

**Zentrum für Plastische und Handchirurgie,
Intensiveinheit für Schwerbrandverletzte
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. P. Mailänder**

**Untersuchung des Potentials von
Erythropoietin als adjuvantes Therapeutikum nach peripherer
Nervenrekonstruktion im Tiermodell**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Universität zu Lübeck**

**vorgelegt von
Eva Essmann aus Neuenkirchen,**

Lübeck 2010

1. Berichtersteller: Prof. Dr. med. P. Mailänder
2. Berichtersteller: Prof. Dr. med. Andreas Moser
Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2011
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06.04.2011

**Zentrum für Plastische und Handchirurgie,
Intensiveinheit für Schwerbrandverletzte
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. P. Mailänder**

**Untersuchung des Potentials von
Erythropoietin als adjuvantes Therapeutikum nach peripherer
Nervenrekonstruktion im Tiermodell**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Universität zu Lübeck**

**vorgelegt von
Eva Essmann aus Neuenkirchen,**

Inhaltsverzeichnis

<u>Einleitung</u>	1
<u>Historische Entwicklung der Nervenrekonstruktion</u>	5
<u>Histopathologie der Nervenregeneration</u>	6
<u>Nervenkoaptation (Neurorrhaphie)</u>	8
<u>Nerventransplantation</u>	8
<u>Tubulisation</u>	9
<u>Erythropoietin</u>	11
<u>Fragestellung</u>	14
<u>Material und Methoden</u>	15
<u>Studienmodell</u>	15
<u>Studiendesign</u>	15
<u>Kollagen-Conduit</u>	17
<u>Operationstechnik und Anästhesie</u>	18
<u>Erythropoietin</u>	24
<u>Untersuchungsmethoden</u>	25
<u>Pinch-Test</u>	25
<u>Muskelmassenquotient</u>	25
<u>Histologie / Immunhistologie</u>	26
<u>Computergestützte Axonquantifizierung</u>	28
<u>Ganganalyse</u>	36
<u>Statistische Analyse</u>	37
<u>Ergebnisse</u>	38
<u>Klinische Untersuchungen</u>	39
<u>Kontrakturen</u>	39
<u>Trophische Störungen</u>	39
<u>Mutilationen</u>	39
<u>Infektzeichen</u>	40
<u>Pinch-Test</u>	40

<u>Muskelmassenquotient</u>	40
<u>Histologie / Immunhistologie</u>	44
<u>Immunhistologie</u>	50
<u>Neurofilamentfärbung</u>	50
<u>S100-Färbung</u>	52
<u>Computergestützte Axonquantifizierung</u>	55
<u>Ganganalyse</u>	57
<u>Diskussion</u>	58
<u>Zusammenfassung</u>	66
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	68

Einleitung

In Europa beträgt die Anzahl der peripheren Nervenverletzungen bis zu 300.000 Fälle im Jahr (2;3). Die häufigste Ursache von Nervenverletzungen sind Traumata (4). Meist ist die obere Extremität betroffen (4-6). In der Handchirurgie gehen 10 % der zu versorgenden Notfälle mit Nervenverletzungen einher (7). Traumata führen häufig zu Schnitt- und Rissverletzungen des Nerven (8).

Eine optimale Versorgung vorausgesetzt, ist das periphere Nervensystem zwar in der Lage zu regenerieren, aber die Reinnervation erreicht nie die ursprüngliche Qualität (siehe Abbildung 1a,b und 2). Der Verlust von Sensibilität und motorischer Funktion beeinträchtigt den Patienten sowohl im sozialen Bereich als auch bei der Arbeit und kann weitreichende sozioökonomische Folgen haben (9;10). Durch das Erlöschen der Schutzsensibilität besteht eine erhöhte Verletzungsgefahr der Extremität. Außerdem kann es durch Neuombildung zum Auftreten neuropathischer Schmerzen kommen, die auch mit potenten Analgetika oft nur schwer zu beherrschen sind (11). Ausfälle der sympathischen Funktion können zu einer Einschränkung der Temperaturregulation führen. Bei Verletzungen motorischer Nerven treten Paresen auf. Fehlinnervationen während der Regeneration können in Synkinesien resultieren, die durch zeitgleiche Kontraktionen gegenläufig wirkender Muskelgruppen den Bewegungsablauf stören (2).

Ist es zur vollständigen oder partiellen Durchtrennung eines peripheren Nerven gekommen, ist die Wiederherstellung der proximodistalen Kontinuität erforderlich. Der Goldstandard ist die spannungsfreie Koaptation der Nervenstümpfe.

Liegt aufgrund der Nervenverletzung oder des erforderlichen Débridements ein Nervendefekt vor, kann die spannungsfreie Koaptation häufig nicht gewährleistet werden. In diesen Fällen ist der Goldstandard die Verwendung eines autologen Transplantats zur Überbrückung der Defektstrecke (12;13). Als Spendernerv kann man unter anderem den N. suralis, N. cutaneus antebrachii medialis oder N. interosseus posterior gewinnen.

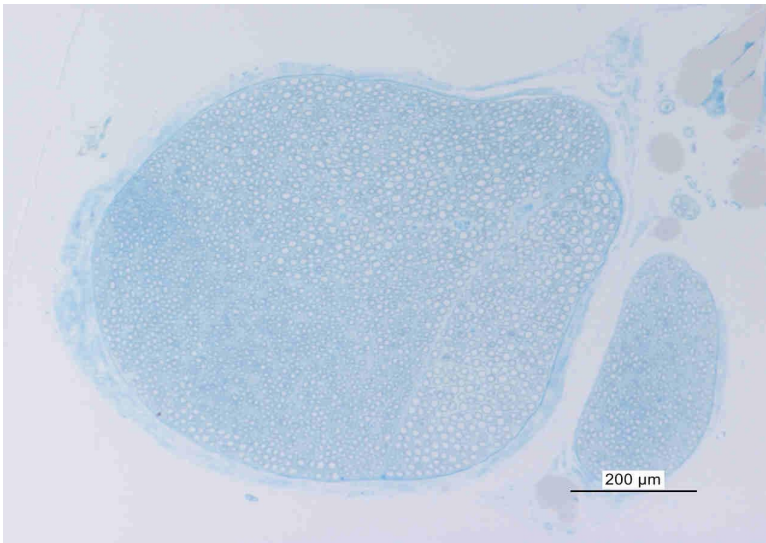


Abb. 1a: Histologischer Querschnitt eines gesunden Nerven (Toluidinblaufärbung, Vergrößerung 100fach)

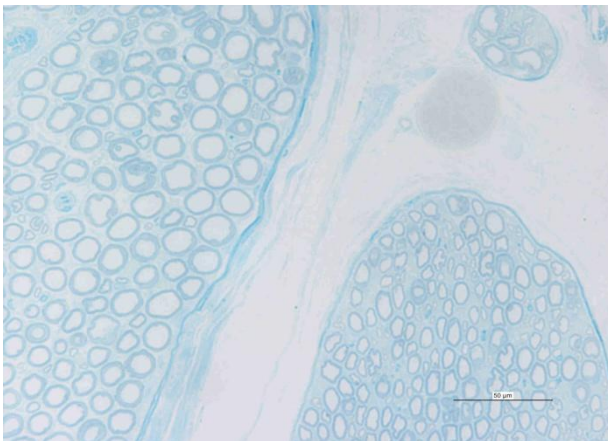


Abb. 1b: Ausschnittvergrößerung (400fach)

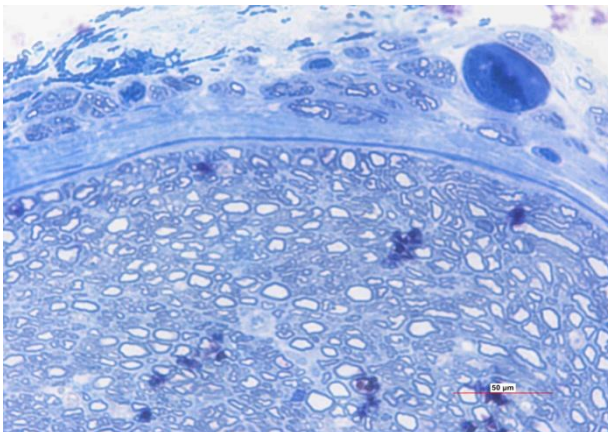


Abb. 2: Querschnitt eines autologen Nervenimplantats, sechs Monate nach der Transplantation (Vergrößerung 400fach).

Alternativ besteht die Möglichkeit der Tubulisation. Bei dieser Methode setzt man anstelle des Nerventransplantates ein biologisches oder artifizielles Röhrchen ein, in dem die Axone des proximalen Nervenstumpfes nach distal auswachsen können (14).

Die Entwicklung adjuvanter Therapieprinzipien zur Verbesserung der Nervenregeneration ist Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte. Sowohl zellbasierte Studien, z.B. mit Schwann-Zellen (15-17), als auch proteinbasierte Experimente konnten schon vielversprechende Ergebnisse erzielen (18-23;23-28). Aber auch in der klinischen Anwendung konnte bei Patienten, die einen Schlaganfall erlitten hatten, durch die systemische Verabreichung von Erythropoietin ein positiver Effekt erzielt werden (29-31). Im Tiermodell zeigte sich ein Rückgang der Hirnschädigung von 50 – 70 % unter Epo-Gabe bis zu sechs Stunden nach der Schädigung (32). Untersuchungen von Druckverletzungen peripherer Nerven ergaben Hinweise auf neuroprotektive Effekte des Erythropoietins (26). Trotz der genannten Ergebnisse hinsichtlich der Neuroregeneration im zentralen und peripheren Nervensystem gibt es bisher keine Untersuchungen zum Einfluss von systemischer Erythropoietin-Gabe auf die Regeneration peripherer Nerven nach Transplantation oder Tubulisation.

Während beim autologen Nerventransplantat das bestehende Gefäßnetz des Transplantats wieder mit dem Körperkreislauf anastomosiert wird (Inoskulation), muss bei der Verwendung eines Conduits eine völlig neue Gefäßversorgung entstehen (Angiogenese). Ein schnellerer Anschluss an den Blutkreislauf könnte dabei eine bessere nutritive Versorgung der für die Regeneration essentiellen Schwann-Zellen bedeuten. Zudem könnten neuroprotektive und neuroregenerative Effekte den Untergang von Neuronen im Spinalganglion vermindern und einen direkten positiven Einfluss auf regenerierende Axone ausüben, so dass eine schnellere Reinnervation des Endorgans möglich scheint.

Wir entschlossen uns zur Untersuchung des Einflusses rekombinanten humanen Erythropoietins (rhEpo) auf die periphere Nervenregeneration, da sowohl durch die Stimulation der Angiogenese als auch durch direkte neuroprotektive und neuroregenerative Effekte auf den Nerven Vorteile für die posttraumatische Nervenregeneration möglich erscheinen.

Historische Entwicklung der Nervenrekonstruktion

Den ersten historischen Hinweis auf die Versorgung einer peripheren Nervenverletzung kann man bereits bei Galen von Pergamon (131-201 n.Chr.) finden. Paul of Aegina (625-690) beschrieb als Erster die Annäherung von Nervenenden durch den Wundverschluss (33). Avicenna (980-1073) beschreibt in seinem Werk „Canon medicinae“ die Notwendigkeit der Nervennaht für die Heilung eines Nervs. Zunächst erfolgte die Annäherung der Nervenenden aber nur indirekt, indem man das umliegende Gewebe adaptierte. Gabriele Ferrera (1543-1627) war ein Pionier auf dem Gebiet der Nerven Chirurgie. Er war der erste Chirurg der eine Technik beschrieb, mit der man die Stümpfe eines zerteilten Nervs wiederzusammenfügt. Seine Technik umfasste bereits die präzise Identifikation der Nervenstümpfe (34).

Die Beschreibung der Schwann-Zellen durch Schwann 1839 und der Waller-Degeneration 1850 durch Waller förderten das Verständnis und Interesse der Wissenschaft am peripheren Nervensystem. Schließlich führte Hueter (1871) das Konzept der primären epineuralen Nervennaht ein. Auch der Gedanke, dass eine möglichst geringe Spannung auf der Koaptationsstelle lasten sollte, wurde bereits früh beschrieben. Mikulicz beschrieb 1882 Nähte, die diese Spannung reduzieren sollten. Loebke versuchte 1884 das Prinzip der Knochenverkürzung zur Reduzierung der Spannung (33;35).

1876 beschrieb Albert die Gewinnung von Nerventransplantaten. Viele Erfahrungen zur Nerven Chirurgie wurden im Ersten und im Zweiten Weltkrieg gesammelt bei der Behandlung von Kriegsverletzungen (33;36). In den Weltkriegen wurden die Nerven zumeist unter Spannung zusammengebracht, was zusammen mit der hohen Infektionsrate zu schlechten Ergebnissen hinsichtlich ihrer Funktion führte (37). Erst die Einführung des Operationsmikroskops im 20. Jahrhundert, welches 1921 durch den Hals-Nasen-Ohren-Arzt Carl-Olof Nylén erstmals tierexperimentell eingesetzt wurde und die nachfolgende Entwicklung mikrochirurgischer Techniken und Geräte in den 50er und 60er Jahren ermöglichten die Nerven Chirurgie wie wir sie heute kennen (38).

Histopathologie der Nervenregeneration

Nach einer kompletten Nervendurchtrennung kommt es zu verschiedenen zellulären Veränderungen und Wechselwirkungen. Sowohl Makrophagen als auch Schwann-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der axonalen Regeneration und Remyelinisierung, indem sie mitogene und wachstumsfördernde Faktoren sezernieren (39). Diese Neurotrophine diffundieren über das Verletzungsgebiet hinweg und üben auf die aussprossenden Axone des proximalen Stumpfes einen Wachstumsreiz aus. Kommen die Schwann-Zellen schließlich mit regenerierenden Axonen in Kontakt, wird eine zweite Phase der Schwannzell-Proliferation induziert, vermittelt durch einen gliazellspezifischen neuronalen Wachstumsfaktor.

Im distalen Nervenstumpf findet nach Durchtrennung des Axons die Waller-Degeneration statt. Neben den Umbauprozessen im distalen Teil des verletzten Axons finden auch im proximalen Stumpf zu einem geringeren Anteil retrograde Umbauvorgänge statt.

Im Zellkörper des Neurons kann man die Fragmentierung des Golgi-Apparates, die Vakuolisierung des Protoplasmas und die Verlagerung des Zellkerns aus der Mitte an den Rand der Zelle beobachten. Die Nissl-Substanz geht verloren.

Am Ort der Nervenverletzung und distal davon ist zunächst ein Anschwellen der Axone zu erkennen. Dann folgen die Fragmentierung der Neurofilamente und das Ablösen der Myelinscheide. Nach etwa 2 – 3 Tagen bricht das aufgequollene Axon auseinander. Die Myelinscheide zerfällt schließlich in Fragmente. Diese werden zusammen mit dem Axon-Debris von eingewanderten Phagozyten abgeräumt. Die Schwann-Zellen reagieren auf die Schädigung des Axons mit einer Steigerung der Aktivität. Die Apparate der Proteinsynthese werden aktiviert und die mitotische Aktivität wird angeregt. Nach 2 Wochen nimmt die Schwann-Zell-Aktivität langsam wieder ab und die Anzahl der eingewanderten Makrophagen reduziert sich ebenfalls deutlich zum Ende der vierten Woche. Die in den Endoneuralschäuchen verbleibenden Schwann Zellen bilden mit diesen zusammen die sogenannten Hanke-Büngnerschen-Bänder, die das unterstützende Grundgerüst für die

nachfolgende Regeneration, also das Aussprossen der Axone, darstellen (40). Nach einer Nervenverletzung werden die Faktoren Nerve growth factor (NGF), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin 4 (NT-4) und p75 hochreguliert, NT-3 hingegen nicht. Man geht davon aus, dass der kombinierte Anstieg von NGF und p75 die Proliferation und Migration der Schwann-Zellen unterstützen könnte. Durch den gestörten retrograden Transport nach Axonverletzung kommt es teilweise zum Untergang von Neuronen. McKay Hart et al. wiesen eine Apoptose von 35 % der Hinterwurzelganglienzellen nach Axonotomie nach (41). Motorische Neurone scheinen zwar weniger empfindlich zu sein, aber auch sie sind bei Axonschädigungen zelltotgefährdet (41).

Das Axonwachstum beträgt nach einsetzender Regeneration durchschnittlich 1 - 2 mm pro Tag. Nach der Initialverzögerung ist die Wachstumsgeschwindigkeit zunächst etwas höher und nimmt dann ab, je näher die Axone ihrem Ziel kommen (37;40).

Das Aussprossen der Axone wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst, die noch nicht vollständig erforscht sind. Es wird angenommen, dass die Mikroumgebung, wie die benachbarten Schwann-Zellen, verschiedene lokale Faktoren freisetzt, die das Axonwachstum fördern und lenken (20).

Nervenkoaptation (Neurorrhaphie)

Die direkte Koaptation ist der Defektüberbrückung mittels eines Nerven­transplantates überlegen, da nur eine Koaptationsstelle von den aussprossenden Axonen durchwachsen werden muss. Steht die Koaptationsstelle jedoch unter Spannung, ändert sich das Bild zugunsten des Nerven­transplantats, da Nerven gegenüber Druck und Zug sehr empfindlich sind (42;43). Entscheidende Faktoren für das Ergebnis der Nervenregeneration sind neben dem Patientenalter die Höhe der Läsion (wobei weiter distal gelegene Verletzungen eine bessere Prognose aufweisen) und die Zeitspanne, die zwischen der Verletzung und der Operation liegt (44). Vergehen mehr als zwei Jahre ist die Chance auf eine erfolgreiche Regeneration minimal, da die Aktivität der Schwann-Zellen und die Funktionalität der Endorgane immer weiter abnimmt(36;37).

Nerven­transplantation

Wenn die direkte Koaptation eines Nervs nicht spannungsfrei möglich ist, ist das autologe Nerven­transplantat zurzeit der Goldstandard der Versorgung (13). Die Verwendung allogenen oder xenogenen Gewebes ist wegen der nötigen Immunsuppression unüblich, zumal die Ergebnisse hinter denen der autologen Transplantate zurückstehen (45).

Da die Nerven­transplantate zunächst nur über Diffusion ernährt werden, ist ein schneller Anschluss an das Gefäßnetz im Empfänger­gebiet erforderlich, um eine optimale Versorgung der Schwann-Zellen zu gewährleisten. Hier könnten die angiogenetischen Eigenschaften von Erythropoietin einen Vorteil für die Nervenregeneration erbringen.

Tubulisation

Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit und der begleitenden Entnahmemorbidiät autologer Nerventransplantate, gibt es zahlreiche Untersuchungen zu möglichen Alternativen. Für die Verwendung als „Nervenröhrchen“ bieten sich grundsätzlich sowohl biologische als auch artifizielle Materialien an. Solche Conduits sollen nicht nur als führendes Gerüst fungieren, sondern auch eine Barriere zur Umgebung bieten, so dass die Konzentration der vom Stumpf ausgeschütteten Wachstumsfaktoren auf einem hohen Niveau bleibt. Über kurze Distanzen brachte die Verwendung von Venen gute Ergebnisse, jedoch bleiben die Nachteile der Spendermorbidity und der längeren Operationszeit bestehen. Zudem tendieren Venentransplantate dazu zu kollabieren (46). Auch Arterien, dekalzifizierter Knochen oder denaturiertes Muskelgewebe (47;48) wurden auf ihre Tauglichkeit hin untersucht.

Artifizielle Conduits können aus verschiedenen Materialien gewonnen werden, am häufigsten werden Kollagen oder Polymere verwendet (14;49-52). Die Materialien müssen biokompatibel sein und möglichst wenig toxische Nebeneffekte besitzen. Der Durchmesser der Conduits lässt sich entsprechend der Lokalisation des Defekts anpassen, um eine optimale Führung ohne Einengung zu gewährleisten. Ebenso wie bei den biologischen Conduits muss bei artifiziellen Conduits ein neues Kapillarnetz entstehen. Zudem fehlt leeren Röhrchen der positive Effekt der Wachstumsfaktoren, welche unter anderem von den Schwann-Zellen ausgeschüttet werden (53).

Conduits bieten jedoch die Möglichkeit zusätzliche chemische Stimulantien und neurotrophe Faktoren, wie Glial growth factor (GGF), Nerve growth factor (NGF), Ciliary neurotrophic factor (CNTF), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) oder Neurotrophin 3 (NT-3) von extern hinzuzufügen oder sie mit kultivierten Schwann-Zellen anzureichern (15;53;54). Auch die Verwendung von Kollagengels, als Reservoir für im Lumen gebildete Neurotrophine sowie longitudinal ausgerichteter Polyglactin-Filamente oder PDS-Filamente (Polydioxanone) als

zusätzliche innere Leitstruktur wurden untersucht (17;55). Es ist weitgehend anerkannt, dass die Regeneration der Axone in nicht-nervalen Transplantaten und Conduits über längere Strecken versagt, da in ihnen nicht genügend lebende Schwann-Zellen vorhanden sind, die durch die Bereitstellung neurotropher und neurotroper Faktoren eine wesentliche Rolle für das Axonwachstum spielen (53).

Erythropoietin

Das humane Erythropoietin (Epo) ist ein saures Glykoproteinohormon mit einer Molekülmasse von 30,4 kDa (siehe Abbildung 3), das die Produktion der roten Blutkörperchen reguliert.

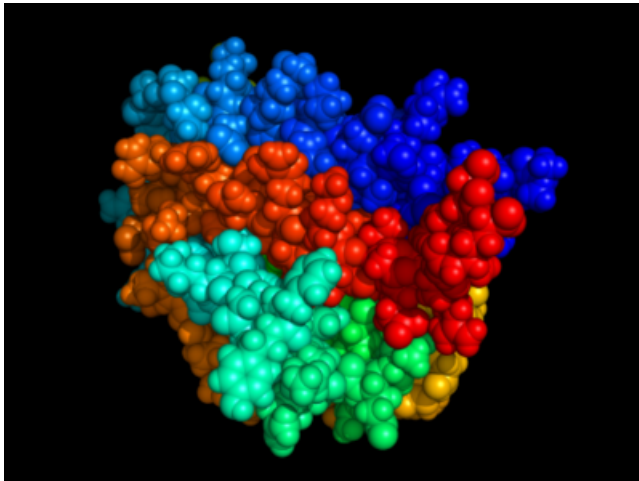


Abb.3: Kalottenmodell Erythropoietin (56)

Die normale Konzentration von aktivem Epo im Serum oder Plasma beträgt beim Gesunden etwa 15 IU/L. Beim Erwachsenen wird das Hormon überwiegend in den peritubulären Zellen der Nieren gebildet und zu einem geringen Teil (5 – 15 %) in den Hepatozyten. Beim Fetus ist die Leber der Hauptsyntheseort. Erythropoietin fördert das Überleben der roten Blutkörperchen, indem es den programmierten Zelltod (Apoptose) verhindert. Zusammen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren Stem cell factor (SCF), Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Interleukin-3 (IL-3) und Insulin-like growth factor (IGF-1) steuert Epo die Differenzierung von erythroiden Progenitorzellen zu Proerythroblasten. Daraus resultiert eine Erhöhung der Produktion roter Blutkörperchen (Erythrocyten) (57).

Das gebildete Hormon bindet an seinen Rezeptor (EpoR) auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen. Dieser besteht aus p66-Protein, das nach der Aktivierung dimerisiert wird und zwei weiteren Proteinen. EpoR findet man außer auf Erythrocyten noch auf vielen anderen Zellen, wie Knochenmarkzellen, Lymphozyten, Megakaryozyten, Endothelzellen (58), Myokardzellen, Zellen der glatten Muskulatur, Prostatazellen sowie auf Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems (59). Epo spielt somit in verschiedenen intrazellulären Stoffwechselwegen eine Rolle. Erythropoietin hat außer der Stimulation der Angiogenese noch weitere Funktionen wie die Erhöhung des Serum-Renins und die Stimulation der Proliferation glatter Muskelzellen und Gefäßendothelien (60). Durch die Proliferationssteigerung von Epithelzellen fördert es beispielsweise die Neovaskularisation in vivo. Eine neuroprotektive Wirkung nach Ischämie konnte für das zentrale Nervensystem nachgewiesen werden. In klinische Studien konnte ein positiver Effekt für rhEpo bei Patienten gezeigt werden, die einen Schlaganfall erlitten hatten (61). Nach der Verletzung peripherer Nerven konnte im Experiment ein erhöhter Epo-Spiegel in der Nähe der Läsion festgestellt werden. Die Aktivierung von EpoR führt zur Aktivierung der Janus-Tyrosinkinase-2 (JAK2), die für die Phosphorylierung des Epo-Rezeptors und anderer Proteine verantwortlich ist. Für das Zentrale Nervensystem konnte eine erhöhte Neuronen-Regeneration über diesen Signalweg gezeigt werden (62). Man nimmt an, dass die erhöhte Epo-Konzentration über die JAK2-Aktivierung zu einer verstärkten Proliferation der umliegenden Schwann-Zellen führt. Auch undifferenzierte Schwann-Zellen werden durch Epo zur Proliferation angeregt (63). Digicaylioglu und Lipton zeigten 2001, dass Erythropoietin im zentralen Nervensystem die Apoptose geschädigter Neurone verhindern kann. Keswani et al. schreiben dem Hormon zusätzliche schützende Eigenschaften zu (64). Epo soll die axonale Degeneration verhindern. Als Signalstoff fungiert Stickstoffmonoxid (NO), welches die Erythropoietin-Produktion der benachbarten Schwann-Zellen stimuliert. Das von den Schwann-Zellen gebildete Epo aktiviert einen „axonoprotektiven“ Stoffwechselweg. Andere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Verringerung der inflammatorischen Reaktion nach einer

Nervenverletzung. Die Waller-Degeneration und neuropathische Schmerzen/Hyperalgesie werden durch Pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) vermittelt. Für rhEpo konnte gezeigt werden, dass es die Konzentration von TNF- α mRNA und die axonale Degeneration im Rattenmodell signifikant vermindert. Ein direktes Entgegenwirken der TNF- α -Signaltransduktion, die zu Degeneration und neuropathischen Schmerzen führen, scheint ebenfalls möglich zu sein (65).

Wang et al. zeigten, dass Erythropoietin die Angiogenese steigert und bei Ratten nach einem Schlaganfall die neurologische Funktion verbessert (66).

Bereits 1942 beschrieb Weddell eine erhöhte Rate der Nervenregeneration in der Nähe größerer Blutgefäße (67;68). Ebenso scheinen die axonale Degeneration und Regeneration Veränderungen in der Anzahl der benachbarten Kapillaren (69) oder in deren Permeabilität (70) zu verursachen und deuten so ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen regenerierenden Axonen und Blutgefäßen hin (68). Durch Zugabe von VEGF in Matrigel-enthaltende Nervenröhrchen konnten Hobson et al. eine Erhöhung der Anzahl penetrierender Blutgefäße erreichen und die korrelierende Erhöhung der axonalen Regeneration und der Schwann-Zell-Migration nachweisen (71). Dies deutet auf einen engen Zusammenhang zwischen regenerierenden Axonen und Blutgefäßen innerhalb des Conduits hin. Die zentrale Rolle der Schwann-Zellen für die Regeneration des Nervs ist ein entscheidender Ansatz für adjuvante Therapieprinzipien. Durch eine schnelle Wiederherstellung der nutritiven Versorgung der Schwann-Zellen, könnte die Sekretion neurotroper und neurotropher Faktoren erhöht werden und zu einer vermehrten Expression von Zelladhäsionsmolekülen (cell adhesion molecules (CAMs)) führen (20). Penkert konnte experimentell sicher nachweisen, dass frei verpflanzte Transplantate vom Kaliber eines Hautnerven aus dem Transplantatbett heraus durch wiedereinsprossende Mikrogefäße innerhalb von drei Tagen revaskularisiert werden (72). Ein früher Wiederanschluss intraneuraler Gefäße lässt eine Verbesserung des Regenerationsergebnisses vermuten.

Fragestellung

Trotz früher Diagnosestellung, moderner chirurgischer Methoden und exakter Koaptation, wird nach der Verletzung eines peripheren Nervs das Ausgangsniveau nicht wieder erreicht.

Pharmakologische und chirurgische Versuche die Nervenregeneration zu verbessern, zielen darauf ab, die Anzahl von Axonen, die das richtige Zielorgan erreichen, zu erhöhen bzw. ihre Regeneration zu beschleunigen.

Für die Beeinflussung der Degeneration, der Neuronenapoptose und der axonalen Regenerationsrate sowie der Revaskularisation ist Erythropoietin ein vielversprechendes Agens.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung, ob durch die systemische Gabe von rekombinantem humanen Erythropoietin (rhEpo) im Tiermodell eine Verbesserung der peripheren Nervenregeneration gegenüber der Placebogabe erzielt werden kann. Untersucht wird sowohl die Regeneration über das autologe Nerventransplantat als auch bei Überbrückung der Nervendefektstrecke durch ein kollagenes Nervenröhrchen.

Ein weiteres Ziel war die Entwicklung eines Computerprogrammes zur Auswertung histologischer Schnittbilder. Die Auswertung histologischer Schnitte ist zeitaufwändig und untersucherabhängig. Zur Vereinfachung und Standardisierung der quantitativen Bestimmung entwickelten wir ein halbautomatisches, computergestütztes Programm zur Zählung myelinisierter Axone.

Material und Methoden

Studienmodell

Die Regeneration peripherer Nerven wird beispielhaft am N. ischiadicus der Ratte untersucht. Aufgrund seiner topographischen Beziehungen und seiner Größe wird dieser Nerv häufig als Modell herangezogen (73-76).

Die Versuche werden an 32 weiblichen Ratten der Gattung Lewis (Züchtung Charles River) mit Genehmigung der Tierschutzkommission nach §15 des Tierschutzgesetzes durchgeführt (Tierversuchsnummer: 27/s/07).

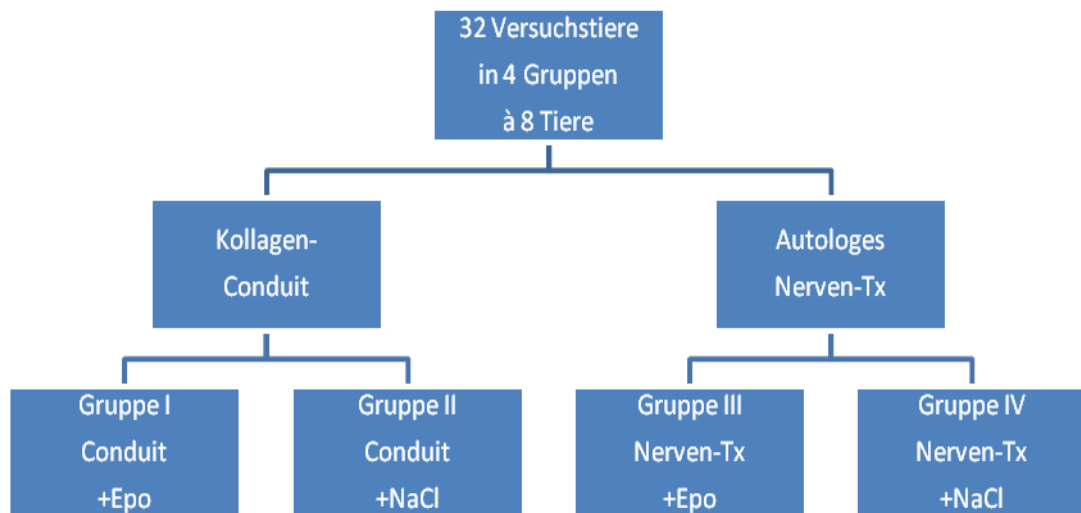
Die Unterbringung der Tiere erfolgt paarweise unter Standardbedingungen (Temperatur 19 – 22 °C, Luftfeuchtigkeit 40 – 50 %) mit einem Tag-Nachtrhythmus von 12:12 Stunden und Zugang zu Wasser und Futter (Standardfutter) ad libitum. Zum Zeitpunkt der Operation sind die Ratten zwischen 6 und 8 Wochen alt und wiegen durchschnittlich 141 g (107-173 g). Die Zeitspanne zwischen Operation und Zeitpunkt der Auswertung der Nervenregeneration beträgt 7 Wochen. Dieses Intervall wurde bewusst früh gewählt, da zu diesem Zeitpunkt eine eingesetzte aber noch nicht abgeschlossene Nervenregeneration zu erwarten ist, die eine sensitivere Aussage über Unterschiede hinsichtlich Geschwindigkeit und Qualität der frühen Nervenregeneration ermöglichen sollte.

Studiendesign

Bei einer Gesamtzahl von 32 Ratten wird die Regeneration des N. ischiadicus nach Setzen eines 12 mm langen Defektes und nachfolgender Rekonstruktion durch Nervenröhrchen bzw. autologe Nerven transplantation in Abhängigkeit von systemischer Erythropoietingabe untersucht. Die Tiere werden in vier Gruppen à 8 Tiere unterteilt. In den Placebo-Vergleichsgruppen erfolgt die Applikation von isotonomischer NaCl-Lösung. Das autologe Nerven transplantat ist zurzeit der Goldstandard bei der Überbrückung peripherer Nervendefekte. Während hierbei der transplantierte Anteil als biologische Schienung für die vorwachsenden Axone dient, erfordert die Implantation eines Nervenröhrchens eine komplett neue Einwanderung

und Ausbildung von Nervenscheidenzellen und innerer Leitstruktur. Die Wachstumsrate des N. ischiadicus der Ratte beträgt etwa 0,35 mm/d (52;77).

Tabelle der Versuchsgruppen:



In **Gruppe I** (Conduit-rhEpo) wurde den Tieren ein Kollagen-Röhrchen von 14 mm Länge zur Überbrückung eines Nervendefektes von 12 mm eingesetzt. Die Koaptation erfolgte mittels je einer epineuralen 10/0 U-Naht (Ethilon®, Ethicon, Norderstedt). Postoperativ wurden die Tiere über 14 Tage systemisch mit Erythropoietin (NeoRecormon®, Roche, Welwyn Garden City, UK)(1000 IE/kg KG s.c.) behandelt (siehe Abbildungen 4a und 4b).

Gruppe II (Conduit-NaCl) diente als Kontrolle zu Gruppe I. Bei gleicher operativer Technik erfolgte die postoperative systemische Gabe von 0,5 ml NaCl 0,9 % s.c. (siehe Abbildungen 4a und 4b).

In **Gruppe III** (NTx-rhEpo) wurde ein 12 mm langes Stück des N. ischadicus entnommen, invertiert wieder eingebracht und mit je 3 epineuralen 10/0 U-Nähten (Ethilon®) koaptiert. Postoperativ wurden die Tiere über 14 Tage systemisch mit Erythropoietin (1000 IE/kg KG s.c.) behandelt (siehe Abbildungen 4c und 4d).

Gruppe IV (NTx-NaCl) diente als Kontrolle zu Gruppe I. Bei gleicher operativer Technik erfolgte die postoperative systemische Gabe von 0,5 ml NaCl 0,9 % s.c. (siehe Abbildungen 4c und 4d).

a)

b)

c)

d)

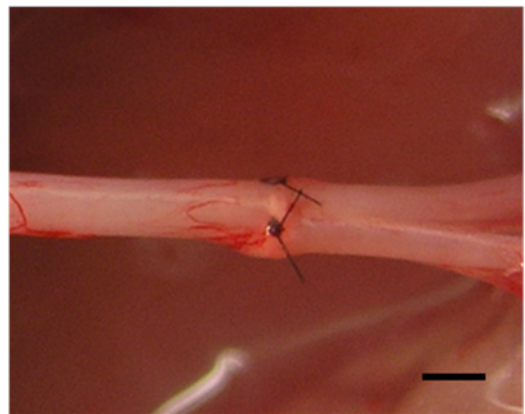
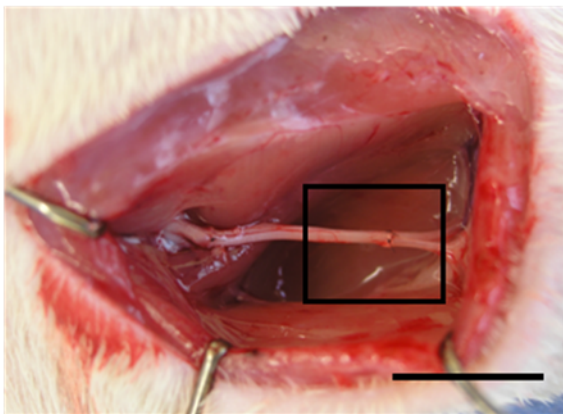
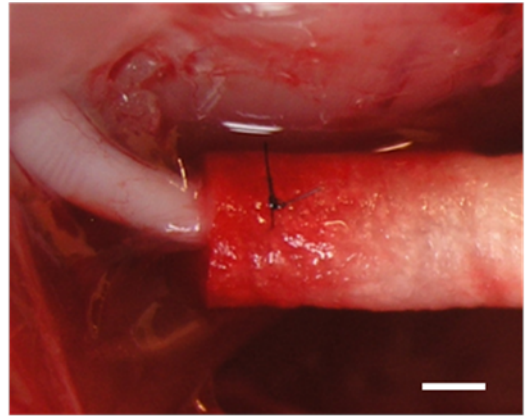
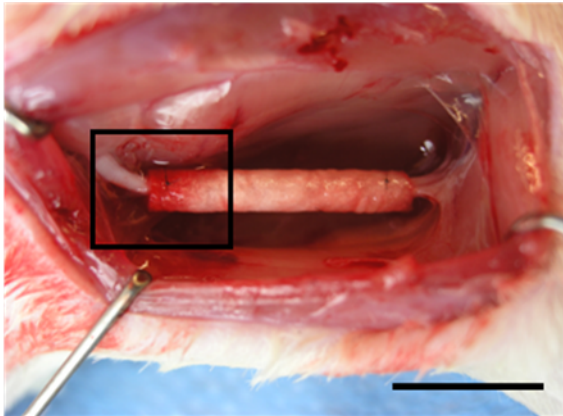


Abb. 4a-d

Modell der Nervenregeneration: N. ischiadicus der Ratte

Überbrückung eines verursachten 12 mm Nervendefektes mittels Kollagen-Conduit (16 Tiere) (4a, 4b).

Simulation der autologen Transplantation durch Entnahme eines 12 mm langen Abschnitts des N. ischiadicus und invertierte Transplantation desselben (16 Tiere)(4c, 4d). Der Skalierungsbalken entspricht 10 mm (4a, 4c) bzw. 1 mm (4b, 4d).

Kollagen-Conduit

In den Gruppen I und II wurden als Leitstruktur für die aussprossenden Axone Kollagen-Conduits der Firma Integra verwandt (NeuraGen, Peripheral Nerve Guide, Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ 08536 USA; REF: 33015-2001-0) (siehe Abbildung 5). Die semipermeablen Kollagenröhrchen sind inert und im feuchten Zustand weich, biegsam und bruchfest. Die Röhrchen sind in verschiedenen Größen erhältlich, ihr Innendurchmesser reicht von 1,5 bis 7 mm. Die vollständige Resorption des Materials erfolgt über 36 Monate. Die von uns gewählten Röhrchen weisen eine Länge von 14 mm und einen Innendurchmesser von 1,5 mm auf. Der Außendurchmesser beträgt im Feuchtzustand 2,5 mm. Somit ergibt sich eine Wandstärke von 0,5 mm.



Abb. 5:

Integra NeuraGen,

Nervenröhrchen aus Kollagen I,

Innendurchmesser 1,5 mm

(vergrößerte Abbildung, Skalierung in 0,5 mm Schritten).

Die Conduits werden aus bovinem Kollagen I hergestellt und sind für die klinische Verwendung zugelassen. Sie erfüllen die Sicherheitsstandards für implantierbare medizinische Materialien (International Organization for Standardisation ISO-10993-1:1992 (E) Biological evaluation of medical devices – Part 1: Guidance

on selection of tests). Bei der gewählten Defektlänge von 12 mm ist eine verminderte Regeneration gegenüber dem autologen Nerven­transplantats zu erwarten.

Operationstechnik und Anästhesie

Allen Tieren wird zur eindeutigen Zuordnung eine fortlaufende Nummer gegeben. Die Narkose erfolgt durch die intraperitoneale Injektion von Hellabrunner Mischung, d.h. Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun®, Bayer, Leverkusen) und Ketamin S 25mg/ml (Ketanest S®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin) im Verhältnis Xylazinhydrochlorid : Ketanest S 1:15 nach vorangegangener CO₂-Inhalationnarkose.

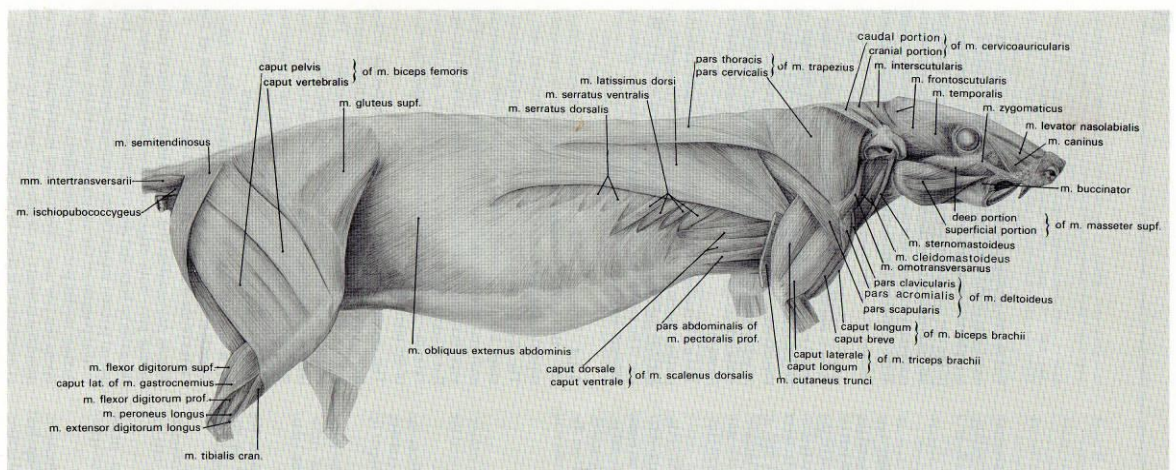
Der rechte Hinterlauf der Tiere wird als Versuchsextremität ausgewählt. Die linke hintere Extremität dient bei der Auswertung der Muskelgewichte als Kontrolle.

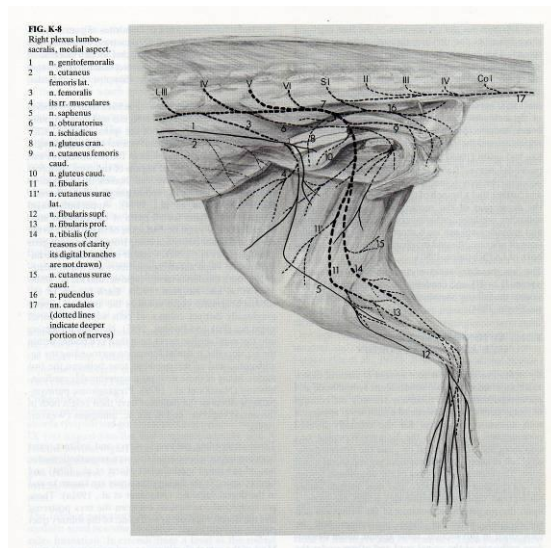
Die Tiere werden nach Rasur des unteren Rückens und der Glutealregion in Bauchlage fixiert. Die Operationen erfolgen unter dem Operationsmikroskop (Carl Zeiss, Jena) in mikrochirurgischer Technik unter sterilen Bedingungen.

Die Freilegung des N. ischiadicus erfolgt ausschließlich rechtsseitig von dorsal. Nach scharfem Durchtrennen der Haut im Bereich der mittleren Oberschenkelrückseite auf einer Länge von 2 cm wird nach sparsamer subkutaner Präparation das Intervall zwischen den Mm. tensor fasciae latae und gluteus superficialis kranial und dem M. biceps femoris kaudal aufgesucht. In diesem Bereich wird die Faszie mit der Schere beginnend vom proximalen Oberschenkel­drittel bis zum proximalen Unterschenkel­drittel scharf gespalten (siehe Abbildung 6a). Zwischen obigen Muskeln wird stumpf in die Tiefe bis auf den N. ischiadicus präpariert und dieser in mikrochirurgischer Technik in der Länge vom Hüftgelenk bis zur Trifurkation in N. tibialis, N. fibularis communis und N. suralis dargestellt (siehe Abbildung 6b).

Abb. 6a (oben): Oberflächliche Muskulatur, Ansicht von lateral (Zugang rot markiert)
 aus R. Hebel, M. W. Stromberg, Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat, S.26 (1).

Abb. 6b (links): Rechter Plexus lumbosacralis, Ansicht von medial
 aus R. Hebel, M. W. Stromberg, Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat, S.183 (1).





Für das Modell des autologen Nerventransplantats (Gruppe III und IV) wird der Nerv mit der mikrochirurgischen Schere mit Wellenschliff zweimal scharf durchtrennt, so dass ein Stück von 12 mm Länge entnommen werden kann. Der entnommene Nervenabschnitt wird invertiert und End-zu-End mit je drei epineuralen U-Nähten (Ethilon® 10/0, Ethicon, Norderstedt) proximal und distal spannungsfrei rekoaptiert, um ein autologes Nerventransplantat zu simulieren. Die Invertierung erfolgt, um eine unter klinischen Bedingungen unrealistische, genaue anatomische Übereinstimmung beider Enden an den Nahtstellen zu verhindern.

Die Tiere der Gruppen I und II erhalten ein Kollagen-Conduit (NeuraGen Peripheral Nerve Guide, Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ 08536 USA). Der N. ischiadicus wird über den gleichen Zugang auf der rechten Seite dargestellt und ebenfalls zweimal im Abstand von 12 mm scharf durchtrennt. Das herausgetrennte Stück wird verworfen, um an seiner Stelle ein Kollagen-Conduit von 14 mm Länge

einzubringen. Dafür werden die in situ verbliebenen Nervenstümpfe 1 mm überlappend mittels je einer epineuralen U-Naht (Ethilon® 10/0, Ethicon, Norderstedt) proximal und distal unter operationsmikroskopischer Vergrößerung spannungsfrei im Nervenröhrchen fixiert (siehe Abbildung 7). Dabei wurde darauf geachtet, die Nervenenden nicht zu verdrehen, um die Orientierung der Faszikel nicht zu verändern.

Um zu vermeiden, dass es zu einem Einbluten in das Conduit-Lumen kommt, werden alle Conduits nach dem Einbringen und Fertigstellen der Nähte über eine feine Kanüle mit isotonischer Kochsalzlösung gespült (siehe Abbildung 7).

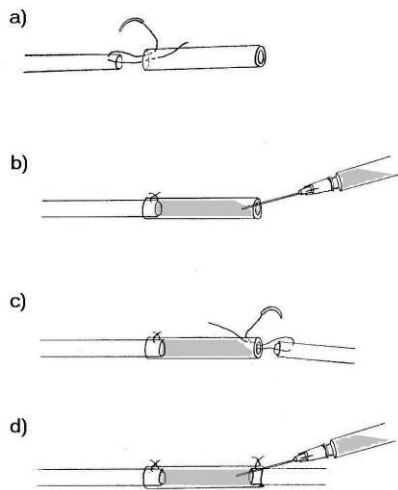


Abb. 7:
Fixierung der Nervenstümpfe im Kollagen-Conduit
mittels epineuraler Nähte.

In allen Gruppen erfolgt der schichtweise Verschluss von Muskulatur und Haut mit Einzelknopfnähten (Serafit® 4/0, Serag-Wiessner KG, Naila).

Nach Ablauf von sieben Wochen werden die Tiere unter CO₂-Narkose durch eine intraperitoneale Überdosis Hellabrunner Mischung (Ketanest S/Rompun 2 %) gemäß der Richtlinien der Tierschutzkommission getötet. Es erfolgt die erneute Freilegung des N. ischiadicus rechts über den bereits verwendeten Operationszugang und die Entnahme des Nervs bzw. des Conduits inklusive der angrenzenden Nervenenden. Das entnommene Präparat wird nach eindeutiger Fadenmarkierung (Prolene® 8/0, Ethicon, Norderstedt) von proximalem und distalem Ende des Transplantats sowie der Trifurkation, in der Mitte mittels mikrochirurgischer Wellenschliff-Schere unter dem Operationsmikroskop scharf durchtrennt. Der proximale Anteil und die Trifurkation werden in Glutardialdehyd 3,9 % gegeben, während der distale Anteil in Formaldehyd 3,9 % gegeben wird, um sie für die nachfolgenden histologischen Färbungen zu fixieren (siehe Abbildungen 8a und 8b).

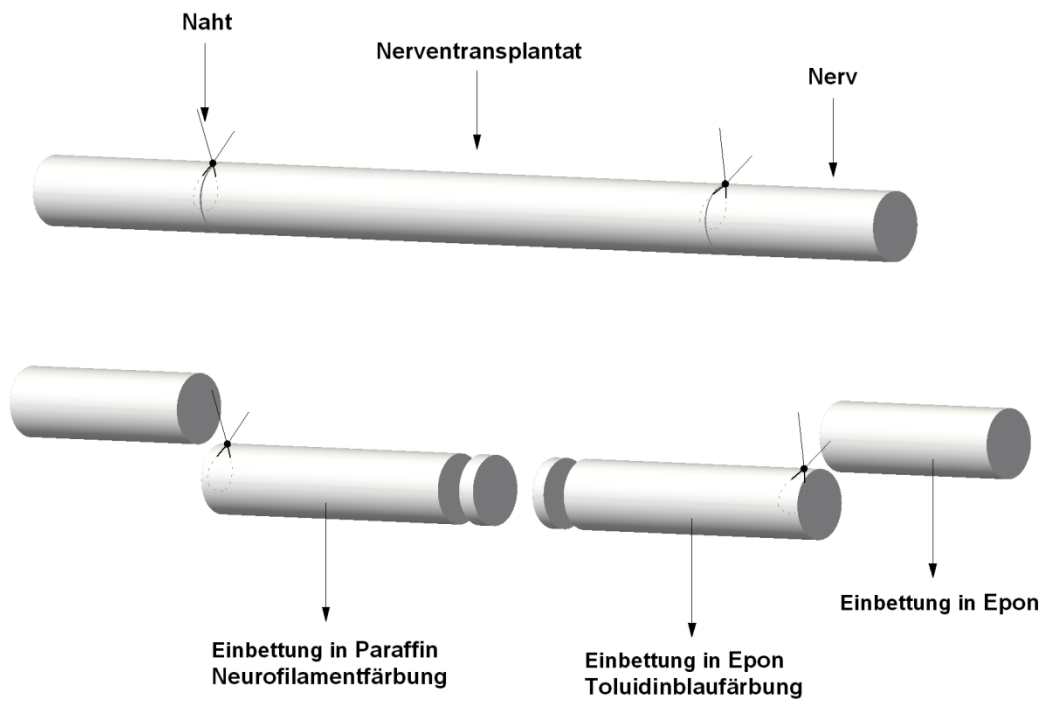


Abb.: 8a

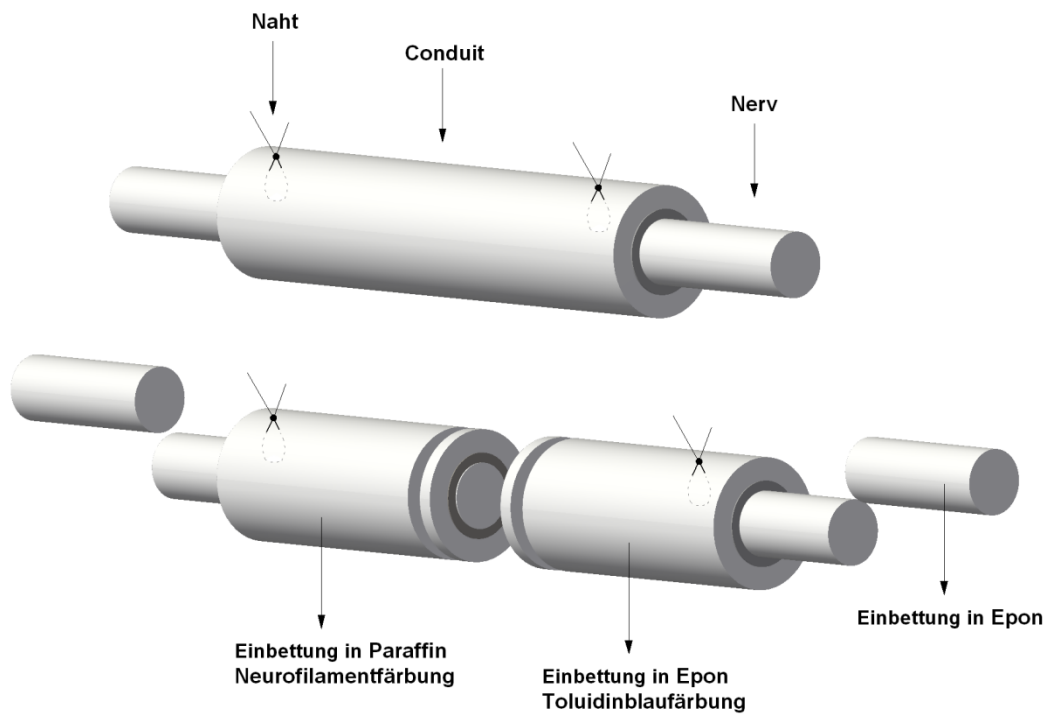


Abb.: 8b

Abb. 8a und 8b: Schematische Darstellungen der histologischen Präparate. Die Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgt aus der Mitte des Präparates von den einander zugewandten Seiten

Fadenmarkierung und Einbettung der Teilpräparate in Paraffin bzw. Epon und entsprechende Färbung (Vektorworks 2008).

8a: Nerventransplantat.

8b: Conduit-Präparat.

Weiter werden nach der Abpräparation von Fell und Subkutangewebe, die verschiedenen Hinterlaufmuskeln durch stumpfe Präparation voneinander getrennt, um dann die Mm. tibialis anterior et gastrocnemius mit ihren Faszien scharf an Ansatz und Ursprung abzusetzen (siehe Abbildung 9). Der M. soleus verbleibt in situ. In gleicher Weise erfolgt die Entnahme der genannten Muskeln der kontralateralen Extremität.

Von allen entnommen Muskeln wird das Feuchtgewicht in Gramm erhoben und der Quotient der operierten zur kontralateralen Seite als Maß der Muskelatrophie bestimmt (78).

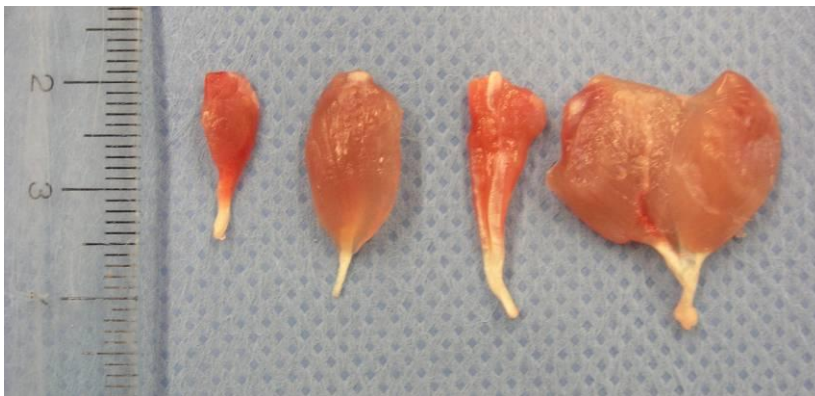


Abb. 9: Muskelpräparate vor der Fixierung.
Von links: M. tibialis rechts, M. tibialis links, M. gastrocnemius rechts, M. gastrocnemius links. Bereits makroskopisch zeigt sich eine deutliche Atrophie der Muskulatur der operierten Extremität.

Er

ythropoietin

Die Tiere wurden mit rekombinantem humanen Erythropoietin beta (rhEpo) der Firma Roche behandelt (NeoRecormon® 5000IE, Injektionslösung in Fertigspritzen

à 300µl, Roche, Welwyn Garden City, UK). Erythropoietin beta wird gentechnisch aus transformierten Ovarialzelllinien des Chinesischen Hamsters hergestellt.

Humanes Erythropoietin (rhEpo) ist ein saures Glykoproteinormon mit einem Molekulargewicht von 30,4 kDa. Das Molekül besteht aus 165 Aminosäuren, die sich zu vier antiparallelen Alpha-Helices auffalten. Erythropoietin ist ein wichtiger Wachstumsfaktor in der Hämatopoiese (Erythropoiesis Stimulating Agents). Das Hormon wirkt auf die Differenzierung von BFU-E (Erythroid Burst Forming Unit) zu CFU-E (Erythroid Colony Forming Unit) und CFU-E zu Pronormoblasten. (Die BFU-E sind zuvor aus pluripotenten CFUs (Colony Forming Unit) entstanden). Hypoxie stimuliert die Synthese von Erythropoietin und somit die Differenzierung von Erythrozyten.

Epo wird überwiegend in peritubulär gelegenen Endothelzellen der Niere gebildet (85-90%) und zu einem geringen Anteil (10-15%) in den Hepatozyten der Leber. Die Hormonkonzentration beim gesunden Menschen beträgt 19 mU/ml. Der Abbau erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose in Lysosomen.

Den Tieren der Gruppen I und III wird rhEpo injiziert. Die fertige Injektionslösung wird auf eine Konzentration von 0,35 IU/µl verdünnt und in einer Dosierung von 1000 IU/kg KG s.c. appliziert.

Die Injektion der Lösung (0,5 ml) erfolgt täglich subkutan in die Bauchwand der Tiere (rechts und links im täglichen Wechsel). Die erste Gabe erfolgt direkt postoperativ und wird an den ersten 14 postoperativen Tagen wiederholt. Es ergibt sich eine Gesamtdosis von 2100 – 2625 IE rhEpo pro Tier.

Bei den Kontrollgruppen II und IV erfolgt die tägliche Gabe von 0,5 ml NaCl-Lösung 0,9 %.

Untersuchungsmethoden

Pinch-Test

Nach sieben Wochen wird den Tieren ein plantarer Schmerzreiz an der operierten hinteren Extremität gesetzt. Ein Zurückziehen des Beines als Reaktion auf den

gebotenen Reiz wird als positives Ergebnis gewertet. Erfolgt keine Reaktion gilt das Ergebnis als Pinch-Test-negativ.

Das Testergebnis lässt Rückschlüsse auf ein Wiederkehren der sensiblen Innervation zu.

Muskelmassenquotient

Der M. gastrocnemius und der M. tibialis anterior werden vom N. tibialis bzw. N. peroneus profundus aus dem N. ischiadicus innerviert. Bei Verletzung des Nervs kommt durch die Denervation zur Atrophie der Muskulatur. Die Muskelmasse dient somit als Parameter für die Wiederkehr der motorischen Funktion eines Muskels. Bei erfolgreicher Reinnervation sollte sein Gewicht zunehmen. Für die Beurteilung berechnet man das relative Muskelgewicht (78;79). Am 48. postoperativen Tag werden jeweils der M. tibialis anterior und der M. gastrocnemius der Versuchsextremität und der kontralateralen Seite entnommen. Das Feuchtgewicht wird auf drei Nachkommastellen genau in Gramm bestimmt und als Quotient ausgewertet (80). Der Quotient berechnet sich aus dem Feuchtgewicht des jeweiligen Muskels der Versuchsextremität und dem Feuchtgewicht des entsprechenden Muskels der kontralateralen Seite (siehe Abbildung 9).

Für die statistische Auswertung verwendeten wir den Mann-Whitney-U-Test, der bevorzugten Testmethode für Werte, die nicht einer Normalverteilung entsprechen.

Berechnung des Muskelmassenquotienten:

$$Q_{gc} = \frac{\text{Gewicht M. gastrocnemius Versuchsseite [in g]}}{\text{Gewicht M. gastrocnemius Kontrollseite [in g]}}$$

Einige Muskelpräparate werden für eine qualitative histologische Analyse in Formaldehyd 4% fixiert und in Paraffin eingebettet.

Histologie / Immunhistologie

Die entnommenen Nervenpräparate werden der histologischen Aufarbeitung zugeführt.

Vom proximalen Anteil und der Trifurkation werden immunhistochemisch gefärbte Paraffinschnitte angefertigt, während der distale Anteil zur Darstellung der Myelinscheiden dient (Toluidinfärbung im Semidünnschnitt (Epon)). Die Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgt aus der Mitte des Präparates von den einander zugewandten Seiten (siehe Abbildungen 8a und 8b). Somit kann die Anzahl und die Verteilung der aussprossenden Axone in der Transplantatmitte anhand unterschiedlicher Färbetechniken dargestellt werden und der Fortschritt des konusförmigen Wachstums des Nervs beurteilt werden. Die Auswertung auf Höhe der Trifurkation erfolgt qualitativ im Semidünnschnitt. Die unterschiedlichen Anteile wurden nach der Entnahme und scharfen Durchtrennung in Fixierlösungen gegeben. Wir verwendeten Toluidinblau zur Darstellung der Myelinscheiden im Nervenquerschnitt, die Einbettung des Präparates erfolgte zuvor in Epoxidharz. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Standardfärbung bei histologischen Untersuchungen und bietet einen guten Überblick über die Struktur des Gewebes. Kollagenes Bindegewebe, Zellkerne, Zytoplasma, Erythrozyten und Muskulatur lassen sich auch mit Hilfe der Masson-Goldner-Färbung, bestehend aus Eisenhämatoxin, Säurefuchsin, Orange G und Lichtgrün, darstellen. Mit Hilfe der verwendeten Anti-S100-Antikörper-Färbung lassen sich periaxonale Schwann-Zellen und periganglionäre Gliazellen darstellen. Der Antikörper ist gegen das S100-Strukturprotein der Zellen gerichtet (siehe Abbildung 14d und 14e). Die Neurofilamentfärbung ist geeignet, um Axone anzufärben, da diese viele Neurofilamente enthalten. Neurofilamente sind Zytoskelettproteine der peripheren Neurone. Die deutlich braune Anfärbung der Axone lässt sich von den weiß ausgesparten Myelinscheiden gut unterscheiden (siehe Abbildung 14b). Für die Einbettung in Epoxidharz (Epon) werden der proximale Anteil des Präparats und die Trifurkation für zwei Stunden in Glutardialdehyd 3,9 % (Merck, Landsdale, Pennsylvania, USA) bei Raumtemperatur dehydriert und danach in einem 0,1 M

Phosphatpuffer (pH 7,6) (siehe Anhang) bei 4°C aufbewahrt. Es folgt die Anfertigung von Semidünnschnitten (Schnittdicke 1µm, Ultramikrotom), welche mit Toluidinblau gefärbt werden. Der distale Transplantatanteil wird nach Fixierung in Formaldehyd 3,9 % in Paraffin eingebettet und mit Neurofilamentfärbung und Anti-S100-Antikörper-Färbung gefärbt.

Die entnommenen Muskeln (Mm. gastrocnemii et tibiales anteriores der Versuchs- und Kontrollextremität) werden ebenfalls in Formaldehyd 3,9 % fixiert und in Paraffin eingebettet. Die angefertigten Schnitte werden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Computergestützte Axonquantifizierung

Die Auswertung der Präparate findet an einem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena) statt, welches über eine Digitalkamera (Nikon DS-U1, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) mit einem Computer verbunden ist. Die Gesichtsfelder der einzelnen Präparate können so mit Hilfe der Software EclipseNet (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) digital eingelesen, ausgewertet und archiviert werden.

Gemessen wurden die absolute Anzahl der Axone im Präparat und der Axonaußendurchmesser (in μm). Anlässlich dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit einer Forschergruppe um S.J. Richerson (Biomedical Engineering Program, Milwaukee School Of Engineering, Milwaukee Wisconsin, USA) ein Software-Programm entwickelt, welches speziell auf die Anforderungen der Auswertung histologischer Nervenschnitte abgestimmt wurde. Diese Software soll dem Untersucher nicht nur die quantitative Auswertung erheblich erleichtern, sondern auch dazu dienen, deren Vergleichbarkeit mit späteren Ergebnissen zu erhöhen.

Die halb-automatische Auswertung eines Nervenquerschnitts setzt sich zusammen aus der automatischen Segmentation und der benutzerdefinierten Segmentation. Das digital eingelesene Gesichtsfeld eines Toluidin-Blau-gefärbten Präparates (siehe Abbildung 11a) unterläuft zunächst der automatischen Segmentation. Diese soll dazu dienen, die relevanten Bildbereiche vom Hintergrund stärker abzuheben und von Artefakten zu unterscheiden.

Für die Segmentation wird das farbige Bild in 8-Bit-Grauschattierungen umgerechnet. Dieses erfolgt anhand der Farbe Rot, da deren Intensitätsunterschiede bezüglich der Myelinscheide im Vergleich zum Hintergrund und Axonkern im Toluidinblau-gefärbten Präparat am größten sind (siehe Abbildung 11b). Die automatische Segmentation des stark kontrastierten Grau-Bildes beruht auf dem ersten Eigen-Wert der Hess'schen Matrix, welcher zur Kontrastverstärkung der Ränder (Myelinscheide) verwendet wird (81) und einer Hysteresis-basierten Segmentation zur Randerkennung (82-85) und Zellsegmentation, bei der auch die

Konnektivität der Axone untereinander miteinbezogen wird. Dabei werden zunächst anhand eines „harten“ Rasters die Pixel ausgewählt, die aufgrund ihrer hohen Intensität mit großer Sicherheit zur Myelinscheide gehören. In einem zweiten Schritt wird ein „weiches“ Raster verwendet, welches auch intensitätsschwächere Pixel des Hintergrundes zulässt, jedoch nur, wenn diese in direktem Bezug zu einem durch das „harte“ Raster ausgewählten Pixels stehen (Konnektivität) (86;87) (siehe Abbildung 11c). Zellgrenzen, die unterbrochen sind und somit nicht vollständig ausgefüllt werden, werden durch das Programm entfernt (88). So ergibt sich für ein Axon das Bild eines hellen Kerns, umgeben von einem intensitätsstarken Ring, der Myelinscheide, vor einem hellen Hintergrund (siehe Abbildung 11d). Diese automatische Segmentation kann sehr gut verwendet werden für die Auswertung histologischer Präparate mit wenig Artefakten und klaren Kontrasten (89).

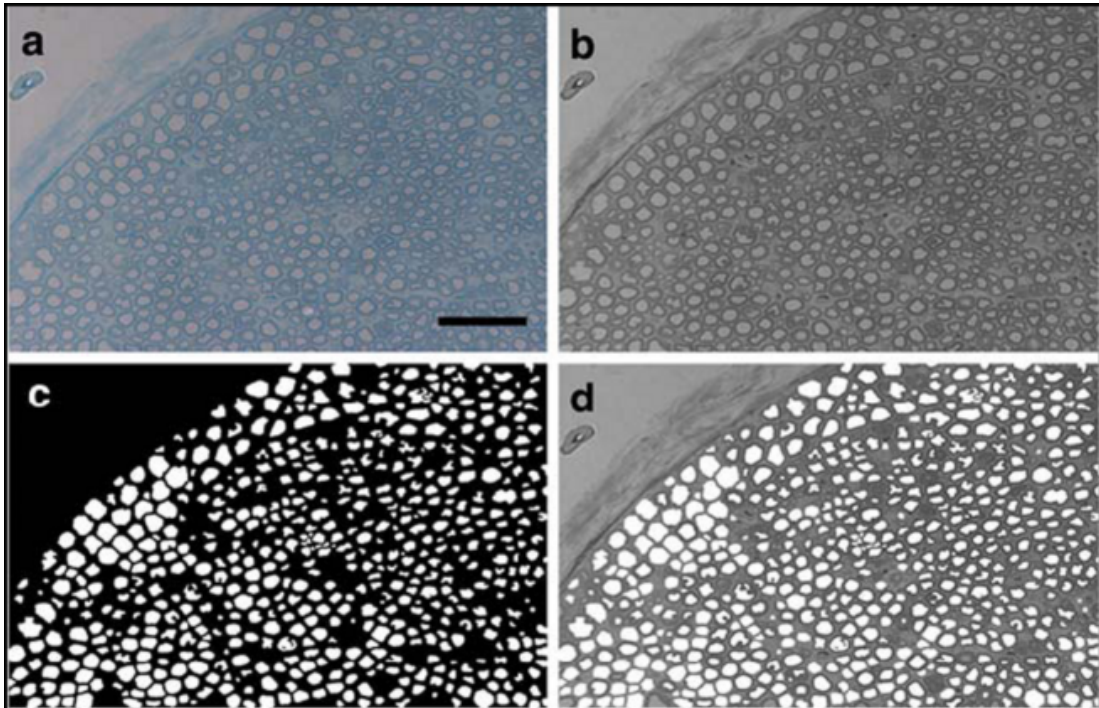


Abb. 10: Arbeitsschritte der entwickelten Software.

10a: Histologischer Querschnitt des nativen *N. ischiadicus* in Toluidinblaufärbung.

10b: nach der Umrechnung in 8-Bit-Graustufen.

10c: nach der digitalen Segmentierung mittels der entwickelten Software.

10d: Bei der Projektion der errechneten Segmente auf das Grau-Bild erkennt man das Maß der Übereinstimmung. Der Skalierungsbalken entspricht 50 μm

Da Querschnitte regenerierender Strukturen eine unregelmäßige Architektur und viele Artefakte aufweisen können, kann der Anwender manuell in das Programm eingreifen (siehe Abbildung 12a). Nach der oben beschriebenen automatischen Segmentierung kann der Anwender falsch segmentierte Bereiche löschen und nicht segmentierte Strukturen hinzufügen (siehe Abbildungen 11a - 11c). Hierfür hat er zum einen die Möglichkeit mit Hilfe der Watershed-Transformation (82;83;90)

zusätzliche Strukturen vom Programm markieren zu lassen oder er kann Punkt für Punkt den Rand der hinzuzufügenden Struktur manuell markieren (91) (siehe Abbildung 11a). Außerdem ist es dem Benutzer möglich einen Größenbereich (in Pixel) einzustellen, so dass Strukturen, deren Größe außerhalb eines festgelegten Intervalls liegen automatisch aus der Segmentation gelöscht werden (siehe Abbildung 11b).

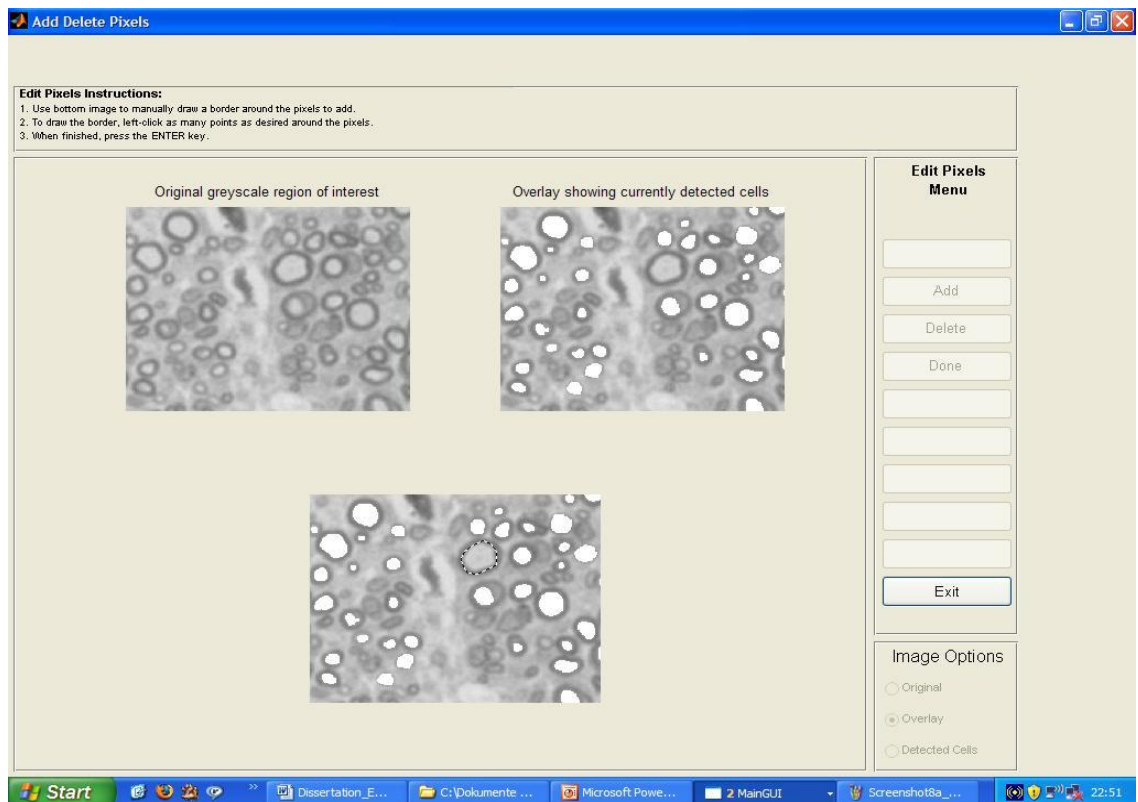


Abb. 11a: Im Unterfenster des ausgewählten Bildausschnitts lassen sich manuell Bereiche durch ihre Markierung hinzufügen...

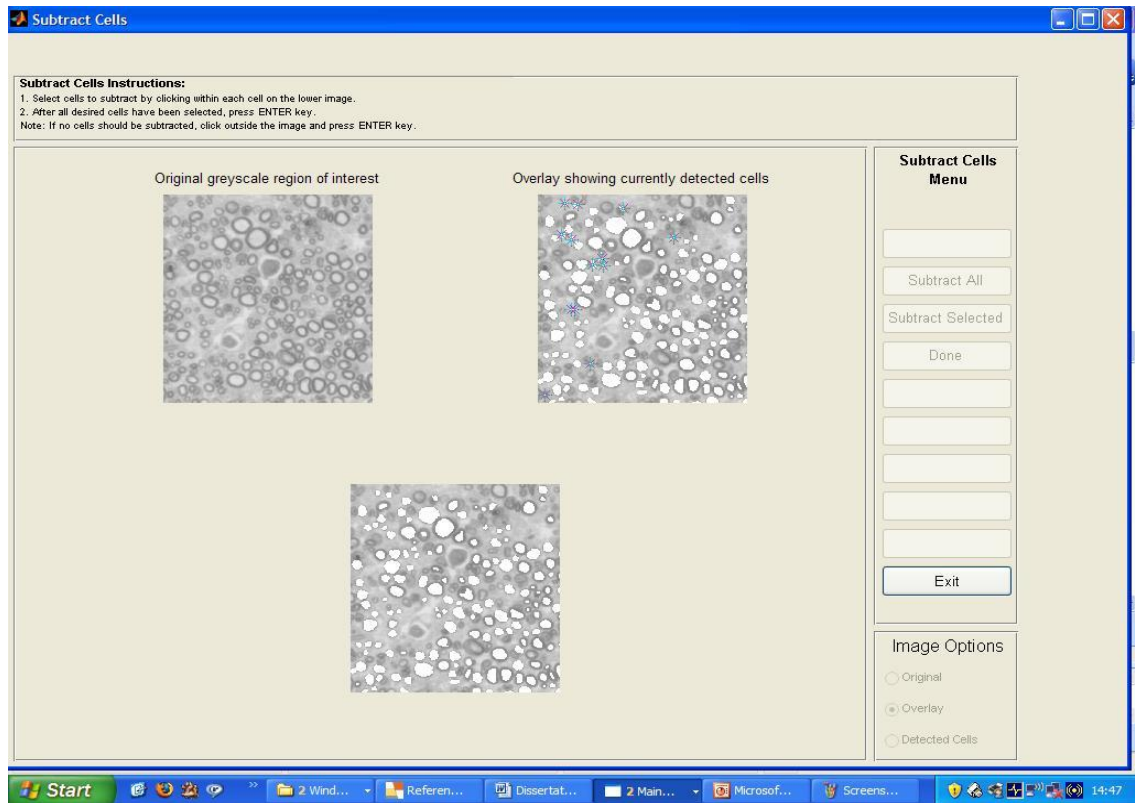


Abb. 11b: ...oder entfernen.

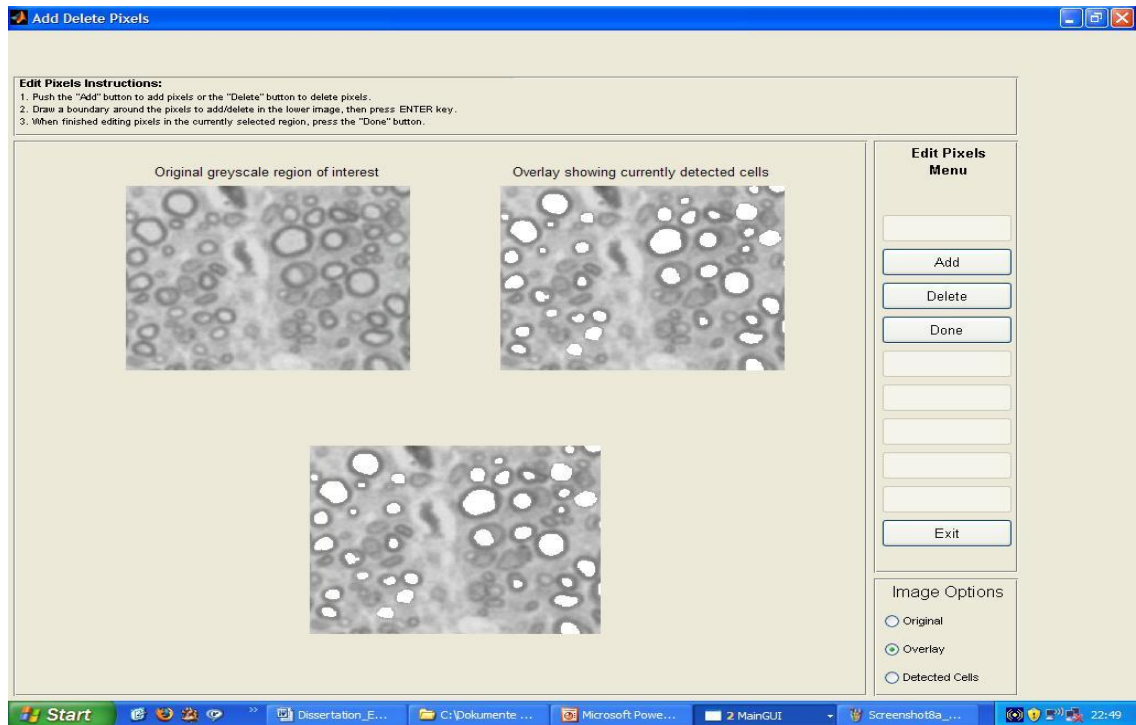


Abb. 11c: Durch die manuelle Nachbearbeitung lässt sich die Genauigkeit der Bestimmung deutlich erhöhen.

Die benutzer-definierte Segmentation ist besonders von Nutzen für die Auswertung regenerierender Strukturen. Die Genauigkeit der Axonerkennung kann hier deutlich erhöht werden (siehe Abbildung 12b).

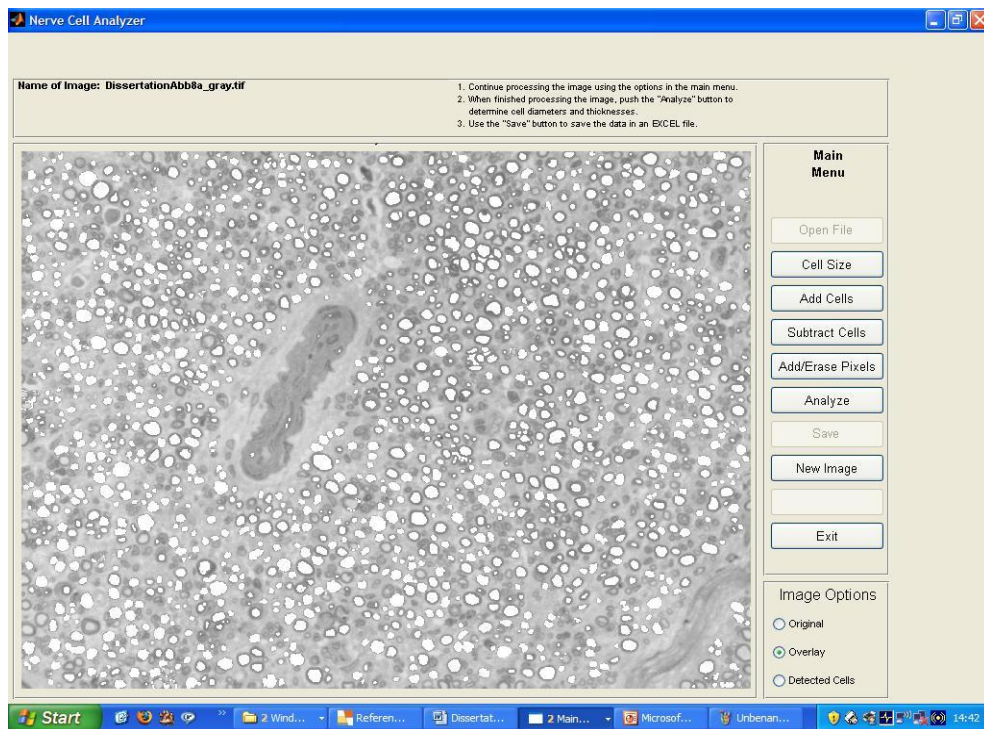


Abb.12a: Analysiertes Bild eines regenerierenden Nervs vor der manuellen Nachbearbeitung.

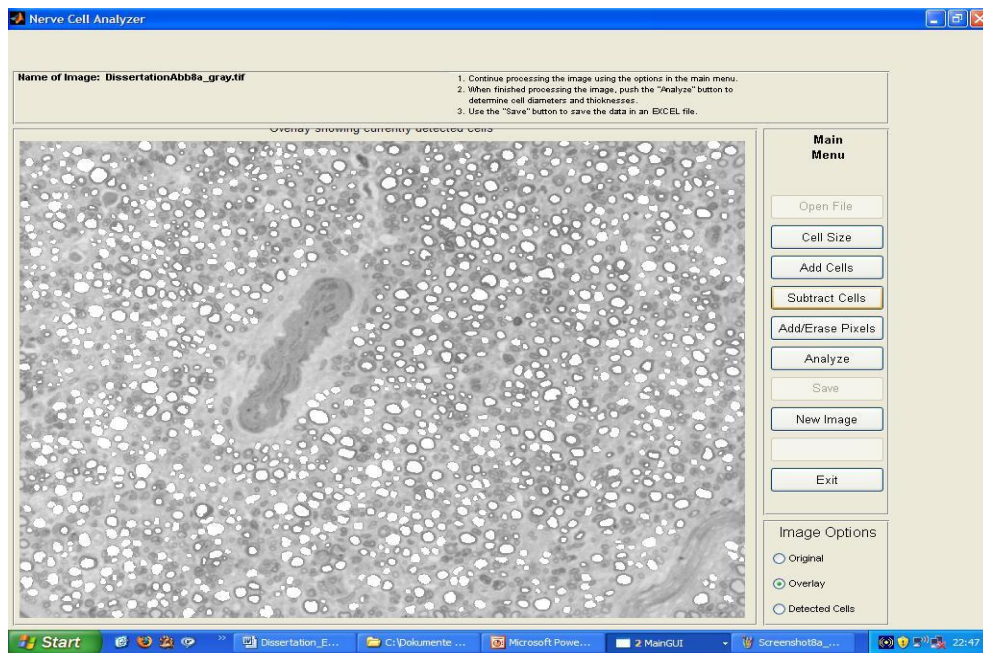


Abb.12b: Analysiertes Bild eines regenerierenden Nervs nach der manuellen Nachbearbeitung.

Nach Abschluss der semi-automatischen Segmentation wird das Gesamtbild quantitativ ausgewertet.

Jede als Zelle erkannte Struktur bekommt eine fortlaufende Nummer. Die Gesamtzahl der Axone wird bestimmt (siehe Abbildung 13).

Mit Hilfe der Hough-Transformation (92) wird für jedes gezählte Axon die geometrische Form der Ellipse angepasst und deren kleinster Durchmesser berechnet.

Der gemessene Wert wird zusammen mit der entsprechenden Axon-Nummer gespeichert. Als dritter Wert wird die prozentuale Dicke der Myelinscheide im Verhältnis zum Durchmesser des Axons berechnet und zusammen mit der Axon-Nummer gespeichert (93-96).

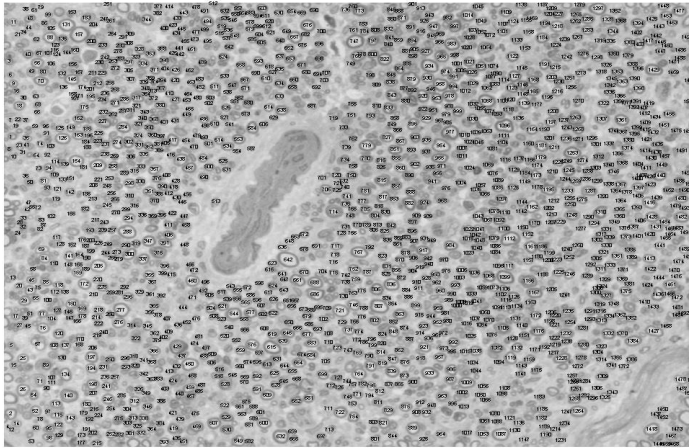


Abb.13: Fortlaufende eindeutige Nummerierung aller markierten Axone.

Alle berechneten Daten können in Form einer Excel-Tabelle direkt gespeichert werden (siehe Tabelle 1). Die benutzer-definierte Segmentation sowie die Auswertungen wurden durch einen Untersucher und verblindet durchgeführt.

Original Image Name				
30A_6.tif				
Index	Diameter (pixels)	Thickness (percentage)	Diameter (μm)	
1	26,1293228	0,24719551	3,13301233	
2	6,70557703	0,22222222	0,80402602	
3	6,9479191	0,25119617	0,83308383	
4	6,31892773	0,24013158	0,7576652	
5	39,8027612	0,30054091	4,77251333	
6	24,9931364	0,17787032	2,99677894	
7	17,33701	0,24084668	2,07877818	
8	11,9514394	0,29531971	1,43302631	
1630	6,244998	0,25367647	0,74880072	
1631	5,77350269	0,24583333	0,69226651	
1632	4,41477022	0,296875	0,52934895	
1633	6,60155637	0,36904762	0,79155352	
1634	3,46410162	0,23611111	0,41535991	

Tab. 1: Die Software ermöglicht die direkte Erfassung, Auswertung und Speicherung der Axondurchmesser in einer Excel-Tabelle (Ausschnitt der dokumentierten Messergebnisse).

Ganganalyse

Der Sciatic functions index (SFI) wird über eine sogenannte ink track-Analyse bestimmt, bei der man die Versuchstiere mit der in Tinte getauchten Extremität über ein Blatt Papier laufen lässt, um die Fußabdrücke danach zu vermessen (siehe Abbildung 14). Die Größe des Abdrucks mit den Parametern wie die Länge des Fußabdrucks (PL) (mittlere Zehe bis zum Fersenende) und die Abstände der Zehen 1 - 5 (TS) und der Zehen 2 - 4 (IT) lassen auf die Funktion des N. ischiadicus rückschließen. Eine weitere Beurteilungsgröße ist der Static toe spread index (TSF) (7;97;98)

Aus den Messungen wird nach der von Bain (97) angegebenen Formel der Sciatic function index (SFI) berechnet (siehe Tabelle 2).

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

EPL = experimental foot print length

NPL = normal foot print length (opposite site)

ETS = experimental toe spread

NTS = normal toe spread

EIT = experimental intermediary toe spread

NIT = normal intermediary toe spread

Tab. 2: Sciatic function index (SFI) nach Bain (Übersetzungen im Text).

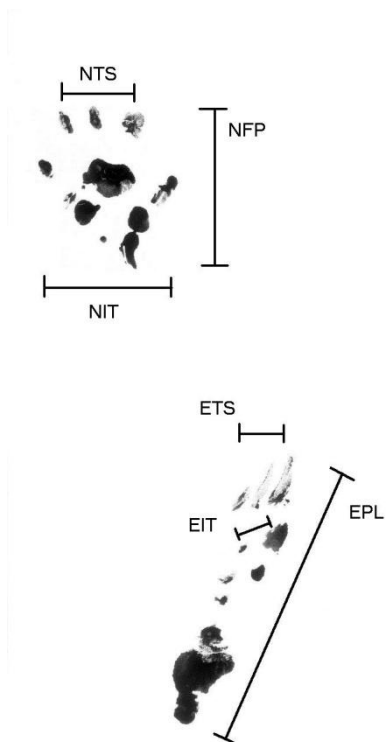


Abb. 14:

Beispiel für die Messung der relevanten Parameter auf der nicht operierten (oben) und der operierten, nicht funktionell reinnervierten Seite nach Ausfall des N. ischiadicus (unten).

Statistische Analyse

Alle Berechnungen zur Verteilung der Axone und Quotienten der Muskelgewichte erfolgen mit SPSS, Version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Zur Berechnung statistischer Unterschiede verwendeten wir den Mann-Whitney U-Test. Es wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse

Die Entnahme der Nerventransplantate und Kollagenröhrchen erfolgte über den gleichen operativen Zugang, welcher bereits für deren Einbringen verwendet wurde. Nach siebenwöchiger Haltung betrug das durchschnittliche Gewicht 197 g, wobei 174 g das Minimum und 257 g das Maximum darstellten.

Die Narbe stellte sich bei allen Tieren reizlos dar und zeigte keine Dehiszenzen. Die Kollagenröhrchen bzw. Nerventransplantate befanden sich bei 29 von 32 Tieren in situ. Zwei Conduits der Versuchsgruppe und ein Conduit der Kontrollgruppe waren während der Versuchsdauer untergegangen und mussten durch drei neue Versuchstiere ersetzt werden.

Die Morphologie der Conduits zeigte sich unauffällig bis auf die drei untergegangenen Conduits. Diese zeigten sich bräunlich gefärbt, ein Lumen war nicht mehr zu erkennen. Ihr Durchmesser hatte stark abgenommen und war nunmehr kleiner als der, der Nervenstümpfe des N.ischiadicus. Das Kollagenröhrchen war nicht mehr abzugrenzen. Diese drei Tiere wurden aus der Auswertung herausgenommen und durch drei Neue ersetzt.

Es ließen sich makroskopisch keine Kontinuitätsunterbrechungen oder Dehiszenzen feststellen. Es gab keine Hinweise auf eine Einengung oder Dehnung der Transplantate. Vorhandenes adhäsives Bindegewebe ließ sich problemlos stumpf abpräparieren. Die Nerventransplantate und Conduits zeigten auf ihrer Oberfläche ein dichtes Kapillarnetz.

Es konnte initial der vollständige Verlust der Funktion des N. ischiadicus bei allen Tieren beobachtet werden. Die Tiere, die mit einem Conduit versorgt worden waren, zeigten im Verlauf keine Besserung der N. ischiadicus-Funktion. Bei den Tieren, die ein Nerventransplantat erhalten hatten, konnte hingegen eine Verbesserung des Gangbildes beobachtet werden.

Klinische Untersuchungen

Kontrakturen

Alle Tiere wiesen Beugekontrakturen im Zehenbereich der Versuchsextremität auf. Ein plantares Aufsetzen der Extremität war nicht mehr möglich. Desweiteren zeigte sich eine Hyperkeratose der Krallen des rechten Hinterlaufs bei allen Tieren.

Trophische Störungen

Bei der Inspektion zeigten sich bei 17 Tieren Ulzerationen im Vorfußbereich dorsal und bei einem Tier eine Hauterosion an der Ferse der Versuchsextremität. Dabei gehörten 3 Tiere der Gruppe IV (NTx/NaCl) an und 5 Tiere der Gruppe III (NTx/rhEpo). 6 Tiere, die eine temporäre Ulzeration aufwiesen gehörten zu Gruppe II (Conduit/NaCl) und 3 Tiere zu Gruppe I (Conduit/rhEpo). Es gab in keinem der Fälle Anhalt für eine Entzündung. Trotz der bleibenden Asensibilität heilten die aufgetretenen Ulzerationen im Verlauf ab.

Gruppe		Anzahl der Ratten mit einem Fußulkus
I	Co rhEpo	3
II	Co NaCl	6
III	NTx rhEpo	5
IV	NTx NaCl	3

Mutilationen

Es gab keine Hinweise auf selbst zugefügte Verletzungen im Sinne von autoaggressivem Verhalten der Tiere.

Infektzeichen

Ein Tier der Gruppe I zeigte Symptome einer Atemwegsinfektion, die sich jedoch ohne eine Therapie im Verlauf schnell besserten. Alle anderen Tiere zeigten keine Anzeichen einer Infektion.

Pinch-Test

Der Pinch-Test, d.h. das Setzen eines plantaren Schmerzreizes zur Bestimmung der Rückkehr der sensiblen Funktion, war nach sieben Wochen bei 29 von 32 Tieren (90,6 %) positiv. In den Gruppen I, II und III zeigten jeweils 28 von 32 Tieren (87,5 %) eine Wiederkehr der Sensibilität. In Gruppe IV war der Test bei allen Tiere positiv.

Muskelmassenquotient

Der Muskelmassenquotient als Zeichen der Muskelatrophie beziehungsweise als Maß für die wiederkehrende Muskelfunktion der operierten Seite ergab folgende Ergebnisse und Signifikanzen.

Quotienten der Muskelgewichte und ihre Standardfehler.

Gruppe		Qtib	Qtib Stdfehler	Qgc	Qgc Stdfehler
I	Co rhEpo	0,190	0,011	0,148	0,009
II	Co NaCl	0,188	0,010	0,151	0,010
III	NTx rhEpo	0,529	0,018	0,404	0,020
IV	NTx NaCl	0,430	0,019	0,362	0,023

Muskelmassenquotient M. tibialis anterior nach Verwendung eines Nerven­transplantats

Gruppe III (NTx/rhEpo)	Gruppe IV NTx/NaCl)
0,529 ± 0,018	0,430 ± 0,019

$p = 0,026 \rightarrow p < 0,05$

Signifikant besseres Ergebnis in Gruppe III.

Muskelmassenquotient M. gastrocnemius nach Verwendung eines Nerven­transplantats

Gruppe III (NTx/rhEpo)	Gruppe IV NTx/NaCl)
0,404 ± 0,020	0,362 ± 0,023

$p = 0,29$

Quotient der Versuchsgruppe /Gruppe III ist höher, aber nicht statistisch signifikant.

Muskelmassenquotient M. tibialis anterior nach Verwendung eines Kollagen-Conduits

Gruppe I (Co/rhEpo)	Gruppe II Co/NaCl)
0,190 ± 0,011	0,188 ± 0,010

$p = 0,86$

Keine statistische Signifikanz.

Muskelmassenquotient M. gastrocnemius nach Verwendung eines Kollagen-Conduits

Gruppe I (Co/rhEpo)	Gruppe II Co/NaCl)
0,148 ± 0,009	0,151 ± 0,010

p = 0,70

Keine statistische Signifikanz.

Zusammenfassung der Signifikanzen der Unterschiede der Muskelmassenquotienten von M. tibialis ant. zu M. gastrocnemius beim autologen Nerven­transplantat und beim kollagenen Conduit:

Signifikanzen der Unterschiede der Muskelquotienten zw.
M. tibialis und M. gastrocnemius

Gruppe I - Co rhEpo **p = 0,00010**

Gruppe II – Co NaCl **p = 0,0057**

Gruppe III – NTx
rhEpo **p = 0,0005**

Gruppe IV - NTx NaCl **p = 0,018**

Zusammenfassung der Signifikanzen der Unterschiede der Muskelmassenquotienten der Versuchsgruppen (Epo) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (NaCl) bei autologer Nerven­transplantation und beim kollagenen Conduit:

Signifikanzen der Unterschiede der Muskelquotienten zw.
den Versuchsgruppen mit Epo-Gabe und den
Kontrollgruppen mit NaCl-gabe

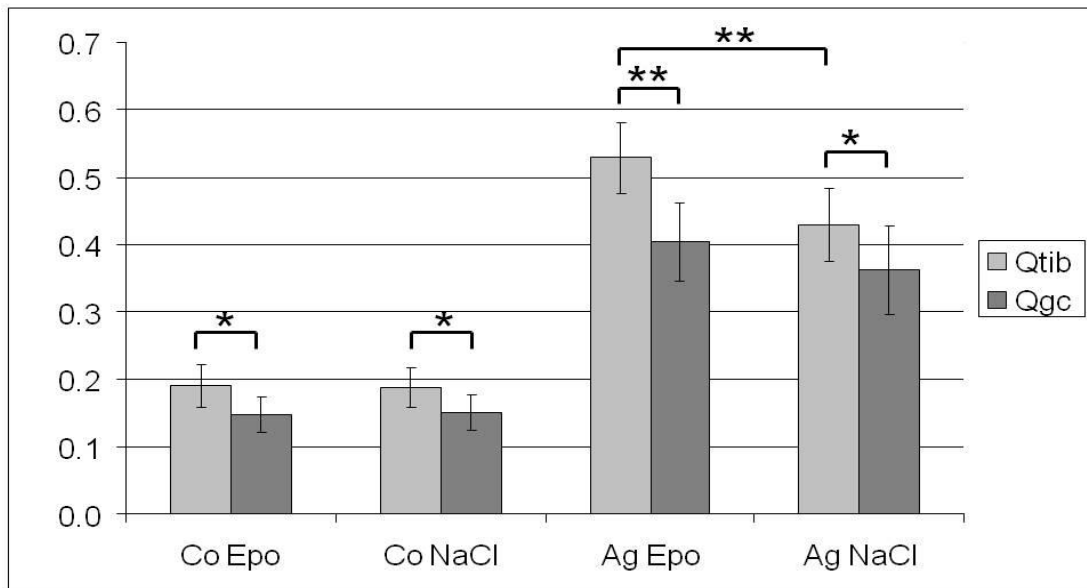
NTx
M. tibialis **p = 0,026**

NTx	
M. gastrocnemius	p = 0,29
Conduit	
M. tibialis	p = 0,86
Conduit	
M. gastrocnemius	p = 0,70

Bei subkutaner Applikation von Erythropoietin lässt sich in der Nerven­transplantat-Versuchsgruppe eine signifikant geringere Atrophie der Muskulatur nachweisen als in der entsprechenden Kontrollgruppe mit NaCl-Applikation.

In allen Gruppen ergab sich für den M. tibialis anterior ein höherer Gewichtsquotient als für den M. gastrocnemius. Signifikanz $p < 0,05$. Dieses lässt auf eine allgemein schnellere oder bessere Regeneration des M. tibialis anterior schließen.

Verglichen mit den Tieren, die ein autologes Nerven­transplantat erhalten haben, war der Grad der Muskelatrophie nach sieben Wochen in den Gruppen, die mit Kollagen-Conduits versorgt worden waren signifikant höher. Signifikanz $p < 0,001$.



Grafik 1: Gewichtsquotienten der entnommen Muskeln (M. tibialis und M.gastrocnemius, jeweils im Verhältnis zur Gegenseite – Qtib bzw. Qgc).

Qtib: Massenquotient, berechnet aus den Feuchtgewichten der Mm. tibialis anteriores der Versuchsextremität und der kontralateralen Seite.

Qgc: entsprechender Quotient für den M. gastrocnemius.

Berechnet wurden der Mittelwert und der Standardfehler. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Co: Conduit Ag: Autograft (Nerventransplantat).

Histologie / Immunhistologie

In allen vier Versuchsgruppen (NTx/rhEpo, NTx/NaCl, Co/rhEpo, Co/NaCl) konnten mit Hilfe der Toluidinblau- und der Masson Goldner-Färbung sowie der immunhistochemischen Färbungen nach einer Versuchsdauer von sieben Wochen sowohl in der Mitte der autologen Nerven­transplantate als auch in der Conduitmitte zahlreiche myelinisierte Axone nachgewiesen werden.

Im Querschnitt des autologen Nerven­transplantats zeigen sich in der Toluidinblau-Färbung zahlreiche Axone verschiedener Durchmesser, eingebettet in das aufgelockerte Perineurium und umgeben von fibrösem Nerven­hüllgewebe. Die Axone sind überwiegend in Gruppen angeordnet, die die einzelnen Faszikel bilden. Der regenerierende Strang des autologen Nerven­transplantats setzt sich aus mehreren von Bindegewebe umschlossenen Faszikeln zusammen.

Die Verteilung der Axone ist im Nerven­transplantat im Vergleich zum Nativnerv unregelmäßiger. Es lassen sich zwar zahlreiche Axone abgrenzen, insgesamt ist die Dichte der Axone im regenerierenden Nerv jedoch geringer und die Axone sind von mehr lockerem Bindegewebe umgeben.

Das Nerven­hüllgewebe (Epineurium) weist keine pathologische Verbreiterung, Atrophie oder entzündliche Infiltration auf. Es zeigt sich weder eine Hyperämie, noch eine pathologisch erhöhte Zellularität. Die dargestellten Kapillaren zeigen keine abnorme Erweiterung (siehe Abbildungen 15a,b).

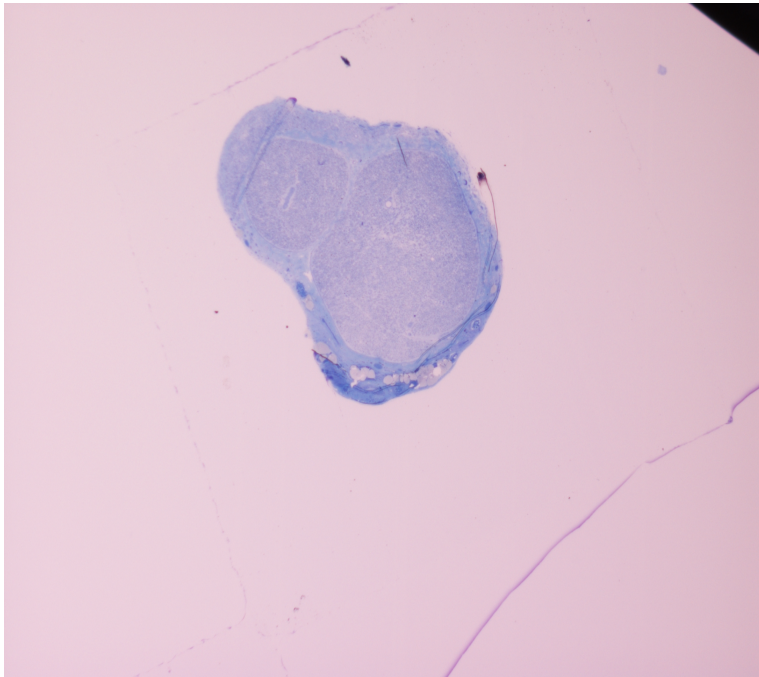


Abb.15a: Querschnitt des Autologen Nerven­transplantats sieben Wochen postoperativ.
Toluidinblaufärbung.

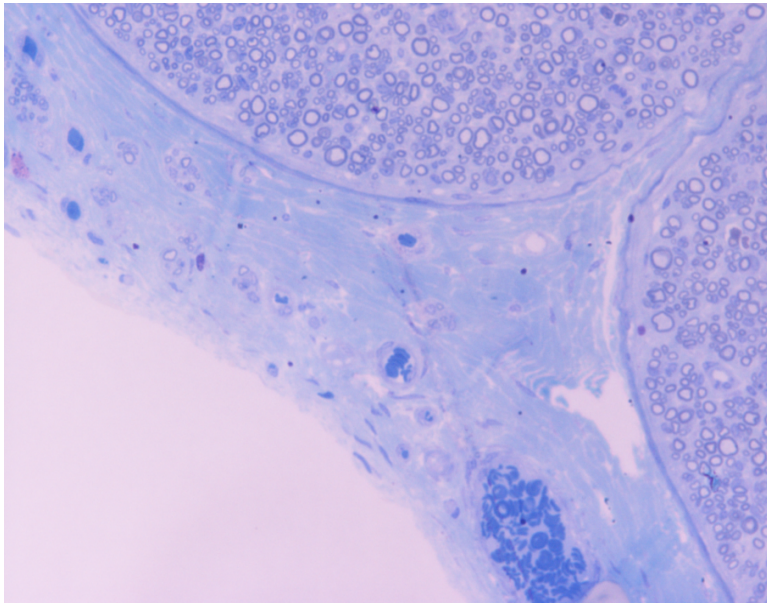


Abb.15b: Vergrößerter Ausschnitt des autologen Nerven transplantats. Im Nervenüllgewebe sind Kapillaren zu erkennen (Pfeile)

Im Inneren des Nervs finden sich ebenfalls normgerechte Kapillaren. Es ist kein interstitielles Ödem zu sehen.

Die verschiedenen Axonquerschnitte sprechen für eine ausgeprägte Wachstumspotenz des Nervs, welches den Erwartungen entspricht. (siehe Abbildung 15a bis 15c). Es ist zu vermuten, dass die kleineren Axone im Verlauf der Proliferation an Durchmesser zunehmen.

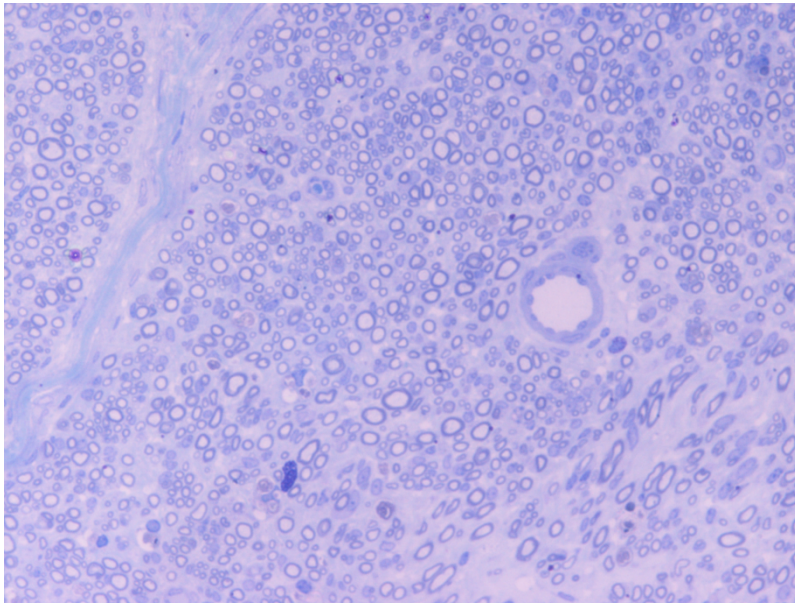


Abb.15c: weiterer Ausschnitt des autologen Nerven­transplantats mit zahlreichen Axonen verschiedener Kaliber. Weiter zeigen sich ein bindegewebiges perineurales Septum (gestrichelter Pfeil) sowie eine größere Kapillare (Pfeil),

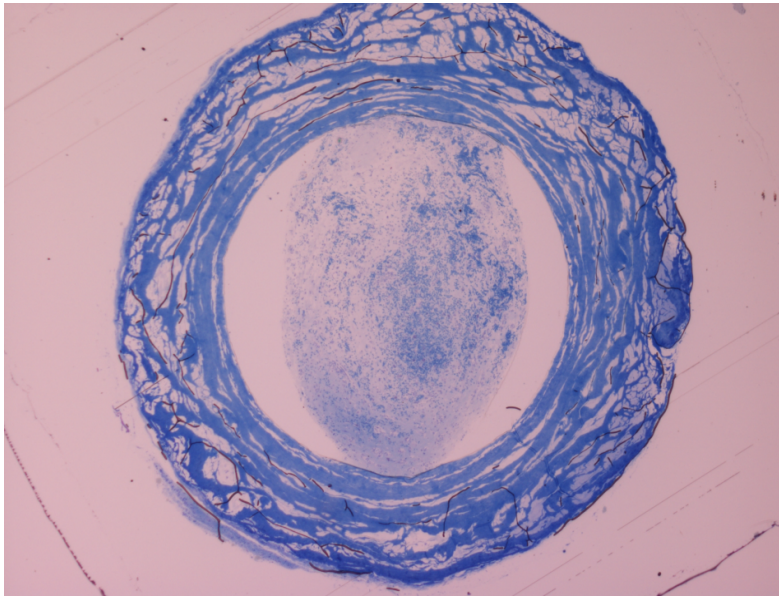


Abb.16a: Kollagenconduit im Querschnitt.

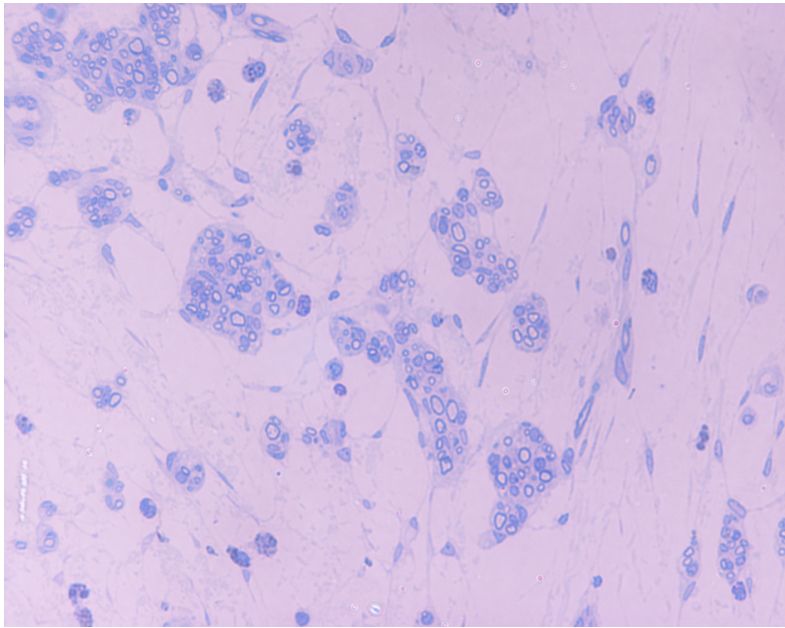


Abb.16b: Ausschnittvergrößerung des Conduits. Die Axone liegen im Vergleich zum Nerven­transplantat deutlich verteilt im Stroma.

Im Kollagen-Conduit ist die Axonverteilung insgesamt unregelmäßiger als im Nerven­transplantat (siehe Abbildungen 16a und 16b).

Die mittlere Axongröße, in den mit Conduits versorgten Gruppen beträgt 1,0 bis 1,5 μm . Der Durchmesser der Axone nach Verwendung eines autologen Nerven­transplantats liegt überwiegend im Bereich zwischen 1,5 und 2,0 μm und ist somit größer.

In der Masson Goldner-Färbung färbt sich Kollagen türkisblau an. Im Querschnitt des Conduits ist das erhaltene Kollagenröhrchen zu erkennen, welches den Nerv umgibt (siehe Abbildung 17b). Im Inneren des Conduits erkennt man mehrere Faszikel des regenerierenden Nervs. Innerhalb der einzelnen Faszikel liegt zwischen den Nervenfasern ein zartes Bindegewebe, das Endoneurium. Das Epineurium, eine

Schicht aus straffem Bindegewebe, umhüllt den gesamten Nerv. Das Perineurium besteht aus konzentrisch angeordneten Schichten dünn ausgebreiteter Fibrozyten, zwischen welchen kollagene Fibrillen liegen (99)

(siehe Abbildungen 17a und 17b).

Im Conduit-Querschnitt findet sich deutlich mehr lockeres Bindegewebe als im Nerven-Transplantat (Vergleiche Abbildungen 17a und 17b). Es liegt in keiner Versuchsgruppe eine überschießende Fibrose vor.

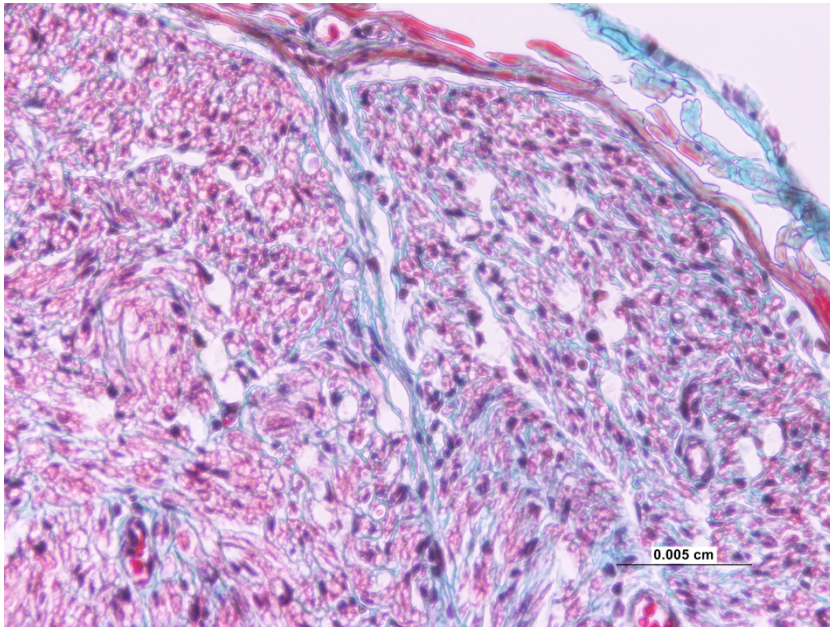


Abb. 17a: Querschnitt des autologen Nerven­transplantats in der Masson Goldner-Färbung (Ausschnitt). Die einzelnen Faszikel sind von dünnen Schichten Bindegewebe eingefasst. Zellkerne stellen sich dunkel dar.

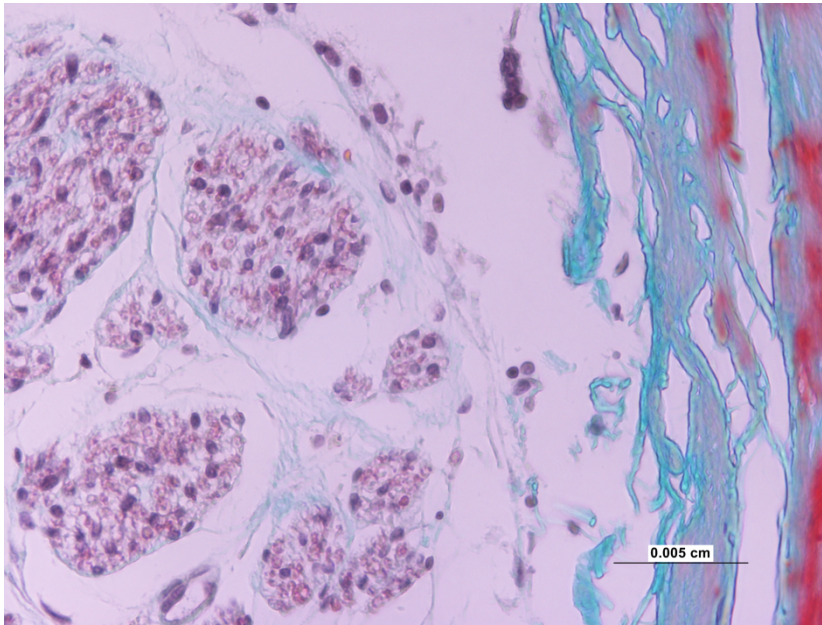


Abb. 17b: Conduit in der Masson Goldner-Färbung. Am rechten Bildrand erkennt man den Anschnitt des umgebenden Kollagenröhrchens (türkis).

Immunhistologie

Neurofilamentfärbung

Bei der Neurofilament-Färbung handelt es sich um eine Färbung, welche auch eine gute Abgrenzung der Axonumgebung ermöglicht.

Es stellen sich neben Axonen unterschiedlicher Durchmesser vor allen Fibrozyten und kapillarreiches Stroma dar.

Es finden sich Ansammlungen von Fibrozyten im Randbereich des Transplantats als Hinweis auf eine Verdickung des Nervenüllgewebes im Sinne einer fibrozytisch-fibroblastischen Proliferation.

Die angeschnittenen Kapillaren stellen sich regelrecht dar. Es findet sich keine Schwellung der Endothelzellen (Endotheliose) als Zeichen eines Hochdrucks. Im histologischen Querschnitt des Wachstumskonus lassen sich die üblicherweise anzutreffenden Zellen wie Fibroblasten, Fibrozyten, Kapillaren und die Axone mit der sie umgebenden Myelinscheide disseminiert nachweisen. Es zeigt sich das Bild des physiologischen Vorgangs nachwachsender Axone. Im Querschnitt des Nervenimplantats (siehe Abbildung 18) sieht man deutlich weniger vorwachsende Axone als im Querschnitt des Conduits. Im Conduit liegen die in Faszikeln angeordneten Axone sehr viel lockerer im umgebenden Stroma (siehe Abbildung 19).

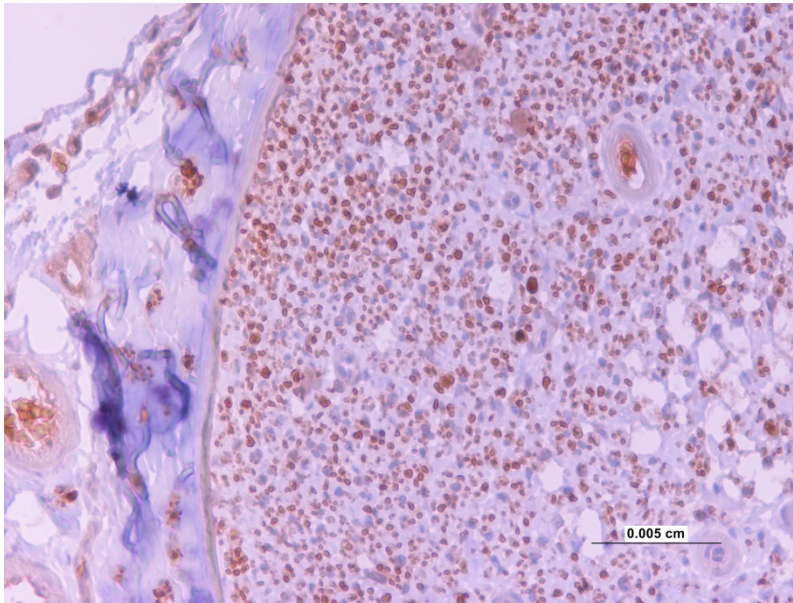


Abb. 18: Nerven­transplantat mit Neurofilamentfärbung: Am linken Bildrand erkennt man ein arterielles Blutgefäß mit darin enthaltenen Erythrocyten (Pfeil). Die Axone stellen sich bräunlich dar und sind von einem hellen Saum, der Myelinscheide umgeben. Zentral findet sich ein weiteres Blutgefäß (Pfeil).

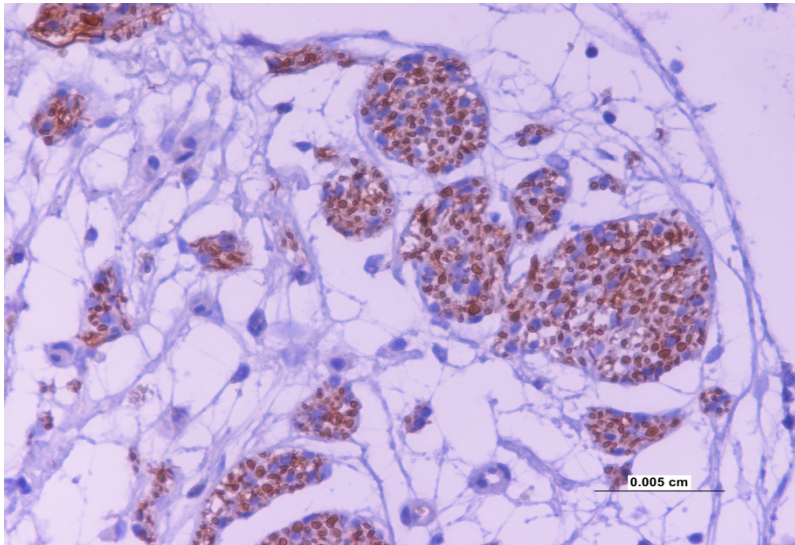


Abb. 19: Conduit mit Neurofilamentfärbung: Lockere Ausbildung des Bindegewebes (blau) zwischen den in Bündeln regenerierenden Axonen (rotbraun). Insgesamt zeigen sich deutlich weniger Axone als im Nervenplantat.

S100-Färbung

Die S100-Färbung färbt neuroektodermale Strukturen wie die Schwann-Zellen an. Die verschiedenenkalibrigen Axone liegen im Nervenransplantat dicht gepackt und im Conduit in größeren und kleineren Faszikeln angeordnet in der Stromamatrix (siehe Abbildungen 20a,b und 21a,b).

Das Zellgut ist insgesamt unauffällig und intakt. Es findet sich keine Hypo- oder Hyperzellularität.

In allen axonalen Ausläufern findet sich eine kräftige Expression von S100-Protein.

Im autologen Nervenransplantat sieht man zahlreiche angeschnittene Blutgefäße.

Epineural finden sich großlumigere Gefäße, zentral liegt das verzweigtere Kapillarnetz zur Versorgung des Wachstumskonus (siehe Abbildungen 20a und 20b).

Auch im Conduit-Regenerationsstrang finden sich zahlreiche Kapillaren. Die Kapillaren weisen ein kleineres Lumen auf, die Gefäßdichte ist jedoch höher als im Nervenransplantat (siehe Abbildungen 21a und 21b).



Abb. 20a: Autologes Nerventransplantat in der S100-Färbung. Es zeigt sich eine hohe Axondichte. Die Axone sind in größeren Faszikeln angeordnet. Im Querschnitt erkennt man zahlreiche epineurale und zentrale Kapillaren (Pfeile).

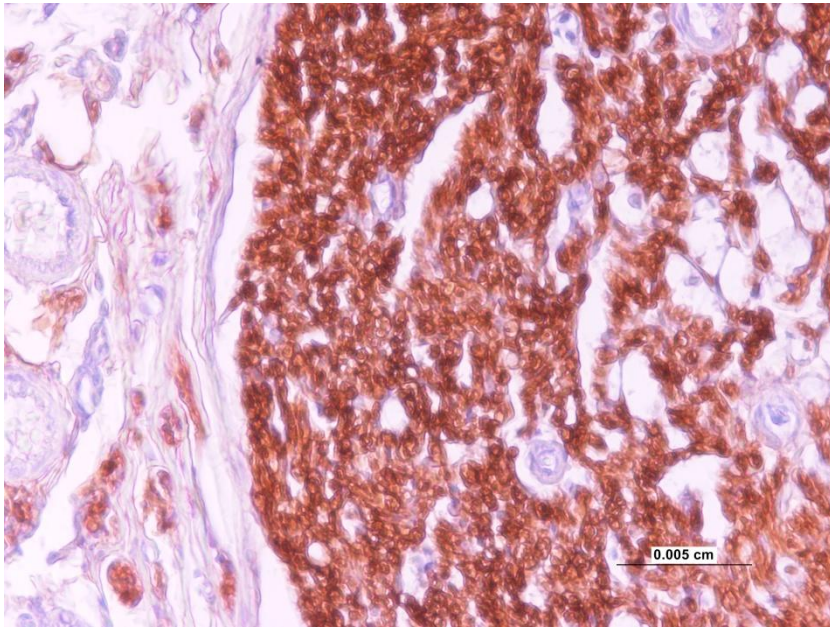


Abb. 20b: Autologes Nerven­transplantat in der S100-Färbung. Die Axone liegen dicht gepackt. Die im Hüllgewebe gelegenen Kapillaren sind großlumiger als die zentral gelegenen Verzweigungen.

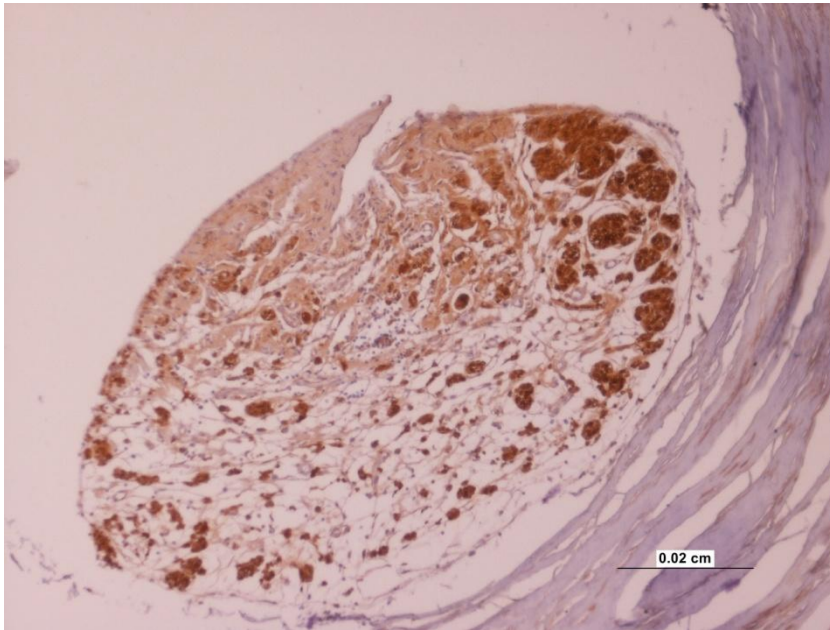


Abb. 21a: Conduit in der S100-Färbung. Die Axone liegen hier deutlich disseminierter im umgebenden Bindegewebe. Sie sind in kleineren Faszikeln angeordnet. Man erkennt zahlreiche kleinlumige Kapillaren (Pfeile).

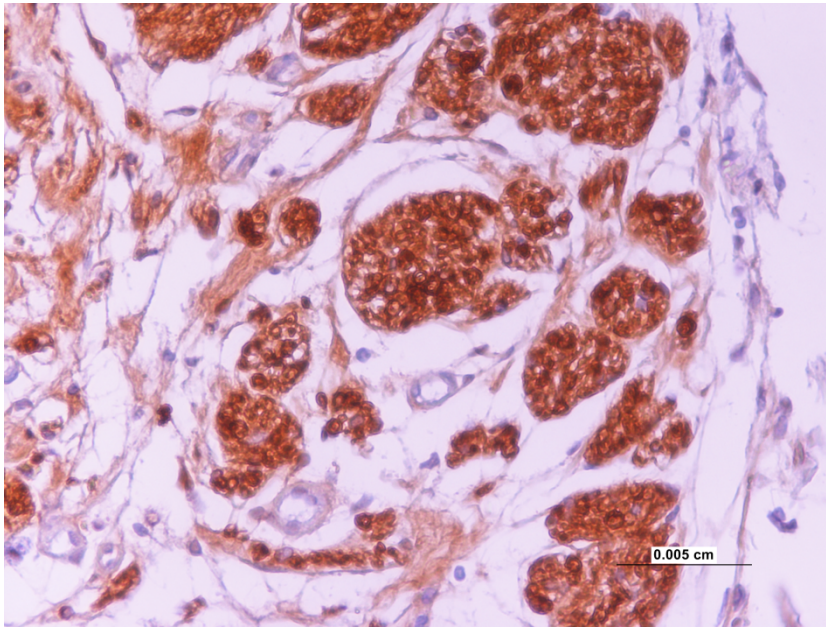


Abb. 21b: Conduit-Querschnitt mit S100-Färbung. Die Axone liegen locker in Gruppen angeordnet. Im Wachstumskonus liegen einige Kapillaren (Pfeile).

Computergestützte Axonquantifizierung

Die Quantifizierung der Axone erfolgte anhand von Querschnitten aus der Mitte der Conduits bzw. Nerventransplantate mit Hilfe einer eigens hierfür entwickelten Software.

In allen Gruppen fanden sich myelinisierte Axone (siehe Abbildung 22).

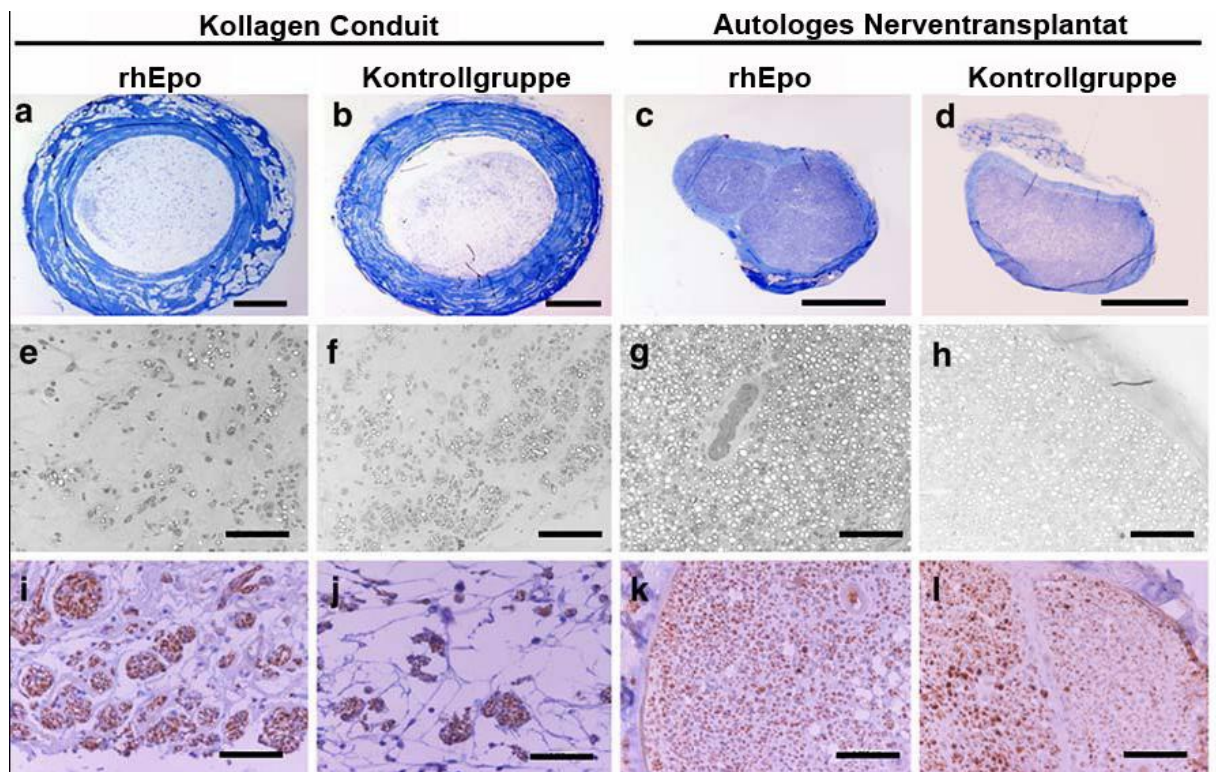


Abb. 22: Nach einer Versuchsdauer von sieben Wochen erfolgt die histologische Auswertung der Nerventransplantate und Conduits. Nach Färbung der Querschnitte mit Toluidinblau (a-d), erfolgte die Segmentierung und Quantifizierung mit der entwickelten Software (e-h). Die immunhistologische

Färbung erbringt den qualitativen Nachweis von Axonen, sowohl im Nerven­transplantat als auch im Conduit (i-l). Die Skalierung entspricht 0,5 mm (a-d) bzw. 50 µm (e-l).

Es wurden alle Axone ausgewertet, deren Durchmesser größer als 1 µm war.

	rhEpo	NaCl
Co	610 ± 158	865 ± 328
NT	5159 ± 738	4165 ± 423
x		

Tab. 2: Durchschnittliche absolute Axonanzahl eines Conduits bzw. Nervenquerschnitts und ihr Standardfehler.

In den Gruppen, die ein autologes Nervenransplantat erhalten hatten (rhEpo und NaCl), waren die durchschnittlichen Axonzahlen signifikant höher als nach Tubulisation. Signifikanz $p < 0,001$ für die rhEpo-Gruppen bzw. $p < 0,01$ für die NaCl-Gruppen.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der Axonzahlen zwischen den mit Erythropoietin behandelten Tieren und der jeweiligen Kontrollgruppe festgestellt werden.

Zur Auswertung der Axondurchmesser wurden Größenintervalle gebildet mit Abstufungen in 0,5 µm-Schritten (siehe Grafik 2).

Zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen konnten hinsichtlich des Axondurchmessers keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Das Verteilungsmaximum der Axondurchmesser nach Tubulisation lag bei 1,0 – 1,5 µm. Somit waren die vorwachsenden Axone zum Untersuchungszeitpunkt signifikant kleiner als nach der Verwendung eines autologen Transplantats. In diesen Gruppen lag das Verteilungsmaximum bei 1,5 – 2,5 µm.

Das entwickelte halbautomatische Programm erkannte dabei abhängig von der Bildqualität im ersten und zweiten Schritt bis zu 90 % der Axone. Die genannten Axonzahlen wurden nach manueller Nachbearbeitung (Schritt 3) ermittelt.

Grafik 2: Absolute Axonzahlen aufgeschlüsselt nach ihrem Durchmesser. Nach der halbautomatischen Zelldetektion lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Epo-Applikation und der Kontrollgruppen darstellen. Angegeben sind der Durchschnitt der Axonzahlen und die Standardfehler

Ganganalyse

Für die Beurteilung der Rückkehr der Nervenfunktion kann man die Abstände der Zehen sowie die Fußabdrucklänge heranziehen. Aus diesen Größen lässt sich der sciatic functions index (SFI) (7) bestimmen.

Die Tiere zeigten eine starke Plantarflexion der Versuchsextremität auf, so dass eine Messung der genannten Parameter nicht möglich war. Auch in anderen Studien wurde dieses bereits beobachtet (17;100).

Diskussion

Nach kompletter Durchtrennung eines peripheren Nervs, ist die direkte Koaptation die Methode der Wahl zur Wiederherstellung der Kontinuität. Ist jedoch ein Nervendefekt entstanden, gilt zur Zeit die Transplantation eines autologen Nervs als Goldstandard zur Nervenrekonstruktion. Nachteile dieser Methode sind unter anderem die begrenzte Verfügbarkeit und die Notwendigkeit der Schädigung eines oder mehrerer gesunder Nerven. Zudem besteht das Risiko, dass die Qualität des Transplantats im Hinblick auf die Größenkongruenz, die Anzahl der Faszikel und eine mögliche Vorschädigung des Spendernervs bei der Entnahme nicht ausreichend ist, um den auswachsenden Axonen eine suffiziente Leitstruktur zu bieten. Selbst bei besten Voraussetzungen ist es bislang nicht gelungen eine *Institutio ad integrum* herbeizuführen.

Alternativ zum autologen Nervenransplantat ist die Verwendung einer artifiziellen Nervenleitstruktur möglich. Diese können sowohl aus synthetischen Materialien wie abbaubaren Polymeren (101) oder Silikon (102;103) bestehen als auch aus biologischen wie Kollagen, Venen, Arterien, azellulärer Basallamina (104) oder azellulärer Muskulatur (15). Keine der Alternativen konnte jedoch bisher über längere Defektstrecken die Qualität eines autologen Nervenransplantats erreichen. Die vollständige Wiederherstellung der motorischen und sensiblen Funktion kann nicht gewährleistet werden. Häufig bleiben nach Nervenverletzungen Paresen und Sensibilitätsstörungen zurück.

Die Verwendung von synthetischen, resorbierbaren Nervenröhrchen vermeidet die Spendermorbidity. Die Röhrchen sind prinzipiell unbegrenzt verfügbar. Jedoch ließen sich bisher vor allem Erfolge über kurze Defektstrecken < 20 mm (im Rattenmodell) erzielen. Klinisch konnten die Conduits bei Überbrückung peripherer Nerven der Finger erfolgreich eingesetzt werden (14).

Es gibt zahlreiche Forschungsansätze mit dem Ziel der Verbesserung der Regeneration peripherer Nerven. Die Verwendung von Medikamenten zur adjuvanten Therapie ist einer der Forschungszweige. Durch Applikation neurotropher

Faktoren (18-20) ließen sich schon vielversprechende Ergebnisse erzielen (21-26). Für Neurotrophine konnten Hinweise auf eine Hemmung des programmierten Zelltodes (Apoptose), die Stimulation des Axonwachstums und die Verringerung neuropathischer Schmerzen erbracht werden (18-20). Auch Erythropoietin beeinflusst die Apoptose.

Die systematische Gabe von Erythropoietin stimulierte in in vitro-Experimenten das Aussprossen von Neuronenfortsätzen postnataler (105) und adulter (62) dorsaler Ganglienzellen. Für retinale Ganglienzellen (retinal ganglion cells (RGC)) konnten King et al. im Tierversuch einen neuroprotektiven Effekt von exogen zugeführtem Erythropoietin zeigen. Intravitreale Injektionen von rhEpo wirkten neuroproliferativ und verdoppelten die Anzahl der regenerierenden RGC-Axone entlang des N. opticus nach Nerven-Transplantation (25).

In vitro schützt Erythropoietin Nervenzellen vor hypoxie-induzierter Glutamat-Toxizität, welche die Hauptursache für hypoxie-induzierten Zelltod darstellt (21;22). Hinsichtlich der neuroprotektiven Eigenschaften von Erythropoietin ergaben sich bereits zahlreiche vielversprechende Ergebnisse (24;25;28;106).

Da man Erythropoietin-Rezeptoren (EpoR) auf verschiedensten Zellpopulationen, zu denen auch neuronale Zellen und Gliazellen gehören, nachweisen kann, ist der direkte Einfluss von Epo auf diese EpoR-tragenden Zellen möglich. Welche Rolle Epo im neuronalen Stoffwechsel spielt, konnte bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden. In vitro konnte jedoch bereits ein proliferativer Effekt auf Schwann-Zell-Kulturen belegt werden (107). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Knockout-Mäuse, denen der Epo-Rezeptor fehlt weniger neuronale Progenitorzellen und eine erhöhte zerebrale Apoptose aufwiesen (108). Zudem zeigte sich eine verminderte Neurogenese (24). Arcasoy, Kretz und andere sprechen Erythropoietin eine wichtige Rolle bei Stoffwechselforgängen der Nervenprotektion und -regeneration im Zentralen Nervensystem zu (22;30;62;109). Agnello et al. zeigten für rhEpo einen anti-inflammatorischen Effekt bei autoimmuner Enzephalomyelitis (Tiermodell für Multiple Sklerose) (106). Eine Verbesserung der Nervenregeneration konnte für den Einsatz von rhEpo nach Verletzung des Rückenmarks gezeigt werden

(23;27;28). In der klinischen Anwendung konnte durch die systemische Verabreichung von Erythropoietin ein positiver Effekt bei Patienten erzielt werden, die einen Schlaganfall erlitten hatten (30;31). Tsai et al. stellten heraus, dass der Erythropoietin-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Neurogenese nach einem Schlaganfall sowie bei der Migration von Neuroblasten in den verletzten Bereich spielt (24). Auch Untersuchungen von Druckverletzungen peripherer Nerven ergaben Hinweise auf neuroprotektive Effekte sowie eine Verbesserung der Regeneration(26). So ist ein Anstieg der Erythropoietin-Konzentration in Schwann-Zellen beschrieben(107).

Campana und Myers zeigten positive Effekte von systemischer rhEpo-Gabe bei peripherer Neuropathie(107), Nervenverletzungen und zerebraler Ischämie. Bei peripherer Neuropathie konnte rhEpo die Nervendegeneration vermindern (64) und für den N. cavernosus konnten Allaf et al. die Induktion der Regeneration unter rhEpo zeigen (110).

In den Untersuchungen von Lykissas et al. ist der nachgewiesene stimulierende Effekt auf das Axonwachstum allerdings nur in der Initialphase nachweisbar (79).

Trotz der genannten Ergebnisse hinsichtlich der Neuroregeneration im zentralen und peripheren Nervensystem, existieren bisher keine Untersuchungen zum Einfluss von systemischer Erythropoietin-Gabe auf die Regeneration peripherer Nerven nach Transplantation oder Tubulisation.

Da das Hormon Erythropoietin rekombinant herstellbar ist, eignet es sich gut als Therapeutikum. Bisher hat es sich schon als gut verträgliches Medikament in der Therapie der renalen Anämie bewährt (111;112).

Erythropoietin könnte für die Nervenregeneration nach Transplantation durch seine neuroregenerativen und angiogenetischen Eigenschaften zu einer Verbesserung der sensiblen und motorischen Nervenfunktion führen. Während beim autologen Nerventransplantat das bestehende Gefäßnetz des Transplantats wieder mit dem

Körperkreislauf anastomosiert wird (Inoskulation), muss bei der Verwendung eines Conduits eine völlig neue Gefäßversorgung entstehen (Angiogenese). Ein schnellerer Anschluss an den Blutkreislauf könnte dabei eine bessere nutritive Versorgung der für die Regeneration essentiellen Schwann-Zellen bedeuten. Zudem könnten neuroprotektive und neuroregenerative Effekte den Untergang von Neuronen im Spinalganglion vermindern und einen direkten positiven Einfluss auf regenerierende Axone ausüben, so dass eine schnellere Reinnervation des Endorgans möglich scheint.

Um die Relevanz von rhEpo als adjuvantes Therapeutikum nach einer Nervenverletzung zu untersuchen, setzten wir einen Defekt am rechten N. ischiadicus der Ratte. Dann erfolgte die Wiederherstellung der Kontinuität des Nerven durch ein autologes Nerventransplantat beziehungsweise durch ein kollagenes Nervenröhrchen. Die Tiere wurden jeweils 14 Tage systemisch mit rhEpo beziehungsweise Kochsalzlösung in den Kontrollgruppen behandelt. Die Distanz, der in das Conduit eingeführten Nervenenden wurde bewusst so gewählt, dass gerade keine regelrechte Regeneration mehr zu erwarten war, wie sie bei Defektstrecken bis 10 mm an der Ratte zu sehen ist. Somit sollten feine Unterschiede der Regeneration besser zu detektieren sein.

Unsere Untersuchungen ergaben signifikant höhere Ergebnisse für den Muskelquotienten des M. tibialis unter rhEpo-Applikation nach Transplantation eines autologen Nerven im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Atrophiegrad des M. tibialis war somit nach autologer Nerventransplantation unter rhEpo-Applikation signifikant geringer. Dieses kann als bessere Regeneration der denervierten Muskulatur gedeutet werden. Für den M. gastrocnemius zeigte sich eine ähnliche Tendenz, jedoch keine statistische Signifikanz. Für die Muskelmassenquotienten nach Tubulisation konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Der Atrophiegrad in den Gruppen, die ein Conduit erhalten hatten, war signifikant größer als in den Gruppen, die ein autologes Transplantat erhalten hatten. Auch der geringere Axondurchmesser im Conduit, deutet auf eine qualitativ schlechtere Regeneration hin. Unter Verwendung eines

Kollagen-Conduits konnten keine signifikanten Unterschiede durch die Applikation von rhEpo erzielt werden. Ein positiver Einfluss durch Unterstützung der Neuroregeneration ist sowohl im Modell des autologen Transplantats als auch für die Versorgung mit einem Kollagen-Nervenröhrchen denkbar. Beide Modelle erlauben ein ungestörtes Vorwachsen der Axone und können eine Umgebung bieten, in der sich Wachstumsfaktoren anreichern. Für das Conduit muss im Gegensatz zum Nervenstransplantat ein neues Gefäßnetz entstehen, während beim Transplantat das bestehende Gefäßnetz, welches auf der Nervenoberfläche und zwischen den Faszikeln verzweigt verläuft, wieder an das bestehende Gefäßnetz des proximalen und distalen Nervenstumpfes und somit wieder an den Körperkreislauf angeschlossen wird. Der zu vermutende angiogenetische Effekt von Erythropoietin könnte einen stärkeren Einfluss auf den Anschluss des bereits bestehenden Kapillarnetzes des Nervenstransplantats haben. Der Einfluss von rhEpo auf den Aufbau eines neuen Gefäßsystems hingegen ist gegebenenfalls zu gering, um für die Nervenregeneration im Conduit in dem untersuchten Zeitintervall von Vorteil zu sein.

Denkbar ist ebenfalls, dass eine frühere Kapillarisation des Gewebes im Conduit gar nicht erforderlich ist, sondern die native Gefäßausprossung für die Versorgung der Axone ausreicht und die positive Wirkung durch rhEpo nicht weiter gesteigert werden kann.

Unsere Untersuchungen ergaben keinen nachweisbaren Effekt von rhEpo auf die Anzahl der regenerierenden Axone im autologen oder artifiziellen Nervenstransplantat (Nervenröhrchen). Es konnte jedoch ein signifikant positiver Einfluss auf das relative Gewicht der betroffenen Muskulatur nachgewiesen werden. Trotz Fehlen eines histologischen Korrelats des Nervs lässt sich also ein positiver Einfluss auf das funktionelle Ergebnis nach Nervenstransplantation darlegen. Die Ursache hierfür könnte in einer direkten Beeinflussung der neuromuskulären Überleitung oder in der Muskulatur selbst liegen. Die Tatsache, dass die gleichen Effekte nach Nervenrekonstruktion durch Tubulisation nicht zu sehen waren, könnte sich darin begründen, dass die Nervenregeneration bei der gewählten Defektlänge die neuromuskulären Synapsen nicht in ausreichendem Ausmaß bzw. in entsprechender

Zeit erreichen konnte. Im Vergleich zu früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe und der allgemeinen Literatur, die belegen, dass eine Regeneration am N. ischiadicus der Ratte über ein Conduit bis 1cm in hoher Qualität erfolgt (55), bei längeren Defektstrecken aber deutlich abbricht, ist anzunehmen, dass durch rhEpo-Gabe keine Verbesserung der möglichen Regenerationsstrecke erzielt werden konnte.

Die Entfernung der Transplantate erfolgte bereits sieben Wochen nach der Operation, um zu sehen, ob sich Veränderungen in der Frühphase der Nervenregeneration finden. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob der geringere Atrophiegrad des M. tibialis nach rhEpo-Gabe Auswirkungen auf die endgültige motorische und sensible Funktion hat, sind Untersuchungen mit einer längeren Versuchsdauer erforderlich. Offen bleiben auch veränderte Effekte durch Variation der Erythropoietindosis oder Applikationsdauer.

Bisher konnte für Erythropoietin kein andauernder Effekt auf die Regeneration peripherer Nerven gezeigt werden, die geringere Muskelatrophie des M. tibialis zeigt jedoch die Möglichkeit eines positiven Effekts auf das funktionelle Ergebnis nach autologer Nerven transplantation.

Ein zweiter Aspekt dieser Dissertationsarbeit bestand in der Entwicklung eines Systems zur semiautomatischen quantitativen Analyse der Nervenregeneration über Messung von Axonzahl und Axonquerschnitten.

Die quantitative Auswertung der Axone eines Nervenquerschnittes ist sehr zeitaufwändig. Durch Auswählen eines repräsentativen Bereiches und Extrapolation kann die Auszählung zwar vereinfacht werden, führt aber mitunter zu erheblichen Ungenauigkeiten in Abhängigkeit der ausgewählten Referenzbereiche. Vor allem nach Tubulisation ist das axonale Wachstum häufig sehr unregelmäßig verteilt, so dass eine Extrapolation sehr ungenau wird. Timmer et al. verwendeten eine Software zur automatischen Erkennung myelinisierter Axone. Vor der Quantifizierung wird bei ihrem Programm AnalySIS Pro mittels verschiedener Filter und arithmetischer Operationen das Bildrauschen reduziert, der Hintergrund gelöscht und die

myelinisierten Axone extrahiert. Die Fehlerquote der Erkennung beträgt 10 %. Zudem bedarf die Quantifizierung einer manuellen Überarbeitung der automatisch erkannten Elemente (113).

Um die exakte Bestimmung der Axonanzahl zu vereinfachen und möglicherweise eine höhere Axonerkennung zu erzielen, entwickelten wir für diese Studie die Methode der halbautomatischen Axonquantifizierung mittels einer eigens dafür programmierten Computersoftware. Abhängig von der Qualität der histologischen Querschnitte und der histologischen Färbung erkennt das Programm bis zu 90 % der myelinisierten Axone. Durch manuelles Hinzufügen oder Löschen einzelner Strukturen ist die Auswertung eines kompletten Nervenquerschnittes auf vereinfachte Art und Weise möglich. Sowohl die Axonzahl als auch deren Durchmesser werden ermittelt und können direkt tabellarisch abgespeichert werden.

Die Software ermöglicht die bessere Vergleichbarkeit von axonalen Querschnitten und kann eine Zeitersparnis für den Untersucher bedeuten. Wir verwendeten das Programm für Nervenquerschnitte, die mit Toluidinblau gefärbt wurden, eine Anwendung für andere Färbungen und anatomische Strukturen ist denkbar, bedarf aber weiterer Abstimmungen der Software. Die Watershed-Analyse alleine ist nur bei Bildern mit exzellenten Kontrasten anwendbar. Eine exzellente Schnitttechnik der Präparate ist hierfür essentiell. Um eine bessere Kontrastierung zu erzielen, kann man in folgenden Versuchen alternativ die Färbung mit Osmiumsäure versuchen (Osmierung mit 1 %iger Osmiumtetroxidlösung – Lithiumkarmin), welche die Markscheiden der Axone als dunkle, rostbraun gefärbte Ringe darstellt. Das Axoplasma bleibt wie bei der Toluidinblaufärbung hell und strukturlos. Endoneurium wird hellbraun gefärbt (99).

Eine Verwendung des Programms ohne Nachbearbeitung durch den Untersucher ergibt vor allem bei Querschnitten regenerierender Nerven bisher zu ungenaue Ergebnisse, da diese Querschnitte meist eine unregelmäßige Architektur aufweisen. Durch die manuelle Nachbearbeitung lassen sich alle Axone erfassen und Artefakte entfernen. Eine absolute Messung ist damit möglich. Ungenauigkeiten durch falsche oder wenig repräsentative Bildausschnitte werden ausgeschlossen. Zudem hat man

die Möglichkeit neben der absoluten Axonanzahl auch Aussagen über die Verteilung der Durchmesser der Axone und der Myelinscheiden zu treffen. Dies stellt einen deutlichen und wichtigen Erkenntnisgewinn dar.

Allerdings ergibt sich durch die manuelle Nachbearbeitung auch ein gewisses Risiko für Auswertungsfehler durch den Auswerter. Eine reliablere Methode existiert zu diesem Zeitpunkt bisher jedoch nicht.

Somit kann das Programm als wichtiges und geeignetes Instrument für die Auswertung histologischer Schnitte bewertet werden.

Zusammenfassung

Nach vollständiger Nervendurchtrennung, ist die direkte spannungsfreie Koaptation der Nervenenden die Methode der Wahl. Bei Verletzungen, die mit einem Substanzverlust des Nervs einhergehen, ist die direkte Wiederherstellung jedoch meist nicht möglich. In diesen Fällen ist die Verwendung eines autologen Nerventransplantates der derzeitige Goldstandard. Die Verfügbarkeit der in Frage kommenden Spendernerven ist jedoch begrenzt und die Entnahme immer mit einer gewissen Spendermorbidity verbunden. Alternativ besteht die Möglichkeit der Verwendung artifizierlicher Nervenröhrchen verschiedener Materialien. Um den Erfolg der Transplantation eines autologen Nervs oder eines Conduits zu erhöhen, richtet sich der Fokus der Wissenschaft auf die Beeinflussung der molekularen und zellulären Vorgänge während der Nervenregeneration.

Nachdem in Studien gezeigt werden konnte, dass das Glykoproteinormon Erythropoietin im Zentralen Nervensystem sowohl neuroprotektive als auch neuroregenerative Eigenschaften aufweist, versuchte man auch im Peripheren Nervensystem einen positiven Effekt durch Epo zu erzielen.

Wir untersuchten nun erstmalig den Einfluss von rekombinantem humanen Erythropoietin auf die Nervenregeneration im Modell des autologen Nerventransplantats und im Modell eines Collagen-Conduits.

Dabei gelang der Nachweis einer verminderten Muskelatrophie unter der Therapie mit rhEpo nach Nerven transplantation.

Unsere Versuche ergaben ein höheres Gewicht für den renervierten M. tibialis. Für die Masse des betroffenen M. gastrocnemius besteht ebenfalls die Tendenz zur verminderten Atrophie, die jedoch nicht das Signifikanzlevel erreichte. Bei den Gruppen, bei denen die Nervenrekonstruktion mit einem Kollagen-Conduit erfolgte, ergaben sich nach der Behandlung mit rhEpo keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Atrophiegrades von M. tibialis anterior und M. gastrocnemius. Morphologisch lassen sich bei Betrachtung der Nervenhistologie zwischen der rhEpo-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede feststellen. Für das Nerven transplantat ließ sich zwar eine Tendenz zu einer höheren

Axonzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen, der Unterschied erwies sich jedoch nicht als signifikant.

Im autologen Nerventransplantat war die Anzahl der aussprossenden Axone signifikant höher als im Nervenröhrchen. Die Signifikanz beträgt dabei für die mit rhEpo behandelten Gruppen $p < 0,001$ und für die Kontrollgruppen $p < 0,01$.

Um eine gesicherte Aussage über bleibende funktionelle Verbesserungen der Muskelregeneration treffen zu können ist die Durchführung weiterer Untersuchungsreihen von längerer Versuchsdauer erforderlich.

Das von uns entwickelte halbautomatische Computerprogramm vereinfacht die Auswertung Toluidinblau-gefärbter Nervenquerschnitte. Mit einer Erkennung von bis zu 90 % und nachfolgender manueller Bearbeitung ist es geeignet zur kompletten Quantifizierung histologischer Schnittbilder. Zudem ermöglicht das entwickelte Programm einerseits durch die hohe Standardisierung und Objektivierung der Messung und andererseits die zeitsparende semiautomatische Auswertung eine bessere Vergleichbarkeit der ermittelten Ergebnisse und damit eine gute Alternative zur konventionellen Quantifizierung von Axonzahlen und Axondurchmessern in Nervenquerschnitten.

Abkürzungsverzeichnis

Co	Kollagen-Conduit
NTx	Nerventransplantat
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NO	Stickstoffmonoxid
CAMS	Cell adhesion molecules
GGF	Glial growth factor
NGF	Nerve growth factor
IGF	Insulin-like growth factor
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
GDNF	Glial-cell line-derived neurotrophic factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
HIF	Hypoxia-inducible factor
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
NT-3	Neurotrophin 3
RGC	Retinal ganglion cells
JAK 2	Janus-Tyrosinkinase-2
SCF	Stem cell factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IL	Interleukin

Literaturverzeichnis

- (1) Hebel R, Stromberg M. Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat. Wörthsee: 1986.
- (2) Kingham P, Terenghi G. Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *J Anat* 2006;209:511-26.
- (3) Archibald S, Krarup C, Shefner J, Li S, Madison R. A collagen-based nerve guide for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. *J Comp Neurol* 1991;306(4):685-96.
- (4) Scholz T, Krichevsky A, Sumarto A, Jaffurs D, Wirth G, Paydar K et al. Peripheral Nerve Injuries: An International Survey of Current Treatments and Future Perspectives. *J Reconstr Microsurg* 2009 March 19;ahead of print.
- (5) Noble J, Munro C, Prasad V, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of Patients with multiple injuries. *J Trauma* 1998;45(1):178-204.
- (6) Visser P, Hermreck A, Pierce G, Thomas G, Thomas J, Hardin C. Prognosis of nerve injuries incurred during acute trauma to peripheral arteries. *Am J Surg* 1980 November;140(5):596-9.
- (7) Evans G. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec* 2001;263(4):396-404.
- (8) Taylor C, Braza D, Rice J, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil* 2008 May;87(5):381-5.
- (9) Jaquet J, Luijsterburg A, Kalmijn S, Kuypers P, Hofman A, Hovius S. Median, ulnar, and combined median-ulnar nerve injuries: functional outcome and return to productivity. *J Trauma* 2001;51(4):687-92.
- (10) Rosberg H, Carlsson K, Höjgard S, Lindgren B, Lundborg G, Dahlin L. 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* 2005;30B(1):35-9.
- (11) Clawson D, Seddon H. The late consequences of sciatic nerve injury. *J Bone Joint Surg* 1960;42b(2):213-25.

- (12) Ichihara S, Inada Y, Nakamura T. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. *Int J Care Injured* 2008;39S4:S29-S39.
- (13) Seddon H. Nerve grafting. *J Bone Joint Surg* 1960;269-80.
- (14) Lohmeyer J, Siemers F, Machens H, Mailänder P. The clinical use of artificial nerve conduits for digital nerve repair: a prospective cohort study and literature review. *J Reconstr Microsurg* 2009;25(1):55-61.
- (15) Fansa H, Keilhoff G, Forster G, Seidel B, Wolf G, Schneider W. Acellular muscle with Schwann-cell implantation: an alternative biologic nerve conduit. *J Reconstr Microsurg* 1999;15(531):537.
- (16) Keilhoff G, Goihl A, Stang F, Wolf G, Fansa H. Peripheral Nerve Tissue Engineering: Autologous Schwann Cells vs. Transdifferentiated Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering* 2006;12(6):1451-65.
- (17) Lohmeyer J, Shen Z, Walter G, Berger A. Bridging extended nerve defects with an artificial nerve graft containing Schwann cells pre-seeded on polyglactin filaments. *Int J Artif Organs* 2007;30(1):64-74.
- (18) Boyd J, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol* 2003;27:277-324.
- (19) Gordon T, Sulaiman O, Boyd J. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Periph Nerv Syst* 2003;8:236-50.
- (20) Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 1999;194:1-14.
- (21) Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M et al. The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:228-36.
- (22) Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997;76:105-6.
- (23) Grasso G, Sfacteria A, Erbayraktar S, Passalacqua M, Meli F, Gokmen N et al. Amelioration of spinal cord compressive injury by pharmacological preconditioning with erythropoietin and a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *J Neurosurg Spine* 2006;4:310-8.

- (24) Tsai P, Ohab J, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosurg* 2006;26(4):1296-74.
- (25) King C, Rodger J, Bartlett C, Esmaili T, Dunlop S, Beazley L. Erythropoietin is both neuroprotective and neuroregenerative following optic nerve transection. *Exp Neurol* 2007;205:48-55.
- (26) Elfar J, Jacobson J, Puzas E, Rosier R, Zuscik M. Erythropoietin accelerates functional recovery after peripheral nerve injury. *J Bone Joint Surg (Amer)* 2008;90:1644-53.
- (27) Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus S et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2258-63.
- (28) Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9450-5.
- (29) Siren A, Ehrenreich H. Erythropoietin - a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001;251:179-84.
- (30) Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495-505.
- (31) Hasselblatt M, Ehrenreich H, Siren A. The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease. *J Neurosurg Anesthesiol* 2006;18:132-8.
- (32) Brines M, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle N, Cerami C et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;12:10526-31.
- (33) Novak C, Mackinnon S, Baratz M. Peripheral nerve injuries. *eMedicine* . 9-8-2008.

Ref Type: Online Source

- (34) Sharon I, Fishfeld C. Acute nerve injury. *eMedicine* . 2007.

Ref Type: Online Source

- (35) Seddon H. Nerve grafting. *J Bone Joint Surg* 1963 August;45B(3):447-61.

- (36) Seddon H. The Practical Value of Peripheral Nerve Repair. 1949 p. 427-36.
- (37) Seddon H, Medawar P, Smith H. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *J Physiol* 1943;102:191-215.
- (38) Dellon A, Amadio P, James R. Learmonth: the first peripheral nerve surgeon. *J Reconstr Microsurg* 2000;16(3):213-7.
- (39) Hall S. Nerve Repair: A Neurobiologist's View. *J Hand Surg* 2001 April;26B(2):129-36.
- (40) Sunderland S. Nerves and Nerve Injuries. Edinburgh, London: E. & S. Livingstone Ltd.; 1968.
- (41) McKay Hart A, Wiberg M, Terenghi G. Pharmacological enhancement of peripheral nerve regeneration in the rat by systemic acetyl-L-carnitine treatment. *Neurosci Lett* 2002;334(3):181-5.
- (42) Millesi H. Techniques for nerve grafting. *Hand Clin* 2000;16:73-91.
- (43) Terzis J, Smith K. Repair of peripheral nerves: comparison of the „de Medinaceli" and standard microsuture methods. *Experimental Neurology* 1987;96:672-80.
- (44) Merle M, Foucher G, Van Genechten F, Michon J. The repair of peripheral nerve injuries in emergency. *JJJ* 1984.
- (45) Berger A, Lassner F. Peripheral nerve allografts: survey of present state in an experimental model of the rat. *Microsurgery* 1994;15(11):773-7.
- (46) Brunelli G, Battiston B, Vigasio A, Brunelli G, Marocolo D. Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits. *Microsurgery* 1993;14(4):247-51.
- (47) Mligiliche N, Kitada M, Ide C. Grafting of Detergent-Denatured Skeletal Muscles Provides Effective Conduits for Extension of Regenerating Axons in the Rat Sciatic Nerve. *Arch Histol Cytol* 2001;64(1):29-36.
- (48) Pereira J, Cowley S, Gschmeisser S, Bowden R, Turk J. Denatured Muscle Grafts for Nerve Repair. *J Bone Joint Surg* 1990;72b:874-80.
- (49) Lohmeyer J, Zimmermann S, Sommer B, Machens H, Lange T, Mailänder P. Überbrückung peripherer Nervendefekte durch den Einsatz von Nervenröhrchen. *Der Chirurg* 2007;78:142-7.

- (50) Li J, Yan J, Ai X, Hu S, Gu Y, Matloub H et al. Ultrastructural analysis of peripheral nerve regeneration within a nerve conduit. *J Reconstr Microsurg* 2004;20(7):565-9.
- (51) Liu B. Fabrication and evaluation of a biodegradable proanthocyanidin-crosslinked gelatine conduit in peripheral nerve repair. *J Biomed Mater Res A* 2008.
- (52) Oh S, Kim J, Sang K, Jeon B, Yoon J, Seo T et al. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrical porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. *Biomaterials* 2008;29:1601-9.
- (53) Fansa H, Keilhoff G. Comparison of different biogenic matrices seeded with cultured Schwann cells for bridging peripheral nerve defects. *Neurol Res* 2004;26:167-73.
- (54) Strauch B. Autologous Schwann cells drive regeneration through a 6-cm autogenous venous nerve conduit. *J Reconstr Microsurg* 2001;17(8):589-96.
- (55) Shen Z, Berger A, Hierner R, Allmeling C, Ungewickell E, Walter G. A Schwann cell-seeded intrinsic framework and its satisfactory biocompatibility for a bioartificial nerve graft. *Microsurg* 2001;21:000.
- (56) Wikipedia. Kalottenmodell Erythropoietin. Wikipedia 2009.
- (57) Stockenhuber F, Kurz R, Geissler K, Jahn C, Hinterberger W, Balcke P et al. Recombinant human erythropoietin activates a broad spectrum of progenitor cells. *Kidney International* 1990;37:150-6.
- (58) Anagnostou A, Lee E, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5978-82.
- (59) Lykissas M, Korompilias A, Vekris M, Mitsionis G, Sakellariou E, Beris A. The role of erythropoietin in central and peripheral nerve injury. *J Clin Neurol* 2007;109:639-44.
- (60) Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 2007;78:183-205.
- (61) Pacary E, Petit E, Bernaudin M. Erythropoietin, a Cytoprotective and Regenerative Cytokine, and the Hypoxic Brain. *Neurodegenerative Dis* 2006;3:87-93.

- (62) Kretz A, Happold C, Marticke J, Isenmann S. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via JAK2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation. *Mol Cell Neurosci* 2005;29(4):569-79.
- (63) Campana W, Myers R. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after injury. *The FASEB J* 2001;15:1804-6.
- (64) Keswani S, Leitz G, Hoke A. Erythropoietin is neuroprotective in models of HIV sensory neuropathy. *Neurosci Lett* 2004;371(2-3):102-5.
- (65) Campana W, Li X, Shubayev V, Angert M, Cai K, Myers R. Erythropoietin reduces Schwann cell TNF- α , Wallerian degeneration and pain-related behaviors after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 2006;23:617-26.
- (66) Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with Erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 2004;35:1732-7.
- (67) Weddell G. Axonal regeneration in cutaneous nerve plexuses. *J Anatomy* 1942;77:49-62.
- (68) Hobson M, Green C, Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat* 2000;197:591-605.
- (69) Podhajsky R, Myers R. The vascular response to nerve crush: relationship to Wallerian degeneration and regeneration. *Brain Research* 1993;623:117-23.
- (70) Weerasuriya A. Patterns of change in endoneurial capillary permeability and vascular space during nerve regeneration. *Brain Research* 1990;510:135-9.
- (71) Hobson M. Increased vascularisation enhances axonal regeneration within an acellular nerve conduit. *Ann R Coll Surg Engl* 2002;84:47-53.
- (72) Penkert G. Chirurgie der Nervenverletzungen Teil I. *Der Chirurg* 1999;70:959-67.
- (73) Arai T, Lundborg G, Dahlin L. Bioartificial nerve graft for bridging extended nerve defects in rat sciatic nerve based on resorbable guiding filaments. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2000;34(2):101-8.
- (74) Lee A, Yu V, Lowe J, et al. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol* 2003;184(1):295-303.

- (75) Rutkowski G, Miller C, Jeftinija S, Mallapragada S. Synergistic effects of micropatterned biodegradable conduits and Schwann cells on sciatic nerve regeneration. *J Neural Engl* 2004;1(3):151-7.
- (76) Scherman P, Lundborg G, Kanje M, Dahlin L. Neural regeneration along longitudinal polyglactin sutures across short and extended defects in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg* 2001;95(2):316-23.
- (77) Humphrey M, Levy W, Dietrich W, Rumpf R, Mora J. Peripheral nerve repair across a gap studied by repeated observation in a new window implant chamber. *Brain Res* 1989;497:132-7.
- (78) Trumble T. Peripheral nerve transplantation: the effects of predegenerated grafts and immunosuppression. *J Neural Transplant Plast* 1992;3:39-49.
- (79) Lykissas M, Sakellariou E, Vekris M, Kontogeorgakos V, Batistatou A, Mitsionis G et al. Axonal regeneration stimulated by erythropoietin: An experimental study in rats. *J Neurosci Meth* 2007;164:107-15.
- (80) Langley J, Hashimoto M. Observations on the Atrophy of Denervated Muscle. 1918.
- (81) Barth E, Caelli T, Zetzche C. Image encoding, labeling and reconstruction from differential geometry. *Graphical Model and Image Processing* 1993;55(6):428-46.
- (82) Costa A, Mascarenhas N, De Andrade Netto M. Cell nuclei segmentation in noisy images using morphological watersheds. *Proc SPIE* 1997;3164(314):324.
- (83) Gauch J. Image segmentation and analysis via multiscale gradient watershed hierarchies. 1999 p. 69-79.
- (84) Maintz J, Van Den Elsen P, Viergever M. Evaluation of Ridge Seeking Operators for Multimodality Medical Image Matching. 1996 p. 353-65.
- (85) Wu H, Berba J, Gil J. Iterative thresholding for segmentation of cells from noisy images. *J Microscopy* 2002;197(3):296-304.
- (86) Vessel Segmentation in Angiograms using Hysteresis Thresholding. 2005.
- (87) Canny J. A computational approach to edge detection. 1986.
- (88) Haralick R, Shapiro L. Computer and Robot Vision. *Computer and Robot Visions* 1992;1:174-85.
- (89) Automatic cell count in digital images of liver tissue sections. 1991.

- (90) Wang Y, Sun Y, Lin C, Ju M. Nerve Cell Segmentation via Multi-Scale Gradient Watershed Hierarchies. 2006.
- (91) Beucher S. Segmentation Tools in Mathematical Morphology. 1997.
- (92) Gonzalez R, Woods R. Digital Image Processing. 1993.
- (93) Bamford P, Lovell B. Unsupervised cell nucleus segmentation with active contours. *Signal Processing* 1998;71(2):203-13.
- (94) Fok Y, Chan J, Chin R. Automated analysis of nerve-cell images using active contour models. 1996 p. 353-68.
- (95) Mouroutis T, Roberts S, Bharath A. Robust cell nuclei segmentation using statistical modeling. *Bioimaging* 1998;6(2):79-91.
- (96) Wu H, Barba J, Gil J. Parametric fitting algorithm for segmentation of cell images. 1998 p. 400-7.
- (97) Bain J, Mackinnon S, Hunter D. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83(1):129-38.
- (98) de Medinaceli L, Freed W, Wyatt R. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77(3):634-43.
- (99) Kühnel W. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 11 ed. Stuttgart; New York: Thieme; 2002.
- (100) Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *J Neurosci Meth* 2008 May 30;170(2):255-61.
- (101) Mackinnon S, Dellon A. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconstr Surg* 1990;85:419-24.
- (102) Berger A, Lassner F, Schaller E. The Dellon tube in injuries of peripheral nerves. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 1994;26(1):44-7.
- (103) Dellon A. Use of a silicone tube for the reconstruction of a nerve injury. *J Hand Surg* 1994;19(3):271-2.
- (104) Gulati A. Nerve graft immunogenicity as a factor determining axonal regeneration in the rat. *J Neurosurgery* 1990;72(1):114-22.

- (105) Böcker-Meffert S, Rosenstiel P, Röhl C, Warneke N, Held-Feindt J, Sievers J et al. Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest Ophthalmol Sci* 2002;43(6):2021-6.
- (106) Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines M et al. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2002;952:128-34.
- (107) Campana W, Myers R. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after injury. *The FASEB J* 2001;15:1804-6.
- (108) Yu X, Shacka J, Eells J, Suarez-Quian C, Przygodzki R, Beleslin-Cokic B et al. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 2002;129(2):505-16.
- (109) Arcasoy M. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol* 2008;141(1):14-31.
- (110) Allaf M, Hoke A, Burnett A. Erythropoietin promotes the recovery of erectile function following cavernous nerve injury. *J Urol* 2005;174(5):2060-4.
- (111) Adamson J, Eschbach J. Treatment of the Anemia of Chronic Renal Failure with Recombinant Human Erythropoietin. *Annu Rev Med* 1990;41:349-60.
- (112) Campos A, Garin E. Therapy of Renal Anemia in Children and Adolescents with Recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO). *Clin Paediatrics* 1992;31(2):94-9.
- (113) Timmer M, Robben S, Müller-Ostermeyer F, Nikkhah G, Grothe C. Axonal Regeneration Across Long Gaps in Silicone Chambers Filled With Schwann Cells Overexpressing High Molecular Weight FGF-2. *Cell Transplantation* 2003;12:265-77.