (SULAIMAN und GORDON, 2002) und Induktion von Neutrophinen und Zytokinen wie FGF, CNTF und GDNF (KRIEGLSTEIN *et al.*, 2002).

Fibroblasten Wachstumsfaktoren (Fibroblast growth factors, FGF) werden im Rahmen der peripheren Nervenregeneration von Neuron, Schwann-Zelle, und eingewanderten Makrophagen gebildet (GROTHE *et al.*, 2000; WEWETZER *et al.*, 2001). FGF wirken auf eine Vielzahl biologischer Prozesse wie Mitogenese, Angiogenese und Zelldifferenzierung (CLAUS und GROTHE, 2001). Die im Tierversuch beobachtete Regenerationsverbesserung kann also auf einer proliferationsfördernden Wirkung auf SZ, einem direkten Einfluss auf das geschädigte Neuron oder auch auf einer Steigerung der Angiogenese beruhen (GROTHE und NIKKHAH, 2001).

Zytokine

Wichtige Vertreter der Zytokine sind der ziliare neurotrophische Wachstumsfaktor (Ciliary neurotrophic factor, CNTF), Interleukine (IL), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF-α) und der Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) (UNSICKER *et al.*, 1992). Zyto-

kine sind lösliche Proteine mit mitogener Wirkung, die das Neuritenwachstum und das zelluläre Überleben des Neurons bewirken können. Zudem stellen Zytokine als Mediatoren inflammatorischer Prozesse einen essentiellen Bestandteil der Waller'schen Degeneration dar (SHAMASH *et al.*, 2002). Zytokine bewirken die Expression von MHC-I und MHC-II-Molekülen auf nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen und machen diese für das Immunabwehrsystem erkennbar. Dieser Vorgang ist ausschlaggebend für die Abstoßung von Allotransplantaten (GULATI, 1998; LILJE und ARMATI, 1997).

Extrazelluläre Matrix

Das regenerierende Axon ist bei seiner Orientierung auf chemotaktische Kontaktführung an angrenzenden Strukturen angewiesen. Dabei wachsen Axone in Zellkulturen besonders gut auf Substrat-Adhäsionsmolekülen der ECM, wie Laminin, Kollagen VI und V, Heparansulfat-Proteoglycan, Fibronektin und Tenaszin (TERENGHI, 1995). Diese Substanzen stellen die Hauptbestandteile von Basalmembran und Endoneurium dar und werden *in vivo* von SZ, Fibroblasten und Neuronen gebildet. Laminin spielt zudem eine Rolle bei dem axonalen Aussprießen, der neuronalen Differenzierung und der Formierung von Synapsen (MCGOWAN und MARINKOVICH, 2000). Meist nehmen einzelne Axone eine Wegbereiterrolle ein, indem sie sich durch differenzielle Adhäsion an Gebilden der unmittelbaren Umgebung oder der Basalmembran orientieren. Die anderen Axone können dann – ebenfalls über Kontaktführung – folgen. Diese Kontakte werden durch Adhäsionsmoleküle vermittelt, zu denen die Integrine, die Cadherine und Mitglieder der Superfamilie der Immunglobuline gezählt werden. Integrine sind Transmembranproteine, die sowohl mit dem Zytoskelett, als auch mit der ECM der Basallamina und Rezeptoren angrenzender Zellen in Verbindung stehen. Das von SZ bei Nervenläsionen vermehrt gebildete N-Cadherin vermittelt die Zelladhäsion zwischen SZ untereinander, sowie zwischen Schwann-Zellen und auswachsendem Axon und ist vermutlich an der Stabilisierung der Büngner-Bänder beteiligt. N-CAM und L1, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören, wirken beide über die gleiche Signalkette wie NGF, stehen in Wechselwirkung zu Laminin (HOLLY *et al.*, 2000) und vermitteln ebenfalls Zelladhäsion (WEBB *et al.*, 2001).

1.1.4 ANPASSUNGSVORGÄNGE IM ZNS

Ergänzend zu den lokalen Reparaturmechanismen finden auf Ebene des Zentralen Nervensystems (ZNS) ebenfalls komplexe Anpassungsvorgänge statt, die nach wie vor weitgehend unbekannt sind. Handelt es sich um eine Quetschverletzung des Nervs, so dass die axonale Regeneration über intakte SZ-Basallamina-Schläuche erfolgen kann, wird die individuelle kortikale „Funktionskarte" der entsprechenden Körperregion nach Reinnervation wiederhergestellt. Eine Verletzung mit Nervendurchtrennung bedingt jedoch eine Fehlorientierung von aussprießenden Axonen, auf die das ZNS mit kortikalen und subkortikalen funktionellen Re-

organisierungsprozessen reagiert. Der Innervierung falscher peripherer Zielorgane folgt eine funktionelle synaptische Reorganisierung des somatosensiblen und motorischen Kortex mit Veränderung der „Funktionskarte“ („Remapping“) der betroffenen peripheren Region, um auftretende Fehlfunktionen möglichst gut zu kompensieren (LUNDBORG, 2000). Andererseits werden Fehler in der kortikalen Reinnervation mitverantwortlich für die häufig mangelnde funktionelle Wiederherstellung nach peripheren Nervenverletzungen gemacht (LUNDBORG, 2003).

Bei der Wiederherstellung der sensiblen und motorischen Funktion handelt es sich also um ein komplexes Zusammenwirken regenerativer Vorgänge, begleitet von ebenso komplexen Lern- und Anpassungsvorgängen auf zentraler Ebene. Die große Anzahl der an den Regenerationsvorgängen beteiligten Faktoren und Komponenten öffnet unzählige mögliche Therapieansätze; aber nur ein grundlegendes Verständnis dieser Vorgänge und die konsequente Umsetzung dieses Wissens kann den Weg zu neuen erfolgversprechenden Therapiemöglichkeiten bahnen.

1.2 THERAPIE PERIPHERER NERVENVERLETZUNGEN

Mit jährlich über 300.000 Fällen in Europa (MOHANNA *et al.*, 2003) sind Verletzungen peripherer Nerven sehr häufig. Bei 4,5 % aller Weichteilverletzungen kommt es auch zu einer Kontinuitätsunterbrechungen peripherer Nerven (z.i. DORNSEIFER *et al.*, 2007). Dazu kommt eine nicht publizierte Zahl iatrogener Verletzungen. In 60,5 % aller peripherer Nervenverletzungen ist die obere Extremität betroffen, vorwiegend der N. radialis (NOBLE *et al.*, 1998). Höhe und Schweregrad von Verletzungen großer Nervenstämme der oberen Extremität können von Verletzungen der Fingernerven bis zu Plexusläsionen und von scharfer Durchtrennung bis zu schwerwiegenden Avulsionsverletzungen reichen. Die Folgen für den Patienten reichen von Kälteintoleranz, Dysästhesien und Schmerz bis hin zu lebenslangem Funktionsverlust der Extremität (LUNDBORG, 2003; 2004). Da vor allem junge Männer betroffen sind (MCALLISTER *et al.*, 1996; NOBLE *et al.*, 1998), entstehen aus der resultierenden Arbeitsunfähigkeitsrate auch beträchtliche soziale und wirtschaftliche Folgen (ROSBERG *et al.*, 2005).

1.2.1 KLINISCHE EINTEILUNG DER NERVENVERLETZUNGEN

Bei der klinischen Beurteilung des Verletzungsgrades wird meist die Unterteilung nach SEDDON (1943) oder SUNDERLAND (1951) herangezogen (Tab. 1-1). SUNDERLAND unterscheidet fünf Grade der Nervenverletzungen. Grad I beschreibt einen Leitungsblock bei intaktem Axon und wird meist durch Kompression oder Ischämie verursacht. In der Regel erfolgt eine *restitutio ad integrum*. Die Grade II bis V beinhalten immer eine Kontinuitätsunterbrechungen des Axons und in Abhängigkeit des Grades, die additive Durchtrennung der jeweiligen Hüllstrukturen, was die komplexen Vorgänge der Nervenregeneration und Zielorganreinnervation nach sich zieht. Die vorliegende Studie konzentriert sich auf eine komplette Transsektion des

Nervs, also eine vollständige Kontinuitätsunterbrechung aller nervaler Strukturen auf Querschnittshöhe (Grad V nach SUNDERLAND) mit zusätzlichem Substanzdefekt.

Tabelle 1-1: Einteilung der Nervenverletzungen nach Seddon und Sunderland

Seddon	Sunderland	Definition	Beispiel
Neurapraxie	Grad I	Erhaltene Strukturen, aber vorübergehende Blockierung der Nervenleitung. Dauer der Lähmung: Stunden bis Wochen	Drucklähmung
Axonotmesis	Grad II	Kontinuitätsunterbrechung der Axone bei erhaltener Kontinuität der Nervenhüllen. Regeneration unter optimalen Bedingungen möglich. Dauert Wochen bis Monate	Quetschverletzung
Neurotmesis	Grad III	Kontinuitätsunterbrechung der Axone, aber auch des Endoneuriums.	Grad III bis V z.B. durch Schnittverletzung, Fraktur oder Zerreißung Ab Grad III Regeneration unter erschwerten Bedingungen, über Monate oder gar nicht mehr.
	Grad IV	Kontinuitätsunterbrechung der Axone, des Endoneuriums und des Perineuriums.	
	Grad V	Kontinuitätsunterbrechung der Axone, des Endoneuriums, des Perineuriums, aber auch des Epineuriums.	

1.2.2 THERAPIEPROBLEMATIK

Die beim erwachsenen Menschen relativ langsam erfolgende Regeneration birgt eine Reihe klinischer Gefahren. Nervenläsionen führen zu Degeneration und Atrophie der sensorischen und motorischen Endorgane. Durch die oben beschriebene Regenerationsmechanik steht nur ein kurzes Zeitfenster offen, nach dem es zur vollständigen retrograden Degeneration, zum Untergang des Neurons und zu einem ZNS-Demapping (einem Verlust der Funktionskarte des Gehirns) kommt. Die Folge kann ein irreversibler Funktionsverlust des Körperteils sein. Nach klinischer Erfahrung liegt dieser Zeitraum bei ca. sechs Monaten. Eine verzögerte Rekonstruktion eines Nervendefekts kann jedoch bereits ab einem Monat den Wiederaufbau von Muskelmasse und die damit verbundenen motorische Funktion gefährden (KOBAYASHI *et al.*, 1997). Deshalb ist eine zügige und optimale Versorgung von Verletzungen mit Beteiligung peripherer Nerven entscheidend für den erwünschten Behandlungserfolg.

1.2.3 HISTORIE DER BEHANDLUNG PERIPHERER NERVENVERLETZUNGEN

Die ersten Nervennähte mit „unglaublichen Ergebnissen“ werden bereits im 2. Jhd. n.Chr. von GALEN erwähnt (z.i. SUNDERLAND, 1992). Vor dem späten 19. Jhd. existieren allerdings nur wenige Berichte über versuchte Nervenrekonstruktionen (NAFF und ECKLUND, 2001). Im letzten Jahrhundert verstärkten sich die Bemühungen medizinische Behandlungsmethoden für periphere Nervenverletzungen zu finden. HUETER beschrieb 1873 die Direktnaht eines

peripheren Nerven durch epineural platzierte Nähte, eine Technik die bis heute Anwendung findet (z.i. HARRIS und TINDALL, 1991). Erste Experimente mit Nerveninterponaten wurden bereits im Jahr 1810 von PHILIPEAUX beschrieben (z.i. HARRIS und TINDALL, 1991), eine Möglichkeit, die allerdings lange Zeit als letzter Ausweg betrachtet wurde.

Die beiden Weltkriege, mit ihrer hohen Inzidenz von Nervenverletzungen trieben die Forschung weiter voran (WOODHALL, 1949). Die Fülle an medizinischen Aufzeichnungen über Kriegsverletzungen diente als Grundlage einer großen Anzahl retrospektiver Studien über den Erfolg medizinischer Behandlung von Nervenverletzungen. Die überwiegend als unbefriedigend eingestuften Ergebnisse wurden als Anlass genommen, die wissenschaftlichen Bemühungen im Bereich der chirurgischen Versorgung von Nervenverletzungen zu erhöhen (NAFF und ECKLUND, 2001; WOODHALL, 1949). Zwei wichtige Lehren wurden aus den Erfahrungen während des Krieges gezogen, und zwar, (1) dass verletzte Nervenenden reseziert werden sollten, und (2) dass End-zu-End Rekonstruktionen nicht unter Spannung erfolgen sollten (HARRIS und TINDALL, 1991; MILLESI, 1993). Eine wichtige Methode um Letzteres zu erreichen, war die von Sir Herbert SEDDON wieder eingeführte Idee, ein Nerventransplantat als Interponat zur spannungsfreien Überbrückung von Nervendefekten zu verwenden (z.i. HARRIS und TINDALL, 1991; MILLESI, 1993).

Die Entwicklung des Operationsmikroskops in den 60er Jahren des 20. Jhds. war ein Meilenstein in der chirurgischen Nervenrekonstruktion und ermöglichte eine interfaszikuläre Naht, wie von SUNDERLAND bereits ein Jahrzehnt früher vorgeschlagen (z.i. HARRIS und TINDALL, 1991). Zu den führenden Akteuren bei der Entwicklung mikrochirurgischer Techniken in dieser Zeit zählte Hanno MILLESI, der die Verwendung autologer Nerventransplantate mit interfaszikulärer Naht in Fällen verfocht, in denen eine Primärnaht nicht, oder nur unter Spannung möglich war (MILLESI, 1993).

1.2.4 AKTUELLE THERAPIEANSÄTZE

1.2.4.1 Direktnaht bei kurzen Nervendefekten

Die Überbrückung von Nervenverletzungen ist heute allerdings nach wie vor problematisch (JOHNSON *et al.*, 2005) und mit einer vollständigen Wiederherstellung der Funktion ist selbst in den günstigsten Szenarien nur selten zu rechnen (BELLAMKONDA, 2006; CHALFOUN *et al.*, 2006). Bei glatter Durchtrennung des Nervs empfiehlt sich die primäre End-zu-End Adaptation der Nervenenden. Die Nervennaht kann epineural, perineural (faszikulär) oder epiperineural erfolgen (Abb. 1-2). Eine perineurale Naht kommt nur dann in Frage, wenn sich die einzelnen Faszikel klar zuordnen lassen; andernfalls werden Epi- oder Epiperineuralnaht bevorzugt um Fehlleitungen von Axonen möglichst zu vermeiden. Hinsichtlich des Zeitpunktes der chirurgischen Intervention stand lange eine sekundäre Versorgung nach einem Zeitraum von etwa drei Wochen im Raum, um die Entstehung eines optimalen metabolischen

Potenzials im Nervenzellkörper zu ermöglichen (DUCKER *et al.*, 1969), und z.B. bei Quetschverletzungen die Demarkierung abzuwarten. Heute erfolgt die Behandlung meist in Abhängigkeit des Traumas; so kann bei infizierten oder unklar begrenzten Wundverhältnissen ein zuwartendes Verhalten mit regelmäßiger Wundtoilette, und Rekonstruktion nach Abklingen der Infektion indiziert sein. Ansonsten empfiehlt sich jedoch grundsätzlich ein radikales Debridement mit anschließender Primärversorgung (NINKOVIC, 2006).

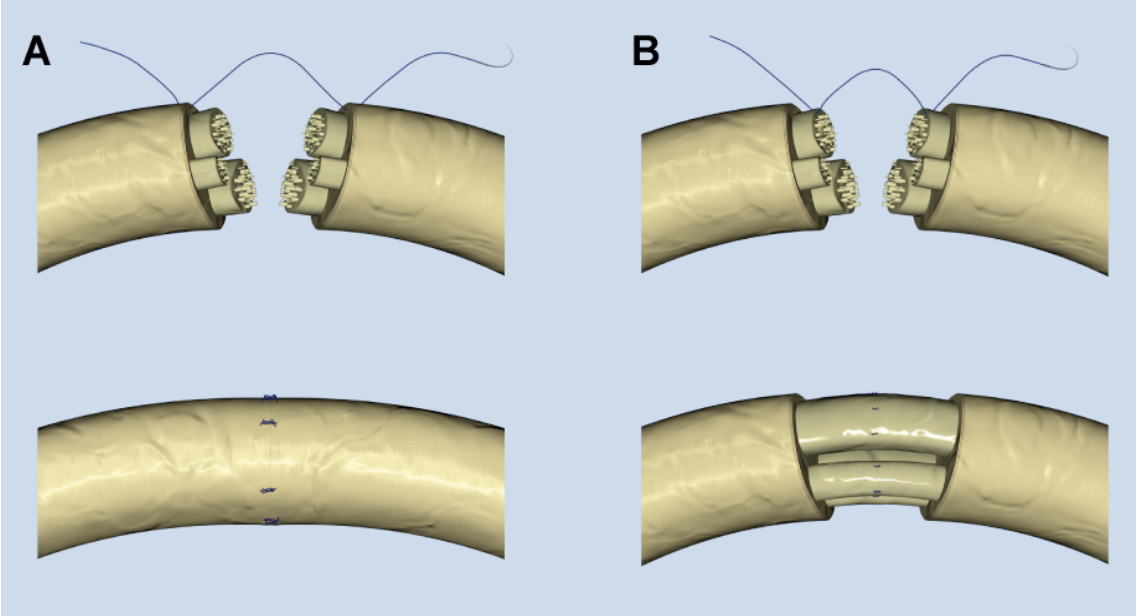

Abb. 1-2: Techniken der End-zu-End Naht eines Nervs
(A) Epineuralnaht. Das Epineurium der beiden Nervenstümpfe wird durch Nähte angenähert, (B) Perineuralnaht. Die einzelnen Faszikel werden durch Nähte vereint. Bei der epiperineuralen Naht (nicht abgebildet) werden mit dem Faden sowohl Peri- als auch Epineurium angeschlungen.

Eine Direktnaht sollte jedoch nur dann angewendet werden, wenn kein größerer Substanzdefekt (wenige Zentimeter) vorliegt (MILLESI, 1981). Eine Naht unter Spannung behindert die Regeneration (KRARUP *et al.*, 2002; MILLESI, 1981) und fördert die Neurombildung (WILLIAMS, 1987). Zwar ist eine Mobilisierung der Nervenenden prinzipiell möglich, aber auch hier sind enge Grenzen gesetzt und der Vorgang ist gestaltet sich zeitaufwändig.

Weitere gelegentlich verwendete Direktnaht-Verfahren sind die Neurotisation und die End-zu-Seit Koaptation; beide Verfahren kommen jedoch nur in gut selektionierten Einzelfällen bei mangelnden Alternativen zur Anwendung. Die End-zu-Seit Koaptation basiert auf der Annahme, dass ein intakter Nerv Axone an das distale Ende eines verletzten Nerven „spenden“ kann. Diese Technik spielt insbesondere bei der Überbrückung besonders langer oder weit proximal gelegener Nervendefekte eine Rolle; beides Situationen, die die Nervenregeneration stark einschränken (z.i. JOHNSON und SOUCACOS, 2008). Unter Neurotisation versteht man eine direkte chirurgisch erzeugte Verbindung zwischen proximalem Nervenstumpf und Muskelbauch; eine Technik, die allerdings nur in selektierten Fällen zum Einsatz kommt. Im Allgemeinen führt diese Methode zu schlechteren Ergebnissen als Direktnaht, End-zu-

Seit-Reparatur oder Nerventransplantat (JOHNSON und SOUCACOS, 2008). Das Mittel der Wahl bei größeren Substanzverlusten (>20 mm) sind Interponate (BELLAMKONDA, 2006).

1.2.4.2 Interponate bei substanziellen Nervendefekten

Besteht eine Kontinuitätsunterbrechung des Nervs mit Substanzverlust, so kommen Interponate zur Anwendung, die zwischen die beiden Nervenstümpfe genäht werden und als Schiene für regenerierende Axone dienen. Dazu wurde bereits eine Vielzahl verschiedener körpereigener und -fremder Materialien getestet. Im Folgenden sollen die wichtigsten heute verwendeten Methoden und Materialien kurz beschrieben werden.

1.2.4.2.1 Biologische Interponate

Autologe Transplantate

Die ersten Versuche mit freien Nerventransplantaten wurden bereits 1876 von ALBERT (1885) durchgeführt. Heute gilt das autologe Nerventransplantat, kurz Autograft, als Therapiestandard bei größerem Substanzdefekt (BELLAMKONDA, 2006; CHALFOUN *et al.*, 2006). Dabei werden funktionell weniger wichtige Nerven, wie der N. suralis als Spendernerv entnommen und zur Überbrückung des Nervendefekts mikrochirurgisch zwischen proximalen und distalen Nervenstumpf genäht. Der wesentliche Vorteil des vitalen Nerventransplantats liegt neben der Spannungsreduktion darin, dass SZ die Transplantation überleben und für durchwachsende Axone ein optimales Milieu schaffen. Dabei garantiert bei angemessen dünnen Transplantaten die Diffusion das Überleben der SZ, bis es zur Neovaskularisierung kommt. Der überbrückende Nerv löst zudem als autologes Gewebe keine Immunreaktion aus, ist resorbierbar, permeabel und steht deshalb im direktem Austausch mit seiner Umgebung. Des Weiteren bilden der longitudinale Faserverlauf und die Büngner-Bänder im Nerventransplantat ein komplexes Leitschienensystem für die aussprießenden Axone.

Die Methode ist allerdings auch mit einer Reihe teils schwerwiegender Nachteile verbunden. Die Langzeitergebnisse sind schwer vorhersehbar, differieren stark (MACKINNON und DELLON, 1988; MILLESI, 1981) und selbst unter optimalen Bedingungen wird ein vollständiges Wiedererlangen der nervalen Funktion nur selten erreicht (BELLAMKONDA, 2006; CHALFOUN *et al.*, 2006). Die Implantierung von Nerventransplantaten ist zeitaufwändig und erfordert technische Erfahrung. Zudem ist die Entnahme des Nerventransplantats mit einem operativen Mehraufwand verbunden (MEEK und COERT, 2002) und verursacht einen Hebedefekt, der ein Risiko für Begleitmorbidität darstellt (Narbe, sensible Defizite und Neurombildung in der Spenderregion) (FIELDS *et al.*, 1989). Da als Spendernerv generell ein rein sensibler Hautnerv gewählt wird, müssen motorische Axone durch eine potenziell hemmende Umgebung wachsen (MARTINI *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1995). Durch die aussetzende vaskuläre Versorgung des Autografts kommt es zur Fibrosierung, die das Gewebe verdichtet und ein Durchwachsen von NF behindern kann; gerade bei großkalibrigen Nerven besteht zudem die

Gefahr der zentralen oder segmentalen Nekrose. Auch ein Auswachsen von NF in extraneurale Gewebe wurde beobachtet (z.i. MEEK *et al.,* 2004). Ein weiterer Faktor, der die Regeneration durch ein Nerventransplantat beeinträchtigen kann, ist die Tatsache, dass regenerierende NF bei Verwendung eines Nerventransplantats zwei Nahtlinien überqueren müssen. Dies führt zu einem Verlust von Fasern an jeder Nahtlinie (EPPLEY und DELFINO, 1988; SCOTT, 1996) und erhöht wiederum die Gefahr der Neuromentstehung (z.i. MEEK *et al.,* 2004). Gegenüber früherer Meinung ist der Beitrag der im Autotransplantat vorhandenen SZ ebenfalls kritisch zu bewerten, denn diese Zellen produzieren neben förderlichen Wachstumsfaktoren auch Substanzen, die das Wachstum hemmen, sog. „Neurite Outgrowth Inhibitors“, wie das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) (DE BELLARD und FILBIN, 1999). Es konnte diesbezüglich nachgewiesen werden, dass aussprießende Axone, die auf SZ treffen, in frühen Phasen der Nervenregeneration teilweise degenerieren (BUNGE und BUNGE, 1978). Hier bedarf es zusätzlich einer digestiven Leistung von Makrophagen, um diese Faktoren zu beseitigen. Die durch SZ forcierte Myelinisierung geht wiederum auf Kosten der Reinnervationsgeschwindigkeit, die als wesentlicher Faktor für das spätere motorische und sensible Ergebnis gilt (KRARUP *et al.*, 2002). Einen weiteren wesentlichen Nachteil des autologen Nerventransplantats stellt die begrenzte Menge an geeigneten Spendernerven dar, weshalb gerade bei ausgedehnten Nervendefekten (z.B. Plexus brachialis) eine vollständige Rekonstruktion häufig unmöglich ist (SCHALLER und BERGER, 1987).

Die zahlreichen Nachteile des autologen Nerventransplantats waren Anlass, die Eignung anderer autologer Gewebe für die Rekonstruktion peripherer Nervendefekte zu untersuchen. Bereits 1880 versuchte GLUCK Nerven mit entkalzifiziertem Knochen zu überbrücken. Ein Jahrzehnt später beschrieb BÜNGNER (z.i. TARAS *et al.*, 2005) die Verwendung der Arteria brachialis einer Leiche zur peripheren Nervenrekonstruktion. Anfang des 20. Jhds. wurden die ersten Versuche mit Venen als Leitschiene im Rattenmodell unternommen (FORMATTI, 1904; NAGEOTTE, 1915). In den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden die ersten Nervenrekonstruktionen mit Faszien- und Venentransplantaten am Menschen durchgeführt (PLATT, 1919-1920). Venen (TANG *et al.*, 1995), Arterien (ANDERSON und TURMAINE, 1986), Gewebeblöcke aus frischer oder denaturierter Skelettmuskulatur (BRYAN *et al.*, 1993; LASSNER *et al.*, 1994), Synovialgewebe (MACKINNON *et al.*, 1985), Amniongewebe (DANIELSEN *et al.*, 1988a), Sehnen (CHALFOUN *et al.*, 2006) und isoliertes Epineurium (AYHAN *et al.*, 2000) wurden ebenfalls verwendet. Auch alternative chirurgische Methoden, wie longitudinal orientierte Nähte (SCHERMAN *et al.*, 2000), End-zu-Seit Rekonstruktion (MILLESI, 2007) und Nervendistraktionen (D'ANJOU *et al.*, 1989) wurden bereits untersucht.

Allograft und Immunsuppression

Leichennerven (Allografts) ermöglichen eine vergleichbare Regeneration und Funktion wie Autografts, ohne auf das körpereigene Spendermaterial begrenzt zu sein. Allerdings lösen allogene Nerventransplantate eine Immunreaktion im Empfänger aus (CHALFOUN *et al.*, 2006) und erfordern daher eine vorübergehende (ca. 2 Jahre) Immunsuppression (MACKINNON *et al.*, 2001) mit allen bekannten (Malignome) und unbekannten Risiken und unerwünschten Arzneimittelwirkungen, bis das Allograft im Rahmen der Regeneration größtenteils durch autologes Gewebe ersetzt wurde. Im Gegensatz zur Allotransplantation solider Organe ist ein Überwachung der Organfunktion kaum möglich, sodass eine Abwehrreaktion nur selten rechtzeitig erkannt werden kann. In dem Moment in dem eine Abwehrreaktion beobachtet wird (meist durch eine Hautinfektion oder Erythem), ist es meist zu spät das Allotransplantat medikamentös zu retten. In Anbetracht anderer Alternativen sollte sich die Indikation von Nerven-Allotransplantaten daher auf irreparable periphere Nervenverletzungen beschränken, die unbehandelt zu einem funktionellen Verlust der Gliedmaße führen würden (MOORE *et al.*, 2009).

Neue Ansätze beschäftigen sich mit der Reduktion der Antigenität allogener Transplantate (BERGER *et al.*, 2007b). Azelluläre Transplantate neigen, obwohl sie nicht mehr immunogen sind (SONDELL *et al.*, 1998), zu verstärkten Entzündungsreaktionen nach Implantation. Dies hängt ursächlich damit zusammen, dass der Denaturierungsprozess entweder die zellulären Bestandteile nicht vollständig aus dem Transplantat entfernen kann oder eine zerstörte ECM zurücklässt (MACKINNON *et al.*, 1984b; POLLARD und FITZPATRICK, 1973). Auch wenn neuere Denaturierungsverfahren erfolgreicher beim Erhalt der strukturellen Integrität sind (HUDSON *et al.*, 2004), ist allen Denaturierungsverfahren gemein, dass sie die SZ mehr oder weniger vollständig zerstören. Transplantate, die keine lebensfähigen SZ enthalten, führen allerdings meist zu keiner ausreichenden neurologischen Regeneration (MACKINNON *et al.*, 1984b; 1987). Bemerkenswerterweise haben manche immunsuppressive Substanzen wie FK506 (Tacrolimus) selbst einen positiven Einfluss auf periphere Nervenregeneration (CHUNASUWANKUL *et al.*, 2002; SNYDER *et al.*, 2006). Diese neurotrophische Wirkung scheint interessanterweise unabhängig von der immunsuppressiven Wirkung zu sein. So konnten mittlerweile Anteile des FK506 vom Rest des Moleküls separiert werden und einige dieser Liganden wirken tatsächlich *in vitro* und *in vivo* regenerationsfördernd, ohne die systemischen Nebenwirkungen einer Immunsuppression zu verursachen (GOLD *et al.*, 1998; HARPER *et al.*, 1999). Auch wenn der Weg zu einer klinischen Anwendung noch weit ist, ist in Zukunft eine nebenwirkungsarme systemische Anwendung dieser sog. „Immuno-„ oder „Neutrophiline“ in der Therapie peripherer Nervenverletzungen durchaus denkbar.

1.2.4.2.2 Synthetische Schienen

Seitdem 1979 erstmals mesotheliale Röhren zur Überbrückung von Nerven verwendet wurden (LUNDBORG und HANSSON, 1979), konnten – dank der enormen Fortschritte im Bio- und Tissue-Engineering Bereich – artifizielle Nervenschienen aus zahlreichen bioresorbierbaren und nicht-bioresorbierbaren Materialien hergestellt werden (BELKAS *et al.*, 2004). Die Anwendung künstlicher Nervenleiter erfordert keinen zusätzlichen Hebedefekt, verringert den Operationsaufwand und bietet zudem den Vorteil einer hohen Verfügbarkeit von Interponaten in allen geforderten Ausmaßen, wodurch starke Kalibersprünge zwischen Empfängernerv und Interponat (*engl.* mismatch) verhindert werden können. Zudem lassen sich die Nervenstümpfe meist mit nur einer Naht pro Nervenende in der künstlichen Schiene fixieren, was nicht nur die Adaptation vereinfacht und Operationszeit einspart, sondern auch die Bildung von Narbengewebe reduzieren kann (z.i. DORNSEIFER *et al.*, 2007).

Nicht-bioresorbierbare Schienen

Nicht-bioresorbierbare Schienen wurden bereits aus Polymethacrylat (KATAYAMA *et al.*, 2006), Silikon (FRANCEL *et al.*, 1997; LUNDBORG *et al.*, 1982; MEEK und COERT, 2002), sowie Polyethylen und Polyvinyl (MEEK und COERT, 2002) hergestellt. Das am häufigsten verwendete Schienenmaterial ist Silikon, ein synthetisches Polymer, bei dem Siliciumatome über Sauerstoffatome verbunden sind. Silikon ist impermeabel, wodurch eine Diffusion neurotroper (Nervensystem-affiner) und neurotropher (Nervensystem-„ernährender“) Substanzen, die am Stumpf gebildet werden, reduziert wird (SONDELL *et al.*, 1999). Auch ein unkontrolliertes Aussprießen von NF wird durch die Röhrenwand verhindert, wodurch die Reinnervation der Zielorgane erleichtert wird (MADISON *et al.*, 1996). Dies spiegelt sich auch in den guten klinischen Ergebnissen bei der Rekonstruktion kurzer (<10 mm) Defekte wider (DAHLIN und LUNDBORG, 2001; LUNDBORG *et al.*, 1997).

Allerdings reduziert die Impermeabilität von Silikonröhren zwar den Verlust von neurotrophen Faktoren, vermindert dadurch aber gleichzeitig auch den Austausch mit dem umliegenden Gewebe. Dieser Austausch scheint jedoch gerade bei der Überbrückung größerer Defektlängen eine wichtige Bedeutung zu haben (FUGLEHOLM *et al.*, 1998). Ein weiterer entscheidender Nachteil von Silikon und anderen nicht-resorbierbaren Materialien ist, dass diese Materialien als Fremdkörper *in situ* verbleiben und chronische Fremdkörperreaktionen mit übermäßiger Bildung von narbigem Gewebe auslösen können (MEEK und COERT, 2002). Dies führt wiederum zu Nervenkompressionen und schließlich zu einer Beeinträchtigung der nervalen Funktion (LUNDBORG *et al.*, 1994b; MERLE *et al.*, 1989). Zudem besteht die Möglichkeit, dass das relativ starre, rigide Material bricht (YOSHII und OKA, 2001a) oder mit der Zeit seine Position verändert, wodurch der Nerv ebenfalls komprimiert und die nervale Funktion beeinträchtigt werden kann (MERLE *et al.*, 1989).

Bioresorbierbare Schienen

Im Anbetracht der mit Silikon verbunden Nachteile erscheint die Verwendung biokompatibler, resorbierbarer, (semi-)permeabler Materialien als sinnvoll. Die Idee hinter der Verwendung bioresorbierbarer Nervenschienen liegt darin, das Nervenwachstum in Richtung distalem Stumpf zu lenken und gleichzeitig das Einwachsen von fibrösem Gewebe in die Nervenlücke und eine Neuromentstehung zu unterbinden. Nach der vollständigen Kontinuitätswiederherstellung hat die Nervenschiene Ihre Aufgabe erfüllt und sollte abgebaut werden. Zu diesem Zeitpunkt ist die Schiene nachweislich nicht nur nutzlos, sondern schädlich für die weitere Regeneration (HENRY *et al.*, 1985).

Die Rekonstruktion mit (leeren) resorbierbaren Nervenschienen führt zu der schnellsten bisher festgestellten Nervenregeneration und ist sogar schneller als durch ein autologes Nerventransplantat (DEN DUNNEN *et al.*, 1996b). Beispiele für biokompatible Materialien, die bereits als Nervenleitschiene Verwendung fanden, sind Poly-Phosphazin (DANIELSEN *et al.*, 1988b), Polyglycolsäure (PGA) (DELLON und MACKINNON, 1988), Glycolit-Trimethylen-Carbonat (MACKINNON und DELLON, 1990), Lactatsäure-Polymere (PLA) wie Copolymer Poly-Lactid/Glycolsäure (BRYAN *et al.*, 2000; HADLOCK *et al.*, 1998) und Copolymer Lactid/ε-Caprolacton (DEN DUNNEN *et al.*, 1996b; 2000; MEEK *et al.*, 1999b), Kollagen Typ I (ARCHIBALD *et al.*, 1991; CHAMBERLAIN *et al.*, 2000; MADORSKY *et al.*, 1998) sowie eine Mischung aus Kollagen Typ I und III (ALLUIN *et al.*, 2009; STANG *et al.*, 2005). Die Materialien werden für gewöhnlich innerhalb von Monaten oder Jahren vollständig resorbiert. Um eine mögliche Gewebsreaktion (DAHLIN und LUNDBORG, 2001) oder Schwellung des Materials (DEN DUNNEN *et al.*, 1997) im Rahmen der Degradierung zu verhindern, sollten die Schienen allerdings möglichst dünnwandig konstruiert werden um wenig Resorptionsfläche zu bieten, ohne jedoch die Stabilität des Gerüsts zu gefährden (MEEK, 1997). Ein häufig zur industriellen Herstellung bioresorbierbarer Nervenleiter verwendetes Material ist Kollagen, das auch in der vorliegenden Studie verwendet wurde, auf das aber weiter unten genauer eingegangen werden soll.

Modifizierte Schienen

Die Vielzahl von Komponenten und Faktoren, die an regenerativen Vorgängen im PNS beteiligt sind, eröffnen nahezu unbegrenzte Möglichkeiten für potenzielle Therapieansätze. Das Schienengerüst kann durch Zugabe biogener Gewebe, Zellen oder Faktoren weiter modifiziert und bereichert werden. Auf diese Weise wurde bereits das Einbringen von denaturierter autologer Muskulatur (MEEK *et al.*, 1999a; 2001a) oder kurzer Nervensegmente (FRANCEL *et al.*, 2003) in das Schienengerüst mit gutem Erfolg getestet. Alternativ oder zusätzlich können wachstums- bzw. regenerationsfördernde Zellen wie Schwann-Zellen (HADLOCK *et al.*, 2000; KEILHOFF *et al.*, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 2000), Makrophagen (MIYAUCHI *et al.*, 1997) oder

Stammzellen verschiedenen Ursprungs (CHALFOUN *et al.*, 2006) in das Gerüst eingebracht werden. Neurotrophische und neurotropische Substanzen, wie NGF (DA-SILVA und LANGONE, 1989; FINE *et al.*, 2002; MOHAMMAD *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 1999), BDGF (HONTANILLA *et al.*, 2007; VOGELIN *et al.*, 2006), Insulin-like growth factor (FANSA *et al.*, 2002), CNTF (HO *et al.*, 1998), FGF (IKEGUCHI *et al.*, 2006) können ergänzend oder alternativ angewandt werden.

Bei all der Euphorie um neurotrophische Substanzen in der Behandlung von Nervenverletzungen sind jedoch nach wie vor wichtige Fragen zu Dosierung, möglicher Toxizität und Kanzerogenität noch nicht hinreichend geklärt. So ist z.B. noch immer unklar, ob hohe Serumspiegel verschiedener Wachstumsfaktoren nicht selbst abnorme synaptische Schaltungen induzieren und damit eher selbst neurologische Fehlfunktionen auslösen (STOLL und MULLER, 1999). Nicht vergessen werden darf auch, dass es sich bei den meisten Wachstumsfaktoren um Mitogene handelt, die potenziell kanzerogen wirken. Von IGF-I ist beispielsweise bekannt, dass es proliferationsfördernd auf Prostata-Epithelzellen wirkt, und dass hohe IFG-I Plasmaspiegel mit einem erhöhten Risiko für Prostatakarzinom einhergehen (CHAN *et al.*, 1998).

Zudem beschränken sich die meisten bisherigen experimentellen Ansätze darauf, neutrale Schienen mit einem oder mehreren regenerationsfördernden Faktoren zu „beimpfen“, was der Komplexität der Vorgänge und den vielen Voraussetzungen der peripheren Nervenregeneration (siehe oben) nicht gerecht werden kann. Zunehmend wird daher die Forderung nach einem Nervenleiter mit dreidimensionaler Struktur und gradiierter Verteilung essentieller Faktoren und/oder Zellen laut, um die physiologische Situation möglichst genau nachempfinden zu können (BELLAMKONDA, 2006; BERGER *et al.*, 2007a; KIM *et al.*, 2007).

1.2.5 AXONALE REGENERATION DURCH NERVENLEITSCHIENEN

Das Grundprinzip einer Nervenkammer

Die prinzipielle Idee hinter der Verwendung von monotubulären Nervenleitern (Röhren) ist es, eine Kammer (*engl.* „nerve chamber“) zu schaffen, die als Führungsschiene der aussprießenden Axone dienen und damit eine gerichtete Nervenheilung unterstützen soll. Diese Grundidee stellt einen biologischen Ansatz zur Nervenheilung dar, bei dem der Chirurg einen Schritt zurück tritt und stattdessen die intrinsische Heilungsfähigkeit der Nerven in den Mittelpunkt rückt. Durch die Röhre wird zwar die generelle Richtung vorgegeben, innerhalb des Lumens jedoch können sich die auswachsenden NF auf der Suche nach ihrem Zielorgan spontan orientieren. Das ungerichtete Aussprießen von NF und die damit verbundene Gefahr der Neurombildung soll durch die mechanische Barriere der Röhrenwand verhindert werden. Auf der anderen Seite soll diese künstliche Kammer das Einwachsen von Gewebe verhindern, die den Heilungsprozess beeinträchtigen könnten und gleichzeitig intrinsische

Wachstumsfaktoren *in situ* halten. Experimentell konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Nervenleitschienen den intrinsischen Regenerationsvorgang unterstützen und beschleunigen kann (ANSSELIN *et al.*, 1997; 1996; BRYAN *et al.*, 2000; DEN DUNNEN *et al.*, 1996b; FANSA *et al.*, 2001).

Regenerationsvorgänge durch leere Röhren

Die regenerativen Vorgänge innerhalb von Nervenschienen basieren auf den bereits beschriebenen Prinzipien der peripheren Nervenregeneration nach Verletzung. Es lassen sich vier Phasen unterscheiden (WILLIAMS *et al.*, 1983) (Abb. 1-3):

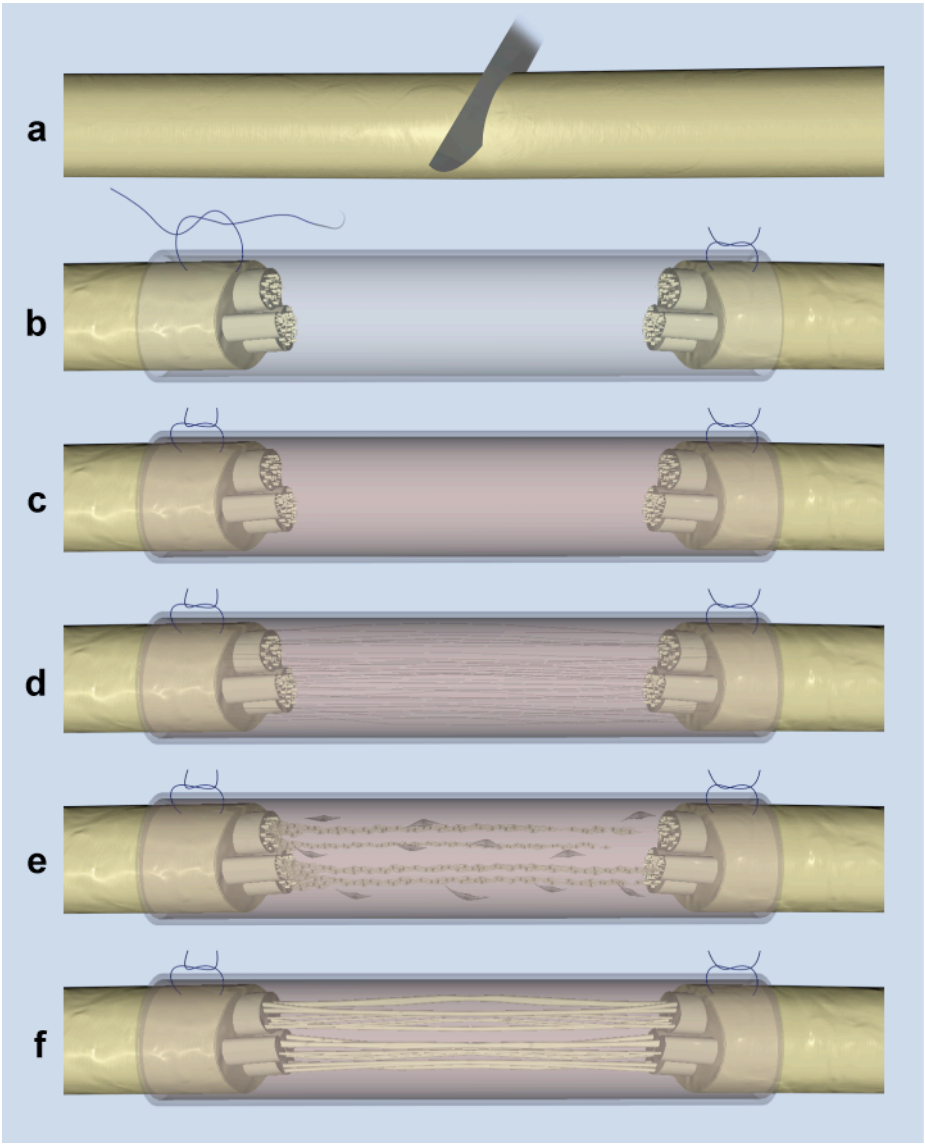

Abb. 1-3: Phasen der axonalen Regeneration durch einen Nervenleiter
Schematische Darstellung. (a) Neurotomie (b) Chirurgische Überbrückung des Defekts mit einer artifiziellen Nervenschiene. (c) Flüssige Phase (1. Tag). (d) Matrixphase (2.-6. Tag). (e) Zelluläre Phase (7.-14. Tag). (f) Axonale Phase (15.-18. Tag). Modifiziert und ergänzt nach WILLIAMS *et al.* (1983).

Am ersten Tag nach Rekonstruktion eines peripheren Nervendefekts mit einer Nervenleitschiene (Abb. 1-3b) bildet sich in der Röhre ein seröses Exsudat; man spricht von der „flüssigen Phase“ (Abb.1-3c). Diese proteinreiche Flüssigkeit besitzt eine neurotrophe Wirkung

auf Neurone und führt zu einer Stimulation des axonalen Wachstums (LONGO *et al.*, 1983). Zwischen dem 2. und 6. Tag bildet sich eine Fibrinbrücke aus zellfreien Fibrinkabeln (Abb. 1-3d) aus (EVANS, 2001; HUDSON *et al.*, 2000), die die Schwann-Zell-Infiltration und die Formierung der Büngner-Bänder ermöglicht und regenerierenden Axonen als Matrix dient. Während der zellulären Phase vom 7. bis 14. Tag migrieren Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und SZ aus beiden Nervenstümpfen in das Regenerationsgebiet (Abb. 1-3e). Die Fibroblasten und SZ bilden eine kontinuierliche Zellbrücke zwischen den Nervenenden, die mit einer einfachen perineuralen Hülle vergleichbar ist (SCHRÖDER *et al.*, 1993). In der axonalen Phase vom 15. bis 28. Tag kommt es schließlich zu einer Aussprossung von zunächst marklosen Axonen vom proximalen zum distalen Stumpf (Abb. 1-3f). Etwa 5 Tage zeitverzögert setzt nach dem Neuritenwachstum die Myelinisierung ebenfalls von proximal nach distal ein. Das distale Nervenende wird nach ca. 28 Tagen (bei 1 cm Schienenlänge) von den aussprießenden NF aus dem proximalen Stumpf erreicht. Ein erfolgreiches Auswachsen von NF durch artifizielle Nervenschienen ist von mehreren Variablen abhängig, wobei die Länge des Defektes und das Mikromilieu innerhalb der Schiene die wichtigsten Faktoren darstellen (LUNDBORG, 2004). Ein optimales Milieu besteht aus einem longitudinal angeordneten strukturellen Gerüst, das auswachsenden Axonen als Leitstruktur dient. Während der Frühphase der Regeneration myelinisieren die reiferen Axontriebe und bilden regenerative Einheiten. Diese Einheiten werden von neuen unmyelinisierten Fasern infiltriert und in Minifaszikeln zusammengeschlossen, die jeweils von einem eigenen Perineurium umschlossen sind (THOMAS und JONES, 1967). Während dieses Prozesses kommt es unausweichlich zur Durchmischung von Fasermodalitäten (sensibel, motorisch), doch kann das Gehirn durch komplexe Anpassungsvorgänge die Kontrolle über Zielgewebe bzw. Zielorgan zum großen Teil wiedererlangen (LUNDBORG, 2003; SANES und DONOGHUE, 2000).

1.3 BASIS UND ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT

1.3.1 KOLLAGEN ALS SCHIENENMATERIAL

Kollagene sind eine Familie aus 28 fibrillären Proteinen mit einer Tripel-Helix-Struktur. Sie zählen mit 25 % des Gesamtproteingehalts des Körpers zu den wichtigsten Strukturproteinen der ECM. Kollagen Typ I, das häufigste gebildete Kollagen im menschlichen Körper, ist eines der ältesten natürlichen Polymere, die als Biomaterial verwendet werden. Von Kollagen ist weithin bekannt, dass es die zelluläre Proliferation anregt und zur Wundheilung beiträgt (WAITAYAWINYU *et al.*, 2007). Darüber hinaus stellt Kollagen eine biologische Unterstützung für Zellwachstum dar und ist an der Differenzierung vieler Zelltypen beteiligt (KLEINMAN *et al.*, 1981; MADISON *et al.*, 1985). Die Verwendung von Kollagen-Nervenschienen hat sich im Tierexperiment für die Überbrückung von Nervendefekten als sehr effektiv erwiesen

(ARCHIBALD *et al.*, 1991; 1995; CHAMBERLAIN *et al.*, 1998; COLIN und DONOFF, 1984; KRARUP *et al.*, 2002; LI *et al.*, 1992).

Ein wesentlicher Vorteil dieses Materials liegt in der vollständigen Resorption bei nur minimaler Entstehung von Narbengewebe und Umgebungsreaktion (ARCHIBALD *et al.*, 1991; LI *et al.*, 1992); selbst nach dreieinhalb Jahren zeigen sich keine Anzeichen für eine kompressionsbedingte Neuropathie (ARCHIBALD *et al.*, 1995). Ein weiterer Vorteil ist die Semipermeabilität der Röhrenwand, die es ermöglicht, dass wichtige Nährstoffe und Wachstumsfaktoren aus der Umgebung in das Röhrenlumen diffundieren können (LI *et al.*, 1992).

Bei der Rekonstruktion kurzer Distanzen sind die Ergebnisse von Kollagenschienen mit Direktnaht und Autograft vergleichbar (ARCHIBALD *et al.*, 1995; KRARUP *et al.*, 2002). Selbst bei längeren Strecken (20-30 mm), bei denen leere Kollagenröhren nicht mehr ausreichend sind (KRARUP *et al.*, 2002), ließen sich mit kompakten Kollagenfaserbrücken noch vergleichbare Ergebnisse wie mit Nerventransplantaten erzielen (YOSHII und OKA, 2001a, b; YOSHII *et al.*, 2002). Diese letzte Beobachtung unterstreicht auch die Relevanz einer geeigneten Füllmatrix, wie hier Kollagenfasern, um die Funktion der Büngner-Bänder als Leitstruktur für wachsende Axone zu ersetzen.

1.3.2 DIE BEDEUTUNG EINER GEEIGNETEN FÜLLMATRIX

Regenerierende Axone orientieren sich neben dem Konzentrationsgefälle neurotropher Faktoren auch an Strukturen ihrer unmittelbaren Nachbarschaft (LETOURNEAU, 1975). Angrenzende Strukturen regenerierender Axone sind SZ und deren Basallamina, Fibroblasten, Kollagen, sowie zumindest in der Initialphase der Regeneration axonale Trümmer, degenerierendes Myelin und phagozytierende Zellen. Die SZ-Basallamina aus Laminin und Fibronektin stellt einen potenten Promotor des Neuritenwachstums dar (BOZYCZKO und HORWITZ, 1986; ROGERS *et al.*, 1983). Ist die Nervenlücke allerdings zu groß, so ist die Ausbildung einer Fibrinbrücke und der Büngner-Bänder zwischen proximalem und distalem Stumpf und damit die Ausbildung einer für gerichtete Nervenregeneration notwendigen Leitstruktur gefährdet (BELLAMKONDA, 2006). Diese fehlenden Leitstrukturen müssen folglich bei der Überbrückung größerer Substanzdefekte durch Einbringen einer geeigneten Matrix ersetzt werden, um optimale Bedingungen für die regenerierenden Axone zu garantieren. Dass ein gerichtetes Neuritenwachstum auch durch unspezifische Kanäle prinzipiell möglich ist, konnte bereits gezeigt werden (NGUYEN *et al.*, 2002).

Mit dem Vorhandensein einer geeigneten Leitstruktur lassen sich im Vergleich zu matrixfreien Röhren auch die guten Ergebnisse von Nervenschienen erklären, die mit Muskulatur (COUTURIER *et al.*, 2002), autologem Nervengewebe (TANG, 1995) Kollagenfasern (MATSUMOTO *et al.*, 2000; YOSHII und OKA, 2001a; YOSHII *et al.*, 2002; 2004) oder Chitosan (ISHIKAWA *et al.*, 2007), einem Polysaccharid-Derivat von Chitin, gefüllt wurden. Eine geeig-

nete Füllmatrix sollte eine dreidimensionale, offenporige Struktur mit Führungsschläuchen aufweisen, die auswachsende Axone auf dem Weg zum distalen Stumpf leiten.

1.3.3 Denaturierte Muskulatur als Schienenmatrix

Muskulatur hat einen strukturell recht ähnlichen hierarchischen Aufbau wie ein Nerv. Jeder Muskel wird von einer bindegewebigen Hülle umgeben. Innerhalb der Muskeln sind mehrere Muskelfasern zu Faszikeln gebündelt, wobei jeder Faszikel wenige hundert bis viele tausend Muskelfasern enthalten kann. Muskelfasern bestehen aus langen, parallel angeordneten Myofibrillen und sind von einer longitudinal ausgerichteten Basalmembran umgeben. In Abb. 1-4 ist der Aufbau eines Skelettmuskels schematisch dargestellt.

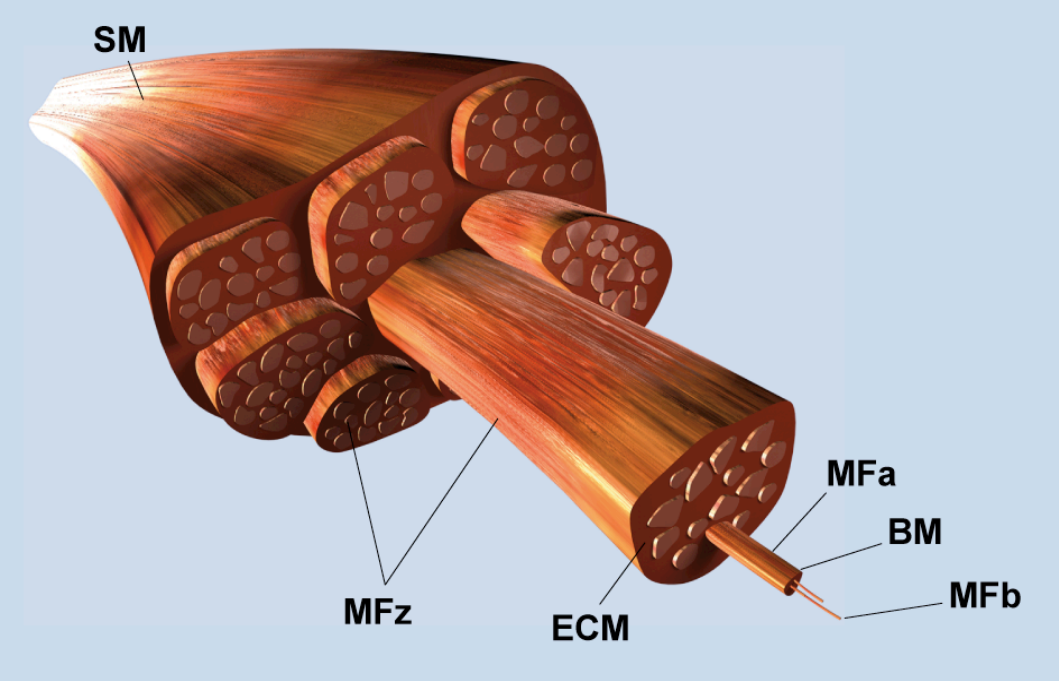

Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Anatomie eines Muskels
Ein Skelettmuskel (SM) besteht aus mehreren Muskelfaszikuli (MFz); Ein Muskelfaszikel wiederum besteht aus einem Bündel Muskelfasern (Mfa), von denen jede von einer Basalmembran (BM) umhüllt ist; Die Muskelfasern werden durch extrazelluläre Matrix (ECM) von einander getrennt. Jede Muskelfaser enthält Myofibrillen (MFb).

Auf der Suche nach Alternativen zum autologen Nerventransplantat wurden auch Versuche mit autologen Venentransplantaten mit unterschiedlichem Erfolg durchgeführt (Malizos *et al.*, 1997; Risitano *et al.*, 2002; Walton *et al.*, 1989). Dabei stellten die zu Kollabierung neigenden und wenig stabilen Venenwände ein großes Problem dar (Chiu und Strauch, 1990). Das Befüllen der Venen mit Muskelgewebe führte zur nötigen Stabilität (Couturier *et al.*, 2002). Dabei zeigte sich, dass Muskelgewebe, insbesondere denaturierter Muskel, auch eine gute Matrix für das Wachstum der Axone darstellt (Couturier *et al.*, 2002). Verantwortlich hierfür ist vermutlich die offenporige Struktur der Extrazellulärmatrix mit longitudinaler Orientierung der Basallamina-Schläuche, die – vergleichbar mit den Büngner-Bändern – als Gerüst für die aussprießenden Axone zum distalen Nervenstumpf dienen (Bertelli *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Keilhoff *et al.*, 2005) (Abb. 2-3E+F).

Zudem ist denaturiertes Muskelgewebe reich an Kollagen Typ IV und Laminin, zwei Molekülen der ECM bzw. der Basalmembran, die das Aussprossen und die Regeneration von peripheren NF unterstützen (BOZYCZKO und HORWITZ, 1986; LUNDBORG *et al.*, 1994a; ROGERS *et al.*, 1983). Mehrere Studien wurden bereits zur Möglichkeit einer Verwendung von muskulärer Basallamina als Leitgerüst für Nervenregeneration durchgeführt (IDE, 1984).

Auch hier spielen SZ eine essentielle Rolle: Sie synthetisieren Zelladhäsionsmoleküle, Neurotrophine und laminin- und fibronektinreiche Basallaminae und stellen so besonders günstige Wachstumsbedingungen bereit. Es ist bekannt, das einwandernde SZ Muskel-Venen-Transplantate zu einem sehr frühen Zeitpunkt kolonisieren (FORNARO *et al.*, 2001) und darin proliferieren (GEUNA *et al.*, 2003). Bereits sehr früh nach der Operation kann in solchen Schienen ein Milieu beobachtet werden, dass reich an Neurotrophinen ist, deren Produktion durch die frühzeitig einwandernden SZ aufrechterhalten wird (PAGNOTTA *et al.*, 2002). Wie Experimente an Y-Prothesen eindrücklich zeigen konnten, ist darüber hinaus die korrekte Orientierung regenerierender Axone durch solche Schienen [über Chemotropismus] möglich (TOS *et al.*, 2000). In einer klinischen Studie erwies sich die Kombination von Vene und (frischer) Muskulatur (BATTISTON *et al.*, 2000a) als gleichwertig mit dem Autograft. In elektrophysiologischen Untersuchungen waren Schienen, die mit denaturierter Muskulatur gefüllt waren, sogar dem autologen Nerventransplantat überlegen (DEN DUNNEN und MEEK, 2001), was elektronenmikrosopische Untersuchungen allerdings nicht bestätigen konnten (MEEK *et al.*, 2001a). Ein entscheidender Vorteil für die klinische Anwendung ist, dass sich das benötigte Muskelgewebe in ausreichender Menge in der Region des Nervendefekts gewinnen lässt, was einen Hebedefekt erübrigt.

1.3.4 ZIELSETZUNG

Die Therapie der Wahl bei Nervenverletzungen mit Substanzdefekt ist nach wie vor das autologe Nerventransplantat, dessen Verwendung jedoch mit teils beträchtlichen Nachteilen verbunden ist. Immer mehr rücken deshalb künstliche Nervenschienen als mögliche Alternative in das Zentrum wissenschaftlicher Bemühungen.

Kollagen-Nervenschienen zeigen großes Potenzial bei der Überbrückung kurzer Distanzen (ARCHIBALD *et al.*, 1991; 1995; KRARUP *et al.*, 2002). Bei Substanzdefekten von mehr als 10 mm erscheint die Verwendung leerer Röhren jedoch als nicht mehr ausreichend (LUNDBORG *et al.*, 1982; MEEK *et al.*, 2003). Um das Regenerationspotenzial über größere Distanzen aufrecht zu erhalten, ist eine komplexe Leitstruktur notwendig. Hierzu bietet sich modifizierte denaturierte autologe Muskulatur (MDM) an, von der bekannt ist, dass sie die axonale Regeneration unterstützt (BATTISTON *et al.*, 2000b; COUTURIER *et al.*, 2002; DEN DUNNEN und MEEK, 2001; GEUNA *et al.*, 2003; LUNDBORG *et al.*, 1994a; MEEK *et al.*, 1999a) und ein frühes Einwandern und Proliferieren von SZ ermöglicht, die für die Wiederherstellung längerer De-

fektstrecken kritisch sind (FORNARO *et al.*, 2001; GEUNA *et al.*, 2003). Die Kombination aus Kollagenschiene und Muskelgewebe erlaubt die Herstellung passgenauer Leitschienen ohne Kaliberunterschiede zwischen Nerv und Interponat für fast jeden Nervendefekt, ohne die beim Heben eines Autografts auftretenden Sekundärschäden in Kauf nehmen zu müssen. Ob damit eine Überbrückung größerer Defektstrecken (>10 mm) möglich und sinnvoll ist, ist bis heute noch nicht ausreichend geklärt.

Aufgrund dieser Erkenntnisse und Überlegungen soll das Ziel der vorliegenden Arbeit sein, die axonale Regeneration entlang einer monotubulären biodegradierbaren Kollagenschiene gefüllt mit einer biogenen Matrix aus denaturiertem autologen Muskelgewebe zur Rekonstruktion ausgedehnter Nervendefekte qualitativ und quantitativ im Tiermodell zu analysieren und mit einer matrixfreien Kollagenschiene gleichen Typs zu vergleichen. Als Diskussionsgrundlage für eine mögliche klinische Anwendung soll zudem der Vergleich mit dem autologen Nerventransplantat dienen. Daraus leiten sich folgende Fragestellungen ab:

1. Ist es möglich einen 14 mm großen Defekt des N. ischiadicus im Rattenmodell mit Hilfe einer matrixfreien Kollagenröhre (bovines Kollagen Typ I) zu überbrücken?
2. Kann durch Einbringung einer Matrix aus denaturierter autologer Muskulatur in das Schienengerüst im Vergleich zur matrixfreien Schiene die Regeneration verbessert werden?
3. In welchem Verhältnis steht der Regenerationserfolg entlang einer auf diese Weise modifizierten Kollagenschiene im Vergleich zum Goldstandard in der Therapie peripherer Nervendefekte, dem autologen Nerventransplantat?

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 VERSUCHSMODELL

Als Versuchsmodell wird das Ischiadicus-Defektmodell der Ratte verwendet, bei dem es sich um das am häufigsten in peripheren Nervenregenerations-Studien verwendete Tiermodell handelt (NICHOLS *et al.*, 2005).

2.2 STUDIENAUFBAU

2.2.1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNG

Als Versuchstiere werden 24 männliche Lewis Ratten (Fa. Charles River, Kißlegg) zwischen 320 und 440 g verwendet. Alle Tiere werden gemäß der EU-Richtlinien behandelt. Das Tierversuchsvorhaben ist gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 209.1/211-2531-115/03) worden. Die Ratten werden in Gruppen von vier Tieren in Standard Makrolon® Typ IV Käfigen bei einem künstlichen 12 h Tag-Nacht-Rhytmus gehalten. Als Einstreu dienen Weichholzfasern (Altromin International, Laage). Die Reinigung der Käfige erfolgt wöchentlich. Pellets (Altromin International, Laage) und Wasser werden *ad libitum* bereitgestellt. Die Haltung der Ratten erfolgt in einem speziellen Tierstall mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 - 65 % und einer konstanten Raumtemperatur von 21 - 23°C. Die Tiere werden wöchentlich gewogen und mehrmals wöchentlich werden Putzverhalten, Aktivität, Automutilationszeichen und Infektionen oder Entzündungen am Fuß inspiziert. Um postoperativen Kontrakturen der denervierten Muskulatur vorzubeugen, wird den Tieren an Wochentagen ein täglicher Auslauf von 4 - 6 h in einem 45 cm x 55 cm x 120 cm Käfig in 8 - 12er Gruppen ermöglicht. Nach Lieferung wird den Tieren eine Eingewöhnungszeit von fünf Tagen vor Versuchsbeginn gewährt.

2.2.2 EXPERIMENTELLES PROTOKOLL

2.2.2.1 Experimentelle Gruppen

Die experimentell erzeugten 14 mm Defekte des NI werden mit verschiedenen Interponaten überbrückt. Folgende drei Versuchsgruppen werden untersucht:

Versuchsgruppe	Operationsmethode	Anzahl n
AG	Autologes Nerventransplantat (=Autograft)	n = 8
KS	PBS-gefüllte Kollagenschiene	n = 8
MDM	Kollagenschiene gefüllt mit Modifizierter denaturierter Muskulatur	n = 8

Als positive Kontrolle dient das autologe Nerventransplantat, in Form des retrotop wieder in den Nervendefekt eingesetzten Nervenresektats. Matrixfreie Kollagenschienen werden als negative Kontrollen betrachtet. Als Referenz dient bei allen *intra vitam* Tests der präoperative Basiswert. In den *post mortem* Untersuchung hingegen wird der Wert der Gegenseite als Referenz herangezogen.

2.2.2.2 **Kollagen-Nervenschienen**

Zur Überbrückung des Nervendefekts werden sterile, monotubuläre Kollagenschienen aus hochgereinigtem Typ 1 Rinderkollagen (NeuraGen™ PNG-220, Integra LifeSciences) in einer Länge von 20 mm verwendet (Abb. 2-1). Der Innendurchmesser beträgt 2,0 mm, die Wandstärke liegt bei ca. 200 µm. Für die Herstellung werden tiefe Beugesehnen von Rindern durch enzymatische und chemische Verfahren bearbeitet, um nicht-kollagenöse Anteile unter Erhalt der fibrillären Struktur zu entfernen, die für die Produktion einer tubulären Matrix in adäquater mechanischer Stärke und kontrollierten Permeabilität notwendig ist. Zusätzlich stabilisiert werden die Nervenschienen durch einen Quervernetzungsprozess mit gasförmigem Formaldehyd, wodurch die strukurelle Stabilität gesteigert und die *in vivo* Resorptionsrate kontrolliert wird. Die mittlere Porengröße der Kollagenröhren ermöglicht die Diffusion von Makromolekülen bis zu einer Größe von bovinem Serum Albumin (Molekulargewicht ca. 68 kDa) durch die Schienenwand (ARCHIBALD *et al.*, 1991).

Abb. 2-1: Handelsübliche Kollagenschiene NeuraGen™ PNG-220
Die Maße der Kollagenschiene betragen: Länge 20 mm, Innendurchmesser 2,0 mm, Wandstärke 200 µm.

2.2.2.3 Modifikation der Nervenschienen

Zur Modifikation der Nervenschienen wird denaturiertes, autologes Muskelgewebe verwendet, das dem Versuchstier zwei Tage vor der Nervenoperation aus dem M. latissimus dorsi entnommen wird. Der Denaturierungsprozess besteht aus mehreren Teilschritten, die analog zu dem bewährten Protokoll nach MEEK *et al.* (1999a) erfolgen: Zunächst wird das entnommene Muskelgewebe bei -20°C für 24 h eingefroren und daraufhin für weitere 24 h bei 4°C in demineralisiertes Wasser gelegt. Im Anschluss daran wird das Gewebe für eine Stunde bei Raumtemperatur in 16 % Essigsäure gelegt worauf sich eine einstündige Vakuum-Behandlung bei 10 mbar (Brand RS-4, Wertheim) anschließt. Als letzter Schritt wird das Muskelgewebe bei Raumtemperatur in 0,1 M Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung gelegt. Die Verwendung eines Vakuums hat den Hintergrund, dass Flüssigkeit aus dem Gewebe extrahiert werden soll und sich die einzelnen Strukturen im Gewebe zusammenfügen sollen. Die Essigsäure wird als zusätzlicher Denaturierungsschritt verwendet (MEEK *et al.*, 1999a).

2.2.2.4 Protokoll zur Durchführung der tierexperimentellen Versuche

Nach der Lieferung wird den Versuchstieren fünf Tage Zeit gegeben, um sich an die neue Umgebung zu adaptieren. Im Anschluss daran beginnt eine neuntägige Trainingsphase, in der die Tiere sich an die funktionellen Tests gewöhnen können. Auf diese Weise lässt sich ein zuverlässiger präoperativer Basiswert ermitteln. Die Basisevaluation erfolgt zwei Tage präoperativ (Tag -2) und beinhaltet funktionelle Tests, Vermessung von Fußabdrücken der Hinterläufe sowie eine Ganganalyse. Ab dem vierten postoperativen Tag erfolgt die Vermessung der Fußabdrücke drei mal wöchentlich über einen Zeitraum von 56 Tagen. Nach 21 und nach 56 Tagen wird zusätzlich eine Video-Ganganalyse durchgeführt. Elektrophysiologische Reizmessungen erfolgen nach acht (Tag 56) Wochen, gefolgt von den strukturellen Untersuchungen an Nerv und Muskulatur nach Euthanasie.

Das ultimative Ziel der peripheren Nervenrekonstruktion ist die bestmögliche Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion der von der Denervierung betroffenen Körperregionen. In unserem Modell müssen dazu die von proximal aussprießenden Axone zunächst das eingesetzte Interponat überbrücken und Kontakt zum distalen Stumpf finden, von dort weiter bis zur Zielmuskulatur vorwachsen und diese erfolgreich reinnervieren. Erst wenn alle anatomischen und physiologischen Leitungsbahnen zwischen ZNS, PNS und Zielorgan wiederhergestellt sind, kann dann eine Wiederherstellung der Funktion eintreten. Um eine umfassende Beurteilung des Regenerationserfolgs zu ermöglichen und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit der Literatur zu gewährleisten, wird mindestens eine Untersuchungsmethode zu jedem der aufgeführten Teilaspekte der Nervenregeneration durchgeführt (Tab. 2-1):

Tabelle 2-1: Untersuchungsplan

Untersuchter Aspekt	Methode	Parameter	Zeitpunkt
1. Regeneration durch das Interponat	Elektroneurographie	Nervenleitgeschwindigkeit	Woche 8
	Nerven Morphometrie	Gesamtfaserzahl, Gesamtfläche, mittlere Fläche und Durchmesser von Faser, Axon und Myelin, Myelinisierungsgrad	
	Elektronen-mikroskopie	qualitative Aussagen	
2. Reinnervation der Zielmuskulatur	Elektromyographie	Muskelaktionspotenziale	Woche 8
	Muskelvolumina	Volumen des M. gastrocnemius	
	Muskel Morphometrie	Muskelfaserquerschnittsfläche	
3. Wiederherstellung der Strukturen und Leitungsbahnen	Elektroneurographie	Nervenleitgeschwindigkeit	Woche 8
	Morphometrie	Parameter wie oben Erfolgsrate	
	Elektronen-mikroskopie	qualitative Aussagen	
4. Funktionelle Wiederherstellung	Motorische Tests	Sciatic Function Index, Static Sciatic Index	3x / Woche
	Video-Ganganalyse	Maximaler und minimaler Gelenkwinkel, Zeitpunkt des Auftretens von maximalem und minimalem Gelenkwinkel	Wochen 0, 3, 8

Abgebildet sind die für eine erfolgreiche Wiederherstellung der Nervenfunktion notwendigen Teilschritte, sowie die Methoden und Parameter die verwendet wurden, um diese Teilschritte zu evaluieren.

2.3 METHODIK IM TIERVERSUCH

2.3.1 OPERATIVE METHODEN

2.3.1.1 Anästhesie und perioperative Vorkehrungen

Anästhesie und Antagonisierung

Nach einer Allgemeinuntersuchung erfolgt die Anästhesie der 320 - 440 g schweren Nager durch eine intraperitoneal applizierte Kombinationsanästhesie aus Midazolam (Dormicum®, Roche, Grezach-Wyhlen) 2,0 mg/kg KGW, Medetomidin (Dormitor®, Pfitzer, Karlsruhe) 0,15 mg/kg KGW, und Fentanyl 25 (Fentanyl®, Curamed, Nürnberg) 0,005 mg/kg KGW. Nach angemessener Wartezeit wird die Narkosetiefe mit Hilfe von Korneal- und Flexorenreflex überprüft. Um die Versuchstiere normotherm zu halten, werden sie während der gesamten Narkose auf einer Heizmatte gelagert. Nach großzügiger Rasur des Operationsfeldes erfolgt die Fixation der Gliedmaßen mit Pflasterstreifen. Über einen Konus wird dem Tier pernasal reiner Sauerstoff substituiert. Die Keratitisprophylaxe erfolgt mit Dexpanthenol-haltiger Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Roche, Genzach-Wyhlen). Während des gesamten Narkoseverlaufs erfolgt eine kontinuierliche Überwachung der Vitalwerte durch klinische Beobachtung, Messung der Temperatur und Monitoring der Pulsfrequenz mit Hilfe eines Highspeed-Pulsoximeters (mediquip Medizintechnik, Kirchzarten). Die ausreichende

Versorgung mit Flüssigkeit erfolgt durch die Gabe von 5 ml Ringerlösung (DeltaSelect GmbH, Dreieich) s.c. zu drei festgelegten Zeitpunkten (vor Hautschnitt, vor Nervdurchtrennung und vor Hautnaht).

Die vollständige Antagonisierung erfolgt durch subkutane Injektion einer Kombination aus Atipamezol (Antisedan®, Pfitzer, Karlsruhe) 0,75 mg/kg KGW, Flumazenil (Anexate®, Roche, Grenzach-Wyhlen) 0,2 mg/kg KGW und Naloxon (Narcanti®, Curasan, über Pharmaselect, Ladenburg) 0,12 mg/kg KGW. Nach Antagonisierung der Narkose erwachen die Tiere in der Regel komplikationslos innerhalb von ein bis drei Minuten.

Nachbehandlung

Unmittelbar postoperativ werden den Tieren 3 Tropfen Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm 1®, Ratiopharm, Ulm) p.o. zur postoperativen Analgesie verabreicht, sobald der Schluckreflex wieder eingesetzt hat. Nach dem vollständigen Erwachen erfolgt die weitere Schmerztherapie mit Hilfe von Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, München) 0,015 mg/12 h s.c. über 2 Tage. Anschließend werden die Tiere für ca. drei Stunden unter eine Rotlichtlampe gesetzt, um einen Wärmeverlust auszugleichen. Erst dann werden sie wieder in die ursprüngliche Käfiggruppe gesetzt, wo ihnen sofort wieder Futter und Wasser zur Verfügung stehen.

2.3.1.2 Entnahme von autologer Muskulatur für die Modifizierung der Schiene

Zur Modifizierung der Kollagenschienen (MDM-Gruppe) wird modifizierte denaturierte autologe Muskulatur (MDM) verwendet. Dazu wird zwei Tage vor der geplanten Ischiasnervendefektsetzung (Tag -2) eine Muskelentnahme an den Versuchstieren der MDM-Gruppe vorgenommen. Die narkotisierten Tiere werden in Bauchlage gelagert (Abb. 2-3A), auf einer Wärmematte fixiert und der Operationsbereich aseptisch vorbereitet. Während der OP erhalten die Tiere eine pernasale Sauerstoffsubstitution. Zum Schutz der Hornhaut wird diese mit Dexpanthenol-haltiger Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe) bedeckt. Die Narkoseüberwachung erfolgt wie oben beschrieben. Nach großzügiger Rasur des Operationsfeldes erfolgt bei negativem Korneal- und Flexorenreflex ein ca. 1,5 cm langer schräger Hautschnitt von der rechten Spina scapulae nach distal medial mit einem 11er Skalpell (Abb. 2-3A). Anschließend wird das Gewebe mit Mikroinstrumenten bis auf die Faszie des M. latissimus dorsi präpariert (Abb. 2-3B). Vom lateralen Anteil des Muskels wird ein ca. 1,8 x 0,3 cm langer Muskelstrang abgetragen und in Soerensen's Phosphatpuffer-Lösung aufbewahrt (Abb. 2-3C). Es erfolgt der schichtweise Verschluss von Faszie und Subkutangewebe mit 4/0 Vicryl (Ethicon, Norderstedt). Um ein Ausbeißen der Fäden zu verhindern erfolgt auch die Hautnaht mit versenkten Einzelknopfnähten mit resorbierbarem Nahtmaterial mit Vicryl 5/0 (Ethicon, Norderstedt). Die Nachbehandlung erfolgt wie oben beschrieben.

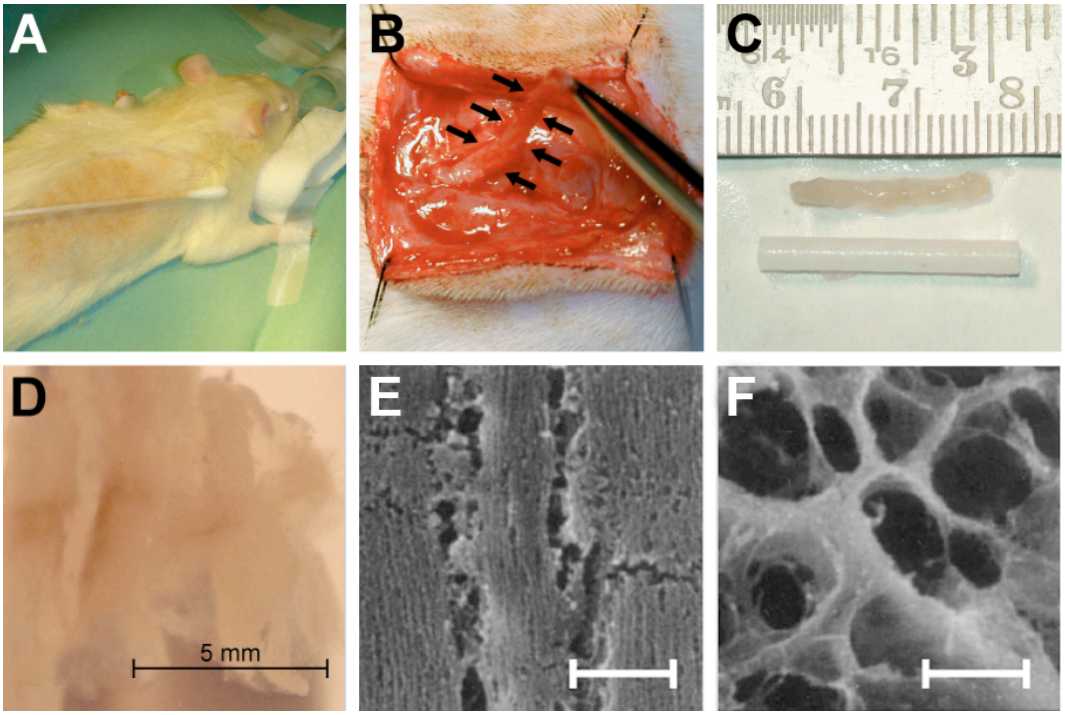

Abb. 2-3: Muskelentnahme und Denaturierung
Oben: Chirurgisches Vorgehen; (A) Lagerung in Bauchlage, der Verlauf des M. latissimus dorsi wird durch den Wattestab angedeutet. (B) Abtragen von Muskegewebe (↗↗) vom lateralen Rand des M. latissimus dorsi (C) Zurechtgeschnittener Gewebsblock vor Platzierung in den Nervenleiter. Unten: Morphologische Aspekte; (D) Muskelmatrix nach Denaturierungsprozess analog zu MEEK *et al.* (1999a). (E+F) Rasterelektronenmikroskopische Gefrierschnitt-Aufnahmen von normaler (E) und denaturierter (F) Muskulatur. Im Vergleich zu normaler Muskulatur entsteht durch den Denaturierungsprozess eine zellfreie extrazelluläre Matrix mit offenporigen Basallamina-Schläuchen. Die Referenzbalken entsprechen 0,3 µm. Bildausschnitte (E+F) aus MEEK *et al.* (1999a), Fig. 3.

In einem Vorversuch mit zwei Versuchstieren konnten keine Auswirkungen auf das Gangbild der Versuchstiere nach Entnahme der Muskelentnahme festgestellt werden, insbesondere wurde der Bewegungsablauf der Hinterläufe nicht beeinflusst (Daten nicht abgebildet).

2.3.1.3 Experimentelle Defektsetzung und Überbrückung

Die Lagerung der vollständig anästhesierten (siehe oben) Versuchstiere erfolgt in Rechtsseitenlage. Nach großzügiger Rasur des Operationsgebiets über dem linken Hinterlauf wird eine ca. 3 cm lange Hautinzision 3 mm dorsal des Trochanter majors nach distal, parallel zum Femur, mit einem 11er Skalpell durchgeführt. Anschließend erfolgt die stumpfe Separierung des M. biceps femoris vom M. gluteus superfizialis an dessen Aponeurose und Durchtrennung des langen Biceps-Kopfes von dessen Ursprung an der Tuber ischiadica. Auf diese Weise lässt sich der unversehrte M. Biceps femoris nach kaudal klappen, wo er mit einer Haltenaht (Prolene® 5/0, Ethicon, Norderstedt) fixiert wird. Darunter stellt sich der Nervus ischiadicus in seinem Verlauf dar (Abb. 2-4A). Um auch den distalen Bereich des Nervs bis zur Bifurcatio ausreichend darstellen zu können, muss der M. biceps femoris am distalen Ende ca. 3 - 4 mm quer zum Faserverlauf eingeschnitten und zurückgeschlagen werden.
Die sich anschließende Präparation des Nervs erfolgt mikrochirurgisch mit Hilfe eines Operationsmikroskops (OPMI 1-F, Zeiss, Jena) bei 5 - 7 facher Vergrößerung. Zunächst wird das Bindegewebe um den freiliegenden Teil des Nervs vorsichtig entfernt, und der Nerv über

eine Länge von ca. 25 mm dargestellt und mobilisiert (Abb. 2-4B). Alle Durchtrennungen werden auf gleicher Höhe durchgeführt, wobei das proximale Stumpfende exakt 4 mm distal des Austrittspunktes des Nervs zwischen M. quadratus femoris und M. quadrizeps femoris liegt. Um den Nervenschmerz bei der Durchtrennung zu reduzieren, erfolgt nach exakter Vermessung des Nervs zuerst die proximale Durchtrennung mit einem neuen 11er Skalpell und anschließend die distale Durchtrennung, wobei ein genau 14 mm langes Nervensegment exzidiert wird. Bis zu diesem Punkt ist die operative Vorgehensweise in allen Gruppen identisch.

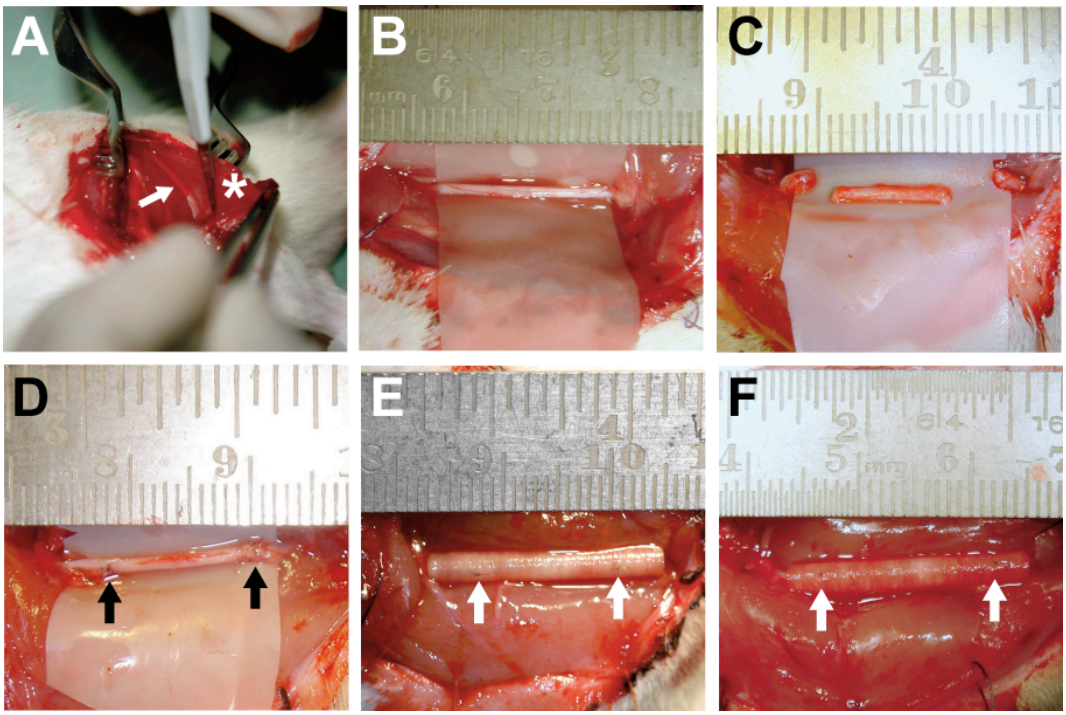

Abb. 2-4: Intraoperative Bilder des experimentellen Ischiasnervendefekts
Experimentelle Defektsetzung (A-C) und Überbrückung des Defekts (D-F). (A) Unter dem zurückgeschlagenen M. biceps femoris (★) stellt sich der N. ischiadicus dar; (B) freipräparierter Nerv; (C) Reseziertes Nervensegment; (D) Das retrotop eingebrachte Nervensegment dient als autologes Nerventransplantat, die Fixierung erfolgt mit mehreren Einzelknopfnähten (↑↑); (E) Überbrückung des Defekts durch eine 20 mm lange leere Kollagenröhre; (F) Überbrückung durch eine Kollagenröhre gefüllt mit modifizierter denaturierter autologer Muskulatur.

Autograftgruppe

In der Autograftgruppe (AG, n=8) wird das entnommene Nervenstück retrotop in den Nervendefekt eingesetzt und beidseits End-zu-End mit drei bis vier epineuralen Einzelknopfnähten mit 10/0 Nylon-Faden (Ethilon 10/0, Ethicon, Norderstedt) reanastomosiert, die zirkulär auf 3, 6 und 9 Uhr gesetzt werden (Abb. 2-4D). Nach der Readaptation des M. biceps femoris erfolgt der schichtweise Wundverschluss mit versenkten Einzelknopfnähten 4/0 Vicryl (Ethicon, Norderstedt). Auch hier erfolgt die Hautnaht mit versenkten Einzelknopfnähten mit Vicryl 5/0 (Ethicon, Norderstedt).

Kollagenschienengruppen

In den Studiengruppen KS und MDM (je n=8) wird das resezierte Nervensegment zunächst für zwei Stunden in Fixierlösung (2,5 % Glutaraldehyd) eingelegt und anschließend in Waschlösung (1 M Soerensen-Lösung) für spätere histologische Untersuchungen aufbewahrt. Entsprechend den Herstellerangaben wird die sterile Kollagenschiene vor der Implantation für zehn Minuten in Ringerlösung eingelegt. In der MDM-Gruppe wird die Kollagenschiene vor Implantation mit der zurechtgeschnittenen Matrix aus denaturierter autologer Muskulatur mit longitudinal orientiertem Faserverlauf vollständig befüllt. Anschließend wird die matrixfreie bzw. befüllte Kollagenschiene im Operationssitus positioniert. Nun erfolgt die Adaptation des distalen Stumpfes mit einer epineural greifenden Einzelknopfnaht mit 10/0 Ethilon (Ethilon®, Ethicon, Norderstedt). Dazu wird die Kollagenschiene zunächst 3 mm proximal des distalen Endes von außen nach innen durchstochen, das Nervensegment epineural quer mit dem Faden angeschlungen und der Faden von innen nach außen durch die Röhrenwand rückgeführt. Anschließend wird das Nervensegment vorsichtig am Faden an die Innenwand der Röhre gezogen und die Fadenenden auf der Außenseite verknotet. Mit einer Spritze mit stumpfer Kanüle wird daraufhin das Lumen des Nervenleiters vorsichtig mit steriler Ringerlösung gespült, bis keine Luftblasen mehr entweichen. Analog zum distalen Stumpf erfolgt nun die Fixierung des proximalen Stumpfes (Abb. 2-4E). Das readaptierte Nervensegment ist nun so positioniert, dass proximaler und distaler Nervenstumpf jeweils 3 mm in dem Lumen der Schiene liegen; damit ist die zu überbrückende Defektlänge auf 14 mm (20 mm - 2 x 3 mm = 14 mm) festgelegt. Um Lufteinschlüsse im Lumen der Schiene zu vermeiden, wird das Lumen wie oben beschrieben ein zweites mal gespült und vollständig mit Ringerlösung aufgefüllt, bis keine Luftblasen mehr entweichen. Nach Annäherung des M. biceps femoris durch eine Fasziennaht mit 4/0 Vicryl (Ethicon, Norderstedt), wird das Bein passiv durchbewegt, um die Immobilisierung der Nervenschiene zu überprüfen. Abschließend erfolgt der schichtweise Wundverschluss analog zur AG-Gruppe.

2.3.2 Gewebeentnahme und strukturelle Untersuchungen

2.3.2.1 Gewebeentnahme und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Nach acht Wochen erfolgt die Euthanasie im direkten Anschluss an die elektrophysiologischen Untersuchungen (s.u.) noch in Narkose durch zügige intrakardiale Applikation von 2 ml (pro Tier) des Kombinations-Narkotikums T61® (Intervet, Unterschleißheim). Für die Volumenbestimmung der Wadenmuskulatur, der qualitativen Beurteilung von Muskelquerschnitts-Präparaten und zur quantitativen Vermessung der Muskelfaserquerschnittsflächen werden die Mm. gastrocnemii und solei bds. vollständig entnommen. Nach erfolgter Entnahme der Wadenmuskulatur wird der NI bds. mit seiner tibialen Fortführung (N. tibialis) vom

proximalsten sichtbaren Punkt nahe des Trochanter major bis zur Mitte der Plantarfläche des Fußes (N. plantaris medialis) abgetrennt und *in toto* gehoben.

Fixierung der Proben

Nach erfolgter Volumenbestimmung (siehe unten) wird die Wadenmuskulatur in kleine Stücke zerschnitten und 24 h lang in 2.5 % Glutaraldehyd (AppliChem GmbH, Darmstadt) getaucht. Im nächsten Schritt werden die Proben in 0,1 M Soerensen's Phosphatpuffer (pH 14) gewaschen und anschließend in 1 % Osmium Lösung (1,0 g OsO_4 in 50 ml *aqua bidest*. nach CAULFIELD 1957) fixiert. Anschließend erfolgt die Dehydratation in einer mehrstufigen aufsteigenden Alkoholreihe. Die dehydrierten Proben werden anschließend in Epoxidharz eingebettet. Die eingebetteten Proben verbleiben dann bei ca. 60°C für zwei Tage im Brutschrank. Der entnommene Nerv wird sofort in drei Segmente unterteilt, auf einem Blatt Papier ausgestreckt und anschließend eine Stunde lang in Fixierlösung (2,5 % Glutaraldehyd) eingetaucht. Nach der Fixation werden die Proben mit Soerensen's Phosphatpuffer gespült.

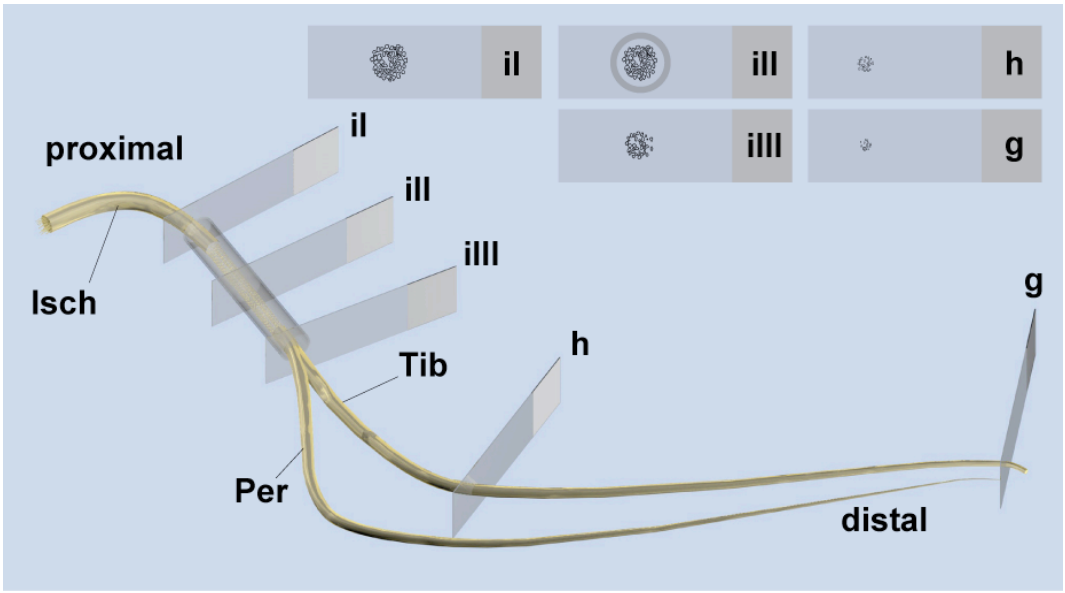

Abb. 2-5: Gewebsentnahmen aus dem N. ischiadicus/tibialis für die strukturelle Analyse
(Isch) N. ischiadicus, (Tib) Nervus tibialis, (Per) Nervus Peroneus. Die Schnitthöhen sind von proximal nach distal wie folgt beschriftet: (il) unmittelbar proximal des Interponats, (ill) Mitte des Regenerats, (illl) Unmittelbar distal der Nervenschiene (Gruppen KS und MDM) bzw. der distalen Nervennaht (AG-Gruppe), (h) kurz vor Eintritt in den M. gastrocnemius links, (g) 0,5 cm distal des Calcaneus links.

Aus festgelegten Regionen des Nervs (Abb. 2-5) werden Stücke entnommen und transversal in 2 mm Segmente geteilt. Die untersuchten Regionen befinden sich auf der linken Seite unmittelbar proximal des Interponats „il", in der Mitte des Regenerats „*ill*", unmittelbar distal der Nervenschiene (KS und MDM) bzw. der distalen Nervennaht (AG) „*illl*", kurz vor Eintritt in den MG „*h*" und 0,5 cm distal des Calcaneus „*g*". Auf der Referenzseite befinden sich die Regionen auf vergleichbarer Höhe, d.h. 1,5 cm proximal der Bifurkation „*c*" (Referenz zu *ill*), kurz vor Eintritt in den MG „*b*" (Referenz zu *h*) und 0,5 cm distal des Calcaneus „*a*" (Referenz zu *g*). Daran schließt sich eine zweistündige Post-Fixation in 2 % OsO_4 bei Raumtemperatur

an, gefolgt von wiederholten Pufferspülungen und Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Anschließend erfolgt auch hier die Fixation in Epoxidharz. Von allen Präparaten werden Semidünnschnitte (0,5 µm) für die lichtmikroskopischen Untersuchungen hergestellt und die Schnitte auf Triethoxysilan-beschichteten Objektträger aufgebracht, auf einer Heizplatte bei 85°C getrocknet und flammenfixiert.

2.3.2.2 Azurblau-Safranin Gewebefärbung

Zur Beurteilung der zellulären Morphologie, Fibrosierung oder fettigen Degeneration der Gastrocnemius-Muskulatur, sowie zur quantitativen Vermessung der Muskelfaser-Querschnittsflächen werden die Muskelquerschnitts-Präparate mit der Gewebefärbung Azur II-Methylenblau und Safranin O angefärbt (JENO und GEZA, 1975). Auch ein Satz von Nervenquerschnitts-Präparaten wird mit dieser Methode gefärbt, um Aussagen über histologische Zusammensetzung und Vaskularisierung der regenerierten Nerven machen zu können. Bei dieser Färbemethode stellen sich Kerne und Myelinscheiden blau, Bindegewebe rosa dar. Die Beurteilung der histologischen Präparate erfolgt in 400-facher Vergrößerung.

2.3.2.3 Paraphenylendiamin Markscheidenfärbung

Für die automatische morphometrische Analyse der regenerierten NF wird ein zweiter Satz von Nervenquerschnitts-Präparaten mit der Markscheidenfärbung *p*-Phenylendiamin (PPD) angefärbt, einer Kontrastierung die sich zur Darstellung der Myelinscheide bewährt hat (COLMAN und STOCKERT, 1983). Markscheiden färben sich bei dieser Methode dunkelbraun bis schwarz. Bindegewebe wird schwach bis gar nicht angefärbt.

2.3.2.4 Elektronenmikroskopische Analyse

Elektronenmikroskopische Untersuchungen werden an Querschnitten durch die Mitte des Interponats, sowie des N. tibialis auf der operierten Seite 0,5 cm distal des Calcaneus durchgeführt. Zusätzlich werden Querschnitte durch die autologe denaturierte Muskulatur innerhalb des Röhrchens untersucht. Die Fixierung erfolgt wie oben beschrieben. Mit einem Ultramikrotom (Ultracut® E, Reichert-Jung) werden Ultradünnschnitte (80 nm) hergestellt, auf ein Kupfernetzchen fixiert und zur Kontrastierung für eine Stunde mit Uranyl-Acetat und für weitere zehn Minuten in Reynold's Bleizitrat-Lösung inkubiert. Die qualitative Beurteilung der Schnitte erfolgt an einem Zeiss EM10 Elektronenmikroskop bei 60 kV. Die Bereiche werden auf das Vorhandensein myelinisierter und markloser NF, Anzahl, Größe und Anordnung von Blutgefäßen, Struktur des Bindegewebes und zelluläre Zusammensetzung hin untersucht. Die denaturierte Muskulatur wird auf Morphologie, sowie auf das Vorhandensein myelinisierter und nicht-myelinisierter NF untersucht. Auf eine histologische Beurteilung der denaturierten Muskulatur vor Implantation wird verzichtet, da diese bereits an anderer Stelle beschrieben wurde (MEEK *et al.*, 1999a).

2.3.3 Morphometrische Analyse

Der Begriff Morphometrie (von griechisch *μορφή, morphé* = Gestalt, Form und *μετρική, metron* = Zählung, Messung) befasst sich mit der Charakterisierung der Form von Objekten durch quantifizierbare Maßzahlen.

2.3.3.1 Bestimmung der Muskelfaserquerschnittsfläche

Die Azurblau-Safranin gefärbten Präparate werden zunächst auf zelluläre Morphologie, Anzeichen von Muskelatrophie, fettiger Degeneration und Fibrose hin untersucht. Zur Quantifizierung der Aussagen wird anschließend die Muskelfaserquerschnittsfläche (*MFQ*) semiautomatisch bestimmt. Dazu werden aus den Muskelquerschnitts-Präparaten aller Versuchstiere (operierte und Kontrollseite) mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 100® Lichtmikroskops mit NEO PLAN Öl-Immersions-Objektiv (40x, n.A. 1.25, Zeiss, Jena) pro Präparat zehn repräsentative Bereiche (2592 x 1944 px) mit einer CCD Kamera (Canon Powershot® G5, Canon Inc., Tokyo, Japan) erfasst. Die Teilbilder werden anschließend in eine Analysesoftware (ImageJ, Rasband, 1997-2009) geladen und alle Muskelfaserquerschnitte bis zu einer Gesamtzahl von 150 Messwerten pro Tier und pro Seite manuell mit Hilfe eines Grafiktabletts (Wacom Intuos® 3 Grafiktablett, Wacom Co., Ltd., Saitama, Japan) umfahren (Abb. 2-6). Aus den Umrissen berechnet das Programm automatisch die Querschnittsflächen, sowie die entsprechenden Mittelwerte pro Tier.

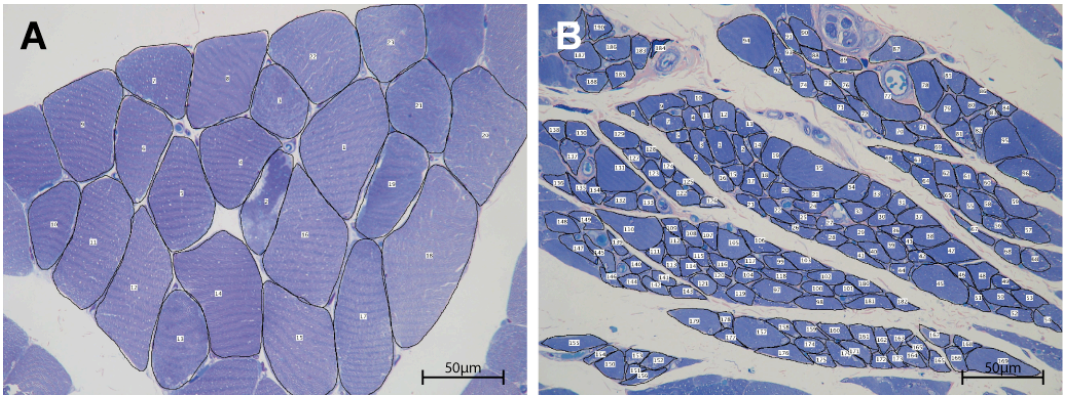

Abb. 2-6: Semiautomatische Erfassung der Muskelfaserquerschnittsflächen
Die Muskelfaserumrisse (schwarz) werden manuell am PC an einem Grafiktablett umfahren, eine Software berechnet daraus die umfahrene Fläche. (A) Rechte (Kontroll-)Seite, (B) Linke (operierte) Seite 8 Wochen nach Neurotmesis mit deutlichen Anzeichen denervierungsbedingten Muskelatrophie.

2.3.3.2 Morphometrische Auswertung der Nervenpräparate

Bildanalyse

Alle Fasern eines Nervenquerschnitt-Präparats werden mit einem Zeiss Axiovert 100® Lichtmikroskop mit einem NEO PLAN Öl-Immersions-Objektiv (40x, n.A. 1.25) und einer CCD Kamera (Canon Powershot® G5 Digitalkamera, Canon Inc., Tokyo, Japan) in einer 400-fachen Gesamtvergrößerung erfasst. Um den gesamten Querschnitt des Nervs abzubilden werden die erfassten Einzelbilder (2592 x 1944 px) am Rechner semiautomatisch (Canon

Photostitch®, Canon Inc., Tokyo, Japan) zu einem Kachelbild zusammengesetzt. Da die Nervenquerschnitte je nach Schnitthöhe unterschiedliche Ausmaße haben, entstehen auf diese Weise je nach Schnittfläche Kachelbilder von 1x1 bis 9x11 Einzelbildern. Besteht der Nervquerschnitt aus mehreren Faszikeln, so wird jeder Faszikel digital ausgeschnitten (Adobe Photoshop®, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) und als eigenständige Datei zur weiteren Bildverarbeitung auf Festplatte (WD Caviar® Blue™, Western Digital Corp., Lake Forest, CA, USA) gespeichert. Der auszuwertende Faserbereich eines jeden Faszikels wird mit einem Grafiktablett (Wacom Intuos®) manuell maskiert (Adobe Photoshop®), wobei Neurodebris, Fixations- und Bildverarbeitungsartefakte ausgeblendet werden um Fehldetektionen zu vermeiden (Abb. 2-7B). Als nächster Schritt der interaktiven Bildverarbeitung wird der Schwellenwert des Bildes so angepasst, dass auch kleinkalibrige myelinisierte NF ringförmig abgebildet werden (Abb. 2-7C).

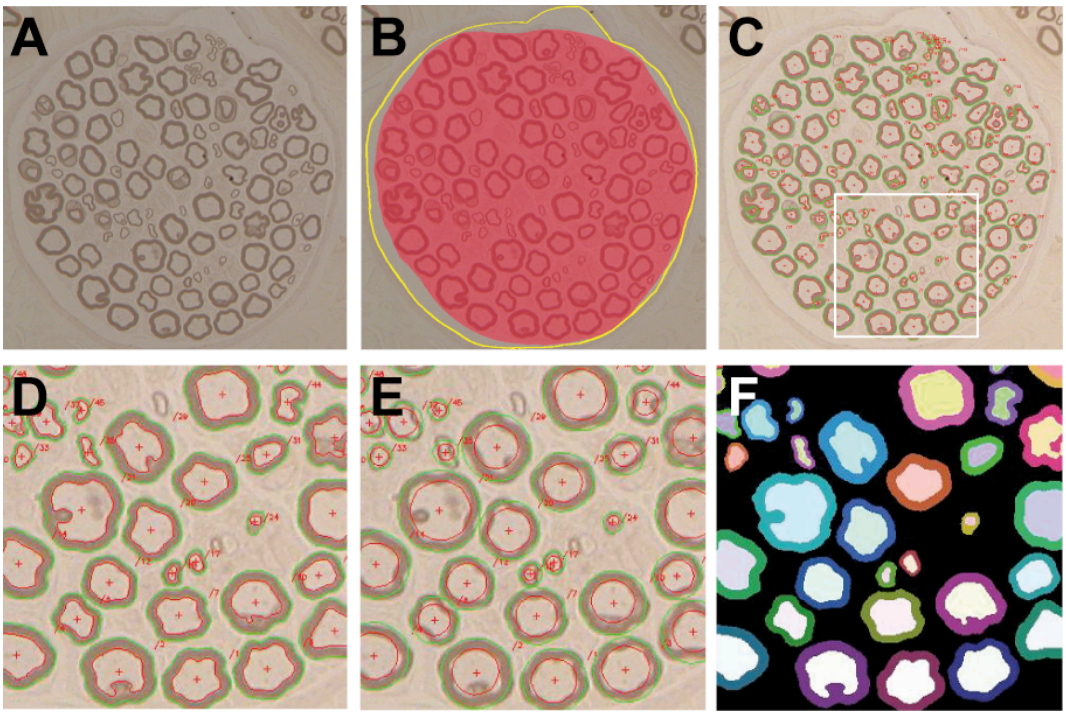

Abb. 2-7: Schrittweise Segmentierung der Nervenquerschnitte
Der Originalaufnahme (A) wird eine Maske (B) aufgelegt, die den auszuwertenden Faserbereich umfasst und aufgrund fixationsbedingter subperineuraler Spaltbildung etwas kleiner als das Perineurium (gelb) ist. Nach einem Schwellenwertabgleich (C) werden Umfang (D), Radien (E) und Flächen, hier in Falschfarben dargestellt (F), der Nervenfasern bestimmt.

Vermessung der Merkmale

Der Bildverarbeitung schließt sich die Extraktion der Merkmale und deren Vermessung an. Eine NF wird definiert als (1) von einem dunklen Ring umgebenes helles Zentrum und (2) einem Durchmesser von mindestens 2 µm. Das helle Zentrum wird als Axon, der dunkle Mantel als Myelinscheide interpretiert. Die Quantifizierung des Nervenfaszikel-Aufbaus umfasst direkte Messungen (Tab. 2-2) an histologischen Strukturen, und die Berechnung von indirekten Parametern. Die Merkmale absolute Faserzahl N, Flächen von Faser A_f und Mye-

linscheide A_m, sowie Radius von Faser r_f und Axon r_a werden aus modifizierten binären Bilddateien mit Hilfe der IDL-Routine (ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO, USA) MT_O_P (RODENACKER und BENGTSSON, 2003) direkt gemessen. Dabei werden die Merkmale in Pixeln gemessen und anschließend auf ihre tatsächliche Größe in µm bzw., μm^2 rückgerechnet, wobei 1 px = 0,1328 µm entspricht. Im Anschluss daran können aus den gemessenen Werten die indirekten Parameter Axonfläche A_a, Myelindicke d_m, Faserdurchmesser d_f, Axondurchmesser d_a, Mittlere Faser-, Axon- und Myelinfläche, sowie die *G-Ratio* berechnet werden. Die direkt und indirekt erhobenen Daten der einzelnen Faszikel eines Nervenquerschnitts werden anschließend wieder auf den ganzen Nervenquerschnitt rückgerechnet.

Tabelle 2-2: Direkte und indirekte Variablen der morphometrischen Analyse

Parameter	Beschreibung
N'	Absolute Faserzahl eines Faszikels (genauer: nur myelinisierte Fasern). Die meisten Nerven bestehen aus 1-3 (max. 7) Faszikeln
A'_f	Gesamt-Faserfläche des einzelnen Faszikels
A'_m	Gesamt-Myelinfläche jedes einzelnen Faszikels
N	Gesamtfaserzahl des gesamten Nervenquerschnitts
A_f, A_a, A_m	Gesamtflächen von Faser, Axon und Myelinscheide des gesamten Nervenquerschnitts
a_f, a_a, a_m	mittlere Flächen von Faser, Axon und Myelinscheide des gesamten Nervenquerschnitts
d_f, d_a, d_m	mittlere Durchmesser von Faser, Axon und Myelinscheide des gesamten Nervenquerschnitts
G-Ratio	Verhältnis von Axondurchmesser zu Faserdurchmesser

Die aufgelisteten Parameter N', A'_f und A'_a werden vom Rechner durch Messung histologischer Strukturen bestimmt. Die restlichen Parameter können aus den vermessenen Parametern berechnet werden. Die G-Ratio ist ein Verhältniswert aus indirekt berechneten Parametern und erlaubt eine Aussage über den Reifegrad der Nervenfasern.

Referenzfläche und Faserdichte

Für Dichtebestimmungen ist eine geeignete Referenzfläche erforderlich. Normalerweise wird hierzu das die Faszikelfläche umschließende Perineurium herangezogen. Bei der Durchsicht der histologischen Schnitte zeigt sich allerdings ein stark unterschiedliches Verteilungsmuster der NF in den Studiengruppen, bzw. unterscheidet sich der Raum, der auswachsenden Axonen in den einzelnen Studiengruppen zur Verfügung steht so massiv, dass die Bestimmung einer geeigneten Referenzfläche nicht korrekt möglich scheint. Deshalb wird auf Faserdichtebestimmungen bereits im Vorfeld verzichtet.

Gesamtfaserzahl

Die Gesamtfaserzahl *N* des gesamten Nervenquerschnitts ergibt sich aus der Summe der Faserzahlen *N'* aller Faszikel eines Nervs:

$$N = \sum_{i=1}^{n} N_i'$$

Faser- und Axondurchmesser

Die Berechnung des Faser- bzw. Axondurchmessers erfolgt aus einem Kreis, dessen Fläche der Querschnittsfläche der Faser bzw. des Axons entspricht. Aus diesem Kreisäquivalent lässt sich der Faserradius R'_f bzw. Axonradius R'_a geometrisch nach folgender Formel berechnen:

$$R_f' = \sqrt{\frac{A_f'}{\pi}} \quad \text{, und analog} \quad R_a' = \sqrt{\frac{A_a'}{\pi}}$$

Die entsprechenden Durchmesser von Faser D_f und Axon D_a werden nach der Formel $D = 2R$ berechnet. Dabei handelt es sich um den Gesamtdurchmesser aller Fasern bzw. Axone eines Faszikels. Für die Beurteilung werden jedoch die mittleren Faser- bzw. Axondurchmesser aller Faszikel, also des gesamten Nervenquerschnitts benötigt. Der mittlere Faserdurchmesser d_f des gesamten Nervenquerschnitts berechnet sich aus den Summen des Produkts der Einzelradien eines Faszikels und der Faserzahl des Faszikels dividiert durch die Gesamtfaserzahl. Es ergibt sich:

$$d_f = \frac{\sum_{i=1}^{n}\left(d_{fi}' \cdot N_i'\right)}{N} = \frac{D_f}{N}$$

und analog für den mittleren Axonradius d'_a:

$$d_a = \frac{\sum_{i=1}^{n}\left(d_{ai}' \cdot N_i'\right)}{N} = \frac{D_a}{N}$$

Myelinscheidendicke

Der Durchmesser der Myelinscheide (=Myelindicke) D_m ergibt sich aus der Differenz von *Faserradius* R_f und *Axonradius* R_a. Die mittlere Myelindicke des gesamten Nervenquerschnitts berechnet sich aus den Summen des Produkts aus allen Durchmessern eines Faszikels mit der Faserzahl dieses Faszikels dividiert durch die Gesamtfaserzahl:

$$d_m = \frac{\sum_{i=1}^{n}\left(d_{mi}' \cdot N_i'\right)}{N} = \frac{D_m}{N}$$

Faser-, Myelinscheiden- und Axonfläche

Die Faserfläche A_f und Axonfläche A_m werden in Pixeln vermessen und auf ihre tatsächliche Größe in µm^2 zurückgerechnet. Die Summe aller einzelnen Faserflächen aller Faszikel eines Nerven ergibt die Gesamtfaserfläche A_f:

$$A_f = \sum_{i=1}^{n} A'_{fi}$$

und analog für die Gesamtmyelinfläche A'_m:

$$A_m = \sum_{i=1}^{n} A'_{mi}$$

Die Gesamtaxonfläche A_a lässt sich als Differenz der Gesamtfaserfläche und der Gesamtmyelinfläche berechnen:

$$A_a = A_f - A_m$$

Die mittlere Faserfläche a_f aller Fasern des gesamten Nervenquerschnitts erhält man durch Division der Gesamtfaserfläche durch die Gesamtfaserzahl.

$$a_f = \frac{A_f}{N}$$

Analog dazu lässt sich die mittlere Axonfläche a_a und die mittlere Myelinscheidenfläche a_m aller Fasern des gesamten Nervenquerschnitts berechnen:

$$a_a = \frac{A_a}{N} \quad \text{bzw.} \quad a_m = \frac{A_m}{N}$$

G-Ratio

Die vermessenen oder berechneten Parameter können als Verhältniswerte angegeben werden (DE MEDINACELI, 1995) um eine bessere und objektivere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, da Verhältniswerte Unregelmäßigkeiten in einzelnen Fasereigenschaften ausgleichen, die sowohl natürlich als auch artefaktbedingt auftreten können. Die *G-ratio* stellt ein Maß für die Dicke der Myelinscheide d_m in Relation zum Axondurchmesser d_a dar. Ermitteln lässt sich die *G-ratio* über das Verhältnis von Axondurchmesser zu Faserdurchmesser. Die *G-Ratio* stellt eine Fasergrößenverteilung dar, die auf zwei Verhältniszahlen basiert. Deshalb ist bei der Berechnung ist darauf zu achten, dass zuerst die tatsächlichen Axon- bzw. Faserdurchmesser addiert und erst dann die Ratio ermittelt wird (COCHRAN, 1977):

$$G - Ratio = \frac{\sum_{i=1}^{n} d'_{ai}}{\sum_{i=1}^{n} d'_{fi}} = \frac{absolute\ Summe\ der\ Axondurchmesser}{absolute\ Summe\ der\ Faserdurchmesser} = \frac{D_a}{D_f}$$

2.3.3.2.1 Erfolgswahrscheinlichkeit

Da nicht in allen Tieren distal des Defekts NF lichtmikroskopisch nachweisbar sind und sich wegen der kleinen Fallzahl in diesen Abschnitten eine statistische Auswertung morphometrischer Daten nicht anbietet, haben wir uns in diesen Abschnitten (iIII, h, g; siehe Abb. 2-5) auf die Berechnung von Erfolgswahrscheinlichkeiten beschränkt. Eine Erfolgswahrscheinlichkeit (*engl. s*uccess ratio) gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit (lichtmikroskopisch erkennbare) myelinisierte NF in einer Studiengruppe bis in die untersuchten Regionen vorgewachsen sind. Das Vorhandensein von myelinisierten Fasern innerhalb des untersuchten Nervenquerschnitts wird als Binärwert notiert (1=Fasern vorhanden, 0=keine Fasern vorhanden). Aus der Summe der Werte aller Tiere dividiert durch die Gruppengröße lässt sich ein Prozentwert errechnen. Die Erfolgsrate unmittelbar distal des Defekts (iIII) erlaubt die Aussage mit welcher Wahrscheinlichkeit der distale Stumpf erfolgreich reinnerviert wurde. Untersuchungen der Nervenregionen vor Eintritt in die Gastrocnemius-Muskulatur (h) geben einen Anhaltspunkt über den Erfolg der Reinnervation der Wadenmuskulatur. Die Erfolgsrate für die am weitesten distal entnommenen Nervenquerschnitte (=distal des Calcaneus, Abschnitt g) gibt an mit welcher Wahrscheinlichkeit myelinisierte NF bis in die distalsten Innervationsgebiete vorgewachsen sind. Die Berechnung erfolgt folgendermaßen:

$$Erfolgsrate\,(iIII) = \frac{nachweisbare\ Nervenfasern\,(iIII)}{Gruppengröße} \cdot 100\% = \frac{N(iIII)}{n} \cdot 100\%$$

und analog für die Abschnitte h und g:

$$Erfolgsrate\,(h) = \frac{N(h)}{n} \cdot 100\% \qquad Erfolgsrate\,(g) = \frac{N(g)}{n} \cdot 100\%$$

2.3.4 Volumenbestimmung der Wadenmuskulatur

Nach der Perfusion wird die Gastrocnemius-Muskulatur der Versuchstiere bds. extrahiert, und das Gesamtvolumen des lateralen und medialen Kopfes durch Wasserverdrängung gemessen. Die gemessenen Volumina werden dann mit dem Körpergewicht (KGW) der Tiere normalisiert um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Zusätzlich werden Ratios der normalisierten Volumina der operierten Seite zur kontralateralen Seite berechnet.

2.3.5 Elektrophysiologische Reizmessung

2.3.5.1 Messung der Nervenleitgeschwindigkeit

Experimenteller Aufbau

Acht Wochen postoperativ erfolgt eine elektrophysiologische Untersuchung des NI. Anästhesie und Darstellung des regenerierten Nerven erfolgen wie oben beschrieben. Die laterale Insertion des M. biceps femoris bleibt dabei unberührt. Da die Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) stark temperaturabhängig ist (Paintal, 1973), wird während der Messungen besonderer Wert auf die Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur zwischen 36 und 38°C gelegt.

Lokalisation der Stimulations- und Ableitungselektroden

Der N. ischiadicus bzw. N. tibialis beider Hinterläufe wird mit zwei monopolaren Nadelelektroden (Länge 12 mm; Durchmesser 0,3 mm; Viasys Healthcare Supplies) stimuliert, die direkt auf den Nerv platziert werden (Abb. 2-8).

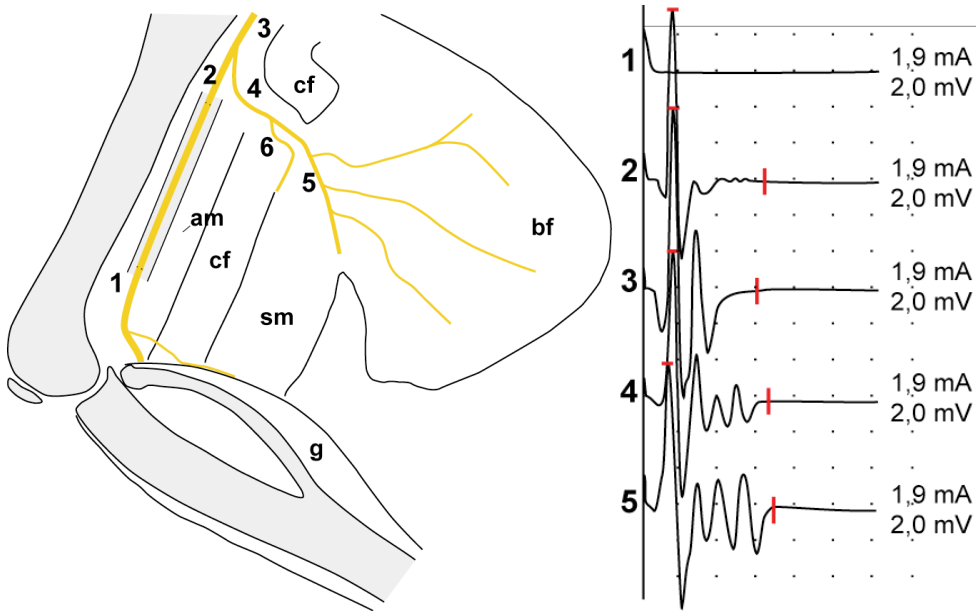

Abb. 2-8: Elektro-Stimulation an proximalen Stimulationspunkten
(Links) Stimulationspunkte bei der elektrophysiologischen Untersuchung, modifiziert nach Rupp *et al.* (2007a), Fig. 1. (Distaler Stumpf des N. ischiadicus (1), proximaler Stumpf (2), proximalster sichtbarer Teil des N. ischiadicus (3). N. musculocutaneus (4, 5), erster Hauptast des N. musculocutaneus (6). Biceps femoris (bf), M. semimembranosus (sm), M. adductor magnus (am), M. caudofemoralis (cf), M. gastrocnemius (g). (Rechts) Muskelaktionspotenziale. Man beachte die Abnahme der Amplitude und zunehmende Polyphasie der nahezu identischen CMAPs nach Stimulation der proximalen Punkte (2-5). Verwendet werden monopolare Elektroden bei einer Sensitivität von 2mV.

Auf der operierten Seite liegen die Stimulationspunkte proximal und distal der Adaptationsnähte. Auf der unoperierten, kontralateralen Seite wird auf Mitte des Oberschenkels und am Malleolus medialis stimuliert. Die ableitenden Elektroden (ebenfalls monopolare Nadelelektroden) werden subkutan an die Plantarfläche des Fußes platziert, wobei die aktive (negative) Elektrode über dem M. interosseus und die Referenz- (positive) Elektrode auf der Plantarseite der dritten Zehe angebracht werden. Die Erdung wird subkutan auf der lateralen Seite des

Metatarsus V angebracht. Beim operierten Hinterlauf werden die Elektroden zusätzlich weiter proximal angebracht um weitere Messungen abzuleiten. Dabei wird die aktive Elektrode intramuskulär innerhalb des M. gastrocnemius (MG) platziert und die Referenzelektrode subkutan über dem MG inseriert. Die Erdung wird in dieser Anordnung subkutan zwischen stimulierende und ableitende Elektrode platziert.

Stimulationsintensität

Alle Stimulationen und Aufzeichnungen werden an einer elektrodiagnostischen Einheit mit zugehöriger Software (Viking Quest™, Viasys Healthcare Supplies, Madison, WI, USA) durchgeführt. Einzelimpulse von einem Hertz mit einer Dauer von 0,2 ms werden mit Pausen von mindestens fünf Sekunden zwischen den Impulsen abgegeben, um eine Reflexabschwächung zu vermeiden. Die Intensität wird schrittweise von submaximalen Werten erhöht, bis ein Potenzial abgeleitet werden kann. Eine Stimulationsintensität von 1,9 mA ist in der Lage eine supramaximale Stimulation zu erreichen. Das Auftreten von Denervierungsanzeichen (positive steile Wellen (*engl.* spike waves), Fibrillationen oder Faszikulationen) werden notiert und von 0 bis +++ bewertet. Zusätzlich wird die Morphologie des Muskelaktionspotenzials CMAP (*engl.* compound muscle action potential) beurteilt.

Berechnung der Nervenleitgeschwindigkeiten

Die Latenzen der CMAPs, definiert als der Zeitraum zwischen Stimulus und Auftreten der ersten Deflektion des Aktionspotenzials von der Grundlinie, werden mit supramaximaler Stimulationsintensität gemessen. Der Hinterlauf des Versuchstiers wird ausgestreckt und die Distanz zwischen den stimulierenden aktiven Elektroden wird mit Hilfe eines Maßbandes auf einen Millimeter genau bestimmt. Diese Werte dienen zur Berechnung der Leitgeschwindigkeit nach der Formel:

$$\vec{v} = \frac{s}{t}$$

Die Geschwindigkeit *v* entspricht dem Quotienten aus zurückgelegter Wegstrecke *s* und abgelaufener Zeit *t*. Daraus ergibt sich für die Nervenleitgeschwindigkeit *NLG*:

$$NLG = \frac{Distanz\ zwischen\ ableitender\ und\ aufzeichnender\ Elektrode}{CMAP\ Latenzzeit}$$

2.3.6 Funktionelle Kontrolle der Nervenregeneration

2.3.6.1 Fußspannenanalyse

Für die Fußspannenanalyse werden die Fußabdrücke der Ratten zwei Tage präoperativ (Basiswert) einmalig und postoperativ dreimal wöchentlich vermessen. Dazu wird ein eigens konstruiertes Holzgestell verwendet (Abb. 2-9).

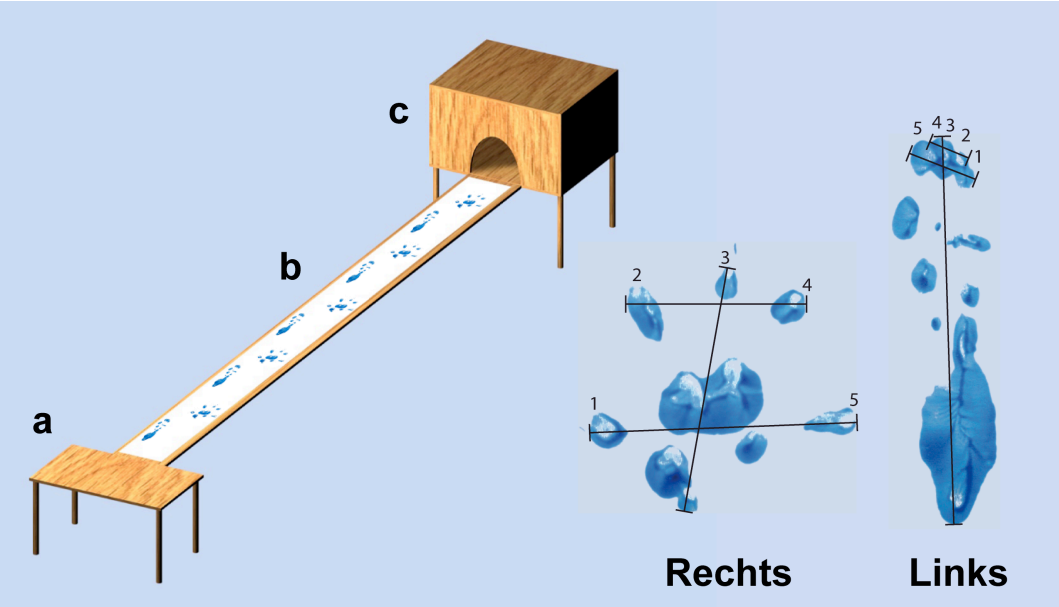

Abb. 2-9: Erfassung und Vermessung der Fußabdrücke
Die Tiere werden mit bemalten Hinterläufen auf eine Holzplattform (a) gesetzt und laufen selbständig über den mit einem Papierstreifen belegten Holzbalken (b) in Richtung der Öffnung (c). Die erfassten Fußabdrücke werden anschließend wie folgt vermessen: (1-5) Zehen 1-5; (PL) Länge des Fußabdrucks (print length); (TS) Abstand zwischen 1. und 5. Zehe (toe spread); (ITS) Abstand zwischen 2. und 4. Zehe (intermediate toe spread). Der im Vergleich zu gesunden Seite (rechts) deutlich längere und schmälere Fußabdruck der operierten Seite (links) ist Ausdruck des Abspreizdefizits der Zehen und des Verlusts des Zehenspitzenstandes.

Nach Auftragen von ungiftiger blauer Kindermalfarbe auf beide Hinterläufe von Ferse bis Zehenspitze, wird das Tier auf einen erhöhten 8 cm breiten Holzsteg gesetzt, der in einem abgedunkelten Unterschlupf endet und mit einem weißen Papierstreifen belegt ist. Mit dieser Methode können brauchbarere Fußabdrücke produziert werden als bei der Verwendung eines Korridors (Rupp *et al.*, 2007b): Da keine Wand existiert, kann sich die Ratte nirgends anlehnen und es besteht keine Möglichkeit dass ein exorotierter Fuß im Schwung die äußere Wand trifft und keinen brauchbaren Abdruck produziert. Darüber hinaus verlässt sich die Ratte bei Überquerung des Stegs unterbewusst auf ihren nicht-operierten (rechten) Hinterlauf, hält sich beim Laufen rechts und erzeugt so deutliche Fußabdrücke auf der linken Seite. Infolge des intensiven präoperativen Trainings läuft das Versuchstier zügig und sicher in Richtung Unterschlupf. Der Versuch wird so lange wiederholt, bis mindestens drei deutliche, vermessbare Abdrücke pro Seite erfasst sind. Pro Tier und pro Untersuchungstag werden je drei deutliche, nicht verwischte Fußabdrücke von zwei Untersuchern unabhängig von einander ausgewählt. Von den ausgewählten Abdrücken wird von beiden Untersuchern die Distanz zwischen den Zehen 1 und 5 (toe spread, *ATS*) und den Zehen 2 und 4 (intermediate

toe spread, *ITS*) sowie die Fußlänge (print lenght, *PL*), wie von VAREJÃO *et al.* (2004a; 2004b) beschrieben, vermessen (Abb. 2-9).

Aus den einzelnen Messwerten der beiden Untersucher wird dann der Mittelwert berechnet und die gemittelten Daten in die Bain-Mackinnon-Hunter Formel (BAIN *et al.*, 1989) zur Berechnung des Sciatic Function Index (*SFI*) eingesetzt:

$$SFI = -38{,}3 \cdot \left(\frac{(EPL - NPL)}{NPL} \right) + 109{,}5 \cdot \left(\frac{(ETS - NTS)}{NTS} \right) + 13{,}3 \cdot \left(\frac{(EITS - NITS)}{NITS} \right) - 8{,}8$$

„E“ steht hier für die Werte der operierten, experimentellen Seite und „N“ auf die der gesunden, normalen Seite („N“) gemessen. Eine normale, uneingeschränkte Funktion des NI ist durch *SFI* Werte nahe 0 charakterisiert, ein Ergebnis um -100 würde einen völligen Funktionsverlust beschreiben (VAREJAO *et al.*, 2004a; 2004b). Die Länge des Fußabdrucks (*print length*, PL) ist abhängig von der Kraft des MG. Das Abspreizvermögen der Krallen (*toe spread*, TS und *intermediate toe spread,* ITS) hingegen wird vorwiegend von der Kontraktionskraft von Fußextensor und intrinsischer Fußmuskulatur bestimmt. Ergänzend werden die Fußabdrücke auch im Stand vermessen. Hierbei wird die Ratte it einer Hand fixiert, die Hinterläufe mit Fingerfarbe bemalt und anschließend mit der anderen Hand wie ein Stempel mit leichtem Druck auf ein leeres DIN A 4 Papier gedrückt. Je drei Abrücke werden auf diese Weise wie oben beschrieben vermessen.

Wie von Bervar (BERVAR, 2000) beschrieben, lassen sich aus „toe spread“ und „intermediary toe spread“ auf gesunder und operierter Seite Faktoren berechnen, die als

„toe spread factor“:

$$TSF = \left(\frac{(ETS - NTS)}{NTS} \right)$$

und „intermediary toe spread factor“:

$$ITF = \left(\frac{(EIT - NIT)}{NIT} \right)$$

in die Formel $SSI = 108{,}44 \cdot TSF + 31{,}85 \cdot ITF - 5{,}49$ eingesetzt werden. Auch für den SSI gelten Werte von 0 als nicht funktionell eingeschränkt und Werte um -100 als vollständiger Funktionsverlust.

2.3.6.2 Video-Ganganalyse

Bewegungszyklus der Ratte

Wie bei Katzen und Hunden auch, besteht der Bewegungszyklus (BZ) des Hinterlaufs einer Ratte aus einer Schwungphase (mit F und E1 Phase) und einer Standphase (mit E2 und E3 Phase) (z.i. LIN *et al.*, 1996) (Abb. 2-12). Während der Schwungphase haben Zehen und Fuß keinen Kontakt zur Unterlage, wohingegen in der Standphase entweder Zehen oder Fuß Kontakt mit der Unterlage haben. In der Flexionsphase (F) wird der Hinterlauf unter Flexion im Sprunggelenk von der Unterlage abgehoben. Die erste Extensionsphase (E1) beginnt mit der ersten Extension im Knie und Sprunggelenk. Die zweite Extensionsphase (E2) beginnt

mit Kontakt der Zehen mit der Unterlage. In der dritten Extensionsphase (E3) startet das Tier die Ferse anzuheben und sich von der Unterlage abzustoßen. Während dem Laufen verändert sich der Sprunggelenkswinkel kontinuierlich. Bei normalen Ratten wird der kleinste Sprunggelenkswinkel etwa in der Mitte der Standphase gemessen. Von diesem Zeitpunkt an wird der Fuß zunehmend bis zum Abstoßen des Fußes von der Unterlage extendiert (Plantar-Flexion) bis in der terminalen Standphase (*engl.* terminal stance) die größten Sprunggelenkswinkel beobachtet werden können. In der Schwungphase wird der Fuß im Gelenk zunächst dorsal-flektiert (F Phase), bis etwa in der Mitte der Schwungphase ein zweites Minimum erreicht wird. Die postoperativen Veränderungen der Sprunggelenkswinkel lassen Rückschlüsse auf das Ausmaß der Regeneration des N. ischiadicus zu.

Aufzeichnung der Bewegungszyklen und Videoschnitt

Für die Ganganalyse wird eine eigens konstruierte bodenfreie Holzkonstruktion mit Glasfront verwendet, die sich passgenau auf einem konventionellen Laufband für Großtiere platzieren lässt (Abb. 2-10).

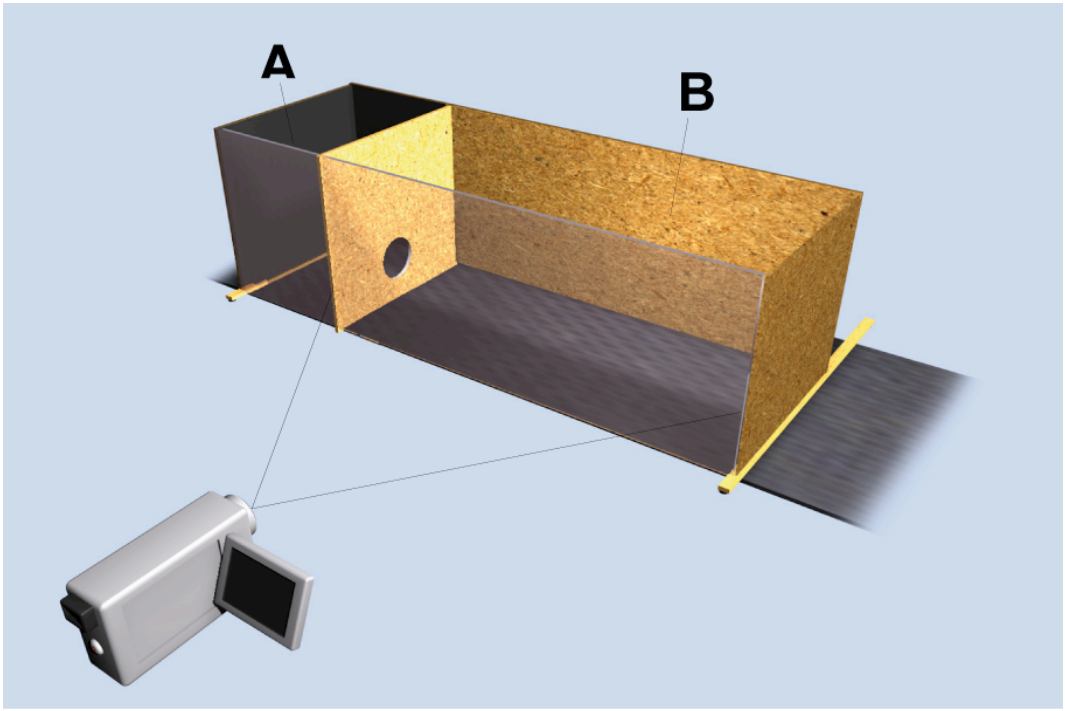

Abb. 2-10: Experimenteller Aufbau zur Aufzeichnung der Bewegungszyklen
Perspektivische Darstellung. Die Versuchstiere werden in die Korridor (B) gesetzt und laufen mit stetiger Geschwindigkeit auf dem Laufband in Richtung des abgedunkelten Bereichs (A). Eine Videokamera wird in ca. 1 m Abstand vor der Glasscheibe platziert und liefert eine direkte Seitansicht des Tiers.

Die Konstruktion ist durch eine Trennwand in zwei Kammern aufgeteilt, die über ein kleines „Schlupfloch“ miteinander verbunden sind. Die kleinere Kammer ist abgedunkelt und soll der Laborratte einen Unterschlupf suggerieren. Vor Beginn der Untersuchung werden mit einem schwarzen, wasserfesten Stift Punkte auf festgelegte anatomische Landmarken (Mitte des Tibiaschafts, Tuber calcanei, Malleolus lateralis, distaler Metatarsus) auf den linken Hinterlauf des zu untersuchenden Tiers gemalt, die später bei der Bestimmung der Gelenkwinkel

zur Orientierung dienen. Während der ganzen Untersuchung wird auf eine ruhige Umgebung geachtet, um Verfälschungen durch Fluchtreaktionen zu vermeiden. Die Ratte wird behutsam in die Konstruktion gehoben und das Laufband mit geringer Geschwindigkeit gestartet um dem Tier Zeit zu geben, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Die Laufbandgeschwindigkeit wird schrittweise erhöht bis das Tier mit konstanter Geschwindigkeit (nicht unterbrochenes Laufen) auf dem Laufband läuft. Die Aufzeichnung der Bewegungsfolgen erfolgt mit Hilfe einer Videokamera (DCR-TRV900E, Sony Corp., Tokyo, Japan) aus standardisiertem Abstand senkrecht zur Laufrichtung des Tieres. Der Vorgang wird beendet, sobald mindestens fünf vollständige Gangzyklen aufgezeichnet sind.

Nach Beenden der Aufzeichnung werden die Videobänder digitalisiert, das Filmmaterial am Rechner mit einem Videoschnittprogramm (Adobe Premiere® CS3, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) geschnitten und für jeden der drei Untersuchungstermine (präoperativ, Woche 3, Woche 8) pro Tier eine Videodatei erstellt, die mindestens fünf vollständige Bewegungsfolgen enthält. Sequenzen, in denen die Tiere gerade loslaufen oder anhalten, werden nicht für die Analyse verwendet. Anschließend werden die Videosequenzen Bild-für-Bild durchgegangen und pro Tier je 5 digitale Standbilder zu drei festgelegten Zeitpunkten innerhalb des Bewegungszyklus (BZ) erfasst: (1) In der Mitte der Standphase, (2) am Ende der Standphase und (3) in der Mitte der Schwungphase (Abb. 2-11).

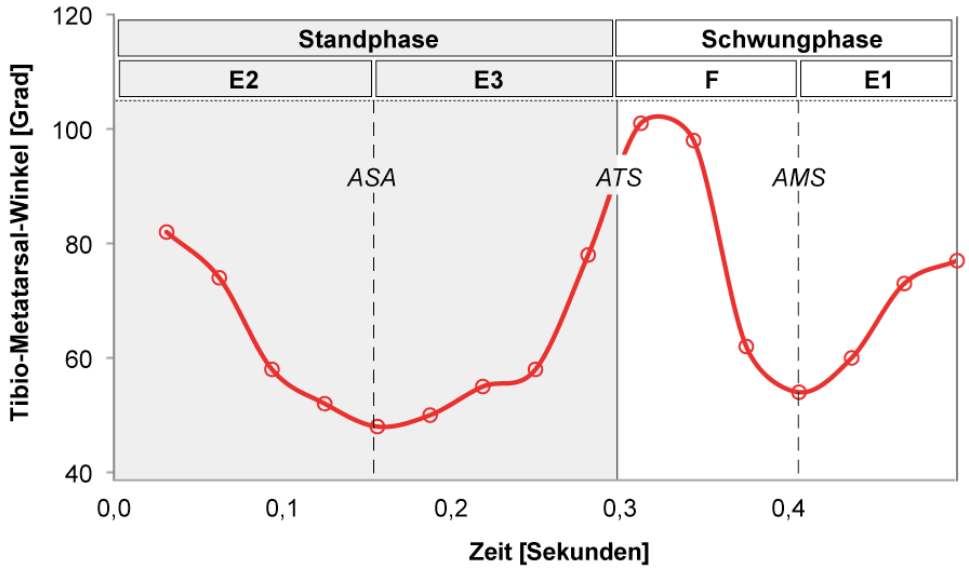

Abb. 2-11: Veränderung des Tibiometatarsal-Winkels während einer Bewegungsfolge
Winkelveränderungen im Sprunggelenk während Standphase (mit E2 und E3 Phase) und Schwungphase (mit F und E1 Phase) eines Bewegungszyklus einer gesunden Ratte. Zusätzlich sind die Zeitpunkte angegeben, zu denen die Sprunggelenkswinkel *ASA, ATS* und *AMS* gemessen werden. Die Kurve wurde mit Excel (MS Excel®, Redmond, WA, USA) geglättet.

Analyse der Sequenzen

Die Analyse der Einzelbilder erfolgt semiautomatisch mit Hilfe der Analyse-Software ImageJ (RASBAND, 1997-2009). Der Sprunggelenkswinkel wird vereinfacht als der Winkel aus den beiden Geraden (1) Tibiaschaft und (2) der Verbindung des lateralen Malleolus mit dem vier-

ten Metatarsalköpfchen definiert. Zur Winkelberechnung werden nacheinander die Markierungspunkte Mitte des Tibiaschafts, Malleolus lateralis und distaler Metatarsus in der Software angeklickt, woraufhin das Programm die Winkelberechnung durchführt.

In der Mitte der Standphase wird der „Ankle stance angle“ *ASA* (*dt.* Standphasen-Gelenkswinkel) gemessen. Die Mitte der Standphase ist definiert als Beginn der E3-Phase (Abb. 2-12). Da nach Durchtrennung des NI der Fuß allerdings während der Standphase flach auf die Unterlage gesetzt wird, und kein Anheben der Ferse stattfindet, wird in der vorliegenden Studie die Mitte der Standphase neu definiert als der Zeitpunkt, zu dem der rechte Hinterlauf am linken vorbeigeführt wird und beide von sagittal gesehen in einer Ebene stehen. Am Ende der Standphase wird der „Terminal stance“-Winkel *ATS* bestimmt. In normalen Ratten erreicht dieser Winkel in der terminalen Standphase ein Maximum. Größere Winkel in der Standphase bedeuten eine größere Extensionsfähigkeit im Sprunggelenk (Plantar-Flexion). Unter pathologischen Bedingungen korreliert jede Abweichung (nach unten) mit dem Ausmaß der funktionellen Beeinträchtigung. Als genauer Messzeitpunkt wird in der vorliegenden Studie das letzte Standbild definiert, bei dem die Zehen des linken Hinterlaufs noch Kontakt mit der Unterlage haben. Zusätzlich wird in der Mitte der Schwungphase der „Mid-swing“-Winkel *AMS* vermessen (Abb. 2-12). Die Mitte der Schwungphase ist definiert als Beginn der ersten Extensionsphase (E1). Da jedoch nach vollständiger Durchtrennung des NI keine Extension im Sprunggelenk mehr möglich ist, wird die Mitte der Schwungphase – analog zum *ASA* – als der Zeitpunkt definiert, in dem das linke, betroffene Bein am rechten vorbeigeführt wird und beide von sagittal gesehen in einer Ebene liegen. In der Mitte der Schwungphase erreicht der Sprunggelenkswinkel im normalen Gangbild ein Minimum. Für jeden der drei Winkel werden anschließend aus den fünf Einzelmessung pro Tier die Mittelwerte berechnet.

2.3.7 Statistische Auswertung

Mittelwerte, Standardabweichung, Minimum, Maximum und Median werden mit Excel (MS Excel® 12.1, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) berechnet. Für die statistische Analyse der funktionellen und elektrophysiologischen und morphometrischen Daten wird der Kruskal-Wallis-Test verwendet um festzustellen, ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen vorliegen. Dabei handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben (Gruppen) hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable unterschieden. Zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p<0,05$), so schließt sich der Mann-Whitney-Unabhängigkeitstest zum Vergleich der einzelnen Gruppen gegeneinander an. Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmungen zweier unabhängiger Verteilungen. Es handelt sich um einen Homogenitätstest,

der – wie der Kruskal-Wallis-Test – auf Rangplatzsummen basiert, jedoch nur für den Vergleich zweier Gruppen ausgelegt ist.
Zum paarweisen Vergleich von Parametern innerhalb einer Versuchsgruppe wird der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet; ein statistischer Test für verbundene Stichproben, der gerade für kleine Stichproben geeignet ist. Der Test ist unabhängig vom Verteilungstyp und wird daher als nichtparametrisch bezeichnet.
Die statistische Analyse der Erfolgswahrscheinlichkeit erfolgt mit Hilfe des Exakten Fisher-Tests, einem Signifikanztest auf Unabhängigkeit in der Kontingenztafel, der auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert.
Zur statistischen Analyse der Muskelfaserquerschnittsfläche hinsichtlich Gruppenunterschieden werden Generalized estimation equation (GEE) Modelle verwendet, da diese Methode die Struktur sich wiederholender Daten korrekt wiederspiegelt und dabei Korrelationen innerhalb eines Individuums berücksichtigt. Dabei wird eine austauschbare Korrelationsstruktur zwischen den Gruppenmitgliedern angenommen.
Zur Bestimmung von Korrelationen zwischen den einzelnen Untersuchungsparametern dient die Bravais-Pearson-Korrelation. Der Korrelationskoeffizient ρ ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen und kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Bei einem Wert von +1 (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Werte von $\rho = 0$ bedeuten überhaupt keinen (linearen) Zusammenhang. Um eine Aussage treffen zu können, ob eine Korrelation statistisch signifikant (d.h. ρ signifikant von 0 verschieden) ist, dient anschließend ein t-Test.
Als statistische Software wird SPSS (SPSS 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet, wobei p-Werte<0,05 als statistisch signifikant, p-Werte<0,001 als hochsignifikant betrachtet werden.
Bei der Analyse der Daten wurde das multiple Testproblem nicht berücksichtigt. Man versteht darunter die Kumulierung der α-Fehler (Fehler 1. Art), die bei multiplen Paarvergleichen auftritt. Soll der multiple Testfehler berücksichtigt werden, müsste das Signifikanzniveau entsprechend der Bonferroni-Korrektur angepasst werden, indem das ursprüngliche Signifikanzniveau (p=0,05) durch die Anzahl der durchgeführten statistischen Tests (n=38) geteilt wird. Da ein Unterschied zwischen einzelnen Stichproben um überhaupt signifikant zu werden, umso größer sein muss, je kleiner der Stichprobenumfang ist, und in unserer Studie trotz des geringen Stichprobenumfangs (n=8) hohe Signifikanzen beobachtet wurden, kann aber davon ausgegangen werden, dass die festgestellten Unterschiede tatsächlich von Bedeutung sind.

2.4 MATERIALIEN UND GERÄTE

2.4.1 ZUSAMMENSETZUNG HÄUFIG VERWENDETER LÖSUNGEN

Fixativa und Waschlösungen

Soerensen Phosphatpuffer (pH 14)

Lösung A:	
Kaliumdihydrogenphosphat (Nr. 23115, Serva, Heidelberg)	9,078 g
ad Aqua dest.	1000 ml
Lösung B:	
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat (Nr. A2006, AppliChem, Darmstadt)	11,876 g
ad Aqua dest.	1000 ml

Mischungsverhältnis: 192 ml Lösung A ad 808 ml Lösung B

Glutaraldehyd 2,5 %

Glutaraldehyd 25 % (AppliChem GmbH, Darmstadt)	10 ml
Ad Soerensen Phosphatpuffer	100 ml

Osmium Lösung 1 %

Saccharose (Nr. A1125, AppliChem, Darmstadt)	0,45 g
Aqua bidest.	1,0 ml
0,1 M HCl (Nr. 1.09060.1000, Merck, Darmstadt)	2,0 ml
Veronalacetat-Puffer	2,0 ml
Osmium Lösung 2 %	5,0 ml

Veronalacetat-Puffer (pH 10,3)

Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz 5,5 % (Nr. 6318, Merck, Darmstadt)	1,47 g
Natriumacetat (Nr. 6267, Merck, Darmstadt)	0,97 g
Aqua bidest.	50 ml

Osmium Lösung 2 %

Osmiumtetroxid (Plano W. Plannet, Wetzlar)	1 mg
Aqua bidest.	50 ml

Glycidäther-Gemisch

Mischung A:	
Glycidäther 100 (Nr. 2104, Serva, Heidelberg)	38,82 g
2-Dodecenylsuccinicacid-4-Anhydrid (Nr. 10755, Serva, Heidelberg)	5,3 g
Mischung B:	
Glycidäther 100 (Nr. 2104, Serva, Heidelberg)	61,8 g
Methylnacidanhydrid (Nr. 294529, Serva, Heidelberg)	56,34 g

Mischungsverhältnis: 41,2 g Mischung A ad 75,0 g Mischung B

Ad 2,4,5-Trisdimethylaminomethylphenol (Nr. 36975, Serva, Heidelberg)	1,5 ml

Epoxidharzeinbettung

Lösung	Konzentration	Dauer	Temperatur
Osmium	1 %	2 h	4°
Waschlösung		3 x spülen	
Aceton	50 %	3 x spülen	
Aceton	70 %	10 min	4°
Aceton	70 %	10 min	4°
Aceton	90 %	10 min	4°
Aceton	90 %	10 min	4°
Aceton	100 %	20 min	4°
Aceton	100 %	20 min	18°
Aceton 100 % + Glycinäther-Gemisch	1:1	1 h	18°
Glycinäther-Gemisch	pur	30 min	18°
Glycinäther-Gemisch	pur	30 min	18°

Färbe-Methoden

Azur II

Aqua dest.	100 ml
Di-Natriumtetraborat, wasserfrei (Nr. 63069, Merck, Darmstadt)	1 g
Azur II (Nr. 9211, Merck, Darmstadt)	1 g
Formalin, konzentriert	2-3 Tropfen

Safranin O

Aqua dest.	100 ml
Di-Natriumtetraborat, wasserfrei (Nr. 63069, Merck, Darmstadt)	1 g
Safranin O (Chroma 1B 463, Diagonal, München)	1 g
Saccharose (Nr. 7635, Merck, Darmstadt)	40 g
Formalin, konzentriert	2,3 Tropfen

p-Phenylendiamin Markscheidenfärbung

p-Phenylendiamin-Lösung 1 %:	
1,4-p-Phenylendiamin (Nr. 807246, Merck, Darmstadt)	2 g
Alkohol 100 %	100 ml
Alkohol 96 %	100 ml

Lösung ca. 3 Tage vor Gebrauch bei Tageslicht stehen lassen, bis die Lösung ein braune Farbe angenommen hat.

Alkohol-Spüllösung:

Alkohol 100 %	100 ml
Alkohol 96 %	100 ml

Chemikalien

T61® (Embutramidum 200 mg, Mebezonium 50 mg, Tetracain 5 mg), Intervet, Unterschleißheim

Ringer Lösung, DeltaSelect, Dreieich

Uranyl-Acetat, Serva Feinbiochemica GmbH und Co., Heidelberg

Bleizitrat, Serva Feinbiochemica GmbH und Co., Heidelberg

2.4.2 TIEREXPERIMENTE

Nähte, Ethilon 10/0, Ethicon, Norderstedt
Mikroinstrumente
NONIN 8600V High-Speed-Pulsoxymeter, mediquip Medizintechnik, Kirchzarten
Lewis Ratten, Charles River Wiga, Sulzfeld
Altromin 1324, Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse, Altromin International, Laage

2.4.3 GERÄTE UND SOFTWARE

Laborgeräte

OPMI 1-F OP-Mikroskop, Zeiss, Jena
Zeiss Axiovert 100® Lichtmikroskop, Zeiss, Jena
NEO PLAN Öl-Immersions-Objektiv (40x, n.A. 1.25), Zeiss, Jena
Zeiss-EM10 Elektronenmikroskop, Zeiss, Jena
Ultracut® E, Reichert-Jung, Wien, Österreich
NeuraGen™ PNG-220, Integra LifeSciences Corp., Plainsboro, NJ, USA
Viking Quest, Fa. ViaSys Healthcare, Madison, WI, USA
Monopolare Nadelelektroden, ViaSys Healthcare Supplies 2003, Katalog Nummer.: 019-404700, Nicolet

Rechner und Zubehör

Apple Mac® Pro 2 x 2,66 Ghz Core Duo, 5 GB RAM, Apple Inc., Cupertino, CA, USA
Canon Powershot® G5 Digitalkamera, Canon Inc., Tokyo, Japan
Sony DCR-TRV900E Videokamera, Sony Corp., Tokyo, Japan
WD Caviar® BlueTM 750 GB, Western Digital Corp., Lake Forest, CA, USA
Wacom Intuos® 3 Grafiktablett, Wacom Co., Ltd., Saitama, Japan

Software

Adobe Photoshop® 10.0 for Mac, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe Premiere® CS3, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
IDL, ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO, USA
ImageJ® 1.38q, RASBAND, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. 1997-2009.
Canon Photostitch® 3.1 for Mac, Canon Inc., Tokyo, Japan
MT_O_P Software-Routine, K. Rodenacker, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg
Microsoft Excel® 12.1 for Mac, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
SPSS 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA

3 ERGEBNISSE

3.1 ALLGEMEINZUSTAND DER VERSUCHSTIERE

Verhalten und allgemeiner Gesundheitszustand sind bei allen Versuchstieren während der gesamten Studie normal. Ein Ausbeißen der Fäden kann durch die versenkte Nahttechnik in allen Tieren erfolgreich verhindert werden, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen. Alle Tiere weisen während der Beobachtungszeit eine leichte Gewichtszunahme auf, zeigen regelrechtes Putzverhalten und mittlere bis hohe Aktivitätslevel. Bei zwei Tieren entwickeln sich dauerhafte Kontrakturen der Fußmuskulatur auf der operierten Seite. Automutilationserscheinungen werden bei keinem der Tiere beobachtet. Auch werden in keinem der Tiere irgendwelche Anzeichen einer chronischen Gewebsentzündung bei den *post mortem* Untersuchungen festgestellt.

3.2 STRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN

3.2.1 DENATURIERUNGSPROZESS DER AUTOLOGEN MUSKULATUR

Nach Denaturierung weist das entnommene Muskelgewebe eine Schrumpfung um durchschnittlich etwa 20 % auf. Ultrastrukturelle Untersuchungen der denaturierten autologen Muskulatur zeigt acht Wochen nach *in vivo* Implantation eine größtenteils aufgehobene Myofibrillenstruktur mit Verlust der typischen Querstreifung. Immer wieder finden sich allerdings größere Bereiche mit unvollständig fortgeschrittener Denaturierung, in denen die Myofibrillenstruktur noch erkennbar ist und die Myofibrillen geschwollen sind. Hier finden sich Rückstände muskulärer Zellen mit amorphem Inhalt, umgeben von teils geschwollenen Mitochondrien, sarkolemmalen Fragmenten und elektronendichter Basallamina. Auch inflammatorische Zellen, vorwiegend Lymphozyten und Makrophagen, werden gelegentlich gefunden. Die wenigen NF, die innerhalb der Muskelmatrix gefunden werden, sind – selbst wenn sie nicht vollständig myelinisiert sind – stets mit SZ assoziiert und vorwiegend innerhalb der Basallamina der Muskelschläuche lokalisiert (Abb. 3-1).

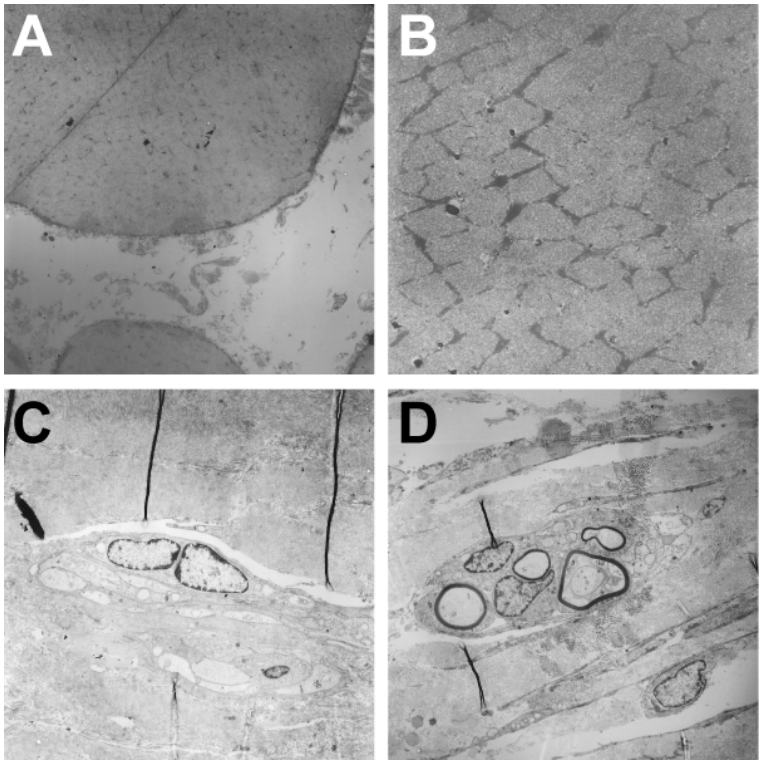

Abb. 3-1: Elektronenmikroskopische Untersuchung der denaturierten Muskulatur
(A) Degenerierte Muskelfasern innerhalb des Röhrchens, Vergr. 1250x; (B) Muskelfilamente Vergrößerung 6300x; (C) Faseriges Material innerhalb der denaturierten Muskulatur, unvollständige Denaturierung, Vergrößerung 2000x; (D) Minifaszikel mit schwach myelinisierten Nervenfasern und Schwann-Zellen innerhalb der denaturierten Muskulatur, Vergrößerung 1600x.

3.2.2 Morphologische Untersuchung der Regenerate

Autograftgruppe

Bei der Obduktion der Versuchstiere nach acht Wochen stellt sich der überbrückte Nerv in der AG-Gruppe bei allen Tieren ohne Kontinuitätsunterbrechung dar. Nahtdehiszenzen werden bei keinem der Tiere festgestellt, die Nahtstellen zwischen den Nervenenden und dem Autograft sind nach wie vor identifizierbar. Auch werden keine Anzeichen auf eine entzündliche Gewebsreaktion beobachtet. Histologisch ist der Aufbau des Nervenregenerats dem eines normalen Nerven strukturell sehr ähnlich: Aussprießende gut-myelinisierte Axone wachsen in großer Zahl gebündelt in je zwei bis acht Faszikeln durch das gut revaskularisierte autologe Nerventransplantat. Peri- und Endoneurium sind deutlich ausgebildet (Abb. 3-2). Elektronenmikroskopisch erscheint der NI in der Mitte des Regenerats aus gut-myelinisierten Axonen mit regelmäßiger Form, großem Durchmesser und dicker Myelinisolierung, umgeben von SZ und organisierter extrazellulärer Kollagen-Matrix. Fibrosierungserscheinungen werden keine beobachtet. In distalen Nervenquerschnitten (g-Abschnitt) zeigen sich neben myelinisierten NF zahlreiche dünn-myelinisierte und marklose NF mit unorganisiertem, teils verdicktem extrazellulärem Kollagen und kleinen SZ. Insgesamt lassen sich myelinisierte NF distal des Calcaneus in sieben von acht (87,5 %) Ratten nachweisen. Die myelinisierten A-

xone sind überwiegend in regenerativen Gruppen oder Clustern, aber auch einzeln verteilt angeordnet. Marklose Fasern sind in allen Tieren vorhanden.

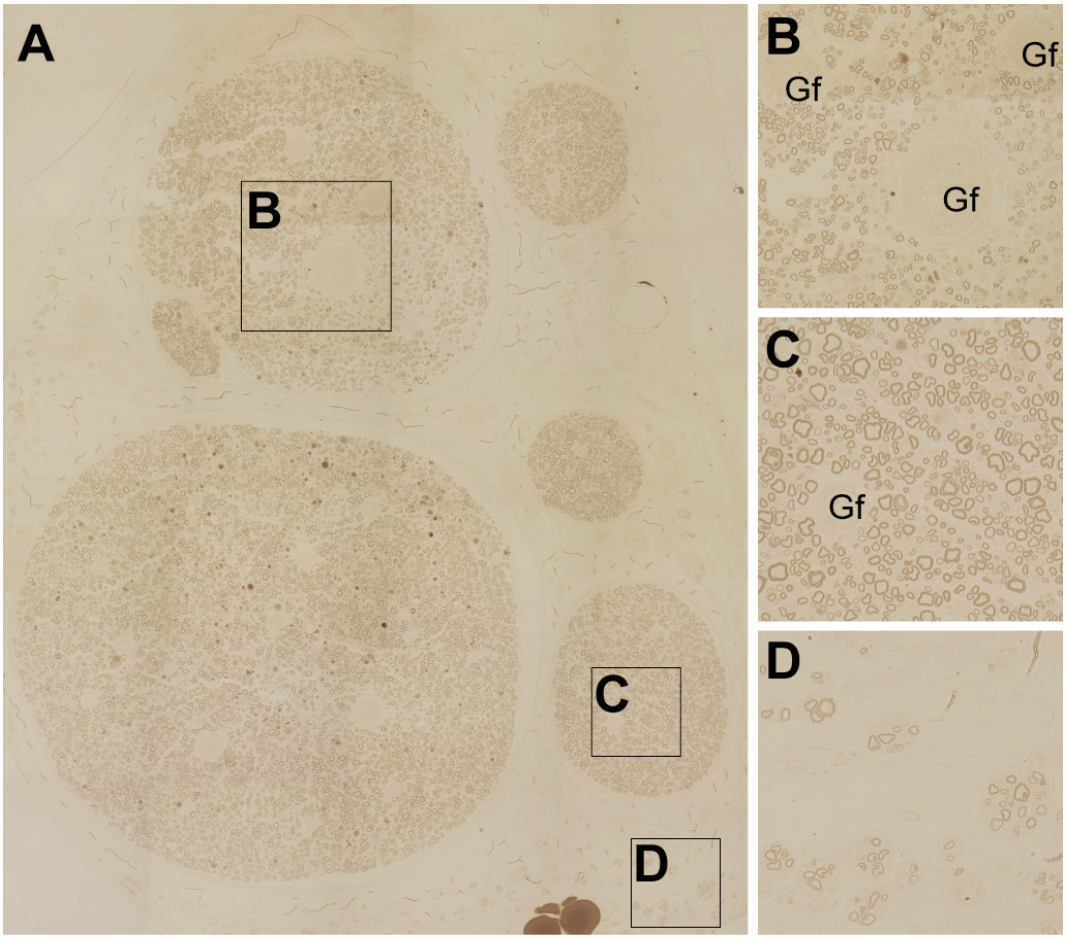

Abb. 3-2: Regeneration durch das autologes Nerventransplantat
Schnitt durch das autologes Nerventransplantat 8 Wochen nach Implantation (Paraphenylendiamin Färbung), Vergr. 400x. (A) Zahlreiche myelinisierte NF wachsen gebündelt in mehreren Faszikeln unterschiedlicher Größe durch das autologe Nerventransplantat. (B+C) In den Ausschnittsvergößerung lassen sich neben kleinen myelinisierten NF zahlreiche Gefäße (Gf) erkennen. (D) Vereinzelte NF wachsen innerhalb des Bindegewebes.

Kollagenschienengruppen

In den experimentellen Gruppen lässt sich bei der Obduktion in allen Versuchstieren die Nervenschiene mit den beiden proximal bzw. distal eingeführten Nervensegmenten ohne Dislokation der Schiene oder eines Nervenstumpfes darstellen. Die Kollagenschiene ist in allen Versuchstieren intakt und von lockerem Bindegewebe umgeben. Hinweise auf eine Entzündung werden nicht gefunden. Die Schienen zeigen eine dunklere Färbung und sind deutlich elastischer als zum Zeitpunkt der Implantation, weisen aber ansonsten makroskopisch keine weiteren Resorptionszeichen auf. Lichtmikroskopisch ist der Zerfallsprozess der Röhrchen bereits zu erkennen, ein Kollabieren der Röhrenwand oder eine Infiltration von abberanten NF wird aber nicht beobachtet. In der KS-Gruppe wachsen zahlreiche myelinisierte Axontriebe in Minifasziklen und kleinen regenerativen Clustern durch die ungefüllten Schienen über das gesamte Lumen verteilt, mit höheren Faserdichten im Zentrum der Röhre (Abb. 3-3).

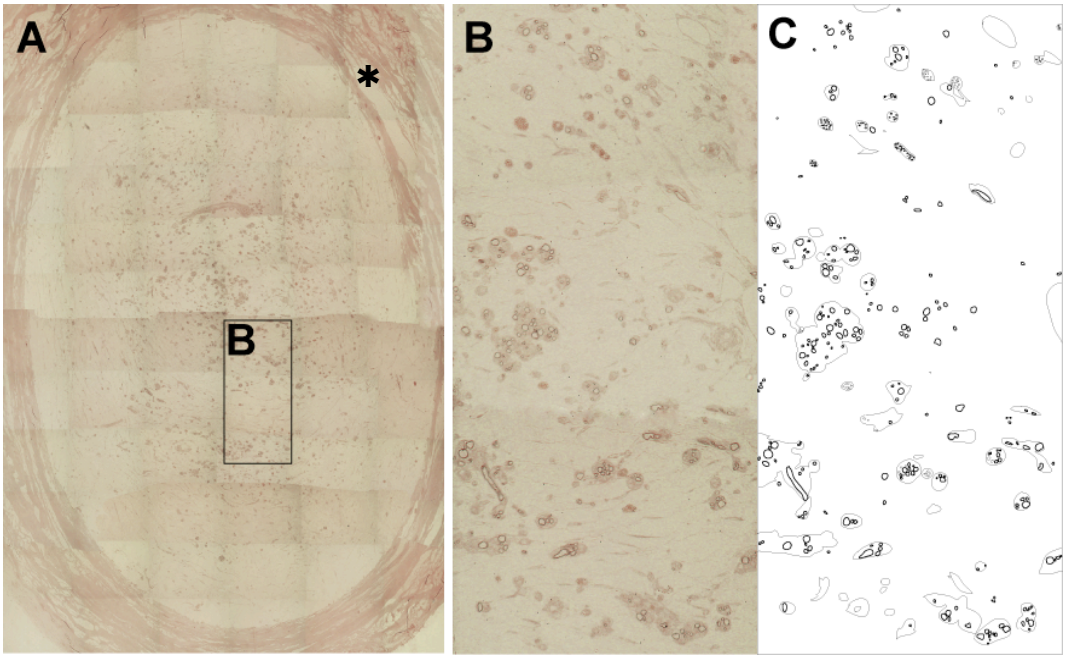

Abb. 3-3: Wachstumsmuster der NF durch eine matrixfreie Schiene
Während die Kollagenröhre (✱) bereits begonnen hat sich zu zersetzten, zeigen sich im Lumen zahlreiche kleine Axontriebe. (A) Querschnitt durch eine matrixfreie Kollagenschiene 8 Wochen postoperativ (Kachelbild aus 7x12 Einzelbildern, Vergr. 400x. (B) Ausschnittsvergrößerung, (C) schematische Darstellung der Nervenfaserverteilung.

Im Gegensatz dazu finden sich in der MDM-Gruppe die meisten Axone im Randbereich der Schiene. Die muskuläre ECM erscheint gequollen, stellenweise inhomogen dicht oder aufgelockert. Der Großteil der Axontriebe wächst in größeren Clustern innerhalb des schmalen ringförmigen Lumens zwischen MDM und luminaler Wand der Kollagenröhre. Innerhalb der dichten ECM sind licht- (Abb. 3-4) und elektronenmikroskopisch (Abb. 3-5D) nur sporadisch NF nachweisbar. Das Querschnitts-Profil lässt in beiden Schienengruppen auf eine korrekte longituniale Ausrichtung der NF innerhalb der Röhre schließen. Allerdings scheint in beiden

Schienengruppen sowohl die Anzahl an myelinisierten NF, als auch die Anzahl an Blutgefäßen im Vergleich zum Autograft vermindert. Im Vergleich zum Autograft erscheinen die Fasern insgesamt dünner und von mehr Bindegewebe umgeben. Innerhalb der regenerativen Cluster sind die Fasern in den Schienengruppen von lockerem Bindegewebe getrennt; ein Perineurium ist teilweise noch unvollständig ausgebildet (Abb. 3-3, 3-4).

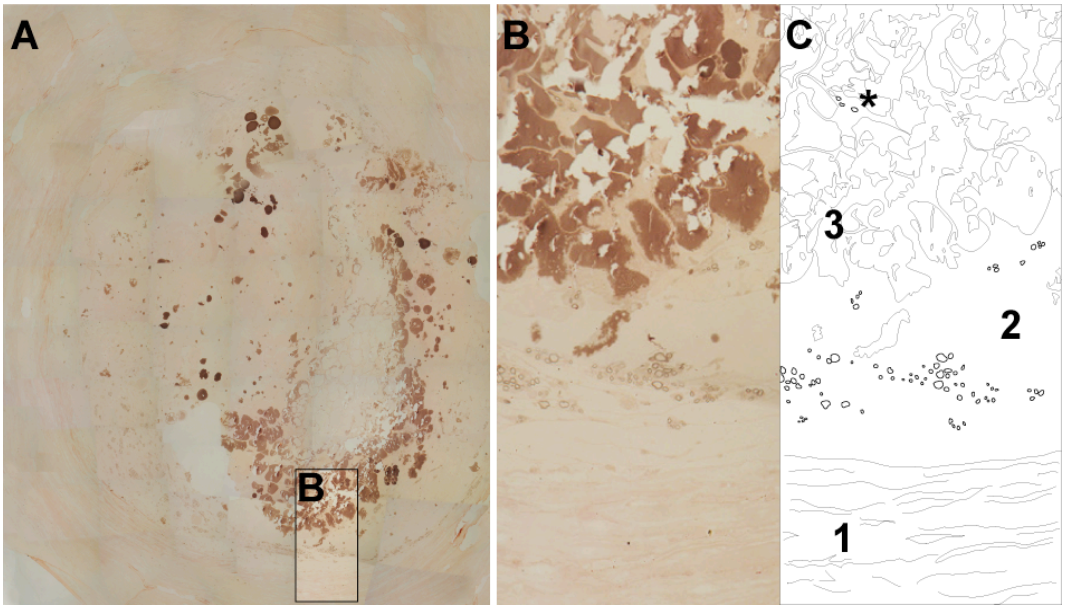

Abb. 3-4: Wachstumsmuster der NF durch ein mit MDM gefülltes Kollagenröhrchen
(A) Transversalschnitt durch die Mitte einer modifizierten Kollagenschiene (Kachelbild aus 9x11 Einzelbildern, Vergr. 400x). (B) Auschnittsvergrößerung. (C) Schematische Darstellung der Ausschnittsvergrößerung. Die regenerierenden Nervenfasern wachsen in dem schmalen Raum (2) zwischen innerer Schienenwand (1) und denaturierter Muskulatur (3). Nur vereinzelte Fasern (*) wachsen durch die dichte Matrix.

Elektronenmikroskopisch lassen sich ebenfalls gut-myelinisierte, von SZ umgebene Axone innerhalb des Röhrchens erkennen – wenn auch in deutlich geringerer Anzahl als im Autograft. Distal des Röhrchens finden sich allerdings im Vergleich zum Autograft wesentlich kleinere, dünn-myelinisierte bzw. unmyelinisierte NF mit irregulärer Form, kleine SZ und nur sehr wenige Blutgefäße. Zudem lässt sich in den am weitesten peripher entnommenen Präparaten (g-Abschnitte) eine fortschreitende Wallersche Degeneration, begleitet von einer Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration beobachten. Distal des Calcaneus können nur in jeweils drei von acht Tieren in der KS- bzw. MDM-Gruppe myelinisierte NF gefunden werden, wenn auch hier nur in sehr geringer Zahl. Unmyelinisierte Axone mit reduzierten Durchmessern werden in jeweils fünf von acht Tieren in den Gruppen KS und MDM beobachtet. In allen untersuchten Segmenten können Ovoide, Büngner-Bänder und Kollagennester beobachtet werden, wobei Anzeichen von Myelindestruktion und der Anteil denervierterer Schwann-Zellen in beiden Schienengruppen höher liegt als in der AG-Gruppe. Obwohl in den Schienengruppen mehrere Tiere keine oder nur sehr wenige NF in den distalen Nervenabschnitten aufweisen, werden zunächst alle Tiere in die sich anschließende stereologische Auswertung einbezogen (siehe unten).

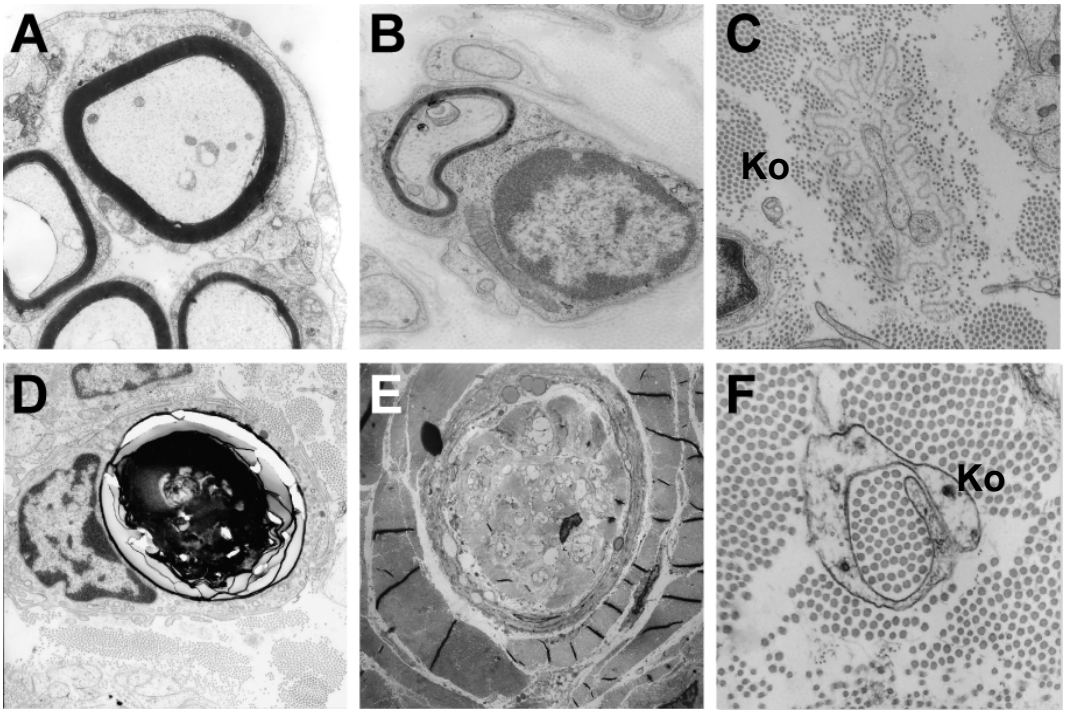

Abb. 3-5: Elektronenmikroskopische Beobachtungen
(A) Minifaszikel (Gruppe B), Vergrößerung 5000x, (B) schwach myelinisierte Nervenfaser (Gruppe B), Vergrößerung 5000x, (C) Ausbildung von Büngner-Bändern, zahlreiche quergetroffene Kollagenfasern (Ko), Vergrößerung 2000x, (D) Schwannzelle mit Myelindebris, Vergrößerung 2000x, (E) Degenerierter Nerv innerhalb der denaturierten Muskulatur (Gruppe C), Vergrößerung 2000x, (F) Aus Mangel an Substrat umwickelt eine Schwann-Zelle ein Bündel Kollagenfasern (Ko) (MDM-Gruppe), Vergrößerung 4000x.

3.2.3 Morphometrische Auswertung der Nervenpräparate

3.2.3.1 Vergleich der Erfolgsraten

Myelinisierte NF sind lichtmikroskopisch in allen Tieren der AG-Gruppe distal des Transplantats (Abschnitt iIII) nachweisbar. Nur in 50 % sind myelinisierte Fasern erfolgreich durch die matrixfreie Kollagenschiene gewachsen. In der MDM-Gruppe können in sechs von acht Tieren (75 %) myelinisierte NF im distalen Stumpf beobachtet werden. Auch bei der Untersuchung von Querschnitten des N. tibialis vor Eintritt in den MG lassen sich in allen Tieren der AG-Gruppe und in der Hälfte der Tiere in der KS-Gruppe myelinisierte NF nachweisen, aber nur noch in drei von acht Tieren (37,5 %) in der MDM-Gruppe. Distal des Calcaneus lassen sich im N. tibialis/ N. plantaris noch in sieben von acht Tieren (87,5 %) in der AG-Gruppe, und in je drei von acht Tieren (37,5 %) in der KS- und MDM-Gruppe beobachten (Tab. 3-1). Auch zeigt sich, dass nur in Tieren, in denen proximal Fasern nachweisbar sind, auch weiter distal noch myelinisierte NF zu beobachten sind. Ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Erfolgsraten ergibt sich nur zwischen AG und MDM vor Eintritt in den Gastrocnemius ($p=0,0256$, Tab. 3-1).

Tabelle 3-1: Erfolgsraten in Prozent

Abschnitt	*Gruppe*			*p-Werte*		
	AG	*KS*	*MDM*	*AG - KS*	*AG - MDM*	*KS - MDM*
iIII	100	50	75	0,0769	0,4667	0,6084
h	100	50	37,5	0,0769	**0,0256***	1
g	87,5	37,5	37,5	0,1189	0,1189	0,0769

Angegeben sind die Erfolgsraten der einzelnen Gruppen in Prozent auf verschiedenen Querschnittshöhen. (iIII) distal des Transplantats/ Interponats; (h) kurz vor Eintritt in die Gastrocnemius-Muskulatur; (g) distal des Calcaneus. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Exakten Fisher-Test. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Elektronenmikroskopisch konnten kleine myelinisierte und unmyelinisierte NF selbst in den distalen Nervenabschnitten in allen Tieren vereinzelt beobachtet werden; diese wurden jedoch nicht von der Analysesoftware erkannt und gehen deshalb nicht in diese Statistik mit ein.

3.2.3.2 Quantitative Merkmale

Eine Zusammenfassung der Signifikanzen aller untersuchten morphometrischen Merkmale auf Höhe eines Querschnitts durch die Mitte des Transplantats/ Interponats (=Abschnitt iII) findet sich in Tabelle 3-2; die Ergebnisse werden im Folgenden ausführlich besprochen. Wie die Erfolgsrate schon zeigt, sind nicht in allen Versuchstieren distal des Defekts lichtmikroskopisch NF nachweisbar. Aus diesem Grund ist der Stichprobenumfang in diesen Abschnitten (iIII, h, g) nicht mehr für eine aussagekräftige statistische Analyse ausreichend. Dazu kommt, dass in diesen Abschnitten durch die fortschreitende Waller'sche Degeneration große Mengen an Myelindebris, Zelldetritus etc. zu zahlreichen Artefakten bei der automatischen Vermessung geführt und dadurch die morphometrische Analyse erschwert haben. Aus diesen Gründen beschränkt sich die Analyse dieser Abschnitte im Wesentlichen auf morphologische Beobachtungen und Erfolgsraten. Zur Information des Lesers werden dennoch die morphometrischen Ergebnisse aller Abschnitte abgebildet; wegen des großen Tabellenumfangs im Anhang (Tab. 3-22).

Tabelle 3-2: Statistischer Vergleich der morphometrischen Ergebnisse

	AG-KS-MDM		*AG - KS*	*AG - MDM*	*KS - MDM*
TEST	*K-W*		*M-W*	*M-W*	*M-W*
N	**0,000***	→	**0,001***	**0,001***	**0,002***
d_f	0,112				
d_a	0,867				
d_m	**0,005***	→	0,141	**0,016***	**0,005***
A_f	**0,000***	→	**0,001***	**0,001***	**0,002***
a_f	0,213				
A_a	**0,000***	→	**0,001***	**0,001***	**0,002***
a_a	0,454				
A_m	**0,000***	→	**0,001***	**0,001***	**0,005***
a_m	0,066				
G-Ratio	**0,030***	→	**0,005***	0,753	0,115

Als Grundlage zur Berechnung der Parameter dient das Verhältnis (*engl.* ratio) links / rechts auf Höhe eines Querschnittes durch die Mitte des Interponats (iII). Ergeben sich im gemeinsamen Vergleich der Studiengruppen (Kruskal-Wallis-Test, *K-W*) signifikante Unterschiede, schließt sich ein paarweiser Vergleich an (Mann-Whitney U Test, *M-W*). P-Werte $p<0,05$ werden als statistisch signifikant betrachtet. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

3.2.3.2.1 Gesamtfaserzahl

Auf der Kontrollseite werden absolute Faserzahlen *N* von 8220 ± 882 innerhalb des gesunden NI gemessen, wobei die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht statistisch signifikant sind. Auf der operierten Seite hingegen sind die Unterschiede innerhalb des Transplantats/ Interponats (gleiche Querschnittshöhe) zwischen allen Studiengruppen statistisch signifikant. Die höchsten Gesamtfaserzahlen werden in der AG-Gruppe (11.649 ± 2013) gezählt, während in der KS-Gruppe nur 2248 ± 1284 (p=0,001) und in der MDM-Gruppe 256 ± 325 (p=0,001) myelinisierte Nervenfasern detektiert werden (Tab. 3-22, Tab. 3-2, Abb. 3-6). In Abb. 3-7 sind die NF auf unterschiedlichen Querschnittshöhen abgebildet. Dabei lässt sich ein stetiger Abfall der Gesamtfaserzahlen nach distal in allen Gruppen beobachten. Eine Ausnahme stellt hier der Querschnitt durch die Mitte des Autografts dar, in dem deutlich mehr Fasern als auf der Gegenseite beobachtet werden. Auch in den distalen Abschnitten lassen sich in der AG-Gruppe im Vergleich zu den Schienengruppen höhere Gesamtfaserzahlen beobachten. Wegen der zu geringen Stichprobengröße wurde in diesen Abschnitten jedoch auf eine statistische Auswertung verzichtet.

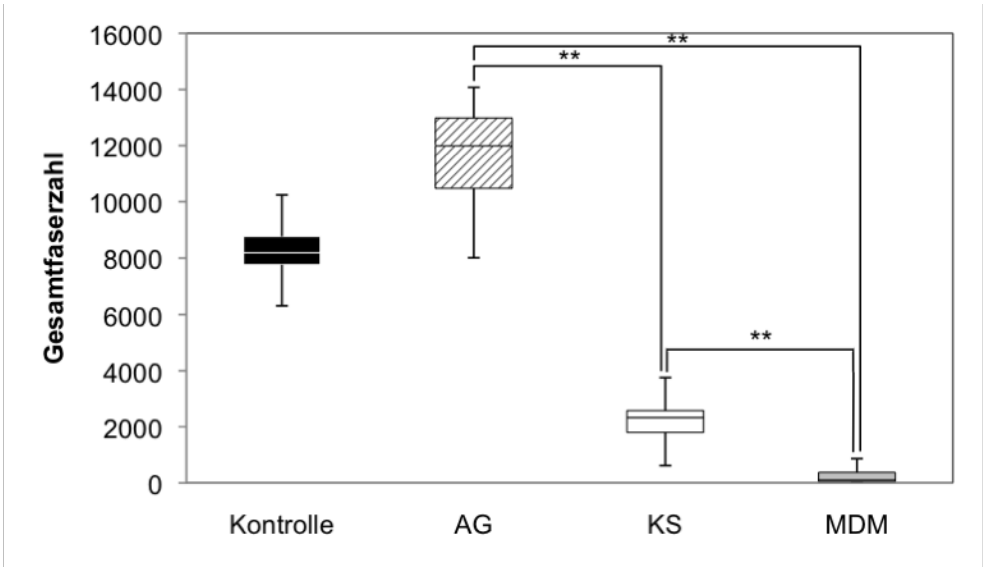

Abb. 3-6: Gesamtfaserzahl (Boxplot)
Abgebildet ist die Gesamtfaserzahl *N* auf Höhe eines Querschnitts durch die Mitte des Interponats. Als Kontrolle dient die Gegenseite. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene. (∗∗) Signifikanter Unterschied (p<0,01). Für den paarweisen Vergleich diente der Mann-Whitney U Test.

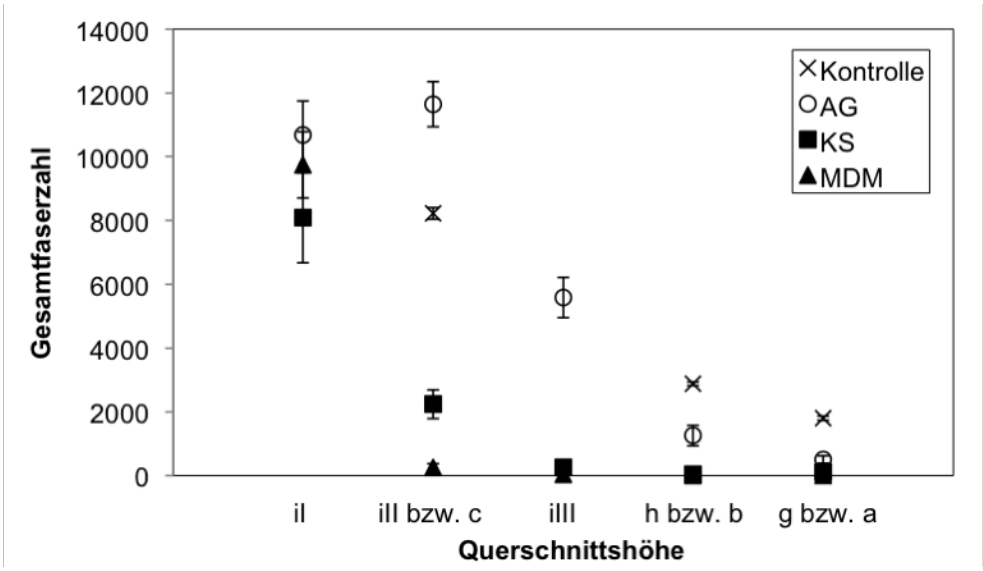

Abb. 3-7: Gesamtfaserzahl auf unterschiedlichen Querschnittshöhen
Abgebildet ist die Gesamtfaserzahl des N. ischiadicus/ N. tibialis proximal des Interponats (il), in der Mitte des Interponats (ill), distal des Interponats (illl), sowie kurz vor Eintritt in den Gastrocnemius (h) und distal des Calcaneus (g). Für den paarweisen Vergleich diente der Mann-Whitney U Test.

3.2.3.2.2 Flächen und Durchmesser

Gesamtflächen

Die durchschnittliche Gesamtfaserfläche A_f des gesunden NI liegt in unserer Studie bei 308.006 ± 32.596 µm^2, wobei der Unterschied zwischen den Gruppen nicht statistisch signifikant ist. Innerhalb der Transplantate/Interponate auf der operierten Seite hingegen finden sich signifikante Unterschiede zwischen allen Studiengruppen mit den höchsten Gesamtfaserflächen in der AG-Gruppe (112.131 ± 29.823 µm^2). In den Schienengruppen werden Flächen von 25.165 ± 16.755 µm^2 in der KS-Gruppe und 3126 ± 3894 µm^2 in der MDM-Gruppe

gemessen. Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich bei Betrachtung der Gesamtaxonfläche A_a (Kontrolle: 120.082 ± 14.672 µm^2; AG: 35.387 ± 10.175 µm^2, KS: 9680 ± 7561 µm^2; MDM: 1000 ± 1322 µm^2) und der Gesamtmyelinfläche A_m (Kontrolle: 187.925 ± 22.359 µm^2; AG: 76.744 ± 19.871 µm^2; KS: 15.485 ± 9.798 µm^2; MDM: 2126 ± 2586 µm^2; Tab. 3-22). Damit ist der Unterschied der Gesamtflächen von Faser, Axon und Myelinscheide sowohl zwischen AG-Gruppe und beiden Schienengruppen, als auch zwischen ungefüllten und muskelgefüllten Schienen statistisch signifikant (Tab. 3-2, Abb. 3-8).

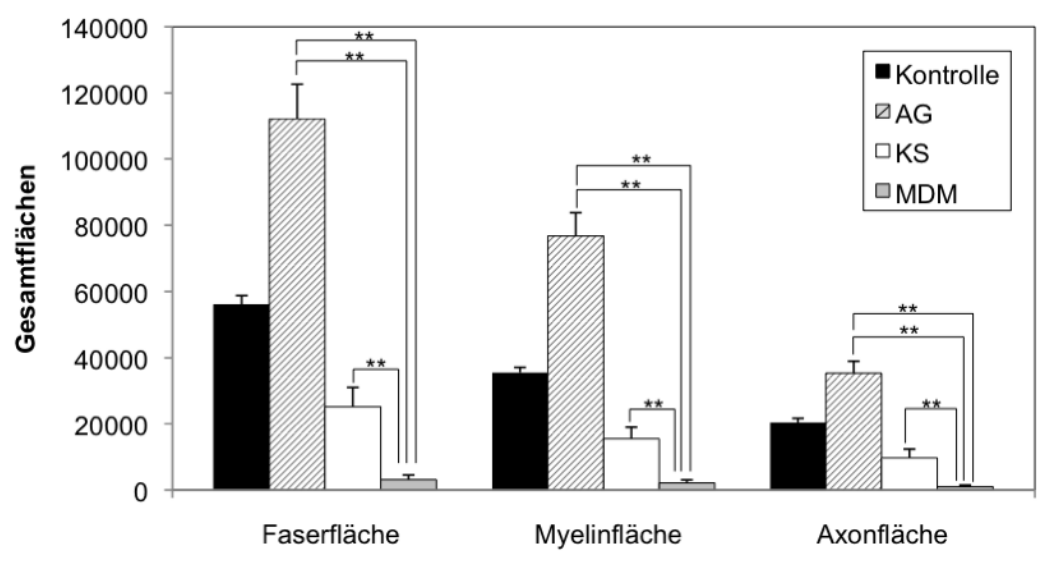

Abb. 3-8: Gesamtflächen von Faser, Myelin und Axon [µm^2]
Dargestellt sind die mittleren Gesamtflächen von Faser, Myelin und Axon. Als Kontrolle dient der Wert der Gegenseite. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. (∗∗) Signifikanter Unterschied (p<0,01); (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene. Für den paarweisen Vergleich diente der Mann-Whitney U Test.

Mittlere Flächen von Faser und Axon

Auf der Kontrollseite werden mittlere Faserflächen a_f von 37,6 ± 3,5 µm^2, Axonflächen a_a von 14,7 ± 2,3 µm^2 und Myelinflächen a_m von 22,9 ± 1,6 µm^2 gemessen. Im Gegensatz dazu liegt die mittlere Faserfläche auf der operierten Seite bei 9,6 ± 1,3 µm^2 (AG) und 10,6 ± 3,5 µm^2 (KS). In der MDM-Gruppe finden sich tendenziell höhere Faserflächen mit 12,3 ± 3,1 µm^2. Die mittleren Axonflächen liegen bei 3,0 ± 0,46 µm^2 (AG), 4,1 ± 2,1 µm^2 (KS) und 3,6 ± 1,9 µm^2 (MDM) (Tab. 3-22). Die beobachteten Unterschiede zwischen den Studiengruppen sind jedoch nicht statistisch signifikant (Tab. 3-2).

Faser- und Axondurchmesser

Im normalen NI werden mittlere Faserduchmesser d_f von 6,5 ± 0,4 µm und mittlere Axondurchmesser d_a von 4,0 ± 0,4 µm gemessen. Im Vergleich dazu liegt der mittlere Faserdurchmesser auf der operierten Seite in der MDM-Gruppe mit 3,7 ± 0,5, und damit tendenziell höher als in den anderen Studiengruppen (AG: 3,3 ± 0,2 µm; KS: 3,3 ± 0,2 µm). Der mittlere Axondurchmesser liegt bei 1,8 ± 0,1 µm (AG), 1,8 ± 0,1 µm (KS) und 1,8 ± 0,6 µm

(MDM). Statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Studiengruppen werden jedoch weder beim Faser- noch beim Axondurchmesser beobachtet (Tab. 3-2; Abb. 3-9).

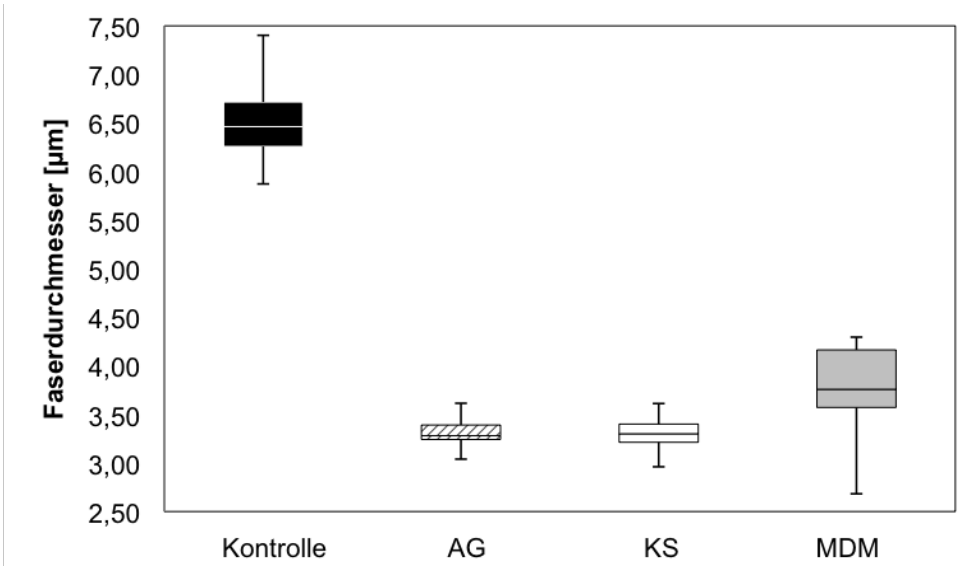

Abb. 3-9: Mittlerer Faserdurchmesser [µm] (Boxplot)
Dargestellt sind die mittleren Faserdurchmesser auf Höhe eines Querschnitts durch die Mitte des Interponats. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene. Der Unterschied zwischen den Studiengruppen war nicht statistisch signifikant. Für den paarweisen Vergleich diente der Mann-Whitney U Test.

3.2.3.2.3 Myelinscheidenparameter

Myelinscheidendicke

Die mittlerer Myelindicke d_m im unbehandelten NI liegt bei 0,64 ± 0,05 µm. Auf der operierten Seite wird die höchste Myelindicke in der MDM-Gruppe beobachtet (0,50 ± 0,06 µm), im Vergleich zu 0,43 ± 0,03 µm in der AG- und 0,41 ± 0,03 µm in der KS-Gruppe (Tab. 3-22). Der Unterschied ist sowohl zwischen MDM und AG (p=0,016), als auch zwischen MDM und KS (p<0,01) statistisch signifikant, während der Unterschied zwischen AG und KS (p=0,141) keinen signifikanten Unterschied zeigt (Tab. 3-2, Abb. 3-10). Auch die mittlere Myelinfläche (8,7 ± 1,7 µm^2) ist in der MDM-Gruppe tendenziell höher als in den anderen Studiengruppen (AG: 6,6 ± 0,9 µm^2; KS: 6,5 ± 1,4 µm^2), wobei der Unterschied allerdings nicht statistisch signifikant ist.

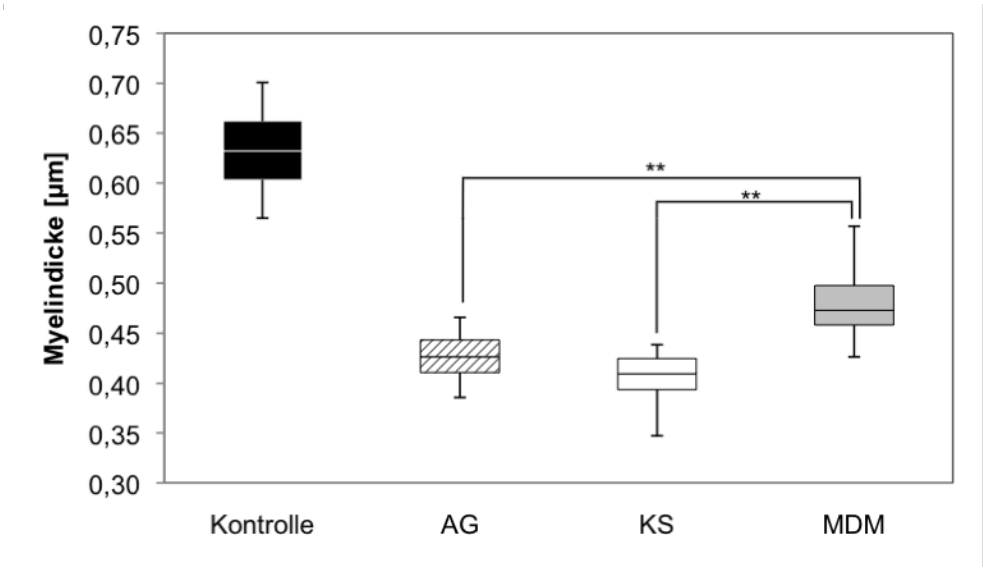

Abb. 3-10: Mittlere Myelindicke [µm] (Boxplot)
Dargestellt ist die mittlere Myelindicke auf Höhe eines Querschnitts durch die Mitte des Interponats. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene. (∗∗) Statistisch signifikanter Unterschied ($p<0,01$). Für den paarweisen Vergleich diente der Mann-Whitney U Test.

G-Ratio

Die *G-Ratio* beträgt auf der unbehandelten Kontrollseite 0,55 ± 0,04. In der KS-Gruppe werden tendenziell höhere (0,58 ± 0,03) gemessen, während In den beiden anderen Studiengruppen die *G-Ratio* erniedrigt ist bei 0,54 ± 0,02 in der AG- und 0,52 ± 0,08 in der MDM-Gruppe. Beim paarweisen Vergleich der Studiengruppen tritt ein signifikanter Unterschied nur zwischen den Gruppen KS und AG auf ($p<0,01$; Tab. 3-2, Abb. 3-11).

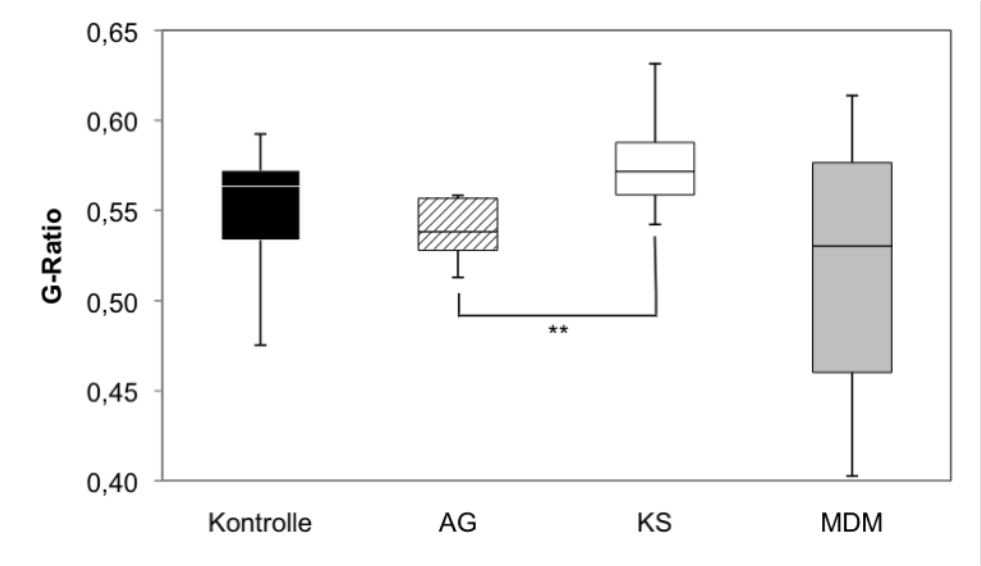

Abb. 3-11: G-Ratio (Boxplot)
Dargestellt ist die mittlere G-Ratio auf Höhe eines Querschnitts durch die Mitte des Interponats. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene. (∗∗) Signifikanter Unterschied ($p<0,01$). Für den paarweisen Vergleich diente der Mann-Whitney U Test.

3.2.4 GASTROCNEMIUS-VOLUMEN

Makroskopisch zeigt sich auf der operierten Seite in unterschiedlichem Ausmaß bei allen Tieren eine Atrophie der Wadenmuskulatur, vergesellschaftet mit einer kompensatorischen Hypertrophie der Gegenseite (Abb. 3-12). Die Analyse der Muskelvolumina ergibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrollseite (2,30 ± 0,14 ml) und operierter Seite (0,64 ± 0,21 ml) in allen Studiengruppen ($p<0,01$; Tab. 3-4). Die höchsten Muskelvolumina werden in der AG-Gruppe (0,85 ± 0,19 ml) gemessen. In beiden Schienengruppen (KS: 0,50 ± 0,12 ml; MDM: 0,58 ± 0,12 ml) werden im Vergleich zum Autograft signifikant niedrigere Volumina gemessen (Tab. 3-3), während der Unterschied zwischen den beiden Schienengruppen nicht signifikant ist ($p=0,38$). Dieses Ergebnis zeigt sich auch dann, wenn – zum Ausschalten des Einflusses einer möglichen kompensatorischen Hypertrophie der Gegenseite – das Verhältnis der mit dem KGW normalisierten Volumina links/rechts in der statistischen Analyse verwendet wird (Tab. 3-5).

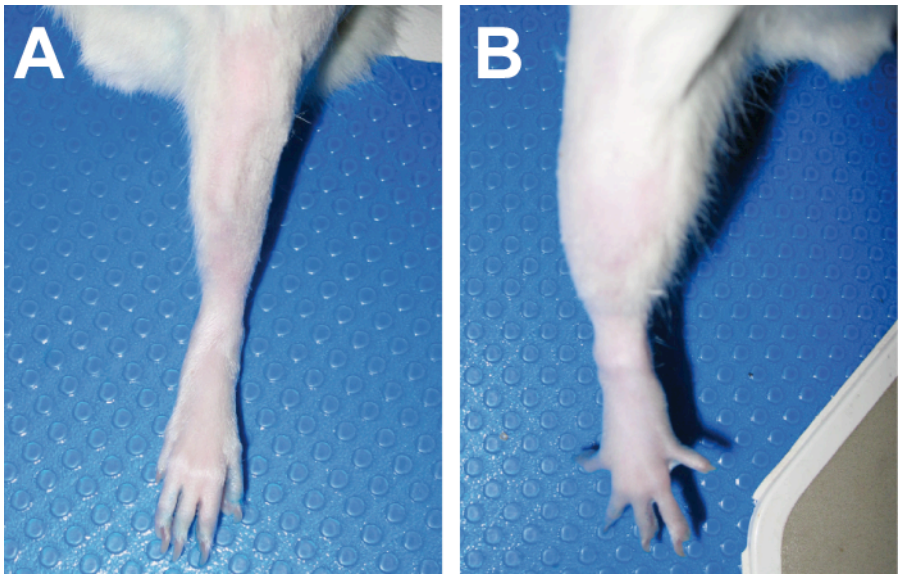

Abb. 3-12: Wadenmuskelvolumina im Vergleich
Vergleich der Volumina präoperativ und 8 Wochen postoperativ. Deutliche Anzeichen einer Denervierungsathrophie der Wadenmuskulatur auf der linken, operierten Seite (A), bei gleichzeitiger kompensatorischer Hypertrophie der Gegenseite (B) acht Wochen postoperativ. *Post mortem* erfolgt eine Volumenbestimmung zur Quantifizierung dieser Beobachtungen.

Tabelle 3-3: Deskriptive Statistik der absoluten Gastrocnemius-Volumina (ml)

Gruppe	*Seite*	*n*	*Median*	*Min*	*Max*	*MW ± SA*
AG	*L*	8	0,9	0,6	1,1	0,85 ± 0,19
	R	8	2,2	2	2,5	2,25 ± 0,15
KS	*L*	8	0,6	0,3	0,6	0,50 ± 0,12
	R	8	2,3	2,2	2,5	2,34 ± 0,09
MDM	*L*	8	0,6	0,4	0,8	0,58 ± 0,12
	R	8	2,3	2,1	2,5	2,30 ± 0,17

Abgebildet sind Median, Minimum (Min), Maximum (Max), Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SA) der absoluten Gastrocnemius-Muskelvolumina der operierten Seite (L) und der nicht-operierten Kontrollseite (R). (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-4: Statistischer Vergleich der Gastrocnemius-Volumina mit der Kontrollseite

	AG	*KS*	*MDM*
GVol L-R	**0,008***	**0,008***	**0,008***

P-Werte aus der statistischen Analyse mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-5: Statistischer Vergleich der Gastrocnemius-Volumina der Gruppen

	AG-KS-MDM		*AG-KS*	*AG-MDM*	*KS-MDM*
TEST	*K-W*		*M-W*	*M-W*	*M-W*
GVol L	**0,003***	→	**0,002***	**0,007***	0,38
GVol L / GVol R	**0,04***	→	**0,001***	**0,01***	0,16

In der linken Tabellenhälfte dargestellt ist der gleichzeitige Vergleich (Kruskal-Wallis, K-W) des *GVol* (links). Ergibt sich ein signifikantem Unterschied, so schließt sich in der rechten Tabellenhälfte ein paarweiser Vergleich (Mann-Whitney U, M-W) zur Diskrimination von Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen an. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

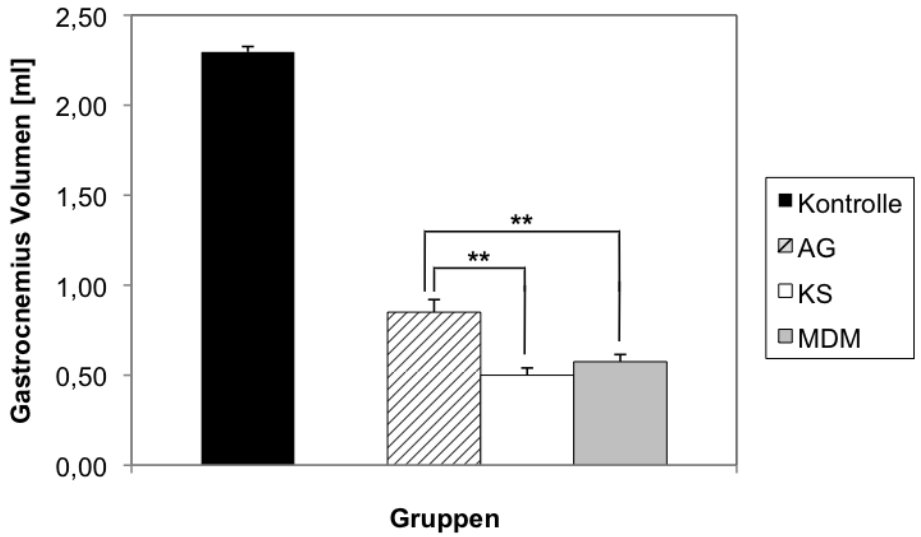

Abb. 3-13: Vergleich der Gastrocnemius-Volumina (ml)
Mittlere Volumina der Gastrocnemius-Muskulatur. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. Die Kontrolle entspricht dem rechten (unoperierten) Bein aller Tiere. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modfizierte Kollagenschiene. (∗∗) Statistisch signifikanter Unterschied ($p<0,01$). Für den paarweisen statistischen Vergleich diente der Mann-Whitney U Test.

3.2.5 MUSKELFASERQUERSCHNITTSFLÄCHE

Histologisch lassen sich in der AG-Gruppe dicht gepackte Muskelfasern mit randständigen Nuklei erkennen. Im Vergleich zur Kontrollseite sind die Muskelfasern zwar kleiner, weisen aber ansonsten die gleiche zelluläre Morphologie auf. Im Gegensatz dazu zeigen alle Präparate in den Schienengruppen Anzeichen einer Denervierungsatrophie in unterschiedlichem Ausmaß, wie eine generalisierte Muskelatrophie, fettige Degeneration, verstärkte Fibrosierung und Kernveränderungen (Abb. 3-14).

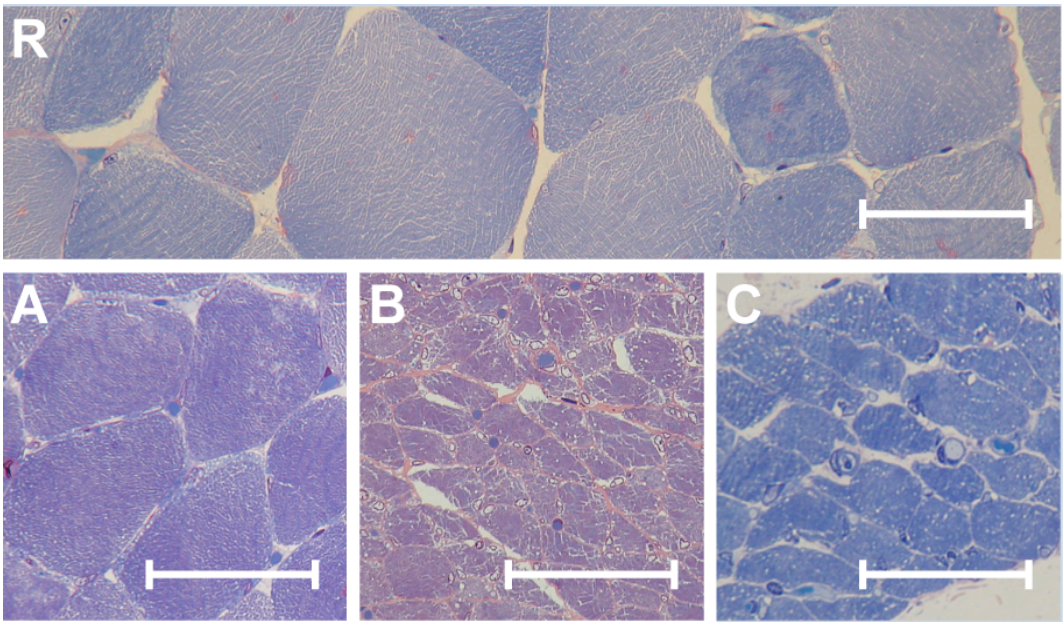

Abb. 3-14: Subjektive Auswahl von Muskelfaserquerschnitten
Faserquerschnitte durch den rechten M. gastrocnemius (R, Kontrolle) mit kompensatorischer Hypertrophie der Muskelfasern. (A) Autograft, (B) leere Kollagenschiene, (C) modifizierte Kollagenschiene. Vergrößerung 400-fach. Der Balken entspricht 50 µm.

Zur Quantifizierung dieser Aussagen werden die Muskelfaserquerschnittsflächen vermessen. Da die Größe des Tiers und die Region der Muskelbiopsie Einfluss auf die Muskelfaserquerschnittsfläche haben, werden pro Tier 150 Muskelfasern aus verschiedenen Muskelregionen vermessen und die mittlere Querschnittsfläche im Verhältnis zur Gegenseite betrachtet. Nach acht Wochen zeigt sich in allen Gruppen eine Muskelfaseratrophie mit einer Verkleinerung der mittleren Muskelfaserfläche von 2941 ± 119 µm^2 (Kontrolle) auf 1662 ± 864 µm^2 in der AG-Gruppe, 339 ± 88 µm^2 in der KS-Gruppe und 423 ± 147 µm^2 in der MDM-Gruppe (Tab. 3-6). Der paarweise statistische Vergleich zeigt sowohl zwischen AG und KS, als auch zwischen AG und MDM einen hoch signifikanten Unterschied ($p<0,001$). Die Gruppen KS und MDM unterscheiden sich hingegen nicht signifikant von einander ($p=0,14$; Tab. 3-7). Dasselbe Ergebnis zeigt sich auch, wenn die Daten als Verhältnis links/rechts berechnet und die Ratios der Gruppen verglichen werden (Tab. 3-8).

Tabelle 3-6: Deskriptive Statistik der Muskelfaserquerschnittsfläche (µm^2)

Gruppe		*Median*	*Min*	*Max*	*MW ± SA*
AG	*L*	1661,2	694,2	3178,1	1662,0 ± 863,7
	R	2761,9	1857,2	3522,0	2730,7 ± 564,4
KS	*L*	325,5	224,9	512,2	339,2 ± 87,9
	R	2999,0	2591,0	3448,0	3025,1 ± 326,3
MDM	*L*	366,7	300,1	739,0	422,8 ± 147,2
	R	3061,7	2443,6	4109,8	3115,5 ± 539,4

Alle Ergebnisse der linken (L) bzw. rechten Seite (R) werden angegeben als Median, Minimum (Min), Maximum (Max), Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SA). (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-7: Vergleich der Muskelfaserquerschnittsflächen der Gruppen

Gruppe 1	*Gruppe 2*	*Differenz Gruppe 1 - Gruppe 2*	*p-Wert*
AG	*KS*	0,001322821	**<0,001***
AG	*MDM*	0,001239165	**<0,001***
KS	*MDM*	$-8{,}37 \cdot 10^{-5}$	0,14
	Overall		**<0,001***

Angegeben werden die Differenzen der Ergebnisse der Gruppen und die p-Werte. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene. Für die statistische Analyse dienten Generalized estimation equation Modelle (GEE).

Tabelle 3-8: Vergleich der Ratios links : rechts der Muskelfaserquerschnittsfläche

Gruppe 1	*Gruppe 2*	*Differenz der Ratios Gruppe 1 - Gruppe 2*	*p-Wert*
AG	*KS*	0,607664734	**<0,001***
AG	*MDM*	0,568070266	**<0,001***
KS	*MDM*	-0,039594468	0,251
	Overall		**<0,001***

Angegeben werden die Differenzen der Ergebnisse der Gruppen und die p-Werte. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene. Für die statistische Analyse dienten Generalized estimation equation Modelle (GEE)

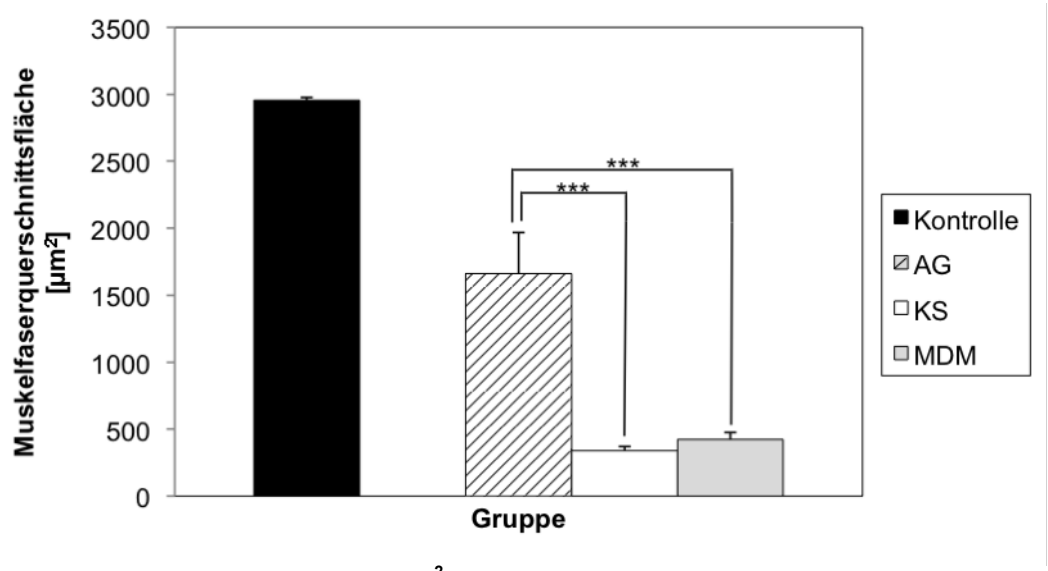

Abb. 3-15: Muskelfaserquerschnittsfläche (µm²)
Mittlere Muskelfaserquerschnittsflächen. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. Die Kontrolle entspricht dem rechten (nicht-operierten) Bein. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modfizierte Kollagenschiene. (***) hoch signifikanter Unterschied (p<0,001). Für die statistische Analyse diente der Mann-Whitney U Test. Als statistischer Test dienten Generalized estimation equation Modelle.

3.3 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE REIZMESSUNG

Morphologie der Muskelaktionspotenziale

Eine Ableitung von CMAPs aus der Interosseus-Muskulatur der operierten Hinterbeine ist bei keinem der Tiere möglich. Da jedoch innerhalb des GM auf der operierten Seite bei allen Ratten CMAPs aufgezeichnet werden können, werden diese für die Berechnung der Nervenleitgeschwindigkeiten verwendet. Je nachdem ob distaler oder proximaler Stumpf gereizt werden, variiert die Wellenform von nahezu normalen biphasischen CMAPs zu polyphasischen CMAPs mit verlängerter Zeitdauer. Bei Stimulation des proximalen Stumpfes lassen sich in den Tieren aller Untersuchungsgruppen morphologisch identische, polyphasische Muskelaktionspotenziale ableiten. Die mittlere Intensität, die zur Auslösung eines CMAPs benötigt wird, liegt bei 3,0 mA nach Stimulation des proximalen und 5,8 mA nach Stimulation des distalen Stumpfes. Der Grad pathologischer Spontanaktivität zeigt zwischen den Gruppen keine Unterschiede. Auf der Kontrollseite lassen sich nach supramaximaler Stimulation des NI auf Mitte des Oberschenkels, bzw. des N. tibialis am Malleolus medialis mit einer Intensität von 1.9 mA physiologische, deutlich biphasische CMAPs ableiten. Wird die aktive Elektrode innerhalb des MG platziert, so lassen sich allerdings auch hier polyphysische CMAPs beobachten.

Nervenleitgeschwindigkeit

Aus statistischer Sicht ist der Unterschied zwischen operierter (33,5 ± 5,3 m/s) und Kontrollseite (54,3 ± 6,9 m/s) signifikant (p=0,008; Tab. 3-10, Abb. 3-16). Zwischen den Studiengruppen hingegen ergibt sich kein statistischer Unterschied der Nervenleitgeschwindigkeit (0,39), wobei die NLG in der AG-Gruppe tendentiell etwas höher ist (AG: 35,9 ± 6,6 m/s; KS: 31,5 ± 5,1 m/s; MDM: 33,0 ± 3,4 m/s; Abb. 3-16). Es ergibt sich auch dann kein statistisch signifikanter Unterschied, wenn wenn das Verhältnis zur Gegenseite (*NLG* L/ *NLG* R) für die statistische Analyse verwendet wird (Tab. 3-11). Auf einen paarweisen Vergleich kann aus diesem Grund verzichtet werden.

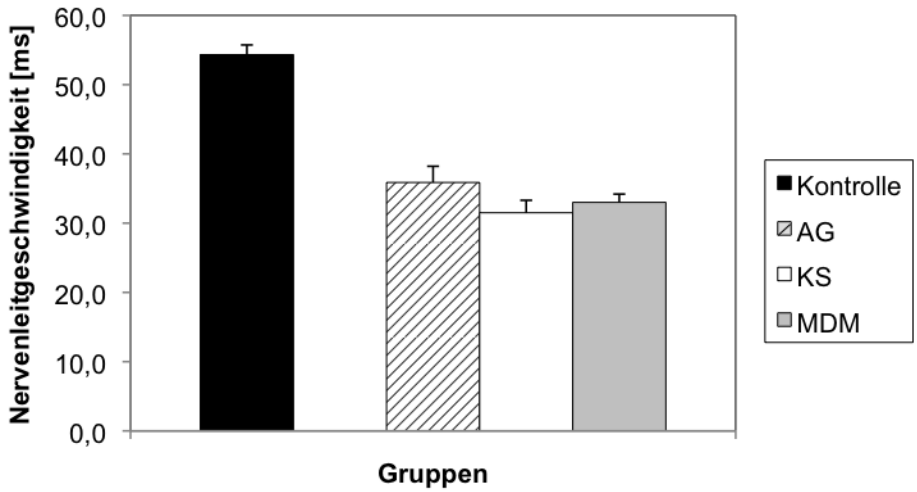

Abb. 3-16: Leitgeschwindigkeit (m/s) im Gruppenvergleich
Als Kontrolle dient in dieser Grafik die Gegenseite aller Tiere. Zwischen den einzelnen Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede. Verglichen mit der Kontrollseite sind alle Werte signifikant. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) Modifizierte Kollagenschiene. Zwischen den Studiengruppen waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen (p=0,39). Als statistischer Test diente der Kruskal-Wallis-Test.

Tabelle 3-9: Deskriptive Statistik der Nervenleitgeschwindigkeit

	NLG	*Median*	*Min*	*Max*	*MW* ± *SA*
AG	L	33,0	27,0	46,0	35,9 ± 6,6
	R	59,0	48,0	71,0	58,8 ± 7,4
	L / R	0,60	0,44	0,90	0,63 ± 0,17
KS	L	31,0	26,0	39,0	31,5 ± 5,1
	R	54,5	43,0	60,0	52,4 ± 6,5
	L / R	0,60	0,44	0,71	0,60 ± 0,07
MDM	L	33,5	27,0	38,0	33,0 ± 3,4
	R	51,5	45,0	61,0	51,9 ± 4,9
	L / R	0,64	0,52	0,75	0,64 ± 0,07

Die Ergebnisse der NLG des linken (L) bzw. rechten (R) N. ischiadicus bzw. der Ratio links : rechts (L/R), dargestellt als Median, Minimum (Min), Maximum (Max), Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SA). (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-10: Vergleich der Leitgeschwindigkeit mit der Kontrollseite

	AG	*KS*	*MDM*
NLG L-R	**0,008***	**0,008***	**0,008***

P-Werte aus der statistischen Analyse mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummen Tests (Wilc). (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-11: Vergleich der Leitgeschwindigkeiten der Studiengruppen

	AG-KS-MDM
NLG L	0,39
NLG L / *NLG* R	0,65

P-Werte aus der statistischen Analyse der NLG des linken (L) bzw. rechten (R) N. ischiadicus mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

3.4 EVALUATION DES IN VIVO REGENERATIONSVERLAUFS

Direkt nach der Operation schleifen alle Versuchstiere die operierte Gliedmaße hinterher; eine aktive Streckung und Beugung im Kniegelenk ist zu diesem Zeitpunkt bei keinem Tier möglich, ebenso wenig wie ein Abspreizen der Zehen.

3.4.1 FUßSPANNENANALYSE

Sciatic Function Index

Unmittelbar postoperativ tendiert der *SFI* in allen Gruppen gegen -100, ein deutliches Zeichen der vollständigen Denervierung des NI. Nach anfänglicher Stagnation bis zur 3. Woche zeigt sich nach acht Wochen nur in der AG-Gruppe (Woche 3: 97,4 ± 3,22 ; Woche 8: -86,7 ± 11,0) eine statistisch signifikante Verbesserung des *SFI* (p=0,017; Tab. 3-13). Im Gegensatz dazu bleibt der *SFI* in beiden Schienengruppen über den gesamten Zeitraum unverändert (KS: -95,5 ± 4,1; MDM: -98,4 ± 3,6 nach acht Wochen; Abb. 3-17), wobei der Unterschied zwischen diesen Schienengruppen nicht statistisch signifikant ist (p=0,17). Der Unterschied zwischen AG und KS ist statistisch signifikant; allerdings nur, wenn die Differenz des *SFI* nach acht Wochen und des präoperativen *SFI* betrachtet wird (p=0,03). Beim Vergleich von AG und MDM ergibt sich hingegen nur dann ein signifikanter Unterschied wenn der *SFI* ohne Referenz verglichen wird (p=0,03; Tab. 3-14).

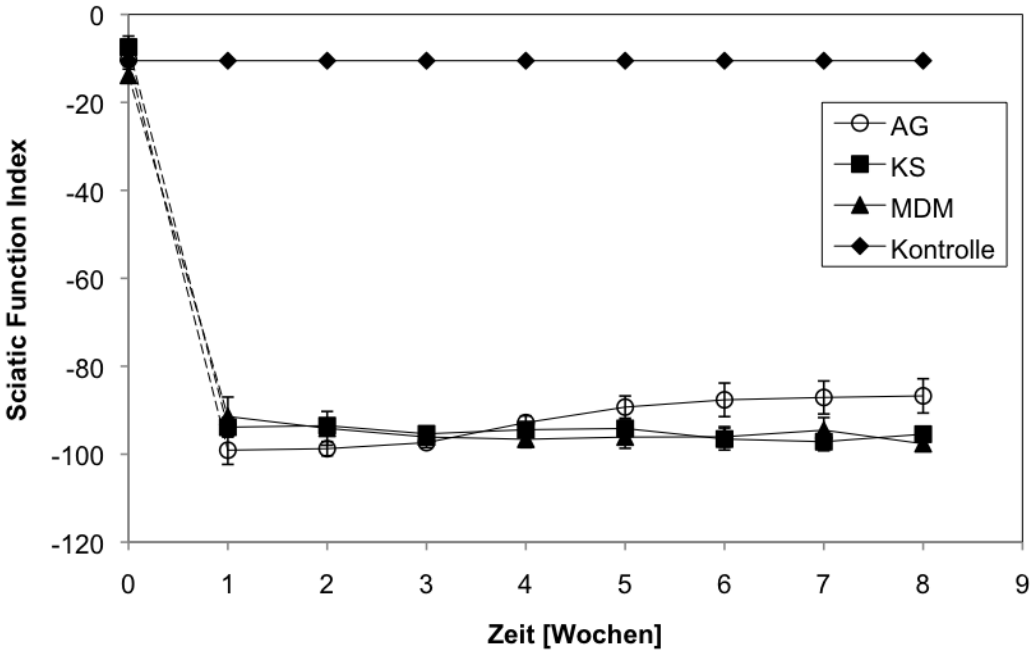

Abb. 3-17: Veränderungen des *SFI* im Zeitverlauf
Abgebildet ist der Sciatic Function Index (*SFI*) der Studiengruppen im Zeitverlauf mit Standardfehler. Woche 0 entspricht dem präoperativen Ausgangswert (Kontrolle), Woche 1 dem ersten postoperativen Wert. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modfizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-12: Deskriptive Statistik der Veränderungen des *SFI* im Zeitverlauf

		Woche								
Grp		*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
AG	*Med*	-11,51	-100,37	-97,87	-96,54	-92,93	-88,31	-86,45	-87,80	-88,05
	Min	-15,10	-113,48	-106,47	-103,18	-98,26	-98,30	-106,87	-101,59	-100,22
	Max	-2,58	-81,66	-93,50	-93,67	-85,32	-77,87	-70,98	-67,67	-68,00
	MW	-10,27	-99,09	-98,74	-97,37	-92,82	-89,29	-87,64	-87,10	-86,74
	SA	3,94	9,15	4,55	3,22	4,34	7,18	10,79	10,60	11,02
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
KS	*Med*	-6,55	-93,42	-93,13	-96,02	-92,98	-93,67	-98,58	-98,13	-95,49
	Min	-16,79	-104,79	-98,36	-100,71	-101,68	-101,97	-104,92	-106,05	-100,58
	Max	3,03	-85,08	-88,29	-86,91	-88,48	-86,84	-84,54	-89,86	-89,58
	MW	-7,42	-93,86	-93,51	-95,36	-94,43	-94,15	-96,55	-97,16	-95,45
	SA	7,08	6,34	3,24	4,55	4,93	5,42	7,07	5,82	4,11
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MDM	*Med*	-13,72	-98,16	-97,77	-96,69	-98,16	-96,52	-97,72	-97,99	-98,38
	Min	-21,05	-99,49	-109,13	-101,77	-101,18	-106,09	-103,64	-100,88	-101,60
	Max	-7,90	-72,58	-76,93	-87,69	-84,58	-85,70	-85,52	-80,69	-92,58
	MW	-13,86	-91,42	-94,12	-96,09	-96,61	-96,11	-96,04	-94,53	-97,63
	SA	4,08	11,67	10,88	4,55	5,34	7,22	6,50	8,10	3,60
	n	8	7	8	8	8	8	8	8	8

Dargestellt sind Median (Med), Minimum (Min), Maximum (Max), Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SA) der Studiengruppen (Grp). (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-13: Vergleich *SFI* nach 3 Wochen mit *SFI* nach 8 Wochen

	AG	*KS*	*MDM*
SFI 3 Wochen - SFI 8 Wochen	**0,017***	0,575	0,600

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests. Angegeben sind die p-Werte der Gruppen (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-14: Statistischer Vergleich des *SFI* nach acht Wochen

	AG-KS-MDM		*AG - KS*	*AG - MDM*	*KS - MDM*
TEST	*K-W*		*M-W*	*M-W*	*M-W*
SFI(w8)	0,05	→	0,06	**0,03***	0,61
Differenz SFI(w8) – SFI(w0)	0,05	→	**0,03***	0,23	0,17

Links: Gemeinsamer Vergleich der Studiengruppen (rechts) mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests (K-W). Rechts: Paarweiser Vergleich der Gruppen AG (Autograft), KS (Kollagenschiene) und MDM (modifizierte Kollagenschiene) mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests (M-W). Das Signifikanzniveau wird bei p=0,05 angenommen.

Static Sciatic Index

Im Zuge der Denervierung sinkt der *SSI* postoperativ auf -90,6 ± 11,3 in der AG-Gruppe, -78,5 ± 17,5 in der KS-Gruppe und -67,5 ± 14,1 in der MDM-Gruppe (Tab. 3-16). Auch hier zeigt sich nach acht Wochen nur in der AG-Gruppe eine statistisch signifikante Verbesserung des *SSI* (AG: -54,36 ± 22,9; p=0,012; Tab. 3-15), wobei sich die ersten funktionellen Verbesserungen in dieser Gruppe ab der fünften postoperativen Woche zeigen (Abb. 3-18). Der Unterschied ist sowohl zwischen AG und KS (p=0,01) und AG und MDM (p=0,04) statistisch signifikant. (Tab. 3-16; Tab. 3-17). In beiden Schienengruppen stagniert der Index postoperativ während der gesamten Beobachtungszeit (KS: -81,7 ± 6,3; MDM: -74,4 ± 8,4), wobei der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht statistisch signifikant ist (p=0,14).

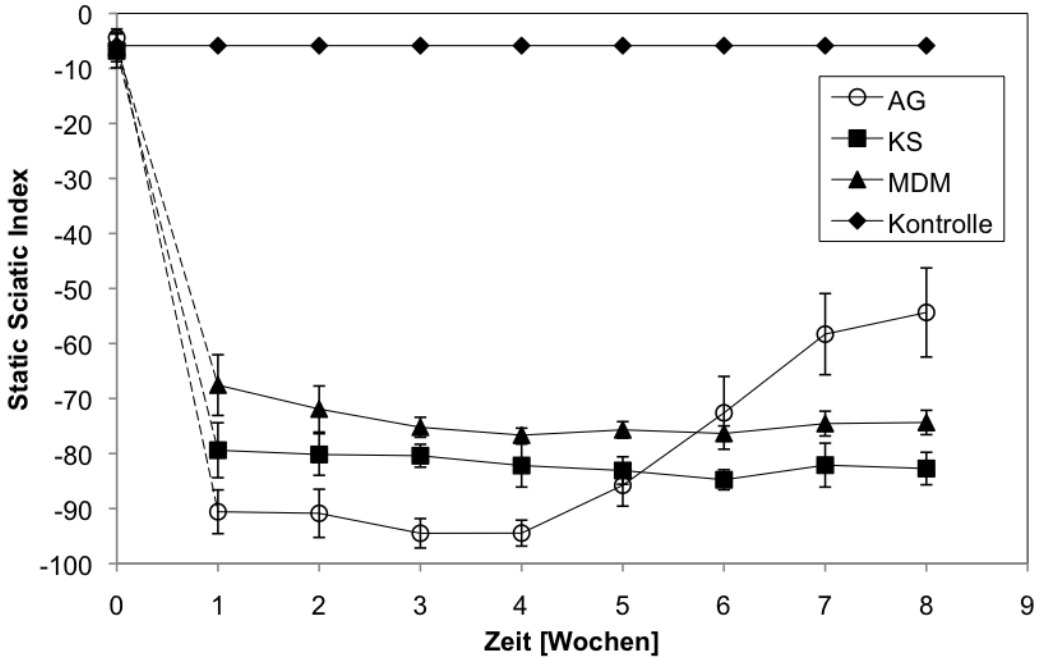

Abb. 3-18: Veränderungen des SSI im Zeitverlauf
Abgebildet ist der Static Sciatic Index (*SSI*) ± Standardfehler der Studiengruppen im Zeitverlauf. Woche 0 entspricht dem präoperativen Ausgangswert (Kontrolle), Woche 1 dem ersten postoperativen Wert. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) Modfizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-15: Gleichzeitiger Vergleich des *SSI* nach 3 mit dem *SSI* nach 8 Wochen

	AG	*KS*	*MDM*
SSI 3 Wochen - SSI 8 Wochen	**0,012***	0,674	0,499

Angegeben sind die p-Werte aus der statistischen Analyse mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-15: Deskriptive Statistik der Veränderungen des *SSI* im Zeitverlauf

		Woche								
Grp		*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
AG	*Med*	-2,01	-95,32	-96,10	-96,56	-95,00	-86,48	-76,61	-51,10	-49,22
	Min	-10,54	-97,80	-101,31	-101,23	-101,51	-99,21	-96,71	-92,85	-91,48
	Max	0,90	-64,80	-65,67	-77,63	-80,76	-66,49	-45,70	-34,25	-23,19
	MW	-4,41	-90,58	-90,87	-94,49	-94,46	-85,76	-72,60	-58,29	-54,36
	SA	4,50	11,25	12,38	7,56	6,68	10,73	18,71	20,86	22,89
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
KS	*Med*	-8,67	-75,67	-77,85	-79,24	-82,48	-84,54	-84,94	-84,03	-83,67
	Min	-17,80	-98,72	-103,11	-88,07	-87,78	-89,59	-90,72	-88,59	-91,01
	Max	4,34	-56,71	-62,91	-72,49	-75,90	-77,21	-77,36	-66,81	-70,98
	MW	-7,07	-78,50	-78,04	-79,52	-82,19	-83,75	-85,04	-82,00	-81,67
	SA	8,56	17,47	11,57	5,10	4,11	4,27	4,32	7,22	6,25
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MDM	*Med*	-5,82	-70,04	-70,88	-75,91	-78,40	-73,61	-74,59	-75,29	-74,12
	Min	-19,48	-80,47	-89,83	-83,13	-93,87	-88,86	-85,60	-90,96	-85,99
	Max	6,01	-40,26	-59,05	-65,35	-55,93	-68,88	-71,42	-59,34	-60,22
	MW	-6,09	-67,56	-71,91	-75,22	-76,66	-75,69	-76,35	-74,55	-74,35
	SA	8,68	14,12	10,70	5,88	11,06	7,06	5,14	11,29	8,35
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Dargestellt sind Median (Med), Minimum (Min), Maximum (Max), Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SA) der Studiengruppen. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-17: Paarweiser Vergleich des *SSI* nach acht Wochen hinsichtlich der Gruppen

	AG-KS-MDM		*AG-KS*	*AG-MDM*	*KS-MDM*
TEST	*K-W*		*M-W*	*M-W*	*M-W*
SSI 8 Wochen	**0,04***	→	0,06	0,08	0,06
Differenz SSI 8 Wochen – SSI präoperativ	**0,01***	→	**0,01***	**0,04***	0,14

Gemeinsamer Vergleich der Studiengruppen (linke Tabellenhälfte) mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests (*K-W*). Wird ein signifikanter Unterschied gefunden, schließt sich in ein paarweiser Vergleich der Gruppen AG (Autograft), KS (Kollagenschiene) und MDM (modifizierte Kollagenschiene) mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests (*M-W*) an (rechte Tabellenhälfte). Das Signifikanzniveau wird bei p=0,05 angenommen.

3.4.2 VIDEO-GANGANALYSE

Allgemeine Beobachtungen

Drei Wochen postoperativ weisen die Tiere durch vollständige Denervierung der Flexoren und Extensoren in Unterschenkel und Fuß eine schlaffe Lähmung auf, die sich deutlich auf das Gangbild auswirkt (Abb. 3-19, 3-20). Der Fuß kann in der Standphase das KGW der Ratte nicht mehr tragen – nach Aufsetzten auf das Förderband wird das Bein durch die Gewichtsbelastung im Sprunggelenk zunehmend passiv flektiert bis gegen Ende der Standphase ein Minimum des Sprunggelenk-Winkels erreicht wird. Ein Abstoßen des Hinterlaufes von der Unterlage ist denervierungsbedingt nicht möglich, das Tier „schleudert“ das Bein kompensatorisch aus der Hüfte heraus nach vorne. Wegen der ebenfalls denervierten Flektoren kommt es während der Schwungphase schwerkraft-bedingt zu einer passiven Extension im

Sprunggelenk. Im weiteren Verlauf der Schwungphase ändert sich der Tibio-Metatarsalwinkel kaum. Diese pathologischen Bewegungsmuster lassen sich auch nach acht Wochen in unterschiedlichem Ausmaß noch in allen Tieren beobachten.

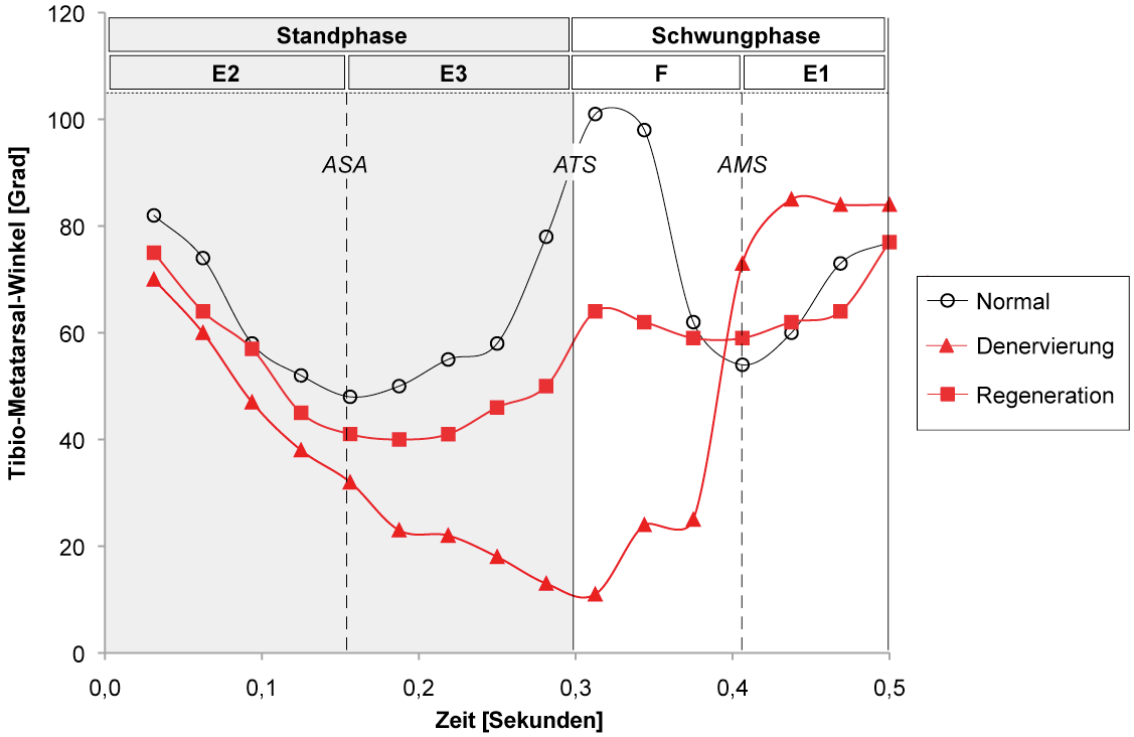

Abb. 3-19: Veränderung des Tibiometatarsal-Winkels während einer Bewegungsfolge
Winkelveränderungen im Sprunggelenk während Standphase (mit E2 und E3 Phase) und Schwungphase (mit F und E1 Phase) eines Bewegungszyklus dreier Ratten: normale Ischiadicusfunktion (Kreis); vollständige Denervierung (Dreieck); fortschreitende Regeneration (Quadrat).. Zusätzlich sind die Zeitpunkte angegeben, zu denen die Sprunggelenkswinkel *ASA, ATS* und *AMS* gemessen werden. Die Kurven wurden mit Excel (MS Excel®, Redmond, WA, USA) geglättet.

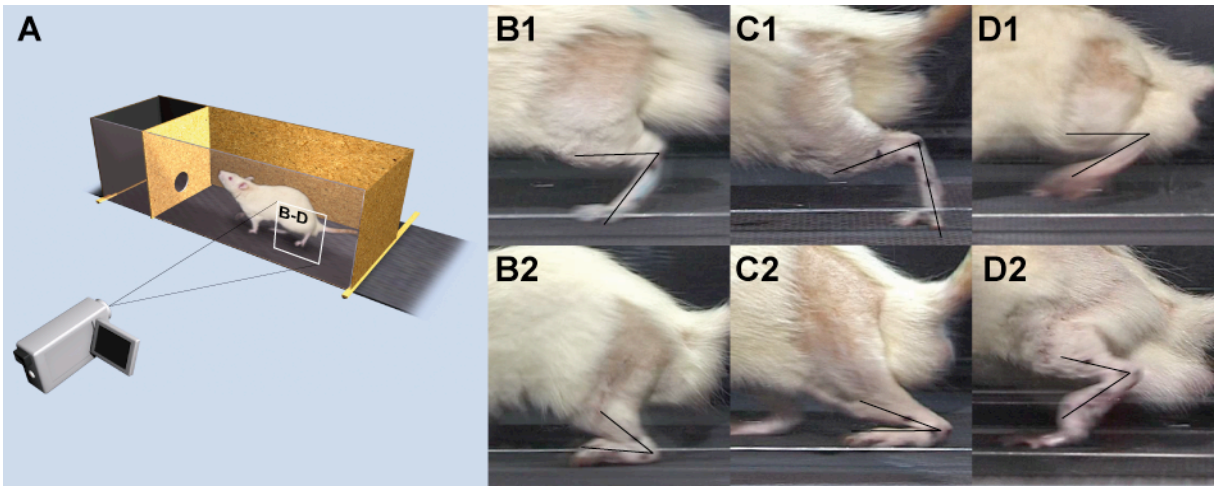

Abb. 3-20: Physiologische und pathologische Gelenkswinkel
(A) Übersicht; (B-D) physiologische und pathologische Sprunggelenkswinkel. Obere Zeile: physiologische Winkel in der Mitte der Standphase *ASA* (B1), am Ende der Standphase *ATS* (C1) und in der Mitte der Schwungphase *AMS* (D1). Untere Zeile: Sprunggelenkswinkel drei Wochen nach peripherer Nervenrekonstruktion: *ASA* (B2), *ATS* (C2) und *AMS* (D2).

Analyse der Sprunggelenkswinkel

Pro Tier werden zu jedem der drei Untersuchungstermine (w0, w3, w8) je fünf Winkelmessungen an den Zeitpunkten des Auftretens von *ASA, ATS* und AMS analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-18 dargestellt.

Tabelle 3-18: Deskriptive Statistik der Veränderungen des Tibio-Metatarsalwinkels

		ASA			*ATS*			*AMS*		
Grp		*w0*	*w3*	*w8*	*w0*	*w3*	*w8*	*w0*	*w3*	*w8*
AG	*MW*	48,45	25,04	37,46	92,97	29,70	37,88	27,36	47,60	47,47
	SA	3,36	3,92	3,71	9,01	4,25	6,54	3,60	11,18	12,02
	Min	43,75	16,96	32,37	79,96	22,88	27,86	20,53	28,39	19,20
	Max	54,02	28,58	42,50	103,44	34,11	45,74	30,96	67,14	56,57
KS	*MW*	47,95	26,33	29,41	90,59	25,08	24,84	27,33	45,37	63,12
	SA	1,84	3,68	6,09	7,11	3,36	5,48	1,00	5,56	9,18
	Min	45,40	21,03	22,19	78,98	21,01	19,52	25,85	36,80	52,02
	Max	50,61	33,41	41,02	101,22	31,95	34,89	28,74	56,12	74,43
MDM	*MW*	50,20	28,97	30,83	93,70	27,57	26,20	27,40	50,59	59,57
	SA	3,11	3,93	6,05	6,49	5,04	7,05	3,24	6,19	5,97
	Min	44,86	23,53	24,17	85,86	20,11	18,73	22,17	43,14	51,94
	Max	54,50	33,45	40,41	105,06	33,53	38,54	31,95	59,34	68,55

Abgebildet sind Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SA), Minimum (Min) und Maximum (Max) der Sprunggelenkswinkel *ASA, ATS* und *AMS* zu den Zeitpunkten w0, w3 und w8. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Ankle Stance und Terminal Stance Winkel

In Abb. 3-21 sind die Ergebnisse der *ASA*- und *ATS*-Messungen präoperativ, sowie drei und acht Wochen postoperativ abgebildet. Der *ASA* liegt präoperativ bei durchschnittlich 48,9 ± 2,9° und verringert sich postoperativ infolge der Denervierung der Extensoren signifikant (26,8 ± 4,0° nach drei Wochen; $p<0,01$; Tab. 3-19; Abb. 3-21). Nach acht Wochen zeigt sich auch hier nur in der AG-Gruppe eine statistisch signifikante Verbesserung (37,5 ± 3,7°; $p=0,011$), wohingegen der *ASA* in beiden Schienengruppen unverändert bleibt (KS: 29,4 ± 6.1°; MDM: 30,8 ± 6,0°; Tab. 3-19). Der Unterschied zwischen Autograft- und beiden Schienengruppen ist ebenfalls statistisch signifikant ($p\leq0,01$), wohingegen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Schienengruppen festgestellt werden kann ($p=0,645$).

Analog verhält es sich bei Betrachtung des *ATS*-Winkels: Hier sinken die Werte von präoperativ 92,4 ± 7,4° auf 27,5 ± 4,5° nach drei Wochen ab. Nach acht Wochen zeigt die AG-Gruppe (37,9 ± 6,5°) eine statistisch signifikante Verbesserung ($p=0,036$) im Vergleich zur dritten Woche, wogegen der *ATS* in den experimentellen Gruppen nach acht Wochen unverändert ist (KS: 24,8 ± 5,5°; MDM: 26,2 ± 7,1° nach acht Wochen; Tab. 3-19, Abb. 3-22). Damit ist der *ATS* in der AG-Gruppe nach acht Wochen signifikant höher (=normaler) als in beiden Schienengruppen, während der Unterschied zwischen KS- und MDM-Gruppe nicht signifikant ist ($p=0,753$; Tab. 3-20).

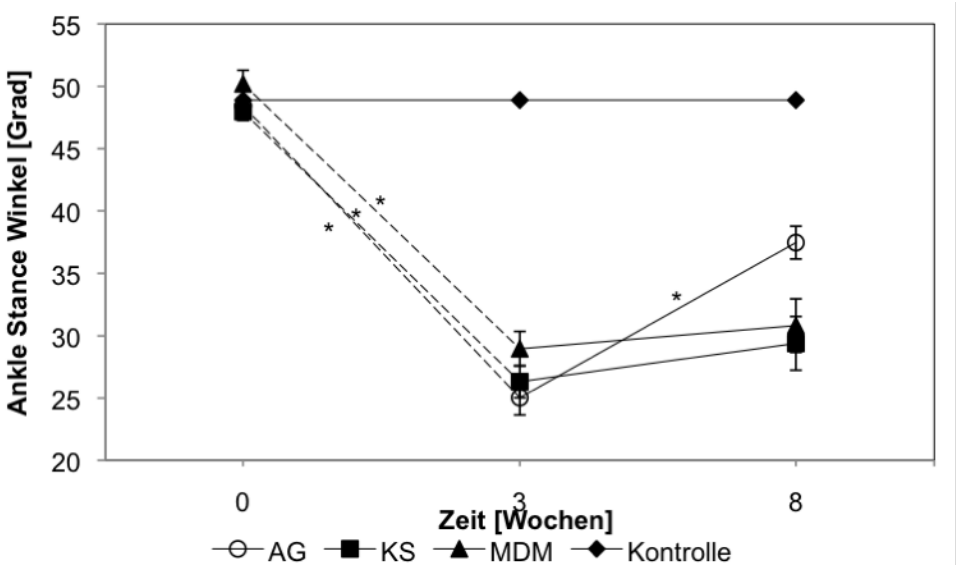

Abb. 3-21: Änderung des Tibio-Metatarsalwinkels in der Mitte der Standphase (*ASA*)
Ergebnisse der *ASA*-Messungen vor der Operation (Kontrolle), sowie 3 und 8 Wochen nach der Operation. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den angrenzenden Zeitpunkten ($p<0,05$) werden durch einen Asterisk (∗) gekennzeichnet. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modfizierte Kollagenschiene. Als statistischer Test diente der Wilcoxon Rangsummentest.

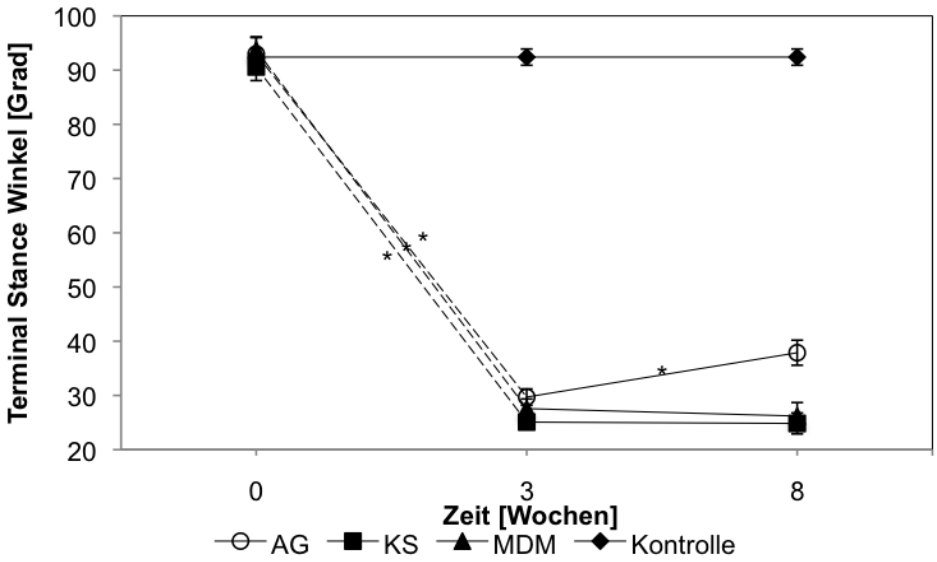

Abb. 3-22: Änderung des Tibio-Metarsalwinkels am Ende der Standphase (*ATS)*
Ergebnisse der *ATS*-Messungen vor der Operation, sowie 3 und 8 Wochen nach der Operation. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den angrenzenden Zeitpunkten ($p<0,05$) werden durch einen Asterisk (∗) gekennzeichnet. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modfizierte Kollagenschiene. Als statistischer Test diente der Wilcoxon Rangsummentest.

Mid-Swing Winkel

Die Ergebnisse des Mid-swing Winkels *AMS* sind in Abb. 3-23 abgebildet. Im Mittel liegt der *AMS* präoperativ bei 27,4 ± 2,7° und steigt postoperativ infolge der beeinträchtigten Flexionsfähigkeit signifikant auf 47,9 ± 8,0° (nach drei Wochen) an. Nach acht Wochen bleibt der *AMS* in der AG-Gruppe unverändert (47,5 ± 12,0°; p=0,483), während in beiden Schienengruppen eine statistisch signifikante fortschreitende Zunahme des *AMS* registriert wird (KS: 63,1 ± 9,2°; MDM: 59,6 ± 5,9°; Tab. 3-18, 3-19, Abb. 3-23). Auch hier zeigt sich ein statistischer Unterschied zwischen der AG-Gruppe und den Schienengruppen mit signifikant höheren (d.h. näher am Ausgangswert liegenden) *AMS*-Winkeln, aber kein Unterschied zwischen den beiden Röhrengruppen (p=0,493; Tab. 3-20).

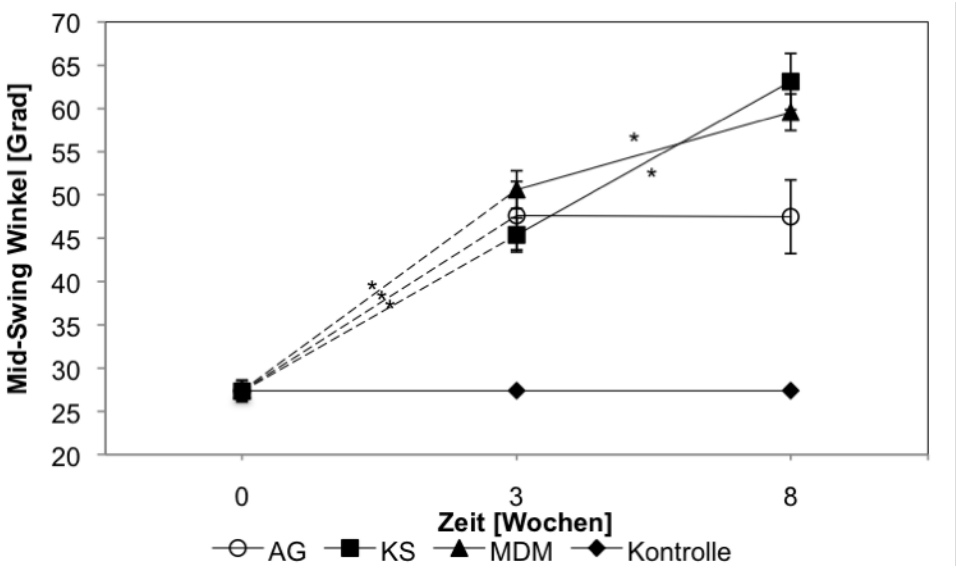

Abb. 3-23: Änderung des Tibio-Metatarsalwinkels in der Mitte der Schwungphase (*AMS)*
Ergebnisse der *AMS*-Messungen vor der Operation, sowie 3 und 8 Wochen nach der Operation. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den angrenzenden Zeitpunkten (p<0,05) werden durch ein Sternchen gekennzeichnet. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modfizierte Kollagenschiene. Als statistischer Test diente der Wilcoxon Rangsummentest.

Tabelle 3-19: Vergleich der Sprunggelenkswinkel zu verschiedenen Zeitpunkten

Parameter 1	*Parameter 2*	*AG*	*KS*	*MDM*
ASA(w0)	*ASA(w3)*	**0,012***	**0,012***	**0,012***
ASA(w0)	*ASA(w8)*	**0,011***	**0,011***	**0,012***
ASA(w3)	*ASA(w8)*	**0,011***	0,482	0,395
ATS(w0)	*ATS(w3)*	**0,012***	**0,012***	**0,012***
ATS(w0)	*ATS(w8)*	**0,012***	**0,012***	**0,012***
ATS(w3)	*ATS(w8)*	**0,036***	0,889	0,401
AMS(w0)	*AMS(w3)*	**0,012***	**0,012***	**0,012***
AMS(w0)	*AMS(w8)*	**0,017***	**0,012***	**0,012***
AMS(w3)	*AMS(w8)*	0,483	**0,012***	**0,025***

Abgebildet sind die P-Werte aus dem paarweisen Vergleich der Sprunggelenkswinkel *ASA, ATS* bzw. *AMS* zu den Untersuchungszeitpunkten w0 (Kontrolle), w1 und w8 mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

Tabelle 3-20: Vergleich der Sprunggelenkswinkel der Gruppen

	AG-KS-MDM		*AG-KS*	*AG-MDM*	*KS-MDM*
TEST	*K-W*		*M-W*	*M-W*	*M-W*
ASA(w0)	0,308				
ASA(w3)	0,185				
ASA(w8)	**0,017***	→	**0,010***	**0,021***	0,645
ATS(w0)	0,763				
ATS(w3)	0,112				
ATS(w8)	**0,006***	→	**0,005***	**0,009***	0,753
AMS(w0)	0,91				
AMS(w3)	0,314				
AMS(w8)	**0,007***		**0,010***	**0,005***	0,493

In der linken Tabellenhälfte ist der gleichzeitige Vergleich (Kruskal-Wallis, *K-W*) der Sprunggelenkswinkel *ASA, ATS* und *AMS* der Studiengruppen zu den Zeitpunkten w0, w3 und w8 dargestellt. Wird in diesem Test ein signifikanter Unterschied festgestellt, schließt sich zur Diskrimination von Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen in der rechten Tabellenhälfte ein paarweiser Vergleich (Mann-Whitney U, *M-W*) an. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

3.5 KORRELATIONSANALYSE

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse lassen sich wie folgt zusammenfassen (eine ausführliche Darstellung findet sich in Tab. 3-21):

(1) Die Nervenleitgeschwindigkeit *NLG* korreliert mit dem Gastrocnemius-Volumen *GVol*, aber nicht mit morphometrischen Parametern.

(2) *SFI* und *SSI* korrelieren miteinander sowie mit dem Gastrocnemius-Volumen *GVol*, Faserzahl *N* und Flächen *A* (Faser-, Axon-, Myelin-).

(3) Gastrocnemius-Volumen *GVol* und Muskelfaserquerschnittsfläche *MFQ* korrelieren miteinander. *GVol* korreliert zudem mit Faserzahl und Flächen, *SFI* und *SSI*, den Sprunggelenkswinkeln *ASA, ATS* und *AMS* und der Nervenleitgeschwindigkeit *NLG*.

(4) Die Muskelfaserquerschnittsfläche *MFQ* korreliert mit *GVol, ASA, ATS, AMS,* sowie mit Faserzahl und Flächen.

(5) Der Standphasen-Sprunggelenkswinkel *ASA, ATS* und *AMS* korrelieren neben Gastrocnemius-Volumen *GVol* und Muskelfaserquerschnittsfläche *MFQ* auch mit Faserzahl *N* und Flächen *A* (Faser-, Axon-, Myelin-)

(6) Faserzahl und Flächen korrelieren.

(7) Faser- und Axondurchmesser korrelieren untereinander und mit dem Durchmesser-Verhältnis *G-Ratio.*

Tabelle 3-21: Pearson Korrelationskoeffizienten für 16 Variablen in 24 Tieren

	NLG	*SFI*	*SSI*	*ASA*	*ATS*	*AMS*	*GVol*	*MFQ*	*N*	d_m	d_f	d_a	*G-Ratio*	A_f	A_m	A_a
NLG	1,00															
SFI	-0,22	1,00														
SSI	-0,02	**0,72****	1,00													
ASA	0,15	0,25	0,37	1,00												
ATS	0,40	0,19	0,36	**0,78****	1,00											
AMS	-0,32	-0,19	-0,12	-0,24	-0,28	1,00										
GVol	**0,44***	**0,42***	**0,64****	**0,61****	**0,62****	**-0,41***	1,00									
MFQ	0,39	0,22	0,40	**0,52****	**0,67****	-0,40	**0,72****	1,00								
N	0,28	**0,55****	**0,56****	**0,50***	**0,67****	**-0,53****	**0,66****	**0,83****	1,00							
d_m	-0,18	-0,14	0,04	-0,01	-0,13	0,13	-0,05	-0,11	-0,26	1,00						
d_f	-0,01	0,04	-0,01	0,00	0,08	0,07	0,14	0,04	-0,01	0,28	1,00					
d_a	0,03	0,03	-0,12	-0,08	0,05	0,08	0,05	-0,01	-0,03	-0,24	**0,84****	1,00				
G-Ratio	0,05	0,03	-0,21	-0,14	0,00	0,03	-0,07	-0,05	-0,01	**-0,78****	0,27	**0,75****	1,00			
A_f	0,23	**0,55****	**0,57****	**0,49***	**0,64****	**-0,47***	**0,69****	**0,85****	**0,98****	-0,20	0,05	0,01	-0,01	1,00		
A_m	0,24	**0,57****	**0,60****	**0,50***	**0,65****	**-0,48***	**0,71****	**0,86****	**0,98****	-0,20	0,05	0,00	-0,02	**0,99****	1,00	
A_a	0,20	**0,53****	**0,52****	**0,44***	**0,62****	**-0,44***	**0,64****	**0,83****	**0,96****	-0,22	0,05	0,02	0,01	**0,99****	**0,98****	1,00

Abgebildet sind die Korrelationskoeffezienten (ρ) der Pearson's Korrelation, (*) signifikante Korrelation ($p<0,05$), (**) signifikante Korrelation ($p<0,01$).

4 DISKUSSION

4.1 PROBLEMSTELLUNG

Ziel dieser Studie war es, die Regeneration durch modifizierte bioresorbierbare Kollagenschienen über einen großen Substanzdefekt des NI zu beurteilen, bei dem konventionelle Schienen normalerweise versagen. Zu diesem Zweck wurde autologes Muskelgewebe denaturiert, in handelsübliche Kollagenschienen eingebracht und zwischen proximalen und distalen Stumpf adulter Ratten implantiert. Im Mittelpunkt des Interesses stand der Einfluss der azellulären Muskelmatrix auf die strukturelle und funktionelle Regeneration. Als Kontrollen dienten ungefüllte Kollagenschienen des gleichen Typs (negative Kontrolle), sowie das Autograft als Standardmethode bei Defektverletzungen peripherer Nerven (positive Kontrolle).

4.1.1 DEFEKTMODELL

Tiermodell

Das Ischiadicus-Defektmodell der Ratte ist das am häufigsten verwendete Tiermodell in peripheren Nervenregenerationsstudien, weil es kostengünstig, gebräuchlich und gut untersucht ist (z.i. VAREJAO *et al.*, 2001a). Die Regenerationskapazität in Ratten ist zudem mit der von Primaten vergleichbar (MACKINNON *et al.*, 1985). In seinen Größenverhältnissen entspricht der – in der Ratte leicht zugängliche (HADLOCK *et al.*, 1999) – N. ischiadicus den menschlichen Handnerven (NICHOLS *et al.*, 2005).

Lewis Ratten wurden wegen Ihrer geringen Anfälligkeit zu Automutilation nach Ischiasdurchtrennung (CARR *et al.*, 1992; INBAL *et al.*, 1980; PANERAI *et al.*, 1987), ihrer anatomischen Eignung (RUPP *et al.*, 2007c) und nicht zuletzt auch wegen ihrer freundlichen Natur (STRASBERG *et al.*, 1999) gewählt, da viele Evaluationen häufigen und engen Kontakt erforderten. Die Autophagie denervierter Gliedmaßen (Automutilation), ist ein häufiges Phänomen nach Nervendurchtrennung in Ratten, das vermutlich durch den Phantomschmerz in der betroffenen Gliedmaße ausgelöst wird (AL-ADAWI *et al.*, 2002). Automutilationserscheinungen stellen ein ernstzunehmendes Problem bei der funktionellen Evaluation dar (VAREJAO *et al.*, 2001a; 2004b; YU *et al.*, 2001). Die Wahl des richtigen Rattenstammes ist ein wichtiges Versuchskriterium, da die verschiedenen Rattenstämme unabhängig von äußeren Faktoren ein unterschiedlich starkes Automutilationsverhalten zeigen (CARR *et al.*, 1992). So kommt es in Sprague Dawley Ratten in 70 % zu Automutilation, selbst wenn eine Reanastomosierung stattgefunden hat. Bei Lewis Ratten hingegen liegt die Automutilationsrate bei 0 % (CARR *et al.*, 1992). Auch in der vorliegenden Studie waren keine Automutilationserscheinungen zu beobachten.

Anatomische Überlegungen bei der Wahl des Rattenstammes spielen ebenfalls eine große Rolle. So konnte unsere Arbeitsgruppe feststellen, dass die Höhe der Bifurkation des NI, und damit die maximal überbrückbare Länge des NI in den fünf wichtigsten Laborrattenstämmen variiert (RUPP *et al.*, 2007c). Der im Rahmen von Regenerationsstudien wichtige „nutzbare" Nervenabschnitt, bei dem der NI ungeteilt vorliegt, ist mit ca. 14 mm bei Lewis Ratten im Vergleich zu den anderen untersuchten Rattenstämmen am größten. Wird der Bereich verwendet, bei dem der NI sich bereits aufgezweigt hat, Nn. tibialis und peroneus aber noch von dem gleichen Perineurium umgeben sind, liegt die überbrückbare Distanz sogar bei 18 mm. Die von uns gewählten Lewis-Ratten erfüllen also auch anatomisch die Voraussetzungen für Studien zur peripheren Nervenregeneration am NI.

Defektlänge

Im N. ischiadicus-Defektmodell der Ratte wurde die Nervenregeneration bereits über Defekte zwischen 3 mm (HEIJKE *et al.*, 1993) und 50 mm (KEILHOFF *et al.*, 2005) untersucht. Bei der Wahl der richtigen Defektlänge sind mehrere Überlegungen wichtig. Der Defekt sollte lang genug gewählt werden, um Unterschiede zwischen den Gruppen diskriminieren zu können, aber kurz genug um überhaupt eine (funktionelle) Regeneration zu ermöglichen. Dabei müssen die anatomischen Möglichkeiten des Tiermodells, die kritische Defektlänge, die hohe spontane Regenerationsrate in Ratten und nicht zuletzt auch die beabsichtigte klinische Anwendung in die Überlegungen miteinbezogen werden. Wie bereits angesprochen, variiert die für Regenerationsstudien „nutzbare" Länge des NI (die Länge, bei welcher der Nerv ungeteilt ist) bei den einzelnen Rattenstämmen zwischen 11 mm in Fisher Ratten und 14 mm in Lewis Ratten (RUPP *et al.*, 2007c). Wird der Teil des Ischiadicus, bei dem der Nerv sich bereits geteilt hat, N. tibialis und N. peroneus communis aber noch von dem gleichen Epineurium umgeben ist, können theoretisch zwischen 12 mm in Fisher Ratten und 18 mm in Lewis Ratten für die Regenerationsstudie verwendet werden. Die kritische Länge bei der Überbrückung des NI im Rattenmodell liegt bei 10 mm (LUNDBORG *et al.*, 1982; MEEK *et al.*, 2003); bis zu dieser Länge scheint eine Überbrückung mit matrixfreien Nervenleitern möglich zu sein (ALLUIN *et al.*, 2009; LEICHTLE *et al.*, 2009; LUNDBORG *et al.*, 1982). Nervendefekte, die größer als 6 mm in Mäusen, 10 mm in Ratten und 20 mm in höher entwickelten Spezies sind, lassen sich mit matrixfreien Nervenschienen nicht mehr suffizient überbrücken (BUTI *et al.*, 1996; LUNDBORG *et al.*, 1982; MACKINNON und DELLON, 1990).

Die spontane Regeneration in Ratten ist sehr hoch und erreicht 2-3 mm pro Tag (NEAR *et al.*, 1992). Manche Autoren berichten von Nervenlücken von bis zu 10 mm und mehr, die wegen des enorm hohen Regenerationspotenzials in Ratten sogar ohne Nervenleiter spontan überbrückt werden können, weshalb große Defektlängen in Regenerationsstudien notwendig sind um eine spontane Regeneration zu vermeiden (KEILHOFF *et al.*, 2005). Große Defektlängen

in Regenerationsstudien werden zudem dem Ziel einer sinnvollen klinischen Anwendung gerechter. Kleine Defekte können – in Abhängigkeit der Defektlokalisation – häufig durch Mobilisierung der Nervenenden primärvernäht werden, so dass beim Menschen erst ab Defektgrößen von 20 mm der Einsatz von Interponaten wirklich sinnvoll ist (BELLAMKONDA, 2006). In der vorliegenden Studie haben wir uns für eine Defektlänge (14 mm) entschieden, die deutlich über der kritischen Defektlänge liegt, bei der der Nerv aber noch ungeteilt oder zumindest von einem gemeinsamen Epineurium umgeben und gut zugänglich ist. Der relativ große Defekt sollte eine Spontanregeneration ausschließen, und zugleich eine Diskrimination von Unterschieden zwischen matrixfreien und modifizierten Schienen ermöglichen. Bei Betrachtung der Defektlänge muss ein zusätzliches Kriterium beachtet werden: In den meisten Studien, in denen größere Defektlängen überbrückt werden, wird ein kürzeres Nervenstück entfernt als anschließend durch ein Interponat ersetzt wird. So erreichten z.B. MEEK *et al.* (1999c) eine Nervenlücke von 15 mm, indem ein nur 12 mm Nervensegment entfernt, und (nach Retraktion der Nervenenden) durch ein 15 mm Interponat ersetzt wurde. In unserer Studie wurde hingegen ein „echter" 14 mm Defekt überbrückt, d.h. die überbrückte Länge entsprach auch 1:1 der Länge des entfernten Nervensegments. Es wird zwar allgemein davon ausgegangen, dass nicht die Länge des entfernten Nervensegments sondern nur die letztendlich überbrückte Defektlänge maßgebend für Erfolg oder Misserfolg der Regeneration ist. Dabei darf aber nicht vergessen werden, dass nur bei Verwendung „echter" Defektlängen eine Vergleichbarkeit mit dem AG gegeben ist. Schließlich entspricht in der Autograftgruppe die überbrückte Länge der des entnommenen Grafts, da dieses ja zur Rekonstruktion des Defektes eingesetzt wird. Für unsere Studie bedeutet dieses Vorgehen allerdings, dass die Nervenenden im Vergleich zu anderen Studien einer höheren Zugspannung ausgesetzt waren. Eine Tatsache, die sich möglicherweise negativ auf die Ergebnisse aller Gruppen gleichermaßen ausgewirkt hat.

4.1.2 BEOBACHTUNGSZEITRAUM

Der Beobachtungszeitraum kann die Aussagekraft einer Studie maßgeblich beeinflussen. Um eine differenzierte Auswertung zu gewährleisten, muss der Beobachtungszeitraum lang genug gewählt werden, um eine gerichtete Regeneration zu ermöglichen, gleichzeitig jedoch so kurz gewählt sein, dass sich zwischen den Studiengruppen messbare Regenerationsunterschiede ergeben. Wird zu lange gewartet, werden Unterschiede zwischen positiven und negativen Kontrollen aufgrund des herausragenden Regenerationspotenzials der Ratten (CARR *et al.*, 1992; STRASBERG *et al.*, 1999) und der kurzen absoluten Gliedmaßenlänge wieder unsignifikant (KEUNE *et al.*, 2006).

Die mittlere Länge des N. ischiadicus / N. tibialis beträgt bei Lewis-Ratten ca. 23 mm vom proximalsten Punkt bis zum Eintritt in den MG, und von dort bis zur Aufästelung des N. tibia-

lis in seine distalsten Äste weitere 23 mm (RUPP *et al.*, 2007c). Da in unserer Studie die proximale Durchtrennung 4 mm distal des Austrittspunktes lag, müssen die Axone vom proximalen Stumpf durchschnittlich etwa 42 mm bis in die distalsten Muskelgruppen vorwachsen. Der zeitlimitierende Faktor bei der Regeneration scheint allerdings die Überbrückung der Nahtstelle zu sein (GORDON *et al.*, 2007). Erst nach einer Latenzzeit von mehreren Tagen wachsen die schnellsten Axone mit 3 - 4,7 mm/d in Richtung Erfolgsorgan vor (FORMAN *et al.*, 1979; IJKEMA-PAASSEN *et al.*, 2002; PESTRONK *et al.*, 1980). Damit sollten – rein rechnerisch – die ersten Axone nach etwa zweieinhalb Wochen die distalen Muskelgruppen erreicht haben. Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen schien uns der Zeitraum von acht Wochen als geeignet, um eine Reinnervation der Zielmuskulatur zu gewährleisten und Regenerationsunterschiede zwischen den Gruppen herauszustellen.

4.1.3 WAHL DES INTERPONATS

Kollagen-Nervenschienen als Gerüst

In letzter Zeit hat sich die periphere Nervenforschung und das Bioengineering verstärkt auf die Entwicklung artifizieller Nervenschienen aus verschiedenen Materialien konzentriert, die das herkömmliche autologe Nerventransplantat als Standardtechnik zur Wiederherstellung von Nervendefekten ablösen sollen. Die Funktion solcher Nervenschienen liegt in der Bereitstellung einer Leitstruktur, die richtungsweisend für regenerierende Axone ist (GUNDERSEN, 1985), neurotrophische Faktoren aus dem distalen Stumpf konzentriert (DANIELSEN *et al.*, 1983; LUNDBORG *et al.*, 1982), das Einwachsen von fibrösem Narbengewebe reduzieren (COLIN und DONOFF, 1984), und zur Vermeidung von Neuromen beitragen kann. Die Vorteile der Verwendung künstlicher Nervenschienen im Vergleich zum Autograft ist vielfältig: (1) der beim autologen Nerventransplantat obligate Hebedefekt entfällt, (2) Nervenschienen sind in allen erdenklichen Maßen und in unbegrenzten Mengen erhältlich; (3) erlauben die freie Orientierung der Axone; Letztere wachsen zudem schneller durch (ungefüllte) Schienen als durch Autografts; (4) Nervenschienen sind einfach in der Handhabung und helfen OP-Zeit einzusparen. Aus der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Schienenmaterialien haben wir uns für Kollagenschienen entschieden, da Kollagen hervorragende Materialeigenschaften hat und bereits für den klinischen Einsatz zugelassen ist. Zwei wichtige Materialeigenschaften von Kollagenschienen sind deren vollständige Bioresorbierbarkeit und die Semipermeabilität der Röhrenwand. Beide Eigenschaften, Resorptionsrate und Permeabilitätsgrad können bei der Herstellung von Kollagenschienen verändert werden. Nachdem die Lücke zwischen den Nervenstümpfen überbrückt wurde, sind Nervenschienen nachweislich nicht nur nutzlos, sondern können sogar einen negativen Einfluss auf die weitere Regeneration haben, indem sie eine Fremdkörperreaktion begünstigen und sekundär zu einer Kompression der NF führen können (HENRY *et al.*, 1985). Ein wesentlicher Vorteil von Kollagenschienen liegt

in der vollständigen Bioresorption durch Kollagenasen bei nur minimaler Entstehung von Narbengewebe und Umgebungsreaktion (ARCHIBALD *et al.*, 1991; LI *et al.*, 1992). Selbst nach dreieinhalb Jahren zeigen sich keine Anzeichen auf kompressionsbedingte Neuropathie (ARCHIBALD *et al.*, 1995). Im Vergleich zu biostabilen Silikonröhren sind Kollagenröhren überlegen (KEMP *et al.*, 2009). Auch beim direkten Vergleich von Typ I Kollagenröhren mit anderen bioresorbierbaren Röhren (PGA) zur Überbrückung von 10 mm Defekten in der Ratte, stellte sich bei der funktionellen und strukturellen Überprüfung nach 15 Wochen eine deutliche Überlegenheit der Kollagenröhren heraus (WAITAYAWINYU *et al.*, 2007). Die Ergebnisse der Kollagenröhren waren über diese Distanz sogar mit dem Autograft vergleichbar. Die Permeabilität ist eine weitere wichtige Eigenschaft des Schienenmaterials, da die metabolische Aktivität von Zellen einen Austausch von Nährstoffen, wachstumsfördernden Faktoren und Abfallprodukten zwischen innerem und äußerem Lumen der Schiene benötigen. Der große Einfluss von Porengröße und Permeabilitätsgrad auf die Regeneration wurde experimentell bestätigt (AEBISCHER *et al.*, 1988; LI *et al.*, 1992; VLEGGEERT-LANKAMP *et al.*, 2008). Im Vergleich zu impermeablen Silikonschienen haben Kollagenschienen ein deutlich höheres Regenerationspotenzial, und zeigen ein vermehrtes Einwachsen von SZ und eine verbesserte Vaskularisierung (KEMP *et al.*, 2009). Weitere wichtige physikalische Parameter sind der Innendurchmesser und die Wandstärke der Röhre. Zu weite Nervenröhren erhöhen die Gefahr, dass fibröses Gewebe in das Lumen einwächst, was die Nervenregeneration und Reifung behindern kann (DEN DUNNEN *et al.*, 1995). Auf der anderen Seite ist bekannt, dass ein zu kleiner Innendruchmesser zu einer verminderten Durchblutung des regenerierenden Gewebes und dadurch zu einer herabgesetzten Regeneration (BUTI *et al.*, 1996), sowie zu chronischer Nervenkompression führen kann (MACKINNON *et al.*, 1984a). In gesunden Ratten hat der NI etwa einen Durchmesser von 1 mm. Der ideale Innendurchmesser biostabiler (Silikon-) Interponate wird mit dem 2,5 - 3-fachen der Nervenquerschnittsfläche (entspricht ca. dem 1,5 - 1,7-fachen Durchmesser) angegeben (BUTI *et al.*, 1996; DUCKER und HAYES, 1968). Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren die von uns verwendeten kommerziellen Kollagenschienen nur mit einem minimalen Innendruchmesser von 2,0 mm erhältlich. Damit liegt der Wert etwas über den empfohlenen Werten, was möglicherweise einen Einfluss auf die Regeneration hatte. Tatsächlich war nach acht Wochen in den Kollagenschienen ein höherer Anteil an fibrösem Gewebe im Vergleich zum Autograft feststellbar. Eine weitere wichtige Materialeigenschaft monotubulärer Nervenleiter ist deren Wandstabilität über einen längeren Zeitraum, da sich bei zu schneller Resorption des Materials das Lumen der Röhre verformen und so die axonale Regeneration behindern kann (DEN DUNNEN *et al.*, 1995). Diese Gefahr besteht z.B. dann, wenn die Wandstärke der Schiene zu dünn gewählt wird. So stellten HADLOCK et al. (1998) nach *in vivo* Implantation von 100 µm starken resorbierbaren polymerischen Nervenschienen erhebliche Materialschäden fest. DEN DUNNEN *et*

al. (1995) fanden eine Wanddicke von 340 µm (Wanddicken von 340-680 µm wurden untersucht) zur Überbrückung eines 10 mm Defekts des NI der Ratte als geeignet. Die von uns verwendeten Kollagenschienen wiesen eine Wandstärke von ca. 200 µm auf. Bei Explantation nach acht Wochen waren alle Kollagenschienen intakt und gut im Umgebungsgewebe integriert. Eine Fremdkörperreaktion war in keinem der Tiere feststellbar. Die Schienen erschienen insgesamt dunkler, geschwollen und wiesen eine verminderte Stabilität auf, blieben aber in jedem Fall formstabil und wiesen keinen Hinweis auf eine fortgeschrittene Zersetzung auf. Ein weiterer Vorteil von Kollagenröhren besteht in deren Anwenderfreundlichkeit. In unserer Studie wurde das Autograft durch epineurale Naht vernäht, wobei zwischen drei und vier Nähte pro Stumpf notwendig waren. Der Aufwand einer perineuralen (faszikulären) Rekonstruktion wäre noch erheblich größer gewesen. Im Gegensatz dazu reichte in den Kollagenschienengruppen eine Naht pro Stumpf zur Kontinuitätswiederherstellung aus, wodurch sich OP-Zeit einsparen ließ. Neben der verkürzten Operationszeit und den damit verbundenen Kosteneinsparungen, liegt ein weiterer wesentlicher Vorteil des verminderten Nahtmaterialbedarfs in einer reduzierten Narbenbildung an der Nahtstelle (z.i. DORNSEIFER *et al.*, 2007). 20 - 40 % der NF gehen an jeder Nahtlinie verloren (ALMQUIST *et al.*, 1983). Auch der Zeitraum, den alle Motoneurone bei einer Direktnaht zum Überqueren der Nahtstelle brauchen, ist mit 28 Tagen (BRUSHART *et al.* 2002) erstaunlich lang. Erst nach Überquerung der Nahtstelle wachsen die schnellsten Axone mit 3 - 4,7 mm/d in Richtung Erfolgsorgan vor (FORMAN *et al.*, 1979; IJKEMA-PAASSEN *et al.*, 2002; PESTRONK *et al.*, 1980). Eine Reduktion des notwendigen Nahtmaterials könnte deshalb auch einen positiven Einfluss auf die Geschwindigkeit des Nervenwachstums in der wichtigen Frühphase der Regeneration haben. Der lange Zeitraum, den ein verletztes Neuron ohne Zielverbindung ist (chronische Axotomie) und denervierte SZ im distalen Stumpf ohne Axonkontakt sind (chronische Schwann-Zell-Denervierung) wird für das zunehmende Versagen der Neuronen ihre Axone zu regenerieren verantwortlich gemacht (FU und GORDON, 1997). Zudem kann eine verzögerte Nervenregeneration zu einer erhöhten intraneuralen Fibrosierung führen. Dadurch wiederum kann es zu einer Verschmälerung der Endoneuralschläuche im distalen Nervenstumpf kommen, durch den die regenerierenden Axone wachsen müssen. Infolgedessen kann die Wiederherstellung der Nervenfunktion beeinträchtigt werden (DEN DUNNEN *et al.*, 1996b; MEEK *et al.*, 1999c). Nerventransplantate bestehen aus dichten Strukturen, die das Neuritenwachstum möglicherweise behindern können (MEEK *et al.*, 1999c). Auch enthalten Nerventransplantate proliferierende SZ. Sobald ein regenerierendes Axon Kontakt mit einer Schwann-Zelle findet, verringert sich die Geschwindigkeit der Axonregeneration während das Axon myelinisiert wird (BUNGE und BUNGE, 1978). Im Nerventransplantat finden die Axone bereits in einer frühen Phase Kontakt zu SZ im Vergleich zu Axonen, die innerhalb einer Nervenschiene auswachsen. Zudem ist bekannt, dass eine schlechte Vaskularisierung des Nerven-

transplantats eine zunehmende Fibrosierung begünstigt, die wiederum die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration beeinträchtigen kann (MEEK *et al.*, 1999c). Solche Fibrosierungserscheinungen sollen durch die Nervenschienen vermieden werden. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Nervenregeneration durch (leere) Nervenschienen höher ist als bei autologem Nerventransplantat (DEN DUNNEN *et al.*, 1996b) und Direktnaht (ARCHIBALD *et al.*, 1995). Die funktionellen Langzeitergebnisse von Kollagenschienen im Ratten- (ARCHIBALD *et al.*, 1991), und Primatenmodell (ARCHIBALD *et al.*, 1995; KRARUP *et al.*, 2002) sind bei der Rekonstruktion kurzer Substanzdekte (4 - 5 mm) mit Direktnaht und Autograft vergleichbar. COLIN und DONOFF (1984) berichten sogar von besseren strukturellen Ergebnissen mit organisierteren Wachstumsmustern und weniger Narbengewebe als im Autograft nach der Verwendung von Kollagenschienen zur Überbrückung von 5 mm Ischiadicus-Defekten im Rattenmodell. Im Gegensatz zum herkömmlichen Nerventransplantat können sich in Röhrenimplantaten die regenerierenden Axone – gesteuert durch chemische Signale vom distalen Stumpf – auf natürliche Weise spontan in Richtung ihres Zieles orientieren, wodurch eine zwanghafte Fehlorientierung der Fasern bei falscher faszikulärer Readaptation möglicherweise verhindert werden kann.
Kollagen ist also hervorragend als Schienenmaterial für die Rekonstruktion kurzer Nervendefekte geeignet und anderen nicht-resorbierbaren und resorbierbaren Materialien überlegen. Der große Nachteil von (ungefüllten) Nervenschienen im Allgemeinen ist jedoch die limitierte Nervendistanz, die damit erfolgreich überbrückt werden kann. Diese „kritische Defektlänge“ variiert mit dem Tiermodell und wird bei 10 mm in Ratten angenommen (LUNDBORG *et al.*, 1982; MEEK *et al.*, 2003).

Denaturierte Muskulatur als Füllmatrix

Bei der natürlichen Nervenregeneration orientieren sich auswachsende Axone durch engen Kontakt mit SZ und deren Basallamina (IDE *et al.*, 1983). Die Basallamina ist Bestandteil der ECM, an die sich regenerierende Axone bevorzugt anheften, und die Basallamina-Schläuche bieten ein Lumen, durch das die NF durchwachsen können (BRYAN *et al.*, 1993). Innerhalb der Basallamina bilden sich Schwann-Zell-Säulen als Leitstrukturen aus, durch die regenerierende Axone in Richtung auf ihr Zielorgan wachsen können (BRYAN *et al.*, 1993; IDE, 1996). Dabei sind die Axone nicht notwendigerweise auf die Basallamina von SZ angewiesen, sondern brauchen lediglich die Basallamina irgendeines Zelltyps, wie z.B. von Skelettmuskelfasern (IDE, 1984). Zahlreiche Strategien verfolgen das Ziel, durch Einbringen einer vorgeformten Matrix in Interponate ein ähnliches Gerüst für axonales Wachstum bereit zu stellen (ISHIKAWA *et al.*, 2007; MEEK *et al.*, 1999a; TONGE *et al.*, 1997; VAREJAO *et al.*, 2003a; YOSHII und OKA, 2001a). Die dreidimensionale Struktur muskulärer Basallaminae bietet eine Mikroumgebung, die über Zelladhäsion an Molekülen der ECM wie Laminin, Kollagen Typ IV

und Fibronektin das axonale Wachstum steuern und fördern kann (BARON-VAN EVERCOOREN *et al.*, 1982; SATOU *et al.*, 1986). Diese ECM-Moleküle können aktiv an den Wachstumskonus eines regenerierenden Axons anheften, um dessen Wachstum in Richtung Zielorgan zu dirigieren (LETOURNEAU, 1975; 1994). Neuronale Membranen können mit den ECM-Molekülen über die große Familie der Integrine interagieren (POWELL und KLEINMAN, 1997). Insbesondere von den Lamininen, einer Gruppe von Glykoproteinen der Basalmembran, ist bekannt, dass sie wachstumsfördernd auf Neuriten (BARON-VAN EVERCOOREN *et al.*, 1982) und stimulierend auf SZ wirken (BECK *et al.*, 1990; KLEINMAN und WEEKS, 1989). Die ECM von Skelettmuskulatur ist neben Laminin auch reich an Kollagen Typ IV, von dem ebenfalls ein intrinsisch wachstumsfördernder Effekt auf Neuriten bekannt ist, wodurch das Auswachsen verletzter NF positiv beeinflusst wird (SATOU *et al.*, 1986).

Skelettmuskelgewebe wurde bereits experimentell und klinisch zur peripheren Nervenrekonstruktion verwendet (CALDER und NORRIS, 1993; GATTUSO *et al.*, 1989; GLASBY *et al.*, 1986b; IDE, 1984; KEYNES *et al.*, 1984; LAWSON und GLASBY, 1995; RAO *et al.*, 2001; SANES *et al.*, 1978; WHITWORTH *et al.*, 1995). Interponate aus denaturierter Muskulatur bieten eine effektive Matrix für die Migration von SZ aus dem proximalen und distalen Stumpf und ermöglichen es auch kultivierten SZ einzuwachsen (FANSA *et al.*, 1999b; 2001; HALL, 1997). Es ist bekannt, dass einwandernde SZ Muskel-Venen-Transplantate zu einem sehr frühen Zeitpunkt kolonisieren (FORNARO *et al.*, 2001) und darin proliferieren (GEUNA *et al.*, 2003). Bereits sehr früh nach der Operation kann in solchen Interponaten ein Milieu beobachtet werden, das reich an Neurotrophinen ist, deren Produktion durch die frühzeitig einwandernden SZ aufrechterhalten wird (PAGNOTTA *et al.*, 2002). Zudem unterstützt denaturierte Muskulatur die Diffusion von Nährstoffen und die Neoangiogenese (KEILHOFF *et al.*, 2005).

Skelettmuskelgewebe kann vorbehandelt werden, um ein offenporiges Netzwerk coaxial ausgerichteter muskulärer Basallamina-Schläuche zu erhalten, das als temporäres Gerüst für zielgerichtetes axonales Wachstum dienen kann. Durch diese Vorbehandlungen kommt es zur akuten Nekrose von Myozyten, intramuskulären Nerven und anderen zellulären Bestandteilen der Skelettmuskelfasern (MEEK *et al.*, 1999a). Die zellulären Zerfallsprodukte werden durch Makrophagen entfernt, wodurch das Gewebe aufgelockert und eine Regeneration erleichtert wird. GLASBY *et al.* (1986a) stellten fest, dass vorbehandelte Muskulatur ein besseres axonales Einwachsen in das Muskelgewebe ermöglicht als frische Skelettmuskulatur. Auch SZ migrieren zu einem früheren Zeitpunkt in vorbehandelte Muskulatur (TOS *et al.*, 2007). Zudem lässt sich denaturierte Muskulatur praktisch unbegrenzt aufbewahren.

Die Vorteile von autologen Muskeltransplantaten gegenüber Nerventransplantaten und artifiziellen Schienen sind vielzählig. Dazu zählen ein unbegrenztes Angebot an Material aus zahlreichen möglichen Spenderregionen, einfache Präparationsweise, immunologische Kompatibilität mit dem Empfänger und das Fehlen von sekundären funktionellen Defiziten. In

den allermeisten Fällen kann das benötigte Muskelgewebe direkt am Ort der Nervenverletzung gewonnen werden, wodurch sich ein Hebedefekt erübrigt.

Die Eignung von Muskelgewebe als Leitstruktur für axonales Wachstum wird durch Studien am Primatenmodell und erste klinische Studien bestätigt (CALDER und NORRIS, 1993; GLASBY *et al.*, 1986b; NORRIS *et al.*, 1988; PEREIRA *et al.*, 2008; RATH, 2002; THOMAS *et al.*, 1994). GLASBY *et al.* (1986b) überbrückten 3 cm Defekte des N. ulnaris in Primaten und stellten fest, dass nach sechs Monaten die Funktion der Hand wieder normal war. In einer klinischen Studie überbrückten NORRIS *et al.* (1988) 15 - 25 mm Defekte bei Menschen mit Verletzungen der Fingernerven mit Hilfe denaturierter Muskel-Autotransplantate. Bei der Evaluation drei bis elf Monate nach der Rekonstruktion wiesen sieben von acht Patienten eine vollständige sensorische Wiederherstellung auf. PEREIRA *et al.* demonstrierten eine erfolgreiche Nervenregeneration nach Verwendung denaturierter autologer Muskulatur für die Rekonstruktion von Nervendefekten in Lepra-Patienten (PEREIRA *et al.*, 1991a; 1991b; 1996; 2008). Die Verwendung von Muskeltransplantaten zur sekundären Rekonstruktion von neun Tibialis posterior und drei Medianusdefekten (25 - 60 mm) zeigten bessere Ergebnisse im Vergleich zur End-zu-End Reparatur (PEREIRA *et al.*, 1991a). In einer zweiten Studie beschrieben PEREIRA *et al.* (1991b) 24 Fingernerv-Rekonstruktionen mit denaturierten Muskeltransplantaten zur Rekonstruktion von Defekten zwischen 15 und 28 mm Länge. Die Ergebnisse der Muskeltransplantate waren autologen Nerventransplantaten überlegen. In einer aktuellen Studie von PEREIRA *et al.* (2008) wurden die Langzeitergebnisse von 38 Patienten mit elf Medianusdefekten am Handgelenk und 37 Tibialis posterior-Defekten am Knöchel beschrieben, die mit denaturierten autologen Muskeltransplantaten überbrückt worden waren (2,5 - 14 cm). Die sensorische Wiederherstellung lag bei 89 % und blieb während der gesamten Beobachtungszeit von durchschnittlich 12,6 Jahren (Spanne 4 - 14 Jahre) erhalten. THOMAS *et al.* (1994) verwendeten denaturierte Muskeltransplantate zur Kontinuitätswiederherstellung in 22 schmerzhaften Neuromen, wodurch sich in 60 % der Fälle eine teilweise oder komplette Schmerzlinderung erzielen ließ. In einer Fallvorstellung berichtet RATH (2002) von der erfolgreichen Überbrückung eines 1,5 cm-Defekts des N. alveolaris inferior mit denaturierter Muskulatur. Ein Stück autologes Muskelgewebe des vorderen Digastricus-Bauchs wurde mit flüssigem Stickstoff dreimal gefroren und komplett aufgetaut, wodurch das Gewebe unter Erhalt von Struktur und Proteingehalt devitalisiert werden konnte. Ein Jahr postoperativ war das Gefühl nahezu vollständig wiederhergestellt. Auch CALDER und NORRIS (1993) beobachteten eine gute sensible Wiederherstellung in fünf von zwölf Patienten, bei denen Nervenverletzungen (des Medianus und Ulnaris) mit Skelettmuskel-Transplantaten rekonstruiert worden waren.

Weniger erfolgreich hingegen war die motorische Wiederherstellung. So konnten STIRRAT *et al.* keine Erholung der motorischen Funktion nach Rekonstruktion großer gemischter Nerven in sieben Patienten mit denaturierter Muskulatur ohne die Unterstützung einer Nervenschiene feststellen (z.i. MEEK *et al.*, 1999a). ROGANOVIC *et al.* (2007) überbrückten neun radiale Nervendefekte (2,5 - 6 cm) mit Hilfe von denaturierter Muskulatur und verglichen diese mit 23 radialen Nervendefekten (2,5 - 5,5 cm), die mit autologen Nerventransplantaten rekonstruiert wurden. Nach fünf Jahren war in sieben von neun Patienten, die mit einem Muskel Transplantat versorgt worden waren, eine teilweise Wiederherstellung der motorischen Funktion zu beobachten (Handgelenksextension gegen Schwerkraft oder gegen Widerstand möglich). Diese war jedoch weniger komplett und von geringerer Qualität als nach Rekonstruktion mit Hilfe eines autologen Nerventransplantats. Eine exzellente Wiederherstellung (Finger und Daumenextension) wurde nur nach Verwendung autologer Nerventransplantate festgestellt.

Kombination aus Kollagenschiene und denaturierter Muskulatur

In den aufgeführten klinischen Studien wurde allerdings das Muskelgewebe nicht in Kombination mit einer Nervenschiene verwendet, was das schlechtere Abschneiden der Muskeltransplantate erklären könnte. Die begrenzte Defektlänge, die mit Muskeltransplantaten überbrückt werden kann, wird als ein Hauptnachteil von Muskeltransplantaten gewertet (MEEK *et al.*, 2004). GLASBY *et al.* verglichen Nerven- und Muskeltransplantate bei der Rekonstruktion von Nervenlücken in Kaninchen, Schafen und Primaten (GLASBY *et al.*, 1991; 1993; HEMS und GLASBY, 1993; MLIGILICHE *et al.*, 2001b). Sie demonstrierten, dass mit zunehmender Länge des Defekts eine zuverlässige Regeneration nur durch Nerventransplantate, nicht jedoch durch Muskeltransplantate stattfand. Doch selbst Nerventransplantate führten zu keinen optimalen Ergebnissen bei zunehmenden Defektlängen. Die Studien lassen eine Spanne von 2 - 5 cm als Grenze für die erfolgreiche Anwendung von Skelettmuskeltransplantaten vermuten (HEMS und GLASBY, 1993). Die sinkende Effektivität solcher Transplantate mit zunehmenden Defektlängen lässt sich zum Teil durch fehlwachsende Axone begründen, die aus dem Transplantat herauswachsen und eine Neurombildung begünstigen. Auch ist gerade in längeren Muskelinterponaten stellenweise ein narbiger Ersatz der Basalmembran und Infiltration von inflammatorischen Zellen beschrieben worden, wodurch das axonale Wachstum zusätzlich beeinträchtigt werden kann (HEMS und GLASBY, 1993). Experimentelle Studien geben jedoch Anlass zur Hoffnung, dass diese beiden Probleme, das Auswachsen von Axonen aus dem Interponat und die narbige Infiltration in das Interponat, umgangen werden können, wenn Skelettmuskelgewebe mit einer Nervenschiene (Vene oder artifizielle Schiene) kombiniert wird.

Auf der anderen Seite ist bekannt, dass leere Röhren bei der Überbrückung großer Defektstrecken versagen, weil ihnen die für eine erfolgreiche Regeneration notwendigen SZ fehlen (GULATI *et al.*, 1995). Ein Befüllen der Schienen mit Muskelgewebe könnte dieses Problem beheben, da bekannt ist, dass SZ Muskelgewebe frühzeitig kolonisieren (FORNARO *et al.*, 2001), dort proliferieren (GEUNA *et al.*, 2003) und ein neurotropes Milieu aufrechterhalten (PAGNOTTA *et al.*, 2002). Als weiteres häufiges Problem wurde ein Kollabieren von (ungefüllten) Interponaten wie Venen und dünnwandigen resorbierbaren Schienen beobachtet, was die Nervenregeneration massiv beeinträchtigen kann (CHIU und STRAUCH, 1990; MEEK, 1997). MEEK *et al.* (1996, 1999a; 2001a) stellten fest, dass die Kombination von denaturierter Muskulatur und einer dünnwandigen resorbierbaren Nervenschiene ein Kollabieren der Schiene verhindern konnte. Durch die Verwendung muskelgefüllter Nervenschienen soll eine synergistische Nutzung der Vorteile beider Interponate erzielt werden. Die in der Muskulatur enthaltenen Basallamina-Schläuche sollen als Leitstruktur für das Wachstum regenerierender Axone in Richtung des distalen Nervensegments dienen (IDE, 1996) und stabilisierend auf die Schienenwand wirken, während das Einwachsen von fibrösem Narbengewebe und eine Neuroentstehung durch fehlwachsende Axone mit Hilfe einer resorbierbaren Schiene verhindert werden soll.

BRUNELLI *et al.* (1993) verwendeten kombinierte Muskel-Venen-Interponate zur Wiederherstellung von 10 und 20 mm Ischiasnervendefekten in der Ratte und stellten fest, dass die eingebrachte Matrix ein Kollabieren der Venen erfolgreich verhindern konnte. Die funktionellen Ergebnisse waren mit denen autologer Nerventransplantate vergleichbar und besser als jeweils Venen- bzw. Muskeltransplantat allein. MEEK *et al.* (1996) stellten im Tierexperiment im Vergleich zu leeren Schienen eine beschleunigte Nervenregeneration durch resorbierbare Schienen fest, die mit modifizierter denaturierter Muskulatur gefüllt waren. Bereits drei Wochen nach Rekonstruktion eines 15 mm Nervendefekts mit Hilfe muskelgefüllter Schienen in der Ratte waren die ersten funktionellen Verbesserungen (*SFI*) festzustellen, während erst fünf Wochen nach Überbrückung eines 10 mm Defekts mit leeren Schienen die ersten Anzeichen für eine Funktionsverbesserung beobachtet wurden. In einer zweiten Studie stellten MEEK *et al.* (1999c) auch im Vergleich zum autologen Nerventransplantat eine verbesserte funktionelle Wiederherstellung nach Rekonstruktion von Ischiasnervendefekten mit muskelgefüllten resorbierbaren Nervenschienen fest, obwohl für die Muskelschienen eine längere Defektstrecke (15 mm) gewählt wurde als beim Autograft (12 mm). Das Autograft führte in dieser Studie innerhalb von zwölf Wochen zu keiner funktionellen Regeneration, während sich in der Schienengruppe bereits nach drei Wochen Verbesserungen des *SFI* beobachten ließen. Auch bei elektrophysiologischen Untersuchungen waren Schienen, die mit denaturierter Muskulatur gefüllt worden waren dem autologen Nerventransplantat überlegen (DEN DUNNEN und MEEK, 2001). Selbst eine erfolgreiche axonale Regeneration über große Defekt-

längen (50 mm) mit Reinnervation der Muskulatur im Kaninchenmodell ist mit dieser Technik beschrieben (MLIGILICHE *et al.*, 2003). In der Klinik wurde die Kombination von Muskulatur mit einem Schienengerüst bisher nur in Form von muskelgefüllten Venen untersucht (BATTISTON *et al.*, 2000a; 2000b; 2007). Wie schon von BRUNELLI *et al.* (1993) im Tiermodell beobachtet, ließ sich auch in klinischen Studien durch die Kombination von Venen mit Muskulatur ein Kollabieren der Venen vermeiden (BATTISTON *et al.*, 2000a). Seit 1993 behandelte die Arbeitsgruppe um Bruno BATTISTON über 40 Patienten mit Finger- und Handnervenverletzungen mit Muskel-Venen-Transplantaten und stellten gute funktionelle Ergebnisse in 85 % der Patienten bei der Rekonstruktion sensibler und gemischter Nerven bis zu 5 cm fest (BATTISTON *et al.*, 2007).

Die guten Ergebnisse experimenteller und erster klinischer Studien sprechen dafür, dass die Kombination von Schienengerüst und Füllmatrix eine erfolgreiche Methode zur Unterstützung der peripheren Nervenregeneration ist. Insbesondere Kollagen, das sich durch seine hervorragenden Materialeigenschaften auszeichnet, und denaturierte Muskulatur, die eine offenporige Leitstruktur für Axone bietet, scheinen besonders gut geeignet zu sein. Die Kombination dieser beiden Materialien wurde in der Form in unserer Studie zum ersten Mal untersucht.

4.2 EVALUATION DES REGENERATIONSERFOLGS

Da ein einzelner methodischer Ansatz die gesamte Nervenfunktion nur unzureichend reflektiert (DELLON und MACKINNON, 1989b; KANAYA *et al.*, 1996), wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene methodische Ansätze kombiniert, um möglichst alle Teilschritte der Regeneration untersuchen zu können. Neben den beschriebenen strukturellen, elektrophysiologischen und motorischen Tests wurden auch sensorische Tests durchgeführt, die sowohl Propriozeption als auch Nozizeption umfassten, diese wurden jedoch bereits an anderer Stelle beschrieben (RUPP, 2007).

4.2.1 BEURTEILUNG DES DENATURIERUNGSPROZESSES

Da das Denaturierungsverfahren einen substanziellen Einfluss auf das experimentelle Ergebnis hat, ist die Wahl eines geeigneten Verfahrens von großer Bedeutung. Dabei sind neben morphologischen Eigenschaften des Gewebes auch Handhabung, Resorptionsverhalten Immunkompatibilität, sowie die klinische Umsetzbarkeit des Verfahrens von Bedeutung.

Technische Überlegungen zur Wahl des Denaturierungsprozesses

Zahlreiche verschiedene Verfahren zur Denaturierung von Muskelgewebe, wie wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen (GLASBY *et al.*, 1986b; HALL und ENVER, 1994; IDE, 1984; KEYNES *et al.*, 1984), Erhitzen (HALL und ENVER, 1994), Mikrowellen (WHITWORTH *et al.*, 1995), chemische Verfahren (KEILHOFF *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2001) oder Kombination aus den genannten

(MEEK *et al.*, 1999a) wurden bereits beschrieben. In der Praxis zeigte sich, dass Muskeltransplantate, die durch Gefrier-Auftau-Zyklen denaturiert wurden, wegen der hohen Bruchgefahr und starker Gewebsschrumpfung schwer zu handhaben sind, und dass die Nervenregeneration durch solche Transplantate oft unzureichend ist (CALDER und NORRIS, 1993; HALL und ENVER, 1994; HEMS und GLASBY, 1992). Vorbehandlung durch Erhitzung auf 60°C konnte zwar den Schrumpfungsprozess und die Bruchgefahr reduzieren (HALL und ENVER, 1994), führte aber zu einer verstärkten Immunantwort, wodurch die Regeneration im NI der Ratte beeinträchtigt wurde (WHITWORTH *et al.*, 1995). Erhitzung auf 80° führte ebenfalls zu einem Versagen der Regeneration, was zum Teil durch die Thermosensibilität von Laminin zu begründen ist (HALL und ENVER, 1994). Auch ein zu langes Einfrieren führt zu einer vollständigen Zerstörung der Muskelstruktur mit Fragmentierung der Basalmembran (ROGANOVIC *et al.*, 2007). MLIGILICHE *et al.* (2001a) waren die Ersten, die eine Detergens-basierte (Triton X-100, Natrium-Dodecylsulfat) Denaturierung von Skelettmuskelfasern für die Produktion effektiver Nervenschienen vorschlugen. Ihr Verfahren löste das Myoplasma und zelluläre Komponenten nahezu vollständig aus dem Gefüge, beließ aber die Basallamina-Schläuche intakt, so dass ein 1 cm Defekt im NI der Ratte erfolgreich überbrückt werden konnte. In chemisch extrahierter Muskulatur bleibt die Elastizität des Materials erhalten, wodurch diese als Transplantate einfach anzuwenden sind (LIU *et al.*, 2001). Auch konnte festgestellt werden, dass Axone und SZ schneller in chemisch extrahierte autologe Muskeltransplantate einwachsen als in Muskelgewebe, das durch eine Serie aus Gefrier-Auftau-Zyklen denaturiert wurde (LIU *et al.*, 2001). Allerdings zeigte sich in einer jüngeren Studie (KEILHOFF *et al.*, 2005), dass rein chemisch denaturiertes Muskelgewebe anfälliger ist, frühzeitig resorbiert zu werden und deshalb, gerade für die Überbrückung längerer Defektstrecken, nicht geeignet ist.

MEEK *et al.* (1999a) untersuchten den Einfluss mehrerer Denaturierungsverfahren auf die ultrastrukturelle und molekulare Zusammensetzung des Muskelgewebes. Die besten Ergebnisse fanden sich nach Anwendung einer Kombination aus Gefrier-Auftau-Prozessen mit anschließender Essigsäurebehandlung. Bei dieser Methode beobachteten die Autoren eine sehr offene Struktur der ECM bei gleichzeitig erhaltener Basallamina. In einer *in situ* Pilotstudie kombinierten die Autoren auf diese Weise denaturierte Muskulatur mit einer Nervenschiene und evaluierten die Regeneration durch solche Schienen zur Rekonstruktion von 15 mm Defekten des NI der Ratte. Bereits nach drei Wochen ließen sich die ersten funktionellen Verbesserungen beobachten. Nach zwölf Wochen waren keine funktionellen Unterschiede zu Tieren feststellbar, die mit einem autologen Nerventransplantat versorgt worden waren. Weder eine erhöhte Brüchigkeit noch eine verfrühte Resorption des Gewebes wurden beschrieben. Wir entschieden uns für die von MEEK *et al.* vorgeschlagene Methode, da die Kombination aus chemischen und physikalischen Methoden die Nachteile der einzelnen Ver-

fahren auszugleichen scheint und dadurch auch bei größeren Defektlängen noch Erfolg versprechend ist.

Morphologische Beurteilung der denaturierten Muskulatur

Im Gegensatz zu reinen Gefrierdenaturierungen, bei denen eine Schrumpfung der Muskelgewebsblöcke zum technischen Problem wird, war die Schrumpfung in unserer Studie nur gering ausgeprägt. Auch blieb die Gewebselastizität erhalten, was die Handhabung im Vergleich zu reinen Gefrierprozessen erleichterte. Zudem wurden keine Hinweise auf eine verstärkte Immunantwort gefunden. Anders als bei rein chemischen Verfahren, wurde in unserer Studie keine vorzeitigen Resorption des Muskelgewebes beobachtet. Die eingebrachte Matrix aus dezellularisierter Muskulatur, die in unserer Studie zusätzlich durch eine Kollagenschiene vor Resorption geschützt war, blieb über einen Zeitraum von acht Wochen *in vivo* stabil – also lang genug für die Überbrückung des gesetzten Defekts. Ein kontrollierter biologischer Abbau in zeitlicher Übereinstimmung mit der axonalen Wachstumsrate ist eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg einer peripheren Nervenrekonstruktion mit biologischen Interponaten (DEN DUNNEN *et al.*, 2000; HEMS und GLASBY, 1993). Ein längerer Resorptionszeitraum garantiert, dass die Regeneration und Reifung des Nervs der Belastung bei Mobilisierung standhält. Zudem vermindert ein später biologischer Abbau das Risiko der Invasion von fibrösem Gewebe, das zur Beeinträchtigung der Regeneration und Reifung der Axone führen könnte (MAQUET *et al.*, 2000). Die morphologischen Eigenschaften der Muskulatur acht Wochen nach *in vivo* Implantation entsprachen im Großen und Ganzen den elektronenmikroskopischen Befunden von MEEK *et al.* (1999a), deren Protokoll für die Denaturierung verwendet wurde. Allerdings mussten wir feststellen, dass – trotz exakten Einhaltens der beschriebenen Denaturierungsschritte – der Denaturierungsprozess nicht alle Bereiche der Muskulatur erreicht hatte und die Denaturierung dort unvollständig war. MEEK *et al.* liefern keine Aussage darüber, ob das gesamte denturierte Muskelgewebe gleichmäßig denaturiert ist. Auch wird nicht erwähnt, wie groß, bzw. dick die entnommenen Muskelproben waren. In unserer Studie wurde das Gewebe entsprechend dem geforderten Röhrchenlumens relativ großzügig entnommen um eine eventuelle Schrumpfung kompensieren zu können. Es ist denkbar, dass das von MEEK *et al.* beschriebene Verfahren nicht in der Lage ist, größere Muskelblöcke vollständig zu denaturieren. Eine unvollständige Denaturierung ist kein seltenes Problem von Denaturierungsverfahren und wurde auch von anderen Autoren beobachtet. CALDER und NORRIS (1993) machten eine inkomplette Denaturierung mitverantwortlich für die schlechten funktionellen Ergebnisse von 13 Patienten nach Rekonstruktion von sechs medianen und sieben ulnaren Nervendefekten. Die Autoren vermuteten, dass größere Muskelgewebsblöcke, die zur Wiederherstellung gemischter Nerven verwendet werden sollen, mehrmals gefroren und wieder aufgetaut werden müssen. Auch die Denaturierung durch

Glutaraldehyd-fixierte Muskeltransplantate scheiterte, weil es wegen eingeschränkter Entfernung zellulärer Debris zu einer mechanischen Obstruktion für auswachsende Axone gekommen war (KEYNES *et al.*, 1984). Inwieweit sich die unvollständige Denaturierung in unserer Studie auf das Regenerationsergebnis ausgewirkt hat, soll im Folgenden erläutert werden.

4.2.2 MORPHOLOGISCHE BEURTEILUNG DES REGENERATS

Nach Rekonstruktion eines peripheren Nervendefekts müssen die regenerierenden Axone zuerst aus dem proximalen Stumpf durch das Transplantat bzw. Interponat wachsen und erfolgreich Kontakt zum distalen Stumpf finden. Dieser erste Schritt der Nervenregeneration wurde in unserer Studie durch strukturelle und ultrastrukturelle Untersuchungen innerhalb und unmittelbar distal des Transplantats/ Interponats qualitativ und quantitativ untersucht.

4.2.2.1 Morphologische Beurteilung des Regenerats

Die morphologische Beurteilung des Nervs gibt Hinweise über den trophischen Zustand der regenerierten Strukturen (DE MEDINACELI, 1995; KANAYA *et al.*, 1996). Die qualitative Beurteilung markloser NF ist im Wesentlichen der Elektronenmikroskopie vorbehalten.

In unserer Studie waren in allen Tieren innerhalb des Interponats/ Transplantats NF nachweisbar, die auch in den Röhrengruppen bereits eine beginnende Organisation und Kompartimentalisierung zeigten. Diese war jedoch im Vergleich zum Autograft weniger vollständig. Auch waren beide Schienengruppen dem Autograft zahlenmäßig in Hinblick auf regenerierte NF und neugebildete Blutgefäße deutlich unterlegen. Eine erfolgreiche Reinnervation des distalen Stumpfes fand im Gegensatz zum AG nicht in allen Tieren der Schienengruppen statt. Andere Forschungsgruppen (BATTISTON *et al.*, 2000b; GEUNA *et al.*, 2004; MEEK *et al.*, 2001a) beobachteten bei der Rekonstruktion von Nervendefekten mit muskelgefüllten Venen und Nervenschienen, dass die regenerierende Axone entlang und durch das Muskelgewebe wuchsen. Zwar fanden auch wir vereinzelte Nervenfasern innerhalb der muskulären Matrix (Abb. 3-3), der Großteil der Fasern regenerierte jedoch ausschließlich in dem schmalen Saum zwischen Schienenwand und Muskulatur, sodass wir davon ausgehen, dass in unserer Studie die denaturierte Muskulatur eine mechanische Barriere für auswachsende Axone dargestellt hatte.

4.2.2.2 Morphometrische Analyse des Regenerats

Diskussion methodischer Aspekte Computer-unterstützer Analyseverfahren

Morphologische Aspekte der Nervenregeneration können durch Auswertung histologischer Proben quantifiziert werden, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten (GERSHENBAUM und ROISEN, 1980) und unterschiedlichen Querschnittshöhen (CHAMBERLAIN *et al.*, 2000) lichtmikroskopisch (DE MEDINACELI, 1995; KEUNE *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2003; TERRIS *et al.*,

1999) oder elektronenmikroskopisch (GERSHENBAUM und ROISEN, 1980; MEEK *et al.*, 2001a; VAREJAO *et al.*, 2004a) untersucht werden. Die Morphometrie ist ein sehr nützliches Instrument zur objektiven, quantitativen Beurteilung von Unterschieden in der Zusammensetzung regenerierender Nerven. Da morphometrische Parameter wie Faserzahl und Myelindicke die elektrophysiologischen Eigenschaften peripherer Nerven widerspiegeln und mit Zahl, Menge und Verhältnis leitfähiger und isolierender Komponenten korrelieren (VLEGGEERT-LANKAMP *et al.*, 2004), erlaubt die Morphometrie zudem Aussagen über die elektrofunktionellen Konsequenzen mit Auswirkung auf Leitgeschwindigkeit, Reizschwelle, Amplitude von Aktionspotenzialen und Refraktionszeit (SMITH, 1978). Bei der Wahl der geeigneten Analysemethode gibt es jedoch eine Reihe technischer Überlegungen zu berücksichtigen. Manuelle Morphometrie ist mühselig, zeitaufwändig, schwierig in der Durchführung und fehleranfällig (AUER, 1994). Aus diesem Grund werden heutzutage meist automatische oder semi-automatische Analyseverfahren angewendet (EWART *et al.*, 1989). Wird nicht der gesamte Nervenquerschnitt ausgewertet, sondern randomisierte Teilbereiche (Sampling), ist zu beachten, dass die Faserverteilung in großen Faserpopulationen heterogen ist und so Untersucherabhängige Samplingfehler zwischen 10 % und 50 % auftreten können (ROMERO *et al.*, 2000; TORCH *et al.*, 1989). Dank der Zusammenarbeit mit dem Helmholtzentrum München und der Verwendung einer für diese Zwecke programmierten Analysesoftware, war es in der vorliegenden Studie möglich, gesamte Nervenquerschnitte automatisch zu erfassen, wodurch Samplingfehler vermieden werden konnten. Neben dem enormen Hardwareaufwand und der Notwendigkeit einer speziellen Software gilt als ein Nachteil automatischer Verfahren, dass sie anfälliger gegenüber systematischen Fehlern und Falscherkennungen bei artefaktbelasteten Präparaten sind. Um diese Gefahr zu minimieren wurden vor der Bildanalyse Artefakte wie Luftblasen, Färbeartefakte, Überlappungen an Kachelbildern (Abb. 4-1D) etc. manuell maskiert und von der Analyse ausgeschlossen.

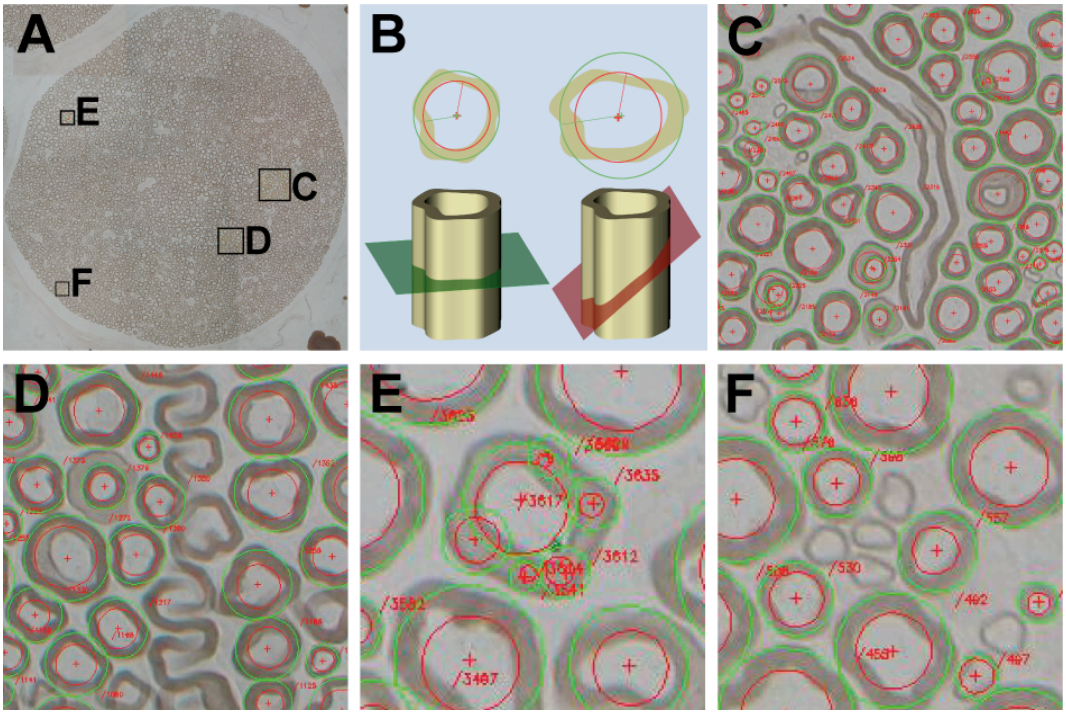

Abb. 4-1: Beispiele für typische Segmentationsfehler
Typische Segmentationsfehler bei der automatischen Bildanalyse, hier beispielhaft dargestellt an einem Querschnitt durch einen Referenznerven (A), Vergrößerung 100x; (C-F) Ausschnittsvergrößerungen; (B) Schräggeschnittene Fasern führen zu Überschätzungen der gemessenen Daten. Aus diesem Grund ist es wichtig, Obergrenzen zu setzen. (C) Die schräggetroffene Nervenfaser überschreitet die festgelegten Maximalwerte und wird nicht in die Auswertung eingeschlossen; (D) Bildartefakte durch Verschiebungen an den Nahtstellen zwischen zwei Kachelbildern können dazu führen, dass die Myelinscheide um die Fasern nicht vollständig geschlossen und die Faser nicht detektiert wird, da definitionsgemäß nur vollständig umschlossene Fasern als Nervenfasern erkannt werden; (E) Degenerationserscheinungen und Fixationsartefakte können zu Fehldetektionen führen, wie hier innerhalb einer geschwollenen Myelinscheide. Um diese Fehler zu minimieren wurden Strukturen <2µm kategorisch ausgeschlossen; (F) Durch diese Einschränkung wurden sehr kleine (<2µm) und schwach angefärbte Nervenfasern nicht detektiert.

Dennoch stellten sich Artefakte insbesondere in den distalen Nervenabschnitten als großes Problem heraus, da Degenerationserscheinungen wie Schwellung der Myelinscheiden, Aufsplitterung der Myelinscheiden in Lamellen und unregelmäßige Formen von Axon und Myelinscheide mit Bildung von Markballen zu Falscherkennungen führten (Abb. 4-1E). Aus diesem Grund beschränken sich Aussagen über diese distalen Nervenabschnitte vorwiegend auf morphologische Beobachtungen.

Gesamtfaserzahl und Gesamtflächen

Das Zählen der Nervenfasern ist eine häufig verwendete Methode, die gut geeignet ist, um Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen aufzudecken (VLEGGEERT-LANKAMP, 2007). Bei Betrachtung der Gesamtfaserzahl muss beachtet werden, dass die absolute Anzahl der Axone in einem regenerierenden Nerven nicht der Anzahl tatsächlich vorhandener, dazugehöriger Neurone übereinstimmen muss (KUYPERS *et al.*, 1980). Das kommt daher, dass im Rahmen von Regenerationsvorgängen im peripheren Nervensystem multiple Kollateralen (sog. Filopodien) aus den proximalen Axonen entlang der Büngner-Bänder aussprossen (*engl.* sprouting) (SUNDERLAND, 1992), was dazu führt, dass die Anzahl von NF distal des

Defekts erhöht ist (WITZEL *et al.*, 2005). Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, Kontakt zum distalen Nervenstumpf zu finden. Da in dieser Phase der axonalen Regeneration ein Überangebot an NF vorliegt, spricht man auch von temporärer Hyperneurotisation. Im weiteren Verlauf der Regeneration kommt es dann zu einer Degeneration aller Kollateralen mit Ausnahme des Axons, das als erstes stabilen Kontakt zum distalen Nervenstumpf finden konnte (LUNDBORG und DANIELSEN, 1991), wodurch die Präzision der Reinnervation erhöht wird (IJKEMA-PAASSEN *et al.*, 2002).

Dieses „Sprouting"-Phänomen ließ sich sehr deutlich in der Autograftgruppe beobachten. Hier wurden nach acht Wochen in der Mitte des Transplantats im Durchschnitt über elftausend kleinere NF gezählt. Diese Werte entsprechen den Beobachtungen anderer Autoren nach Autograft-Rekonstruktion (CHAMBERLAIN *et al.*, 1998). Der NI auf der Kontrollseite wies im Vergleich etwa achttausend NF auf, was von der Größenordnung mit Zählungen anderer Autoren übereinstimmt (MAEDA *et al.*, 1993; ROBINSON *et al.*, 1991).

Innerhalb der matrixfreien Kollagenröhren wurden signifikant weniger NF gezählt (wenige tausend). Entsprechende Werte wurden auch von anderen Forschungsgruppen berichtet, die vergleichbar große Defekte mit ungefüllten Nervenschienen rekonstruieren wollten (CAI *et al.*, 2004). Das Ergebnis ist insofern nicht verwunderlich, da der Defekt deutlich oberhalb der angegebenen kritischen Defektlänge lag. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass oberhalb dieser Grenze aus Mangel einer geeigneten Leitstruktur und aufgrund trophischer Probleme eine vollständige Regeneration nicht zu erwarten ist. Entgegen unseren Erwartungen fand sich die geringste Faserzahl aller Studiengruppen in den muskelgefüllten Schienen. Betrachtung der Gesamtflächen von Faser, Axon bzw. Myelinscheide bestätigen diese Beobachtung. Im Hintergrund der morphologischen Untersuchungen der Muskelmatrix muss von einer mechanischen Obstruktion des Axonwachstums ausgegangen werden. Bei dem von uns verwendeten Verfahren wurden die (denaturierten) Muskelgewebsblöcke nach einmaligem Einfrieren und Auftauen als zusätzlicher Denaturierungsschritt für eine Stunde in 16-%ige Essigsäure gelegt. Doch selbst dadurch ließ sich eine vollständige Denaturierung nicht erreichen. Eine weitere mögliche Erklärung für das Versagen der Regeneration durch die denaturierte Muskulatur in unserer Studie könnten Rückstände von Denaturierungsmitteln im Muskelgewebe sein. Denkbar wäre, dass die Essigsäure, selbst nach Vakuumbehandlung und Waschen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, nicht ganz aus den unvollständig denaturierten Bereichen entfernt werden konnte und erst *in vivo* nach und nach austrat, sich im Röhrchenlumen anreicherte und so die Regeneration negativ beeinflusste. Dafür spricht auch, dass die wenigen regenerierten NF nicht innerhalb oder entlang des Muskelgewebes, sondern mit einem „Sicherheitsabstand" zwischen Muskelgewebe und Röhrcheninnenwand wuchsen.

MEEK *et al.* (1999a) hatten in einer Pilot-*in-situ*-Studie gute funktionelle Ergebnisse nach Rekonstruktion von 15 mm NI-Defekten im Rattenmodell mit dünnwandigen (p(DLAA-ε-Caprolacton) Laktatpolymerschienen, die mit modifizierter denaturierter Muskulatur gefüllt waren, festgestellt. Später untersuchte die Arbeitsgruppe die verwendete Rekonstruktionsmethode auch elektronenmikroskopisch und morphometrisch (2001a) und stellten im Gegensatz zu unseren Ergebnissen nach zwölf Wochen eine signifikante Zunahme der Faserzahl fest. Die gemessene Faserzahl lässt sich allerdings nicht direkt mit unseren Messungen vergleichen, da MEEK *et al.* nur eine relative Faserzahl bezogen auf eine Standardfläche untersucht hatten, wobei sich die Beurteilung auf drei 500 μm^2 große, „repräsentative" Ausschnitte pro Nervenquerschnitt beschränkte (z.i. DEN DUNNEN *et al.*, 1993). Der vollständige Verzicht auf positive (Autograft) und negative (leere Schiene) Kontrollgruppen in der Studie von MEEK *et al.* erschwert die Vergleichbarkeit zusätzlich.

Die Gesamtfaserzahlen (und auch die Gesamtflächen) unterliegen bekanntermaßen starken interindividuellen Schwankungen und sind für sich betrachtet nicht sehr aussagekräftig. Zwar ist eine geringere Faserzahl als im (unbehandelten) Kontrollnerv nachteilig, weil dies bedeutet, dass nicht alle Fasern aus dem proximalen Stumpf regeneriert sind (WITZEL *et al.*, 2005). Auf der anderen Seite können wenige regenerierte NF mit großem Durchmesser und exzellenten elektrophysiologischen Eigenschaften unter Umständen einer großen Population kleiner Fasern mit schwachen elektrophysiologischen Eigenschaften überlegen sein (VLEGGEERT-LANKAMP, 2007), weshalb auch die Faserqualitäten beurteilt werden müssen, bevor eine Aussage über Erfolg oder Nichterfolg der Methode getroffen werden kann.

Durchmesser

Der *Durchmesser* stellt den klassischen Parameter zur Klassifizierung von NF dar (ERLANGER und GASSER, 1937; SCHALOW *et al.*, 1995) und gilt als ein Haupteinflussfaktor der *Nervenleitgeschwindigkeit* (HURSH, 1939). Für die Berechnung wurden die Dimensionen einer idealisierten myelinisierten Faser mit kreisförmiger Querschnittsfläche verwendet, um Artefakte durch unterschiedliche Gewebsschrumpfung im Rahmen der Fixierung und Färbung für die histologischen Präparate zu minimieren (KARNES *et al.*, 1977). Der mittlere Faserdurchmesser eines normalen, unverletzten NI der Ratte liegt zwischen 5,1 und 8,5 µm (bei uns 6,5 µm) und ist in regenerierenden Nerven deutlich vermindert bei Werten um 2,8 - 4,2 µm (bei uns 3,3 µm) in autologen Nerventransplantaten (Daten aus 26 Studien, z.i. VLEGGEERT-LANKAMP, 2007). In keiner Studie war der Durchmesser in regenerierenden Nerven größer als 4,5 µm. Diese Beobachtung konnten wir bei der Untersuchung nach acht Wochen ebenfalls machen. Auf der verletzten Seite waren die mittleren Faserdurchmesser in allen Studiengruppen deutlich kleiner als auf der Kontrollseite, was dafür spricht, dass die Fasern noch unreif waren. Auch vorstellbar wäre die Vermutung, dass vorwiegend sensible

NF, die für Schmerz-, Temperatur-, und Druckempfinden zuständig sind ausgewachsen sind. Es ist bekannt, dass sensible NF in der Frühphase der Regeneration schneller regenerieren als motorische Fasern (KAWASAKI *et al.*, 2000). Tatsächlich konnten wir in allen Tieren nach acht Wochen eine nahezu vollständige Rückkehr der Schmerzempfindung in Fuß und Zehen beobachten (Daten nicht abgebildet). Diese Beobachtung kann aber auch durch Kollateralenbildung aus dem N. saphenus erklärt werden, wie unsere Arbeitsgruppe in einer anderen Studie zeigen konnte (RUPP *et al.*, 2007b). Auch MEEK *et al.* (1999c) stellten bei Ihrer funktionellen Beurteilung sowohl nach Autograftrekonstruktion, als auch nach Verwendung muskelgefüllter Schienen eine vollständige Wiederherstellung der Nozizeption fest. Da die Wiederherstellung im Gegensatz zu anderen funktionellen Tests das Niveau der Kontrolltiere erreichte, diskutierten die Autoren ebenfalls eine abberante Reeinnervation durch Hautnerven. MEEK *et al.* untersuchten die Nozizeption durch Messung der zur Auslösung eines Schmerzreizes notwendigen Amplitude mittels Elektrostimulation an drei Punkten entlang der lateralen Fußsohle, wobei die 5. Zehe allerdings nicht mituntersucht wurde. In unserer Studie war eine Rückkehr der Schmerzempfindung in die 5. Zehe nur in der AG-Gruppe zu beobachten. Aus diesem Grund betrachten wir nur diesen Messpunkt für geeignet, um Fehlmessungen durch abberante Innervationen bei nozizeptiven Untersuchungen im Rattenmodell zu verhindern (RUPP *et al.*, 2007b).

Die von uns gemessenen Axondurchmesser aller Gruppen waren etwas kleiner verglichen mit den Ergebnissen von MEEK *et al.* (2001a). Allerdings liegt in deren Studie der Untersuchungszeitpunkt bei zwölf Wochen (bei uns acht), so dass von einer weiteren Zunahme der Axondurchmesser in unserer Studie ausgegangen werden kann. Obwohl Faser- und Axondurchmesser in unserer Studie innerhalb der muskelgefüllten Röhren – möglicherweise als Folge eines positiven Effekts der in der Muskulatur enthaltenen Faktoren – tendenziell über den in AG und KS-Gruppe gemessenen Werten lag, war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Die meisten Arbeitsgruppen konnten bei der Betrachtung des mittleren Faserduchmessers keinen signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen Behandlungsmethoden feststellen (FRANCEL *et al.*, 2003; ROBINSON *et al.*, 1991), oder nur zwischen Autograft und leeren Nervenschienen (ITOH *et al.*, 2001; MAEDA *et al.*, 1993), von denen schwache Regenerationsleistungen bekannt sind. VLEGGEERT-LANKAMP (2007) schließt in einer aktuellen Metaanalyse aus den Daten von 23 Studien, dass die Unterschiede zwischen den mittleren Faserdurchmessern regenerierender Nerven einfach zu klein sind, um als Werkzeug zur Differenzierung von Unterschieden zwischen zwei Behandlungsmethoden ausreichend zu sein. Diese Feststellung machten wir auch bei Betrachtung der Axondurchmesser und der mittleren Flächen von Faser, Axon und Myelinscheide, die ebenfalls nicht zu einer Differenzierung von Unterschieden zwischen den Gruppen führten. Die Autorin empfiehlt stattdessen Häufigkeitsverteilungen (Histogramme) durch Verteilung der NF in verschiedene

Klassen (z.B. 180 Klassen von jeweils 0,1 µm) zu betrachten. Häufigkeitsverteilungen wären in unserer Studie allerdings nicht ohne methodische Änderungen in der morphometrischen Analyse, verbunden mit einen erheblichen Mehraufwand möglich gewesen.

Myelinisierungsgrad als Marker für die Faserreife

Es ist genetisch bedingt, ob Neurone myelinisierte oder unmyelinisierte Axone besitzen, wobei die Myelogenese durch eine Interaktion zwischen Axon- und Schwann-Zell-Membran gesteuert wird (WEINBERG und SPENCER, 1975). Auch im Rahmen von Regenerationsprozessen ist dadurch gewährleistet, dass ein vorher markhaltiges Axon wieder eine Markscheide erhält; und zwar unabhängig davon ob das Axon in einen markhaltigen oder marklosen Nervenstumpf einwächst (AGUAYO *et al.*, 1976; WEINBERG und SPENCER, 1975, 1978). Anfärbbare Myelinscheiden treten sechs Tage nach dem Auswachsen der Axone auf, während sich die ersten Einschnürungen zwei Wochen später zeigen (GUTH, 1956). Die Messung der Myelinscheidendicke wurde in einer Reihe von Untersuchungen als Qualitätsindex für axonale Regeneration gewertet (ANSSELIN *et al.*, 1997; DI BENEDETTO *et al.*, 1994; RAB *et al.*, 1998). Bei der Berechnung der Myelindicke ist darauf zu achten, die Radien von Faser und Axon von einander zu subtrahieren; nicht selten wird jedoch fälschlicherweise die Differenz von Faser- und Axondurchmesser für die Berechnung verwendet (HUNTER *et al.*, 2007) oder die Differenz der beiden Durchmesser berechnet und erst das Ergebnis halbiert (VAREJAO *et al.*, 2003c), was zu Fehlinterpretationen führen kann und die Vergleichbarkeit mit anderen Studien beeinträchtigt.

Im gesunden NI liegt die Myelindicke bei etwa 0,55 µm (bei uns 0,63 µm) (DI BENEDETTO *et al.*, 1994). Im regenerierenden Nerven waren die Myelindicken in allen Gruppen deutlich kleiner – eine Beobachtung, die ebenfalls von anderen Autoren gemacht wurde (DI BENEDETTO *et al.*, 1994). Innerhalb der muskelgefüllten Schienen wurde eine (signifikant) höhere Myelindicke gemessen als in den anderen Gruppen. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Myelinisierung innerhalb der muskelgefüllten Schienen durch Bestandteile der muskulären Matrix angeregt wurde. So ist gerade von Laminin, das reichlich in denaturierter Muskulatur vorhanden ist, ein myelinproduzierender Effekt bekannt (KIM *et al.*, 2007). Möglicherweise wurde also zwar das Axonwachstum innerhalb der muskelgefüllten Schienen durch eine zu dichte Matrix behindert, die Qualitäten der einzelnen Fasern aber durch die Matrix positiv beeinflusst. Diese Beobachtung sollte allerdings nicht überbewertet werden, da es sich bei den Angaben um mittlere Werte handelt. Das bedeutet, dass zwar prozentual der Anteil dick myelinisierter Fasern in der MDM-Gruppe höher war. Insgesamt aber in den anderen Gruppen möglicherweise deutlich mehr Fasern mit hervorragenden elektrophysiologischen Merkmalen wie einer dicken Myelinschicht vorhanden sind. Auch hier

wären also retrospektiv betrachtet Histogramme mit Verteilungen der Myelindicken aussagekräftiger gewesen, was im Rahmen dieser Studie aber nicht realisierbar war.

G-Ratio

Da bei isolierter Betrachtung der Myelindicke zudem große Schwankungen auftreten, empfielt sich die Berechnung einer relativen Myelindicke wie der G-Ratio (BEAR und SCHMITT, 1937). Ein weiterer Vorteil der Verwendung dieses Verhältniswertes ist, dass die Faserzahl auf diesen Wert keinen Einfluss hat[2]. Die G-Ratio ist als Indikator für die saltatorische Reizleitung von großer Relevanz (RUSHTON, 1951) und wird von vielen Autoren für die Beurteilung des Reifegrads einer NF verwendet (DEN DUNNEN *et al.*, 1996a; 1996b; MIDHA *et al.*, 2003). Zur Interpretation des Reifegrads sind fundierte Kenntnisse über die Myelinisierungsvorgänge am regenerierenden Axon notwendig. Im gesunden Nerven liegt die G-Ratio bei knapp 0,6 (DEN DUNNEN *et al.*, 1993; FANSA *et al.*, 1999a), was sich mit unseren Messungen deckt (0,55 ± 0,04). Je kleiner die G-Ratio, desto dicker ist das Axon myelinisiert (Abb. 4-2A). Die dickste relative Myelinscheide fand sich in unserer Studie nach Verwendung denaturierter Muskulatur (G-Ratio 0,51 ± 0,08), was das Ergebnis der mittleren Myelindicke bestätigt. Nach Verwendung konventioneller Kollagenschienen hingegen war die G-Ratio im Vergleich zu MDM- und Autograftgruppe erhöht (0,58 ± 0,03). Zur Erklärung dieser Beobachtungen ist zusätzlich ein Verständnis über die physiologische Entwicklung von Axon und Myelinscheide wichtig, denn Axondurchmesser und Myelindicke entwickeln sich asynchron: Der Faserdurchmesser steigt während der Regeneration, so dass die Myelinscheidendicke initial im Vergleich zum Axon verhältnismäßig größer ist (SANDERS und WHITTERIDGE, 1946). Bei fortschreitender Regeneration reduziert sich die Dicke der Myelinscheide im Verhältnis zum Axondurchmesser stufenweise (AITKEN und THOMAS, 1962). Daraus folgt, dass die G-Ratio im Rahmen von Regenerationsvorgängen zunächst abfällt und dann – mit Zunahme des Axondurchmessers – wieder ansteigt (Abb. 4-2B). Die hohe G-Ratio in der KS-Gruppe kann also zweierlei bedeuten: (1) Zum einen kann eine hohe G-Ratio einer schwachen Myelinisierung entsprechen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass konventionellen Nervenschienen die für den Myelinisierungsprozess wichtigen SZ fehlen. Dadurch konnte in der KS-Gruppe möglicherweise die Ausbildung einer Myelin-Isolierung nicht in dem Maße erfolgen wie in den anderen Studiengruppen. (2) Zum anderen kann die höhere G-Ratio in der KS-Gruppe aber auch durch eine – im Vergleich zu den anderen Studiengruppen – bereits weiter fortgeschrittene Myelinisierung erklärt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass leere Nervenschienen zu einer sehr schnellen Nervenregeneration führen. Dies wird dadurch erklärt, dass sich

[2] Die G-Ratio ist der Verhältniswert aus absolutem Axon- zu absolutem Faserdurchmesser. Der absolute Durchmesser entspricht dem Produkt aus mittlerem Durchmesser und Faserzahl. Die Faserzahl kürzt sich folglich mathematisch aus dem Bruch der beiden Durchmesser heraus.

auswachsende NF im Schienenlumen frei und ungehindert orientieren können. Im Gegensatz dazu mussten die NF sowohl in der AG-, als auch in der MDM-Gruppe durch ein dichtes Basallamina-Netzwerk wachsen, wodurch die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration möglicherweise gebremst wurde. Sowohl im Autograft, als auch in den muskelgefüllten Schienen war die G-Ratio im Vergleich zur Kontrollseite vermindert. Auch MEEK *et al.* (2001a) beobachteten noch nach zwölf Wochen nach Überbrückung von 15 mm Defekten mit Hilfe von muskelgefüllten dünnwandigen Laktatpolymer-Nervenschienen kleinere G-Ratios im Vergleich zur Kontrollseite. Dieser zweite Erklärungsansatz wird durch die Beobachtung zusätzlich gestützt, dass in distal der Röhre gelegenen Nervenabschnitten in allen Gruppen kleinere G-Ratios beobachtet wurden.

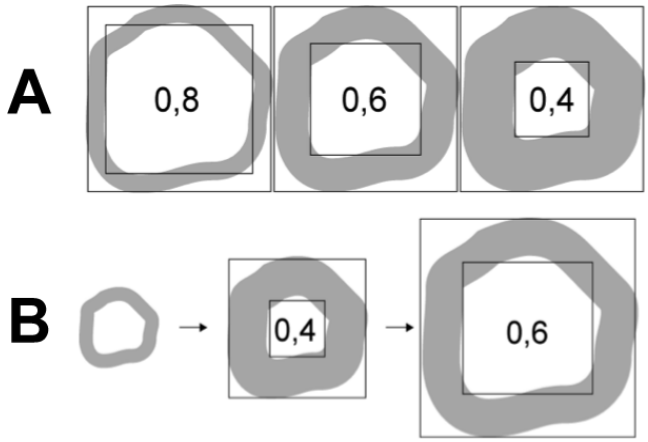

Abb. 4-2: Schematische Darstellung der G-Ratio
(A) Die G-Ratio entspricht dem Quotienten aus Axondurchmesser und Faserdurchmesser. Eine dünne relative Myelinschicht entspricht einer hohen G-Ratio (>0,6), während eine dicke relative Myelinschicht einer niedrigen G-Ratio (<0,6) entspricht; (B) Während der Regeneration steigt zunächst der Faserdurchmesser an, wodurch die Myelindicke initial im Vergleich zum Axon vergrößert ist (niedrige G-Ratio). Im weiteren Verlauf wächst das Axon, wodurch sich die Myelindicke im Verhältnis zum Axondurchmesser stufenweise reduziert (Anstieg der G-Ratio).

Für die AG- und MDM-Gruppe würde dies bedeuten, dass die Axonreifung in diesen Gruppen noch nicht abgeschlossen ist, und möglicherweise mit einer weiteren Verbesserung der saltatorischen Reizleitung nach einer längeren Beobachtungszeit gerechnet werden kann.

Schlussfolgerungen aus der morphologischen und morphometrischen Analyse

Die strukturelle Untersuchung zeigt ein eindeutiges Ergebnis. Die Überlegenheit des Autografts bei der Überbrückung des großen Defekts zeigt sich bereits in der ultrastrukturellen Zusammensetzung der regenerierten Nerven. Die quantitativen Messungen der Faserzahl und Flächen unterstützen diesen Befund. Vermutlich infolge mangelnder Schwann-Zellen-Migration, Vaskularisierung und dem Fehlen einer Leitstruktur innerhalb der matrixfreien Kollagenschienen führten diese nur zu einer unvollständigen Regeneration. Damit bestätigen wir die Annahme anderer Autoren (BERGER *et al.*, 2007a; LUNDBORG *et al.*, 1982; MEEK *et al.*, 2003; SINIS *et al.*, 2007), dass oberhalb der für dieses Tiermodell kritischen Defektlänge eine suffiziente Regeneration nicht zu erwarten ist. Die schlechteste Regeneration zeigte sich

allerdings in den muskelgefüllten Schienen, in denen nur wenige hundert NF innerhalb des Interponats gefunden werden konnten. Da innerhalb der muskulären Matrix nahezu keine NF aufgefunden wurden, ist davon auszugehen, dass die eingebrachte Muskulatur eine mechanische Obstruktion darstellte oder Detergensrückstände eine regenerationshemmende Wirkung ausgeübt hatten.

Eine aktuelle Studie wurde von ALLUIN *et al.* (2009) publiziert. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die funktionelle Wiederherstellung nach Rekonstruktion von 1 cm Peroneusdefekten in der Ratte mit Kollagen (Typ I und III-Kollagen aus Schweinehaut) gefüllt mit denaturierter Muskulatur (Gefrier-Auftau-Prozesse mit Flüssigstickstoff). Im Gegensatz zu leeren Kollagenschienen und Autograft zeigte sich nach Verwendung muskelgefüllter Schienen nur eine unvollständige funktionelle Wiederherstellung, sowie eine stärker ausgeprägte Muskelatrophie und ein höherer Verlust an NF zwischen proximalem und distalem Stumpf. In ihrer Diskussion machen die Autoren eine Fehlorientierung der Basallaminae für die schlechten Ergebnisse in dieser Gruppe verantwortlich, die eine obstruktive Rolle bei der Nervenregeneration gespielt haben soll. Die Bedeutung eines hindernisfreien Regenerationswegs wurde auch durch histologische und elektrophysiologische Untersuchungen regenerierender Nerven durch unterschiedlich orientierte Muskelmatrizen bestätigt (MEEK *et al.*, 2004). Und GLASBY et al. (1986a) stellten fest, dass die Anzahl der Fasern innerhalb von Muskeltransplantaten signifikant niedriger waren, wenn die Transplantate so platziert waren, dass die Muskelfasern im rechten Winkel zu den Nervenfaszikeln orientiert waren. Füllstrukturen aus exogener Matrix müssen also innerhalb einer Nervenschiene mit Vorsicht eingesetzt werden. Sie können die Migration von Zellen durch die engen Kanäle der 3D-Struktur behindern. Wenn die Kanäle nicht weit genug sind (LABRADOR *et al.*, 1995) oder die Orientierung der inneren Strukturen nicht longitudinal angeordnet ist (ALLUIN *et al.*, 2009; GLASBY *et al.*, 1986a), kann das die axonale Immigration beeinträchtigen – zumindest so lange, bis die dichten Strukturen abgebaut sind. Zudem kann die exogene Matrix den Prozess der normalen Matrixformation behindern (z.i. MEEK *et al.*, 2001a).

Wichtiger als eine hohe Menge an regenerierenden Fasern sind allerdings die physiologischen Qualitäten der Fasern, sowie eine hohe Präzision bei der Reinnervation der Zielregionen. Hier zeigte sich in der MDM-Gruppe ein gewisser Vorteil mit größeren Faserdurchmessern (nicht signifikant) und dickerer Myelinscheide (signifikant) als in den anderen Studiengruppen; zwei Faktoren die für die elektrophysiologische Reizleitung wichtig sind. Möglicherweise führten die in der Muskelmatrix enthaltenen myelinisierungsfördernden Moleküle wie Laminin in dieser Gruppe zu einer Unterstützung der Faserentwicklung. Da nur sehr wenige NF in den Interponaten gezählt wurden, konnte u.U. jedoch auch der Aufwand, den der Nerv normalerweise für das Aufzweigen vieler kleiner Axonsprossen aufwendet, hier für die Unterstützung weniger NF aufgewendet werden, die erfolgreich Kontakt mit dem distalen Stumpf

gefunden hatten und so einen Selektionsvorteil genossen. Während die Axonreifung in der KS-Gruppe bereits abgeschlossen war, ist in der AG- und MDM-Gruppe noch mit einer weiteren Reifung und möglicherweise einer weiteren Verbesserung der Ergebnisse zu rechnen.

4.2.3 Beurteilung der Reinnervation der Zielmuskulatur

Der zweite Schritt der Nervenregeneration beinhaltet die Wiederherstellung synaptischer Verbindungen zwischen Nerv und Zielmuskulatur, die dann zu einer Rückkehr der Muskelfunktion führen kann. Dabei erscheinen die Muskelkontraktionen häufig unkoordiniert und treten zum falschen Zeitpunkt auf, wenn Fehlinnervationen stattgefunden haben (Gramsbergen *et al.*, 2000). Eine Denervierung von drei Monaten führt zu einer faserigen Durchsetzung der Muskulatur (Kobayashi *et al.*, 1997), wobei bereits nach kürzerer Zeit eine erniedrigte Kontraktionskraft beobachtet werden kann (Kalliainen *et al.*, 2002). Bereits nach einer Verzögerung der Reinnervation von einem Monat kann die Muskelmasse und damit verbunden die Muskelfunktion nicht mehr vollständig hergestellt werden (Kobayashi *et al.*, 1997). Zur Beurteilung der Reinnervation der Zielmuskulatur war zunächst interessant, ob überhaupt NF bis zur Zielmuskulatur vorgewachsen waren. Dies war in unserer Studie in allen Tieren der AG-Gruppe, jedoch nur in der Hälfte der Tiere in der KS-Gruppe, sowie in knapp 40 % der Tiere in der MDM-Gruppe der Fall. Auch wenn kleine myelinisierte und unmyelinisierte NF nicht in der Statistik berücksichtigt sind, zeigt sich hier bereits eine deutliche Überlegenheit des Autografts. Die Erfolgsrate kann jedoch keine Aussage über ein erfolgreiches Zustandekommen einer synaptischen Verbindung, die Qualität der Reinnervation oder den trophischen Zustand der Muskulatur geben. Aus diesen Gründen wurde zusätzlich die Muskulatur selbst morphologisch, morphometrisch und elektrophysiologisch untersucht.

Muskelvolumen und Faserquerschnittsfläche

Nach Euthanasie lassen sich Nassgewicht und Volumen des M. gastrocnemius und soleus bestimmen und mit Werten der Gegenseite vergleichen (Malushte *et al.*, 2004; Varejao *et al.*, 2004a; 2004b). Diese beiden Sprunggelenks-Plantarflektoren werden vom hinteren tibialen Ast des NI innerviert. Die Folgen der Denervierung in Form einer generalisierten Muskelatrophie treten frühzeitig auf (Malushte *et al.*, 2004), die Muskulatur erholt sich allerdings nur relativ langsam, wobei der Grad der stattfindenden Reinnervation widergespiegelt wird (z.i. Varejao *et al.*, 2004b). Nach fünf Wochen zeigt sich auf der kontralateralen Seite eine maximale kompensatorische Hypertrophie (Wessig *et al.*, 2004).

Wir beobachteten bei allen Tieren eine Muskelatrophie unterschiedlicher Ausprägung auf der operierten Seite, begleitet von einer ausgeprägten kompensatorischen Hypertrophie der Gegenseite. In allen Gruppen waren die Muskelvolumina nach acht Wochen signifikant erniedrigt, wobei der Verlust an Muskelmasse jedoch in der Autograftgruppe (62 %) signifikant weniger stark ausgeprägt war als in den Schienengruppen (KS: 79 %; MDM: 75 %). Modifizierte

Kollagenschienen unterschieden sich nicht signifikant von matrixfreien Schienen. Bei der Beurteilung von Muskelvolumina nach Nerventrauma ist zu beachten, dass Vakatfettwucherung und fibröses Ersatzgewebe ein höheres Muskelgewicht bzw. -volumen vortäuschen können (KANAYA *et al.*, 1996; VAREJAO *et al.*, 2003a; 2004b) und sich die Muskulatur auch durch abberante „cross"-Innervation aufbauen kann (KANAYA *et al.*, 1996). Um eine exaktere Aussage über die Regeneration der Zielmuskulatur geben zu können, die nicht durch Einlagerungen von Ersatzgewebe beeinträchtigt wird, wurde die Muskulatur zusätzlich morphologisch und morphometrisch untersucht. Dabei zeigte sich in beiden Schienengruppen eine fortgeschrittene Denervierungsatrophie. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der AG-Gruppe, mit Ausnahme einer geringeren Kaliberdicke der Muskelfasern, ein völlig normaler Aufbau der Muskelstruktur. Diese Beobachtungen und die Ergebnisse der Volumenbestimmung wurden durch semi-automatische Messungen der Muskelfaserquerschnittsflächen bestätigt. Die von uns gemessenen mittleren Muskelfaserflächern auf der Gegenseite waren mit Beobachtungen anderer Autoren vergleichbar (WESSIG et al., 2004). Messungen auf der operierten Seite bestätigen die Ergebnisse der Muskelvolumenbestimmung, wobei das unterschiedliche Ausmaß der Atrophie zwischen AG (60 % Atrophie) und Schienengruppen (KS: 89 %; MDM: 87 %) hier noch deutlicher wurde, was vermutlich auf den höheren Ersatzgewebsanteil in den Schienengruppen zurückzuführen ist. Auch bei dieser Untersuchung war der Unterschied zwischen den Schienengruppen nicht statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Untersuchung der Muskulatur bekräftigen die Ergebnisse der strukturellen Analyse der Nervensegmente. Dies spiegelt sich auch statistisch in der Korrelationsanalyse wider. Hier zeigt sich eine enge Korrelation der Muskelparameter (Muskelvolumen, Querschnittsfläche) mit morphometrischen Messungen des Nervs (Gesamtfaserzahl, Gesamtflächen); eine Beobachtung, die auch KANAYA *et al.* (1996) machten. WESSIG *et al.* (2004) hatten bereits eine Korrelation zwischen Muskelfaserfläche und MRT-vermessenem Muskelumfang festgestellt. Wir beobachteten eine hochsignifikante Korrelation zwischen Muskelvolumen und Muskelfaserquerschnittsfläche (ρ=0,723, p<0,001).

Bei der Vermessung der Muskelfaserquerschnittsfläche handelt es sich um ein kaum verwendetes, aber aussagekräftiges Verfahren, das sich in unserer Studie bei der quantitativen strukturellen Beurteilung der Zielmuskulatur als äußerst nützlich, unkompliziert und schnell erwies. Da nur die Muskelfasern selbst betrachtet werden, ist die Methode im Vergleich zu konventionellen Methoden, die den gesamten Muskel beurteilen (Umfangs-, Volumen-, Gewichtsmessungen), weniger fehleranfällig. Durch geringfügige Modifikationen beim Vermessen der Muskelpräparate lassen sich auf einfache Weise zusätzliche Parameter wie extrazelluläre Anteile und Anzahl der Gefäße bestimmen (WESSIG *et al.*, 2004), wodurch quantitave Aussagen über wichtige trophische Aspekte der Muskulatur möglich werden.

4.2.4 Elektrophysiologische Beurteilung des Regenerationserfolgs

Als nächsten Schritt zu einer erfolgreichen Regeneration, gilt es die neuroanatomischen Strukturen und Leitungsbahnen korrekt wiederherzustellen. Dazu ist es interessanterweise nicht notwendig, diese Eigenschaften in Ihrer Gesamtheit wiederherzustellen, da Kompensationsmechanismen wie axonales „Sprouting", Vergrößerung der motorischen Einheiten (Kobayashi *et al.*, 1997), sowie zahlreiche noch unvollständig erforschte Anpassungsvorgänge (Plastizität) auf kortikaler (Cusick *et al.*, 1990; Lundborg, 2003; Sanes und Donoghue, 2000) und subkortikaler Ebene (Brushart *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2002) stattfinden. Das Ausmaß dieser zentralen Plastizität ist allerdings schwierig zu quantifizieren. Eine Abschätzung erlaubt nur der Vergleich funktioneller Ergebnisse mit morphologischen Beobachtungen von Muskel und Nerv.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften von Nerven und Muskeln können sich erst dann wieder etablieren, wenn die physiologischen und anatomischen Strukturen und Leitungsbahnen wiederhergestellt sind. Um zu überpüfen, ob eine anatomische Verbindung zwischen Nerv und den periphersten Innervationsgebieten erfolgreich hergestellt wurde, wurden Nervenquerschnitte des N. tibialis/ N. plantaris distal des Calcaneus vor Eintritt in die Mm. Interossii licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Wie sich herausstellte, war dies nicht in allen Tieren der Fall. Und obwohl der Unterschied zwischen den Gruppen nicht statistisch signifikant war, muss auch hier – gerade auch unter Berücksichtigung der elektronenmikroskopischen Befunde – von einem höheren Regenerationserfolg des autologen Nerventransplantats ausgegangen werden. Die morphometrische Analyse dieser Abschnitte wurde durch degenerative Prozesse in der Peripherie, die zu zahlreichen Fehlerkennungen führten massiv beeinträchtigt und erscheint als nicht repräsentativ. Dazu kommt, dass für eine statistische Auswertung der morphometrischen Beobachtungen die Stichprobengröße in diesen Bereichen nicht mehr ausreichend war.

Morphologie der Muskelaktionspotenziale

Elektrophysiologische Tests dienen als ergänzende Untersuchungsmethode zur Beurteilung des denervierungsbedingten muskulären Schadens und zur Beurteilung der Qualität der Reinnervation. Elektrische Signale können im Prinzip erst dann abgeleitet werden, wenn regenerierende Axone bereits bis zur Höhe der ableitenden Nadel vorgewachsen sind[3]. Abhängig von der Distanz zwischen innervierter Muskulatur und Nervenläsion kommt es 48-72h nach einer Quetschungsverletzung des Nervs zu einer abnormalen Spontanaktivität (Restrepo *et al.*, 1983) mit Fibrillationspotenzialen und positiven „sharp waves" durch hypersensitivierte Muskelfasern. Der Grund dafür liegt in der Destabilisierung der sarkolemma-

[3] Eine Ableitung kann auch über abberante Leitungswege (z.B. Muskulatur) zustande kommen, ein Sachverhalt, auf den weiter unten näher eingegangen wird.

len Membranen als Folge der Denervierung (CUDDON, 2002). In unserer Studie zeigten alle Tiere eine erhöhte Spontanaktivität im Vergleich zur Kontrolle, deren Ausmaß sich jedoch nicht zwischen den einzelnen Studiengruppen unterschied. Abnormale EMG-Muster sind ein bekanntes Phänomen nach peripherer Nervenrekonstruktion und werden auch noch 36 Wochen nach einer Nervenrekonstruktion mit Autograft oder Nervenschiene beobachtet (MEEK *et al.*, 2001b; 2003).

Nach vollständiger Denervierung löst die Reizung eines Motoneurons keine Antwort in einer motorischen Einheit aus. Sobald ein CMAP nach Stimulation des peripheren Nerven abgeleitet werden kann, bedeutet das, dass die Reinnervation der Muskulatur erfolgreich war. Die abgeleiteten CMAPs reinnervierter Muskeln weisen während der Regeneration niedrigere Amplituden (BENDSZUS *et al.*, 2004; RESTREPO *et al.*, 1983), kleinere Amplitudenflächen und verlängerte Latenzen auf (WOLTHERS *et al.*, 2005). Die Rückbildung des Potenzials ist sowohl von der Myelinisierung, als auch von zunehmendem Faserdurchmesser abhängig (KRARUP *et al.*, 1988). Während der Reinnervation der Muskulatur lässt sich häufig eine zeitliche Verbreiterung der CMAPs (vergrößerte Fläche) mit oder ohne Polyphasie beobachten. Dies spricht dafür, dass regenerierende Axone wegen unterschiedlicher Größe und Reifungsgrad mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten leiten (CUDDON, 2002). In unserer Studie ließen sich nach direkter Stimulation des NI proximal und distal des Defekts in allen Tieren polyphasische CMAPs von sehr ähnlicher Morphologie aus der Gastrocnemius-Muskulatur ableiten. Auf der Gegenseite hingegen ließen sich nach Stimulation des NI in der Mitte des Oberschenkels und des N. tibialis auf Höhe des Malleolus medialis deutlich biphasische (physiologische) CMAPs aus den Mm. interossii ableiten. Die Mm. Interossii empfehlen sich für die Aufzeichnung von CMAPs in Regenerationsstudien am NI, da keine größeren Muskeln in der unmittelbaren Umgebung dieser Muskeln die Aufzeichnung stören können. Allerdings befindet sich diese Muskelgruppe am weitesten vom regenerierenden Nerven entfernt und wird deshalb zuletzt reinnerviert. In der vorliegenden Studie war eine Ableitung aus den Mm. interossii bei keinem Tier möglich, weshalb sich elektrophysiologische Beobachtungen auf der operierten Seite auf Ableitungen aus der Gastrocnemius-Muskulatur beschränken mussten.

Beurteilung der Nervenleitgeschwindigkeit

Die Stimulation des Nervs proximal des Defekts durch elektrische Impulse (KOBAYASHI *et al.*, 1997) und Ableitung des Nervenaktionspotenzials (*engl.* compund nerve action potential, *CNAP*) distal des Defekts ermöglicht die Beurteilung funktioneller Aspekte der Regeneration. Die Amplitude des *CNAP* erlaubt Rückschlüsse auf die Anzahl funktionsfähiger Axone (CUDDON, 2002; DELLON und MACKINNON, 1989b; KANAYA *et al.*, 1996). Zudem kann der Reifegrad der Fasern beurteilt werden (DELLON und MACKINNON, 1989b; NEGREDO *et al.*, 2004),

da die *NLG* direkt mit Axondurchmesser und Myelinisierungsgrad (TERZIS *et al.*, 1976; WOLTHERS *et al.*, 2005), sowie den am schnellsten leitenden Axonen (KANAYA *et al.*, 1996) korreliert. Reizmessungen können nicht nur am Nerven selbst über die Ableitung von Nervenaktionspotenzialen (CNAPs), sondern auch am innervierten Muskel über Ableitung von Muskelaktionspotenzialen (CMAPs) erfolgen. Aus den gemessenen Latenzen der CNAPs bzw. CMAPs lässt sich die *NLG* berechnen. In der vorliegenden Studie wurden die *CMAPs* aus Aufzeichnungen aus der Gastrocnemius-Muskulatur verwendet, um die *NLG* zu berechnen, da bei keinem Tier eine Ableitung aus den M. interossii an den operierten Hinterpfoten möglich war. Im Vergleich zur Kontrollseite ließen sich in allen Tieren auf der operierten Seite signifikant verzögerte Latenzzeiten und entsprechend geringere *NLGs* beobachten. Auch wurde im Vergleich zur Kontrollseite eine wesentlich höhere Reizstärke zum Auslösen eines *CMAPs* benötigt. Aus der Klinik ist bekannt, dass nach peripheren Nervenverletzungen die *NLG* in neu gebildeten Axonsprossen wegen der geringeren Myelinisierung langsamer erfolgt und die reinnervierten Muskelfasern entsprechend später erregt werden (FU und GORDON, 1995). Auf der operierten Seite unterschieden sich Morphologie der *CMAPs* und *NLG* nicht signifikant zwischen den Gruppen, was dafür sprechen könnte, dass der Reifegrad der am schnellsten leitenden Fasern in den Studiengruppen vergleichbar war. Allerdings wurden keine Korrelationen zwischen elektrophysiologischen und morphometrischen Variablen festgestellt; Beobachtungen dieser beiden Evaluationsmethoden wiesen sogar gravierende Abweichungen auf: Die morphometrische Analyse und elektronenmikroskopische Untersuchungen von transversalen Schnitten durch die Mitte des Nerven- bzw. Schieneninterponats zeigte bei manchen Tieren Anzeichen für eine rege Reinnervation, während v.a. in den Schienengruppen bei einzelnen Tieren nur wenige hundert Nervenfasern gefunden worden. Histologische Untersuchungen weiter distal gelegener Nervenabschnitte zeigten sogar, dass bei einem Teil der Tiere gar keine (myelinisierten) Nervenfasern bis in die Muskulatur vorgewachsen waren. Im starken Kontrast dazu ließen sich jedoch bei allen Tieren vergleichbare Nervenleitgeschwindigkeiten berechnen. Auch zeigten die elektrophysiologischen Reizmessungen – trotz der offensichtlichen Überlegenheit des Autografts in morphometrischen Untersuchungen – keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0,39$). Interessanterweise stimmen die von uns berechneten Nervenleitgeschwindigkeiten gut mit anderen Methoden in anderen Regenerationsstudien am Ischiadicus der Ratte überein (CHIU *et al.*, 1988; WOLTHERS *et al.*, 2005). In zahlreichen Publikationen zeigte die *NLG* keine signifikanten Unterschiede zwischen Autograft und künstlicher Nervenschiene (FRANCEL *et al.*, 1997; 2003; HOPPEN *et al.*, 1990; MAEDA *et al.*, 1993; MEYER *et al.*, 1997; ROBINSON *et al.*, 1991), was häufig Anlass zur Folgerung war, die künstliche Schiene sei dem Autograft bei der Überbrückung peripherer Nervendefekten gleichwertig. Nicht selten

war jedoch auch der Vergleich mit einem unbehandelten Kontrollnerv nicht signifikant (FRANCEL *et al.*, 1997; 2003; HOPPEN *et al.*, 1990).

Follow-up Studie zur Determination des Ursprungs der elektrischen Aktivität

Die gravierenden Unterschiede zwischen elektrophysiologischen und morphometrischen Daten veranlassten unsere Arbeitsgruppe, eine Folgestudie zur Determination des Ursprungs der elektrischen Aktivität durchzuführen (RUPP *et al.*, 2007a). Bei sieben zusätzlichen Tieren wurde eine permanente Ischias-Exzision nach dem gleichen operativen Prinzip wie in der Hauptstudie durchgeführt. Zu unterschiedlichen postoperativen Zeitpunkten (eine Stunde bis acht Wochen) erfolgte anschließend die Beurteilung durch elektrophysiologische und histologische Untersuchungen, sowie durch retrogrades Tracing. Trotz langstreckiger Unterbrechung des NI und nachweislich vollständig fehlender Reinnervation der Gastrocnemius-Muskulatur ließen sich trotzdem CMAPs ableiten. Darüber hinaus konnten auch auf der Gegenseite polyphasische CMAPs beobachtet werden, wenn die Ableitung direkt aus dem MG erfolgt war. Die Ergebnisse der Studie legen nahe, dass diese Ableitungen höchstwahrscheinlich von der umliegenden, nicht von der Denervierung betroffenen Muskulatur durch direkte oder indirekte (durch Ausbreitung des elektrischen Signals) Stimulation generiert wurden – ein Phänomen, das als „cross-talk“ (KUIKEN *et al.*, 2003) bekannt ist. Sowohl der M. biceps femoris als auch M. semimembranosus, die beide vom N. musculocutaneus, einem weit proximalen Ast des NI (GREENE, 1935; PUIGDELLIVOL-SANCHEZ *et al.*, 2000) innerviert werden, kommen dafür in Frage.

Schlussfolgerungen aus den elektrophysiologischen Untersuchungen

Vor diesem Hintergrund sind die elektrophysiologischen Ergebnisse unserer Studie fraglich zu beurteilen. Es darf hier nicht der Fehler gemacht werden, die fehlenden signifikanten Unterschiede der elektrophysiologischen Untersuchung in unserer Studie allgemein als Indiz für eine vergleichbare Eignung der verwendeten Methoden zur funktionellen Wiederherstellung zu sehen. Sowohl die klinisch-funktionellen Tests (s.u.), als auch die morphometrische Analyse widersprechen dieser Schlussfolgerung. Hier wird die substanzielle Bedeutung des bereits propagierten multimethodologischen Ansatzes zur Evaluation peripherer Nervenregenerationsvorgänge deutlich; denn erst der Vergleich mit anderen methodischen Ansätzen kann solche Fehlerquellen aufdecken. Generell sollten Interpretationen von Aufzeichnungen des MG nach Stimulation des NI im Rattenmodell mit Skepsis betrachten werden. Selbst bei nicht erfolgter Reinnervation der Gastrocnemius-Muskulatur sind Ableitungen von Muskelaktionspotenzialen möglich, die direkt über den N. musculocutaneus oder indirekt über Ausbreitung des elektrischen Signals über die umliegende Muskulatur fortgeleitet werden können. Aus diesem Grund ist es ratsam, Obergrenzen in der Intensität des zugeführten elektrischen Signals zu setzten. Als sicherste Methode für die Ableitung von CMAPs gilt die interossäre

Fußmuskulatur, da hier keine großen Muskelgruppen mit den Aufzeichnungen interferieren können. Um aus diesem Bereich Ableitungen zu erhalten, ist allerdings eine erfolgreiche Regeneration bis in die distalsten Bereiche der Ischias-Ausläufer notwendig, was in unserer Studie jedoch nur in einem Teil der Tiere der Fall war.

4.2.5 Beurteilung des funktionellen Regenerationserfolgs

Das letztendliche Ziel der peripheren Nervenregeneration ist eine (möglichst vollständige) Wiederherstellung der verlorengegangenen Funktion. In der vorliegenden Studie wurde neben der gängigen Fußabdruckanalyse auch eine Video-Ganganalyse mit kinetischen Winkelmessungen des Sprunggelenks durchgeführt um den Einfluss der Regeneration auf die Fortbewegung zu untersuchen. Fortbewegung erfordert eine koordinierte Muskelfunktion, der ein sensorisches Signal, Beteilung des Kortex und eine motorische Antwort zu Grunde liegt (Dellon und Mackinnon, 1989b; Varejao *et al.*, 2001b; Walker *et al.*, 1994a).

Bei der Beurteilung des Regenerationserfolgs im peripheren Nervensystem spielen funktionelle Methoden eine wesentliche Rolle (de Medinaceli *et al.*, 1982; Hadlock *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000; Nichols *et al.*, 2005), da sie Aufschluss darüber geben, wie gut sich der Körper an Probleme durch nicht-selektive Reinnervation adaptieren bzw. diese Probleme kompensieren kann (Dellon und Mackinnon, 1989b). Morphologische und elektrophysiologische Veränderungen korrelieren dabei nicht notwendigerweise mit der Rückkehr der motorischen und sensorischen Funktion (Dellon und Mackinnon, 1989b), weshalb funktionelle Untersuchungen ein essentieller Bestandteil jeder Regenerationsstudie sein sollten. Zudem empfehlen viele Autoren die Durchführung mehrerer Tests zur Beurteilung der funktionellen Regeneration, um möglichst alle funktionellen Qualitäten abzudecken, da Abweichungen zwischen sensorischer und motorischer Regeneration auftreten können (Varejao *et al.*, 2004b). In der vorliegenden Studie wurden neben den aufgeführten motorischen Untersuchungen auch sensorische Tests zur Beurteilung der Nozizeption (withdrawal reflex) und Propriozeption (Hopping response, lifting response, Balancieren über Holzlatten unterschiedlicher Breite) durchgeführt, die Ergebnisse wurden jedoch bereits an anderer Stelle besprochen (Rupp, 2007).

4.2.5.1 Bewertung der Fußspannenanalyse

Einschränkungen der Funktion des NI führen zu charakteristischen Veränderungen von Fußabdrücken und Gang bei Ratten (de Medinaceli *et al.*, 1982). Die Analyse der Fußabdrücke wird als umfassende Methode zur Beurteilung der Regeneration betrachtet (Dellon und Mackinnon, 1989a; Martins *et al.*, 2006; Varejao *et al.*, 2001a; 2001b; 2004a; 2004b), da sie das komplexe Zusammenspiel zwischen sensorischem Signal, kortikaler Verarbeitung und motorischer Antwort widerspiegelt (Bervar, 2000; Kanaya *et al.*, 1996; Varejao *et al.*, 2001b). Verletzungen des NI führen zu einer Längenzunahme des Fußabdrucks und einer

Abnahme der Abspreizfähigkeit der Krallen, was sich mit Hilfe des *SFI* nicht-invasiv, objektiv (VAREJAO *et al.*, 2004b), und reproduzierbar (BROWN *et al.*, 1989) quantifizieren lässt. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass der zeitliche Verlauf der Regenerationsvorgänge durch wiederholte Messungen am gleichen Tier auf unkomplizierte Weise nachvollzogen werden kann (WALKER *et al.*, 1994b). Allerdings variiert die Länge der Fußabdrücke (*print-length*, PL) mit der Laufgeschwindigkeit der Ratte (VAREJAO *et al.*, 2001b; WALKER *et al.*, 1994b), weshalb nur Fußabdrücke von ununterbrochenen Läufen mit gleichmäßiger Geschwindigkeit verwendet werden sollten (DIJKSTRA *et al.*, 2000). Dieser Grund war ausschlaggebend für die Entwicklung eines vereinfachten, Geschwindigkeits-unabhängigen, statischen Index – dem sog. Static Sciatic Index *SSI* (BERVAR, 2000).

In unserer Studie zeigten beide Fußabdruckindizes (*SFI* und *SSI*) nur nach Verwendung autologer Nerventransplantate eine signifikante funktionelle Verbesserung nach acht Wochen. Allerdings wurde auch in der AG-Gruppe nur eine partielle Wiederherstellung der Funktion (um durchschnittlich ca. 45 %) beobachtet, und auch hier nicht in allen Tieren. Der interindividuell stark variable Regenerationserfolg in der AG-Gruppe wurde bei Betrachtung des *SSI* noch deutlicher. Während einzelne Tiere nahezu keine Anzeichen einer motorischen Reinnervierung (8,5 % Verbesserung) aufwiesen, ließen sich bei anderen Tieren Fußabdrücke messen, die nahe an den Kontrollwert reichten (76,8 % Verbesserung). Ein Versagen von Autograft-Tieren über diese Distanz wurde auch von anderen Autoren beobachtet (LIN *et al.*, 1996; MEEK *et al.*, 1999c). In der Klinik stellen unvorhersehbare, teils stark variierende Ergebnisse nach Rekonstruktion mit autologen Nerventransplantaten ein großes Problem dar (MILLESI, 1981, 2007d). In Tieren der AG-Gruppe, die eine gute Regeneration aufwiesen, zeigten sich die ersten funktionellen Verbesserungen zwischen der vierten und fünften postoperativen Woche. Ab diesem Zeitpunkt wurde auch die Überlegenheit des Autografts im Vergleich zu den Schienengruppen offensichtlich, denn weder in der KS- noch in der MDM-Gruppe zeigte sich innerhalb des Beobachtungszeitraums eine statistisch signifikante funktionelle Verbesserung. Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen nach Überbrückung vergleichbar großer Defektstrecken mit artifiziellen Nervenschienen (ANSSELIN *et al.*, 1997; DIJKSTRA *et al.*, 2000). Unsere funktionellen Ergebnisse bestätigen damit die strukturellen Untersuchungen von Nerv und Muskulatur. Auch die verbesserten Fasereigenschaften, die nach Verwendung muskelgefüllter Schienen beobachtet wurden, führten letztendlich zu keiner positiven Beeinflussung des funktionellen Ergebnisses. Im starken Kontrast zu unseren Ergebnissen beobachteten MEEK *et al.* (1999a; 1999c) nach Verwendung denaturierter autologer Muskulatur innerhalb dünnwandiger Laktatpolymerschienen zur Rekonstruktion von 15 mm Defekten bereits nach drei Wochen die ersten funktionellen Verbesserungen. Nach 12 Wochen hatte sich der SFI auf knapp 60% der ursprünglichen Nervenfunktion verbessert. Die Verwendung unterschiedlicher Nervenschienen (Kol-

lagen *vs*. Laktatpolymer) allein kann diese Diskrepanzen zwischen den Studien nicht erklären, zumal Kollagenschienen bekanntermaßen anderen polymerischen Schienen überlegen sind (WAITAYAWINYU *et al.*, 2007). Da dasselbe Denaturierungsverfahren verwendet wurde, muss davon ausgegangen werden, dass das von den Autoren beschriebene Protokoll zur Denaturierung der Muskulatur nicht dazu geeignet ist, wiederholbar gute Ergebnisse zu produzieren. Aus operativer Sicht gibt es eine zweite Überlegung, die das schlechtere funktionelle Abschneiden der MDM in unserer Studie erklären könnte. Im Gegensatz zu MEEK *et al.* entsprach der in unserer Studie überbrückte Defekt auch tatsächlich der Länge des entnommenen Nervensegments. MEEK *et al.* hingegen entfernten ein nur 12 mm Segment, ließen die Nervenenden retrahieren (15 mm) und verwendeten dann eine entsprechend längere Schiene zur Rekonstruktion. Dadurch reduzierte sich – im Vergleich zu unserer Methode – die Zugspannung, die auf die Nahtstellen wirkte. Da bereits eine geringe Spannung einen negativen Einfluss auf das Regenerationsergebnis haben kann (KRARUP *et al.*, 2002; MILLESI, 1981), wäre dies eine Erklärung für das vergleichsweise bessere funktionelle Abschneiden der muskelgefüllten Schienen bei MEEK. Für diese Erklärung spricht auch, dass die Arbeitsgruppe um MEEK keine Verbesserung des SFI in der Autograftgruppe feststellen konnte (MEEK *et al.*, 1999c). In dieser Gruppe wurde nämlich die experimentell erzeugte Lücke mit dem 12 mm-langen resezierten Nervensegment wiederhergestellt. Zwar war dadurch die zu überbrückende Distanz in dieser Gruppe im Vergleich zur MDM-Gruppe geringer, es entstand aber wegen der Retraktion der Nervenenden (und des entfernten Nervensegment selbst) im Vergleich zu den anderen Studiengruppen auch eine deutlich höhere Zugspannung auf die Nahtstellen, was möglicherweise ursächlich für das schlechtere Abschneiden des Autografts war.

4.2.5.2 Bewertung der Ergebnisse der Video-Ganganalyse

Die dynamische Fußspannenanalyse hat auch ihre Grenzen (VAREJAO *et al.*, 2001b; 2004b), insbesondere dann, wenn nur sehr wenig Regeneration stattgefunden hat (HADLOCK *et al.*, 1999), oder wenn schwerwiegende Kontrakturen (CHAMBERLAIN *et al.*, 2000) oder Automulationen aufgetreten sind (HADLOCK *et al.*, 1999), was zu unlesbaren Fußabdrücken führen kann (VAREJAO *et al.*, 2001a; 2004b; YU *et al.*, 2001). Zudem wird bei der Fußabdruckanalyse die dynamische Bewegungskomponente nicht mit untersucht. Aus diesen Gründen empfehlen viele Autoren heute die Durchführung einer Video-Ganganalyse mit kinetischer Winkelmessung zur funktionellen Beurteilung des Regenerationserfolgs (VAREJAO *et al.*, 2001a; 2004b; YU *et al.*, 2001). Während die Fußspannenanalyse vorwiegend die intrinsische Fußmuskulatur beurteilt, ermöglicht die Ganganalyse die Beurteilung der Knie- und Hüftmuskulatur. Da diese Muskelgruppen vor der intrinsischen Fußmuskulatur reinnerviert wird, lassen sich bereits zu einem früheren Zeitpunkt Aussagen über den unterschiedlichen Regenerati-

onserfolg von Studiengruppen machen. Zudem ist eine höhere Validität von Ganganalyseparametern im Vergleich zum *SFI* bei der Beurteilung der Funktion des NI bekannt (LIN *et al.*, 1996).

Beurteilung der Tibialisfunktion durch Winkelmessung in der Standphase

Direkt nach Durchtrennung des NI ist als Folge der Denervierung der Sprunggelenks-Extensoren (N. tibialis) ein Zehenspitzenstand nicht mehr möglich. Während der Standphase befindet sich das gegenüberliegende Bein in der Schwungphase und das gesamte KGW lastet auf dem operierten Bein. Durch die Beeinträchtigung der Rolle des MG in der Kontrolle der Vorwärtsbewegung des Beins kommt es durch die Belastung zum Kollaps der Tibia über den Fuß. In diesem pathologischen Stadium bleibt der flache Fuß in der Standphase in Kontakt mit dem Untergrund, und ein Anheben der Ferse am Ende der Standphase geschieht nur in Zusammenhang mit dem Anheben des gesamten Beins beim Vorwärtsschwung (VAREJAO *et al.*, 2003b). Zur Beurteilung der wiederkehrenden Extensorenfunktion wurden in der vorliegenden Studie die Sprunggelenkswinkel in der Mitte der Standphase (*ASA*) (LIN *et al.*, 1996) und in der terminalen Standphase (*ATS*) (YU *et al.*, 2001) untersucht. Der Ankle stance angle (*ASA*) wurde wegen seiner hohen Validität und Sensitivität bei der Beurteilung der funktionellen Beeinträchtigung der NI-Funktion gewählt (LIN *et al.*, 1996; VAREJAO *et al.*, 2001a). Sowohl *ATS* als auch *ASA* sind in ihrer Funktion vorwiegend von der Funktion des N. tibialis abhängig (YU *et al.*, 2001). Beide Standphasenwinkel sind beim normalen Gang sehr beständig (LIN *et al.*, 1996; YU *et al.*, 2001). Aus der Literatur sind in gesunden Ratten *ASA*-Werte von ca. 50° (bei uns 48,9 ± 2,9°), und vier Monate nach Verwendung autologer Nerventransplantate knapp 40° (bei uns 37,5 ± 3,7° nach zwei Monaten) bekannt. Tiere bei denen keine Rekonstruktion stattfand, zeigen im Vergleich dazu nach vier Monaten Winkel von etwa 20° (LIN *et al.*, 1996). Der *ATS* Winkel liegt bei ca. 100° Grad (bei uns 92,4 ± 7,4°) in normalen Ratten, und ca. 40° Grad zwölf Wochen nach vollständiger Ischiadicus-Durchtrennung (YU *et al.*, 2001). Diese Werte stimmen gut mit unseren Messungen überein. In der vorliegenden Studie ließ sich in keiner Studiengruppe eine vollständige Wiederherstellung der Funktion beobachten. So war ein Zehenspitzenstand nach acht Wochen bei keinem der Tiere möglich; eine Beobachtung, die auch von anderen Autoren und selbst noch nach vier Monaten gemacht wurde (LIN *et al.*, 1996). Die Analyse beider Standphasenwinkel zeigt aber eine signifikante Verbesserung der Extensionsfähigkeit in der Autograftgruppe, was sich mit Beobachtungen aus der Literatur deckt (KIM *et al.*, 2007). In den Schienengruppen hingegen war keine funktionelle Verbesserung feststellbar, wodurch die Ergebnisse der Fußabdruckanalyse bestätigt werden.

Der MG ist in der Standphase bekanntermaßen hoch aktiv (z.i. LIN *et al.*, 1996). In unserer Studie lag das Gastrocnemius-Volumen nach acht Wochen nur noch bei 23 % der Gegensei-

te in den Schienengruppen, und bei 37 % und Autograftgruppe. Als Folge dieser starken Atrophie des MG war es den Tieren nicht möglich ihr volles KGW in der Mitte der Standphase zu tragen und die gemessenen Sprunggelenkswinkel (*ASA* und *ATS*) waren entsprechend kleiner. Diese Beobachtungen wurden durch die Korrelationsanalyse bestätigt: Sowohl *ASA* als auch *ATS* wiesen eine hohe Korrelation mit dem Gastrocnemius-Volumen ($p=0,001$) und der Muskelfaserquerschnittsfläche der Gastrocnemius-Muskulatur ($p<0,01$) auf. Eine Korrelationen zwischen *ASA* und Gastrocnemius-Gewicht wurden auch schon von anderen Autoren beobachtet (LIN *et al.*, 1996).

Beurteilung der Peroneusfunktion durch Winkelmessung in der Schwungphase

Der Nervus peroneus profundus, ein Ast des NI innerviert den M. tibialis anterior, einen wichtigen Flexor im Sprunggelenk. Während der Fortbewegung führt die Peroneus-Aktivität in normalen Ratten in der ersten Hälfte der Schwungphase zu einer starken Abnahme des Sprunggelenkswinkels und Minimierung der Hüftflexion. In der Mitte der Schwungphase erreicht der Sprunggelenkswinkel ein Minimum. Durch den denervierungsbedingten Verlust der Sprunggelenks-Flektoren (N. peroneus) nach Durchtrennung des NI, entwickelt sich eine Fußheberschwäche in der betroffenen Extremität, deren Ausmaß mit der Zunahme des Sprunggelenkswinkels in der Mitte der Schwungphase (*AMS*) korreliert. Der *AMS* Winkel ist dabei hauptsächlich von der Peroneusfunktion abhängig (YU *et al.*, 2001).

In der Literatur wird der *AMS* normaler Tiere bei ca. 24° Grad (bei uns 27,4 ± 2,7°) und zwölf Wochen nach vollständiger Durchtrennung des NI bei ca. 45° Grad angegeben (YU *et al.*, 2001). Postoperativ war in allen Tieren eine vollständige Fußheberschwäche zu beobachten, was sich in einer deutlichen Erhöhung des *AMS* widerspiegelte (56,7 ± 11,3°). Eine Rückkehr der Peroneusfunktion mit Rückbildung der Fußheberschwäche war in keiner Gruppe innerhalb des Beobachtungszeitraums feststellbar. Während jedoch die Peroneusfunktion in der Autograftgruppe unverändert blieb, kam es in den Schienengruppen sogar zu einer signifikanten Progression der Fußheberschwäche bis zur achten Woche. Darauf hatte auch die Rekonstruktionsmethode (leere Schiene *vs.* modifizierte Schiene) keinen Einfluss. Eine progrediente Verschlechterung der Peroneusfunktion ist ein bekannter Befund nach Peroneusverletzung bei unvollständiger Regeneration (YU *et al.*, 2001). Wie die Sprunggelenkswinkel in der Standphase, korrelierte auch der *AMS* mit dem Volumen der Gastrocnemius-Muskulatur ($p=0,045$). Zwar spielt der Gastrocnemius in der Schwungphase eine untergeordnete Rolle; es ist jedoch anzunehmen, dass bei fortbestehender Denervierung des Ischiadicus in Tieren mit mangelhafter Regenerationsleistung Flektoren und Extensoren gleichermaßen atrophieren. ALLUIN *et al.* (2009) beobachteten insgesamt bessere funktionelle Ergebnisse von Autograft und leeren Kollagenschienen, was aber bereits durch die kürzere Defektlänge (10 mm) erklärt werden kann. Zudem wurden dort reine Peroneusdefekte unter-

sucht. Entsprechend der Innervation des N. peroneus beschränkte sich die Ganganalyse auf die Schwungphase, und statt des *SFI* wurde der „Peroneal function index“ *PFI* verwendet. Anders als bei uns wurden die Gelenkwinkel nicht zu festgelegten Zeitpunkten gemessen, sondern die minimalen und maximalen Gelenkwinkel, sowie die maximale Amplitude der Winkel von Knie und Sprunggelenk bestimmt. Sowohl mit dem AG, als auch mit leeren Kollagenschienen war nach zwölf Wochen eine nahezu komplette funktionelle Wiederherstellung über 10 mm möglich. Kollagenschienen zeigten zwar eine langsamere Regenerationsleistung (verspäteter Anstieg des PFI) – der Unterschied zwischen Autograft und Kollagenschiene war aber nach zwölf Wochen nicht statistisch signifikant. In Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen hingegen zeigten muskelgefüllte Kollagenschienen in allen Tests nur eine unvollständige funktionelle Wiederherstellung, was die Autoren auf eine falsche Orientierung der Muskulatur innerhalb der Schienen zurückführten.

4.3 Zusammenfassende Beurteilung

Nach wie vor sind künstliche Nervenschienen dem autologen Nerventransplantat in fast allen Studien unterlegen (Berger *et al.*, 2007a; Fansa *et al.*, 2001; Guenard *et al.*, 1992; Hadlock *et al.*, 1998). Unsere Studie macht hier keine Ausnahme: Sowohl strukturell als auch funktionell war das Autograft den anderen Rekonstruktionsmethoden überlegen. Die Verwendung leerer Kollagenschienen führte in dem verwendeten Tiermodell nur zu einer unvollständigen morphologischen und funktionellen Regeneration. Damit bestätigen wir die Beobachtungen anderer Autoren (Berger *et al.*, 2007a; Sinis *et al.*, 2007) und unterstützen die Theorie, dass Nervendefekte, die über der kritischen Defektlänge des Tiermodells liegen, nicht mehr mit konventionellen Nervenschienen rekonstruiert werden können.

Entgegen unseren Erwartungen konnte die eingebrachte exogene Matrix aus modifizierter denaturierter Muskulatur die Nervenheilung nicht zusätzlich unterstützen. Ganz im Gegensatz waren in dieser Gruppe sogar die niedrigsten Faserzahlen aller Studiengruppen zu beobachten. Und obwohl die NF in dieser Gruppe eine verbesserte Myelinisierung aufwiesen, wirkte sich dies nicht positiv auf die funktionelle Wiederherstellung aus. In der Literatur wurde immer wieder beobachtet, dass denaturierte Muskulatur nicht in allen Fällen zu einer Verbesserung der Nervenregeneration führt, und diese sogar behindern kann (Alluin *et al.*, 2009; Calder und Norris, 1993; Glasby *et al.*, 1986a; Hall und Enver, 1994; Hems und Glasby, 1992; Keilhoff *et al.*, 2005; Keynes *et al.*, 1984; Roganovic *et al.*, 2007; Whitworth *et al.*, 1995). Die Gründe hierfür sind vielfältig und von der gewählten Denaturierungsmethode abhängig: Schrumpfung und Brüchigkeit des Gewebes (Calder und Norris, 1993; Hall und Enver, 1994; Hems und Glasby, 1992), Zerstörung des Basallamina-Gerüsts oder wichtiger Proteine (Hall und Enver, 1994; Roganovic *et al.*, 2007), verstärkte Immunantwort (Whitworth *et al.*, 1995), zu schnelle Resorption (Keilhoff *et al.*, 2005),

eine falsche Orientierung der muskulären Basallamina (ALLUIN *et al.*, 2009; GLASBY *et al.*, 1986a), oder eine unvollständige Denaturierung (CALDER und NORRIS, 1993; KEYNES *et al.*, 1984). Auch in unserer Studie ist das Versagen der muskelgefüllten Schienen wahrscheinlich auf eine unzureichende Denaturierung des Muskelgewebes zurückzuführen, was zu einer Blockade des Axonwachstums geführt hatte. In unserer Studie wurde das Muskelgewebe lumenfüllend in die Nervenschienen eingebracht. Andere Autoren die Muskulatur innerhalb eines Schienen- bzw. Venengerüsts untersucht hatten machen keine Angabe wie viel Muskelgewebe genau in die Nervenschienen eingebracht wurde (GEUNA *et al.*, 2004; MEEK *et al.*, 1996, 1999a; 2001a). Die Grundüberlegung bei der Verwendung von Muskulatur zur peripheren Nervenrekonstruktion ist zwar, dass die regenerierenden Fasern in die Muskulatur einwachsen und deren Basallamina-Gerüst als Leitschiene benutzen. Wie unsere Studie zeigt, beeinträchtigt jedoch ein „zu viel" an Muskelgewebe die axonale Regeneration – zumindest in Fällen, in denen die Denaturierung der Muskulatur nicht vollständig war. Das von MEEK *et al.* (1999a) vorgeschlagene Denaturierungsverfahren können wir in Anbetracht dieser Studie nicht weiterempfehlen, da es nicht zuverlässig und reproduzierbar zu einer vollständigen Denaturierung von Muskelgewebe führt. Noch aus einem anderen Grund ist das beschriebene Verfahren in dieser Form nicht für die klinische Anwendung geeignet. So ist ein weiterer, wenn auch selten angesprochener Nachteil der meisten bisher beschriebenen Denaturierungsverfahren der hohe Zeitaufwand der für die Denaturierung notwendig ist. Wie auch bei der von uns verwendeten Methode, dauern die meisten experimentellen Verfahren mehrere Tage (KEILHOFF *et al.*, 2005; MEEK *et al.*, 1999a; MLIGILICHE *et al.*, 2001a). Das würde in der Klinik ein zweizeitiges bzw. verzögertes Vorgehen bedeuten, welches die bisherigen Erfolge von Muskeltransplantaten nicht rechtfertigen können. Eine Möglichkeit der zeitsparenden Denaturierung ist das Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff (-196°C), was aber zu technischen Schwierigkeiten (Brüchigkeit) führt. WHITWORTH *et al.* (1995) untersuchten den Einfluss von Mikrowellenerhitzung auf Skelettmuskelgewebe und folgerten, dass diese Technik eine gute Alternative sei. Weiterführende strukturelle und funktionelle Untersuchungen sind allerdings noch ausstehend.

In jüngster Zeit wird jedoch die Notwendigkeit einer Vorbehandlung von Muskelgewebe an sich in Frage gestellt (TOS *et al.*, 2007). Die Autoren verglichen Venengrafts, die mit frischer oder denaturierter Muskulatur (Gefrier-Auftau-Prozesse mit Flüssigstickstoff) gefüllt waren bei der Überbrückung von 10 mm Medianusdefekten im Rattenmodell. Dabei stellten sie mit morphologischen und biomolekularen Methoden nur nach fünf Tagen, nicht jedoch nach 30 Tagen einen Vorteil von vorbehandelter gegenüber frischer Muskulatur fest. Die Autoren resümierten aus ihren Beobachtungen, dass eine Vorbehandlung keine Voraussetzung für die Herstellung muskelgefüllter Schienen sei, und dass Techniken die Herstellung von Nervenschienen ermögliche, die erfolgreich zur Rekonstruktion peripherer Nerven eingesetzt

werden können. Allerdings basieren die Beobachtungen nicht auf quantitativen Messungen (Morphometrie) und auf funktionelle Untersuchungen wurde vollständig verzichtet. Aus diesen Gründen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich die von den Autoren beobachtete erhöhte SZ-Infiltration und Genexpression in der vorbehandelten Muskulatur in der für die Nervenregeneration wichtigen Frühphase nicht doch positiv auf die Nervenregeneration ausgewirkt hat. Vor einer breiten klinischen Anwendung gilt es also noch eine Reihe von technischen Fragen zur Anwendung und ggf. zur optimalen Vorbehandlung von Skelettmuskulatur zu klären. Ein entsprechendes Verfahren vorausgesetzt, verdient diese Methode eine Stelle im Arsenal der zur Verfügung stehenden Methoden in der peripheren Nervenchirurgie, wie experimentelle und klinische Erfolge zeigen konnten – zumindest in Situationen in denen die Anwendung eines Autografts nicht möglich oder sinnvoll erscheint. Die Vorteile von kombinierten Muskel-Schienen-Interponaten sind vielfältig: keine Notwendigkeit der Entnahme eines sensiblen Nerven, kein Hebedefekt, hohe Verfügbarkeit von Muskelgewebe, sowie die Möglichkeit der Herstellung von Interponaten in jeder beliebigen Größe. Theoretisch wäre mit Muskeltransplantaten sogar eine faszikuläre Naht möglich, um die intraneurale Topographie aufrecht zu erhalten (KEILHOFF *et al.*, 2005). Darüber hinaus bietet sich Muskelgewebe als natürliche Matrix für weitere Modifikationen durch Wachstumsfaktoren und SZ an (FANSA *et al.*, 1999a; 1999b; 2001; 2003; KEILHOFF *et al.*, 2005).

4.4 NEUE PERSPEKTIVEN DURCH MODIFIZIERTE NERVENSCHIENEN

Große Fortschritte in der Aufklärung physiologischer und biochemischer Zusammenhänge des zentralen und peripheren Nervensystems haben dazu geführt, dass die vergangene Dekade auch als „Jahrzehnt des Gehirns“ bezeichnet wird. Dennoch steht die Erforschung des Nervensystems erst am Anfang und viele der komplexen Mechanismen sind nach wie vor unvollständig verstanden. Die Ergebnisse, die heute mit Nervenschienen aus Kollagen oder anderen Biomaterialien erreicht werden, können nur ein Teilerfolg sein und werden der Komplexität peripherer Nervenregenerationsvorgänge nicht gerecht. Dennoch helfen die bisherigen Erfahrungen mit artifiziellen Schienen, zusammen mit einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der Nervenregeneration dabei, ein konkreteres Bild zu zeichnen, wie eine ideale Nervenschienen aussehen sollte.

Während der kritische Punkt bei der Überbrückung kurzer Nervendefekte (< 6-8 mm) der Therapiezeitpunkt ist, liegt das grundlegender Problem ausgedehnter Nervendefekte in der Überbrückung des Defekts selbst. Für kleine Nervendefekte sind matrixfreie Nervenschienen ausreichend und haben den Vorteil, dass das axonale Wachstum vor Erreichen des distalen Stumpfes nicht durch eine physikalische Barriere gebremst wird. In ausgedehnten Nervendefekten hingegen brauchen die Axone eine Führung und neurotrophische Unterstützung.

Eine vielversprechende Möglichkeit die periphere Nervenregeneration zu unterstützen, stellt die Applikation verschiedener Wachstumsfaktoren wie NGF, GNDF etc. dar (z.i. CHALFOUN *et al.*, 2006). Die meisten dieser Faktoren waren experimentell in der Lage das Nervenwachstum positiv zu beeinflussten, aber keiner der Faktoren ist für sich alleine ausreichend. Viele andere Faktoren wurden noch gar nicht erforscht oder müssen weiter erforscht werden. In der Zukunft müssen verschiedene Kombinationen bestimmt werden, um eine harmonische Balance zu finden. Dazu ist ein genaues Wissen über Expressionsmuster, Dosierung und Verweildauer der Wachstumsfaktoren entscheidend. Ein großer Nachteil in der Verwendung von Wachstumsfaktoren ist und bleibt deren pleiotroper Effekt auf eine Vielzahl von Zellen, also eine potenzielle Kanzerogenität. Zudem wird die Therapie mit Wachstumsfaktoren wegen der hohen biologischen Aktivität im Pico- und Nanomolarenbereich, und der kurzen biologischen Halbwertszeit (wenige Minuten bis Stunden) erschwert (GOLD, 1997). Diese Gründe erfordern eine lokale Anwendung der Faktoren; nur so kann ein adäquater therapeutischer Effekt bei nur geringer Gefahr von unerwünschten Arzneimittelwirkungen erzielt werden. Um eine lokale Ausschüttung über einen ausgedehnten Zeitraum zu gewährleisten, bietet sich die Kombination mit Nervenschienen geradezu an, z.B. durch Einbringung der Faktoren in die Röhrchenwand oder innerhalb einer in das Lumen eingebrachten Matrix. Andere Applikationsmethoden umfassen die Verwendung von osmotischen Minipumpen, Injektionsgeräten oder polymerischen Mikrospheren (z.i. PFISTER *et al.*, 2007). Jede dieser Methoden ist jedoch mit großen technischen Schwierigkeiten verbunden und alle bisher verwendeten Verfahren beschränken sich auf eine kontinuierliche Ausschüttung, ohne der unterschiedlichen Pharmakokinetik einzelner Wachstumsfaktoren Rechnung zu tragen.

Eine Möglichkeit, um viele der mit der Applikation von Wachstumsfaktoren verbundenen Probleme zu umgehen, ist die Verwendung von Schwann-Zellen. SZ spielen durch zahlreiche verschiedene Mechanismen eine wichtige Rolle in der peripheren Nervenregeneration. Diese beinhalten die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und die axonale Direktion durch ihre Basalmembran und die Synthese von Oberflächenadhäsionsmolekülen. Der große Vorteil in der Verwendung von Schwann-Zell-Transplantaten gegenüber der Verabreichung von Wachstumsfaktoren ist das Ansprechen der bioempfindlichen SZ auf lokale Umgebungsstimulanzien durch eine Sekretion einer Vielzahl verschiedener Wachstumsfaktoren. Die Anreicherung von autologen SZ in denaturiertem Skelettmuskelgewebe ist möglich (FANSA *et al.*, 1999a; 1999b; 2001; 2003; KEILHOFF *et al.*, 2005) und zeigte selbst bei der Rekonstruktion extragroßer Defekte (50 mm) in der Ratte gute Erfolge (KEILHOFF *et al.*, 2005). Studien, die sich darauf beschränkten SZ in ein Schienengerüst zu integrieren, waren jedoch nicht zu einer Lösung aller Probleme der axonalen Regeneration in der Lage (EVANS *et al.*, 2002; KEILHOFF *et al.*, 2005; LEVI *et al.*, 1994; TERENGHI, 1995) und wichtige Fragen bezüglich der Immunogenität bleiben bestehen. Der großer limitierende Nachteil der Verwendung autolo-

ger SZ ist der große Zeitaufwand (mindestens drei Wochen), der für die *ex vivo* Proliferation und Purifikation von SZ benötigt wird, um eine ausreichende Zahl überlebensfähiger Zellen zu züchten. Diese zeitaufwändige Proliferation in der Kultur könnte den therapeutischen Erfolg in Situationen, in denen eine sofortige Therapie möglich und notwendig ist, massiv beeinträchtigen. Zudem ist die *ex vivo* Proliferation von SZ ein relativ kostenaufwändiger Prozess (finanziell, infrastrukturell, personell). Davon abgesehen erfordert die Verwendung von autogenen SZ wieder die Entnahme eines sensiblen Nerven für die Kultivierung und Expansion der Zellen.

Aus diesem Grund wurden auch andere Zelltypen als alternative Quelle untersucht. Ein Beispiel ist die Verwendung genetisch veränderter Fibroblasten, die die Rolle von SZ durch Produktion von Nervenwachstumsfaktoren übernehmen können (PATRICK *et al.*, 2001). Die Verwendung solcher genetisch veränderter dermaler Fibroblasten ermöglicht eine erleichterte Gewinnung durch Hautbiopsie, kann aber auf der Gegenseite zu ausgeprägter Fibrosierung führen. Mit einer wachsenden Anwendbarkeit von Stammzellen in allen Bereichen der Medizin erschließen sich weitere Zelllinien wie mesenchymale Stammzellen, pluripotente Stammzellen und Vorläuferzellen als Alternative zu SZ. Der Vorteil bei der Verwendung solcher Zelllinien liegt darin, dass die potenzielle Differenzierung von den auswachsenden Axonen stimuliert werden könnte. Pluripotente Stammzellen können möglicherweise multiple Differenzierungswege einschlagen, die eine förderliche Umgebung für axonale Regeneration schaffen können. Menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-293) (JIMENEZ *et al.*, 2004; MCCONNELL *et al.*, 2004), mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (MSC) (CHOI *et al.*, 2005) und vor kurzem auch pluripotente Vorläuferzellen aus Fettgewebe (SANTIAGO *et al.*, 2009) wurden bereits erfolgreich experimentell eingesetzt, ohne ein erhöhtes Risiko zur Narbenbildung. Gerade mesenchymale Stammzellen lassen sich einfach durch Aspiration aus dem Knochenmark gewinnen und unterstützen die periphere Nervenregeneration, hauptsächlich durch die Expression ähnlicher Charakteristiken wie SZ (CHOI *et al.*, 2005; CUEVAS *et al.*, 2004). Obwohl die Mechanismen der Transdifferenzierung MSC und des molekularen Zusammenspiels zwischen MSC und peripheren Nerven noch lange nicht vollständig verstanden sind, werden sie in Hinblick auf ihre Plastizität und ihr Vorkommen in adulten Geweben sicher einen wichtigen Platz bei der Entwicklung neuronaler Tissue-Engineering Strategien einnehmen.

Nach wie vor ist das Autograft trotz der offensichtlichen Nachteile weiterhin das Mittel der Wahl bei der Rekonstruktion von Nervendefekten. Doch auf der Suche nach alternativen Methoden wurden bereits große Fortschritte gemacht. Diese umfassen Schienengerüste aus biologischen Verfahrenstechniken, Manipulation der Expression von Wachstumsfaktoren durch genetisches Engineering und die Induktion der Stammzell-Differenzierung. In Hinblick auf eine klinische Anwendung dieser Methoden befinden wir uns noch ganz am Anfang und

etliche Hürden müssen erst noch überwunden werden. Auch haben die unzähligen experimentellen Ansätze die durch die neuen Technologien ermöglicht werden zu einem regelrechten „Kampf um kurze Strecken“ geführt. Bei all der Euphorie darf dabei aber nicht vergessen werden, dass in der klinischen Praxis Nervendefekte von wenigen Zentimetern eine eher untergeordnete Rolle spielen da hier Autografts meist mit gutem Erfolg eingesetzt werden können. Die wirkliche klinische und wissenschaftliche Herausforderung liegt in der Plexuschirurgie und in der Rekonstruktion langstreckiger Nervendefekte, wo häufig schlichtweg nicht genügend autologes Nervenmaterial für eine Wiederherstellung der Kontinuität zur Verfügung steht. Auch im Tissue-Engineering Bereich wurden solche Defekte noch nicht erfolgreich rekonstruiert, so dass hier nach wie vor großer Forschungsbedarf besteht.

ZUSAMMENFASSUNG

Gerade bei ausgedehnten Nerventraumen mit Substanzdefekten (Plexusverletzungen) führen periphere Nervenrekonstruktionen nach wie vor zu unbefriedigenden Ergebnissen. Die Standardtherapie substanzieller Nervendefekte sind autologe Nerventransplantate (Autografts), die mikrochirurgisch zwischen die beiden Nervenenden genäht werden. Diese Methode ist jedoch mit beträchtlichen Nachteilen verbunden, wie dem Verlust der Spendernervfunktion, operativer Mehraufwand, Neuromentstehung, Begrenztheit an geeigneten Spendernerven und häufig unvollständige funktionelle Wiederherstellung. Als therapeutische Alternative kommen heute kommerzielle Nervenschienen in Betracht, deren Anwendung allerdings auf kurze Defekte kleiner Nerven beschränkt ist, da den Axonen für eine erfolgreiche Regeneration über größere Distanzen wichtige zelluläre und extrazelluläre Leitstrukturen fehlen. In der vorliegenden Studie sollte durch Vorbehandlung autologer Muskulatur eine solche Leitstruktur hergestellt werden und in Kombination mit Kollagenschienen bei der Wiederherstellung größerer Nervendefekte im Rattenmodell untersucht werden. Dazu erfolgte in 24 Lewis Ratten die operative Entfernung eines 14 mm langen N. ischiadicus Segments mit sofortiger Rekonstruktion durch eine der folgenden Methoden (n=8): (1) Autograft; (2) matrixfreie Kollagenschiene; (3) Kollagenschiene gefüllt mit modifizierter denaturierter autologer Muskulatur. Die funktionelle Wiederherstellung wurde postoperativ kontinuierlich mit Hilfe von Fußabdruck- und Videoganganalyse überwacht. Nach acht Wochen schlossen sich elektrophysiologische, sowie qualitative und quantitative strukturelle Untersuchung des Nervs auf verschiedenen Querschnittshöhen und der Zielmuskulatur an. Wie erwartet zeigten matrixfreie Kollagenschienen in diesem Tiermodell über die große Defektlänge eine schwache Regenerationsleistung mit unvollständiger funtioneller Wiederherstellung. Mit einer signifikant höheren Zahl regenerierter Axone, geringerer Muskelatrophie und normalerem Gangbild war das Autograft funktionell und strukturell beiden Schienengruppen überlegen. Muskelgefüllte Schienen wiesen überlegene Faserqualitäten (Fasergröße, Myelindicke) im Vergleich zu den anderen Studiengruppen auf, was möglicherweise auf den myelinisierungsfördernden Effekt von muskulärem Laminin zurückzuführen ist. Im Vergleich zu matrixfreien Schienen brachte dies funktionell allerdings keinen Vorteil. Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, ist diese Beobachtung vermutlich auf eine inkomplette Denaturierung der eingebrachten Muskulatur zurückzuführen, die zu einer mechanischen Obstruktion der axonalen Regeneration geführt hatte. Elektrophysiologische Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen feststellen. Da die Leitgeschwindigkeit durch Ableitungen aus dem M. Gastrocnemius berechnet wurde, ist diese Aussage, nach neueren Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe, allerdings kritisch zu beurteilen, da abberante Signalleitungen zu falsch-positiven Messungen führen können. Die gegenwärtig zur

Verfügung stehenden Denaturierungsverfahren werden vor dem Hintergrund dieser Studie kritisch diskutiert, da sie zu einer Beeinträchtigung der Regeneration führen können. Ein optimiertes Verfahren vorausgesetzt sind jedoch weitere Verbesserungen mit modifizierten Schienen zu erwarten. Neue Einblicke in die komplexen molekularen Zusammenhänge des Nervensystems und Fortschritte im Bereich des Tissue- und Genetic-Engineering eröffnen heute unzählige vielversprechende experimentelle Ansätze. Dieses Wissen gilt es weiterhin für die Entwicklung von Methoden einzusetzen, die gerade bei der Therapie ausgedehnter Nervenverletzungen noch erfolgreich sind.

Schlagwörter: Periphere Nervenregeneration · Kollagennervenschienen · Denaturierte autologe Muskulatur · Extrazelluläre Matrix · Tissue Engineering · Nervus Ischiadicus · Rattenmodell

SUMMARY

Peripheral nerve reconstruction is often associated with poor results, especially in case of excessive nerve trauma. The gold standard for bridging nerve lesions is the autologous nerve graft. This method, however, is beset with numerous drawbacks, such as loss of donor nerve function, additional operation time, neuroma formation, scarcity of suitable donor nerve material and often incomplete functional recovery. Today, artificial nerve conduits can be used as an alternative – but only for small nerve gaps since conventional conduits lack important cellular and extracellular guidance. In this study, a temporary guidance structure was provided by modifying autologous muscle tissue and combining it with a conventional collagen conduit. To evaluate the *in vivo* regenerative potential of such a tube, 14 mm sciatic nerve defects were surgically created in 24 Lewis rats and immediately reconstructed using one of the following methods: autograft; conventional bovine type I collagen tube and collagen tube filled with autologous denatured muscle tissue. Functional regeneration was continuously evaluated using footprint- and video gait analysis. After eight weeks, evaluation was complemented by electrophysiology, as well as qualitative and quantitative structural assessment of the nerve at different cross-sectional levels and the target muscle. As was expected, empty collagen tubes showed an incomplete nerve regeneration accross the large nerve gap in this animal model. Structurally and functionally, the autograft was superior to the other methods, with higher axon counts, a more normal gait pattern and less severe muscle atrophy. Potentially due to the myelin-producing effect of muscular laminin, significantly improved nerve fiber qualities were observed inside muscle-filled tubes. These qualities did, however, not help to improve functional recovery above the level of emtpy tubes. Based on structural and ultrastructural observations of the muscle tissue *in vivo*, we have to assume that an incomplete denaturation constituted a mechanical barrier for axonal outgrowth. Electrophysiological assessment failed to show a significant difference between the study groups, but recordings may have been impaired by abberant electrical signals recorded from the gastrocnemic muscle. In view of our findings, current denaturation processes are critically discussed since these methods can interfere with natural regeneration. An optimized denaturation process provided, improved functional recovery can be anticipated. In the future, new insights in the complex molecular pathways of the nervous system and proceedings in tissue- and genetic-engineering must be used to create more sophisticated conduits that have the potential to reconstruct excessive nerve damages.

Keywords: peripheral nerve regeneration · collagen conduits · modified denatured autologous muscle tissue · extracellular matrix · tissue engineering · rat sciatic nerve

LITERATURVERZEICHNIS

AEBISCHER, P., V. GUENARD, S. R. WINN, R. F. VALENTINI und P. M. GALLETTI (1988). "Blind-ended semipermeable guidance channels support peripheral nerve regeneration in the absence of a distal nerve stump." Brain Res **454**(1-2): 179-187.

AGUAYO, A. J., J. EPPS, L. CHARRON und G. M. BRAY (1976). "Multipotentiality of Schwann cells in cross-anastomosed and grafted myelinated and unmyelinated nerves: quantitative microscopy and radioautography." Brain Res **104**(1): 1-20.

AITKEN, J. T. und P. K. THOMAS (1962). "Retrograde changes in fibre size following nerve section." J Anat **96**: 121-129.

AL-ADAWI, S., G. S. DAWE, A. BONNER, J. D. STEPHENSON und M. ZAREI (2002). "Central noradrenergic blockade prevents autotomy in rat: implication for pharmacological prevention of postdenervation pain syndrome." Brain Res Bull **57**(5): 581-586.

ALBERT, E. (1885). "Einige Operationen am Nerven." Wien Med Press **26**: 1285.

ALLUIN, O., C. WITTMANN, T. MARQUESTE, J. F. CHABAS, S. GARCIA, M. N. LAVAUT, D. GUINARD, F. FERON und P. DECHERCHI (2009). "Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide." Biomaterials **30**(3): 363-373.

ALMQUIST, E. E., O. A. SMITH und L. FRY (1983). "Nerve conduction velocity, microscopic, and electron microscopy studies comparing repaired adult and baby monkey median nerves." J Hand Surg [Am] **8**(4): 406-410.

ANAND, P., G. TERENGHI, R. BIRCH, A. WELLMER, J. M. CEDARBAUM, R. M. LINDSAY, R. E. WILLIAMS-CHESTNUT und D. V. SINICROPI (1997). "Endogenous NGF and CNTF levels in human peripheral nerve injury." Neuroreport **8**(8): 1935-1938.

ANDERSON, P. N. und M. TURMAINE (1986). "Axonal regeneration through arterial grafts." J Anat **147**: 73-82.

ANSSELIN, A. D., T. FINK und D. F. DAVEY (1997). "Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells." Neuropathol Appl Neurobiol **23**(5): 387-398.

ARCHIBALD, S. J., C. KRARUP, J. SHEFNER, S. T. LI und R. D. MADISON (1991). "A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates." J Comp Neurol **306**(4): 685-696.

ARCHIBALD, S. J., J. SHEFNER, C. KRARUP und R. D. MADISON (1995). "Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 4109-4123.

AUER, R. N. (1994). "Automated nerve fibre size and myelin sheath measurement using microcomputer-based digital image analysis: theory, method and results." J Neurosci Methods **51**(2): 229-238.

AYHAN, S., R. YAVUZER, O. LATIFOGLU und K. ATABAY (2000). "Use of the turnover epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps." J Reconstr Microsurg **16**(5): 371-378.

BAIN, J. R., S. E. MACKINNON und D. A. HUNTER (1989). "Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat." Plast Reconstr Surg **83**(1): 129-138.

BARDE, Y. A. (1990). "The nerve growth factor family." Prog Growth Factor Res **2**(4): 237-248.

BARON-VAN EVERCOOREN, A., H. K. KLEINMAN, S. OHNO, P. MARANGOS, J. P. SCHWARTZ und M. E. DUBOIS-DALCQ (1982). "Nerve growth factor, laminin, and fibronectin promote neurite growth in human fetal sensory ganglia cultures." J Neurosci Res **8**(2-3): 179-193.

BATTISTON, B., P. TOS, L. G. CONFORTI und S. GEUNA (2007). "Alternative techniques for peripheral nerve repair: conduits and end-to-side neurorrhaphy." Acta Neurochir Suppl **100**: 43-50.

BATTISTON, B., P. TOS, T. R. CUSHWAY und S. GEUNA (2000a). "Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results." Microsurgery **20**(1): 32-36.

BATTISTON, B., P. TOS, S. GEUNA, M. G. GIACOBINI-ROBECCHI und R. GUGLIELMONE (2000b). "Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. II. Morphological analysis of regeneration." Microsurgery **20**(1): 37-41.

BEAR, R. S. und F. O. SCHMITT (1937). "Optical properties of axon sheaths of crustacean nerves." J Cell Comp Physiol **9**: 275-288.

BECK, K., I. HUNTER und J. ENGEL (1990). "Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein." FASEB J **4**(2): 148-160.

BELKAS, J. S., M. S. SHOICHET und R. MIDHA (2004). "Peripheral nerve regeneration through guidance tubes." Neurol Res **26**(2): 151-160.

BELLAMKONDA, R. V. (2006). "Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels, scaffolds and anisotropy." Biomaterials **27**(19): 3515-3518.

BENDSZUS, M., C. WESSIG, L. SOLYMOSI, K. REINERS und M. KOLTZENBURG (2004). "MRI of peripheral nerve degeneration and regeneration: correlation with electrophysiology and histology." Exp Neurol **188**(1): 171-177.
BERGER, A., R. HIERNER, J. LOHMEYER, Z. SHEN und G. F. WALTER (2007a). "The "bioartificial living nerve graft"." Acta Neurochir Suppl **100**: 65-67.
BERGER, A., R. HIERNER und G. F. WALTER (2007b). "The allogenic nerve graft." Acta Neurochir Suppl **100**: 39-41.
BERTELLI, J. A., M. TALEB, J. C. MIRA und M. F. GHIZONI (2005). "The course of aberrant reinnervation following nerve repair with fresh or denatured muscle autografts." J Peripher Nerv Syst **10**(4): 359-368.
BERVAR, M. (2000). "Video analysis of standing--an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve." J Neurosci Methods **102**(2): 109-116.
BORMANN, P., V. M. ZUMSTEG, L. W. ROTH und E. REINHARD (1998). "Target contact regulates GAP-43 and alpha-tubulin mRNA levels in regenerating retinal ganglion cells." J Neurosci Res **52**(4): 405-419.
BOTTNER, M., K. KRIEGLSTEIN und K. UNSICKER (2000). "The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions." J Neurochem **75**(6): 2227-2240.
BOZYCZKO, D. und A. F. HORWITZ (1986). "The participation of a putative cell surface receptor for laminin and fibronectin in peripheral neurite extension." J Neurosci **6**(5): 1241-1251.
BROWN, C. J., S. E. MACKINNON, P. J. EVANS, J. R. BAIN, A. P. MAKINO, D. A. HUNTER und G. M. HARE (1989). "Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index." Microsurgery **10**(3): 226-235.
BRUNELLI, G. A., B. BATTISTON, A. VIGASIO, G. BRUNELLI und D. MAROCOLO (1993). "Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits." Microsurgery **14**(4): 247-251.
BRUSHART, T. M., P. N. HOFFMAN, R. M. ROYALL, B. B. MURINSON, C. WITZEL und T. GORDON (2002). "Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron." J Neurosci **22**(15): 6631-6638.
BRUSHART, T. M., R. JARI, V. VERGE, C. ROHDE und T. GORDON (2005). "Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration." Exp Neurol **194**(1): 221-229.
BRYAN, D. J., A. H. HOLWAY, K. K. WANG, A. E. SILVA, D. J. TRANTOLO, D. WISE und I. C. SUMMERHAYES (2000). "Influence of glial growth factor and Schwann cells in a bioresorbable guidance channel on peripheral nerve regeneration." Tissue Eng **6**(2): 129-138.
BRYAN, D. J., R. A. MILLER, P. D. COSTAS, K. K. WANG und B. R. SECKEL (1993). "Immunocytochemistry of skeletal muscle basal lamina grafts in nerve regeneration." Plast Reconstr Surg **92**(5): 927-940.
BRYAN, D. J., K. K. WANG und D. P. CHAKALIS-HALEY (1996). "Effect of Schwann cells in the enhancement of peripheral-nerve regeneration." J Reconstr Microsurg **12**(7): 439-436.
BUNGE, R. P. und M. B. BUNGE (1978). "Evidence that contact with connective tissue matrix is required for normal interaction between Schwann cells and nerve fibers." J Cell Biol **78**(3): 943-950.
BUTI, M., E. VERDU, R. O. LABRADOR, J. J. VILCHES, J. FORES und X. NAVARRO (1996). "Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation." Exp Neurol **137**(1): 26-33.
BUTTE, M. J. (2001). "Neurotrophic factor structures reveal clues to evolution, binding, specificity, and receptor activation." Cell Mol Life Sci **58**(8): 1003-1013.
CAI, J., X. PENG, K. D. NELSON, R. EBERHART und G. M. SMITH (2004). "Synergistic improvements in cell and axonal migration across sciatic nerve lesion gaps using bioresorbable filaments and heregulin-beta1." J Biomed Mater Res A **69**(2): 247-258.
CALDER, J. S. und R. W. NORRIS (1993). "Repair of mixed peripheral nerves using muscle autografts: a preliminary communication." Br J Plast Surg **46**(7): 557-564.
CAMPANA, W. M., S. J. DARIN und J. S. O'BRIEN (1999). "Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase mediate IGF-I- and prosaptide-induced survival in Schwann cells." J Neurosci Res **57**(3): 332-341.
CARR, M. M., T. J. BEST, S. E. MACKINNON und P. J. EVANS (1992). "Strain differences in autotomy in rats undergoing sciatic nerve transection or repair." Ann Plast Surg **28**(6): 538-544.
CHALFOUN, C. T., G. A. WIRTH und G. R. EVANS (2006). "Tissue engineered nerve constructs: where do we stand?" J Cell Mol Med **10**(2): 309-317.
CHAMBERLAIN, L. J., I. V. YANNAS, H. P. HSU, G. STRICHARTZ und M. SPECTOR (1998). "Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft." Exp Neurol **154**(2): 315-329.

CHAMBERLAIN, L. J., I. V. YANNAS, H. P. HSU, G. R. STRICHARTZ und M. SPECTOR (2000). "Near-terminus axonal structure and function following rat sciatic nerve regeneration through a collagen-GAG matrix in a ten-millimeter gap." J Neurosci Res **60**(5): 666-677.
CHAN, J. M., M. J. STAMPFER, E. GIOVANNUCCI, P. H. GANN, J. MA, P. WILKINSON, C. H. HENNEKENS und M. POLLAK (1998). "Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study." Science **279**(5350): 563-566.
CHEN, R., L. G. COHEN und M. HALLETT (2002). "Nervous system reorganization following injury." Neuroscience **111**(4): 761-773.
CHIU, D. T., R. E. LOVELACE, L. T. YU, M. WOLFF, S. STENGEL, L. MIDDLETON, I. P. JANECKA und T. J. KRIZEK (1988). "Comparative electrophysiologic evaluation of nerve grafts and autogenous vein grafts as nerve conduits: an experimental study." J Reconstr Microsurg **4**(4): 303-309, 311-302.
CHIU, D. T. und B. STRAUCH (1990). "A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less." Plast Reconstr Surg **86**(5): 928-934.
CHOI, B. H., S. J. ZHU, B. Y. KIM, J. Y. HUH, S. H. LEE und J. H. JUNG (2005). "Transplantation of cultured bone marrow stromal cells to improve peripheral nerve regeneration." Int J Oral Maxillofac Surg **34**(5): 537-542.
CHUNASUWANKUL, R., C. AYROUT, Z. DERELI, A. GAL, M. LANZETTA und E. OWEN (2002). "Low dose discontinued FK506 treatment enhances peripheral nerve regeneration." Int Surg **87**(4): 274-278.
CLAUS, P. und C. GROTHE (2001). "Molecular cloning and developmental expression of rat fibroblast growth factor receptor 3." Histochem Cell Biol **115**(2): 147-155.
COCHRAN, W. G. (1977). Sampling techniques. New York, John Wiley & Sons.
COLIN, W. und R. B. DONOFF (1984). "Nerve regeneration through collagen tubes." J Dent Res **63**(7): 987-993.
COLMAN, O. und J. C. STOCKERT (1983). "Observations on the osmium tetroxide-p-phenylenediamine staining method for Epon semithin sections of nervous tissue." Acta Histochem **72**(1): 123-125.
COUTURIER, C. A., M. C. DAUGE, D. HENIN, J. Y. ALNOT und E. H. MASMEJEAN (2002). "Nerve repair using a composite graft of vein and denatured skeletal muscle: morphologic analysis." J Reconstr Microsurg **18**(8): 681-688.
CUDDON, P. A. (2002). "Electrophysiology in neuromuscular disease." Vet Clin North Am Small Anim Pract **32**(1): 31-62.
CUEVAS, P., F. CARCELLER, I. GARCIA-GOMEZ, M. YAN und M. DUJOVNY (2004). "Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair." Neurol Res **26**(2): 230-232.
CUSICK, C. G., J. T. WALL, J. H. WHITING, JR. und R. G. WILEY (1990). "Temporal progression of cortical reorganization following nerve injury." Brain Res **537**(1-2): 355-358.
D'ANJOU, B., Y. ALLIEU, P. CENAC und J. SANZ (1989). "[Nerve expansion]." Ann Chir Main **8**(4): 336-337.
DA-SILVA, C. F. und F. LANGONE (1989). "Addition of nerve growth factor to the interior of a tubular prosthesis increases sensory neuron regeneration in vivo." Braz J Med Biol Res **22**(6): 691-694.
DAHLIN, L. B. und G. LUNDBORG (2001). "Use of tubes in peripheral nerve repair." Neurosurg Clin N Am **12**(2): 341-352.
DANIELSEN, N., L. B. DAHLIN, Y. F. LEE und G. LUNDBORG (1983). "Axonal growth in mesothelial chambers. The role of the distal nerve segment." Scand J Plast Reconstr Surg **17**(2): 119-125.
DANIELSEN, N., H. MULLER, B. PETTMANN, L. R. WILLIAMS, G. E. DAVIS, E. ENGVALL, M. MANTHORPE und S. VARON (1988a). "Rat amnion membrane matrix as a substratum for regenerating axons from peripheral and central neurons: effects in a silicone chamber model." Brain Res **467**(1): 39-50.
DANIELSEN, N., L. R. WILLIAMS, L. B. DAHLIN, S. VARON und G. LUNDBORG (1988b). "Peripheral nerve regeneration in Gore-tex chambers." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **22**(3): 207-210.
DE BELLARD, M. E. und M. T. FILBIN (1999). "Myelin-associated glycoprotein, MAG, selectively binds several neuronal proteins." J Neurosci Res **56**(2): 213-218.
DE MEDINACELI, L. (1995). "Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions." J Neurosci Methods **58**(1-2): 29-37.
DE MEDINACELI, L., W. J. FREED und R. J. WYATT (1982). "An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks." Exp Neurol **77**(3): 634-643.
DELLON, A. L. und S. E. MACKINNON (1988). "An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap." Plast Reconstr Surg **82**(5): 849-856.
DELLON, A. L. und S. E. MACKINNON (1989a). "Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures." Microsurgery **10**(3): 220-225.
DELLON, A. L. und S. E. MACKINNON (1989b). "Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration." Ann Plast Surg **23**(3): 197-202.

DEN DUNNEN, W. F. und M. F. MEEK (2001). "Sensory nerve function and auto-mutilation after reconstruction of various gap lengths with nerve guides and autologous nerve grafts." Biomaterials **22**(10): 1171-1176.

DEN DUNNEN, W. F., M. F. MEEK, D. W. GRIJPMA, P. H. ROBINSON und J. M. SCHAKENRAAD (2000). "In vivo and in vitro degradation of poly[(50)/(50) ((85)/(15)(L)/(D))LA/epsilon-CL], and the implications for the use in nerve reconstruction." J Biomed Mater Res **51**(4): 575-585.

DEN DUNNEN, W. F., P. H. ROBINSON, R. VAN WESSEL, A. J. PENNINGS, M. B. VAN LEEUWEN und J. M. SCHAKENRAAD (1997). "Long-term evaluation of degradation and foreign-body reaction of subcutaneously implanted poly(DL-lactide-epsilon-caprolactone)." J Biomed Mater Res **36**(3): 337-346.

DEN DUNNEN, W. F., I. STOKROOS, E. H. BLAAUW, A. HOLWERDA, A. J. PENNINGS, P. H. ROBINSON und J. M. SCHAKENRAAD (1996a). "Light-microscopic and electron-microscopic evaluation of short-term nerve regeneration using a biodegradable poly(DL-lactide-epsilon-caprolacton) nerve guide." J Biomed Mater Res **31**(1): 105-115.

DEN DUNNEN, W. F., B. VAN DER LEI, P. H. ROBINSON, A. HOLWERDA, A. J. PENNINGS und J. M. SCHAKENRAAD (1995). "Biological performance of a degradable poly(lactic acid-epsilon-caprolactone) nerve guide: influence of tube dimensions." J Biomed Mater Res **29**(6): 757-766.

DEN DUNNEN, W. F., B. VAN DER LEI, J. M. SCHAKENRAAD, E. H. BLAAUW, I. STOKROOS, A. J. PENNINGS und P. H. ROBINSON (1993). "Long-term evaluation of nerve regeneration in a biodegradable nerve guide." Microsurgery **14**(8): 508-515.

DEN DUNNEN, W. F., B. VAN DER LEI, J. M. SCHAKENRAAD, I. STOKROOS, E. BLAAUW, H. BARTELS, A. J. PENNINGS und P. H. ROBINSON (1996b). "Poly(DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guides perform better than autologous nerve grafts." Microsurgery **17**(7): 348-357.

DEZAWA, M. (2000). "The interaction and adhesive mechanisms between axon and Schwann cell during central and peripheral nerve regeneration." Kaibogaku Zasshi **75**(3): 255-265.

DI BENEDETTO, G., F. LASSNER, M. RICCIO, A. PUGNALONI, M. M. TAPPA, G. BIAGINI, A. BERGER und A. BERTANI (1994). "The use of acellular autologous skeletal muscle grafts in peripheral nerve repair: a morphometrical-morphological study." Clin Mater **16**(3): 137-143.

DIJKSTRA, J. R., M. F. MEEK, P. H. ROBINSON und A. GRAMSBERGEN (2000). "Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex." J Neurosci Methods **96**(2): 89-96.

DONG, Z., A. BRENNAN, N. LIU, Y. YARDEN, G. LEFKOWITZ, R. MIRSKY und K. R. JESSEN (1995). "Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors." Neuron **15**(3): 585-596.

DORNSEIFER, U., K. MATIASEK, M. A. FICHTER, A. RUPP, J. HENKE, N. WEIDNER, L. KOVACS, W. SCHMAHL, E. BIEMER, M. NINKOVIC und N. A. PAPADOPULOS (2007). "Surgical therapy of peripheral nerve lesions: current status and new perspectives." Zentralbl Neurochir **68**(3): 101-110.

DUCKER, T. B. und G. J. HAYES (1968). "Experimental improvements in the use of Silastic cuff for peripheral nerve repair." J Neurosurg **28**(6): 582-587.

DUCKER, T. B., L. G. KEMPE und G. J. HAYES (1969). "The metabolic background for peripheral nerve surgery." J Neurosurg **30**(3): 270-280.

EPPLEY, B. L. und J. J. DELFINO (1988). "Collagen tube repair of the mandibular nerve: a preliminary investigation in the rat." J Oral Maxillofac Surg **46**(1): 41-47.

ERLANGER, J. und H. S. GASSER (1937). Electrical signs of nervous activity. Philadelphia, University of Pensylvania Press.

EVANS, G. R. (2001). "Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs." Anat Rec **263**(4): 396-404.

EVANS, G. R., K. BRANDT, S. KATZ, P. CHAUVIN, L. OTTO, M. BOGLE, B. WANG, R. K. MESZLENYI, L. LU, A. G. MIKOS und C. W. PATRICK, JR. (2002). "Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration." Biomaterials **23**(3): 841-848.

EWART, D. P., W. M. KUZON, JR., J. S. FISH und N. H. MCKEE (1989). "Nerve fibre morphometry: a comparison of techniques." J Neurosci Methods **29**(2): 143-150.

FANSA, H., T. DODIC, G. WOLF, W. SCHNEIDER und G. KEILHOFF (2003). "Tissue engineering of peripheral nerves: Epineurial grafts with application of cultured Schwann cells." Microsurgery **23**(1): 72-77.

FANSA, H. und G. KEILHOFF (2003). "[Factors influencing nerve regeneration]." Handchir Mikrochir Plast Chir **35**(2): 72-82.

FANSA, H., G. KEILHOFF, G. FORSTER, B. SEIDEL, G. WOLF und W. SCHNEIDER (1999a). "Acellular muscle with Schwann-cell implantation: an alternative biologic nerve conduit." J Reconstr Microsurg **15**(7): 531-537.

FANSA, H., G. KEILHOFF, K. PLOGMEIER, O. FRERICHS, G. WOLF und W. SCHNEIDER (1999b). "Successful implantation of Schwann cells in acellular muscles." J Reconstr Microsurg **15**(1): 61-65.
FANSA, H., G. KEILHOFF, G. WOLF, W. SCHNEIDER und B. G. GOLD (2001). "Tissue Engineering of Peripheral Nerves: A Comparison of Venous and Acellular Muscle Grafts with Cultured Schwann Cells." Plast Reconstr Surg **107**(2): 495-496.
FANSA, H., W. SCHNEIDER, G. WOLF und G. KEILHOFF (2002). "Influence of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on nerve autografts and tissue-engineered nerve grafts." Muscle Nerve **26**(1): 87-93.
FIELDS, R. D., J. M. LE BEAU, F. M. LONGO und M. H. ELLISMAN (1989). "Nerve regeneration through artificial tubular implants." Prog Neurobiol **33**(2): 87-134.
FINE, E. G., I. DECOSTERD, M. PAPALOIZOS, A. D. ZURN und P. AEBISCHER (2002). "GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap." Eur J Neurosci **15**(4): 589-601.
FORMAN, D. S., D. K. WOOD und S. DESILVA (1979). "Rate of regeneration of sensory axons in transected rat sciatic nerve repaired with epineurial sutures." J Neurol Sci **44**(1): 55-59.
FORMATTI, C. (1904). "Zur Technik der Nervennaht." Arch Klin Chir **73**: 643.
FORNARO, M., P. TOS, S. GEUNA, M. G. GIACOBINI-ROBECCHI und B. BATTISTON (2001). "Confocal imaging of Schwann-cell migration along muscle-vein combined grafts used to bridge nerve defects in the rat." Microsurgery **21**(4): 153-155.
FRANCEL, P. C., T. J. FRANCEL, S. E. MACKINNON und C. HERTL (1997). "Enhancing nerve regeneration across a silicone tube conduit by using interposed short-segment nerve grafts." J Neurosurg **87**(6): 887-892.
FRANCEL, P. C., K. S. SMITH, F. A. STEVENS, S. C. KIM, J. GOSSETT, C. GOSSETT, M. E. DAVIS, M. LENAERTS und P. TOMPKINS (2003). "Regeneration of rat sciatic nerve across a LactoSorb bioresorbable conduit with interposed short-segment nerve grafts." J Neurosurg **99**(3): 549-554.
FU, S. Y. und T. GORDON (1995). "Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 3886-3895.
FU, S. Y. und T. GORDON (1997). "The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration." Mol Neurobiol **14**(1-2): 67-116.
FUGLEHOLM, K., J. SORENSEN, H. SCHMALBRUCH und C. KRARUP (1998). "Axonal elongation through acellular nerve segments of the cat tibial nerve: importance of the near-nerve environment." Brain Res **792**(2): 309-318.
GATTUSO, J. M., M. A. GLASBY, S. E. GSCHMEISSNER und R. W. NORRIS (1989). "A comparison of immediate and delayed repair of peripheral nerves using freeze-thawed autologous skeletal muscle grafts--in the rat." Br J Plast Surg **42**(3): 306-313.
GEORGIOU, J. und M. P. CHARLTON (1999). "Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein." Glia **27**(2): 101-109.
GERSHENBAUM, M. R. und F. J. ROISEN (1980). "The effects of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on the degeneration and regeneration of crush-lesioned rat sciatic nerves." Neuroscience **5**(9): 1565-1580.
GEUNA, S., S. RAIMONDO, S. NICOLINO, E. BOUX, M. FORNARO, P. TOS, B. BATTISTON und I. PERROTEAU (2003). "Schwann-cell proliferation in muscle-vein combined conduits for bridging rat sciatic nerve defects." J Reconstr Microsurg **19**(2): 119-123; discussion 124.
GEUNA, S., P. TOS, B. BATTISTON und M. G. GIACOBINI-ROBECCHI (2004). "Bridging peripheral nerve defects with muscle-vein combined guides." Neurol Res **26**(2): 139-144.
GILLEN, C., C. KORFHAGE und H. W. MÜLLER (1997). "Gene expression in nerve regeneration." Neuroscientist **3**(2): 1123-1122.
GLASBY, M. A., A. H. DAVIES, J. M. GATTUSO und A. J. HEYWOOD (1991). "Specificity for homonymous pathways following repair of peripheral nerves with treated skeletal muscle autografts--in the primate." Br J Plast Surg **44**(2): 135-141.
GLASBY, M. A., S. GSCHMEISSNER, R. J. HITCHCOCK und C. L. HUANG (1986a). "Regeneration of the sciatic nerve in rats. The effect of muscle basement membrane." J Bone Joint Surg Br **68**(5): 829-833.
GLASBY, M. A., S. E. GSCHMEISSNER, C. L. HUANG und B. A. DE SOUZA (1986b). "Degenerated muscle grafts used for peripheral nerve repair in primates." J Hand Surg [Br] **11**(3): 347-351.
GLASBY, M. A., R. E. MOUNTAIN und J. A. MURRAY (1993). "Repair of the facial nerve using freeze-thawed muscle autografts. A surgical model in the sheep." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **119**(4): 461-465.
GLUCK, T. (1880). "Über Neuroplastik auf dem Wege der Transplantation." Arch Klin Chir **25**: 606-616.
GOLD, B. G. (1997). "FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration." Mol Neurobiol **15**(3): 285-306.

GOLD, B. G., M. ZELENY-POOLEY, P. CHATURVEDI und M. S. WANG (1998). "Oral administration of a nonimmunosuppressant FKBP-12 ligand speeds nerve regeneration." Neuroreport **9**(3): 553-558.
GORDON, T., T. M. BRUSHART, N. AMIRJANI und K. M. CHAN (2007). "The potential of electrical stimulation to promote functional recovery after peripheral nerve injury--comparisons between rats and humans." Acta Neurochir Suppl **100**: 3-11.
GRAMSBERGEN, A., I. J.-P. J und M. F. MEEK (2000). "Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervation of hindleg muscles." Exp Neurol **161**(1): 183-193.
GREENE, E. C. (1935). Anatomy of the rat. New York, Hafner Publishing Co.
GROTHE, C., K. HEESE, C. MEISINGER, K. WEWETZER, D. KUNZ, P. CATTINI und U. OTTEN (2000). "Expression of interleukin-6 and its receptor in the sciatic nerve and cultured Schwann cells: relation to 18-kD fibroblast growth factor-2." Brain Res **885**(2): 172-181.
GROTHE, C. und G. NIKKHAH (2001). "The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration." Anat Embryol (Berl) **204**(3): 171-177.
GUENARD, V., N. KLEITMAN, T. K. MORRISSEY, R. P. BUNGE und P. AEBISCHER (1992). "Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration." J Neurosci **12**(9): 3310-3320.
GULATI, A. K. (1998). "Immune response and neurotrophic factor interactions in peripheral nerve transplants." Acta Haematol **99**(3): 171-174.
GULATI, A. K., D. R. RAI und A. M. ALI (1995). "The influence of cultured Schwann cells on regeneration through acellular basal lamina grafts." Brain Res **705**(1-2): 118-124.
GUNDERSEN, R. W. (1985). "Sensory neurite growth cone guidance by substrate adsorbed nerve growth factor." J Neurosci Res **13**(1-2): 199-212.
GUTH, L. (1956). "Regeneration in the mammalian peripheral nervous system." Physiol Rev **36**(4): 441-478.
HADLOCK, T., J. ELISSEEFF, R. LANGER, J. VACANTI und M. CHENEY (1998). "A tissue-engineered conduit for peripheral nerve repair." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **124**(10): 1081-1086.
HADLOCK, T., C. SUNDBACK, D. HUNTER, M. CHENEY und J. P. VACANTI (2000). "A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration." Tissue Eng **6**(2): 119-127.
HADLOCK, T. A., R. KOKA, J. P. VACANTI und M. L. CHENEY (1999). "A comparison of assessments of functional recovery in the rat." J Peripher Nerv Syst **4**(3-4): 258-264.
HALL, S. (1997). "Axonal regeneration through acellular muscle grafts." J Anat **190 (Pt 1)**: 57-71.
HALL, S. M. und K. ENVER (1994). "Axonal regeneration through heat pretreated muscle autografts. An immunohistochemical and electron microscopic study." J Hand Surg [Br] **19**(4): 444-451.
HARPER, S., J. BILSLAND, L. YOUNG, L. BRISTOW, S. BOYCE, G. MASON, M. RIGBY, L. HEWSON, D. SMITH, R. O'DONNELL, D. O'CONNOR, R. G. HILL, D. EVANS, C. SWAIN, B. WILLIAMS und F. HEFTI (1999). "Analysis of the neurotrophic effects of GPI-1046 on neuron survival and regeneration in culture and in vivo." Neuroscience **88**(1): 257-267.
HARRIS, M. E. und S. C. TINDALL (1991). "Techniques of peripheral nerve repair." Neurosurg Clin N Am **2**(1): 93-104.
HEERSSEN, H. M. und R. A. SEGAL (2002). "Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction." Trends Neurosci **25**(3): 160-165.
HEIJKE, G. C., P. J. KLOPPER und R. P. DUTRIEUX (1993). "Vein graft conduits versus conventional suturing in peripheral nerve reconstructions." Microsurgery **14**(9): 584-588.
HEMS, T. E. und M. A. GLASBY (1992). "Comparison of different methods of repair of long peripheral nerve defects: an experimental study." Br J Plast Surg **45**(7): 497-502.
HEMS, T. E. und M. A. GLASBY (1993). "The limit of graft length in the experimental use of muscle grafts for nerve repair." J Hand Surg [Br] **18**(2): 165-170.
HENRY, E. W., T. H. CHIU, E. NYILAS, T. M. BRUSHART, P. DIKKES und R. L. SIDMAN (1985). "Nerve regeneration through biodegradable polyester tubes." Exp Neurol **90**(3): 652-676.
HEUMANN, R., S. KORSCHING, C. BANDTLOW und H. THOENEN (1987). "Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection." J Cell Biol **104**(6): 1623-1631.
HO, P. R., G. M. COAN, E. T. CHENG, C. NIELL, D. M. TARN, H. ZHOU, D. SIERRA und D. J. TERRIS (1998). "Repair with collagen tubules linked with brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor in a rat sciatic nerve injury model." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **124**(7): 761-766.
HOLLY, S. P., M. K. LARSON und L. V. PARISE (2000). "Multiple roles of integrins in cell motility." Exp Cell Res **261**(1): 69-74.

HONTANILLA, B., C. AUBA und O. GORRIA (2007). "Nerve regeneration through nerve autografts after local administration of brain-derived neurotrophic factor with osmotic pumps." Neurosurgery **61**(6): 1268-1274; discussion 1274-1265.
HOPPEN, H. J., J. W. LEENSLAG, A. J. PENNINGS, B. VAN DER LEI und P. H. ROBINSON (1990). "Two-ply biodegradable nerve guide: basic aspects of design, construction and biological performance." Biomaterials **11**(4): 286-290.
HOWARD, C. S., D. C. BLAKENEY, J. MEDIGE, O. J. MOY und C. A. PEIMER (2000). "Functional assessment in the rat by ground reaction forces." J Biomech **33**(6): 751-757.
HUDSON, T. W., G. R. EVANS und C. E. SCHMIDT (2000). "Engineering strategies for peripheral nerve repair." Orthop Clin North Am **31**(3): 485-498.
HUDSON, T. W., S. Y. LIU und C. E. SCHMIDT (2004). "Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing." Tissue Eng **10**(9-10): 1346-1358.
HUNTER, D. A., A. MORADZADEH, E. L. WHITLOCK, M. J. BRENNER, T. M. MYCKATYN, C. H. WEI, T. H. TUNG und S. E. MACKINNON (2007). "Binary imaging analysis for comprehensive quantitative histomorphometry of peripheral nerve." J Neurosci Methods **166**(1): 116-124.
HURSH, J. B. (1939). "Conduction velocity and diameter of nerve fibers." Am J Physiol **127**: 131-139.
IDE, C. (1984). "Nerve regeneration through the basal lamina scaffold of the skeletal muscle." Neurosci Res **1**: 379-391.
IDE, C. (1996). "Peripheral nerve regeneration." Neurosci Res **25**(2): 101-121.
IDE, C., K. TOHYAMA, R. YOKOTA, T. NITATORI und S. ONODERA (1983). "Schwann cell basal lamina and nerve regeneration." Brain Res **288**(1-2): 61-75.
IJKEMA-PAASSEN, J., M. F. MEEK und A. GRAMSBERGEN (2002). "Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats." Muscle Nerve **25**(6): 891-897.
IKEGUCHI, R., R. KAKINOKI, T. MATSUMOTO, T. YAMAKAWA, K. NAKAYAMA, Y. MORIMOTO, H. TSUJI, J. ISHIKAWA und T. NAKAMURA (2006). "Basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in a C- -ion-implanted silicon chamber." Brain Res **1090**(1): 51-57.
INBAL, R., M. DEVOR, O. TUCHENDLER und I. LIEBLICH (1980). "Autotomy following nerve injury: genetic factors in the development of chronic pain." Pain **9**(3): 327-337.
ISHII, D. N., G. W. GLAZNER und S. F. PU (1994). "Role of insulin-like growth factors in peripheral nerve regeneration." Pharmacol Ther **62**(1-2): 125-144.
ISHIKAWA, N., Y. SUZUKI, M. OHTA, H. CHO, S. SUZUKI, M. DEZAWA und C. IDE (2007). "Peripheral nerve regeneration through the space formed by a chitosan gel sponge." J Biomed Mater Res A **83**(1): 33-40.
ITOH, S., K. TAKAKUDA, S. ICHINOSE, M. KIKUCHI und K. SCHINOMIYA (2001). "A study of induction of nerve regeneration using bioabsorbable tubes." J Reconstr Microsurg **17**(2): 115-123.
JENO, L. und L. GEZA (1975). "A simple differential staining method for semi-thin sections of ossifying cartilage and bone tissues embedded in epoxy resin." Mikroskopie **31**(1-2): 1-4.
JIMENEZ, J. C., D. R. TYSON, S. DHAR, T. NGUYEN, Y. HAMAI, R. A. BRADSHAW und G. R. EVANS (2004). "Human embryonic kidney cells (HEK-293 cells): characterization and dose-response relationship for modulated release of nerve growth factor for nerve regeneration." Plast Reconstr Surg **113**(2): 605-610.
JOHNSON, E. O. und P. N. SOUCACOS (2008). "Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides." Injury **39 Suppl 3**: S30-36.
JOHNSON, E. O., A. B. ZOUBOS und P. N. SOUCACOS (2005). "Regeneration and repair of peripheral nerves." Injury **36 Suppl 4**: S24-29.
KALLIAINEN, L. K., S. S. JEJURIKAR, L. W. LIANG, M. G. URBANCHEK und W. M. KUZON, JR. (2002). "A specific force deficit exists in skeletal muscle after partial denervation." Muscle Nerve **25**(1): 31-38.
KANAYA, F., J. C. FIRRELL und W. C. BREIDENBACH (1996). "Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration." Plast Reconstr Surg **98**(7): 1264-1271, discussion 1272-1264.
KARNES, J., R. ROBB, P. C. O'BRIEN, E. H. LAMBERT und P. J. DYCK (1977). "Computerized image recognition for morphometry of nerve attribute of shape of sampled transverse sections of myelinated fibers which best estimates their average diameter." J Neurol Sci **34**(1): 43-51.
KATAYAMA, Y., R. MONTENEGRO, T. FREIER, R. MIDHA, J. S. BELKAS und M. S. SHOICHET (2006). "Coil-reinforced hydrogel tubes promote nerve regeneration equivalent to that of nerve autografts." Biomaterials **27**(3): 505-518.
KAWASAKI, Y., K. YOSHIMURA, K. HARII und S. PARK (2000). "Identification of myelinated motor and sensory axons in a regenerating mixed nerve." J Hand Surg [Am] **25**(1): 104-111.

KEILHOFF, G., F. PRATSCH, G. WOLF und H. FANSA (2005). "Bridging extra large defects of peripheral nerves: possibilities and limitations of alternative biological grafts from acellular muscle and Schwann cells." Tissue Eng **11**(7-8): 1004-1014.
KEMP, S. W., S. SYED, S. K. WALSH, D. W. ZOCHODNE und R. MIDHA (2009). "Collagen Nerve Conduits Promote Enhanced Axonal Regeneration, Schwann Cell Association, and Neovascularization Compared to Silicone Conduits." Tissue Eng Part A.
KEUNE, J. D., M. J. BRENNER, K. E. SCHWETYE, J. W. YU, I. K. FOX, D. A. HUNTER und S. E. MACKINNON (2006). "Temporal factors in peripheral nerve reconstruction with suture scaffolds: an experimental study in rodents." Restor Neurol Neurosci **24**(3): 181-190.
KEYNES, R. J., W. G. HOPKINS und L. H. HUANG (1984). "Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle: guidance by residual muscle fibre basement membrane." Brain Res **295**(2): 275-281.
KIM, S. M., S. K. LEE und J. H. LEE (2007). "Peripheral nerve regeneration using a three dimensionally cultured schwann cell conduit." J Craniofac Surg **18**(3): 475-488.
KIMPINSKI, K. und K. MEAROW (2001). "Neurite growth promotion by nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 in cultured adult sensory neurons: role of phosphoinositide 3-kinase and mitogen activated protein kinase." J Neurosci Res **63**(6): 486-499.
KLEINMAN, H. K., R. J. KLEBE und G. R. MARTIN (1981). "Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells." J Cell Biol **88**(3): 473-485.
KLEINMAN, H. K. und B. S. WEEKS (1989). "Laminin: structure, functions and receptors." Curr Opin Cell Biol **1**(5): 964-967.
KOBAYASHI, J., S. E. MACKINNON, O. WATANABE, D. J. BALL, X. M. GU, D. A. HUNTER und W. M. KUZON, JR. (1997). "The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model." Muscle Nerve **20**(7): 858-866.
KRARUP, C., S. J. ARCHIBALD und R. D. MADISON (2002). "Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve." Ann Neurol **51**(1): 69-81.
KRARUP, C., G. E. LOEB und G. H. PEZESHKPOUR (1988). "Conduction studies in peripheral cat nerve using implanted electrodes: II. The effects of prolonged constriction on regeneration of crushed nerve fibers." Muscle Nerve **11**(9): 933-944.
KRIEGLSTEIN, K., J. STRELAU, A. SCHOBER, A. SULLIVAN und K. UNSICKER (2002). "TGF-beta and the regulation of neuron survival and death." J Physiol Paris **96**(1-2): 25-30.
KUIKEN, T. A., M. M. LOWERY und N. S. STOYKOV (2003). "The effect of subcutaneous fat on myoelectric signal amplitude and cross-talk." Prosthet Orthot Int **27**(1): 48-54.
KUYPERS, H. G., M. BENTIVOGLIO, C. E. CATSMAN-BERREVOETS und A. T. BHAROS (1980). "Double retrograde neuronal labeling through divergent axon collaterals, using two fluorescent tracers with the same excitation wavelength which label different features of the cell." Exp Brain Res **40**(4): 383-392.
KWON, B. K., J. LIU, C. MESSERER, N. R. KOBAYASHI, J. MCGRAW, L. OSCHIPOK und W. TETZLAFF (2002). "Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3246-3251.
LABRADOR, R. O., M. BUTI und X. NAVARRO (1995). "Peripheral nerve repair: role of agarose matrix density on functional recovery." Neuroreport **6**(15): 2022-2026.
LASSNER, F., G. DI BENEDETTO, A. PUGNALONI, G. BIAGINI, A. BERTANI, G. F. WALTER und A. BERGER (1994). "[Regeneration of peripheral nerves after interposition of acellular muscle into larger defects]." Handchir Mikrochir Plast Chir **26**(5): 258-261.
LAWSON, G. M. und M. A. GLASBY (1995). "A comparison of immediate and delayed nerve repair using autologous freeze-thawed muscle grafts in a large animal model. The simple injury." J Hand Surg [Br] **20**(5): 663-700.
LEE, A. C., V. M. YU, J. B. LOWE, 3RD, M. J. BRENNER, D. A. HUNTER, S. E. MACKINNON und S. E. SAKIYAMA-ELBERT (2003). "Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration." Exp Neurol **184**(1): 295-303.
LEICHTLE, S. W., A. FICHTER, U. DORNSEIFER, A. WILSON, K. MATIASEK, A. RUPP, M. NINKOVIC, E. BIEMER, H. G. MACHENS und N. A. PAPADOPULOS (2009). Kollagenschienen zur Rekonstruktion peripherer Nerven am Tiermodell. 40. Jahrestagung der DGPRÄC - 14. Jahrestagung der VDÄPC. Hannover.
LETOURNEAU, P. C. (1975). "Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation." Dev Biol **44**(1): 92-101.
LETOURNEAU, P. C., M. L. CONDIC und D. M. SNOW (1994). "Interactions of developing neurons with the extracellular matrix." J Neurosci **14**(3 Pt 1): 915-928.

LEVI, A. D., V. GUENARD, P. AEBISCHER und R. P. BUNGE (1994). "The functional characteristics of Schwann cells cultured from human peripheral nerve after transplantation into a gap within the rat sciatic nerve." J Neurosci **14**(3 Pt 1): 1309-1319.
LEVI-MONTALCINI, R. und V. HAMBURGER (1951). "Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo." J Exp Zool **116**(2): 321-361.
LI, S. T., S. J. ARCHIBALD, C. KRARUP und R. D. MADISON (1992). "Peripheral nerve repair with collagen conduits." Clin Mater **9**(3-4): 195-200.
LILJE, O. und P. J. ARMATI (1997). "The distribution and abundance of MHC and ICAM-1 on Schwann cells in vitro." J Neuroimmunol **77**(1): 75-84.
LIN, F. M., Y. C. PAN, C. HOM, M. SABBAHI und S. SHENAQ (1996). "Ankle stance angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery after complete transection." J Reconstr Microsurg **12**(3): 173-177.
LINDHOLM, D., R. HEUMANN, M. MEYER und H. THOENEN (1987). "Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve." Nature **330**(6149): 658-659.
LIU, X. L., T. ARAI, M. SONDELL, G. LUNDBORG, M. KANJE und L. B. DAHLIN (2001). "Use of chemically extracted muscle grafts to repair extended nerve defects in rats." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **35**(4): 337-345.
LONGO, F. M., M. MANTHORPE, S. D. SKAPER, G. LUNDBORG und S. VARON (1983). "Neuronotrophic activities accumulate in vivo within silicone nerve regeneration chambers." Brain Res **261**(1): 109-116.
LUNDBORG, G. (2000). "Brain plasticity and hand surgery: an overview." J Hand Surg [Br] **25**(3): 242-252.
LUNDBORG, G. (2003). "Richard P. Bunge memorial lecture. Nerve injury and repair--a challenge to the plastic brain." J Peripher Nerv Syst **8**(4): 209-226.
LUNDBORG, G. (2004). Nerve injury and repair. Regeneration, reconstruction and cortical re-modelling. Philadelphia, Elsevier.
LUNDBORG, G., L. DAHLIN, N. DANIELSEN und Q. ZHAO (1994a). "Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration." J Reconstr Microsurg **10**(5): 345-354.
LUNDBORG, G., L. B. DAHLIN, N. DANIELSEN, R. H. GELBERMAN, F. M. LONGO, H. C. POWELL und S. VARON (1982). "Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components." Exp Neurol **76**(2): 361-375.
LUNDBORG, G. und N. DANIELSEN (1991). Injury, Degeneration and Regeneration. In: Gelberman RH (ed.) Operative Nerve Repair and Reconstruction. Philadelphia, Lippincott**:** 109-131.
LUNDBORG, G. und H. A. HANSSON (1979). "Regeneration of peripheral nerve through a preformed tissue space. Preliminary observations on the reorganization of regenerating nerve fibres and perineurium." Brain Res **178**(2-3): 573-576.
LUNDBORG, G., B. ROSEN, S. O. ABRAHAMSON, L. DAHLIN und N. DANIELSEN (1994b). "Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings." J Hand Surg [Br] **19**(3): 273-276.
LUNDBORG, G., B. ROSEN, L. DAHLIN, N. DANIELSEN und J. HOLMBERG (1997). "Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: early results from a prospective, randomized, clinical study." J Hand Surg [Am] **22**(1): 99-106.
LUNDBORG, G., B. ROSEN, L. DAHLIN, J. HOLMBERG und I. ROSEN (2004). "Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up." J Hand Surg [Br] **29**(2): 100-107.
MACKINNON, S. E. und A. L. DELLON (1988). Surgery of the peripheral nerve: nerve repair and nerve grafting. New York, Thieme.
MACKINNON, S. E. und A. L. DELLON (1990). "A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate." J Reconstr Microsurg **6**(2): 117-121.
MACKINNON, S. E., A. L. DELLON, A. R. HUDSON und D. A. HUNTER (1984a). "Chronic nerve compression--an experimental model in the rat." Ann Plast Surg **13**(2): 112-120.
MACKINNON, S. E., A. L. DELLON, A. R. HUDSON und D. A. HUNTER (1985). "Nerve regeneration through a pseudosynovial sheath in a primate model." Plast Reconstr Surg **75**(6): 833-841.
MACKINNON, S. E., V. B. DOOLABH, C. B. NOVAK und E. P. TRULOCK (2001). "Clinical outcome following nerve allograft transplantation." Plast Reconstr Surg **107**(6): 1419-1429.
MACKINNON, S. E., A. R. HUDSON, J. R. BAIN, R. E. FALK und D. A. HUNTER (1987). "The peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration in the immunosuppressed host." Plast Reconstr Surg **79**(3): 436-446.

MACKINNON, S. E., A. R. HUDSON, R. E. FALK, D. KLINE und D. HUNTER (1984b). "Peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration across pretreated nerve allografts." Neurosurgery **15**(5): 690-693.

MADISON, R., C. F. DA SILVA, P. DIKKES, T. H. CHIU und R. L. SIDMAN (1985). "Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel." Exp Neurol **88**(3): 767-772.

MADISON, R. D., S. J. ARCHIBALD und T. M. BRUSHART (1996). "Reinnervation accuracy of the rat femoral nerve by motor and sensory neurons." J Neurosci **16**(18): 5698-5703.

MADORSKY, S. J., J. E. SWETT und R. L. CRUMLEY (1998). "Motor versus sensory neuron regeneration through collagen tubules." Plast Reconstr Surg **102**(2): 430-436; discussion 437-438.

MAEDA, T., S. E. MACKINNON, T. J. BEST, P. J. EVANS, D. A. HUNTER und R. T. MIDHA (1993). "Regeneration across 'stepping-stone' nerve grafts." Brain Res **618**(2): 196-202.

MALIZOS, K. N., Z. H. DAILIANA, E. A. ANASTASIOU, I. SARMAS und P. N. SOUCACOS (1997). "Neuromas and gaps of sensory nerves of the hand: management using vein conduits." Am J Orthop **26**(7): 481-485.

MALUSHTE, T. S., J. M. KERNS, C. C. HUANG, S. SHOTT, J. SAFANDA und M. GONZALEZ (2004). "Assessment of recovery following a novel partial nerve lesion in a rat model." Muscle Nerve **30**(5): 609-617.

MAQUET, V., D. MARTIN, B. MALGRANGE, R. FRANZEN, J. SCHOENEN, G. MOONEN und R. JEROME (2000). "Peripheral nerve regeneration using bioresorbable macroporous polylactide scaffolds." J Biomed Mater Res **52**(4): 639-651.

MARTINI, R., M. SCHACHNER und T. M. BRUSHART (1994). "The L2/HNK-1 carbohydrate is preferentially expressed by previously motor axon-associated Schwann cells in reinnervated peripheral nerves." J Neurosci **14**(11 Pt 2): 7180-7191.

MARTINS, R. S., M. G. SIQUEIRA, C. F. DA SILVA und J. P. PLESE (2006). "Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair." Arq Neuropsiquiatr **64**(3B): 750-756.

MATSUMOTO, K., K. OHNISHI, T. KIYOTANI, T. SEKINE, H. UEDA, T. NAKAMURA, K. ENDO und Y. SHIMIZU (2000). "Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves." Brain Res **868**(2): 315-328.

MCALLISTER, R. M., S. E. GILBERT, J. S. CALDER und P. J. SMITH (1996). "The epidemiology and management of upper limb peripheral nerve injuries in modern practice." J Hand Surg [Br] **21**(1): 4-13.

MCCONNELL, M. P., S. DHAR, S. NARAN, T. NGUYEN, R. A. BRADSHAW und G. R. EVANS (2004). "In vivo induction and delivery of nerve growth factor, using HEK-293 cells." Tissue Eng **10**(9-10): 1492-1501.

MCGOWAN, K. A. und M. P. MARINKOVICH (2000). "Laminins and human disease." Microsc Res Tech **51**(3): 262-279.

MCGRAW, T. S., J. P. MICKLE, G. SHAW und W. J. STREIT (2002). "Axonally transported peripheral signals regulate alpha-internexin expression in regenerating motoneurons." J Neurosci **22**(12): 4955-4963.

MEEK, M. F. (1997). "Peripheral nerve regeneration and functional nerve recovery after reconstruction with a thin-walled biodegradable p(DLL-ε-CL) nerve guide." Cells and Materials **7**: 53-62.

MEEK, M. F. und J. H. COERT (2002). "Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: review of the literature." J Reconstr Microsurg **18**(2): 97-109.

MEEK, M. F., W. F. DEN DUNNEN, J. M. SCHAKENRAAD und P. H. ROBINSON (1996). "Evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a poly (DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide, filled with modified denatured muscle tissue." Microsurgery **17**(10): 555-561.

MEEK, M. F., W. F. DEN DUNNEN, J. M. SCHAKENRAAD und P. H. ROBINSON (1999a). "Evaluation of several techniques to modify denatured muscle tissue to obtain a scaffold for peripheral nerve regeneration." Biomaterials **20**(5): 401-408.

MEEK, M. F., W. F. DEN DUNNEN, J. M. SCHAKENRAAD und P. H. ROBINSON (1999b). "Long-term evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a thin-walled biodegradable poly (DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide, using walking track analysis and electrostimulation tests." Microsurgery **19**(5): 247-253.

MEEK, M. F., J. R. DIJKSTRA, W. F. DEN DUNNEN, J. IJKEMA-PAASSEN, J. M. SCHAKENRAAD, A. GRAMSBERGEN und P. H. ROBINSON (1999c). "Functional assessment of sciatic nerve reconstruction: biodegradable poly (DLLA-epsilon-CL) nerve guides versus autologous nerve grafts." Microsurgery **19**(8): 381-388.

MEEK, M. F., P. H. ROBINSON, I. STOKROOS, E. H. BLAAUW, G. KORS und W. F. DEN DUNNEN (2001a). "Electronmicroscopical evaluation of short-term nerve regeneration through a thin-walled biodegradable poly(DLLA-epsilon-CL) nerve guide filled with modified denatured muscle tissue." Biomaterials **22**(10): 1177-1185.

MEEK, M. F., J. F. VAN DER WERFF, F. KLOK, P. H. ROBINSON, J. P. NICOLAI und A. GRAMSBERGEN (2003). "Functional nerve recovery after bridging a 15 mm gap in rat sciatic nerve with a biodegradable nerve guide." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **37**(5): 258-265.

MEEK, M. F., J. F. VAN DER WERFF, J. P. NICOLAI und A. GRAMSBERGEN (2001b). "Biodegradable p(DLLA-epsilon-CL) nerve guides versus autologous nerve grafts: electromyographic and video analysis." Muscle Nerve **24**(6): 753-759.

MEEK, M. F., A. S. VAREJAO und S. GEUNA (2004). "Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: review of the literature." Tissue Eng **10**(7-8): 1027-1036.

MERLE, M., A. L. DELLON, J. N. CAMPBELL und P. S. CHANG (1989). "Complications from silicon-polymer intubulation of nerves." Microsurgery **10**(2): 130-133.

MEYER, R. S., R. A. ABRAMS, M. J. BOTTE, J. P. DAVEY und S. C. BODINE-FOWLER (1997). "Functional recovery following neurorrhaphy of the rat sciatic nerve by epineurial repair compared with tubulization." J Orthop Res **15**(5): 664-669.

MIDHA, R., C. A. MUNRO, P. D. DALTON, C. H. TATOR und M. S. SHOICHET (2003). "Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube." J Neurosurg **99**(3): 555-565.

MILLESI, H. (1981). "Reappraisal of nerve repair." Surg Clin North Am **61**(2): 321-340.

MILLESI, H. (1993). "Forty-two years of peripheral nerve surgery." Microsurgery **14**(4): 228-233.

MILLESI, H. (2007). "Bridging defects: autologous nerve grafts." Acta Neurochir Suppl **100**: 37-38.

MIYAUCHI, A., M. KANJE, N. DANIELSEN und L. B. DAHLIN (1997). "Role of macrophages in the stimulation and regeneration of sensory nerves by transposed granulation tissue and temporal aspects of the response." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **31**(1): 17-23.

MLIGILICHE, N., M. KITADA und C. IDE (2001a). "Grafting of detergent-denatured skeletal muscles provides effective conduits for extension of regenerating axons in the rat sciatic nerve." Arch Histol Cytol **64**(1): 29-36.

MLIGILICHE, N., Y. TABATA, K. ENDOH und C. IDE (2001b). "Peripheral nerve regeneration through a long detergent-denatured muscle autografts in rabbits." Neuroreport **12**(8): 1719-1722.

MLIGILICHE, N. L., Y. TABATA, M. KITADA, K. ENDOH, K. OKAMATO, E. FUJIMOTO und C. IDE (2003). "Poly lactic acid--caprolactone copolymer tube with a denatured skeletal muscle segment inside as a guide for peripheral nerve regeneration: a morphological and electrophysiological evaluation of the regenerated nerves." Anat Sci Int **78**(3): 156-161.

MOHAMMAD, J. A., P. H. WARNKE, Y. C. PAN und S. SHENAQ (2000). "Increased axonal regeneration through a biodegradable amnionic tube nerve conduit: effect of local delivery and incorporation of nerve growth factor/hyaluronic acid media." Ann Plast Surg **44**(1): 59-64.

MOHANNA, P. N., R. C. YOUNG, M. WIBERG und G. TERENGHI (2003). "A composite poly-hydroxybutyrate-glial growth factor conduit for long nerve gap repairs." J Anat **203**(6): 553-565.

MOORE, A. M., W. Z. RAY, K. E. CHENARD, T. TUNG und S. E. MACKINNON (2009). "Nerve Allotransplantation as it Pertains to Composite Tissue Transplantation." Hand (N Y) **4**(3): 239-244.

MUMENTHALER, M., H. SCHLIACK und M. STÖHR (1998). Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome. Stuttgart, Thieme.

NAFF, N. J. und J. M. ECKLUND (2001). "History of peripheral nerve surgery techniques." Neurosurg Clin N Am **12**(1): 197-209, x.

NAGEOTTE, J. (1915). "Le processus de la cicatrisation des nerfs." C R Soc Biol (Paris) **78**: 249-253.

NEAR, S. L., L. R. WHALEN, J. A. MILLER und D. N. ISHII (1992). "Insulin-like growth factor II stimulates motor nerve regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 11716-11720.

NEGREDO, P., J. CASTRO, N. LAGO, X. NAVARRO und C. AVENDANO (2004). "Differential growth of axons from sensory and motor neurons through a regenerative electrode: a stereological, retrograde tracer, and functional study in the rat." Neuroscience **128**(3): 605-615.

NGUYEN, Q. T., J. R. SANES und J. W. LICHTMAN (2002). "Pre-existing pathways promote precise projection patterns." Nat Neurosci **5**(9): 861-867.

NICHOLS, C. M., T. M. MYCKATYN, S. R. RICKMAN, I. K. FOX, T. HADLOCK und S. E. MACKINNON (2005). "Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat." Behav Brain Res **163**(2): 143-158.

NINKOVIC, M. (2006). 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästethischen Chirurgen e.V. Aachen.

NOBLE, J., C. A. MUNRO, V. S. PRASAD und R. MIDHA (1998). "Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries." J Trauma **45**(1): 116-122.
NORRIS, R. W., M. A. GLASBY, J. M. GATTUSO und R. E. BOWDEN (1988). "Peripheral nerve repair in humans using muscle autografts. A new technique." J Bone Joint Surg Br **70**(4): 530-533.
OLSON, L. (2002). "Medicine: clearing a path for nerve growth." Nature **416**(6881): 589-590.
PAGNOTTA, A., P. TOS, M. FORNARO, A. GIGANTE, S. GEUNA und B. BATTISTON (2002). "Neurotrophins and their receptors in early axonal regeneration along muscle-vein-combined grafts." Microsurgery **22**(7): 300-303.
PAINTAL, A. (1973). Conduction in mammalian nerve fibers. New Developments in Electromyography and Clinical Neurophysiology. Basel, Karger. **2:** 19-41.
PANERAI, A. E., P. SACERDOTE, A. BRINI, M. BIANCHI und P. MANTEGAZZA (1987). "Autotomy and central nervous system neuropeptides after section of the sciatic nerve in rats of different strains." Pharmacol Biochem Behav **28**(3): 385-388.
PATRICK, C. W., B. ZHENG, M. SCHMIDT, P. S. HERMAN, B. P. CHAUVIN, Z. FAN, B. STARK und G. R. EVANS (2001). "Dermal fibroblasts genetically engineered to release nerve growth factor." Ann Plast Surg **47**(6): 660-665.
PEREIRA, J. H., R. E. BOWDEN, J. M. GATTUSO und R. W. NORRIS (1991a). "Comparison of results of repair of digital nerves by denatured muscle grafts and end-to-end sutures." J Hand Surg [Br] **16**(5): 519-523.
PEREIRA, J. H., R. E. BOWDEN, T. S. NARAYANAKUMAR und S. E. GSCHMEISSNER (1996). "Peripheral nerve reconstruction using denatured muscle autografts for restoring protective sensation in hands and feet of leprosy patients." Indian J Lepr **68**(1): 83-91.
PEREIRA, J. H., D. D. PALANDE, T. S. NARAYANAKUMAR, A. S. SUBRAMANIAN, S. GSCHMEISSNER und M. WILKINSON (2008). "Nerve repair by denatured muscle autografts promotes sustained sensory recovery in leprosy." J Bone Joint Surg Br **90**(2): 220-224.
PEREIRA, J. H., D. D. PALANDE, A. SUBRAMANIAN, T. S. NARAYANAKUMAR, J. CURTIS und J. L. TURK (1991b). "Denatured autologous muscle graft in leprosy." Lancet **338**(8777): 1239-1240.
PESTRONK, A., D. B. DRACHMAN und J. W. GRIFFIN (1980). "Effects of aging on nerve sprouting and regeneration." Exp Neurol **70**(1): 65-82.
PFISTER, L. A., M. PAPALOIZOS, H. P. MERKLE und B. GANDER (2007). "Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair." J Peripher Nerv Syst **12**(2): 65-82.
PLATT, H. (1919-1920). "On the results of bridging gaps in injured nerve trunks by autogenous fascial tubulization and autogenous nerve grafts." Br J Surg **7**: 384-389.
PLUNET, W., B. K. KWON und W. TETZLAFF (2002). "Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy." J Neurosci Res **68**(1): 1-6.
POLLARD, J. D. und L. FITZPATRICK (1973). "A comparison of the effects of irradiation and immunosuppressive agents on regeneration through peripheral nerve allografts: an ultrastructural study." Acta Neuropathol **23**(2): 166-180.
POWELL, S. K. und H. K. KLEINMAN (1997). "Neuronal laminins and their cellular receptors." Int J Biochem Cell Biol **29**(3): 401-414.
PUIGDELLIVOL-SANCHEZ, A., P. FORCADA-CALVET, A. PRATS-GALINO und C. MOLANDER (2000). "Contribution of femoral and proximal sciatic nerve branches to the sensory innervation of hindlimb digits in the rat." Anat Rec **260**(2): 180-188.
RAB, M., R. KOLLER, W. HASLIK, C. NEUMAYER, B. P. TODOROFF, M. FREY und H. GRUBER (1998). "The impact of a muscle target organ on nerve grafts with different lengths--a histomorphological analysis." Muscle Nerve **21**(5): 618-627.
RAIMONDO, S., S. NICOLINO, P. TOS, B. BATTISTON, M. G. GIACOBINI-ROBECCHI, I. PERROTEAU und S. GEUNA (2005). "Schwann cell behavior after nerve repair by means of tissue-engineered muscle-vein combined guides." J Comp Neurol **489**(2): 249-259.
RAMÓN Y CAJAL, S., R. M. MAY, J. DEFELIPE und E. G. JONES (1991). Cajal's Degeneration and regeneration of the nervous system. New York ; Oxford, Oxford University Press.
RAO, P., P. P. KOTWAL, M. FAROOQUE und A. K. DINDA (2001). "Muscle autografts in nerve gaps. Pattern of regeneration and myelination in various lengths of graft: an experimental study in guinea pigs." J Orthop Sci **6**(6): 527-534.
RASBAND, W. S. (1997-2009). ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/.
RATH, E. M. (2002). "Skeletal muscle autograft for repair of the human inferior alveolar nerve: a case report." J Oral Maxillofac Surg **60**(3): 330-334.
RESTREPO, Y., M. MERLE, J. MICHON, B. FOLLIGUET und D. PETRY (1983). "Fascicular nerve graft using an empty perineurial tube: an experimental study in the rabbit." Microsurgery **4**(2): 105-112.

RISITANO, G., G. CAVALLARO, T. MERRINO, S. COPPOLINO und F. RUGGERI (2002). "Clinical results and thoughts on sensory nerve repair by autologous vein graft in emergency hand reconstruction." Chir Main **21**(3): 194-197.
ROBINSON, P. H., B. VAN DER LEI, H. J. HOPPEN, J. W. LEENSLAG, A. J. PENNINGS und P. NIEUWENHUIS (1991). "Nerve regeneration through a two-ply biodegradable nerve guide in the rat and the influence of ACTH4-9 nerve growth factor." Microsurgery **12**(6): 412-419.
RODENACKER, K. und E. BENGTSSON (2003). "A feature set for cytometry on digitized microscopic images." Anal Cell Pathol **25**(1): 1-36.
RODRIGUEZ, F. J., E. VERDU, D. CEBALLOS und X. NAVARRO (2000). "Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration." Exp Neurol **161**(2): 571-584.
ROGANOVIC, Z., S. ILIC und M. SAVIC (2007). "Radial nerve repair using an autologous denatured muscle graft: comparison with outcomes of nerve graft repair." Acta Neurochir (Wien) **149**(10): 1033-1038; discussion 1038-1039.
ROGERS, S. L., P. C. LETOURNEAU, S. L. PALM, J. MCCARTHY und L. T. FURCHT (1983). "Neurite extension by peripheral and central nervous system neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin." Dev Biol **98**(1): 212-220.
ROMERO, E., O. CUISENAIRE, J. F. DENEF, J. DELBEKE, B. MACQ und C. VERAART (2000). "Automatic morphometry of nerve histological sections." J Neurosci Methods **97**(2): 111-122.
ROSBERG, H. E., K. S. CARLSSON, S. HOJGARD, B. LINDGREN, G. LUNDBORG und L. B. DAHLIN (2005). "Injury to the human median and ulnar nerves in the forearm--analysis of costs for treatment and rehabilitation of 69 patients in southern Sweden." J Hand Surg [Br] **30**(1): 35-39.
RUPP, A. (2007). Functional, electrophysiologic and morphometric evaluation of peripheral nerve regeneration after bridging a 14 mm gap in the rat sciatic nerve. Veterinärmedizinische Fakultät. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
RUPP, A., U. DORNSEIFER, A. FISCHER, W. SCHMAHL, K. RODENACKER, U. JUTTING, P. GAIS, E. BIEMER, N. PAPADOPULOS und K. MATIASEK (2007a). "Electrophysiologic assessment of sciatic nerve regeneration in the rat: Surrounding limb muscles feature strongly in recordings from the gastrocnemius muscle." J Neurosci Methods.
RUPP, A., U. DORNSEIFER, K. RODENACKER, A. FICHTER, U. JUTTING, P. GAIS, N. PAPADOPULOS und K. MATIASEK (2007b). "Temporal progression and extent of the return of sensation in the foot provided by the saphenous nerve after sciatic nerve transection and repair in the rat - implications for nociceptive assessments." Somatosens Mot Res **24**(1-2): 1-13.
RUPP, A., W. SCHMAHL, W. LEDERER und K. MATIASEK (2007c). "Strain differences in the branching of the sciatic nerve in rats." Anat Histol Embryol **36**(3): 202-208.
RUSHTON, W. A. (1951). "A theory of the effects of fibre size in medullated nerve." J Physiol **115**(1): 101-122.
SAARMA, M. (2000). "GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily?" Eur J Biochem **267**(24): 6968-6971.
SANDERS, F. K. und D. WHITTERIDGE (1946). "Conduction velocity and myelin thickness in regenerating nerve fibres." J Physiol **105**(2): 152-174.
SANES, J. N. und J. P. DONOGHUE (2000). "Plasticity and primary motor cortex." Annu Rev Neurosci **23**: 393-415.
SANES, J. R., L. M. MARSHALL und U. J. MCMAHAN (1978). "Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites." J Cell Biol **78**(1): 176-198.
SANTIAGO, L. Y., J. CLAVIJO-ALVAREZ, C. BRAYFIELD, J. P. RUBIN und K. G. MARRA (2009). "Delivery of adipose-derived precursor cells for peripheral nerve repair." Cell Transplant **18**(2): 145-158.
SANTOS, X., J. RODRIGO, B. HONTANILLA und G. BILBAO (1999). "Local administration of neurotrophic growth factor in subcutaneous silicon chambers enhances the regeneration of the sensory component of the rat sciatic nerve." Microsurgery **19**(6): 275-280.
SATOU, T., S. NISHIDA, S. HIRUMA, K. TANJI, M. TAKAHASHI, S. FUJITA, Y. MIZUHARA, F. AKAI und S. HASHIMOTO (1986). "A morphological study on the effects of collagen gel matrix on regeneration of severed rat sciatic nerve in silicone tubes." Acta Pathol Jpn **36**(2): 199-208.
SCHALLER, E. und A. BERGER (1987). "Peripheral nerve allograft." Plast Reconstr Surg **80**(6): 870-871.
SCHALOW, G., G. A. ZACH und R. WARZOK (1995). "Classification of human peripheral nerve fibre groups by conduction velocity and nerve fibre diameter is preserved following spinal cord lesion." J Auton Nerv Syst **52**(2-3): 125-150.
SCHERMAN, P., G. LUNDBORG, M. KANJE und L. B. DAHLIN (2000). "Sutures alone are sufficient to support regeneration across a gap in the continuity of the sciatic nerve in rats." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **34**(1): 1-8.

SCHRÖDER, J. M., R. MAY und J. WEIS (1993). "Perineurial cells are the first to traverse gaps of peripheral nerves in silicone tubes." Clin Neurol Neurosurg **95 Suppl**: S78-83.
SCOTT, J. J. (1996). "The functional recovery of muscle proprioceptors after peripheral nerve lesions." J Peripher Nerv Syst **1**(1): 19-27.
SEDDON, H. J. (1943). "Three types of nerve injury." Brain **66**: 237-288.
SHAMASH, S., F. REICHERT und S. ROTSHENKER (2002). "The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta." J Neurosci **22**(8): 3052-3060.
SHI, T. J., T. TANDRUP, E. BERGMAN, Z. Q. XU, B. ULFHAKE und T. HOKFELT (2001). "Effect of peripheral nerve injury on dorsal root ganglion neurons in the C57 BL/6J mouse: marked changes both in cell numbers and neuropeptide expression." Neuroscience **105**(1): 249-263.
SINIS, N., H. E. SCHALLER, C. SCHULTE-EVERSUM, T. LANARAS, B. SCHLOSSHAUER, M. DOSER, K. DIETZ, H. ROSNER, H. W. MULLER und M. HAERLE (2007). "Comparative neuro tissue engineering using different nerve guide implants." Acta Neurochir Suppl **100**: 61-64.
SMITH, K. J. (1978). "A method to represent the spectrum of refractory periods of transmission of the constituent fibres of a nerve [proceedings]." J Physiol **276**: 7P-9P.
SNYDER, A. K., I. K. FOX, C. M. NICHOLS, S. R. RICKMAN, D. A. HUNTER, T. H. TUNG und S. E. MACKINNON (2006). "Neuroregenerative effects of preinjury FK-506 administration." Plast Reconstr Surg **118**(2): 360-367.
SONDELL, M., G. LUNDBORG und M. KANJE (1998). "Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction." Brain Res **795**(1-2): 44-54.
SONDELL, M., G. LUNDBORG und M. KANJE (1999). "Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system." J Neurosci **19**(14): 5731-5740.
STANG, F., H. FANSA, G. WOLF und G. KEILHOFF (2005). "Collagen nerve conduits--assessment of biocompatibility and axonal regeneration." Biomed Mater Eng **15**(1-2): 3-12.
STOLL, G. und H. W. MULLER (1999). "Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights." Brain Pathol **9**(2): 313-325.
STRASBERG, J. E., S. STRASBERG, S. E. MACKINNON, O. WATANABE, D. A. HUNTER und G. TARASIDIS (1999). "Strain differences in peripheral-nerve regeneration in rats." J Reconstr Microsurg **15**(4): 287-293.
SULAIMAN, O. A. und T. GORDON (2002). "Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo." Glia **37**(3): 206-218.
SUNDERLAND, S. (1951). "A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function." Brain **74**(4): 491-516.
SUNDERLAND, S. (1992). Nerve injuries and their repair. Edinburgh, Churchill Livingstone.
TAKAHASHI, M. (2001). "The GDNF/RET signaling pathway and human diseases." Cytokine Growth Factor Rev **12**(4): 361-373.
TANG, J. B. (1995). "Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects." J Reconstr Microsurg **11**(1): 21-26.
TANG, J. B., D. SHI und H. ZHOU (1995). "Vein conduits for repair of nerves with a prolonged gap or in unfavourable conditions: an analysis of three failed cases." Microsurgery **16**(3): 133-137.
TARAS, J. S., V. NANAVATI und P. STEELMAN (2005). "Nerve conduits." J Hand Ther **18**(2): 191-197.
TERENGHI, G. (1995). "Peripheral nerve injury and regeneration." Histol Histopathol **10**(3): 709-718.
TERRIS, D. J., E. T. CHENG, D. S. UTLEY, D. M. TARN, P. R. HO und A. N. VERITY (1999). "Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and phosphate buffered solution." Auris Nasus Larynx **26**(2): 117-122.
TERZIS, J. K., R. W. DYKES und R. W. HAKSTIAN (1976). "Electrophysiological recordings in peripheral nerve surgery: a review." J Hand Surg [Am] **1**(1): 52-66.
THOENEN, H. (1995). "Neurotrophins and neuronal plasticity." Science **270**(5236): 593-598.
THOMAS, M., A. STIRRAT, R. BIRCH und M. GLASBY (1994). "Freeze-thawed muscle grafting for painful cutaneous neuromas." J Bone Joint Surg Br **76**(3): 474-476.
THOMAS, P. K. und D. G. JONES (1967). "The cellular response to nerve injury. II. Regeneration of the perineurium after nerve section." J Anat **101**(Pt 1): 45-55.
TIANGCO, D. A., K. C. PAPAKONSTANTINOU, K. A. MULLINAX und J. K. TERZIS (2001). "IGF-I and end-to-side nerve repair: a dose-response study." J Reconstr Microsurg **17**(4): 247-256.

TONGE, D. A., J. P. GOLDING, M. EDBLADH, M. KROON, P. E. EKSTROM und A. EDSTROM (1997). "Effects of extracellular matrix components on axonal outgrowth from peripheral nerves of adult animals in vitro." Exp Neurol **146**(1): 81-90.

TORCH, S., P. STOEBNER, Y. USSON, G. D. D'AUBIGNY und R. SAXOD (1989). "There is no simple adequate sampling scheme for estimating the myelinated fibre size distribution in human peripheral nerve: a statistical ultrastructural study." J Neurosci Methods **27**(2): 149-164.

TOS, P., B. BATTISTON, S. GEUNA, M. G. GIACOBINI-ROBECCHI, M. A. HILL, M. LANZETTA und E. R. OWEN (2000). "Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts." Microsurgery **20**(2): 65-71.

TOS, P., B. BATTISTON, S. NICOLINO, S. RAIMONDO, M. FORNARO, J. M. LEE, L. CHIRILA, S. GEUNA und I. PERROTEAU (2007). "Comparison of fresh and predegenerated muscle-vein-combined guides for the repair of rat median nerve." Microsurgery **27**(1): 48-55.

UNSICKER, K., C. GROTHE, R. WESTERMANN und K. WEWETZER (1992). "Cytokines in neural regeneration." Curr Opin Neurobiol **2**(5): 671-678.

VAREJAO, A. S., A. M. CABRITA, S. GEUNA, J. A. PATRICIO, H. R. AZEVEDO, A. J. FERREIRA und M. F. MEEK (2003a). "Functional assessment of sciatic nerve recovery: biodegradable poly (DLLA-epsilon-CL) nerve guide filled with fresh skeletal muscle." Microsurgery **23**(4): 346-353.

VAREJAO, A. S., A. M. CABRITA, M. F. MEEK, J. BULAS-CRUZ, V. M. FILIPE, R. C. GABRIEL, A. J. FERREIRA, S. GEUNA und D. A. WINTER (2003b). "Ankle kinematics to evaluate functional recovery in crushed rat sciatic nerve." Muscle Nerve **27**(6): 706-714.

VAREJAO, A. S., A. M. CABRITA, M. F. MEEK, J. BULAS-CRUZ, P. MELO-PINTO, S. RAIMONDO, S. GEUNA und M. G. GIACOBINI-ROBECCHI (2004a). "Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp." J Neurotrauma **21**(11): 1652-1670.

VAREJAO, A. S., A. M. CABRITA, M. F. MEEK, M. FORNARO, S. GEUNA und M. G. GIACOBINI-ROBECCHI (2003c). "Morphology of nerve fiber regeneration along a biodegradable poly (DLLA-epsilon-CL) nerve guide filled with fresh skeletal muscle." Microsurgery **23**(4): 338-345.

VAREJAO, A. S., A. M. CABRITA, J. A. PATRICIO, J. BULAS-CRUZ, R. C. GABRIEL, P. MELO-PINTO, P. A. COUTO und M. F. MEEK (2001a). "Functional assessment of peripheral nerve recovery in the rat: gait kinematics." Microsurgery **21**(8): 383-388.

VAREJAO, A. S., M. F. MEEK, A. J. FERREIRA, J. A. PATRICIO und A. M. CABRITA (2001b). "Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis." J Neurosci Methods **108**(1): 1-9.

VAREJAO, A. S., P. MELO-PINTO, M. F. MEEK, V. M. FILIPE und J. BULAS-CRUZ (2004b). "Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration." Neurol Res **26**(2): 186-194.

VLEGGEERT-LANKAMP, C. L. (2007). "The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: a systematic review. Laboratory investigation." J Neurosurg **107**(6): 1168-1189.

VLEGGEERT-LANKAMP, C. L., R. J. VAN DEN BERG, H. K. FEIRABEND, E. A. LAKKE, M. J. MALESSY und R. T. THOMEER (2004). "Electrophysiology and morphometry of the Aalpha- and Abeta-fiber populations in the normal and regenerating rat sciatic nerve." Exp Neurol **187**(2): 337-349.

VLEGGEERT-LANKAMP, C. L., J. WOLFS, A. P. PEGO, R. VAN DEN BERG, H. FEIRABEND und E. LAKKE (2008). "Effect of nerve graft porosity on the refractory period of regenerating nerve fibers." J Neurosurg **109**(2): 294-305.

VOGELIN, E., J. M. BAKER, J. GATES, V. DIXIT, M. A. CONSTANTINESCU und N. F. JONES (2006). "Effects of local continuous release of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on peripheral nerve regeneration in a rat model." Exp Neurol **199**(2): 348-353.

WAITAYAWINYU, T., D. M. PARISI, B. MILLER, S. LURIA, H. J. MORTON, S. H. CHIN und T. E. TRUMBLE (2007). "A comparison of polyglycolic acid versus type 1 collagen bioabsorbable nerve conduits in a rat model: an alternative to autografting." J Hand Surg [Am] **32**(10): 1521-1529.

WALKER, J. L., J. M. EVANS, P. MEADE, P. RESIG und B. F. SISKEN (1994a). "Gait-stance duration as a measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model." J Neurosci Methods **52**(1): 47-52.

WALKER, J. L., P. RESIG, GUARNIERI S, B. F. SISKEN und J. M. EVANS (1994b). "Improved footprint analysis using video recording to assess functional recovery following injury to the rat sciatic nerve." Restor Neurol Neurosci **6**: 189-193.

WALLER, A. (1850). "Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres." Philos Trans R Soc London (Biol) **140**: 423-429.

WALTON, R. L., R. E. BROWN, W. E. MATORY, JR., G. L. BORAH und J. L. DOLPH (1989). "Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study." Plast Reconstr Surg **84**(6): 944-949; discussion 950-942.

WEBB, K., E. BUDKO, T. J. NEUBERGER, S. CHEN, M. SCHACHNER und P. A. TRESCO (2001). "Substrate-bound human recombinant L1 selectively promotes neuronal attachment and outgrowth in the presence of astrocytes and fibroblasts." Biomaterials **22**(10): 1017-1028.

WEINBERG, H. J. und P. S. SPENCER (1975). "Studies on the control of myelinogenesis. I. Myelination of regenerating axons after entry into a foreign unmyelinated nerve." J Neurocytol **4**(4): 395-418.

WEINBERG, H. J. und P. S. SPENCER (1978). "The fate of Schwann cells isolated from axonal contact." J Neurocytol **7**(5): 555-569.

WESSIG, C., M. KOLTZENBURG, K. REINERS, L. SOLYMOSI und M. BENDSZUS (2004). "Muscle magnetic resonance imaging of denervation and reinnervation: correlation with electrophysiology and histology." Exp Neurol **185**(2): 254-261.

WEWETZER, K., C. GROTHE und P. CLAUS (2001). "In vitro expression and regulation of ciliary neurotrophic factor and its alpha receptor subunit in neonatal rat olfactory ensheathing cells." Neurosci Lett **306**(3): 165-168.

WHITWORTH, I. H., C. DORE, S. HALL, C. J. GREEN und G. TERENGHI (1995). "Different muscle graft denaturing methods and their use for nerve repair." Br J Plast Surg **48**(7): 492-499.

WILLIAMS, H. B. (1987). The painful stump neuroma and its treatment. Microreconstruction of nerve injuries. J. K. Terzis. Philadelphia, Saunders**:** 161-171.

WILLIAMS, L. R., F. M. LONGO, H. C. POWELL, G. LUNDBORG und S. VARON (1983). "Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay." J Comp Neurol **218**(4): 460-470.

WITZEL, C., C. ROHDE und T. M. BRUSHART (2005). "Pathway sampling by regenerating peripheral axons." J Comp Neurol **485**(3): 183-190.

WOLTHERS, M., M. MOLDOVAN, T. BINDERUP, H. SCHMALBRUCH und C. KRARUP (2005). "Comparative electrophysiological, functional, and histological studies of nerve lesions in rats." Microsurgery **25**(6): 508-519.

WOODHALL, B. (1949). "Modern history of peripheral nerve surgery; World War II and the postwar study of peripheral nerve regeneration." J Am Med Assoc **139**(9): 564-566.

XU, G., C. R. PIERSON, Y. MURAKAWA und A. A. SIMA (2002). "Altered tubulin and neurofilament expression and impaired axonal growth in diabetic nerve regeneration." J Neuropathol Exp Neurol **61**(2): 164-175.

YIN, Q., G. J. KEMP und S. P. FROSTICK (1998). "Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration." J Hand Surg [Br] **23**(4): 433-437.

YIN, Q., G. J. KEMP, L. G. YU, S. C. WAGSTAFF und S. P. FROSTICK (2001). "Expression of Schwann cell-specific proteins and low-molecular-weight neurofilament protein during regeneration of sciatic nerve treated with neurotrophin-4." Neuroscience **105**(3): 779-783.

YOSHII, S. und M. OKA (2001a). "Collagen filaments as a scaffold for nerve regeneration." J Biomed Mater Res **56**(3): 400-405.

YOSHII, S. und M. OKA (2001b). "Peripheral nerve regeneration along collagen filaments." Brain Res **888**(1): 158-162.

YOSHII, S., M. OKA, M. SHIMA, A. TANIGUCHI und M. AKAGI (2002). "30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments." Brain Res **949**(1-2): 202-208.

YOSHII, S., M. SHIMA, M. OKA, A. TANIGUCHI, Y. TAKI und M. AKAGI (2004). "Nerve regeneration along collagen filament and the presence of distal nerve stump." Neurol Res **26**(2): 145-150.

YOU, S., T. PETROV, P. H. CHUNG und T. GORDON (1997). "The expression of the low affinity nerve growth factor receptor in long-term denervated Schwann cells." Glia **20**(2): 87-100.

YU, P., H. S. MATLOUB, J. R. SANGER und P. NARINI (2001). "Gait analysis in rats with peripheral nerve injury." Muscle Nerve **24**(2): 231-239.

ZHANG, Y., G. CAMPBELL, P. N. ANDERSON, R. MARTINI, M. SCHACHNER und A. R. LIEBERMAN (1995). "Molecular basis of interactions between regenerating adult rat thalamic axons and Schwann cells in peripheral nerve grafts. II. Tenascin-C." J Comp Neurol **361**(2): 210-224.

ZHENG, J. Q., T. K. KELLY, B. CHANG, S. RYAZANTSEV, A. K. RAJASEKARAN, K. C. MARTIN und J. L. TWISS (2001). "A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons." J Neurosci **21**(23): 9291-9303.

ANHANG

Tabelle 3-19: Deskriptive Statistik der Morphometrie Ergebnisse

Histo	Gruppe		N	d_a	d_f	d_m	A_f	a_f	A_m	a_m	A_a	a_a	G-Ratio
a	AG	Med	1824	3,562	5,931	0,613	56778	30,528	35511	18,970	21367	11,607	0,559
		Min	1407	3,015	5,545	0,581	38443	26,944	26060	17,789	12383	8,708	0,515
		Max	1994	3,852	6,589	0,687	69046	37,710	44269	24,178	24777	15,070	0,576
		MW	1743	3,520	6,000	0,625	54899	31,571	34729	19,975	20169	11,597	0,554
		SA	216	0,293	0,360	0,034	8870	4,085	5271	2,229	3912	2,079	0,020
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	KS	Med	1737	3,321	5,821	0,659	50819	29,868	32462	19,542	18005	10,168	0,534
		Min	1048	1,739	4,658	0,589	19459	18,568	16359	15,610	3100	2,958	0,378
		Max	2073	3,778	6,270	0,701	72619	35,031	46528	22,445	26111	13,088	0,573
		MW	1652	3,137	5,736	0,653	48969	28,868	32160	19,236	16809	9,632	0,518
		SA	427	0,633	0,527	0,034	18509	5,323	10411	2,318	8179	3,204	0,063
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	MDM	Med	2039	3,582	6,010	0,609	64766	31,256	40299	19,631	25011	12,009	0,570
		Min	1765	3,357	5,621	0,565	49428	28,005	30483	17,271	18945	10,535	0,518
		Max	2300	3,800	6,427	0,695	74488	36,442	46685	22,840	27803	13,602	0,592
		MW	2021	3,589	5,999	0,620	64089	31,684	39739	19,657	24349	12,027	0,567
		SA	175	0,166	0,265	0,046	7844	2,643	5112	1,939	3335	1,109	0,022
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Histo	Gruppe		N	d_a	d_f	d_m	A_f	a_f	A_m	a_m	A_a	a_a	G-Ratio
b	AG	Med	2942	3,661	6,009	0,621	91570	30,981	57239	19,375	33949	11,982	0,580
		Min	2608	2,862	5,451	0,553	75985	25,733	43204	16,566	23299	7,629	0,508
		Max	3246	3,948	6,555	0,673	111797	36,173	73180	22,635	38617	13,538	0,622
		MW	2927	3,555	6,000	0,623	90669	31,009	57761	19,689	32908	11,320	0,566
		SA	242	0,358	0,327	0,037	11415	3,292	8623	2,060	4802	1,918	0,038
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	KS	Med	2830	3,981	6,258	0,591	92756	33,334	53428	19,073	38567	13,869	0,607
		Min	2506	3,557	5,868	0,569	82006	29,628	46211	18,356	30932	11,167	0,581
		Max	3261	4,389	7,045	0,662	133027	43,991	78529	25,969	54498	18,022	0,631
		MW	2857	3,952	6,272	0,602	97146	33,948	57632	20,098	39513	13,850	0,606
		SA	274	0,269	0,361	0,033	17130	4,432	10837	2,597	6823	2,072	0,020
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	MDM	Med	2970	3,754	6,053	0,615	94480	31,454	58189	19,260	37033	12,576	0,582
		Min	2448	3,504	5,842	0,573	77493	29,705	43979	17,965	33514	10,945	0,568
		Max	3357	4,200	6,517	0,634	101136	35,909	64393	21,065	39696	15,227	0,631
		MW	2888	3,807	6,127	0,609	92856	32,323	56166	19,449	36690	12,874	0,594
		SA	350	0,292	0,241	0,022	8290	2,362	7277	1,040	2223	1,772	0,025
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Histo	Gruppe		N	d_a	d_f	d_m	A_f	a_f	A_m	a_m	A_a	a_a	G-Ratio
c	AG	Med	7719	4,135	6,545	0,617	290462	38,540	169223	23,086	122569	16,055	0,603
		Min	6440	3,337	5,873	0,605	251723	30,867	149899	20,207	86938	10,661	0,538
		Max	8746	4,699	7,030	0,659	323205	43,191	203106	24,496	136327	19,915	0,644
		MW	7720	4,061	6,515	0,622	291648	37,971	173462	22,487	118186	15,484	0,595
		SA	668	0,432	0,380	0,019	26991	4,185	17642	1,457	16569	2,999	0,034
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	KS	Med	8466	3,864	6,434	0,626	321896	37,494	195989	23,091	124403	14,360	0,576
		Min	7990	3,580	5,919	0,568	263583	32,035	159849	19,428	103734	12,300	0,565
		Max	9010	4,806	8,012	0,824	346861	43,250	206762	24,576	149765	18,674	0,619
		MW	8467	3,991	6,578	0,645	312251	36,903	190590	22,509	121661	14,394	0,583
		SA	380	0,442	0,657	0,076	29106	3,430	15769	1,584	15539	2,008	0,018
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	MDM	Med	8670	3,760	6,375	0,646	309181	37,048	196837	23,053	118147	13,708	0,573
		Min	6308	3,555	6,187	0,618	283642	34,465	172307	22,077	102500	12,045	0,553
		Max	10240	4,251	7,015	0,673	396548	44,965	255343	27,316	141205	17,650	0,587
		MW	8474	3,847	6,469	0,644	320119	38,057	199722	23,696	120398	14,361	0,571
		SA	1240	0,243	0,281	0,018	37700	3,291	26008	1,744	13572	1,743	0,015
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Histo	Gruppe		N	d_a	d_f	d_m	A_f	a_f	A_m	a_m	A_a	a_a	G-Ratio
il	AG	Med	9937	2,748	4,988	0,554	241391	23,453	154760	15,576	80827	7,877	0,540
		Min	7786	1,610	3,356	0,429	100350	9,653	75350	6,580	22760	2,444	0,461
		Max	17120	3,418	5,931	0,620	288994	31,313	188851	20,011	100143	11,301	0,569
		MW	10682	2,591	4,701	0,532	210831	20,795	139438	13,751	71392	7,044	0,529
		SA	3021	0,657	0,959	0,068	68033	8,173	41685	5,044	27351	3,232	0,036
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	KS	Med	10191	3,080	5,466	0,575	271096	27,701	175242	18,189	91170	9,435	0,534
		Min	834	2,702	5,013	0,558	21750	11,159	15077	6,032	6673	5,126	0,496
		Max	12267	4,521	6,861	0,609	327694	32,449	210046	20,018	117648	13,749	0,633
		MW	8087	3,252	5,605	0,579	216731	25,966	138116	16,504	78616	9,462	0,547
		SA	3997	0,643	0,619	0,019	120620	6,873	79363	4,537	41972	2,699	0,046
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	MDM	Med	9425	3,083	5,309	0,571	253263	26,657	158528	17,423	88817	9,888	0,558
		Min	5479	2,292	4,409	0,493	164512	18,066	101618	11,559	48923	5,569	0,447
		Max	14269	4,000	6,098	0,618	312750	34,019	227180	20,475	125370	15,473	0,626
		MW	9741	3,050	5,291	0,565	246970	26,494	158403	16,705	88567	9,789	0,544
		SA	2942	0,625	0,639	0,040	52372	6,082	39678	2,839	22659	3,669	0,054
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Histo	Gruppe		N	d_a	d_f	d_m	A_f	a_f	A_m	a_m	A_a	a_a	G-Ratio
iII	AG	Med	11994	1,756	3,280	0,427	105270	9,219	72064	6,267	34506	2,931	0,538
		Min	8011	1,666	3,039	0,386	72497	7,903	50888	5,309	21609	2,594	0,513
		Max	14079	2,054	3,781	0,466	175621	12,474	118313	8,403	57308	4,070	0,558
		MW	11649	1,779	3,331	0,427	112131	9,567	76744	6,558	35387	3,009	0,540
		SA	2013	0,125	0,214	0,026	29823	1,331	19871	0,913	10175	0,464	0,017
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	KS	Med	2333	1,832	3,301	0,410	22638	9,818	14711	6,310	7286	3,438	0,572
		Min	150	1,639	2,961	0,345	1075	7,168	643	4,286	432	2,883	0,542
		Max	4685	1,946	3,612	0,439	50263	18,825	32845	9,408	24156	9,418	0,644
		MW	2248	1,823	3,305	0,405	25165	10,595	15485	6,479	9680	4,116	0,579
		SA	1284	0,092	0,193	0,030	16755	3,487	9798	1,428	7561	2,178	0,033
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	MDM	Med	103	1,779	3,758	0,473	854	13,059	635	8,964	219	3,831	0,530
		Min	21	1,074	2,663	0,427	312	6,160	187	5,018	57	1,141	0,403
		Max	970	2,514	4,295	0,606	11081	15,386	7427	10,454	3654	5,960	0,614
		MW	256	1,809	3,730	0,489	3126	12,321	2126	8,726	1000	3,594	0,517
		SA	325	0,580	0,528	0,057	3894	3,111	2586	1,761	1322	1,929	0,081
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Histo	Gruppe		N	d_a	d_f	d_m	A_f	a_f	A_m	a_m	A_a	a_a	G-Ratio
iIII	AG	Med	6500	1,822	3,457	0,458	48463	10,095	31571	7,013	16892	3,082	0,531
		Min	2536	1,539	2,852	0,355	28127	6,884	21542	4,552	6585	2,199	0,472
		Max	7269	2,000	3,859	0,524	91385	12,737	63552	8,857	27833	3,879	0,597
		MW	5589	1,790	3,391	0,445	54643	9,827	37609	6,812	17034	3,015	0,537
		SA	1781	0,147	0,357	0,060	21978	2,030	15573	1,672	6726	0,514	0,040
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	KS	Med	242	1,404	3,626	0,549	2739	11,883	2219	9,610	521	2,273	0,429
		Min	6	1,193	3,202	0,500	92	9,474	75	7,923	17	1,551	0,416
		Max	562	1,660	4,262	0,688	5324	15,314	4453	12,530	872	2,783	0,457
		MW	263	1,415	3,679	0,572	2724	12,138	2241	9,918	482	2,220	0,433
		SA	261	0,213	0,465	0,083	2511	2,509	2084	1,997	430	0,530	0,019
		n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	MDM	Med	21	1,367	3,455	0,527	226	10,240	192	8,521	33	1,781	0,452
		Min	7	1,244	3,146	0,425	65	8,110	46	5,791	17	1,580	0,389
		Max	153	2,812	4,657	0,642	1520	12,380	1235	10,095	284	2,404	0,627
		MW	40	1,594	3,622	0,547	402	10,339	329	8,421	73	1,919	0,477
		SA	56	0,556	0,524	0,078	555	1,589	451	1,625	104	0,356	0,084
		n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Histo	Gruppe		N	d_a	d_f	d_m	A_f	a_f	A_m	a_m	A_a	a_a	G-Ratio
h	AG	Med	1491	1,295	2,962	0,446	10835	7,255	8487	5,747	2348	1,549	0,471
		Min	138	1,203	2,754	0,404	1243	6,399	1029	4,854	214	1,302	0,442
		Max	2612	1,535	3,593	0,553	20974	10,612	16103	8,504	4871	2,108	0,507
		MW	1406	1,327	3,026	0,457	10945	7,743	8550	6,135	2395	1,608	0,471
		SA	923	0,117	0,269	0,044	7593	1,441	5865	1,243	1752	0,275	0,022
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	KS	Med	44	1,412	3,590	0,538	637	13,368	479	10,726	143	2,642	0,430
		Min	9	1,249	3,275	0,522	249	9,522	204	7,845	44	1,677	0,415
		Max	94	2,621	5,689	0,764	905	42,097	737	27,816	198	14,281	0,451
		MW	48	1,674	4,036	0,591	607	19,589	475	14,278	132	5,310	0,431
		SA	41	0,644	1,118	0,116	343	15,119	287	9,141	65	6,000	0,017
		n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	MDM	Med	6	1,543	4,945	0,975	136	24,745	118	22,755	14	1,990	0,344
		Min	2	1,151	3,484	0,586	49	10,496	46	9,061	4	1,435	0,328
		Max	13	1,667	6,032	1,000	185	30,829	171	28,572	19	2,257	0,371
		MW	7	1,454	4,820	0,854	124	22,023	112	20,129	12	1,894	0,348
		SA	6	0,270	1,278	0,232	69	10,436	63	10,017	7	0,419	0,022
		n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Histo	Gruppe		N	d_a	d_f	d_m	A_f	a_f	A_m	a_m	A_a	a_a	G-Ratio
g	AG	Med	446	1,378	3,128	0,468	3634	7,988	2622	6,318	943	1,867	0,495
		Min	28	1,300	3,005	0,426	352	6,892	258	5,024	94	1,638	0,464
		Max	1086	1,804	3,634	0,488	7484	12,581	5456	9,221	2028	3,360	1,000
		MW	505	1,473	3,181	0,461	3907	8,537	2954	6,430	953	2,108	0,555
		SA	314	0,183	0,213	0,023	2121	1,880	1574	1,332	571	0,625	0,182
		n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8
	KS	Med	90	1,767	3,695	0,513	1193	13,261	869	9,655	325	3,704	0,476
		Min	2	1,723	3,195	0,391	29	9,608	21	5,905	8	3,606	0,450
		Max	221	2,162	4,236	0,558	2123	14,373	1305	10,326	818	4,047	0,576
		MW	104	1,884	3,709	0,487	1115	12,414	732	8,628	384	3,786	0,500
		SA	110	0,241	0,521	0,086	1050	2,493	653	2,383	408	0,232	0,067
		n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	MDM	Med	7	1,067	2,869	0,503	72	6,571	58	5,786	10	0,990	0,507
		Min	3	0,802	2,213	0,361	16	3,981	14	3,470	2	0,511	0,429
		Max	14	2,417	4,518	0,562	123	17,616	84	12,023	39	5,593	0,547
		MW	8	1,405	3,174	0,471	67	9,292	52	7,101	15	2,191	0,494
		SA	5	0,673	0,967	0,080	42	5,859	30	3,772	14	2,156	0,051
		n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Abgebildet sind die Ergebnisse der Studiengruppen (Grp.) auf allen untersuchten Querschnittshöhen (Histo). Zu jedem Wert sind Median (Med), Minimum (Min), Maximum (Max), Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SA), sowie die Anzahl von Versuchstieren (n), in denen mindestens eine myelinisierte Nervenfaser gefunden wurde. Eine Erklärung der einzelnen Parameter findet sich in Kapitel 2.3.6, die Lokalisation der Querschnitte ist in Abb. 2-5 dargestellt. (AG) Autograft; (KS) Kollagenschiene; (MDM) modifizierte Kollagenschiene.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildungen

Abb. 1-1: Aufbau eines peripheren Nerven 3
Abb. 1-2: Techniken der End-zu-End Naht eines Nervs 12
Abb. 1-3: Phasen der axonalen Regeneration durch einen Nervenleiter 19
Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Anatomie eines Muskels 22
Abb. 2-1: Handelsübliche Kollagenschiene NeuraGen™ PNG-220 26
Abb. 2-3: Muskelentnahme und Denaturierung 30
Abb. 2-4: Intraoperative Bilder des experimentellen Ischiasnervendefekts 31
Abb. 2-5: Gewebsentnahmen aus dem N. ischiadicus/tibialis für die strukturelle Analyse 33
Abb. 2-6: Semiautomatische Erfassung der Muskelfaserquerschnittsflächen 35
Abb. 2-7: Schrittweise Segmentierung der Nervenquerschnitte 36
Abb. 2-8: Elektro-Stimulation an proximalen Stimulationspunkten 41
Abb. 2-9: Erfassung und Vermessung der Fußabdrücke 43
Abb. 2-10: Experimenteller Aufbau zur Aufzeichnung der Bewegungszyklen 45
Abb. 2-11: Veränderung des Tibiometatarsal-Winkels während einer Bewegungsfolge 46
Abb. 3-1: Elektronenmikroskopische Untersuchung der denaturierten Muskulatur 54
Abb. 3-2: Regeneration durch das autologes Nerventransplantat 55
Abb. 3-3: Wachstumsmuster der NF durch eine matrixfreie Schiene 56
Abb. 3-4: Wachstumsmuster der NF durch ein mit MDM gefülltes Kollagenröhrchen 57
Abb. 3-5: Elektronenmikroskopische Beobachtungen 58
Abb. 3-6: Gesamtfaserzahl (Boxplot) 61
Abb. 3-7: Gesamtfaserzahl auf unterschiedlichen Querschnittshöhen 61
Abb. 3-8: Gesamtflächen von Faser, Myelin und Axon [μm^2] 62
Abb. 3-9: Mittlerer Faserdurchmesser [µm] (Boxplot) 63
Abb. 3-10: Mittlere Myelindicke [µm] (Boxplot) 64
Abb. 3-11: G-Ratio (Boxplot) 64
Abb. 3-12: Wadenmuskelvolumina im Vergleich 65
Abb. 3-13: Vergleich der Gastrocnemius-Volumina (ml) 66
Abb. 3-14: Subjektive Auswahl von Muskelfaserquerschnitten 67
Abb. 3-15: Muskelfaserquerschnittsfläche (μm^2) 68
Abb. 3-16: Leitgeschwindigkeit (m/s) im Gruppenvergleich 70
Abb. 3-17: Veränderungen des *SFI* im Zeitverlauf 71
Abb. 3-18: Veränderungen des SSI im Zeitverlauf 73
Abb. 3-19: Veränderung des Tibiometatarsal-Winkels während einer Bewegungsfolge 75
Abb. 3-20: Physiologische und pathologische Gelenkswinkel 75

Abb. 3-21: Änderung des Tibio-Metatarsalwinkels in der Mitte der Standphase (*ASA*) 77
Abb. 3-22: Änderung des Tibio-Metarsalwinkels am Ende der Standphase (*ATS)* 77
Abb. 3-23: Änderung des Tibio-Metatarsalwinkels in der Mitte der Schwungphase (*AMS)* ... 78
Abb. 4-1: Beispiele für typische Segmentationsfehler 97
Abb. 4-2: Schematische Darstellung der G-Ratio 103

Tabellen

Tabelle 1-1: Einteilung der Nervenverletzungen nach Seddon und Sunderland 10
Tabelle 2-1: Untersuchungsplan 28
Tabelle 2-2: Direkte und indirekte Variablen der morphometrischen Analyse 37
Tabelle 3-1: Erfolgsraten in Prozent 59
Tabelle 3-2: Statistischer Vergleich der morphometrischen Ergebnisse 60
Tabelle 3-3: Deskriptive Statistik der absoluten Gastrocnemius-Volumina (ml) 65
Tabelle 3-4: Statistischer Vergleich der Gastrocnemius-Volumina mit der Kontrollseite 66
Tabelle 3-5: Statistischer Vergleich der Gastrocnemius-Volumina der Gruppen 66
Tabelle 3-6: Deskriptive Statistik der Muskelfaserquerschnittsfläche (μm^2) 67
Tabelle 3-7: Vergleich der Muskelfaserquerschnittsflächen der Gruppen 68
Tabelle 3-8: Vergleich der Ratios links : rechts der Muskelfaserquerschnittsfläche 68
Tabelle 3-9: Deskriptive Statistik der Nervenleitgeschwindigkeit 70
Tabelle 3-10: Vergleich der Leitgeschwindigkeit mit der Kontrollseite 70
Tabelle 3-11: Vergleich der Leitgeschwindigkeiten der Studiengruppen 70
Tabelle 3-12: Deskriptive Statistik der Veränderungen des *SFI* im Zeitverlauf 72
Tabelle 3-13: Vergleich *SFI* nach 3 Wochen mit *SFI* nach 8 Wochen 72
Tabelle 3-14: Statistischer Vergleich des *SFI* nach acht Wochen 72
Tabelle 3-15: Gleichzeitiger Vergleich des *SSI* nach 3 mit dem *SSI* nach 8 Wochen 73
Tabelle 3-15: Deskriptive Statistik der Veränderungen des *SSI* im Zeitverlauf 74
Tabelle 3-17: Paarweiser Vergleich des *SSI* nach acht Wochen hinsichtlich der Gruppen ... 74
Tabelle 3-18: Deskriptive Statistik der Veränderungen des Tibio-Metatarsalwinkels 76
Tabelle 3-19: Vergleich der Sprunggelenkswinkel zu verschiedenen Zeitpunkten 78
Tabelle 3-20: Vergleich der Sprunggelenkswinkel der Gruppen 79
Tabelle 3-21: Pearson Korrelationskoeffizienten für 16 Variablen in 24 Tieren 80
Tabelle 3-19: Deskriptive Statistik der Morphometrie Ergebnisse 142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AG	Autograft
BDGF	Brain derived growth factor
bds.	beidseits
BZ	Bewegungszyklus
bzw.	beziehungsweise
CAM	Cell adhesion molecule (Zelladhäsionsmolekül)
CMAP	Compound Muscle Action Potential = Muskelaktionspotenzial
CNAP	Compound Nerve Action Potential = Nervenaktionspotenzial
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
d.h.	das heißt
ECM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast growth factor
GDNF	Glial cell-line derived neurotrophic factor
HR	Hopping Response
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
ITS	intermediate toe spread
Jhd.	Jahrhundert
KGW	Körpergewicht
KS	Kollagenschiene
LR	Lifting Response
M.	Musculus
MDM	Modifizierte denaturierte (autologe) Muskulatur
MFQ	Muskelfaserquerschnittsfläche
MG	Musculus gastrocnemius
MW	Mittelwert
n	Anzahl, Gruppengröße
N.	Nervus
NF	Nervenfaser
NGF	Nerve growth factor
NI	Nervus ischiadicus
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NT	Neurotrophin
p.o	Per os
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGA	Polyglycolic acid (Polyglycolsäure)
PL	Print length (= Länge des Fußabdrucks)
PLA	Polylactid acid (Polylaktatsäure)
PNS	Peripheres Nervensystem
PPD	Paraphenylendiamin
s.c.	Subkutan
SA	Standardabweichung
SF	Standardfehler = SA/(√(Anzahl der Messwerte))
SFI	Sciatic Function Index
sog.	sogenannt
SSI	Static Sciatic Index
SZ	Schwann-Zelle(n)
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TPR	Tactile Placing Response
TSF	toe spread factor
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
z.B.	zum Beispiel
z.i.	zitiert in
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
g	Gramm
kDa	Kilo-Dalton
M	Molar
mbar	Millibar
ml	Milliliter
m	Meter
cm	Zentimeter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
μm^2	Quadtratmikrometer
nm	Nanometer
px	Pixel
d	Tage
h	Stunden
s	Sekunden

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Durchführung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. habil. E. BIEMER danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die gute Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. N.A. PAPADOPULOS für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, seine Hilfestellung und das große Vertrauen, dass er mir in den vergangenen Jahren entgegen brachte.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. U. DORNSEIFER und Herrn PD Dr. vet. K. MATIASEK, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und ohne die die Arbeit in dieser Form nicht vorliegen könnte.

Frau Dr. vet. A. RUPP, Herrn cand. med. S. LEICHTLE und Herrn cand. med. A. WILSON danke ich für die gute Zusammenarbeit und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung. Frau PD Dr. vet. J. HENKE danke ich für die Unterstützung bei Planung und Durchführung der Durchführung der Tierversuche. Herrn K. RODENACKER sei herzlich für die Unterstützung bei der morphometrischen Auswertung gedankt. Frau Dr. vet. B. BOCKSTAHLER aus der Klinik für Chirurgie und Augenheilkunde der veterinärmedizinischen Universität Wien, Österreich danke ich für die gute Kooperation und Ihre Hilfe bei der Video-Ganganalyse. Gedankt sei auch Herrn Dipl.-Stat. A. HAPFELMEIER für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und für seine Unermüdlichkeit in den vielen Stunden statistischer Beratung. Herzlich sei auch den Technischen Assistentinnen des Neuropathologischen Instituts, sowie den OP-Schwestern und Mitarbeitern des Tierbereichs am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung gedankt.

Meiner Familie, die mir stets zur Seite stand, danke ich für ihre Liebe und Unterstützung in allen Situationen.

LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name	Andreas Max Fichter
Geburtsdatum	18.02.1979
Geburtsort	München

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1985-89	Grundschule Bernau am Chiemsee
1989-98	Gymnasium Prien am Chiemsee
26.06.1998	Abitur
1998-99	Zivildienst; Frauenklinik Prien am Chiemsee
03/1999	Studium der Politikwissenschaft; Hochschule für Politik, München

MEDIZINISCHE AUSBILDUNG

04/2000	Beginn des Medizinstudiums an der LMU München
28.08.2002	Ärztliche Vorprüfung (Physikum), LMU München
28.08.2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, TU München
06.09.2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, TU München
24.04.2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, TU München
26.04.2007	Approbation als Arzt
10/2007	Beginn des Zahnmedizinstudiums and der LMU München
11.04.2011	Zahnärztliche Prüfung, LMU München
18.04.2011	Approbation als Zahnarzt
Seit 07/2011	Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Technischen Universität München (Leitung: Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)

FAMULATUREN

02-03/2003	*Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie* (Klinikum Rechts der Isar, München)
09-10/2003	*Kinderchirurgie* (Dr. v. Haunersches Kinderspital, München)
08-09/2004	*Plastische Chirurgie* (Städtisches Klinikum Bogenhausen, München)
02-03/2005	*Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie* (Praxis Dr. Dr. Rauh, München)

PRAKTISCHES JAHR

04-06/2006	*Orthopädie* (Holland Orthopedic and Arthritic Hospital, Toronto, Canada)
06-08/2006	*Sportorthopädie* (Klinikum rechts der Isar, München)
08-12/2006	*Viszeral- und Unfallchirurgie* (Städtisches Klinikum Bogenhausen, München)
12/06-03/07	*Innere Medizin und Intensivmedizin* (Stadtspital Waid, Zürich, Schweiz)

PROMOTIONEN

2004-2009	**Periphere Nervenregeneration durch muskelgefüllte Kollagenschienen am Modell experimentell erzeugter Ischiadiasnervendefekte in der Ratte** Betreuung: apl. Prof. Dr. med. N. A. Papadopulos, Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie am Klinikum Rechts der Isar, München
Seit 2010	**Entwicklung eines extrakorporalen Perfusionssystems zur Perfusion freier Gewebstransplantate** Betreuung: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K.-D. Wolff, Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie am Klinikum rechts der Isar

KONGRESSBEITRÄGE UND PUBLIKATIONEN

JOURNALBEITRÄGE

1 – The Ideal Split-Thickness Skin Graft Donor Site Dressing: Rediscovery of the Polyurethane Film. *Dornseifer U, Fichter AM, Herter F, Sturtz G, Ninkovic M.* Ann Plast Surg. 2009. 63(2):198-200.

2 – Fetal spina bifida repair - current trends and prospects of intrauterine neurosurgery. *Fichter MA, Dornseifer U, Henke J, Schneider KTM, Kovacs L, Biemer E, Bruner J, Adzick NS, Harrison MR, Papadopulos NA.* Fet Diagn Therap. 2008. 23(4):271-286.

3 – Fetoscopic closure of punctured fetal membranes with acellular human amnion plugs in a rabbit model. *Mallik A* and Fichter MA*, Rieder S, Bilic G, Stergioula S, Henke J, Schneider KTM, Biemer E, Zimmermann R, Zisch A, Papadopulos NA.* Obstet Gynecol 110(5): 1121-1129.

*both authors contributed equally as „first author".

4 – Surgical therapy of peripheral nerve lesions: current status and new perspectives. *Dornseifer U, Matiasek K, Kovacs L, Fichter MA, Henke J, Weidner N, Schmal W, Biemer E, Ninkovic M, Papadopulos NA.* Zentralbl Neurochir. 2007. 68(3): 101-110.

5 – Temporal progression and extent of the return of sensation in the foot provided by the saphenous nerve after sciatic nerve transection and repair in the rat – implications for nociceptive assessments. *Rupp A, Dornseifer U, Rodenacker K, Fichter MA, Jütting U, Gais P, Papadopulos NA, Matiasek K.* Somatosens Mot Res. 2007 Mar-Jun;24(1):1-13.

6 – Peripheral nerve reconstruction with collagen tubes filled with denatured autologous muscle tissue in the rat model. *Fichter AM and Dornseifer U, Leichtle S, Wilson A, Rupp A, Rodenacker K, Ninkovic M, Biemer E, Machens HG, Matiasek K, Papadopulos NA.* Microsurgery. 11/2011; 31(8):632-41.

7 – Mandibular osteoma n a case of Gardner's Syndrome. *Fichter AM, Wolff KD, Mücke T.* HNO. 05/2011; 59(5):523-7.

8 – The ideal split-thickness skin graft donor site dressing: a clinical comparative trial of a modified polyurethane dressing and Aquacel®. *Dornseifer U, Lonic D, Gerstung TI, Herter F, Fichter AM, Holm C, Schuster S, Ninkovic M. Plast Reconstr Surg. 2011 Oct;128(4):918-24.*

VORTRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN

1 – Der Einfluss modifizierter azellulärer Skelettmuskulatur auf den funktionellen und strukturellen Regenerationserfolg durch Kollagenschienen nach Ischiasläsion in der adulten Ratte. *Fichter MA, Dornseifer U, Matiasek K, Leichtle S, Wilson A, Rupp A, Ninkovic M, Biemer E, Machens HG, Papadopulos NA,* 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen e.V., Hannover 2009.

2 – Bridging a 14 mm gap of the sciatic nerve with a modified collagenous conduit in the rat. *Fichter MA, Dornseifer U, Rodenacker K, Hapfelmeier A, Matiasek K, Papadopulos NA.* 4th International Bernd-Spiessl-Symposium, Basel 2008.

Ausgezeichnet mit dem Bernd-Spiessl Award für das beste Studenten-Poster

3 – Erfolgreicher Verschluss von Amnionmembrandefekten mit Hilfe von dezellularisierter humaner Amnionmembran nach Fetoskopie im Kaninchenmodell. *Fichter MA, Mallik A, Rieder S, Schneider KTM, Zisch A, Papadopulos NA.* Gemeinsame Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde (BGGF) und der Österreichischen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (OEGGG), München 2007.

Ausgezeichnet mit dem Förderpreis der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde e.V. für den besten freien Vortrag.

4 – Combination of Collagen Tubes and Denatured Muscle Tissue to Bridge Peripheral Nerve Defects in the Rat. *Dornseifer U, Matiasek K, Fichter MA, Rupp A, Kovacs L, Ninkovic M, Biemer E, Papadopulos NA.* IV. Congress of the World Society for Reconstructive Microsurgery, Athen, Griechenland 2007.

5 – Erfolgreicher Verschluss von Amnionmembrandefekten mit Hilfe dezellularisierter humaner Amnionmembran nach Fetoskopie im Kaninchenmodell. *Fichter MA, Mallik A, Rieder S, Stergioula S,*

Bilic G, Henke J, Zimmermann R, .Schneider KTM, Biemer E, Zisch A, Papadopulos NA. 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästethischen Chirurgen e.V., Aachen 2006.

6 – Successful closure of fetal membrane defects using manufactured, decellularized human amnion membrane after fetoscopy in the midgestational rabbit model. *Mallik A, Fichter MA, Rieder S, Bilic G, Stergioula S, Henke J, Schneider KTM, Biemer E, Zimmermann R, Zisch A, Papadopulos NA.* IFMSS (International Fetal Medicine and Surgery Society) Annual meeting, Hawaii 2006.

7 – Kombination von Kollagenschiene und denaturierter Muskulatur als Leitschiene zur Überbrückung größerer Nervendefekte am Ratten-Modell. *Dornseifer U, Matiasek K, Fichter MA, Rupp A, Ninkovic M, Biemer E, Papadopulos NA.* 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästethischen Chirurgen e.V., Aachen 2006.