

Aus der  
Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med., Dipl. phys. E. Kochs)

und aus dem  
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. med. M. Blobner

Vorgelegt über den  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
am Institut für Tierpathologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Histopathologische Veränderungen am Skelettmuskel nach chronischer  
Inflammation mit *Corynebacterium parvum* mit und ohne Immobilisation  
-Experimentelle Untersuchungen an der Ratte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Andrea Lenz (geb. Dübener)  
aus Staßfurt

München 2007

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Prof. Dr. Schmahl
Korreferenten:	Prof. Dr. Hartmann Prof. Dr. Aigner

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

**meinem Mann und meinen Eltern**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Schrifttum.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Der Skelettmuskel.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Myopathologische Syndrome.....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Ätiologie.....	10
2.2.2 Neurogenes Gewebssyndrom.....	10
2.2.3 Myopathisches Gewebssyndrom.....	10
2.2.4 Endplattenläsionen.....	11
2.2.5 Myositisches Gewebssyndrom.....	11
<b>2.3 Allgemeine Myopathie.....</b>	<b>11</b>
2.3.1 Kaliberänderungen.....	11
2.3.2 Fasertypengruppierung.....	12
2.3.3 Segmentale Fasernekrosen.....	12
2.3.4 Myophagie.....	12
2.3.5 Faseraufspaltungen.....	13
2.3.6 Kernveränderungen.....	13
2.3.7 Entzündliche Infiltrate.....	13
2.3.8 Zunahme des interstitiellen Bindegewebes.....	13
<b>2.4 Sepsis.....</b>	<b>14</b>
2.4.1 Inzidenz der Sepsis.....	14
2.4.2 Definition der Sepsis.....	14
2.4.3 Diagnose der Sepsis.....	16
2.4.4 Pathophysiologie der Sepsis.....	17
2.4.5 Therapieansätze.....	18
2.4.6 Neuromuskuläre Beteiligung.....	19
2.4.7 Critical Illness Polyneuropathy.....	19
2.4.8 Akute Intensivmyopathie.....	21
2.4.9 Corynebakterium parvum Modell.....	26

<b>3. Eigene Untersuchungen.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Zielvorstellungen.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Material und Methodik.....</b>	<b>27</b>
3.2.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen, Akklimation.....	27
3.2.2 Tiermodelle.....	28
3.2.2.1 Corynebakterium parvum-Injektion.....	28
3.2.2.2 Immobilisation einer Hintergliedmaße.....	28
3.2.3 Versuchsplan.....	29
3.2.4 Versuchsgruppen.....	30
3.2.5 Narkose.....	31
3.2.5.1 Anästhesie zur Bakterieninjektion und Immobilisation.....	31
3.2.5.2 Anästhesie zur Muskelkraftmessung und anschließender Euthanasie.....	32
3.2.5.3 Narkose-Monitoring.....	32
3.2.6 Instrumentierung.....	34
3.2.6.1 Bakterieninjektion.....	34
3.2.6.2 Immobilisation.....	35
3.2.6.3 Gefäßpräparation.....	36
3.2.7 Muskelentnahme.....	37
3.2.7.1 Präparation und Konservierung.....	37
3.2.7.2 Histologische Aufarbeitung.....	38
3.2.8 Färbungen.....	38
3.2.8.1 Hämatoxylin & Eosin-Färbung.....	38
3.2.8.2 Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung).....	38
3.2.9 Mikroskopische Untersuchung.....	39
3.2.9.1 Auswertung.....	39
3.2.10 Statistische Bewertung der Ergebnisse.....	42
<b>3.3 Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
3.3.1 Inflammationsparameter.....	43
3.3.1.1 Klinische Beobachtungen.....	43
3.3.1.2 Körpergewicht.....	43
3.3.1.3 Lebergewicht.....	45
3.3.1.4 Hämoglobin-, Methämoglobinwert.....	46
3.3.1.5 Blutbild und $\alpha_1$ -saures Glykoprotein.....	49
3.3.2 Hämodynamik, Herzfrequenz und Blutglukose.....	50

3.3.3 Muskelgewichte.....	51
3.3.4 Histologie.....	54
3.3.4.1 Hämatoxylin & Eosin-Färbung.....	54
3.3.4.2 Periodic-acid-Schiff-Reaktion.....	67
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1 Diskussion der Methoden.....</b>	<b>71</b>
4.1.1 Darstellung des Versuchsziels.....	71
4.1.2 Corynebakterium parvum Modell.....	71
4.1.3 Immobilisationsmodell.....	72
4.1.4 Kombinationsmodell.....	73
4.1.5 Konservierung der Muskelproben.....	73
4.1.6 Histopathologisches Bewertungssystem.....	74
4.1.6.1 Hämatoxylin & Eosin-Färbung.....	74
4.1.6.2 Periodic-acid-Schiff-Reaktion.....	74
<b>4.2 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>74</b>
4.2.1 Messparameter.....	74
4.2.1.1 Körpergewicht.....	74
4.2.1.2 Lebergewicht.....	75
4.2.1.3 Hämoglobin-, Methämoglobinwert, Blutbild, $\alpha_1$ -saures Glykoprotein.....	76
4.2.1.4 Hämodynamik, Herzfrequenz und Blutglukose.....	77
4.2.2 Muskelgewichte.....	77
4.2.3 Hämatoxylin & Eosin-Färbung.....	79
4.2.3.1 Anguläre Fasern, Myophagie, pathologische Kalibervariationen.....	79
4.2.3.2 Muskelfaserdurchmesser.....	80
4.2.3.3 Anzahl der Entzündungszellen.....	81
4.2.3.4 Breite des endomysialen Bindegewebes.....	82
4.2.4 Periodic-acid-Schiff-Reaktion.....	82
4.2.4.1 Muskelfasertypengruppierung.....	82
4.2.4.2 Verhältnis von Typ I- zu Typ II-Muskelfasern.....	83
4.2.5 Gesamtprojekt und abschließende Betrachtung.....	83

<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>85</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>87</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>10. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>105</b>
<b>12. Lebenslauf.....</b>	<b>106</b>

## 1. EINLEITUNG

Bei intensivmedizinisch behandelten Patienten kommt es häufig zu einer muskulären Schwäche und Atrophie, welche sich hauptsächlich in einer verzögerten Entwöhnung vom Respirator und in einer Verlängerung der neurologischen Rehabilitation manifestieren (HUND, 1999). Dies führt oft zu einem schlechteren Therapieergebnis und zu einem verlängerten Klinikaufenthalt, welcher mit zusätzlichen sozioökonomischen Kosten verbunden ist. 95% der Patienten mit einer intensivmedizinischen Therapie von mehr als 28 Tagen haben 5 Jahre nach Entlassung von der Intensivstation neuromuskuläre Defizite (FLETCHER et al., 2003).

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Muskelschwäche ausschließlich auf einer Inaktivitätsatrophie (disuse myopathy) beruht. Inzwischen ist aber etabliert, dass es sich vielmehr um de novo entstandene neuromuskuläre Erkrankungen handelt. 1984 beschrieb die Arbeitsgruppe um BOLTON zunächst die „Critical Illness Polyneuropathie (CIP)“ und wenig später auch die „Critical Illness Myopathie (CIM)“ als eigenständige Krankheitsbilder (BOLTON et al., 1984).

Die Pathogenese der CIP und der CIM ist noch unklar. Es wird vermutet, dass die gleichen Mediatoren, die für die systemische Manifestation der Inflammation (systemic inflammatory response syndrome) oder Sepsis verantwortlich sind, auch die Entstehung einer CIP bedingen. Bei der CIM gibt es darüberhinaus Hinweise darauf, dass exogene Faktoren wie eine Dauermedikation mit Muskelrelaxanzien oder Steroiden ihre Entstehung begünstigen (HUND, 1999). Ein weiterer zu berücksichtigender ätiologischer Faktor bei der CIP/CIM ist die Immobilisation. Patienten mit einer Sepsis werden auf der Intensivstation oft über einen längeren Zeitraum sediert, maschinell beatmet und damit immobilisiert. Diese Ruhigstellung allein hat schon gravierende Auswirkungen auf die Muskulatur, wie Veränderungen der Fasergröße und -zusammensetzung, Abnahme der Kraftentwicklung und Fehlregulation der auf der Muskeloberfläche exprimierten Rezeptoren (IBEBUNJO et al., 1997; IBEBUNJO und MARTYN, 1999).

Auch wenn der Einfluss der einzelnen Komponenten, Sepsis und Immobilisation, auf die Entstehung der CIP/CIM schon Gegenstand verschiedener Untersuchungen war, ist insbesondere das Zusammenspiel beider nur unzureichend untersucht.

Das Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, die Auswirkungen von Sepsis und Immobilisation separat als auch in Kombination auf die Muskelkraft zu untersuchen. Im Mittelpunkt der



vorliegenden Arbeit stehen dabei insbesondere die histopathologischen Veränderungen am Muskel.

## 2. SCHRIFTTUM

### 2.1 Der Skelettmuskel

#### Fasertypen

Das Skelettmuskelgewebe bildet die Grundlage des kontraktiven Bewegungsapparates des Körpers (LIEBICH, 1992). Stoffwechsel, Struktur und Kaliber der einzelnen Muskelfasern hängen von der neuromuskulären Übertragung ab (RIEDE et al., 1995)

Die Muskelfasern werden anhand ihres Myofibrillengehaltes in drei Fasertypen unterteilt:

- Typ I-Fasern (roter Muskel): slow twitch oxidative

Dieser ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

- myoglobin- und mitochondrienreich
- oxidativer Grundmetabolismus
- reich an oxidativen Enzymen (NADH-Tetrazoliumreduktase = NADH-TR, Succinatdehydrogenase = SDH)
- glykogenarm
- langsam kontrahierend

- Typ II B-Faser (weisser Muskel): fast twitch oxidative

Dieser ist charakterisiert durch folgende Eigenschaften:

- myoglobin- und mitochondrienarm
- anaerobe Glykolyse
- reich an myofibrillärer ATPase und Phosphorylase
- glykogenreich
- rasch kontrahierend

- Typ II A-Faser: fast twitch oxidative, glykolytic

Dieser ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

- liegen funktionell zwischen den Typ I- und Typ II-Fasern

Beispielsweise besteht die Unterschenkelmuskulatur der Ratte aus Muskelgruppen folgender Zusammensetzung: der M. soleus enthält vorwiegend Typ I-Fasern (84%), der M. gastrocnemius enthält 58% Typ II-, 5% Typ I- und 37% Typ II A-Fasern (ARIANO et al., 1973). (Die Unterschenkelmuskulatur der Ratte ist Gegenstand der vorliegenden Untersuchung).

## **2.2 Myopathologische Syndrome**

### **2.2.1 Ätiologie**

Nach kausalpathogenetischen Gesichtspunkten lassen sich die Krankheiten der Skelettmuskulatur wie folgt unterteilen:

- neurogene Muskelkrankheiten (= neurogene Muskelatrophien)
- Endplattenläsionen
- Myopathien
- Myositiden

(SCHRÖDER, 1982; RIEDE et al., 1995)

### **2.2.2 Neurogenes Gewebssyndrom**

Neurogene Muskelerkrankungen beruhen auf einer Störung oder Erkrankung der innervierenden Nervenfasern und treten bei degenerativen Prozessen des zentralen und/oder peripheren Nervensystems auf (RIEDE et al., 1995).

Man unterscheidet die spinale/bulbäre Muskelatrophie (Schädigung des motorischen Vorderhorns des Rückenmarks und/oder der motorischen Hirnnervenkerne), die Polyneuropathie (Schädigung des peripheren Nervs durch exogene Noxeneinwirkung) und die hereditäre motorisch-sensorische Neuropathie (infolge genetisch bedingter Erkrankung des peripheren Nervs).

Histologisch fallen eine Schrumpfung des Muskelfaserkalibers und eine Formveränderung der Muskelfasern mit eckigen Querschnitten auf. Die Muskelzellkerne rücken dicht aneinander und erscheinen vermehrt (relative Kernvermehrung) oder sie bilden Kernhaufen („myogene mehrkernige Riesenzellen“)(RIEDE et al., 1995).

### **2.2.3 Myopathisches Gewebssyndrom**

Myopathien sind Erkrankungen, die entweder auf einen krankhaften, in der Skelettmuskulatur selbst entstandenen Prozess zurückgehen (kongenitale Myopathien, Muskeldystrophien), oder auf einer Beteiligung der Skelettmuskulatur bei einer Allgemeinerkrankung beruhen (metabolische, endokrine, ischämische, vaskuläre, toxische und paraneoplastische Myopathien) (RIEDE et al., 1995).

Histologisch lassen sich disseminierte Degenerationen einzelner Muskelfasern, zentrale Kerne, pathologische Kalibervariationen, eine Zunahme des interstitiellen Bindegewebes und bei 20 bis 30% der Präparate auch Infiltrate nachweisen (SCHRÖDER, 1982).

## **2.2.4 Endplattenläsionen**

Dabei handelt es sich um Erkrankungen die die Schnittstelle zwischen Nerv und Muskel, die motorische Endplatte betreffen. Dies resultiert in einer Störung der Impulsübertragung. Ursache dafür ist der Verlust funktionsfähiger prä- oder postsynaptischer Rezeptoren. Beispiele für Endplattenläsionen sind die Myasthenia gravis, der Tetanus und der Botulismus (RIEDE et al., 1995).

## **2.2.5 Myositisches Gewebssyndrom**

Die entzündlichen Erkrankungen der Skelettmuskulatur umfassen die seltenen infektiösen Myositiden, die häufigen nichtinfektiösen autoimmunen Myositiden und die entzündlichen tumorartigen Läsionen mit fokaler Symptomatik (RIEDE et al., 1995).

Infektiöse Myositiden können bakteriell (Gasbrand, tuberkulöse Myositis), viral (Coxsackie Virus B), parasitär (Trichinose, Cystizerkose, Sarkosporidiose) oder durch Pilze (Actinomycceten) verursacht sein (SCHRÖDER, 1982).

Das normale Muskelgewebe ist gegenüber bakteriellen Infektionen relativ resistent. Auch hämatogene Abszesse im Rahmen einer Septikämie sind im Muskel im Unterschied zu zahlreichen anderen Organen extrem selten (SCHRÖDER, 1982).

## **2.3 Allgemeine Myopathologie**

### **2.3.1 Kaliberveränderungen**

Der Skelettmuskel zeigt unter pathologischen Bedingungen nur eine geringe Anzahl morphologischer Reaktionsweisen, wobei ein und dasselbe morphologische Symptom unterschiedliche Ursachen haben kann. Zu unterscheiden sind Veränderungen an den Muskelfasern von denen an den motorischen Endplatten und den Muskelspindeln (SCHRÖDER, 1982), (wobei für die vorliegende Arbeit die Veränderungen an den Muskelfasern im Mittelpunkt stehen).

Die wichtigsten und auffälligsten Veränderungen des Muskelgewebes sind Kaliberveränderungen in Form einer Faseratrophie oder -hypertrophie, wobei eine Faseratrophie ab einem Faserdurchmesser  $< 40 \mu\text{m}$  vorliegt (SCHRÖDER, 1982).

Der normale Muskel weist eine weitgehende Uniformität der Faserdurchmesser auf. Unter krankhaften Verhältnissen entstehen oft pathologische Kalibervariationen mit atrophischen, hypertrophischen kombiniert mit normalkalibrigen Fasern (SCHRÖDER, 1982).

Treten Faseratrophien gruppenförmig auf, ist dies ein Hinweis auf eine neurogene Muskelerkrankung. Aber auch einzeln liegende atrophische Fasern können als denerviert angesehen werden, besonders wenn sie im Querschnitt stark abgeflacht („elongiert“) oder eckig („angulär“) sind. Bei der Mehrzahl der neurogenen Prozesse liegt eine Atrophie sowohl der Typ I- als auch der Typ II- Fasern vor (SCHRÖDER, 1982).

Eine selektive Typ II-Faseratrophie tritt bei einer Inaktivität, einer Immobilisation oder einer Kachexie auf (ENGEL und MELTZER, 1970). Auch JAFFE et al. (1978) haben nach einer 13-tägigen experimentellen Immobilisation der Knie- und Fußgelenke bei der Ratte eine selektive Atrophie der Typ II-Fasern im M. tibialis cranialis nachgewiesen.

Eine Muskelfaserhypertrophie ist sehr vieldeutig. Kompensatorische Faserhypertrophien können unter anderem bei chronischen Denervationsprozessen, namentlich bei chronischen Polyneuropathien sehr ausgeprägt sein (SCHRÖDER, 1982).

### **2.3.2 Fasertypengruppierung**

Im normalen Skelettmuskel liegen die verschiedenen Muskelfasertypen mosaikartig durcheinander. Unter pathologischen Bedingungen kommt es zur Bildung großer, über 40 Fasern eines Typs enthaltenen Gruppen, was auch als pathologische Gruppenbildung bezeichnet wird. Diesen Befund interpretiert man als Hinweis auf einen Ausfall von Motoneuronen mit nachfolgender Reinnervation der denervierten Fasern durch benachbarte Motoneurone (SCHRÖDER, 1982).

### **2.3.3 Segmentale Fasernekrosen**

Bei dieser auch als Zenkersche, wachsartige, hyaline Degeneration bezeichneten Veränderung handelt es sich um eine nur einzelne Sarkomere betreffende Nekrose. Diese Nekrosen sind sehr unspezifisch und bei fast allen Muskelerkrankungen zu finden (SCHRÖDER, 1982).

Im Muskelquerschnitt findet man abgerundete Fasern, die dicker sind als die angrenzenden normalen Muskelfasern, was nach SCHMALBRUCH (1973, 1975) auf eine segmentale Kontraktion und Schwellung zurückzuführen ist. In fortgeschrittenen Stadien zeigen sich verklumpte, homogen erscheinende, „hyaline“ Faserabschnitte oder leere Sarkolemmschläuche (SCHRÖDER, 1982).

### **2.3.4 Myophagie**

Auf eine segmentale oder ausgedehnte Muskelfasernekrose folgt eine myophagische Reaktion. Diese dient dem Abbau des nekrotischen Muskelgewebes (SCHRÖDER, 1982).

### **2.3.5 Faseraufspaltungen**

Bei verschiedenen Prozessen, unter anderem nach Faserhypertrophien sind longitudinale Faseraufspaltungen nachweisbar (HALL-CRAGGS, 1972). Nach SWASH et al. (1978) ist die Aufspaltung der hypertrophischen Muskelfaser bei neurogenen Erkrankungen wahrscheinlich auf eine mechanische Überlastung zurückzuführen, die beim geschwächten Muskel bereits bei normaler Belastung vorliegt.

### **2.3.6 Kernveränderungen**

Im histologischen Bild eines gesunden Muskels sind bis zu 4 Muskelfaserkerne pro Faserquerschnitt zu sehen. Kernveränderungen können sowohl Vermehrungen der subsarkolemmalen Muskelfaserkerne auf über 4 bis 8 pro Faserquerschnitt als auch eine Verlagerung der Kerne ins Innere der Muskelfasern umfassen („zentrale Kerne“). Solche zentralen Kerne treten bei Myopathien, aber auch bei chronischen Denervationsprozessen auf (SCHRÖDER, 1982).

### **2.3.7 Entzündliche Infiltrate**

Im Mittelpunkt des myositischen Gewebssyndroms stehen die entzündlichen Infiltrate. Man unterscheidet perivaskuläre, perimysiale und endomysiale Infiltrate und die granulomatöse Myositis. Die Infiltrate setzen sich meist aus Lymphozyten, Plasmazellen, Histiozyten und Mastzellen, seltener auch aus Granulozyten zusammen (SCHRÖDER, 1982). Sie sind jedoch unspezifisch und kommen gleichermaßen bei unterschiedlichen Muskelerkrankungen vor.

### **2.3.8 Zunahme des interstitiellen Bindegewebes**

JÄRVINEN et al. (2002) beschreiben eine Zunahme des endo- und perimysialen Bindegewebes nach einer dreiwöchigen Immobilisation, wobei die Ablagerung direkt am Sarkolemm der Muskelzellen erfolgt. Diese Zunahme betrifft vor allem die senkrecht orientierten Kollagenfasern, welche zwischen den angrenzenden Muskelfasern im Endomysium verlaufen. Desweiteren stört die Immobilisation die Struktur des Endomysiums, so dass die verschiedenen im Endomysium vorkommenden Kollagenfasernetzwerke nicht voneinander zu unterscheiden sind. Im Perimysium sind die Immobilisation-induzierten Veränderungen ähnlich, das Bindegewebe ist sehr dicht, die Anzahl von irregulär verlaufenden Kollagenfasern ist erhöht. Das Epimysium ist von diesen Alterationen nicht betroffen. Diese qualitativen und quantitativen Veränderungen des intramuskulären Binde-

gewebes tragen wahrscheinlich zu den verschlechterten biomechanischen Eigenschaften und zur eingeschränkten Funktion des immobilisierten Skelettmuskels bei.

Durch die Zunahme des endo- und perimysialen Bindegewebes kommt es zu einer Separation der einzelnen Muskelfasern. Begleitend treten eine Abnahme des Muskelfaserquerschnitts und eine reduzierte Dichte des Kapillarnetzes innerhalb des Muskelgewebes auf (BOOTH, 1978).

## **2.4 Sepsis**

### **2.4.1 Inzidenz der Sepsis**

Sepsis ist trotz moderner Intensivmedizin ein häufig beobachtetes Krankheitsbild.

Nach einer jüngeren Analyse an insgesamt 6,5 Millionen Patienten erkrankten in den USA jährlich 751.000 Menschen an einer Sepsis, wovon 215.000 versterben. Dies stellt 9,3% aller Todesfälle in den USA dar, und liegt über der Anzahl der Todesfälle bei akutem Herzinfarkt (ANGUS et al., 2001).

Da epidemiologische Daten zur Inzidenz der Sepsis für Deutschland fehlen, müssen sich entsprechende Aussagen auf Untersuchungen aus Westeuropa und den USA stützen. Prospektive Studien ergeben in den Niederlanden und in den USA eine Krankenhausinzidenz der nach klinischen Kriterien diagnostizierten Sepsis von ca. 1 bis 2 %. Auf Intensivstationen liegt die Inzidenz etwa 10-fach höher, wobei die Angaben zwischen 9 und 22 % schwanken. Im gesamten Krankenhausbereich liegt die Sepsisletalität bei etwa 30 bis 40 %, im Intensivbereich bei 50 bis 60 % (KIEFT et al., 1993; SANDS et al., 1997).

### **2.4.2 Definition der Sepsis**

Schon seit alters her waren Wundinfektionen aufgrund mangelnder Hygienemaßnahmen eine häufige und gefürchtete Komplikation der Chirurgie. Obwohl der Terminus „Sepsis“ ein Begriff der modernen Intensivmedizin ist, hat schon Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) das Wort „Sepsis“ mit der Bedeutung „faul machen“ eingeführt. Der in der Antike eingeführte und unverändert bis in das 19. Jahrhundert so verwendete Sepsisbegriff, wurde erst durch die Arbeiten des Gynäkologen Ignaz Semmelweis (1818-1865), der durch die Einführung der Händedesinfektion mit Chlorkalklösung eine drastische Senkung der Kindsbettfiebersterblichkeit erreichte, einer modernen Sicht unterworfen (KREYMANN und WOLF, 1996).

Unter dem Einfluss der Erkenntnisse Louis Pasteurs (1822-1895), Joseph Listers (1827-1912) und Robert Kochs (1843-1910) legte Hugo Schottmüller (1867-1936) 1914 den Grundstein

für den modernen Sepsisbegriff: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf eindringen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ (SCHOTTMÜLLER, 1914).

Mit der Entdeckung Ashboughs im Jahre 1967, dass das sehr häufig mit einer Sepsis einhergehende Adult Respiratory Distress Syndrom (ARDS) durch eine Entzündungsreaktion und somit durch körpereigene Substanzen ausgelöst wird, erkannte man die wichtige Rolle der körpereigenen Immunabwehr in der Pathophysiologie der Sepsis (KREYMANN und WOLF, 1996). Dies wurde 1989 von der Arbeitsgruppe des amerikanischen Intensivmediziners BONE (1941-1997), in der noch heute gültigen Sepsisdefinition dargelegt: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/ oder ihren Toxinen in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ (BONE et al., 1989).

Diese Definition wurde 1992 von einer Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicans* und der *Society of Critical Care Medicine* weitergeführt (ACCP/SCCM, 1992), wobei einige Begriffe neu eingeführt bzw. neu definiert wurden:

- *Infektion*: Entzündliche Antwort des sterilen Gewebes auf das Eindringen oder die Präsenz von Mikroorganismen
- *Bakteriämie*: Anwesenheit vermehrungsfähiger Bakterien im Blut, gleiches gilt für Viren (Virämie), Pilze (Fungämie) und Parasiten (Parasitämie)
- *Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)*: Generalisierte hyperinflammatorische Reaktion auf eine Vielzahl unterschiedlicher Noxen (Verbrennungen, Polytraumata, Massenblutungen, ausgedehnte Weichteilverletzungen, Ischämie und Reperfusionvorgänge, Pankreatitis).
- *Sepsis*: Systemische Antwort des Organismus auf eine Infektion
- *Schwere Sepsis*: Sepsis mit Organdysfunktion
- *Septischer Schock*: Sepsis mit Hypotension trotz adäquater Volumengabe bei gleichzeitig bestehenden Perfusionsstörungen, mit Lactatacidose, Oligurie oder einer akuten Veränderung des mentalen Status des Patienten. Hierzu gehören auch Patienten, die unter einer Behandlung mit positiv inotrop oder vasopressorisch wirkenden Medikamenten keine Hypotension mehr zeigen, aber dennoch weiterhin unter einer verminderten Organperfusion und Organfunktionsstörung leiden.
- *Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS)*: veränderte Organfunktion bei akut kranken Patienten, bei denen die Homöostase nicht ohne Intervention aufrecht zu erhalten ist.



### 2.4.3 Diagnose der Sepsis

Für die Diagnose der Sepsis wurde von der Konsensuskonferenz ein Kriterienkatalog erstellt (ACCP/SCCM, 1992).

Demnach liegt eine Sepsis vor, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

Nachweis eines infektiösen Ursprungs der Inflammation,

Nachweis einer systemischen inflammatorischen Reaktion (SIRS), dazu müssen mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sein:

- Temperatur  $> 38^{\circ}\text{C}$  oder  $< 36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz  $> 90$  Schläge/min.
- Atemfrequenz  $> 20$  Atemzüge/min. oder  $\text{PaCO}_2 < 4,3 \text{ kPa}$  ( $< 31 \text{ mmHg}$ )
- Leukozyten  $> 12.000 \text{ Zellen/mm}^3$  (Leukozytose),  $< 4000 \text{ Zellen/mm}^3$  (Leukopenie) oder  $> 10\%$  unreife Formen (Linksverschiebung im Differentialblutbild)

Eine *schwere* Sepsis liegt vor, wenn zusätzlich zu dem Vorgenannten folgende Erscheinungen auftreten:

- Infektionsbezogene Organdysfunktion als Zeichen der unkontrollierten Inflammation (mindestens eines der folgenden Kriterien):
- akute Enzephalopathie (reduzierte Vigilanz, Unruhe, Desorientiertheit)
- Thrombozytopenie ( $< 100.000 \mu\text{l}^{-1}$  oder Abfall um  $> 30\%$  ohne Blutverlust als Ursache)
- arterielle Hypoxämie (arterieller Sauerstoffpartialdruck  $< 10 \text{ kPa}$  ( $75 \text{ mmHg}$ ) bei Raumluft, ohne manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung als Ursache)
- arterielle Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck (SAP)  $< 90 \text{ mmHg}$  oder mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)  $< 70 \text{ mmHg}$  über mindestens eine Stunde trotz ausreichender Volumenzufuhr in Abwesenheit anderer Schockursachen)
- renale Dysfunktion (Urinausscheidung  $< 50 \text{ ml/h}$  für mindestens zwei Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serumkreatininwertes)
- metabolische Azidose (Basenexzess  $< 5,0$  oder eine Plasma-Laktatkonzentration  $> 1,5$  x über dem Referenzwert)

Ein *septischer Schock* liegt vor, wenn gleichzeitig folgende drei Kriterien erfüllt sind:

- Nachweis eines infektiösen Ursprungs der Inflammation
- Nachweis einer systemischen inflammatorischen Reaktion (SIRS)
- Nachweis einer arteriellen Hypotonie (SAP  $< 90 \text{ mmHg}$  oder MAP  $< 70 \text{ mmHg}$ ) für mindestens zwei Stunden trotz adäquater Volumensubstitution

Für den weiteren Krankheitsverlauf sind die körpereigenen Abwehrmechanismen entscheidend. Prospektive Studien haben gezeigt, dass die Letalität mit 8% im Fall einer SIRS und über 50% beim septischen Schock ausgesprochen hoch ist (PITTET et al., 1995). Die höchste Letalitätsrate besteht mit 72% bei Patienten mit einer abdominellen Sepsis (MCLAUHLAN et al., 1995).

#### **2.4.4 Pathophysiologie der Sepsis**

Die Sepsis ist nach der Konsensuskonferenz als systemische Antwort auf eine Infektion definiert (ACCP/SCCM, 1992). Eine bakterielle Infektion beginnt mit dem Überschreiten der Körperbarrieren (Haut, Schleimhaut) durch die Mikroorganismen. In Abhängigkeit von der Immunkompetenz des Individuums ist eine Ausbreitung des Erregers über die Blutbahn möglich (BAUER, 1996).

Toxische Bakterienprodukte, bei gram-negativen Bakterien Endotoxine, bei gram-positiven Exotoxine, aktivieren systemische Abwehrmechanismen, bestehend aus den humoralen (Komplement-, Kallikrein-Kinin- und Gerinnungs- Fibrinolysesystem) und den zellulären Systemen (neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen). Bei einer angepassten Aktivierung dieser Systeme kommt es zur Eliminierung eingedrungener Mikroorganismen. Bei gestörter Immunitätslage und hoher Pathogenität der Erreger kann es jedoch auch zu einer inadäquaten, exzessiven Ganzkörperentzündungsreaktion (SIRS) kommen. Die Abwehrsysteme mit ihren Mediatoren richten sich dann gegen das Individuum, wobei sie sich in ihrer Wirkung im Sinne einer positiven Feed-back-Reaktion verstärken (NEUGEBAUER et al., 1995). Der deutsche Forscher Paul Ehrlich prägte dafür schon 1905 den Begriff „Horror autotoxicus“. DEITCH (1992) bezeichnet das Sepsis-Syndrom auch als „Mediator Disease“. Auch SCHUSTER (1996) sieht die unkontrollierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine als Hauptmechanismus bei der Entstehung der Sepsis, wobei dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), den Interleukinen (IL1, IL2, IL6, IL8), dem Komplementsystem, den Proteasen, den Lipidmediatoren (Metabolite der Arachidonsäure wie Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene), den Sauerstoffradikalen sowie den vasoaktiven Substanzen wie dem Stickstoffmonoxid besondere Bedeutung zukommen. Diese Mediatoren aktivieren metabolische Kaskaden, die über eine Aktivierung von Muskelproteasen mit Bereitstellung von Aminosäuren für die hepatische Glukoneogenese und die Synthese von Akute-Phase-Proteinen wie das  $\alpha_1$ -saure Glykoprotein ( $\alpha_1$ -AGP), zu einer katabolen Stoffwechselsituation führen (NEUGEBAUER et al., 1995).

Die Ausschüttung der Mediatoren führt außerdem durch eine Endothelschädigung zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und ist deshalb ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Funktionsstörungen in verschiedenen Organen (SCHLAG und REDL, 1990).

Gelingt es nicht, die eskalierende Reaktion der körpereigenen Abwehr unter Kontrolle zu bringen, führt dies zum Schock, Multiorganversagen und Tod des Patienten (NEUGEBAUER et al., 1995).

#### **2.4.5 Therapieansätze**

Betrachtet man die Komplexität der Pathogenese der Sepsis scheint eine Monotherapie gegen einen der Mediatoren ungeeignet. Bisher angewandte Therapieverfahren sind Antibiotikagaben, wenn möglich in Kombination mit einer chirurgischen Revision des Infektionsherdes, sowie symptomatische Maßnahmen wie Aufrechterhaltung des Kreislaufs durch Katecholamine, maschinelle Beatmung, Flüssigkeitssubstitution u.ä. (BONE, 1991).

Eine neue „adjuvante Sepsistherapie“ oder „Immuntherapie der Sepsis“ gründet sich auf der Tatsache, dass gramnegative Bakterien die Hauptursache für Infektion und Tod kritisch erkrankter Patienten darstellen. Mediator der toxischen Manifestationen ist dabei der Lipopolysaccharidanteil der äußeren Bakterienmembran. Der zentrale Teil des LPS-Moleküls, das Coreglykolipid, das für die Toxizität verantwortlich ist, zeigt nur eine geringe Varianz zwischen den Bakterienstämmen, so dass Antikörper gegen das Coreglykolipid gleichzeitig gegen eine große Anzahl von gramnegativen Bakterienstämmen Schutz bieten können (BAUMGARTNER et al., 1985).

BONE et al. (1995) beschreiben, dass E 5, ein muriner, monoklonaler Antikörper gegen Endotoxin, signifikant zu einer Rekonvaleszenz vom Organversagen führt, wogegen HA-1A, ein humaner monoklonaler Anti-Endotoxin-Antikörper keine Reduzierung der Mortalität bei Patienten mit gram-negativer Bakteriämie und septischem Schock bringt.

Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungen von GLAUSER et al. (1991), welche eine signifikante Abnahme der Mortalität bei Patienten mit gram-negativer Infektion nach intravenöser Verabreichung von HA-1A feststellten.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen TNF- $\alpha$  in der Behandlung und Prophylaxe der Sepsis (GLAUSER et al., 1991).

Desweiteren zeigt eine entgiftende Plasma-Filtration, welche verschiedene Zytokine aus dem Plasma entfernt, in einer kleinen vorläufigen Studie erste Erfolge (LEVY et al., 1998).

## 2.4.6 Neuromuskuläre Beteiligung

Im Rahmen einer SIRS treten bei bis zu 70 % der Betroffenen eine Reihe neurologischer Komplikationen auf. Früheste neurologische Funktionsstörung ist die septische Enzephalopathie. Sie kann den internistischen Leitsymptomen der Sepsis vorausgehen und ist daher wichtig für die Früherkennung (BOLTON et al., 1993c).

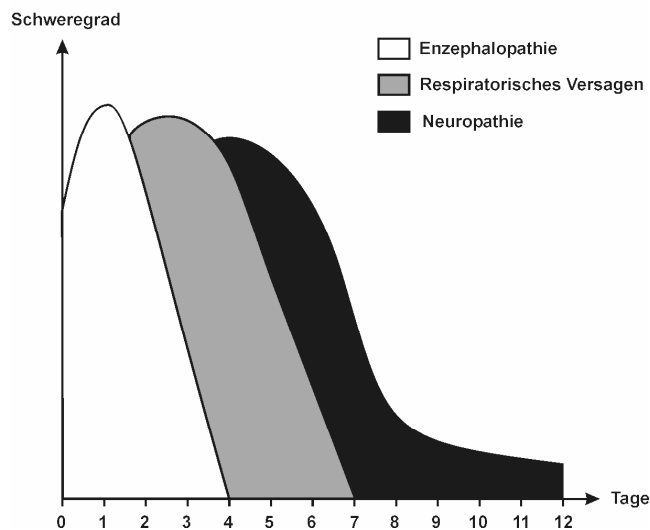


Abbildung 1: Neurologische Komplikationen der Sepsis in der Reihenfolge ihres Auftretens (nach Bolton 1993)

## 2.4.7 Critical Illness Polyneuropathy

Während es durch therapeutische Maßnahmen gelingt, die Sepsis erfolgreich zu behandeln, manifestiert sich bei einer Vielzahl der Patienten eine Beteiligung des peripheren Nervensystems.

1983 berichteten zeitgleich amerikanische, kanadische und holländische Wissenschaftler über das Auftreten einer Polyneuropathie bei Intensivpatienten. Systematisch wurde das als Intensivpolyneuropathie (Critical Illness Polyneuropathy, CIP) bezeichnete Krankheitsbild von BOLTON (1993b, 2001) untersucht.

Die CIP ist charakterisiert durch eine primäre axonale Degeneration der peripheren motorischen und sensorischen Nervenfasern. Sie ist gekennzeichnet durch eine reduzierte Anzahl an Nervenfasern bei erhaltener Myelinscheide (BOLTON et al., 1984). Die Patienten zeigen symmetrische, distal betonte, schlaffe Paresen der Extremitätenmuskulatur, bis hin zur

Tetraplegie. Ebenso betroffen sind das Zwerchfell, die Interkostalmuskulatur und in seltenen Fällen auch das Facialisgebiet bzw. die Okulomotorik (LINDNER und ZIERZ 2000). Die Muskulatur ist meist stark atrophiert (Denervierungsatrophie), wobei die Muskeleigenreflexe, wenn auch abgeschwächt, häufig erhalten bleiben (HUND, 2003). Sensorische Ausfälle treten in 0 bis 75% der Fälle auf und reichen von leichten, distalen Störungen des Vibrationsempfindens bis zu Hypästhesien und Parästhesien von handschuh- oder strumpfförmiger Ausbreitung (HINDER et al., 1997).

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen der CIP sind unbekannt. Es existieren verschiedene Theorien zur Pathogenese. So vermuten ZOCHODNE et al. (1987) und WITT et al. (1991) dass eine gestörte Mikrozirkulation im Bereich der peripheren Nerven infolge der Sepsis zu einer schnellen Erschöpfung der Energiereserven und zu einer distalen axonalen Degeneration führt. Da die die peripheren Nerven versorgenden Blutgefäße über keine Autoregulation verfügen, sind sie besonders empfindlich für Mikrozirkulationsstörungen (BOLTON, 2005). Die sich verschlechternde periphere Nervenfunktion ist vergesellschaftet mit einem steigenden Glukosespiegel infolge einer Insulinresistenz (GUMP et al., 1974). In Studien wurde gezeigt, dass eine Hyperglykämie die endovaskuläre Resistenz erhöht, was zu einem reduzierten Blutfluss und zu einer endoneuralen Hypoxie führt (DYCK, 1989). Diese Hypoxie beeinträchtigt unter anderem den axonalen Transport von Strukturproteinen (SPENCER und SCHAUMBURG, 1984).

Desweiteren geht die sich verschlechternde Nervenfunktion einher mit einem Abfall des Serum-Albuminspiegels. Die im Rahmen einer Sepsis sezernierten Cytokine haben histaminähnliche Eigenschaften, was zu einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität führt, gefolgt von einem Austritt des Albumins in den extravaskulären Raum (ELLMANN, 1984; FLECK et al., 1985). Durch die erhöhte kapillare Permeabilität können zudem potentiell toxische Substanzen wie Steroide, Muskelrelaxanzien und deren Metabolite in den endoneuralen Spalt gelangen und dort direkt zu einer Zerstörung des Axons führen (BOLTON, 1993a). Durch die gestörte Mikrozirkulation an Muskeln und Nerven können Muskelrelaxanzien länger wirken, was zu einer funktionellen Denervation des Muskels und infolge dessen zu einer Denervationsatrophie führt (WERNING et al., 1980).

Zur Diagnose der CIP sind ausführliche elektrophysiologische Studien wichtig, einschließlich motorischer und sensorischer Nerven-Leit-Studien sowie Nadel-Elektromyographie der distalen und proximalen Gliedmassen (BOLTON, 1987). Diese Studien zeigen nahezu normale Nervenleitgeschwindigkeiten und Latenzen, aber erniedrigte Amplituden der Muskel- und sensorischen Nerven-Aktionspotentiale (WITT et al., 1991). Morphologische

Studien bestätigen die primäre axonale Degeneration. In Nervenbiopsien sowohl proximaler als auch distaler motorischer und sensorischer Nerven ist ein Faserverlust als Zeichen der axonalen Degeneration nachweisbar, wobei die distalen Nervensegmente schwerer betroffen sind als die proximalen. Anzeichen einer Entzündung fehlen im peripheren Nervensystem (BOLTON et al., 1984; ZOCHODNE et al., 1987). In Muskelbiopsien sind vereinzelte atrophische Fasern, wie sie für eine akute Denervierung typisch sind, oder Fasergruppenatrophien, typisch für eine länger bestehende Denervierung, nachweisbar. Bei einigen Patienten treten vereinzelt Muskelfasernekrosen auf, was eine zusätzliche primäre Myopathie vermuten lässt (ZOCHODNE et al., 1987).

Bei der Behandlung der CIP ist die oberste Priorität die Therapie des SIRS. Der initiale Insult muss identifiziert und mithilfe geeigneter Antibiotika oder chirurgischer Maßnahmen behandelt werden (LATRONICO et al., 1996; DE LETTER et al., 2001). Eine unterstützende intensive Insulintherapie, welche die periphere Glukoseaufnahme stimuliert und den entgleisten Lipidstoffwechsel normalisiert, führt zu einer Reduktion der Morbidität und Mortalität und zu einer reduzierten Inzidenz für die CIP (VAN DEN BERGHE et al., 2001). Mit Beginn der Behandlung verbessert sich die CIP innerhalb von Wochen bis Monaten je nach Schwere der Ausprägung (LEIJTEN et al., 1996). Klinische und elektrophysiologische Studien zeigen eine progressive Reinnervation der Muskeln und eine Wiederherstellung der sensorischen Funktion (BOLTON et al., 1986; ZIFKO et al., 1998).

Um festzustellen, in wieweit die beschriebenen Ausfälle reversibel sind, untersuchten FLETCHER et al. (2003) Langzeitüberlebende nach einem Zeitraum von 43 Monaten nach Entlassung von der Intensivstation. Alle Patienten beschrieben eine Schwäche und funktionelle Beeinträchtigung mit verlängerter Rekonvaleszenz. Motorische oder sensorische Defizite waren bei 59% der Patienten bei klinischen Untersuchungen nachweisbar, während 95% elektromyographische Anzeichen für eine chronische partielle Denervierung infolge einer vorhergehenden axonalen Neuropathie zeigten (FLETCHER et al., 2003). Patienten mit einer sehr schweren CIP können quadriplegisch bleiben (WITT et al., 1991).

#### **2.4.8 Akute Intensivmyopathie**

Generalisierte Muskelschwäche, verminderte oder fehlende Muskeleigenreflexe und Atrophien können beim Intensivpatienten auch von einer primären Schädigung der Muskulatur herrühren, wobei diese primären Myopathien häufiger auftreten als bislang angenommen wurde (HUND, 2001). Die akute Intensivmyopathie kann sowohl isoliert als

auch in Kombination mit einer primären axonalen Neuropathie auftreten. Da es oft schwierig ist, beide voneinander zu unterscheiden, wurde der Terminus Critical Illness Polyneuropathie (CIPM) geprägt (OP DE COUL et al., 1991).

Zur Diagnose der Myopathie sind wie bei der CIP auch elektrophysiologische Studien von Bedeutung. Nervenleitstudien zeigen erniedrigte bis fehlende Amplituden der Muskel-Aktionspotentiale und normale Amplituden der sensorischen Nerven-Aktionspotentiale (BOLTON et al., 1986). Desweiteren kann eine elektrische Unerregbarkeit der Muskelmembran anhand einer direkten Nadel-Stimulation des Muskels nachgewiesen werden (RICH et al., 1996). Bei der CIP kommt es zu einer Reaktion auf die direkte Muskelstimulation, nicht aber bei der Stimulation des den Muskel versorgenden Nerven, so dass diese Methode hilfreich ist bei der Unterscheidung zwischen Myopathie und Neuropathie (BIRD und RICH, 2002). Auch die Bestimmung des Serum-Creatinkinase-Spiegels (CK) ist von differentialdiagnostischem Nutzen. Stark erhöhte CK-Werte lassen eine nekrotisierende Myopathie vermuten, während bei anderen Formen der Myopathie die CK-Spiegel weniger drastisch erhöht sind (HANSON et al., 1997). Im Gegensatz dazu sind die CK-Spiegel bei der CIP normal oder nur moderat erhöht (WITT et al., 1991).

Diagnostische Methode der Wahl zur Beurteilung struktureller Abnormitäten ist die Muskelbiopsie, welche allerdings aufgrund ihrer Invasivität nicht immer einfach durchführbar ist (HUND, 2001). Die histopathologischen Veränderungen von Muskelbiopsien umfassen sowohl Atrophien von nur Typ-II-Fasern, seltener von nur Typ-I-Fasern, als auch beider Fasertypen (SHOWALTER und ENGEL, 1997).

Man unterscheidet verschiedene Typen der akuten Intensivmyopathie. HUND (1999) benennt 3 Haupttypen:

1. Critical-Illness-Myopathie (CIM)
2. Thick-Filament-Myopathie
3. Akute nekrotisierende Myopathie,

die unter dem Oberbegriff der akuten quadriplegischen Myopathie zusammengefasst werden. Histopathologische Kennzeichen der CIM sind unregelmäßige Muskelfaserdurchmesser, Faseratrophien, anguläre Fasern, zentralisierte Zellkerne, fettige Degeneration der Muskelfasern, interstitielle Fibrose und einzelne Fasernekrosen. Der Serum-CK-Spiegel ist in den meisten Fällen normal (LATRONICO et al., 1996).

Hinsichtlich der Pathogenese der CIM wird angenommen, dass die Muskelzerstörung durch die gleichen Faktoren hervorgerufen wird, welche auch die Effekte der SIRS verursachen (CHAD und LACOMIS, 1994). Die bei der Sepsis freigesetzten Cytokine beeinflussen den

Muskel-Protein-Metabolismus, einschließlich Modulation der enzymatischen Synthese und des Abbaus, sowie die Hemmung der regulatorischen Aktivität von anabolisch wirkenden Hormonen auf den Protein-Umbau (COONEY et al., 1997). Insbesondere die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 und TNF, aber auch die Glukocortikoide sind wichtige Mediatoren der Sepsis-induzierten Muskelproteolyse (HUND, 2001). Die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweges erhöht den intrazellulären Muskelproteinabbau im Rahmen der Sepsis (HASSELGREN und FISCHER, 1997). DE LETTER et al. (2000) beweisen zudem, dass eine lokale Low-level-Immunaktivierung innerhalb des Muskelgewebes die klinischen und elektrophysiologischen Befunde bedingt. Dabei produziert eine kleine Anzahl aktivierter Leukozyten sowohl pro- als auch antiinflammatorische Cytokine, welche den Skelettmuskel infiltrieren. Die insbesondere perivaskulär lokalisierten Infiltrate beinhalten vor allem Makrophagen und T-Helferzellen (CD4+Lymphozyten), seltener T-Killerzellen (CD8+Lymphozyten) oder B-Lymphozyten. Zusätzlich werden isolierte Makrophagen vereinzelt im Perimysium und nahe nekrotischer Muskelfasern gefunden. Bei den Cytokinen handelt es sich vor allem um IL-1, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . Die lokale Balance der Leukozytenaktivität ist daher von Bedeutung für die Pathophysiologie der Muskelschwäche bei der CIPM.

Die Thick-Filament-Myopathie ist gekennzeichnet durch einen selektiven Verlust von Myosin-Filamenten. Die betroffenen Patienten erhielten oft Cortikosteroide als Monotherapie oder in Kombination mit hoch dosierten Muskelrelaxanzien (HUND, 2001).

Histologisch sind umschriebene Regionen mit fehlender Myosin-ATPase-Reaktion nachweisbar, welche oft im Zentrum der Muskelfaser lokalisiert sind. Elektronenmikroskopisch zeigt sich ein fokaler oder diffuser Verlust der dicken Myosinfilamente (LACOMIS et al., 1996). Desweiteren sind unregelmäßige Faserdurchmesser zu beobachten. Der Serum-CK-Spiegel kann geringgradig erhöht sein (BOLTON, 2005).

Die Pathogenese der Thick-Filament-Myopathie ist noch unbekannt. Experimentell konnte ein selektiver Verlust der dicken Myosinfilamente durch eine chirurgische Denervation von Muskeln in Kombination mit hohen Dosen Kortikosteroiden verursacht werden (MASSA et al., 1992). Die Zunahme der Anzahl der Steroidrezeptoren infolge der chirurgischen Denervation deutet auf eine Hypersensibilität auf Kortikosteroide als einen möglichen Mechanismus hin (DUBOIS und ALMON, 1981). Inaktivität kann zu einer zusätzlichen Vulnerabilität gegenüber zirkulierenden Toxinen führen (FARAGHER et al., 1996). RICH et al. (1998) weisen eine Abnahme der Muskelmembran-Erregbarkeit bei einem Prozentsatz der Patienten mit akuter quadriplegischer Myopathie nach. In einem Tiermodell finden sie



Veränderungen der Natrium- und Chloridleitfähigkeit am steroidbehandelten, denervierten Muskel, welche additiv zur normalen Depolarisation des Membranruhepotentials nach einer Denervierung auftreten (RICH et al., 1998). Insgesamt scheint die Behandlung mit Glukokortikoiden bei bestehender Sepsis die Muskelproteolyse zu stimulieren. Dieser Prozess wird synergistisch verstärkt durch eine Muskelinaktivität bedingt durch eine Denervierung (CIP), eine neuromuskuläre Blockade infolge der Verabreichung von Muskelrelaxanzien und eine Membranunerregbarkeit (RUFF, 1998).

Die akute nekrotisierende Myopathie ist charakterisiert durch eine deutliche Myonekrose mit Vakuolenbildung und Phagozytose der Muskelfasern. Die Serum-CK ist deutlich erhöht und es kommt zur Myoglobinurie (BOLTON, 2005). Eine Progression zur Rhabdomyolyse ist möglich (HUND, 2001).

Die Rhabdomyolyse äußert sich durch Schwäche, Myalgie und Schwellung der betroffenen Muskeln. Massive Muskelnekrosen führen zur Freisetzung von Kalium und dem initialen Einschluss von Kalzium. Die resultierende Hyperkaliämie und Hypokalziämie kann eine lebensbedrohliche kardiale Arrhythmie und ein Nierenversagen verursachen. Die elektrophysiologischen Befunde entsprechen einer akuten Myopathie. Die motorischen und sensorischen Nervenleitstudien sind oft normal. Bei der Nadel-Elektromyographie zeigen sich spärlich kurze Fibrillationspotentiale (BOLTON, 2005).

Ähnlich wie bei der Thick-Filament-Myopathie sensibilisieren bestimmte Hauptfaktoren (Sepsis, CIP) den Muskel für myotoxische Triggerfaktoren (Muskelrelaxanzien, Glukokortikoide, Immobilisation) (RAMSAY et al., 1993).

Bei elektrophysiologischen Untersuchungen der Thick-Filament-Myopathie und der akuten nekrotisierenden Myopathie findet sich als Zeichen einer schweren Myopathie (Verlust an Muskelfasern), eine vorzeitige Rekrutierung (frühe Aktivierung) der motorischen Einheiten mit abnorm dichtem Aktivitätsmuster bei normalen oder erniedrigten Amplituden, eine verkürzte mittlere Potentialdauer und polyphasische Potentiale. Diese Messungen erfordern jedoch die aktive Mitarbeit des Patienten (STIBLER et al., 2003). Zudem können im EMG abnorme, spontane Muskelaktivitäten in Form von Fibrillationen abgeleitet werden (BOLTON, 1996).

BOLTON (2005) benennt die kachektische Myopathie oder Inaktivitätsatrophie als eine weitere Unterform der Myopathien. Ursachen sind Hunger und Fehl- bzw. Mangelernährung. Sie ist wahrscheinlich die häufigste Komplikation kritisch Erkrankter. Die elektrophysiologischen Befunde und die Serum CK-Spiegel sind normal. Histopathologische Veränderungen sind nicht immer vorhanden. Eventuell zeigen die Muskelbiopsien eine

Atrophie insbesondere der Typ-II-Fasern. Die Diagnose der kachektischen Myopathie beruht auf dem Ausschluss anderer neuromuskulärer Komplikationen (BOLTON, 2005).

Die folgende Abbildung zeigt noch einmal die verschiedenen Faktoren, die verantwortlich sind für die Entwicklung des Systemic-Inflammatory-Response-Syndroms (SIRS), sowie die neuromuskulären Komplikationen.

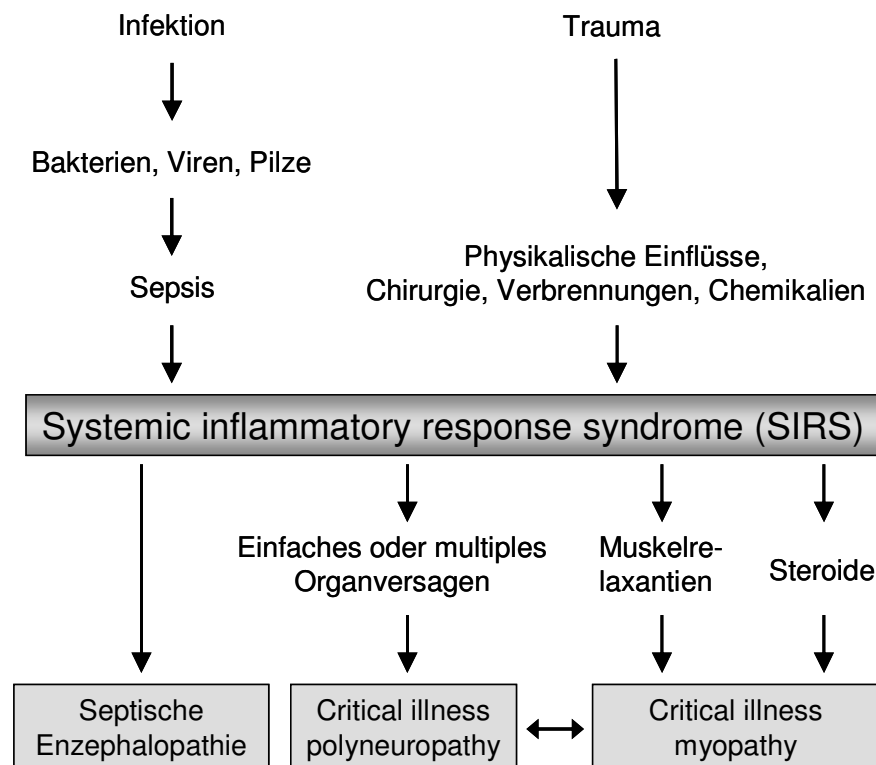


Abbildung 2: Ätiologie des SIRS und neuromuskuläre Komplikationen (nach BOLTON 2005)

Eine spezifische Therapie der Myopathien ist nicht bekannt. Die Diagnose einer sepsis-induzierten neuromuskulären Komplikation sollte bei der Behandlung berücksichtigt werden. Eine flache Lagerung des Patienten ist zu bevorzugen, sie sollte möglichst sorgfältig durchgeführt werden, um weitere Nervenschäden durch Druck zu vermeiden. Muskelrelaxanzien, Kortikosteroide und andere Substanzen mit Wirkung auf die neuromuskuläre Übertragung sollten vermieden oder in der möglichst niedrigsten Dosierung angewendet werden (HUND, 2001).

#### **2.4.9 Corynebacterium parvum (C.p.) Modell zur Entwicklung einer chronischen systemischen Inflammation**

Als Modell für eine systemische Inflammation dient die Injektion von hitzeinaktiviertem Corynebakterium parvum (C.p.).

C.p. induziert eine systemische Inflammation mit granulomatöser Entzündung der Leber (FARQUHAR et al., 1983). Im Rahmen der granulomatösen Hepatitis steigt die Aktivität der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase stark an und es kommt zur vermehrten Bildung von NO und seinen stabilen Reaktionsprodukten Nitrat und Nitrit ( $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ ). Diese wiederum bewirken die Bildung von Methämoglobin (MetHb) aus Hämoglobin durch eine Oxidation des zweiwertigen Eisens der Hämgruppe zu dreiwertigem. MetHb ist nicht in der Lage Sauerstoff zu transportieren. Die Bestimmung von NO und MetHb im Blut der Tiere kann deshalb als laborchemische Verlaufskontrolle der systemischen Entzündung genutzt werden. Der Höhepunkt der Inflammation liegt 72 Stunden nach der Injektion (YI-LING-CHEN et al., 1999).

## **3. Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Zielvorstellungen**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der Faktoren Immobilisation und systemischer Langzeit-Inflammation auf die Muskelmorphologie zu untersuchen. Dabei geht es insbesondere darum, zu unterscheiden, welche histopathologischen Veränderungen am Muskel durch die Einzelfaktoren Immobilisation und chronische Entzündung hervorgerufen werden, und welche durch eine Kombination von beidem verursacht werden. Ferner gilt es zu untersuchen, ob die Kombination beider Faktoren im Zusammenspiel synergistisch oder potenzierend wirkt. Die Untersuchungen sollen an Ratten unmittelbar nach chronischer Inflammation mit *Corynebacterium parvum* mit und ohne Immobilisation durchgeführt werden.

Diese Arbeit ist Teil einer Studie, welche zwei weitere Dissertationen umfasst. Eine Dissertation beinhaltet die Auswirkungen von Immobilisation und systemischer Inflammation auf die Muskelkraft (UNTERBUCHNER, 2006), die zweite die Effekte von Immobilisation und Inflammation auf die Acetylcholinrezeptor-Expression und die Pharmakodynamik von Succinylcholin (HELMING, 2005).

In einer Nachfolgearbeit werden die histopathologischen Verhältnisse in der Rehabilitationsphase nach Immobilisation und chronischer Inflammation untersucht (BUSCH 2007).

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i. d. F. vom 25.05.1998 BGBl I S.1105) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

### **3.2 Material und Methodik**

#### **3.2.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen, Akklimation**

Die Untersuchungen werden an 53 männlichen Sprague Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) durchgeführt. Das Gewicht der Tiere liegt zwischen 275 und 325 g. Eine Akklimatisierungszeit von 14 Tagen erlaubt den Tieren eine Anpassung an die Umgebung, sowie einen mikrobiellen Abgleich der Tiere untereinander. Während dieser Zeit werden die Ratten in Gruppen von maximal fünf Tieren in einem Gruppenkäfig (Makrolon Typ 4) gehalten. Futter (ALTROMIN-Haltung 1324, Altromin GmbH, Lage) und Wasser wird den Tieren ad libitum angeboten.

Als Einstreu in den Käfigen dient entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat (Fa. Altromin, Lage/Lippe).

Die Ratten sind gemäß den Vorgaben zur Versuchstierhaltung bei einer Raumtemperatur von 20 bis 23 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 % und einem Beleuchtungswechsel von je 12 Stunden hell (50 bis 100 Lux im Käfig) und 12 Stunden dunkel untergebracht.

### **3.2.2 Tiermodelle**

#### **3.2.2.1 Corynebakterium parvum (C.p.)-Injektion**

Als Modell für die systemische Inflammation dient eine Injektion von hitzeinaktiviertem Corynebakterium parvum (C.p.). Dazu wird den Ratten in Kurznarkose mit Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden) 56 mg/kg Körpergewicht einer Suspension aus hitzeinaktiviertem C.p. (Roche, Penzberg) mit einem Gesamtvolumen von 0,6 ml in die Vena dorsalis penis injiziert, und mit 0,4 ml isotonischer Kochsalzlösung nachgespült.

Um eine systemische Inflammation über mindestens 12 Tage zu erhalten wird die Injektion 3-mal im Abstand von 4 Tagen wiederholt.

Als Vergleichskontrolle zur Inflammation dient die Injektion von 0,9 %iger Kochsalzlösung (NaCl). Die Ratten dieser Gruppe erhalten 3-mal eine intravenöse Injektion von 1 ml Kochsalzlösung unter identischen Narkosebedingungen ebenfalls in die Vena dorsalis penis.

#### **3.2.2.2 Immobilisation einer Hintergliedmaße**

Als Immobilisationsmodell dient ein etabliertes Rattenmodell in dem eine Hintergliedmaße im Kniegelenk und im Sprunggelenk durch Kirschnerdrähte immobilisiert wird (IBEBUNJO und MARTYN, 1999). Bei der Hälfte der Ratten wird in Kurznarkose ein Kirschnerdraht durch das Fersenbein und das distale Schienbein geschoben, ein zweiter Draht fixiert das proximale Schienbein am Oberschenkelknochen in einem Winkel von jeweils ca. 90°. Somit ist eine Beuge- oder Streckbewegung der beiden Gelenke nicht mehr möglich. Die detaillierte Instrumentierung ist unter Punkt 3.2.6.2 aufgeführt.

Da das operative Trauma bereits einen Effekt haben könnte, bildet man für die C.p.- und für die NaCl-Gruppe jeweils eine „Sham-immobilisierte“ Vergleichsgruppe. Dazu werden diesen Ratten die Kirschnerdrähte in gleicher Weise unter Kurznarkose eingesetzt, aber danach direkt wieder entfernt. Somit ist das operative Trauma der immobilisierten und sham-

immobilisierten Beine gleich. Sie unterscheiden sich lediglich durch die bleibende Immobilisation des Beines der Immobilisationsgruppe. Das immobilisierte wie auch das sham-immobilisierte Bein werden im Folgenden als Op-Bein bezeichnet.

Die jeweils kontralateralen Beine beider Gruppen (Immobilisation und Sham-Immobilisation) erfahren keine chirurgische Intervention. Sie dienen daher zur Beobachtung systemischer Effekte der Immobilisation und Sham-Immobilisation, sie werden im Folgenden als non-Op-Beine bezeichnet.

Die folgende Abbildung soll das eben Beschriebene verdeutlichen:

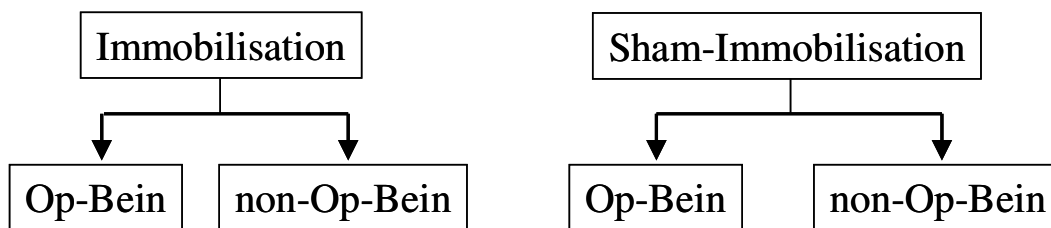


Abb. 3: Gruppenbildung Immobilisation und Sham-Immobilisation mit Op-Bein und non-Op-Bein

### 3.2.3 Versuchsplan

Der Versuch besteht aus

1. Immobilisation bzw. Sham-Immobilisation + erste C.p.- bzw. NaCl-Injektion,
2. Phase der Inflammation mit wiederholter C.p.- bzw. NaCl-Injektion,
3. Versuch mit Muskelkraftmessung unter Narkose mit anschließender Euthanasie und Probennahme
4. histologische Aufbereitung und Beurteilung des Muskelgewebes.

Die Immobilisation bzw. Sham-Immobilisation wird am Tag 0 durchgeführt. In der gleichen Narkose erfolgt die erste C.p.- bzw. NaCl-Injektion. Weitere C.p.- bzw. NaCl-Injektionen folgen an den Tagen 4 und 8. Vor jeder Injektion wird den Ratten über eine in die V. dorsalis penis gelegte Venenverweilkanüle venöses Blut in eine Glaskapillare (Volumen 175 µl) abgenommen. Aus diesem Blut bestimmt man den MetHb-Anteil oxymetrisch, um die effektive systemische Inflammation zu kontrollieren. Am Tag 12 wird der eigentliche Versuch mit Muskelkraftmessung, anschließender Euthanasie und Entnahme der Muskeln durchgeführt.

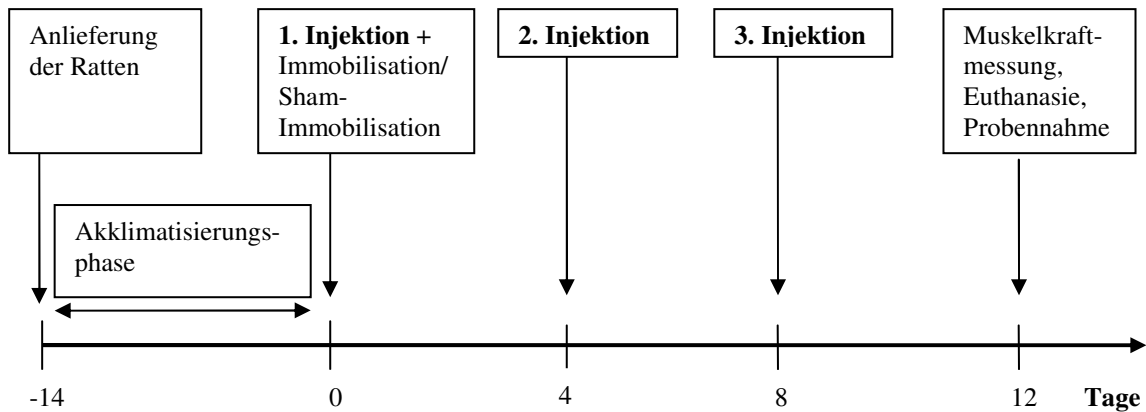


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf von Immobilisation, Infektion, Muskelkraftmessung und Muskelgewebsuntersuchung

Folgende in vivo Parameter werden am Tag 12 (letzter Beobachtungstag) erhoben:

- Messung der Muskelkraft der Mm. tibiales craniales (Thema der Dissertation von UNTERBUCHNER, 2006)
- Bestimmung der Vitalparameter, der Elektrolyte, der Blutgase, der Hämodynamik (mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz) des Blutzuckers
- Bestimmung der Blutbildparameter

In vitro werden folgende Parameter bestimmt:

- TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10
- $\alpha_1$ -saures Glykoprotein
- Expression der Acetylcholinrezeptoren auf dem M. tibialis cranialis (Thema der Dissertation von HELMING 2005)

Histologisch beurteilt werden:

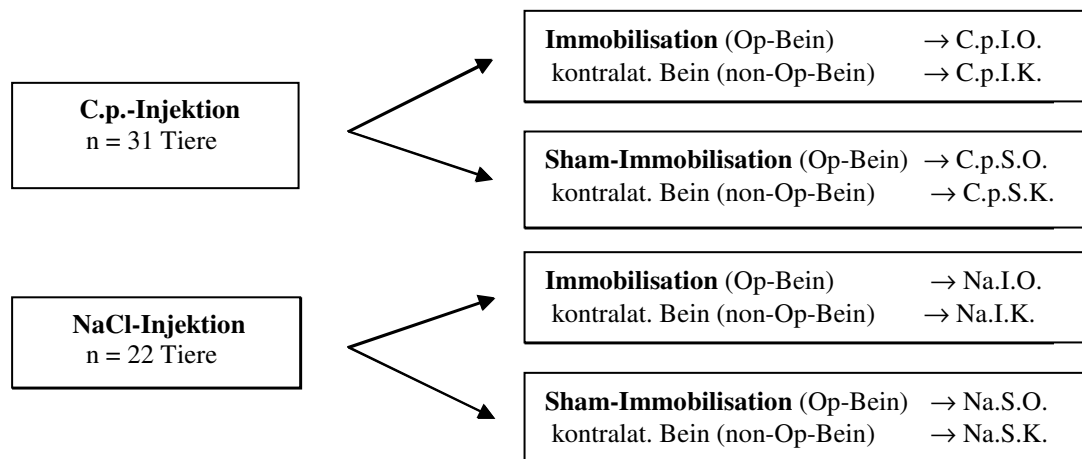
- der M. soleus
- ein Bauch des M. gastrocnemius

### 3.2.4 Versuchsgruppen

In diesem Versuch werden die Modelle der Immobilisation und Inflammation kombiniert. Die Tiere werden randomisiert vier Versuchsgruppen zugeteilt.

- Gruppe 1: Immobilisation + C.p.-Injektion (n=10)
- Gruppe 2: Immobilisation + NaCl-Injektion (n=10)
- Gruppe 3: Sham-Immobilisation + C.p.-Injektion (n=10)
- Gruppe 4: Sham-Immobilisation + NaCl-Injektion (n=10)

Die Verwendung von zwei Modellen und dem kontralateralen Bein (non-OP-Bein) als Kontrolle führt schließlich zur Bildung von 8 Gruppen, die im Folgenden nochmals schematisch aufgezeigt sind:



I.= Immobilisation

O.= Operation

K= Kontrolle

S= Sham-Immobilisation

Abbildung 5: Gruppenbildung

### 3.2.5 Narkose

#### 3.2.5.1 Anästhesie zur Bakterieninjektion und Immobilisation

Die Immobilisation bzw. Sham-Immobilisation und die Bakterien- bzw. NaCl-Injektion werden in der gleichen Narkose durchgeführt.

Die Einleitung der Narkose erfolgt mit 5 Vol% Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden) in einer Plexiglasbox. Nach Erreichen des Toleranzstadiums wird der Kopf der Ratte in eine mit einer Gummimembran abgedichtete Kopfkammer eingebracht. Über diese Kopfkammer erhalten die Tiere 3,5 Vol% Sevofluran, wobei sie die gesamte Zeit spontan



atmen. Wenige Minuten nach Entfernen der Ratten aus der Kopfkammer ist das Narkosegas abgeatmet und die Tiere erwachen von der Narkose.

Für die wiederholten Injektionen von C.p. bzw. NaCl wird die gleiche Narkose verwendet.

### **3.2.5.2 Anästhesie zur Muskelkraftmessung und anschließender Euthanasie**

Auch hier erfolgt die Narkoseeinleitung mit 5 Vol% Isofluran in einer Ganzkörperkammer. Anschließend werden die Tiere mit Hilfe eines modifizierten Kinderlaryngoskops endotracheal intubiert. Als Tubus dient eine zurechtgeschnittene Cavafix Kanüle (14-18 G, Fa. Braun, Melsungen). Die Präparation der Vena jugularis externa und der Arteria carotis communis erfolgt unter volumenkontrollierter Beatmung (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Apparatus Inc. South Natick, USA). Die Anästhesie wird dabei mit 3,5 Vol% Sevofluran in einem Sauerstoff-Luft-Gemisch ( $FiO_2$ : 40%) aufrechterhalten, wobei man anfangs ein Atemzugvolumen von 10 ml/kg Körpergewicht bei einer Atemfrequenz von 65/min wählt. Nach der ersten arteriellen Blutgasanalyse, wird das Atemminutenvolumen so eingestellt, dass der  $PaCO_2$  zwischen 35 und 40 mmHg beträgt.

Nach Kanülierung der rechten Vena jugularis externa stellt man die Narkose auf die intravenöse Gabe von Fentanyl (Fentanyl-Janssen-cilag GmbH, Neuss) (4  $\mu$ g/kg/h) und Propofol (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) (20-40 mg/kg/h) um. Die Gabe erfolgt kontinuierlich über Perfusoren (Harvard Syringe Pump, Apparatus Holliston, USA) und wird der Narkosetiefe, welche anhand von kardiovaskulären Parametern beurteilt wird, angepasst.

### **3.2.5.3 Narkose-Monitoring**

Während der gesamten Narkosedauer findet eine umfassende Überwachung verschiedener Parameter statt. Dies dient sowohl der Kontrolle der Narkosetiefe zum frühzeitigen Erkennen von kritischen Situationen, als auch der Gewährleistung konstanter Versuchsbedingungen.

Messparameter (arterieller Blutdruck, Herzfrequenz, Beatmung, Temperatur, Blutgasanalyse, Hämoglobin, Hämatokrit, Elektrolyte, Blutzucker)

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wird invasiv über einen Katheter in der rechten Arteria carotis communis, der an einen Druckdom (MX 960, Fa. Medex) angeschlossen ist, gemessen. Den Gegendruck zum arteriellen Blutdruck hält ein angeschlossener Beutel mit NaCl 0,9%, welcher auch als Gegenspülung dient. Eine weitere Verbindung besteht vom

Druckdom zur eigentlichen Messapparatur (Cardiicap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland). Vor Versuchsbeginn erfolgt zur Kalibrierung des Gerätes ein Druckausgleich.

Der MAP wird über die Narkosetiefe reguliert.

Die Bestimmung der Herzfrequenz erfolgt kontinuierlich über subcutane EKG-Elektroden.

Die Beatmung wird durch einen Atemgasmonitor (Capnomac Ultima, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) überwacht. Es werden der inspiratorische Sauerstoffanteil ( $\text{FiO}_2$ ), die end-expiratorischen Gaskonzentrationen von  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  sowie die Beatmungsfrequenz und der Beatmungsdruck gemessen.

Die Temperaturmessung erfolgt über eine in den Enddarm eingeführte Temperatursonde (EXACON<sup>®</sup>, ASMUTH Medizintechnik GmbH, Minden), welche an ein Temperaturkontrollgerät (Cardiicap II) angeschlossen ist.

Die Körpertemperatur des Tieres wird mit einer Wärmelampe reguliert, welche über dem Tier angebracht ist. Ziel ist es, die Temperatur konstant bei Werten zwischen  $36,8^\circ$  und  $37,2^\circ$  zu halten.

Zur Bestimmung der arteriellen Blutgase, der Elektrolyte und Blutglukose wird zu definierten Messzeiten Blut über den arteriellen Katheter in eine heparinisierte Kapillare (MULTI CAP, Fa. Bayer,  $175 \mu\text{l}$ ) abgenommen.

Die Blutgasanalyse (BGA) umfasst die Parameter Blut-pH, arterieller Kohlendioxidpartialdruck ( $\text{pCO}_2$ ), arterieller Sauerstoffpartialdruck ( $\text{pO}_2$ ), Basenabweichung (BE), und das Standardbicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ). Sie wird wie die Messung des Gesamthämoglobins, des Hämatokrits, des Methämoglobins und der Elektrolyte ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) an einem BGA-Messgerät durchgeführt (Rapidlab 860, Bayer Vital GmbH, Fernwald).

Die Blutzuckerbestimmung erfolgt mit einem Schnelltestgerät (ACCU-CHEK<sup>®</sup>, Sensor, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Um stabile hämodynamische und physiologische Verhältnisse während des gesamten Versuchs zu gewährleisten, werden folgende Parametergrenzen festgelegt:

- mittlerer arterieller Druck (MAP): 75 - 150 mmHg
- pH: 7,35 - 7,45
- Basenexzess: -2 bis +2

- $p\text{CO}_2$ : 35 - 45 mmHg
- Blutzucker: > 70 mg/dl

Bei Bedarf werden der Basenexzess und der pH-Wert durch Veränderung des Atemminutenvolumens oder durch venöse Applikation von 8,4%-igem Natriumbicarbonat (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) korrigiert.

### 3.2.6 Instrumentierung

#### 3.2.6.1 Bakterieninjektion

Das Tier wird in Rückenlage mit dem Kopf in der Kopfkammer fixiert. Nach Aufsuchen der Vena dorsalis penis wird diese mit einer Venenverweilkanüle (BD VASCULON PLUS, 26 GA) punktiert und 175  $\mu\text{l}$  Blut zur Bestimmung des MetHb-Spiegels in eine Glaskapillare abgenommen. Dann erfolgt die Injektion von 0,6 ml (56 mg/kg) C.p.-Suspension. Anschließend wird die Venenverweilkanüle mit 0,4 ml NaCl gespült und entfernt. Die Kontrollgruppe erhält 1 ml isotonische Kochsalzlösung.

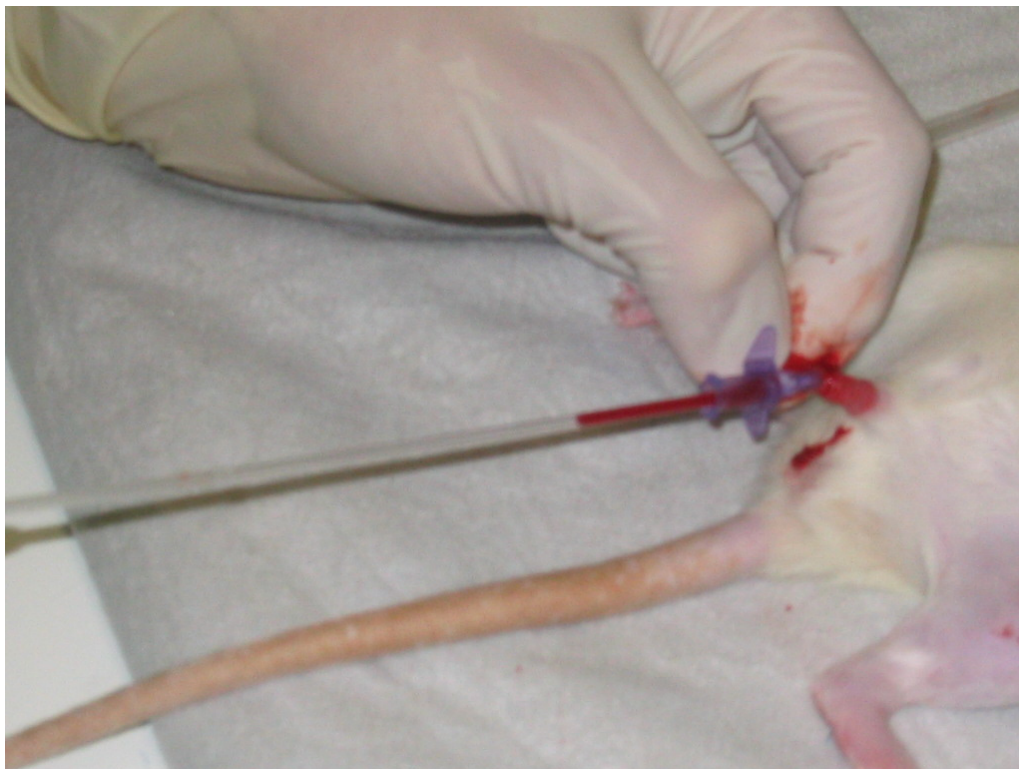


Abb. 6: Aspiration venösen Blutes zur Bestimmung des MetHb aus der Vena dorsalis penis

### 3.2.6.2 Immobilisation

Die Lagerung des Tieres erfolgt in Rückenlage mit dem Kopf in der Kopfkammer. Die zu immobilisierende Hintergliedmaße wird geschoren und desinfiziert (Sterilium pure, Bode Chemie Hamburg). Nachdem das gesamte Tier mit einer sterilen Klebefolie (Secu-Drape<sup>®</sup>, Sengewald Klinikprodukte GmbH) abgedeckt ist, wird ein kleiner Hautschnitt im plantaren Bereich des Calcaneus angelegt und ein Kirschnerdraht mit einem Durchmesser von 1 mm (Bühler Instrumente Medizintechnik GmbH, Tuttlingen) durch den Calcaneus und weiter in den distalen Anteil der Tibia geschoben, wobei die Fixierung des Sprunggelenks in einem Winkel von ca. 90° erfolgt. Die überstehenden Enden des Kirschnerdrahtes werden möglichst nah am Knochen abgetrennt und die Hautinzisionen mit einem Einzelheft nicht resorbierbaren Nahtmaterials (ETHICON<sup>™</sup>, 4-0, Johnson&Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgium) verschlossen.

Die Immobilisierung des Kniegelenkes erfolgt, indem nach einem kleinen Hautschnitt ein Kirschnerdraht mit einem Durchmesser von 1 mm durch die Tuberositas tibiae weiter durch den distalen Femur geschoben wird. Auch hier werden die Enden des Drahtes abgetrennt und die Hautinzisionen mit einem Einzelheft verschlossen. Das Kniegelenk ist somit in einem Winkel von ca. 90° fixiert.



Abb. 7: Versuchstier in der Kopfkammer, die rechte Hintergliedmaße ist für die Immobilisation geschoren

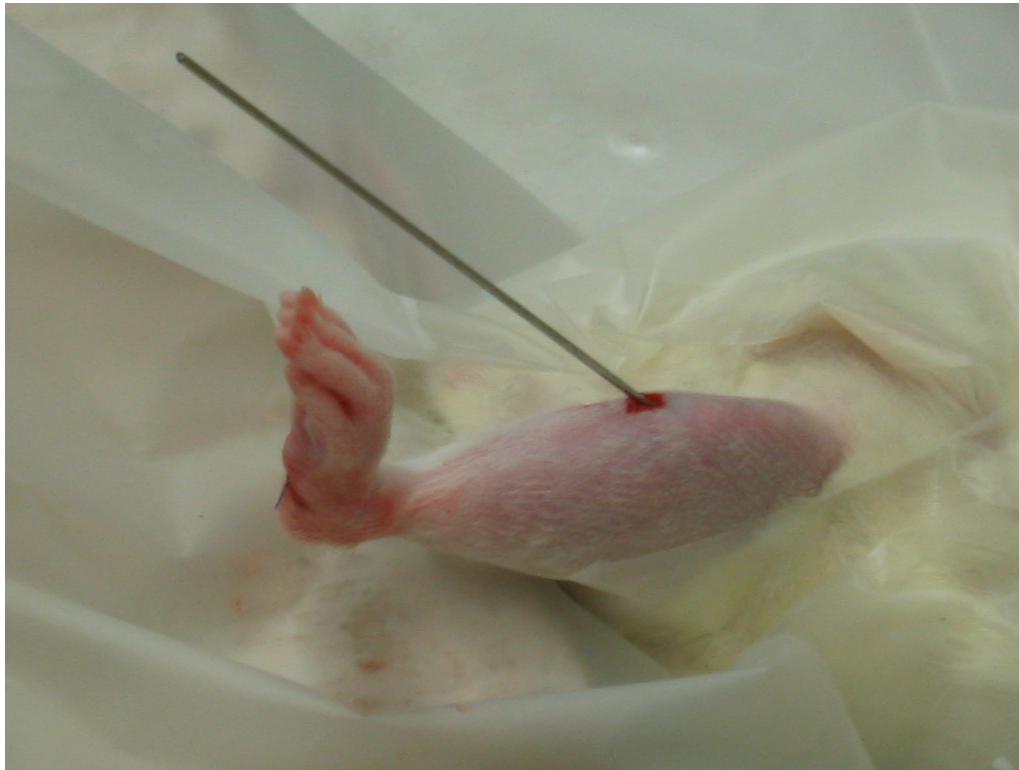


Abb. 8: Immobilisation des Kniegelenkes mit Kirschner-Draht, das Fußgelenk ist bereits immobilisiert

Da das Hüftgelenk nicht fixiert wird, sind die Tiere in der Lage sich frei zu bewegen. Die Operation der Gruppe der sham-immobilisierten Tiere erfolgt in gleicher Weise, wobei die Kirschnerdrähte gleich wieder entfernt werden. Einziger Unterschied zwischen Immobilisierten und sham-immobilisierten Tieren ist somit die eingebrachte Fixierung. Operationstrauma und Narkose sind gleich.

### **3.2.6.3 Gefäßpräparation**

Die Präparation der V. jugularis externa und der A. carotis communis erfolgt in Rückenlage. Die Haut über der Präparationsstelle am rechten Hals wird geschoren und mit Desinfektionsmittel eingesprüht.

Nach Eröffnung der Haut an der rechten Halsseite im paramedianen caudoventralen Bereich und stumpfer Präparation des subcutanen Fettgewebes erfolgt die Freilegung der V. jugularis, welche im Sulcus jugularis zwischen dem M. brachiocephalicus und dem M. sternooccipitalis verläuft. In die V. jugularis werden zwei PE-Katheter (Intramedic Non Radioopaque Polyethylene Tubing, Clay Adams, Division of Beckton & Dickinson, New Jersey) eingeführt

und fixiert. Diese Katheter benötigt man, um Fentanyl, Propofol und gegebenenfalls Natriumhydrogencarbonat oder Glukose 50% (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) zu infundieren.

Die A. carotis communis verläuft in der Tiefe ventrolateral der Trachea, begleitet vom Truncus vagosympathicus. Dieser wird schonend stumpf von der Arterie abpräpariert. In die Arterie wird ein Katheter eingeführt und fixiert. Dieser dient der Blutentnahme zur arteriellen Blutgasanalyse, der arteriellen Blutdruckmessung und der Euthanasie durch Blutentzug am Versuchsende.

### **3.2.7 Muskelentnahme**

Am Tag 12 findet die Muskelkraftmessung der Mm. tibiales beider Hintergliedmaßen und die Abnahme der In-vitro-Blutparameter statt. Die genaue Durchführung des Versuches und die Ergebnisse sind Gegenstand einer anderen Doktorarbeit (UNTERBUCHNER, 2006).

Nach Abschluss der Messungen erfolgt die Euthanasie des Tieres durch Vertiefung der Narkose und Blutentzug. Das Blut wird in EDTA-Blutbildmonovetten (S-Monovette<sup>®</sup>, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nürnberg) abgenommen, in Eppendorf-Cups (Probenvolumen 1 ml) umgefüllt und bei 4°C mit 4000 Rotationen/ min zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Kendo Laboratory Products GmbH, Hanau). Das gewonnene Serum dient der Bestimmung der Sepsisparameter TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 und  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein und wird bis zur weiteren Untersuchung bei -70°C in Eppendorf-Cups aufbewahrt.

Für weiterführende Untersuchungen werden beide Mm. tibiales craniales, die Mm. gastrocnemii, die Mm. solei, die Mm. flexores digitorum, die Nn. ischiadici sowie die Leber entnommen.

#### **3.2.7.1 Präparation und Konservierung**

Die histologische Untersuchung erfolgt an je einem Bauch der Mm. gastrocnemii beider Hintergliedmaßen und an beiden Mm. solei. Nach Bestimmung des Gewichtes der einzelnen Muskeln, wird jeder Muskel quer in drei Teile geschnitten. Diese werden mit ihrem Querschnitt auf je eine Korkscheibe aufgebracht und mit einem Einfriermedium (Tissue Freezing Medium<sup>®</sup>, Leica Instruments GmbH, Nussloch) umgeben. Das Einfrieren erfolgt in Isopentan (2-Methylbutane, 99,5%, Sigma-Aldrich, Steinheim), welches sich in einem Gefäß in flüssigem Stickstoff befindet. Nachdem das Muskelstück durchgefroren ist, wird es bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C gelagert.

### **3.2.7.2 Histologische Aufarbeitung**

Das Schneiden der Muskeln erfolgt an einem Kryotom (HM 500 O, Microm International GmbH, Walldorf), bei einer Kammertemperatur von -24°C.

Die Korkscheiben mit den aufgefrorenen Muskelstücken werden auf den Objektisch des Kryotoms aufgefroren und von jedem Muskelteil 9 Schnitte für die H&E-Färbung und 6 Schnitte für die PAS-Färbung auf Objektträger aufgebracht. Die Schnittdicke beträgt 10 µm.

Die Objektträger werden auf Trockeneis transportiert und bei -70°C gelagert.

### **3.2.8 Färbungen**

#### **3.2.8.1 Hämatoxylin & Eosin-Färbung (H & E-Färbung)**

Die Hämatoxylin & Eosin-Färbung (H & E-Färbung) dient als Übersichtsfärbung und erfolgt nach dem Färbeprotokoll laut ROMEIS (1989).

Die Kernfärbung erfolgt mit Hämalaun nach Mayer, wobei Zellkerne und Zytoplasmabestandteile, die reich an rauhem endoplasmatischem Retikulum sind, blau-violett angefärbt werden. Die Blau-Violett-Färbung beruht dabei auf dem Vorkommen negativ geladener Anteile im Präparat wie Kernsäuren (DNA, RNA), mancher Muzine und extrazellulärer Proteoglykane.

Die Plasma- oder Gegenfärbung wird mit Eosin durchgeführt, welches die anderen Zytoplasmabestandteile rot färbt.

Vor dem Eindecken werden die Objektträger in wechselnde Küvetten RotiHistol<sup>®</sup> getaucht. Das dient zum einen der Fixierung, zum anderen ist RotiHistol<sup>®</sup> das Lösungsmedium für das Eindeckmedium Roti<sup>®</sup>-Histokitt (Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe).

Die Muskelschnitte werden nach der Färbung mit Deckgläsern eingedeckt und bis zur Betrachtung unter dem Lichtmikroskop bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

#### **3.2.8.2 Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung)**

Die PAS-Färbung dient der Unterscheidung der Muskelfasertypen anhand ihres Glykogengehaltes. PAS-positive Substanzen färben sich dabei rosa bis violett. Neben Glykogen werden auch neutrale und einige sulfatierte Mukosubstanzen, Hyalin, Basalmembranen u.a. gefärbt.

Die Typ II-Fasern, welche reich an Glykogen sind, stellen sich bei dieser Färbung dunkelviolett dar, die Typ I-Fasern erscheinen hellviolett.

Auch die PAS-Färbung erfolgt nach ROMEIS (1989).



### **3.2.9 Mikroskopische Untersuchung**

Bei der histologischen Untersuchung wird ein Bauch des M. gastrocnemius und der M. soleus der immobilisierten bzw. sham-immobilisierten Hintergliedmaße (Op-Bein) mit den entsprechenden Muskeln des non-Op-Beines verglichen.

Die gefärbten Muskelschnitte werden geblindet untersucht, d.h. sie werden ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit des jeweiligen Tieres unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

Dabei liegen bei den H&E-gefärbten Schnitten folgende Beurteilungskriterien zugrunde:

1. Muskelfaserkaliber, Vorkommen pathologischer Kalibervariationen, Vorhandensein von atrophischen, hypertrophischen und angulären Fasern
2. Lage der Zellkerne in den Muskelfasern
3. Auftreten und Ausmaß von endomysialen und perivaskulären Entzündungszellinfiltraten

Die Beurteilung der PAS-gefärbten Schnitte erfolgt nach folgenden Parametern:

1. Verhältnis der Typ I-Fasern zu den Typ II-Fasern
2. Vorkommen von Muskelfasergruppierungen

#### **3.2.9.1 Auswertung**

Die H&E-gefärbten Schnitte werden schematisch ausgewertet.

- 1. Schritt: 100-fache Vergrößerung:  
Die Muskelschnitte werden zunächst mäanderförmig durchmustert, wobei das Vorkommen und das Ausmaß von endomysialen und perivaskulären Entzündungszellinfiltraten beurteilt werden.
- 2. Schritt: 200-fache Vergrößerung:
  - 1) Beurteilung der Faserkaliber: Das Vorhandensein von Faseratrophien, Faserhypertrophien und angulären Fasern wird mit einem einfachen ja/nein-Grading-System bewertet.
  - 2) Lage der Zellkerne: Das Auftreten von zentralen Kernen wird ebenfalls nach einem einfachen ja/nein-Grading beurteilt.
  - 3) Myophagie: Treten innerhalb der Muskelfasern Entzündungszellen in Form einer Myophagie auf, wird dies mit einem ja bewertet.
  - 4) Nekrosen: Liegen Fasernekrosen in Form einer hyalinen Degeneration mit oder ohne Integritätsverlust des Sarkolemms vor, wird auch das mit einem ja beurteilt.



Auch die Beurteilung der PAS-gefärbten Schnitte erfolgt schematisch:

-100-fache Vergrößerung:

1) Muskelfasertypengruppierung: Das Vorhandensein einer Muskelfasertypengruppierung wird nach einem einfachen ja/nein-Grading beurteilt.

Eine Fasertypengruppierung liegt vor, wenn mindestens 40 Fasern eines Types ohne Vorkommen des anderen zusammenliegen.

2) Verhältnis Typ I- zu Typ II-Fasern: Durch das Auszählen der Anzahl der Fasern des jeweiligen Fasertyps in insgesamt 100 Fasern erhält man das prozentuale Verhältnis der Fasertypen zueinander.

Morphometrie:

- 1. Schritt: Fotografie

Von jedem Muskel wird in der H&E-Färbung von einer repräsentativen Stelle ein Foto mit einer am Lichtmikroskop installierten Digitalkamera gemacht.

- 2. Schritt: Ausmessen der Faserdurchmesser und der Breite des endomysialen Bindegewebes

1) Als Maßstab dient ein geeichtes Objektmikrometer (Fa. Zeiss, Jena), welches unter den gleichen Bedingungen wie die Präparate fotografiert wird. Anschließend wird am Monitor der Abstand zweier Maßstriche des Mikrometers mit einem Lineal gemessen und als Grundlage für das Erstellen einer Umrechnungsformel für den Faserdurchmesser und die Breite des endomysialen Bindegewebes verwendet. Der Abstand zweier Maßstriche, welcher einem Abstand von 10 µm entspricht, beträgt am Monitor 14 mm, dh. 10 µm entsprechen 14 mm auf dem Monitor. Daraus ergibt sich folgender Dreisatz:

$$x \text{ µm} = \frac{y \times 10 \text{ µm}}{14 \text{ mm}}$$

wobei y der für den Faserdurchmesser oder die Breite des endomysialen Bindegewebes gemessene Wert in mm und x der gesuchte Wert in µm ist.

2) Das Foto des Muskels wird auf einem Monitor dargestellt und der Durchmesser von insgesamt 10 Fasern an ihrer jeweils schmalsten Stelle mit einem Lineal gemessen und der Mittelwert gebildet.

3) Die Breite des endomysialen Bindegewebes wird an 10 Stellen mit dem Lineal bestimmt und gemittelt.

4) Die erhaltenen Mittelwerte werden mit der oben angegebenen Formel umgerechnet.

- 3.Schritt: Auszählen der Entzündungszellen

Es wird jeweils die Anzahl der Entzündungszellen pro Gesichtsfeld in der 200-fachen Vergrößerung gezählt.

### **3.2.10 Statistische Bewertung der Ergebnisse**

Die abhängigen Variablen werden mit Zweiwege-ANOVAs mit wiederholten Messungen oder mit faktoriellen ANOVAs geprüft. Als unabhängige Variablen zwischen den Gruppen gehen die Infektion (C.p. vs. NaCl) sowie die Beweglichkeit des operierten Beines (Immobilisation vs. Sham-Immobilisation) ein. Je nachdem welche abhängige Variable geprüft werden soll, sind entweder die Zeit (Tage 0; 1; ... ;12), die Injektionstage während der Infektionsphase (Tage 0; 4, 8;) oder das Bein (Op-Bein vs. non-Op-Bein) Binnengruppenfaktoren. Wenn mindestens eine Wechselwirkung der geprüften Faktoren signifikant ( $p < 0,05$ ) ist, wird posthoc mit gepaarten bzw. ungepaarten t-Tests geprüft. Dargestellt werden die Mittelwerte und die Standardabweichung der einzelnen Variablen. Die statistische Analyse führt man mit SPSS 12.0 für Windows (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) durch.

Bei den Merkmalen pathologische Kalibervariationen, Fasertypengruppierung, Myophagie und anguläre Fasern handelt es sich um dichotome Daten (ja/nein Kriterium). Die Untersuchung ist nicht mit dichotomen Daten geplant. Für solche Daten müssten deutlich höhere Fallzahlen beobachtet werden. Deshalb kann an diesen Merkmalen keine statistische Auswertung erfolgen. Die Ergebnisse beschränken sich daher auf eine Beschreibung.

## **3.3 Ergebnisse**

### **3.3.1 Inflammationsparameter**

#### **3.3.1.1 Klinische Beobachtungen**

Von den insgesamt 53 Tieren, die in den Versuch eingeschlossen wurden, sind 11 Tiere an den Folgen der systemischen Inflammation verstorben. Zwei weitere wurden aus dem Versuch genommen, da sich die Fixation des Knie- oder Sprunggelenkes gelockert hat, und somit eine Immobilisation der entsprechenden Gliedmaße nicht mehr garantiert ist. Es gingen deshalb pro Gruppe 10 Ratten in die Versuchsauswertung ein.

#### **3.3.1.2 Körpergewicht**

Das Gewicht der Tiere wird beginnend am Tag der Immobilisation bzw. Sham-Immobilisation und der ersten Injektion täglich protokolliert. Tabelle 1 und Abbildung 10 zeigen das durchschnittliche tägliche Körpergewicht in Gramm.

Das mittlere tägliche Körpergewicht der Tiere der NaCl/ Immobilisations-Gruppe und der NaCl/ Sham-Immobilisations-Gruppe beträgt am Tag 0  $303,0 \pm 16,2$  g bzw.  $308,8 \pm 17,0$  g und am Tag 12  $326,4 \pm 22,2$  g bzw.  $339,6 \pm 19,8$  g, was einer positiven Gewichtsbilanz (NaCl/ Immobilisation: +8%, NaCl/ Sham-Immobilisation: +10%) über den Zeitraum von 12 Tagen entspricht. Lediglich von Tag 0 auf Tag 1 verlieren die NaCl-Tiere an Gewicht. Der Gewichtsverlust beträgt  $4,6 \pm 8,3$  g bei der NaCl/ Immobilisationsgruppe und  $8,6 \pm 10,2$  g bei der NaCl/ Sham-Immobilisationsgruppe. Nach den repetitiven Injektionen in Kurznarkose war am darauffolgenden Tag eine Stagnation der Gewichtszunahmen zu beobachten (siehe Tabelle 1).

Die Tiere der C.p./ Immobilisationsgruppe und der C.p./ Sham-Immobilisationsgruppe weisen über den gleichen Zeitraum eine negative Gewichtsbilanz auf. So verliert die C.p./ Immobilisationsgruppe insgesamt  $24,8 \pm 31,7$  g und die C.p./ Sham-Immobilisationsgruppe  $19,5 \pm 9,3$  g, was einem Gewichtsverlust von 8,2 % bzw. 2,7 % entspricht.

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen des durchschnittlichen täglichen Körpergewichts der vier Versuchsgruppen in Gramm

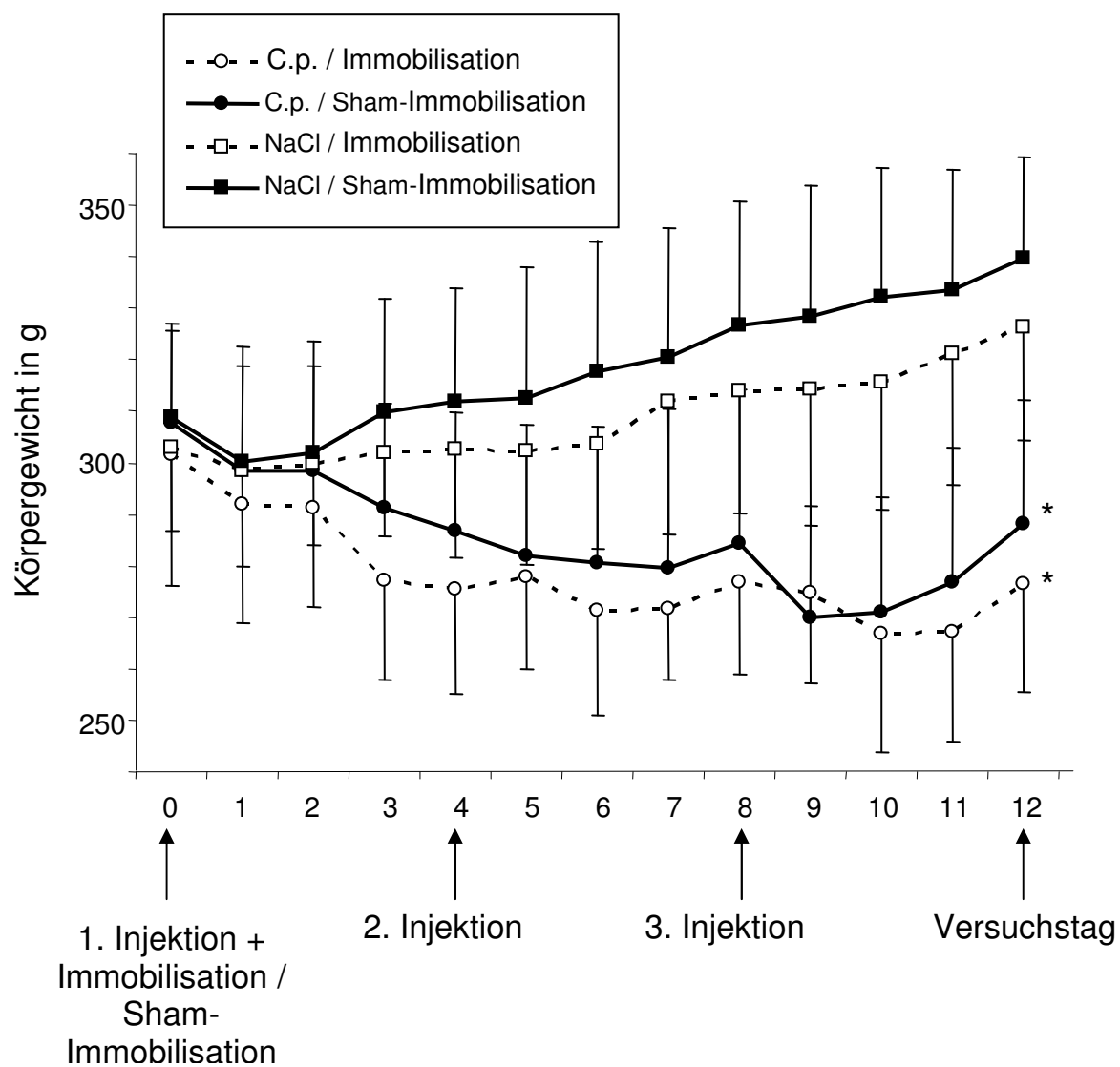
Versuchstag	Gruppe C.p./ Immobilisation	Gruppe C.p./ Sham- Immobilisation	Gruppe NaCl/ Immobilisation	Gruppe NaCl/ Sham- Immobilisation
<b>Tag 0</b>	301,4 ± 25,3	307,8 ± 19,2	303,0 ± 16,2	308,8 ± 17,0
<b>Tag 1</b>	291,8 ± 22,9	298,3 ± 20,4	298,4 ± 18,6	300,2 ± 22,4
<b>Tag 2</b>	291,2 ± 19,1	298,4 ± 20,5	300,0 ± 15,9	302,0 ± 21,6
<b>Tag 3</b>	277,2 ± 19,2*	291,4 ± 20,3	301,8 ± 16,0	309,9 ± 22,0
<b>Tag 4</b>	275,4 ± 20,2*	286,9 ± 23,1**	302,5 ± 20,9	312,0 ± 21,8
<b>Tag 5</b>	278,0 ± 18,0*	282,1 ± 25,4**	302,2 ± 22,0	312,5 ± 25,6
<b>Tag 6</b>	271,3 ± 20,3*	280,6 ± 26,4**	303,6 ± 20,3	317,8 ± 25,4
<b>Tag 7</b>	271,7 ± 13,6*	279,7 ± 30,7**	311,8 ± 25,9	320,3 ± 25,1
<b>Tag 8</b>	276,8 ± 17,8*	284,2 ± 30,2**	314,1 ± 24,0	326,5 ± 24,4
<b>Tag 9</b>	274,7 ± 17,6*	270,0 ± 21,5**	314,2 ± 26,4	328,5 ± 25,2
<b>Tag 10</b>	266,8 ± 23,2*	270,8 ± 22,4**	315,5 ± 24,6	332,0 ± 25,4
<b>Tag 11</b>	267,2 ± 21,4*	276,8 ± 26,1**	321,3 ± 25,7	333,6 ± 23,2
<b>Tag 12</b>	276,6 ± 21,0*	288,3 ± 24,0**	326,4 ± 22,2	339,6 ± 19,8

\*p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations-Subgruppe ab Tag 3

\*\*p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Sham-Immobilisations-Subgruppe ab Tag 4

Bei den Tieren der beiden C.p.-Gruppen tritt der Gewichtsverlust weniger deutlich im Zusammenhang mit den wiederholten C.p.-Injektionen auf, sondern zeigt sich mehr oder weniger gleichmäßig über den gesamten Zeitraum.

Der Gewichtsverlust der C.p.-Tiere verglichen mit den NaCl-Tieren ist innerhalb der Immobilisationsgruppe ab Tag 3 signifikant, in der Sham-Immobilisationsgruppe ab Tag 4 (siehe Tabelle 1).



\*p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations/ Sham-Immobilisations-Untergruppe

Abb. 9: Körpergewicht der Versuchstiere im Verlauf der systemischen Inflammation

### 3.3.1.3 Lebergewicht

Das Lebergewicht der C.p./Immobilisationsgruppe und der C.p./Sham-Immobilisationsgruppe beträgt durchschnittlich  $16,9 \pm 2,1$  g bzw.  $18,4 \pm 2,2$  g, das der NaCl/ Immobilisationsgruppe und der NaCl/ Sham-Immobilisationsgruppe  $10,5 \pm 1,6$  g bzw.  $11,4 \pm 0,7$  g. Das entspricht einer Gewichtszunahme bei den C.p.-Gruppen von 61,0 % bzw. 61,4 % verglichen mit den entsprechenden NaCl-Gruppen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Absolutes Lebergewicht in Gramm und relatives Lebergewicht in % Körpermasse

<b>Gruppen</b>	<b>Absolutes Lebergewicht in g</b>	<b>Relatives Lebergewicht in % Körpermasse</b>
<b>C.p./ Immobilisation</b>	16,9 ± 2,1*	6,1 ± 0,8*
<b>NaCl/ Immobilisation</b>	10,4 ± 1,6	3,2 ± 0,4
<b>C.p./ Sham-Immobilisation</b>	18,4 ± 2,2*	6,4 ± 0,2*
<b>NaCl/ Sham-Immobilisation</b>	11,4 ± 0,7	3,4 ± 0,3

\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations-/ Sham-Immobilisations-Subgruppe

### 3.3.1.4 Hämoglobin-, Methämoglobinwert

An den Tagen der Injektionen und am Tag 12 werden der Hämoglobin-Wert und der Methämoglobinwert der Tiere bestimmt.

Der Hb-Wert der C.p./ Immobilisationsgruppe beträgt am Tag 0 15,2 ± 0,8 g / dl, der der C.p./ Sham-Immobilisationsgruppe 16,3 ± 0,8 g / dl. Am Tag 12 liegen die Werte bei 9,4 ± 0,9 g / dl bzw. 10,0 ± 1,0 g / dl (siehe Tabelle 3 und Abbildung 11). Das entspricht einem Absinken von 38,2 % bei den C.p./ Immobilisationstieren bzw. 38,7 % bei den C.p./ Sham-Immobilisationstieren. Die Hb-Werte der C.p.-Gruppen sind ab Tag 8 signifikant gegenüber den NaCl-Gruppen erniedrigt. Der Hb-Wert der NaCl/ Immobilisationsgruppe unterliegt nur geringen Schwankungen. Der Hb-Wert der immobilisierten Tiere ist gegenüber den sham-immobilisierten Tieren innerhalb der NaCl-Gruppe am Tag 8 signifikant erniedrigt.

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hämoglobinwerte der vier Versuchsgruppen in g/dl

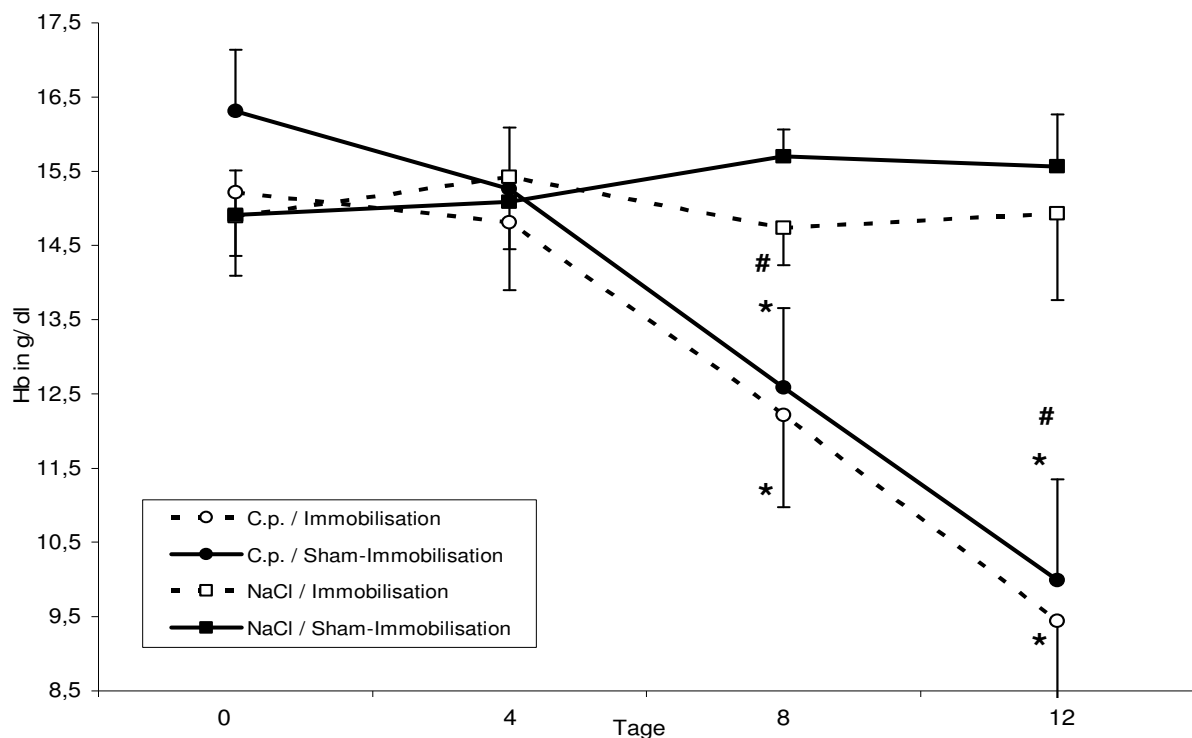
Versuchstag	Gruppe C.p./ Immobilisation	Gruppe C.p./ Sham- Immobilisation	Gruppe NaCl/ Immobilisation	Gruppe NaCl/ Sham- Immobilisation
Tag 0	15,2 ± 0,8 <sup>#</sup>	16,3 ± 0,8 <sup>**</sup>	14,9 ± 0,8	14,9 ± 0,6
Tag 4	14,8 ± 0,9	15,3 ± 0,8	15,4 ± 1,0	15,1 ± 0,4
Tag 8	12,2 ± 1,2 <sup>*</sup>	12,6 ± 1,1 <sup>**</sup>	14,7 ± 0,5 <sup>§</sup>	15,7 ± 0,4
Tag 12	9,4 ± 0,9 <sup>*</sup>	10,0 ± 1,0 <sup>**</sup>	14,9 ± 1,4	15,6 ± 1,2

\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations-Subgruppe

\*\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Sham.-Immobilisations-Subgruppe

<sup>#</sup> p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der C.p.-Gruppe

<sup>§</sup> p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der NaCl-Gruppe



\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations-/ Sham-Immobilisations-Subgruppe

<sup>#</sup> p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der NaCl-Gruppe

Abb. 10: Hb-Entwicklung im Verlauf der systemischen Inflammation

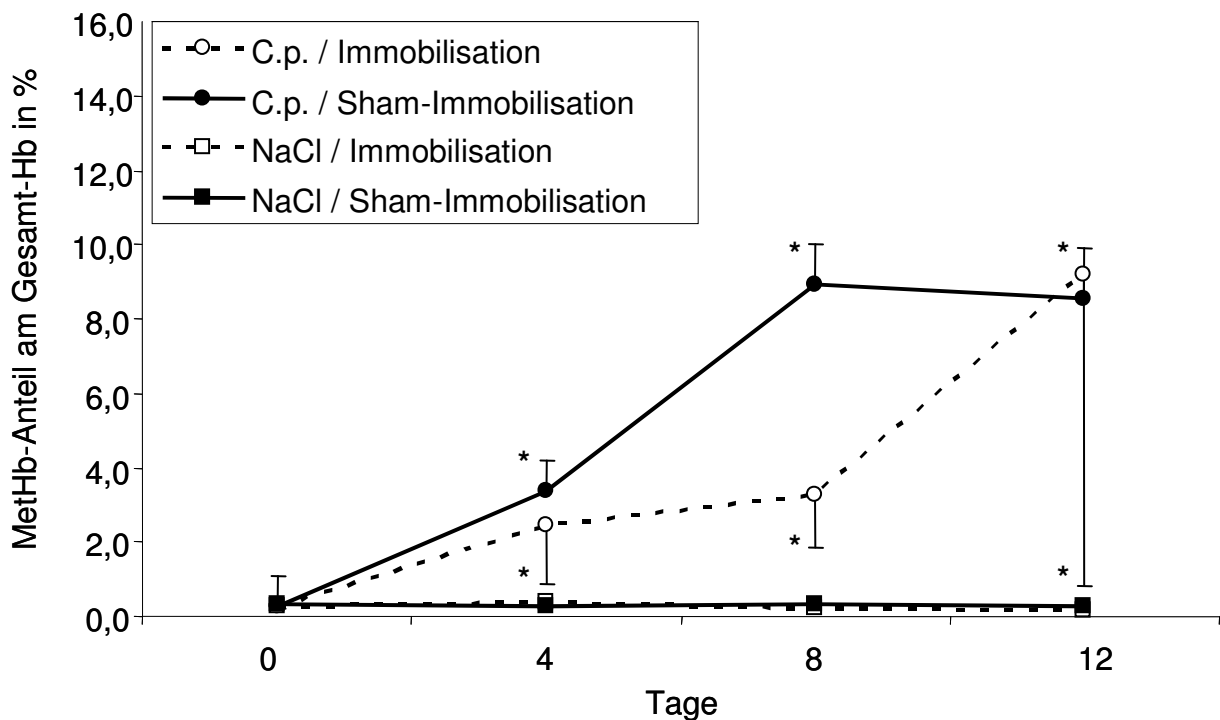


Der Methämoglobin-Wert steigt bei der C.p./ Immobilisationsgruppe von  $0,3 \pm 0,04$  % Gesamt-Hb am Tag 0 auf  $8,4 \pm 8,5$  % am Tag 12, bei der C.p./ Sham-Immobilisationsgruppe von  $0,3 \pm 0,03$  g / dl auf  $7,8 \pm 3,7$  % an (siehe Tabelle 4 und Abb. 12). Das entspricht einem Anstieg auf das 28- bzw. 26-fache. Die C.p./ Immobilisationsgruppe erreicht den Maximalwert am Tag 12, die C.p./ Sham-Immobilisationsgruppe am Tag 8. Die MetHb-Werte der NaCl-Gruppen bleiben deutlich unter denen der C.p.-Gruppen. Ab Tag 4 liegt eine Signifikanz zwischen den MetHb-Werten der C.p.-Tiere und der NaCl-Tiere vor.

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Methämoglobin-Werte der vier Versuchsgruppen in % Anteil am Gesamthämoglobin

<b>Versuchstag</b>	<b>Gruppe C.p./ Immobilisation</b>	<b>Gruppe C.p./ Sham-Immobilisation</b>	<b>Gruppe NaCl/ Immobilisation</b>	<b>Gruppe NaCl/ Sham-Immobilisation</b>
<b>Tag 0</b>	$0,3 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,03$	$0,2 \pm 0,07$	$0,3 \pm 0,15$
<b>Tag 4</b>	$2,4 \pm 1,58^*$	$3,4 \pm 2,08^*$	$0,4 \pm 0,27$	$0,3 \pm 0,04$
<b>Tag 8</b>	$3,3 \pm 1,42^*$	$8,9 \pm 4,44^*$	$0,2 \pm 0,14$	$0,3 \pm 0,08$
<b>Tag 12</b>	$8,4 \pm 8,49^*$	$7,8 \pm 3,67^*$	$0,4 \pm 0,17$	$0,2 \pm 0,09$

\*  $p < 0,05$  C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations- und Sham-Immobilisations-Subgruppen



\*  $p < 0,05$  C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations-/ Sham-Immobilisations-Subgruppe

Abb. 11: MetHb-Verlauf als Entzündungsparameter

### 3.3.1.5 Blutbild und $\alpha_1$ -saures Glykoprotein

Die Blutbildparameter und der  $\alpha_1$ -saure Glykoproteinspiegel im Serum werden am Tag 12 aus dem durch das Entbluten gewonnene Blut bestimmt.

Die Anzahl der Erythrozyten beträgt bei den Tieren der NaCl/ Immobilisationsgruppe  $6,1 \pm 0,9$  Millionen /  $\mu\text{l}$ , bei der NaCl/ Sham-Immobilisationsgruppe  $6,7 \pm 0,8$  Mill. /  $\mu\text{l}$ , bei der C.p./ Immobilisationsgruppe  $4,3 \pm 0,7$  Mill. /  $\mu\text{l}$  und bei der C.p./ Sham-Immobilisationsgruppe  $4,5 \pm 0,9$  Mill. /  $\mu\text{l}$  (siehe Tabelle 5). Die Werte der C.p.-Subgruppen liegen signifikant unter denen der NaCl-Subgruppen. Auch die Thrombozytenzahlen der C.p.-Subgruppen sind signifikant erniedrigt im Vergleich zu den NaCl-Tieren. Die Leukozytenzahlen weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (siehe Tabelle 5). Der Entzündungsparameter  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein ist ebenfalls bei den C.p.-Subgruppen signifikant erhöht verglichen mit den Tieren der NaCl-Subgruppen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5. : Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten und  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein ( $\alpha_1$ -AGP) am Tag 12

<b>Op-Bein</b>	<b>Immobilisation</b>		<b>Sham-Immobilisation</b>	
<b>Gruppen</b>	<b>C.p.</b>	<b>NaCl</b>	<b>C.p.</b>	<b>NaCl</b>
<b>Erythrozyten (Mill. <math>\mu\text{l}^{-1}</math>)</b>	4,34 $\pm$ 0,68*	6,10 $\pm$ 0,91	4,52 $\pm$ 0,89*	6,74 $\pm$ 0,86
<b>Thrombozyten ( 1.000 <math>\mu\text{l}^{-1}</math>)</b>	491 $\pm$ 287*	822 $\pm$ 220	355 $\pm$ 92*	755 $\pm$ 152
<b>Leukozyten ( 1.000 <math>\mu\text{l}^{-1}</math>)</b>	7,76 $\pm$ 2,83	7,48 $\pm$ 3,05	5,83 $\pm$ 1,94	7,29 $\pm$ 3,13
<b><math>\alpha_1</math>-AGP (mg/ ml)</b>	1,69 $\pm$ 0,49*	0,26 $\pm$ 0,25	1,60 $\pm$ 0,49*	0,25 $\pm$ 0,16

\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations- und Sham-Immobilisations-Subgruppe

### 3.3.2 Hämodynamik, Herzfrequenz und Blutglukose

Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der am Versuchstag bestimmten hämodynamischen Parameter (MAP und Herzfrequenz) und der Blutglukose sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 6: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) in mmHg, Herzfrequenz (HF) in Schläge / min. und Blutglukose (BZ) in mg / dl

<b>Gruppe</b>	<b>MAP (mmHg)</b>	<b>Herzfrequenz (Schläge / min)</b>	<b>Blutglukose (mg / dl)</b>
<b>C.p./ Immobilisation</b>	92,8 $\pm$ 9,2*	341,0 $\pm$ 32,8	124,0 $\pm$ 59,1
<b>C.p./ Sham-Immobilisation</b>	94,3 $\pm$ 11,4	360,0 $\pm$ 21,6	99,8 $\pm$ 11,8**
<b>NaCl/ Immobilisation</b>	116,8 $\pm$ 16,4	352,0 $\pm$ 31,2	99,0 $\pm$ 23,6
<b>NaCl/ Sham-Immobilisation</b>	115,6 $\pm$ 31,3	367,0 $\pm$ 48,5	83,6 $\pm$ 12,5

\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations-Subgruppe

\*\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Sham-Immobilisations-Subgruppe

Der mittlere arterielle Blutdruck ist bei den C.p.-Tieren der Immobilisations-Subgruppe signifikant erniedrigt, verglichen mit den entsprechenden NaCl-Tieren.

Die Herzfrequenz weist nur geringe Schwankungen auf und zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Der Blutzuckerwert der NaCl-Tiere der Sham-Immobilisations-Subgruppe ist signifikant niedriger als bei den entsprechenden C.p.-Tieren.

### **3.3.3 Muskelgewichte**

Nach der Euthanasie wird das Muskelgewicht des M.tibialis cranialis, des M.gastrocnemius, des M. flexor digitorum und des M. soleus des Op- und des non-Op-Beines bestimmt.

Die Muskelgewichte und die Muskelgewichtsverluste sind in den folgenden zwei Tabellen dargestellt.

Tabelle 7: Muskelgewichte des Op-Beines und des non-Op-Beines in Gramm

		<b>M. tibialis cranialis</b> [g]		<b>M. soleus</b> [g]		<b>M. gastrocnemius</b> [g]		<b>M. flexor digit.</b> [g]	
<b>Bein</b>		<b>Op-Bein</b>	<b>non-Op-Bein</b>	<b>Op-Bein</b>	<b>non-Op-Bein</b>	<b>Op-Bein</b>	<b>non-Op-Bein</b>	<b>Op-Bein</b>	<b>non-Op-Bein</b>
<b>C.p.</b>	<b>Immobilisation</b>	0,295* ±0,028	0,472 ±0,068	0,103* ±0,015	0,140 ±0,012	0,860* ±0,103	1,259 ±0,164	0,184* ±0,042	0,253 ±0,040
	<b>Sham-Immobilisation</b>	0,402* ±0,059	0,522 ±0,057	0,118 ±0,019	0,132 ±0,016	1,044* ±0,101	1,259 ±0,133	0,201* ±0,051	0,224 ±0,051
<b>NaCl</b>	<b>Immobilisation</b>	0,377* ±0,054	0,653 ±0,048	0,103* ±0,027	0,156 ±0,027	0,979* ±0,204	1,654 ±0,109	0,224* ±0,051	0,314 ±0,021
	<b>Sham-Immobilisation</b>	0,610 ±0,055	0,662 ±0,060	0,171 ±0,031	0,178 ±0,027	1,544* ±0,149	1,763 ±0,193	0,329 ±0,051	0,337 ±0,054

\*p < 0,05 Op-Bein vs. non-Op-Bein innerhalb der jeweiligen Subgruppen

Tabelle 8: Muskelgewichtsverluste des Op-Beines gegenüber dem non-Op-Bein in %.

<b>Muskeln/ Gruppen</b>	<b>C.p./ Immobilisation</b>	<b>C.p./ Sham- Immobilisation</b>	<b>NaCl/ Immobilisation</b>	<b>NaCl/ Sham- Immobilisation</b>
<b>M. tibialis cranialis</b>	-35 ± 11 %	-23 ± 10 %**	-42 ± 7 % <sup>#</sup>	-8 ± 6 %
<b>M. soleus</b>	-27 ± 11 % <sup>#</sup>	-11 ± 8 %	-32 ± 19 % <sup>#</sup>	-3 ± 14 %
<b>M. gastrocnemius</b>	-31 ± 10 % <sup>#</sup>	-17 ± 7 %	-21 ± 10 % <sup>#</sup>	-12 ± 9 %
<b>M. flexor digitorum</b>	-26 ± 15 %	-22 ± 16 %**	-29 ± 13 % <sup>#</sup>	-2 ± 9 %

<sup>#</sup>p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der C.p./ NaCl-Gruppe

\*\*p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Sham-Immobilisations-Subgruppe

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich liegen die Gewichte der Muskeln des Op-Beines ausnahmslos unter denen des non-Op-Beines. Eine signifikante Gewichtsabnahme liegt vor beim M. tibialis cranialis bei den C.p./ Immobilisations- und -Sham-Immobilisations-Gruppen sowie bei der NaCl/ Immobilisationsgruppe. Der M. soleus des Op-Beines ist bei den Immobilisations-Subgruppen der C.p.- und NaCl-Gruppen signifikant leichter als am non-Op-Bein. Das Gewicht des M. gastrocnemius des Op-Beines liegt bei allen Gruppen signifikant unter dem des non-Op-Beines.

Bis auf die NaCl/ Sham-Immobilisations-Gruppe sind auch die Unterschiede zwischen den Gewichten des M. flexor digitorum des Op- und non-Op-Beines signifikant.

Zusammengefasst ist der Gewichtsverlust aller 4 Muskeln am Op-Bein der Tiere der NaCl/ Immobilisationsgruppe signifikant größer verglichen mit der NaCl/ Sham-Immobilisations-Gruppe. Die Gruppe C.p./ Immobilisation weist lediglich beim M. soleus und M. gastrocnemius gegenüber der C.p./ Sham-Immobilisations-Gruppe einen signifikanten Verlust auf.

In der NaCl/ Immobilisationsgruppe weisen die Muskeln des Op-Beines die größte Gewichtsabnahme gegenüber dem non-Op-Bein auf. Der M. gastrocnemius des Op-Beines verlor am meisten Masse bei den Tieren der C.p./ Immobilisationsgruppe (-31 ± 10 %) (siehe Tabelle 8).

### **3.3.4 Histologie**

#### **3.3.4.1 Hämatoxylin & Eosin-Färbung**

##### Pathologische Kalibervariationen, Myophagie, anguläre Fasern

Die folgende Tabelle zeigt die Anzahl der pathologischen Kalibervariationen, Myophagien und angulären Fasern in den jeweiligen Subgruppen (n=10).

Tabelle 9: Anteil von Muskeln am Op- bzw. non-Op-Bein mit pathologischen Kalibervariationen, Myophagie und angulären Fasern innerhalb einer Subgruppe

	<b>Muskel</b>	<b>Bein</b>	<b>C.p./ Immo.</b>	<b>C.p./ Sham-Immo.</b>	<b>NaCl/ Immo.</b>	<b>NaCl/ Sham-Immo.</b>
<b>pathol. Kaliber- variationen</b>	<b>M. gastro- cnemius</b>	<b>Op-Bein</b>	3 von 10	4 von 10	6 von 10	5 von 10
		<b>Non-Op-Bein</b>	5 von 10	3 von 10	4 von 10	4 von 10
	<b>M. soleus</b>	<b>Op-Bein</b>	1 von 10	1 von 10	1 von 10	1 von 10
		<b>Non-Op-Bein</b>	1 von 10	2 von 10	0 von 10	1 von 10
<b>Myophagie</b>	<b>M. gastro- cnemius</b>	<b>Op-Bein</b>	7 von 10	4 von 10	3 von 10	1 von 10
		<b>Non-Op-Bein</b>	6 von 10	1 von 10	1 von 10	1 von 10
	<b>M. soleus</b>	<b>Op-Bein</b>	4 von 10	2 von 10	7 von 10	3 von 10
		<b>Non-Op-Bein</b>	5 von 10	2 von 10	4 von 10	5 von 10
<b>anguläre Fasern</b>	<b>M. gastro- cnemius</b>	<b>Op-Bein</b>	6 von 10	5 von 10	7 von 10	4 von 10
		<b>Non-Op-Bein</b>	8 von 10	5 von 10	6 von 10	6 von 10
	<b>M. soleus</b>	<b>Op-Bein</b>	5 von 10	7 von 10	4 von 10	5 von 10
		<b>non-Op-Bein</b>	10 von 10	6 von 10	8 von 10	5 von 10



Um ein prägnanteres Ergebnis zu erhalten werden die Werte für den M. gastrocnemius und den M. soleus des Op- bzw. non-Op-Beines zusammengefasst und in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 10: Anteil von Muskeln mit pathologischen Kalibervariationen, Myophagie und angulären Fasern von M. gastrocnemius und M. soleus zusammengefasst

	Muskel	Bein	C.p./ Immo.	C.p./ Sham- Immo.	NaCl/ Immo.	NaCl/ Sham- Immo.
<b>pathol. Kaliber- variationen</b>	<b>M. gastro- cnemius + M. soleus</b>	<b>Op-Bein</b>	2 von 10	2,5 von 10	3,5 von 10	3 von 10
		<b>non-Op- Bein</b>	3 von 10	2 von 10	2 von 10	2 von 10
<b>Myophagie</b>	<b>M. gastro- cnemius + M. soleus</b>	<b>Op-Bein</b>	5,5 von 10	3 von 10	5 von 10	2 von 10
		<b>non-Op- Bein</b>	5,5 von 10	1,5 von 10	2,5 von 10	3 von 10
<b>anguläre Fasern</b>	<b>M gastro- cnemius + M. soleus</b>	<b>Op-Bein</b>	5,5 von 10	6 von 10	5,5 von 10	4,5 von 10
		<b>non-Op- Bein</b>	9 von 10	5,5 von 10	7 von 10	5,5 von 10

Pathologische Kalibervariationen treten bei den Tieren der vier Gruppen am Op- und am non-Op-Bein mit nur geringen Unterschieden auf (siehe Tabelle 10).

Mit 6 von 10 Muskeln findet sich die größte Anzahl von Muskeln mit pathologischen Kalibervariationen am M. gastrocnemius des Op-Beines der NaCl/ Immobilisationsgruppe. Exemplarisch für pathologische Kalibervariationen ist ein histologisches Bild in Abbildung 14 dargestellt. Auffällig ist das Auftreten unterschiedlich großer Muskelfasern innerhalb der einzelnen Faszikel.

Der größte Anteil an Muskeln mit Myophagie findet sich in der C.p./ Immobilisationsgruppe, wobei kein Unterschied zwischen dem Op-Bein und dem non-Op-Bein besteht (siehe Tabelle 10).

In Abbildung 15 ist ein histologisches Bild mit Myophagie dargestellt. Man erkennt die Infiltration einzelner Muskelfasern mit Makrophagen.

Anguläre Fasern treten mit 9 von 10 am häufigsten am non-Op-Bein der Tiere der C.p./ Immobilisationsgruppe auf (siehe Tabelle 10). Beim M. soleus des non-Op-Beines der Gruppe

C.p./ Immobilisation können bei allen Tieren anguläre Fasern nachgewiesen werden (siehe Tabelle 9).

In Abbildung 16 sind in einem histologischen Bild anguläre Fasern dargestellt. Diese Fasern liegen abgeflacht, zum Teil mit einem dreieckigen Querschnitt zwischen den übrigen Muskelfasern.

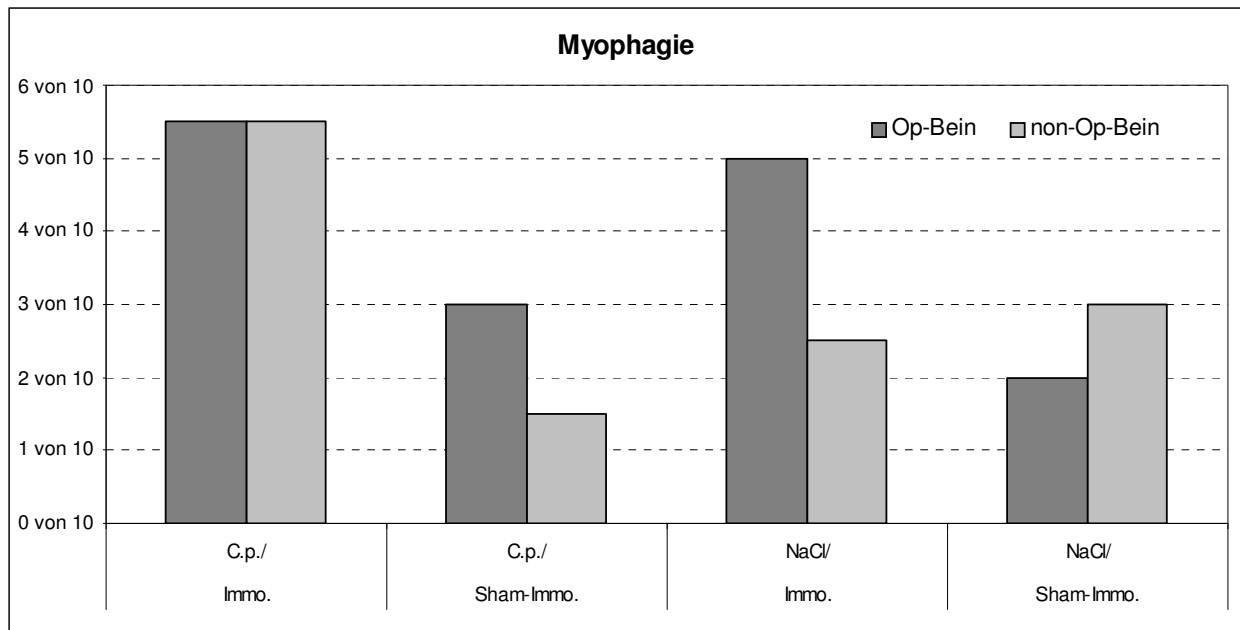


Abb.12: Vergleichende graphische Darstellung des Anteils der Muskeln mit Myophagie innerhalb der Subgruppen (n=10)

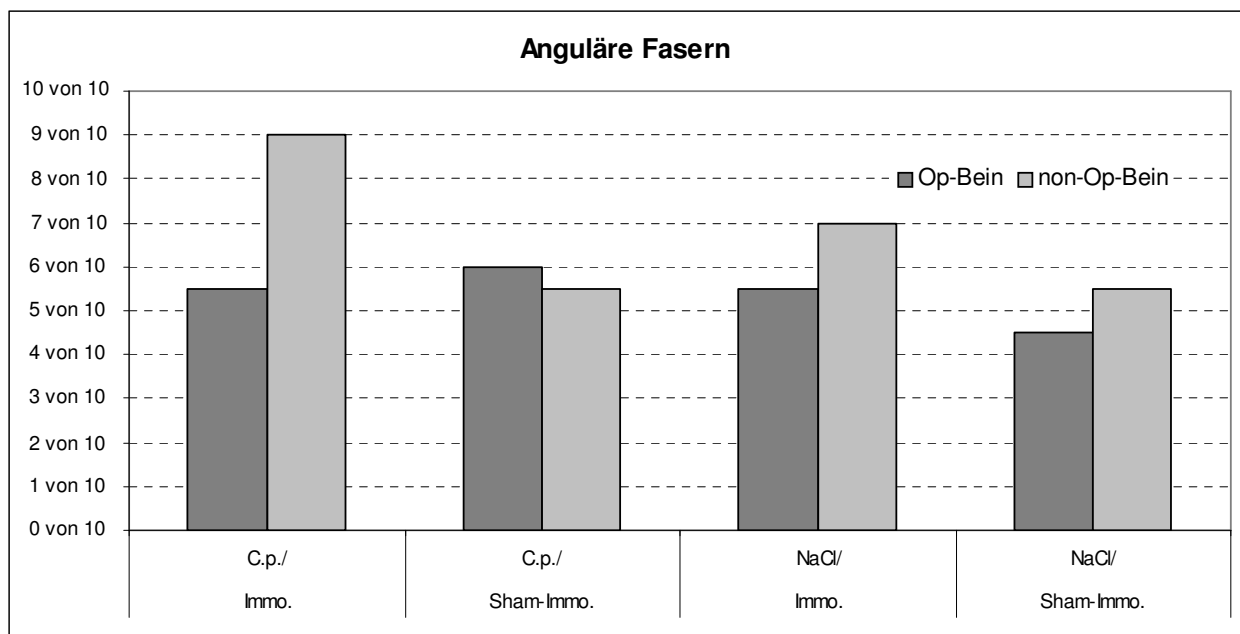


Abb. 13: Vergleichende graphische Darstellung des Anteil der Muskeln mit angulären Fasern innerhalb der Subgruppen (n=10)

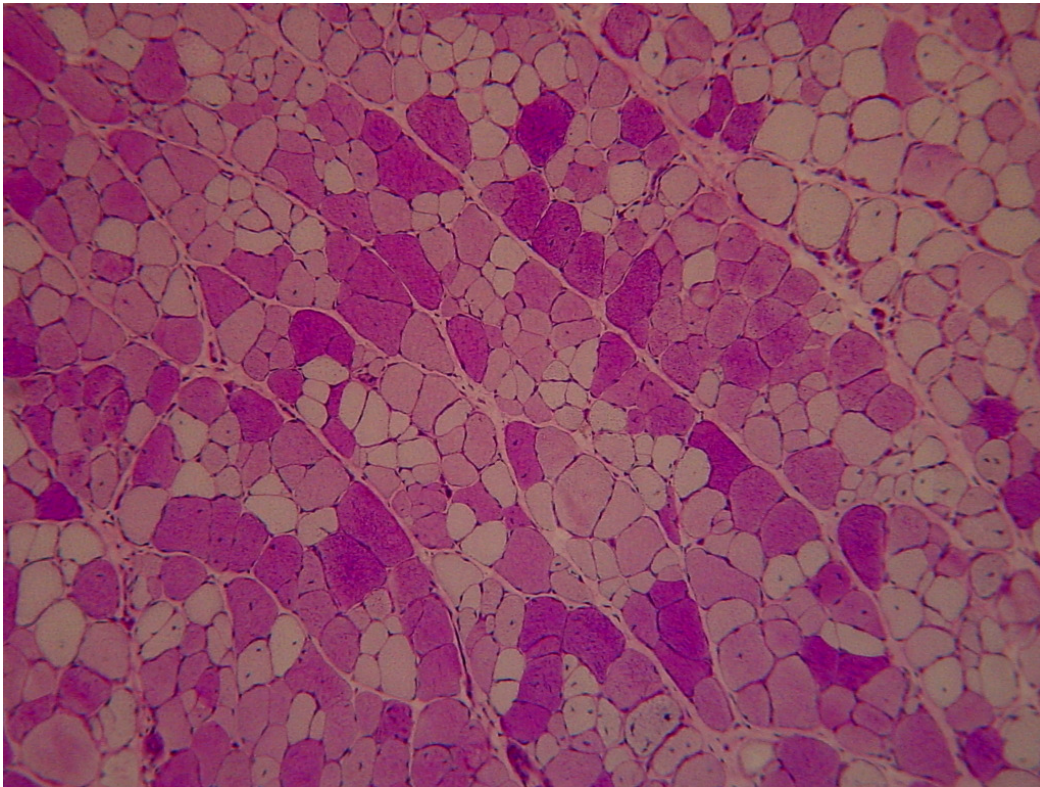


Abb. 14: Pathologische Kalibervariationen; M. gastrocnemius des Op-Beines, Gruppe C.p./ Sham-Immobilisation; PAS-Färbung; 100-fache Vergrößerung

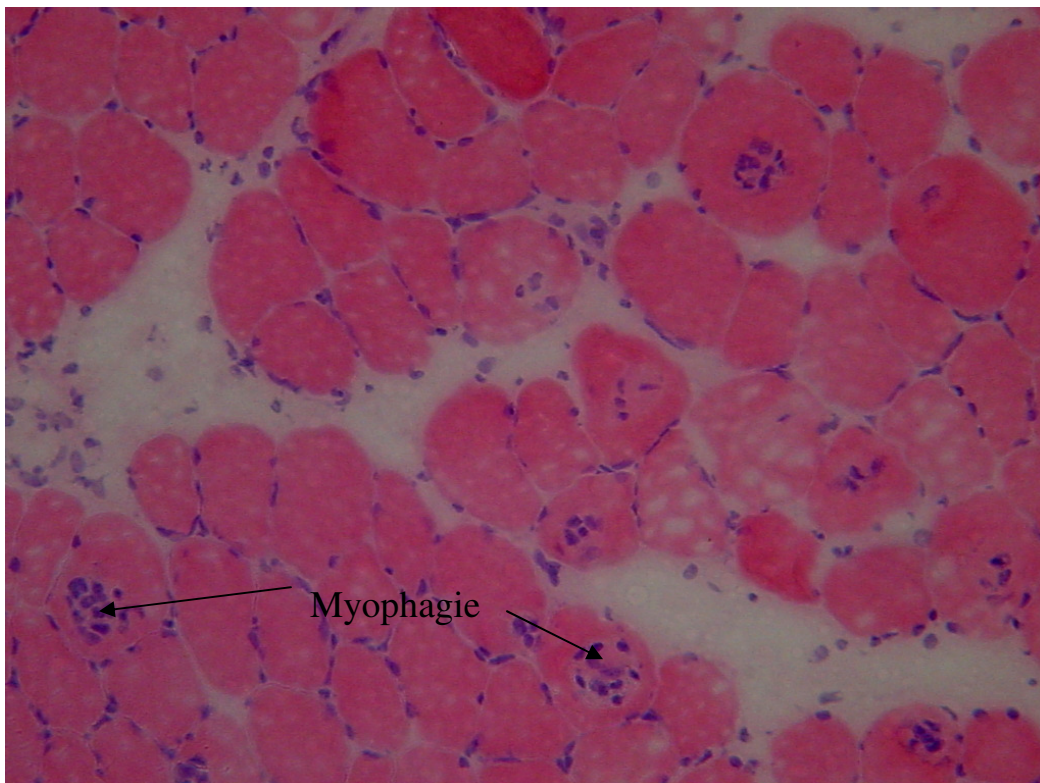


Abb. 15: Myophagie; M. gastrocnemius des Op-Beines, Gruppe NaCl/ Immobilisation; HE-Färbung; 200-fache Vergrößerung

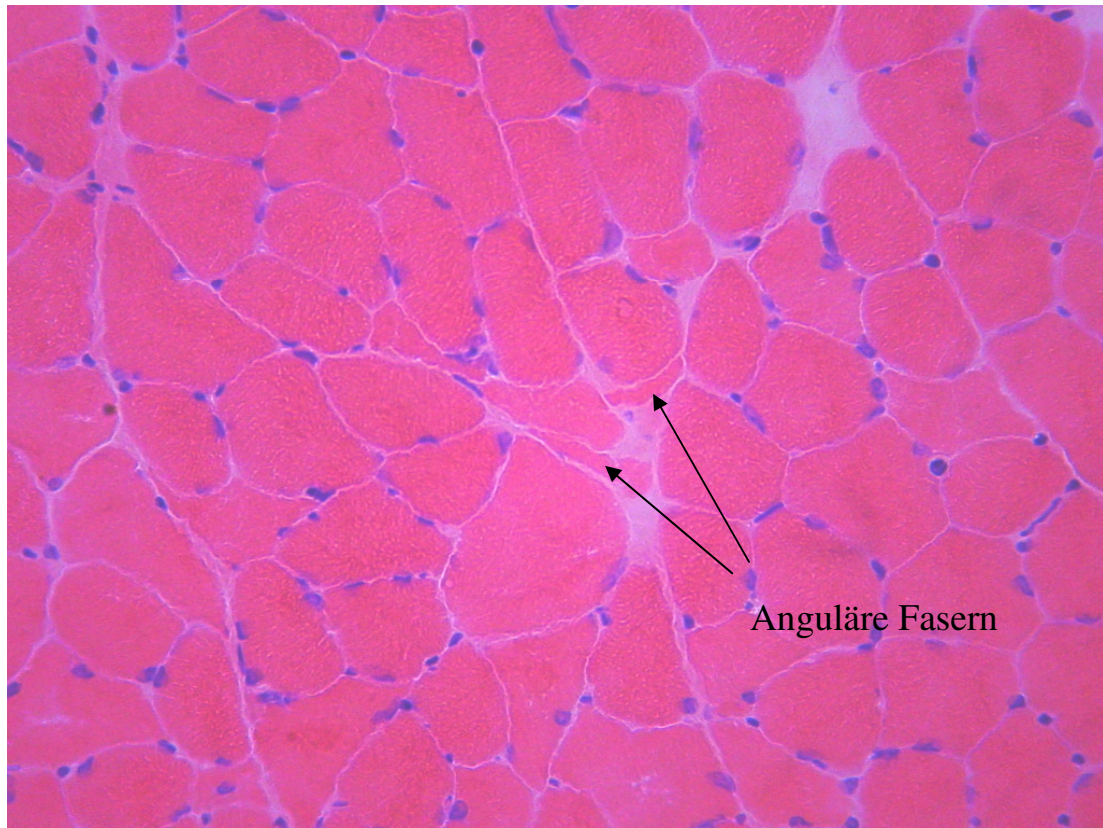


Abb. 16: Anguläre Fasern; M. gastrocnemius des Op-Beines, Gruppe NaCl/ Immobilisation; HE-Färbung; 400-fache Vergrößerung

### Muskelfaserdurchmesser

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Muskelfaserdurchmesser des M. gastrocnemius und des M. soleus des Op- und non-Op-Beines in  $\mu\text{m}$  sind in der folgenden Tabelle dargestellt.



Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen der Muskelfaserdurchmesser von M. gastrocnemius und M. soleus des Op- und non-Op-Beines in  $\mu\text{m}$

	Muskel	Bein	C.p./ Immo.	C.p./ Sham- Immo.	NaCl/ Immo.	NaCl/ Sham- Immo.
Faser- durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	M. gastro- cnemius	Op-Bein	32,3 $\pm$ 3,6*	35,2 $\pm$ 3,1**	36,6 $\pm$ 4,1 <sup>§</sup>	43,0 $\pm$ 4,1
		non-Op- Bein	41,0 $\pm$ 5,4	41,3 $\pm$ 3,4**	43,0 $\pm$ 4,3 <sup>§</sup>	48,4 $\pm$ 5,4
	M. soleus	Op-Bein	34,7 $\pm$ 10,1	41,5 $\pm$ 3,0**	34,8 $\pm$ 9,4 <sup>§</sup>	47,3 $\pm$ 6,4
		non-Op- Bein	47,8 $\pm$ 3,6	46,1 $\pm$ 4,6	46,7 $\pm$ 4,6	51,2 $\pm$ 8,4

\*\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Sham-Immobilisations-Subgruppe

<sup>§</sup>p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der NaCl-Gruppe

\*p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations-Subgruppe

Um die Ergebnisse zu verdeutlichen werden auch hier die Werte für den M. gastrocnemius mit denen des M. soleus des jeweiligen Beines zusammengefasst und in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Muskelfaserdurchmesser von M. gastrocnemius und M. soleus zusammengefasst

	Muskel	Bein	C.p./ Immo.	C.p./ Sham- Immo.	NaCl/ Immo.	NaCl/ Sham- Immo.
Faser- durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	M. gastro- cnemius + M. soleus	Op-Bein	33,4 $\pm$ 7,3	38,3 $\pm$ 4,4**	35,7 $\pm$ 7,1 <sup>§</sup>	45,2 $\pm$ 5,6
		non-Op- Bein	44,4 $\pm$ 5,7	43,7 $\pm$ 4,6**	44,8 $\pm$ 4,7 <sup>§</sup>	49,8 $\pm$ 7,0

<sup>§</sup>p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der NaCl-Subgruppe

\*\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Sham-Immobilisationsgruppe

Der Muskelfaserdurchmesser sowohl des M. gastrocnemius als auch des M. soleus des Op-Beines nimmt im Vergleich zum non-Op-Bein bei allen Tieren unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit ab. Eine signifikante Gewichtsabnahme liegt vor am M. gastrocnemius des Op-Beines und des non-Op-Beines und am M. soleus des Op-Beines der Immobilisations-Subgruppe verglichen mit der Sham-Immobilisations-Subgruppe innerhalb der NaCl-Gruppe (siehe Tabelle 11).

Die stärkste Faseratrophie zeigen die Muskeln des Op-Beines der Tiere der C.p./ Immobilisationsgruppe (siehe Tabelle 12 und Abbildung 17).

Die C.p.-Injektion hat einen systemischen Effekt innerhalb der Sham-Immobilisations-Gruppe, welcher zu einer signifikanten Abnahme der Faserdurchmesser bei den C.p./ Sham-immobilisierten Tieren führt, verglichen mit den NaCl-Tieren. Dies gilt für den M. gastrocnemius des Op- und non-Op-Beines, für den M. soleus des Op-Beines sowie für beide Muskeln zusammen am Op- und non-Op-Bein (siehe Tabelle 11 und 12). Die Immobilisation bedingt eine Atrophie der Muskelfasern am Op-Bein im Vergleich zum kontralateralen non-Op-Bein bei allen vier Gruppen (siehe Tabelle 12 und Abbildung 17).

Abbildung 18 zeigt in einem histologischen Bild Muskelfaseratrophien. Man erkennt deutlich die atrophierten Muskelfasern zwischen den normalgroßen Fasern.

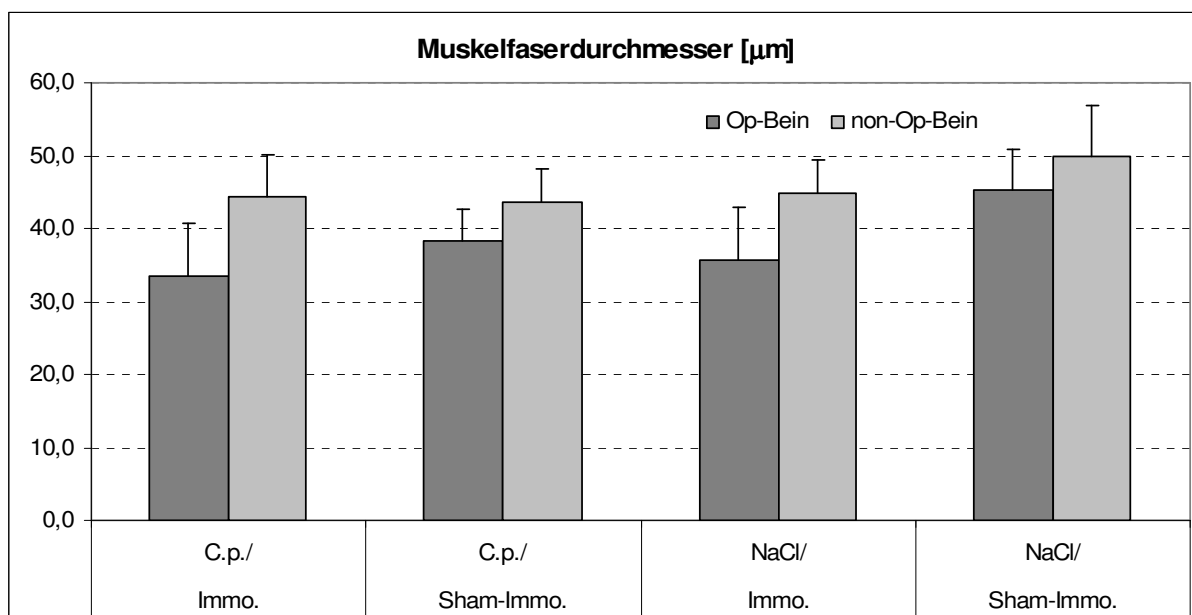


Abb. 17: Vergleichende graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Muskelfaserdurchmesser von M. gastrocnemius und M. soleus zusammen in µm

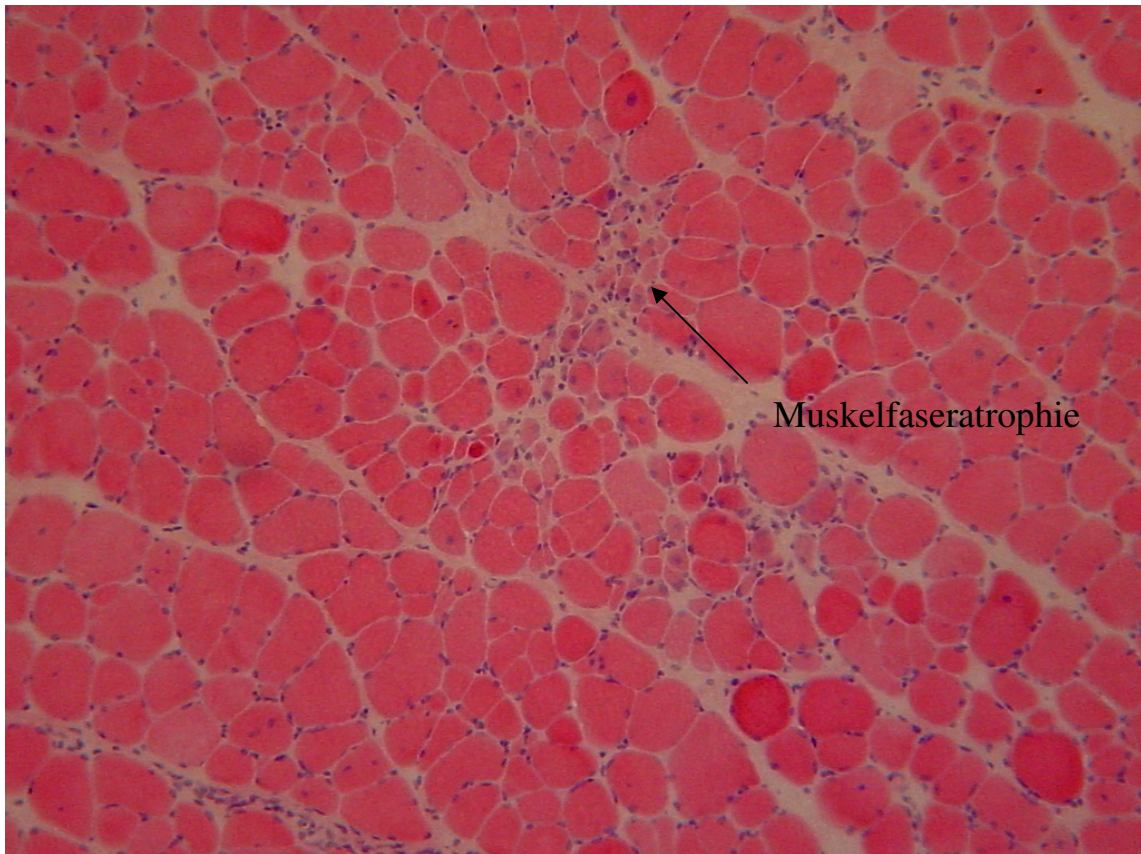


Abb.18: Muskelfaseratrophien; M. gastrocnemius des Op-Beines, Gruppe C.p./ Sham-Immobilisation; HE-Färbung;100-fache Vergrößerung

#### Anzahl der Entzündungszellen

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der pro Gesichtsfeld ausgezählten Entzündungszellzahl sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Entzündungszellen pro Gesichtsfeld vom M. gastrocnemius und M. soleus

	Muskel	Bein	C.p./ Immo.	C.p./ Sham- Immo.	NaCl/ Immo.	NaCl/ Sham- Immo.
Anzahl Entzündungszellen (pro Gesichtsfeld)	M. gastro- cnemius	Op-Bein	35,7 ± 20,1*	17,2 ± 11,6**	15,9 ± 11,6 <sup>§</sup>	6,4 ± 3,2
		non-Op- Bein	19,1 ± 15,9*	22,2 ± 22,9	7,2 ± 4,8	8,0 ± 4,2
	M. soleus	Op-Bein	48,2 ± 20,5*	33,3 ± 23,6	22,2 ± 16,2	18,4 ± 10,9
		non-Op- Bein	34,5 ± 25,0*	36,2 ± 16,9**	9,9 ± 7,8	15,1 ± 7,0

\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations-Subgruppe

\*\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Sham-Immobilisations-Subgruppe

<sup>§</sup>p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der NaCl-Gruppe

Die Zusammenfassung der Anzahl der Entzündungszellen von M. gastrocnemius und M. soleus eines Beines ergibt die in der folgenden Tabelle dargestellten Werte.

Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Entzündungszellen pro Gesichtsfeld von M. gastrocnemius und M. soleus eines Beines zusammen

	Muskel	Bein	C.p./ Immo.	C.p./ Sham- Immo.	NaCl/ Immo.	NaCl/ Sham- Immo.
Anzahl Entzündungszellen (pro Gesichtsfeld)	M. gastro- cnemius + M. soleus	Op-Bein	41,6 ± 20,7* <sup>#</sup>	25,2 ± 19,9*	19,1 ± 14,1	12,4 ± 9,9
		non-Op- Bein	26,8 ± 21,8*	28,8 ± 21,0*	8,6 ± 6,5	11,6 ± 6,7

\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations- und Sham-Immobilisations-Gruppe

<sup>#</sup>p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der C.p.-Gruppe



Eine signifikante Erhöhung der Entzündungszellzahl liegt vor bei allen Muskeln der C.p.-Tiere der Immobilisations-Subgruppe verglichen mit den entsprechenden NaCl-Tieren. Ist die C.p.-Injektion mit der Immobilisation einer Hintergliedmaße verbunden, ist der Anstieg der Entzündungszellen signifikant größer als bei der Kombination mit einer Sham-Immobilisation (siehe Tabelle 13).

Fasst man die Entzündungszellzahl des M. gastrocnemius mit denen des M. soleus zusammen, so wird ihr Anstieg bei den C.p.-Tieren gegenüber den NaCl-Tieren unabhängig von einer vorliegenden Immobilisation deutlich. Dieser Unterschied ist für alle vier Gruppen signifikant (siehe Tabelle 14).

Desweiteren ist die Entzündungszellzahl beider Muskeln des Op-Beines bei den Immobilisations-Tieren signifikant erhöht verglichen mit den Sham-Immobilisations-Tieren innerhalb der C.p.-Gruppe (siehe Tabelle 14).

Abbildung 20 zeigt Entzündungszellinfiltrate und Myophagie in einem histologischen Bild. Erkennbar sind Infiltrate von Entzündungszellen sowohl im z.T. verbreiterten endomysialen Bindegewebe als auch in den Muskelfasern.

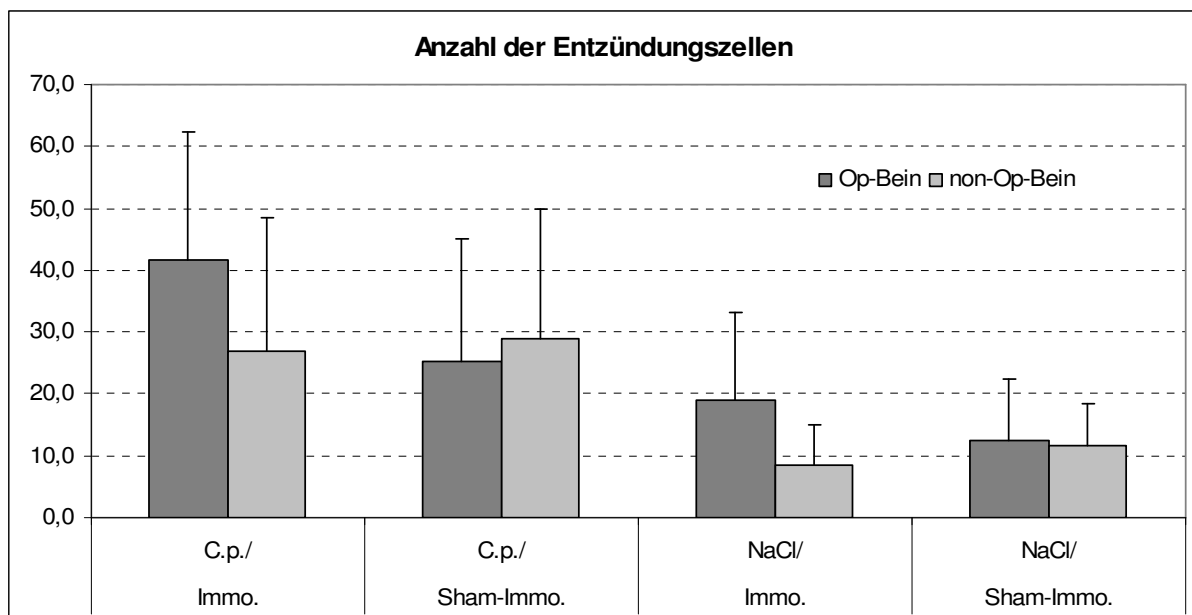


Abb. 19: Vergleichende graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Entzündungszellen von M. gastrocnemius und M. soleus zusammengefasst

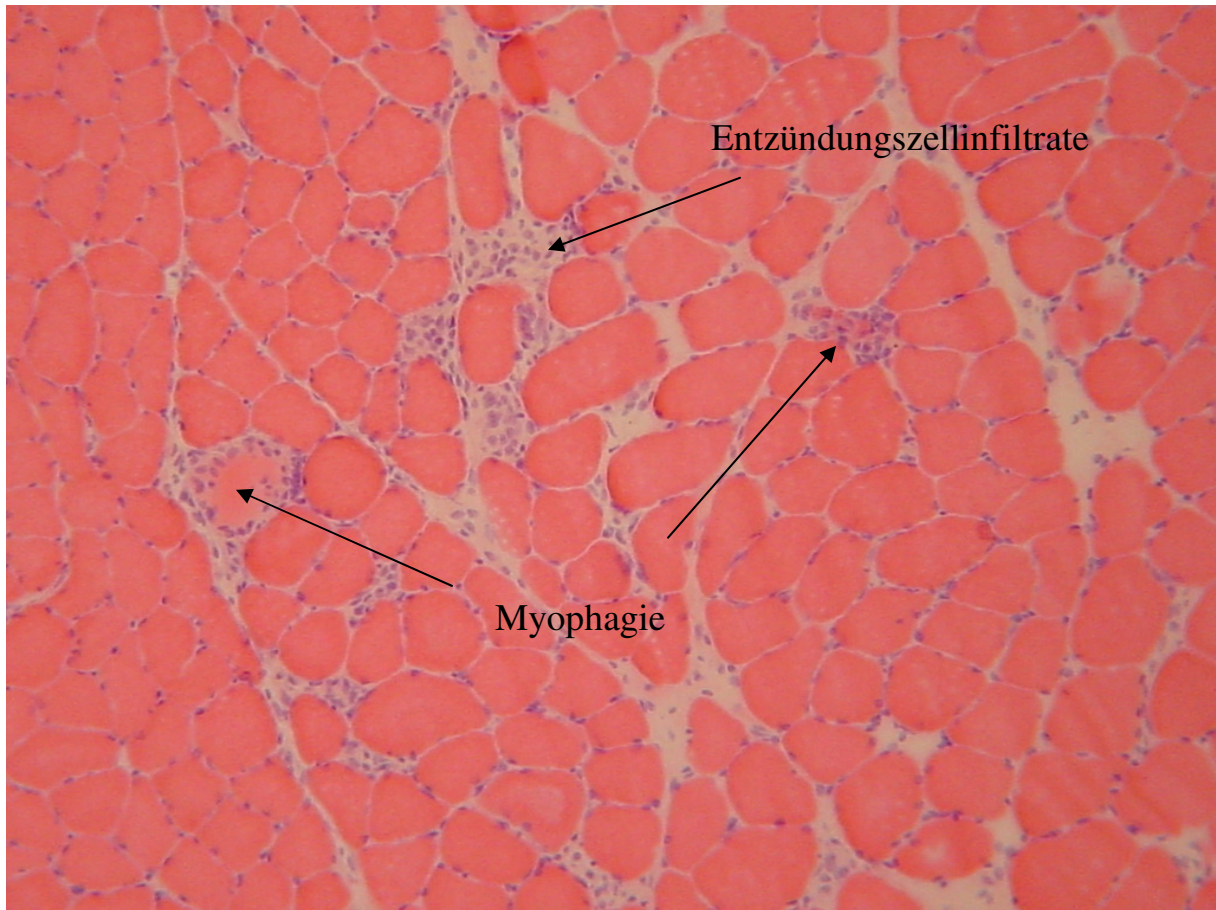


Abb. 20: Entzündungszellinfiltrate und Myophagie; M. gastrocnemius des non-Op-Beines, Gruppe C.p./ Immobilisation; HE-Färbung; 100-fache Vergrößerung

#### Breite des endomysialen Bindegewebes

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Breite des endomysialen Bindegewebes der einzelnen Muskeln sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Breite des endomysialen Bindegewebes in  $\mu\text{m}$

	Muskel	Bein	C.p./ Immo.	C.p./ Sham- Immo.	NaCl/ Immo.	NaCl/ Sham- Immo.
Breite des endomysialen Bindegewebes ( $\mu\text{m}$ )	M. gastro- cnemius	Op-Bein	3,5 $\pm$ 1,0 <sup>#</sup>	2,5 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 0,8 <sup>#</sup>	2,0 $\pm$ 0,8
		non-Op- Bein	2,4 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 1,5	2,1 $\pm$ 0,7	3,0 $\pm$ 1,2
	M. soleus	Op-Bein	3,9 $\pm$ 1,0	2,9 $\pm$ 0,6 <sup>**</sup>	4,1 $\pm$ 1,4	4,2 $\pm$ 1,1
		non-Op- Bein	3,7 $\pm$ 1,8 <sup>*</sup>	3,5 $\pm$ 1,0	2,4 $\pm$ 0,8	3,1 $\pm$ 1,3

\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations-Subgruppe

\*\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Sham-Immobilisations-Subgruppe

# p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der C.p.- und NaCl-Gruppe

Die für den M. gastrocnemius und den M. soleus zusammengefassten Werte zeigt Tabelle 16.

Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Breite des endomysialen Bindegewebes für den M. gastrocnemius und den M. soleus zusammengefasst

	Muskel	Bein	C.p./ Immo.	C.p./ Sham- Immo.	NaCl/ Immo.	NaCl/ Sham- Immo.
Breite des endomysialen Bindegewebes ( $\mu\text{m}$ )	M. gastro- cnemius + M. soleus	Op-Bein	3,6 $\pm$ 1,0 <sup>#</sup>	2,7 $\pm$ 0,8	3,6 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 1,5
		non-Op- Bein	3,0 $\pm$ 1,5 <sup>*</sup>	3,3 $\pm$ 1,2	2,2 $\pm$ 0,7 <sup>§</sup>	3,1 $\pm$ 1,2

\* p < 0,05 C.p. vs. NaCl innerhalb der Immobilisations-Subgruppe

# p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der C.p.-Gruppe

§ p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation innerhalb der NaCl-Gruppe

Eine signifikante Zunahme der Breite des endomysialen Bindegewebes findet sich am M. gastrocnemius des Op-Beines der immobilisierten Tiere sowohl der C.p.- als auch der NaCl-Gruppe verglichen mit den sham-immobilisierten Tieren (siehe Tabelle 15).

Abbildung 21 zeigt exemplarisch eine Degeneration von Muskelfasern. Dabei kommt es zur Spaltenbildung insbesondere der hypertrophen Muskelfasern. Das endomysiale Bindegewebe ist verbreitert und mit Entzündungszellen infiltriert. Eine deutliche Begrenzung der einzelnen Faszikel fehlt.

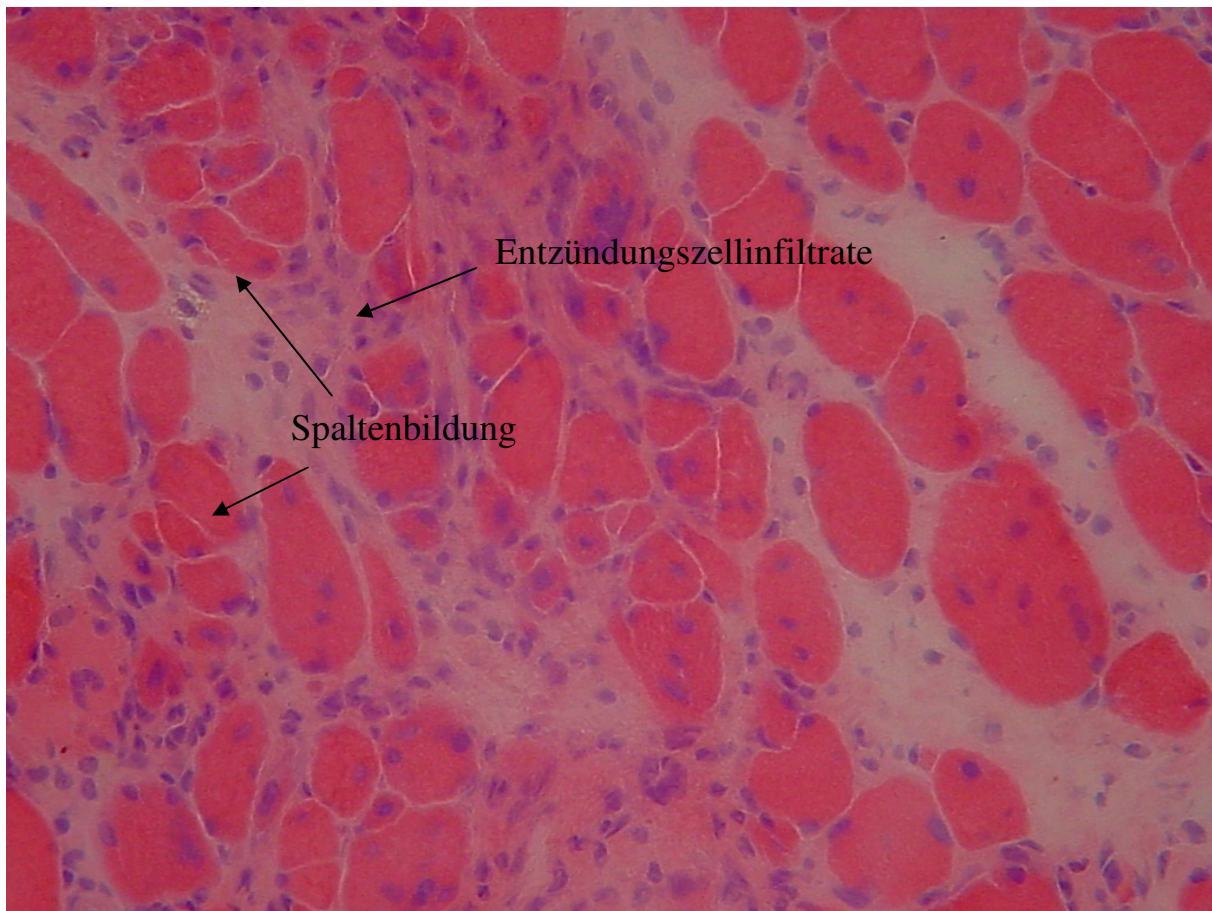


Abb. 21: Muskelfaserdegeneration mit Spaltenbildung und Entzündungszellinfiltraten; M. gastrocnemius des Op-Beines, Gruppe C.p./ Immobilisation; HE-Färbung; 200fache Vergrößerung

### 3.3.4.2 Periodic-acid-Schiff-Reaktion

#### Muskelfasertypengruppierung

Der Anteil an Muskeln mit einer vorhandenen Gruppierung innerhalb einer Subgruppe ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 17: Anteil an Muskeln mit einer Muskelfasertypengruppierung beim M. gastrocnemius und M. soleus des Op- und non-Op-Beines innerhalb einer Subgruppe (n=10)

	Muskel	Bein	C.p./ Immo.	C.p./ Sham- Immo.	NaCl/ Immo.	NaCl/ Sham- Imm.
<b>Muskel- fasertypen- gruppierung ( % )</b>	<b>M. gastro- cnemius</b>	<b>Op-Bein</b>	4 von 10	1 von 10	4 von 10	0 von 10
		<b>non-Op- Bein</b>	3 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10
	<b>M. soleus</b>	<b>Op-Bein</b>	0 von 10	1 von 10	1 von 10	0 von 10
		<b>non-Op- Bein</b>	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10

Die für den M. gastrocnemius und M. soleus zusammengefassten Werte des Vorkommens einer Fasertypengruppierung sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 18: Anteil an Muskeln mit einer Muskelfasertypengruppierung innerhalb einer Subgruppe (n=10) für den M. gastrocnemius und den M. soleus zusammen

	Muskel	Bein	C.p./ Immo.	C.p./ Sham- Immo.	NaCl/ Immo.	NaCl/ Sham- Immo.
<b>Muskel- fasertypen- gruppierung</b>	<b>M. gastro- cnemius + M. soleus</b>	<b>Op-Bein</b>	2 von 10	1 von 10	2,5 von 10	0 von 10
		<b>non-Op- Bein</b>	1,5 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10

Mit 4 von 10 Muskeln ist der Anteil der Muskeln, welche eine Fasertypengruppierung aufweisen beim M. gastrocnemius der immobilisierten Gliedmaße am größten, unabhängig von einer Injektion mit Corynebakterium parvum. In der Gruppe NaCl/ Sham-Immobilisation kann an keinem Muskel eine Fasertypengruppierung nachgewiesen werden. Auch weist der M. soleus des non-Op-Beines in keiner der Gruppen eine Fasertypengruppierung auf (siehe Tabelle 17).

Abbildung 24 zeigt eine Muskelfasertypengruppierung. Man erkennt deutlich eine große Gruppe heller Typ-I-Muskelfasern und daneben eine Gruppe dunkler Typ-II-Fasern ohne das typische mosaikartige Muster.



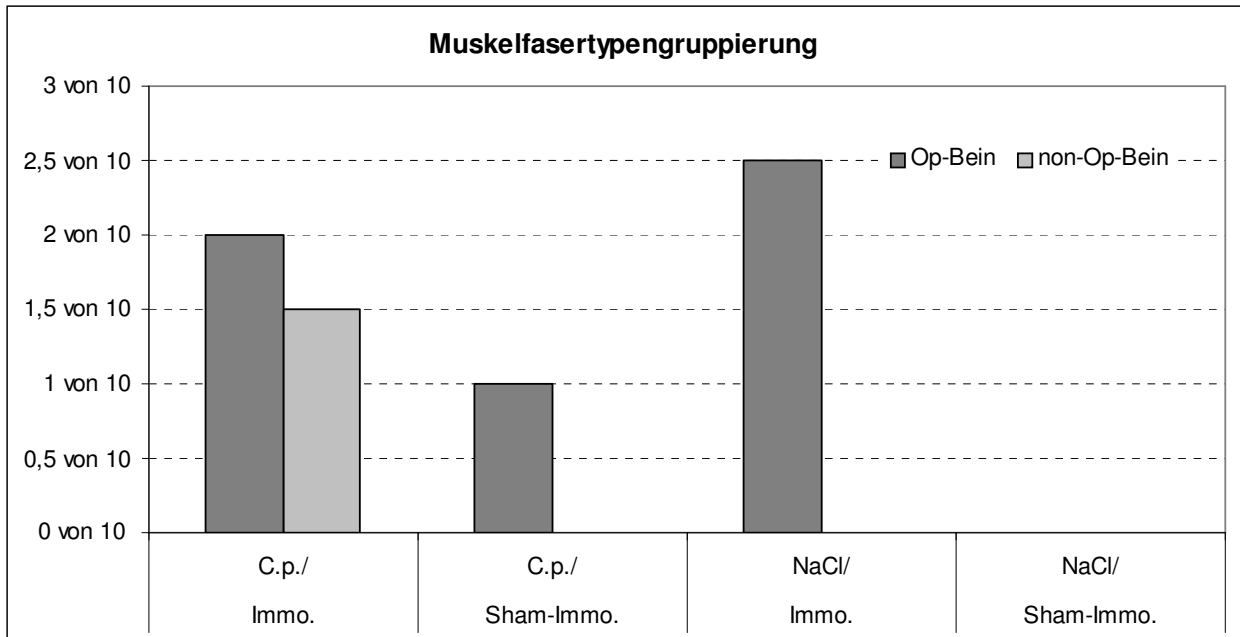


Abb. 22: Vergleichende graphische Darstellung des Anteils an Muskeln mit einer Muskelfasertypengruppierung innerhalb einer Subgruppe für den M. gastrocnemius und den M. soleus zusammen

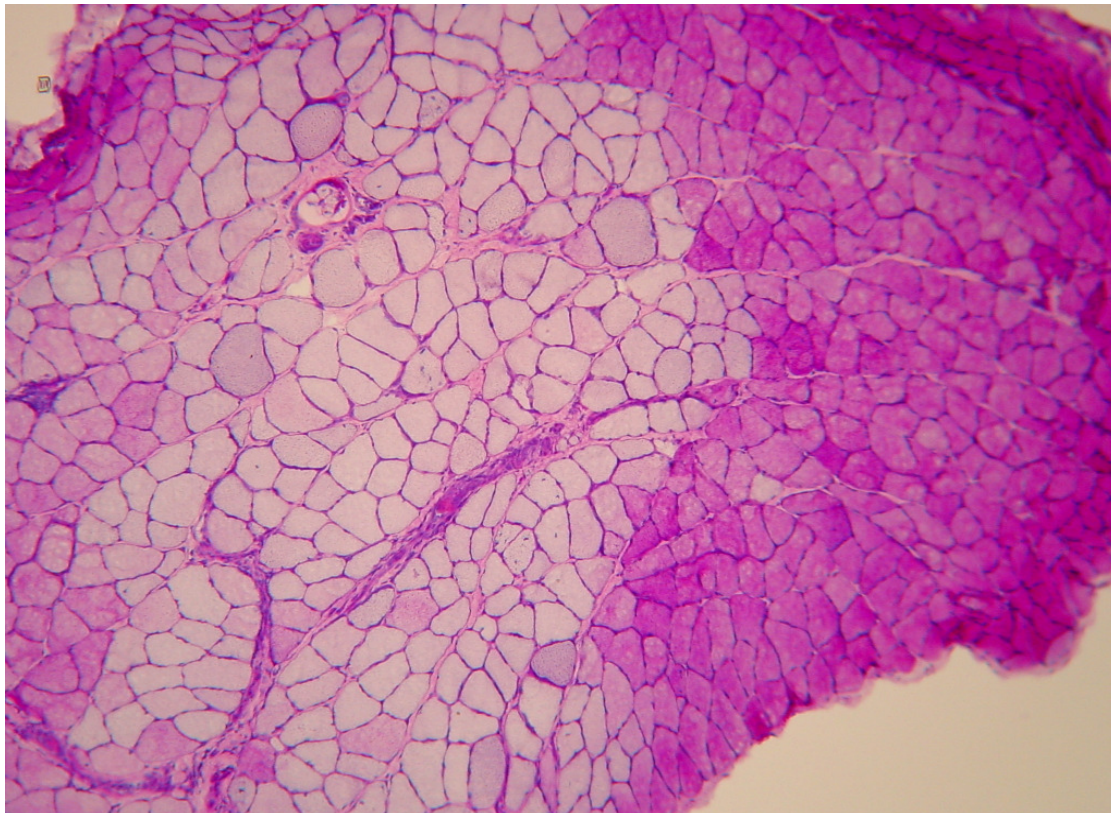


Abb.23: Fasertypengruppierung; M. soleus des Op-Beines, Gruppe C.p./ Sham-Immobilisation; PASFärbung; 100fache Vergrößerung

### Verhältnis von Typ I- zu Typ II-Muskelfasern

Das Verhältnis von Typ I- zu Typ II-Muskelfasern wird am M. gastrocnemius bestimmt. Der prozentuale Anteil von Typ I-Fasern an der Gesamtfaserzahl ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 19: Prozentualer Anteil von Typ I-Fasern an der Gesamtmuskelfaserzahl beim M. gastrocnemius

	<b>Muskel</b>	<b>Bein</b>	<b>C.p./ Immo.</b>	<b>C.p./ Sham- Immo.</b>	<b>NaCl/ Immo.</b>	<b>NaCl/ Sham- Immo.</b>
<b>Typ I- Muskelfasern ( % )</b>	<b>M. gastro- cnemius</b>	<b>Op-Bein</b>	46 ± 8	49 ± 11	46 ± 9	48 ± 11
		<b>non-Op- Bein</b>	44 ± 7	50 ± 7	49 ± 7	44 ± 10

Das Verhältnis von Typ I- zu Typ II-Muskelfasern weist zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methoden**

#### **4.1.1 Darstellung des Versuchsziels**

Ziel dieser Arbeit ist, den Einfluss von Immobilisation und chronischer Inflammation auf die Muskelmorphologie zu untersuchen. Dabei soll insbesondere die Frage geklärt werden, inwieweit Immobilisation und Inflammation allein oder die Kombination beider die Muskelmorphologie beeinträchtigt, und ob die Kombination von Immobilisation und Infektion eine Summation oder Potenzierung der Effekte bedingt.

In der Vergangenheit gab es verschiedene Arbeiten, die sich mit den isolierten Auswirkungen von Immobilisation (IBEBUNJO und MARTYN, 1999; RADELL et al., 2002) und Sepsis (BOLTON, 1993b); (WITT et al., 1991) auf das neuromuskuläre System gesondert beschäftigten. Im klinischen Alltag kommen aber bei kritisch kranken Patienten immer mehrere Faktoren zusammen. Neben der auslösenden Krankheit ist bei einem Patienten mit einer Sepsis auf der Intensivstation eine Immobilisation durch die Bettlägerigkeit immer Teil des Krankheitsbildes. Zusätzlich erhalten diese Patienten eine Vielzahl an Medikamenten verabreicht, welche ihrerseits auch einen Effekt auf das neuromuskuläre System haben können. Diese komplexe Multifaktorialität ist jedoch schwer in einem Tiermodell darzustellen.

So gibt es bisher kein etabliertes In-vivo-Tiermodell, welches zwei der propagierten Hauptfaktoren für die Critical Illness Polyneuromyopathie, die Immobilisation und die Inflammation kombiniert.

Die vorliegende Studie stellt die Etablierung eines solchen „double-hit“ Modells dar.

Dabei ist die Untersuchung der histopathologischen Veränderungen am Muskel nur ein Teil des Gesamtprojektes, welches außerdem die Auswirkungen von Immobilisation und systemischer Inflammation auf die Muskelkraft (UNTERBUCHNER, 2006), und ihre Effekte auf die Azetylcholinrezeptor-Expression und auf die Pharmakodynamik von Succinylcholin (HELMING, 2005) untersucht.

#### **4.1.2 Corynebakterium parvum Modell**

Zur Beantwortung der Frage, in welchem Ausmaß Schäden an der Skelettmuskulatur durch eine Infektion, eine Immobilisation oder die Kombination von beidem hervorgerufen werden, wird ein stabiles, eine chronische Inflammation verursachendes Infektionsmodell benötigt.



Der Einfluss einer Inflammation auf die Muskelfunktion wurde schon früher untersucht. Dazu verwendete man verschiedene Tiermodelle. So zeigten Mäuse nach einer Endotoxin (LPS)-Injektion eine Reduktion der Kontraktionskraft des Diaphragmas schon 12 Stunden nach der Injektion. In einem chemisch verursachten Peritonitis-Modell bei der Ratte war die Muskelkraft nach 6 Tagen signifikant vermindert (EL-DWAIRI et al., 1998). Das klinische Bild der Critical Illness Polyneuromyopathie (CIPM) konnte in diesen Tiermodellen nicht simuliert werden. Die CIPM ist eine chronische Erkrankung welche mindestens 7 Behandlungstage auf der Intensivstation für ihre Entstehung benötigt (DE LETTER et al., 2001; DE JONGHE et al., 2002).

Alle bisher publizierten Tiermodelle haben einen Krankheitsverlauf von weniger als 10 Tagen und sind deshalb zur Untersuchung von Langzeiteffekten wenig geeignet. Das verwendete hitzeinaktivierte Corynebakterium parvum induziert eine systemische Inflammation mit granulomatöser Hepatitis (FARQUHAR et al., 1983). Diese Inflammation ist selbstlimitierend mit einer maximalen Ausprägung des Krankheitsbildes an den Tagen 4 bis 6 (FINK et al., 2003). Eine chronische Inflammation wird durch die wiederholte Injektion von Corynebakterium parvum im Abstand von 4 Tagen erzielt.

Dass das Corynebakterium parvum (C.p.) ein potentes Infektivum ist, zeigt der Umstand, dass 11 der insgesamt 53 Ratten infolge der systemischen Inflammation verstarben. Die übrigen zeigen deutliche Anzeichen einer SIRS wie Gewichtsverlust bzw. fehlende Gewichtszunahme und Veränderungen von Blutparametern wie MetHb,  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein und Blutbildveränderungen.

Das C.p.-Modell ist an der Ratte etabliert. Desweiteren sprechen für die Verwendung der Ratte als Versuchstier die vorhandene Erfahrung der Arbeitsgruppe mit dieser Tierart hinsichtlich der Narkosemedikation, des Herz-Kreislaufverhaltens unter der Narkose, der Präparation und Entnahme von Proben sowie deren histologischen Aufarbeitung. Neurophysiologisch niedriger entwickelte Tierarten sind für klinisch-neurologische Untersuchungen, die zum Nachweis der Critical Illness Polyneuropathy nötig sind, nicht geeignet.

#### **4.1.3 Immobilisationsmodell**

In der Vergangenheit wurden für die chronische Ruhigstellung von Muskeln verschiedene Modelle eingesetzt, z.B. die Durchtrennung des Rückenmarks, die neurale Applikation von toxischen Substanzen wie Tetrodotoxin oder die Aufhängung einer Hintergliedmaße. Jede dieser Methoden ruft funktionale, morphologische und biochemische Störungen im Muskel

hervor und ist relevant für spezielle klinische Konditionen beim Menschen. Allerdings kann nur die Immobilisation durch Fixation der Gelenke die eingeschränkte Beweglichkeit bei der Critical Illness, insbesondere die reduzierte neuromuskuläre Aktivität bei erhaltener Kommunikation zwischen allen Ebenen des Nervensystems (zentral und peripher) und den Muskelfasern wiedergeben (IBEBUNJO und MARTYN, 1999).

#### **4.1.4 Kombinationsmodell**

Der vorliegende Versuch kombiniert erstmals die Immobilisation einer Hintergliedmaße durch interne Spickdrahtfixierung mit einer chronischen Inflammation durch die repetitive Injektion von hitzeinaktivierten C.p.. Dadurch soll die Komplexität der Einflüsse auf einen kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation genauer als in Modellen mit nur einem schädigenden Faktor dargestellt werden. Da die CIPM eine sich chronisch entwickelnde Krankheit ist, wurden die Tiere für die Dauer von 12 Tagen den potentiell schädigenden Einflüssen ausgesetzt.

#### **4.1.5 Konservierung der Muskelproben**

Das Einfrieren der Muskelproben in Isopentan, welches sich in einem Gefäß in flüssigem Stickstoff befindet, gewährleistet ein schnelles Durchfrieren der Probe, wodurch das Auftreten von Gefrierartefakten in Form von Gefrierlöchern verhindert wird.

Wird das Muskelgewebe unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren, bildet sich eine Schicht von gasförmigem Stickstoff um das Muskelgewebe und wirkt als Isolierschicht, so dass die Abkühlung verlangsamt wird. Isopentan wirkt demgegenüber als kälteleitendes Medium und führt zum raschen Einfrieren des Präparates (SCHRÖDER, 1982).

In Vorversuchen wurden Proben durch Lagerung auf Trockeneis gefroren. Diese Methode lässt den Muskel mit einer langsameren Geschwindigkeit durchfrieren, so dass eine histologische Beurteilung der Proben aufgrund massiver Gefrierartefakte unmöglich war.

Nach dem Einfrieren werden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dies und der Transport der Proben auf Trockeneis sollen ein Antauen der Präparate verhindern, welches das nachträgliche Entstehen von Gefrierartefakten zur Folge hätte.

## **4.1.6 Histopathologisches Bewertungssystem**

### **4.1.6.1 Hämatoxylin & Eosin-Färbung**

Diese Färbemethode ist eine einfache und schnell durchzuführende Routinefärbung, welche die Zellkerne und an rauhem endoplasmatischem Retikulum reiche Zytoplasmabestandteile blau und die übrigen Zytoplasmabestandteile rot färbt. Vorteil der H&E-Färbung ist die Einfachheit der Durchführung mit konstant gutem optischem Ergebnis. Sie hat sich deshalb in der Histologie als Übersichtsfärbung etabliert.

### **4.1.6.2 Periodic-acid-Schiff-Reaktion**

Zur histopathologischen Beurteilung der Muskeln ist eine Färbemethode nötig, mit der sich die verschiedenen Muskelfasertypen unterscheiden lassen. Die Typ I- und Typ II-Fasern unterscheiden sich unter anderem durch ihren Glykogengehalt. Die PAS-Färbung als histochemische Färbemethode färbt Glykogen violett an.

Eine weitere histochemische Reaktion als Färbemöglichkeit zur Unterscheidung der Muskelfasertypen ist die ATPase-Reaktion, welche die Myosin-ATPase sichtbar macht. Die nachzuweisenden Enzyme wie die Myosin-ATPase sind empfindlich, was diese Methode anfällig macht. Das Einhalten der Kühlkette ist unbedingt erforderlich, um das Entstehen von Gefrierartefakten zu vermeiden. Desweiteren ist diese immunhistochemische Reaktion im Vergleich zur PAS-Färbung relativ teuer.

Da die PAS-Färbung sensitiv genug für die vorliegende orientierende Untersuchung ist, und im institutseigenen Labor die Erfahrungen und technischen Voraussetzungen für die PAS-Reaktion vorhanden sind, wird diese als zweite Färbemethode für die histopathologische Beurteilung der Muskeln präferiert.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Messparameter**

#### **4.2.1.1 Körpergewicht**

Die Erstellung einer Gewichtskurve ist eine einfache Methode, um das Allgemeinbefinden der Tiere zu beurteilen. Um Trends und Verläufe zu erkennen, ist es wichtig, dass alle Versuchs-

tiere zu Beginn der Untersuchung vergleichbare Gewichte haben. Wie in Abbildung 9 ersichtlich ist dies in der vorliegenden Studie der Fall.

Am Tag 1, nach erfolgtem Eingriff, weisen alle Tiere einen Gewichtsverlust auf. Die Tiere, welche am Tag 4 und am Tag 8 C.p. injiziert bekommen, verlieren insgesamt an Gewicht, wobei bis auf eine Ausnahme (Gruppe C.p./ Immobilisation, Tag 5) der Gewichtsverlust besonders am Tag nach der Injektion deutlich wird.

Die Tiere, welche NaCl injiziert bekommen, weisen ab Tag 2 eine Gewichtszunahme mit Stagnation am Tag nach der Injektion auf. Dies ist damit zu erklären, dass eine Operation unter Kurznarkose für den Organismus eine mit Stress verbundene Belastung ist. Nach dem Eingriff wird den Tieren zwar wieder Wasser und Futter angeboten, doch vergehen teilweise bis zu 24 Stunden, ehe die Tiere das erste Futter und Wasser zu sich nehmen. So erklärt sich die Gewichtsabnahme bei den Tieren aller Gruppen am Tag 1.

Der Verlust an Körpergewicht in den C.p.-Gruppen ist ein typisches Zeichen für die hyperkatabole Stoffwechselsituation im Zustand der SIRS. Darüber hinaus dürfte die in der Literatur beschriebene entzündungsbedingte Anorexie zumindest anteilig an der Reduktion des Körpergewichts beteiligt sein (RUFF und SECRIST, 1984).

Vergleiche zwischen den C.p.- und den NaCl-Tieren zeigen, dass die NaCl-Tiere insgesamt eine positive Gewichtsbilanz aufweisen.

Der höhere Gewichtsverlust bzw. die erhöhte Wachstumsstagnation der Gruppen C.p./ Immobilisation bzw. NaCl/ Immobilisation im Vergleich zu den jeweiligen Sham-Immobilisations-Subgruppen, könnte auf die Immobilisation als zusätzlichen Stressfaktor zurückgeführt werden, der über einen gesteigerten Energieumsatz zu einer erhöhten Mobilisierung körpereigener Reserven führen würde (JASPERS et al., 1988).

#### **4.2.1.2 Lebergewicht**

Die Injektion von C.p. führt zu einer signifikanten Lebervergrößerung, verglichen mit den NaCl-Tieren. Das relative Lebergewicht der C.p.-Tiere ist fast doppelt so groß wie das der NaCl-Tiere. (siehe Tabelle 2). Dies ist damit zu erklären, dass die Injektion von *Corynebacterium parvum* eine granulomatöse Hepatitis hervorruft (FARQUHAR et al., 1983). Unter anderem kommt es bei einer Entzündung der Leber zu einer Größenzunahme, welche zurückzuführen ist auf die gesteigerte aktive Durchblutung des Organs.

#### **4.2.1.3 Hämoglobin-, Methämoglobinwert, Blutbild, $\alpha_1$ -saures Glykoprotein**

Die Veränderungen der Blutparameter sind Ausdruck der systemischen Inflammation. Sie stehen somit in direktem Zusammenhang mit den Ergebnissen der histopathologischen Untersuchungen, da Veränderungen an nicht geschädigten Muskeln durch die Inflammation verursacht sein können. Deshalb werden die Blutparameter in der vorliegenden Arbeit mit aufgeführt.

Wie aus Tabelle 3 und Abbildung 11 ersichtlich sind die Hb-Werte der C.p.-Tiere ab Tag 8 signifikant erniedrigt im Vergleich zu den NaCl-Tieren.

Die MetHb-Werte der C.p.-Tiere sind ab Tag 4 signifikant erhöht verglichen mit den NaCl-Tieren (siehe Tabelle 4 und Abbildung 12).

Da der Hämoglobinwert der NaCl-Tiere nur geringen Schwankungen unterliegt, ist als Ursache der Anämie der C.p.-Tiere die systemische Inflammation zu sehen.

Die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), wird unter anderem durch bakterielle Endotoxine, Vasodilatoren oder Zytokine angeregt. Bildungsorte sind Endothelzellen, Mastzellen, Thrombozyten und Astrozyten (STARK und SZURSZEWski, 1992). Im Verlauf einer Sepsis kommt es zu einer zusätzlichen NO-Bildung in Hepatozyten, Kupfferschen Sternzellen und Makrophagen durch die sogenannte „induzierbare NO-Synthetase“ (BAUER, 1996). NO ist somit ein wichtiger Entzündungsparameter. Als Oxidationsmittel bewirkt es die Oxidation des zweiwertigen Eisens der Hämgruppe im Hämoglobin zu dreiwertigem. Es entsteht Methämoglobin als stabiles Produkt von NO.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist das Akute-Phase-Protein  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein als weiterer Entzündungsparameter bei den C.p.-Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu den NaCl-Tieren. Die Ursache ist eine vermehrte Bildung dieser Proteine in der Leber im Rahmen einer Akute-Phase-Reaktion, wie sie nach Entzündungen, Infektionen und anderen akuten Schädigungen auftritt. Auslöser sind die am Entzündungsort gebildeten proinflammatorischen Zytokine wie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin 1 und 6.

Die Erythrozyten- und Thrombozytenzahl fällt bei den C.p.-Tieren signifikant ab verglichen mit den NaCl-Tieren und bestätigt damit die erfolgreiche Entwicklung einer systemischen Inflammationsantwort.

#### **4.2.1.4 Hämodynamik, Herzfrequenz und Blutglukose**

Der mittlere arterielle Blutdruck wurde innerhalb festgesetzter Grenzen gehalten, die es ermöglichen trotz individueller Abweichungen sicherzustellen, dass er keinen signifikanten Einfluss auf die Hauptzielvariablen hat.

So war der MAP bei den Tieren der C.p.-Gruppen z.T. signifikant niedriger als bei den Tieren der NaCl-Gruppen (siehe Tab. 6). Dies unterstreicht die Tatsache, dass die Tiere mit systemischer Inflammationsantwort auch Probleme mit der Aufrechterhaltung der Kreislauf-funktion haben. Dennoch ist ein Effekt auf die histopathologischen Ergebnisse auszuschließen, da die hämodynamischen Parameter innerhalb der festgesetzten Grenzen waren.

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, ist die Blutglukose bei den C.p.-Tieren erhöht im Vergleich zu den NaCl-Tieren. Innerhalb der Sham-Immobilisations-Subgruppe sind die Blutzuckerwerte der C.p.-Tiere signifikant erhöht gegenüber den NaCl-Tieren, wogegen aufgrund der hohen Standardabweichung in der Gruppe C.p.-Immobilisation die Blutzuckerwerte dieser Gruppe statistisch gesehen keine Signifikanz gegenüber den NaCl/ Immobilisations-Tieren erreichen. Die hohe Standardabweichung reflektiert dennoch den pathologischen Zuckerstoffwechsel und kann deshalb, trotz fehlender statistischer Signifikanz, indirekt als aussagekräftiges Ergebnis gewertet werden. Diese Blutzuckererhöhung bzw. der gestörte Zuckerstoffwechsel ist durch eine gesteigerte Glukoneogenese in der Leber im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL1 und 6 bedingt (NEUGEBAUER et al., 1995), und somit ebenfalls ein Merkmal der systemischen Inflammationsreaktion.

#### **4.2.2 Muskelgewichte**

Die C.p.-Injektion führt zu einer Reduktion des Muskelgewichtes sowohl am Op- als auch am non-Op-Bein (siehe Tabelle 7).

Proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL1, IL2, IL6, Lipidmediatoren (Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene), NO sowie Faktoren des Komplementsystems aktivieren metabolische Kaskaden, die über eine Aktivierung von Muskelproteasen zum Muskelabbau führen (NEUGEBAUER et al., 1995). Auch VOISIN et al. (1996) und BREUILLE et al. (1999) zeigten in ihren Sepsismodellen, dass der ausgeprägte Proteinkatabolismus, mediiert durch den Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweg, als die Hauptursache für die beobachtete Muskelatrophie angesehen werden kann.

Die Abnahme des Muskelgewichtes bei den C.p.-Tieren könnte also einerseits die Folge einer entzündungsbedingten, bevorzugten Proteolyse kontraktiler, muskulärer Proteine sein. Insbesondere die Myofibrillen Aktin und Myosin, die im Rahmen des zytokin-modulierten Hyperkatabolismus eine negative Proteinbilanz aufweisen, werden durch einen energieabhängigen Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweg intrazellulär abgebaut (DI GIOVANNI et al., 2004; LACOMIS, 2002). Andererseits könnte dieser Effekt auch durch die CIP bedingt sein, die über eine Denervationsatrophie ebenfalls zur Verringerung der Muskelmasse beiträgt (BOLTON et al., 1984).

Ein Effekt des SIRS dürfte sein, dass der Gewichtsverlust des M. tibialis cranialis und M. flexor digitorum des Op-Beines bei der Gruppe C.p./ Sham-Immobilisation signifikant stärker gegenüber der Gruppe NaCl/ Sham-Immobilisation ist (siehe Tabelle 8).

Als Zeichen der immobilisationsbedingten Inaktivitätsatrophie waren die Gewichte aller 4 Muskeln innerhalb der Immobilisations-Subgruppen am Op-Bein gegenüber dem non-Op-Bein vermindert. Die Immobilisation führt nach der gängigen Literatur zu einer Vielzahl von morphologischen und funktionellen Veränderungen des Muskels:

- Proteinverlust (v.a. myofibrilläres Protein) und Reduktion des Querschnitts (cross sectional area), ohne Reduktion der Faserzahl (CARDENAS et al., 1977; HERBISON et al., 1978)
- Verlust an sarkoplasmatischem Retikulum, teilweise segmentale Fasernekrosen (BAKER und MATSUMOTO, 1988)
- Anstieg der Myoglobinkonzentration in den Muskelfasern (BOOTH, 1977)
- Minderung der oxidativen Kapazität des Muskels aufgrund einer Reduktion des mitochondrialen Cytochrom C-Gehalts und der mitochondrialen Citratsynthetaseaktivität (BOOTH, 1977)
- Verminderung der glykolytischen Aktivität
- EMG- Veränderungen (WITZMANN et al., 1982)
- Verlust der in Reihe geschalteten Sarkomere und Reorganisation der Sarkomerstrukturen, wenn der Muskel in Entspannung immobilisiert ist (WITZMANN et al., 1982)
- Hochregulation von Azetylcholinrezeptoren mit gesteigerter Expression aller 5 Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ), mögliche Expression fetaler Rezeptoren an junktionaler und extrajunktionaler Stelle; unveränderte, neuromuskuläre Endplattengröße; Anstieg der Ratio Endplattengröße/ Fasergröße (IBEBUNJO et al., 1997)

- Reduktion der Kontraktionskraft und Resistenz gegenüber der tetanischen Ermüdung des Muskels (IBEBUNJO und MARTYN, 1999).

Betrachtet man den signifikanten, durch Atrophie bedingten Gewichtsverlust der 4 Muskeln am immobilisierten Op-Bein gegenüber dem non-Op-Bein, so muß man bei der C.p.-Gruppe und der NaCl-Gruppe unterschiedliche ursächliche Faktoren in Erwägung ziehen.

Die Reflexatrophie, welche durch den chirurgischen Schmerz des Immobilisationseingriffes und durch die folgende Minderbelastung der Extremität hervorgerufen wird, trägt laut IBEBUNJO und MARTYN (1999) nur minimal zum Gewichtsverlust der Muskulatur bei. Diese Feststellung beruht zum einen auf der Beobachtung, dass die Reflexatrophie nur ein temporäres, ca. 7 Tage dauerndes Phänomen ist, die Immobilisationszeit in der vorliegenden Studie aber 12 Tage betragen hat (IBEBUNJO und MARTYN, 1999). Zum anderen weisen die Muskeln der eigenen Versuchsreihe am Op-Bein der Gruppe NaCl/ Sham-Immobilisation keinen signifikanten Gewichtsverlust gegenüber dem non-Op-Bein auf, mit Ausnahme des M. gastrocnemius. Hier dürfte der Muskelgewichtsverlust fast ausschließlich auf die Reflexatrophie zurückzuführen sein.

Die stärkste Atrophie am immobilisierten Op-Bein weist sowohl in der C.p.- als auch in der NaCl-Gruppe der M. tibialis cranialis auf (siehe Tabelle 8). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Immobilisation unter Entspannung, also in verkürzter Ruhelänge, wie dies im vorliegenden Modell für den M. tibialis cranialis der Fall ist (90° Flexion in Knie- und Sprunggelenk), zu einer schnelleren und ausgeprägteren Atrophie gegenüber der Neutralposition führt (BAKER und MATSUMOTO, 1988). Demnach sind die funktionelle Länge und die Muskelspannung wichtig für die Aufrechterhaltung der Muskelmasse und der Faserarchitektur.

#### **4.2.3 Hämatoxylin & Eosin-Färbung**

##### **4.2.3.1 Anguläre Fasern, Myophagie, pathologische Kalibervariationen**

Die Ergebnisse der folgenden Kriterien werden einmal für den M. gastrocnemius und den M. soleus gesondert, und zum anderen für beide Muskeln zusammengefasst betrachtet. Das Zusammenfassen der Werte soll die Unterschiede zwischen den operierten und den nicht-operierten Gliedmaßen unabhängig vom jeweiligen Muskel verdeutlichen, ohne dabei die bei den einzelnen Muskeln festgestellten Veränderungen außer Acht zu lassen.

Anguläre Fasern sind am M. gastrocnemius und am M. soleus unabhängig von einer Immobilisation oder Inflammation an beiden Beinen nachweisbar (siehe Tabelle 9 und 10).



Diese einzelnen angulären Fasern sind Ausdruck einer akuten Denervation, wie sie im Rahmen der CIP in Folge der axonalen Degeneration auftritt (ZOCHODNE et al., 1987). Aber auch regenerierte Muskelfasern erscheinen atrophisch, solange noch keine Reinnervation stattgefunden hat (SCHRÖDER, 1982).

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, ist eine Myophagie bei beiden Muskeln beider Beine nachweisbar, mit einer Häufung in der Gruppe C.p./ Immobilisation und am Op-Bein der Gruppe NaCl/ Immobilisation. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Immobilisation einer Gliedmasse vermehrt zu einer Nekrose von Muskelfasern führt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von ZOCHODNE et al. (1994) und LATRONICO et al. (1996) überein, welche in Muskelbiopsien kritisch kranker Patienten Muskelnekrosen nachweisen konnten. Die mit Ausnahme der Gruppe NaCl/ Sham-Immobilisation zu beobachtende Häufung der Myophagie am Op-Bein kann auch durch eine Muskelschwellung infolge des Eingriffs, welche im Rahmen eines Compartment-Syndroms zu einer reduzierten intramuskulären Durchblutung mit folgender ischämischer Nekrose führt, bedingt sein (COAKLEY et al., 1993). Die von RAMSAY et al. (1993) beschriebene „Nekrotisierende Myopathie der Intensivtherapie“, welche durch schwere Muskelnekrosen gekennzeichnet ist, tritt insbesondere nach längerer Gabe nicht-depolarisierender Muskelrelaxantien und hoher Dosen Glukokortikoide auf, was im vorliegenden Versuch nicht der Fall ist.

Allerdings ist ein hoher Kortisolspiegel Kennzeichen des Stresssyndroms bei Patienten mit Multiorganversagen, so dass die endogene Steroidproduktion oder eine Hochregulation der Glukokortikoidrezeptoren mit verantwortlich sein könnte für die Muskelfasernekrosen (ARNOLD et al., 1993; RUFF, 1998).

Das gehäufte Auftreten der Myophagie in der Gruppe C.p./ Immobilisation sowohl am Op- als auch am Non-Op-Bein weist auf eine Addition der lokalen (Immobilisation) und der systemischen (Inflammation) Effekte hin.

Interessanterweise zeigen die eigenen Untersuchungen pathologische Kalibervariationen am M. gastrocnemius sowohl des Op-Beines als auch des Non-Op-Beines unabhängig von einer Immobilisation und Inflammation. Am M. soleus treten pathologische Kalibervariationen weniger häufig auf (siehe Tabelle 10).

#### **4.2.3.2 Muskelfaserdurchmesser**

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit der Faserdurchmesser der Muskeln des Op-Beines kleiner ist als der am Non-Op-Bein (siehe

Tabelle 12 und Abbildung 17). Die nachgewiesene Faseratrophie an der immobilisierten Gliedmaße entspricht den Erwartungen, wonach eine Immobilisation zu einer Inaktivitätsatrophie der Muskelfasern führt. Der Grund ist die Kombination der Immobilisation mit einem hohen Grad an Katabolismus, wie er bei kritisch kranken Patienten vorliegt (NATES et al., 1997). Wie bereits im Rahmen der Muskelgewichte (4.2.2) dargelegt, führt die Immobilisation zu diversen morphologischen Veränderungen. Diese resultieren nicht nur in einer allgemeinen Abnahme der Muskelgewichte, sondern spiegeln sich auch in einer Reduktion des Durchmessers der einzelnen Fasern aller Muskeln der Op-Beine wieder, was letztendlich der Grund für die Reduktion der Muskelgewichte ist.

Die Tatsache, dass auch die Sham-Immobilisation zu einer Atrophie der Muskelfasern führt, ist damit zu erklären, dass der postoperative Schmerz eine Schonung der Gliedmaße im Vergleich zur kontralateralen Seite nach sich zieht. Auch wenn dieser als Reflexatrophie bezeichnete Zustand laut IBEBUNJO und MARTYN (1999) nur ein temporäres Phänomen ist (siehe unter 4.2.2), dürfte er die Erklärung für die Faseratrophie am sham-immobilisierten Bein sein. Laut ihren Untersuchungen führt die Sham-Immobilisation nur zu einer minimalen Atrophie (2% bis 11%) im Vergleich mit den kontralateralen Kontrollmuskeln. Dieses Ergebnis stimmt weitestgehend mit den eigenen Resultaten überein.

Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, hat die C.p.-Injektion einen systemischen Einfluss auf den Muskelfaserdurchmesser. So sind die Fasern beider Muskeln des Op- und des Non-Op-Beines der Gruppe C.p./ Sham-Immobilisation signifikant kleiner als die entsprechenden Muskeln der Gruppe NaCl/ Sham-Immobilisation. Wie schon unter 4.2.2 erläutert könnte die Faseratrophie bei den C.p.-Tieren die Folge einer entzündungsbedingten Proteolyse kontraktiler Proteine sein. Dieser Effekt könnte aber auch durch die CIP bedingt sein, die durch die axonale Degeneration zu einer Denervationsatrophie führt (BOLTON et al., 1984).

#### **4.2.3.3 Anzahl der Entzündungszellen**

Erwartungsgemäß zeigen die eigenen Untersuchungen eine deutlich höhere Anzahl an Entzündungszellen in den Muskeln der C.p.-Tiere als in denen der NaCl-Tiere. Wie aus Tabelle 14 ersichtlich, ist dieser Anstieg bei den C.p.-Tieren sowohl in der Immobilisations- als auch in der Sham-Immobilisationsgruppe signifikant im Vergleich zu den entsprechenden NaCl-Tieren. Daraus folgt, dass die systemische Inflammation zu Myositis-ähnlichen Veränderungen im Muskel führt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von DE LETTER et al. (2000) überein, welche in Muskelbiopsien von Patienten mit einer CIPM

sowohl perivaskulär gelegene Entzündungszellinfiltrate als auch einzeln im Endomysium verstreute Entzündungszellen nachweisen konnten, welche sie aufgrund immunhistopathologischer Untersuchungen als Makrophagen und T-Helferzellen identifizierten.

Desweiteren liegt ein signifikanter Anstieg der Entzündungszellen am Op-Bein der Gruppe C.p./ Immobilisation vor, verglichen mit der Gruppe C.p./ Sham-Immobilisation (siehe Tabelle 14). Trotz Einhalten steriler Operationsbedingungen beim Einführen der Kirschnerdrähte in die Knochen stellt das Metall einen Fremdkörper dar, auf welchen der Organismus mit einer lokalen Entzündungsreaktion antwortet. Dementsprechend sind diese lokalen Prozesse im Sinne einer vermehrten Ansammlung von Entzündungszellen in den Muskeln der Gliedmassen, in denen die Drähte 12 Tage verweilten (Immobilisation) stärker ausgeprägt als in den Muskeln der Gruppe Sham-Immobilisation, bei denen zum einen die Drähte sofort nach dem Einbringen wieder entfernt wurden, zum anderen der Organismus 12 Tage Zeit hatte die lokale, operationsbedingte Entzündungsreaktion erfolgreich zu bekämpfen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass durch die Immobilisation die Durchblutung im ruhiggestellten Bein herabgesetzt ist, was die Aktivierung der lokalen Immunantwort behindern könnte.

#### **4.2.3.4 Breite des endomysialen Bindegewebes**

Wie in Tabelle 15 ersichtlich, führt die Immobilisation zu einer signifikanten Verbreiterung des endomysialen Bindegewebes am M. gastrocnemius des Op-Beines sowohl in der C.p.- als auch in der NaCl-Gruppe. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von JÄRVINEN et al. (2002) überein, welche nach einer dreiwöchigen Immobilisation eine deutliche Zunahme des endo- und perimysialen Bindegewebes beobachten konnten.

In dieser Arbeit wird nur die Breite des endomysialen Bindegewebes bestimmt, da die Ergebnisse auf das Perimysium übertragbar sind (JÄRVINEN et al., 2002)

#### **4.2.4 Periodic-acid-Schiff-Reaktion**

##### **4.2.4.1 Muskelfasertypengruppierung**

Die vorliegenden Untersuchungen ergeben eine Häufung einer Muskelfasertypengruppierung am M. gastrocnemius der immobilisierten Gliedmaße unabhängig von einer C.p.-Injektion (siehe Tabellen 17 und 18 und Abbildung 22). Der naheliegendste Grund dafür ist die nach einer Denervation, wie sie im Rahmen der CIPM auftritt, einsetzende Reinnervation der Muskelfasern. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Untersuchungen von COAKLEY et

al. (1992), welche Zeichen einer neurogenen Atrophie mit Reinnervation bei Patienten schon nach mindestens 7-tägigem Aufenthalt auf der Intensivstation nachwiesen.

#### **4.2.4.2 Verhältnis von Typ I- zu Typ II-Muskelfasern**

Wie aus Tabelle 19 ersichtlich ergaben die eigenen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Verhältnisses der Typ I-Fasern zu den Typ II-Fasern zwischen den einzelnen Gruppen. Das entspricht den Ergebnissen von IBEBUNJO und MARTYN (1999), welche in Bezug auf die Muskelfasertypen ein ähnliches Verhältnis am kontralateralen Kontrollmuskel des immobilisierten M. tibialis nachwiesen.

#### **4.2.5 Gesamtprojekt und abschließende Betrachtung**

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Studie, welche außer den beschriebenen histopathologischen Veränderungen am Muskel auch die Auswirkungen der Immobilisation und der systemischen Inflammation auf die Muskelkraft untersucht. Dabei wurde eine Abnahme der maximalen Einzelkontraktionskraft und der maximalen tetanischen Kraft des Op-Beines sowohl nach Immobilisation als auch nach alleiniger Inflammation beobachtet. Die Kombination beider Faktoren reduzierte die Kontraktionskräfte am Op-Bein und am Non-Op-Bein weiter, so dass ein additiver Effekt festgestellt werden kann (UNTERBUCHNER, 2006).

Desweiteren sind die Effekte von Immobilisation und Inflammation auf die Azetylcholinrezeptor-Expression und die Pharmakodynamik von Succinylcholin Teil des Gesamtprojektes. Die chronische systemische Inflammation allein kann eine Hochregulierung der Azetylcholinrezeptoren auslösen. Die Immobilisation führt zu signifikant verringerten Effektivitätsdosen verglichen mit den entsprechenden sham-immobilisierten Gruppen als Ausdruck einer Sensibilisierung gegenüber Succinylcholin durch eine Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren. Die Kombination von Immobilisation und Inflammation hatte keinen zusätzlichen Effekt (HELMING 2005).

Zudem gibt es eine Folgestudie, welche an die Phase der Immobilisation und Inflammation eine Rekonvaleszenzphase anschließt. Dazu werden die Kirschnerdrähte entfernt und die repetitiven C.p.-Gaben eingestellt. Am 4., 12. und 36. Tag der Rekonvaleszenzzeit werden die gleichen Untersuchungen wie in der vorliegenden Studie durchgeführt (BUSCH, 2007; BUYAR, in Vorbereitung).

Dabei zeigt sich, dass auch am Tag 36 der Erholungsphase noch ein signifikant niedrigeres Gewicht des M. gastrocnemius des Op-Beines der Gruppe C.p./ Immobilisation nachweisbar ist, so dass die Immobilisation als Hauptgrund für die verzögerte Erholung der Muskel-

atrophie anzusehen ist. Atrophische Muskelfasern sind am Op-Bein bei beiden Immobilisations-Gruppen noch am Tag 36 der Rekonvaleszenz nachweisbar, im Gegensatz zu den entsprechenden Sham-Immobilisations-Gruppen. Auch die Muskelfaserdurchmesser am Op-Bein bleiben bei den Immobilisations-Gruppen bis zum Tag 36 deutlich verkleinert. Nach ca. einer Woche nehmen die Regenerationsprozesse zu, was sich im vermehrten Auftreten von unreifen Fasern mit zentralen Kernen, der verringerten Anzahl an atrophischen Fasern und der langsamen Zunahme des stark reduzierten Faserdurchmessers äußert. Allerdings ist die Regeneration nach 36 Tagen Erholung in Bezug auf das Muskelgewicht und auf histologischer Ebene noch nicht abgeschlossen (BUSCH, 2007).

Auch bezüglich der muskulären Kraft ist die Erholungsphase bei den immobilisierten Tieren verlängert. Sie zeigen auch am Tag 36 der Rekonvaleszenz noch muskuläre Defizite (BUYAR, in Vorbereitung).

Mit der vorliegenden Studie konnte ein „double-hit“ Modell, welches sowohl die Einflüsse einer Immobilisation als auch einer systemischen Inflammation auf die Entwicklung einer CIPM untersucht, etabliert werden. In Kombination mit der Folgearbeit von BUSCH (2007) und BUYAR (in Vorbereitung) konnten Ergebnisse erzielt werden, die mit den klinischen Verhältnissen beim Menschen durchaus vergleichbar sind, und die auch nach Jahren noch anhaltenden Defizite erklären.

## 5. Zusammenfassung

### **„Histopathologische Veränderungen am Skelettmuskel nach chronischer Inflammation mit Corynebakterium parvum mit und ohne Immobilisation – Experimentelle Untersuchungen an der Ratte“**

95% der Menschen mit einer intensivmedizinischen Therapie von mehr als 28 Tagen haben 5 Jahre nach der Entlassung aus der Intensivstation neuromuskuläre Defizite. Systemische Inflammation und Immobilisation sind zwei Hauptfaktoren in der Pathogenese dieser sogenannten Critical Illness Polyneuromyopathie (CIPM). Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Auswirkungen dieser beiden Faktoren alleine und in Kombination auf die Morphologie der Skelettmuskulatur zu untersuchen.

53 männliche Sprague-Dawley Ratten erhielten an den Tagen 0, 4, und 8 je eine intravenöse Injektion von entweder Corynebakterium parvum (C.p.) oder physiologischer Kochsalzlösung (NaCl). Die Gruppen wurden weiter unterteilt, um eine Hintergliedmaße (Op-Bein) entweder mit einem Kirschner-Draht zu immobilisieren (Immobilisation), oder diesen wieder zu entfernen und die Gliedmaße nach der Operation mobil zu lassen (Sham-Immobilisation). Das entsprechende kontralaterale Bein diente als Kontrolle (Non-Op-Bein). Am Tag 12 wurden die Tiere euthanasiert, die Muskel- und Lebergewichte bestimmt und aus dem Serum das Akute-Phase-Protein  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein bestimmt. Ein Bauch des M. gastrocnemius und der M. soleus beider Hintergliedmaßen wurden histologisch untersucht.

11 Ratten starben nach der Bakterieninjektion, bei 2 Tieren war die Immobilisation instabil. Die Tiere mit der systemischen Inflammation (C.p.-Tiere) wiesen gegenüber den NaCl-Tieren einen Gewichtsverlust, einen Abfall des Hämoglobinwertes und eine Reduktion der Erythrozyten und der Thrombozyten auf. Desweiteren waren bei den C.p.-Tieren der Methämoglobinspiegel, das absolute und relative Lebergewicht und das Akute-Phase-Protein  $\alpha_1$ -AGP im Vergleich zu den NaCl-Tieren erhöht. Die Gewichte der Muskeln des Op-Beines waren bei allen Gruppen reduziert verglichen mit denen des Non-Op-Beines. Myophagie trat gehäuft an beiden Hintergliedmaßen der Gruppe C.p./ Immobilisation auf. Der Muskelfaserdurchmesser ist an der immobilisierten Gliedmaße reduziert, sowohl im Vergleich zur sham-immobilisierten Gliedmaße als auch zur kontralateralen Seite. Die C.p.-Injektion führte zu einem Anstieg der Entzündungszellen in allen Muskeln verglichen mit den NaCl-Tieren. Am M. gastrocnemius des Op-Beines liegt eine Verbreiterung des endomysialen

Bindegewebes bei den immobilisierten Tieren verglichen mit den sham-immobilisierten Tieren vor. Eine Muskelfasertypengruppierung tritt gehäuft an den Muskeln der immobilisierten Gliedmaßen auf. Unterschiede hinsichtlich der Fasertypenkomposition sind zwischen den Gruppen nicht nachweisbar.

Die klinischen Symptome der Critical Illness Polyneuromyopathie konnten im vorliegenden Modell dargestellt werden. Die Kombination von Immobilisation und systemischer Inflammation hat einen additiven Effekt auf die histologischen Parameter der untersuchten Muskeln. Die nachgewiesene Myositis identifiziert die Inflammation als einen Hauptfaktor in der Pathogenese der Critical Illness Polyneuromyopathie.

## 6. Summary

### **„Histopathological changes on skeletal muscle after chronic inflammation with *Corynebacterium parvum* with and without immobilisation – experimental studies on rats”**

95% of human patients with an intensive care of more than 28 days show neuromuscular deficits 5 years after discharge from intensive care unit. Systemic inflammation and immobilisation are main factors in the pathogenesis of Critical Illness Polyneuromyopathy (CIPM). This study should show the effects of the both factors alone and in combination on muscle morphology.

53 male Sprague-Dawley rats received an intravenous injection of *Corynebacterium parvum* (C.p.) or saline on days 0, 4 and 8. The groups were further divided into one hind limb immobilized (surgery-leg) using a Kirschner wire (immobilisation), or to remove the wire to keep the hind limb mobile (sham-immobilisation). The respective contralateral leg served as control (non-surgery-leg). On day 12 the animals were painless killed, the body weight, the liver weight and the serum  $\alpha_1$ -acid glycoprotein were determined. One venter of the musculus gastrocnemius and the musculus soleus of both hind limbs were histologically examined.

11 rats died following injection of C.p., 2 animals had an instable immobilisation. The animals with a systemic inflammation (C.p.-animals) showed a loss of body weight, a decrease of haemoglobin, erythrocytes and thrombocytes. Furthermore the C.p.-animals had an increased methaemoglobin, absolute and relative liver weight and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, compared with the NaCl-animals. The muscle weights of Op-leg were reduced in all groups compared with non-Op-leg. Myophagy appeared frequently on both hind limbs of the group C.p./ immobilisation. The fiber cross-sectional area is decreased on immobilized hind limb compared with the sham-immobilized hind limb and the contralateral leg. The C.p.-injection leads to an increase of the inflammatory cells in all muscles compared with the NaCl-animals. The musculus gastrocnemius of the immobilized legs shows an increase of endomysial connective tissue compared with sham-immobilized legs. A fiber-type grouping appears frequently on the muscles of the immobilized legs. Differences of the fiber-type composition are not provable between the groups.



This model represents the clinical signs of Critical Illness Polyneuromyopathy (CIPM). Immobilisation in combination with systemic inflammation had an additive effect in terms of the histopathological parameters of the investigated muscles. The proved myositis identifies the inflammation as a main factor in the pathogenesis of CIPM.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
$\alpha_1$ -AGP:	$\alpha_1$ -saures Glykoprotein
ATPase:	Adenosintriphosphatase
BGA:	Blutgasanalyse
CIM:	Critical Illness Myopathy
CIP:	Critical Illness Polyneuropathy
CIPM:	Critical Illness Polyneuromyopathy
CK:	Kreatinkinase
dl:	Deziliter
Hb:	Hämoglobin
HE:	Hämatoxylin & Eosin
IFN $\gamma$ :	Interferon $\gamma$
IL:	Interleukin
KM:	Körpermasse
kPa:	Kilopascal
LPS:	Lipopolysaccharid
MAP:	mittlerer arterieller Blutdruck
M.:	Musculus
Mm.:	Musculi
mmHg:	Millimeter Quecksilbersäule
min:	Minute
ml:	Milliliter
$\mu$ l:	Mikroliter
MetHb:	Methämoglobin
NADH:	Niacinamid-Adenin-Dinucleotid
non-Op-Bein:	nicht operiertes Bein
Op-Bein:	operiertes Bein
paCO <sub>2</sub> :	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAS:	Periodic-acid-Schiff-Reaktion
SAP:	systolischer arterieller Blutdruck
SIRS:	Systemic Inflammatory Response Syndrom

TNF  $\alpha$ :

Tumornekrosefaktor  $\alpha$

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Mittelwerte und Standardabweichungen des durchschnittlichen täglichen Körpergewichts.....	44
Tabelle 2:	Absolutes und relatives Lebergewicht.....	46
Tabelle 3:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Hämoglobinwerte.....	47
Tabelle 4:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Methämoglobinwerte.....	48
Tabelle 5:	Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten und $\alpha_1$ -saures Glykoprotein am Tag 12.....	50
Tabelle 6:	Mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Blutglukose.....	50
Tabelle 7:	Muskelgewichte des Op-Beines und des non-Op-Beines in Gramm.....	52
Tabelle 8:	Muskelgewichtsverluste des Op-Beines gegenüber dem non-Op-Bein in %.....	53
Tabelle 9:	Anteil von Muskeln am Op-Bein bzw. non-Op-Bein mit pathologischen Kalibervariationen, Myophagie und angulären Fasern innerhalb einer Subgruppe.....	55
Tabelle 10:	Anteil von Muskeln mit pathologischen Kalibervariationen, Myophagie und angulären Fasern von M. gastrocnemius und M. soleus zusammengefasst.....	56
Tabelle 11:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Muskelfaserdurchmesser.....	60
Tabelle 12:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Muskelfaserdurchmesser von M. gastrocnemius und M. soleus zusammengefasst.....	60
Tabelle 13:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Entzündungszellen pro Gesichtsfeld.....	63
Tabelle 14:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Entzündungszellen pro Gesichtsfeld von M. gastrocnemius und M. soleus zusammengefasst.....	63
Tabelle 15:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Breite des endomysialen Bindegewebes in $\mu\text{m}$ .....	66
Tabelle 16:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Breite des endomysialen Bindegewebes in $\mu\text{m}$ für den M. gastrocnemius und den M. soleus zusammengefasst.....	66

Tabelle 17:	Anteil an Muskeln mit einer Muskelfasertypengruppierung innerhalb einer Subgruppe.....	68
Tabelle 18:	Anteil an Muskeln mit einer Muskelfasertypengruppierung innerhalb einer Subgruppe für den M. gastrocnemius und den M. soleus zusammengefasst.....	68
Tabelle 19:	Prozentualer Anteil von Typ I-Fasern an der Gesamtmuskelfaserzahl beim M. gastrocnemius.....	70

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neurologische Komplikationen der Sepsis in der Reihenfolge ihres Auftretens.....	19
Abbildung 2: Ätiologie des SIRS und neuromuskuläre Komplikationen.....	25
Abbildung 3: Gruppenbildung Immobilisation und Sham-Immobilisation.....	29
Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf von Immobilisation, Injektion, Muskelkraftmessung und Muskelgewebsuntersuchung.....	30
Abbildung 5: Gruppenbildung.....	31
Abbildung 6: Aspiration venösen Blutes zur Bestimmung des Methämoglobinwertes aus der Vena dorsalis penis.....	34
Abbildung 7: Versuchstier in der Kopfkammer.....	35
Abbildung 8: Immobilisation des Kniegelenks mit einem Kirschner-Draht.....	36
Abbildung 9: Körpergewicht der Versuchstiere im Verlauf der systemischen Inflammation.....	45
Abbildung 10: Hb-Entwicklung im Verlauf der systemischen Inflammation.....	47
Abbildung 11: MetHb-Verlauf als Entzündungsparameter.....	49
Abbildung 12: Vergleichende graphische Darstellung des Anteils der Muskeln mit Myophagie.....	57
Abbildung 13: Vergleichende graphische Darstellung des Anteils der Muskeln mit angulären Fasern.....	57
Abbildung 14: pathologische Kalibervariationen; M gastrocnemius des Op-Beines; Gruppe C.p./ Sham-Immobilisation; PAS 100 x.....	58
Abbildung 15: Myophagie; M. gastrocnemius des Op-Beines; Gruppe NaCl/ Immobilisation; HE 200 x.....	58
Abbildung 16: Anguläre Fasern; M. gastrocnemius des Op-Beines; Gruppe NaCl/ Immobilisation; HE 400 x.....	59
Abbildung 17: Vergleichende graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Muskelfaserdurchmesser.....	61
Abbildung 18: Faseratrophien und entzündliche Infiltrate; M. gastrocnemius des Op-Beines; Gruppe C.p./ Sham-Immobilisation; HE 100 x.....	62

Abbildung 19: Vergleichende graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Entzündungszellen.....	64
Abbildung 20: Entzündungszellinfiltrate und Myophagie; M gastrocnemius des non-Op-Beines; Gruppe C.p./ Immobilisation; HE 100 x.....	65
Abbildung 21: Muskelfaserdegeneration mit Spaltenbildung, Entzündungs- zellinfiltrate; M. gastrocnemius des Op-Beines; Gruppe C.p./ Immobilisation; HE 200 x.....	67
Abbildung 22: Vergleichende graphische Darstellung des Anteils an Muskeln mit einer Muskelfasertypengruppierung.....	69
Abbildung 23: Fasertypengruppierung; M. soleus des Op-Beines; Gruppe C.p./ Sham-Immobilisation; PAS 100 x.....	69

## 10. Literaturverzeichnis

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis

Crit Care Med 1992; 20:864-74

ANGUS DC, LINDE-ZWIRBLE WT, LIDICKER J, CLERMONT G, CARCILLO J, PINSKY MR

Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care

Crit Care Med 2001; 29:1303-10

ARIANO M, ARMSTRONG R, EDGERTON V

Hindlimb muscle fiber populations of five mammals.

J Histochem Cytochem 1973; 21:51-5

ARNOLD J, CAMPBELL IT, SAMUELS TA

Increased whole body protein breakdown predominates over increased whole body protein synthesis in multiple organ failure

Clin Sci 1993; 84:655-61

BAKER JH, MATSUMOTO DE

Adaptation of skeletal muscle to immobilization in a shortened position

Muscle Nerve 1988; 11:231-44

BAUER M

[The physiopathology of sepsis. Current concepts]

Anaesthesist 1996; 45:312-22

BAUMGARTNER J, GLAUSER M, MCCUTCHAN J, ZIEGLER E, VAN MELLE G, KLAUBER M, VOGT M, MUEHLEN E, LUETHY R, CHIOLERO R

Prevention of gram-negative shock and death in surgical patients by antibody to endotoxin core glycolipid.

Lancet 1985; 13:59-63

BIRD SJ, RICH MM

Critical illness myopathy and polyneuropathy

Curr Neurol Neurosci Rep 2002; 2:527-33

BOLTON CF

Neuromuscular manifestations of critical illness muscle and nerve 2005; 32:140-63

BOLTON CF

Electrophysiologic studies of critically ill patients muscle Nerve 1987; 10:129-35



- BOLTON CF  
Neuromuscular abnormalities in critically ill patients  
Intensive Care Med 1993a; 19:309-10
- BOLTON CF  
Neuromuscular complications of sepsis  
Intensive Care Med 1993b; 19 Suppl 2:S58-63
- BOLTON CF, YOUNG GB, ZOCHODNE DW  
The neurological complications of sepsis  
Ann Neurol 1993c; 33:94-100
- BOLTON CF  
Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: neuromuscular manifestations  
Crit Care Med 1996; 24:1408-16
- BOLTON CF  
Critical illness polyneuropathy and myopathy  
Crit Care Med 2001; 29:2388-90
- BOLTON CF, GILBERT JJ, HAHN AF, SIBBALD WJ  
Polyneuropathy in critically ill patients  
J Neurol Neurosurg Psychiatry 1984; 47:1223-31
- BOLTON CF, LAVERTY DA, BROWN JD, WITT NJ, HAHN AF, SIBBALD WJ  
Critically ill polyneuropathy: electrophysiological studies and differentiation from Guillain-Barre syndrome  
J Neurol Neurosurg Psychiatry 1986; 49:563-73
- BONE R, BALK R, FEIN A, PERL T, WENZEL R, REINES H, QUENZER R, IBERTI T, MACINTYRE N, SCHEIN R  
A second large controlled clinical study of E5, a monoclonal antibody to endotoxin: results of a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. The E5 Sepsis Study Group.  
Crit Care Med 1995; 23:994-1006
- BONE RC  
Sepsis syndrome. New insights into its pathogenesis and treatment  
Infect Dis Clin North Am 1991; 5:793-805
- BONE RC, FISHER CJ, JR., CLEMMER TP, SLOTMAN GJ, METZ CA, BALK RA  
Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group  
Crit Care Med 1989; 17:389-93
- BOOTH FW  
Time course of muscular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats  
J Appl Physiol 1977; 43:656-61

BOOTH FW

Regrowth of atrophied skeletal muscle in adult rats after ending immobilization.  
J Appl Physiol 1978; 44:225-30

BREUILLE D, VOISIN L, CONTREPOIS M, ARNAL M, ROSE F, OBLED C

A sustained rat model for studying the long-lasting catabolic state of sepsis  
Infect Immun 1999; 67:1079-85

BUSCH F

Histopathologische Veränderungen im Muskelgewebe während der Erholungsphase nach Immobilisation und systemischer Inflammation im Rattenmodell  
Vet Med Dis München, 2007

BUYAR S

Muskelfunktion in der Erholungsphase nach Critical Illness Myopathie- der Effekt von Immobilisation und Inflammation anhand eines Rattenmodells  
Med Dis TU München, in Vorbereitung

CARDENAS DD, STOLOV WC, HARDY R

Muscle fiber number in immobilization atrophy  
Arch Phys Med Rehabil 1977; 58:423-6

CHAD D, LACOMIS D

Critically ill patients with newly acquired weakness: the clinicopathological spectrum.  
Ann Neurol 1994; 35:257-9

COAKLEY JH, NAGENDRAN K, HONAVAR M, HINDS CJ

Preliminary observations on the neuromuscular abnormalities in patients with organ failure and sepsis  
Intensive Care Med 1993; 19:323-8

COAKLEY JH, NAGENDRAN K, ORMEROD IE, FERGUSON CN, HINDS CJ

Prolonged neurogenic weakness in patients requiring mechanical ventilation for acute airflow limitation  
Chest 1992; 101:1413-6

COONEY R, KIMBALL S, VARY T

Regulation of skeletal muscle protein turnover during sepsis: mechanisms and mediators  
Shock 1997; 7:1-16

DE JONGHE B, SHARSHAR T, LEFAUCHEUR JP, AUTHIER FJ, DURAND-ZALESKI I, BOUSSARSAR M, CERF C, RENAUD E, MESRATI F, CARLET J, RAPHAEL JC, OUTIN H, BASTUJI-GARIN S

Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study  
JAMA. 2002; 288:2859-67

DE LETTER MA, SCHMITZ PI, VISSER LH, VERHEUL FA, SCHELLENS RL, OP DE COUL DA, VAN DER MECHE FG

Risk factors for the development of polyneuropathy and myopathy in critically ill patients  
Crit Care Med 2001; 29:2281-6

DE LETTER MA, VAN DOORN PA, SAVELKOUL HF, LAMAN JD, SCHMITZ PI, OP DE COUL AA, VISSER LH, KROS JM, TEEPEN JL, VAN DER MECHE FG  
Critical illness polyneuropathy and myopathy (CIPNM): evidence for local immune activation by cytokine-expression in the muscle tissue  
J Neuroimmunol 2000; 106:206-13

DEITCH EA  
Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy.  
Ann Surg 1992; 216:117-34

DI GIOVANNI S, MOLON A, BROCCOLINI A, MELCON G, MIRABELLA M, HOFFMAN EP, SERVIDEI S  
Constitutive activation of MAPK cascade in acute quadriplegic myopathy  
Ann Neurol 2004; 55:195-206

DUBOIS D, ALMON R  
A possible role for glucocorticoids in denervation atrophy  
Muscle Nerve 1981; 4:370-3

DYCK P  
Hypoxic neuropathy: does hypoxia play a role in diabetic neuropathy? The 1988 Robert Wartenberg lecture.  
Neurology 1989; 39:111-8

EL-DWAIRI Q, COMTOIS A, GUO Y, HUSSAIN SN  
Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases  
Am J Physiol 1998; 274:C770-9

ELLMANN H  
Capillary permeability in septic patients  
Crit Care Med 1984; 12:629-33

ENGEL WK, MELTZER H  
Histochemical abnormalities of skeletal muscle in patients with acute psychoses  
Science 1970; 168:273-6

FARAGHER M, DAY B, DENNETT X  
Critical care myopathy: an electrophysiological and histological study.  
Muscle Nerve 1996; 19:516-8

FARQUHAR D, BENVENUTO JA, KUTTESCH N, LI LOO T  
Inhibition of hepatic drug metabolism in the rat after corynebacterium parvum treatment  
Biochem Pharmacol 1983; 32:1275 -80

FINK H, LUPPA P, MAYER B, ROSENBROCK H, METZGER J, MARTYN JA, BLOBNER M  
Systemic inflammation leads to resistance to atracurium without increasing membrane expression of acetylcholine receptors  
Anesthesiology 2003; 98:82-8

FLECK A, RAINES G, HAWKER F, TROTTER J, WALLACE PI, LEDINGHAM IM, CALMAN KC  
Increased vascular permeability: a major cause of hypoalbuminaemia in disease and injury  
Lancet 1985; 6:781-4

FLETCHER S, KENNEDY D, GHOSH I, MISRA V, KIFF K, COAKLEY G, HINDS CJ  
Persistent neuromuscular and neurophysiological abnormalities in long term survivors of prolonged critical illness  
Crit Care Med 2003; 31:1012-6

GLAUSER MP, ZANETTI G, BAUMGARTNER JD, COHEN J  
Septic shock: pathogenesis  
Lancet 1991; 338:732-6

GUMP F, LONG C, KILLIAN P, KINNEY J  
Studies of glucose intolerance in septic injured patients  
J Trauma 1974; 14:378-88.

HALL-CRAGGS ECB  
The significance of longitudinal fibre division in skeletal muscle  
J Neurol Sci 1972:27 - 33

HANSON P, DIVE A, BRUCHER J, BISTEAU M, DANGOISSE M, DELTOMBE T  
Acute corticosteroid myopathy in intensive care patients  
Muscle Nerve 1997; 20:1371-80

HASSELGREN P, FISCHER J  
The ubiquitin-proteasome pathway: review of a novel intracellular mechanism of muscle protein breakdown during sepsis and other catabolic conditions  
Ann Surg 1997; 225:307-16

HELMING M  
Effekte von Immobilisation und Inflammation auf die Acetylcholinrezeptor-Expression und die Pharmakodynamik von Succinylcholin im Rattenmodell  
Med Dis TU München 2005

HERBISON GJ, JAWEED MM, DITUNNO JF  
Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat  
Arch Phys Med Rehabil 1978; 59:301-5

HINDER F, LUDEMANN P, HINDER S, RINGELSTEIN EB, VAN AKEN H  
[Prolonged muscle weakness in intensive care patients with special attention to the so-called intensive care polyneuromyopathy]  
Anaesthesist 1997; 46:211-9

HUND E  
Myopathy in critically ill patients  
Crit Care Med 1999; 27:2544-7

HUND E

Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy  
J Neurol 2001; 248:929-34

HUND E

Critical-Illness-Polyneuropathie und -Myopathie  
Intensivmed 2003; 40:203-11

IBEBUNJO C, MARTYN JA

Fiber atrophy, but not changes in acetylcholine receptor expression, contributes to the muscle dysfunction after immobilization  
Crit Care Med 1999; 27:275-85

IBEBUNJO C, NOSEK MT, ITANI MS, MARTYN JA

Mechanisms for the paradoxical resistance to d-tubocurarine during immobilization-induced muscle atrophy  
J Pharmacol Exp Ther 1997; 283:443-51

JAFFE DM, TERRY RD, SPIRO AJ

Disuse atrophy of skeletal muscle. A morphometric study using image analysis  
J neurol Sei 1978; 35:189-200

JÄRVINEN TA, JOZSA L, KANNUS P, JÄRVINEN TL, M. J

Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study  
J Muscle Res Cell Motil 2002; 23:245-54

JASPERS SR, FAGAN JM, SATARUG S, COOK PH, TISCHLER ME

Effects of immobilization on rat hind limb muscles under non-weight-bearing conditions  
Muscle Nerve 1988; 11:458-66

KIEFT H, HOEPELMAN AI, ZHOU W, ROZENBERG-ARSKA M, STRUYVENBERG A, VERHOEF J

The sepsis syndrome in a Dutch university hospital. Clinical observations  
Arch Intern Med 1993; 153:2241-7

KREYMANN G, WOLF M

[History and definition of sepsis--do we need new terminology?]  
Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1996; 31:9-14

LACOMIS D

Critical illness myopathy  
Curr Rheumatol Rep 2002; 4:403-8

LACOMIS D, GIULIANI M, VAN COTT A, KRAMER D

Acute myopathy of intensive care: clinical, electromyographic, and pathological aspects  
Ann Neurol 1996; 40:645-54

LATRONICO N, FENZI F, RECUPERO D, GUARNERI B, TOMELLERI G, TONIN P, DE MARIA G, ANTONINI L, RIZZUTO N, CANDIANI A  
Critical illness myopathy and neuropathy  
Lancet 1996; 347:1579-82

LEIJTEN FS, DE WEERD AW, POORTVLIET DC, DE RIDDER VA, ULRICH C, HARINK-DE WEERD JE  
Critical illness polyneuropathy in multiple organ dysfunction syndrome and weaning from the ventilator  
Intensive Care Med 1996; 22:856-61

LEVY H, ASH S, KNAB W, STECZKO J, CARR D, BLAKE D  
Systemic inflammatory response syndrome treatment by powdered sorbent pheresis: the BioLogic-Detoxification Plasma Filtration System  
ASAIO J 1998; 44:M659-65

LIEBICH H-G  
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Schattauer  
Stuttgart New York 1993; 77-81

LINDNER A, ZIERZ, S.  
Auswirkungen der Sepsis auf das Nervensystem:  
Pathophysiologie, Klinik, Prophylaxe und Therapie der Critical-Illness-Encephalopathie, -  
Neuropathie und -Myopathie  
In: SCHUSTER H.-P., WERDAN K (Hrsg): Intensivtherapie bei Sepsis und  
Multiorganversagen;  
3. Edition. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag 2000;455-469

MASSA R, CARPENTER S, HOLLAND P, KARPATI G  
Loss and renewal of thick myofilaments in glucocorticoid-treated rat soleus after denervation and reinnervation.  
Muscle Nerve 1992; 15:1290-8

MCLAUCHLAN GJ, ANDERSON ID, GRANT IS, FEARON KC  
Outcome of patients with abdominal sepsis treated in an intensive care unit  
Br J Surg 1995; 82:524-9

NATES JL, COOPER DJ, DAY B, TUXEN DV  
Acute weakness syndromes in critically ill patients--a reappraisal  
Anaesth Intensive Care 1997; 25:502-13

NEUGEBAUER E, DIMMELER S, TROIDL H  
Mediatorensysteme und Sepsis  
Chirurg 1995; 66:2-10

OP DE COUL AA, VERHEUL GA, LEYTEN AC, SCHELLENS RL, TEEPEN JL  
Critical illness polyneuromyopathy after artificial respiration  
Clin Neurol Neurosurg 1991; 93:27-33

PITTET D, RANGEL-FRAUSTO S, LI N, TARARA D, COSTIGAN M, REMPE L, JEBSON P, WENZEL R  
Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients.  
Intensive Care Med 1995; 21:302-9

RADELL PJ, REMAHL S, NICHOLS DG, ERIKSSON LI  
Effects of prolonged mechanical ventilation and inactivity on piglet diaphragm function  
Intensive Care Med 2002; 28:358-64

RAMSAY D, ZOCHODNE D, ROBERTSON D, NAG S, LUDWIN S  
A syndrome of acute severe muscle necrosis in intensive care unit patients.  
J Neuropathol Exp Neurol 1993; 52:387-98

RICH MM, PINTER MJ, KRANER SD, BARCHI RL  
Loss of electrical excitability in an animal model of acute quadriplegic myopathy  
Ann Neurol 1998; 43:171-9

RICH MM, TEENER JW, RAPS EC, SCHOTLAND DL, BIRD SJ  
Muscle is electrically inexcitable in acute quadriplegic myopathy  
Neurology 1996; 46:731-6

RIEDE U-N, SCHÄFER H-E, WEHNER H  
Allgemeine und spezielle Pathologie  
3 Edition. Stuttgart, New York: Georg Thieme,1995; 1096-1112

ROMEIS B  
Mikroskopische Technik. München; Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg,1989; 215-236; 393-416

RUFF RL  
Why do ICU patients become paralyzed?  
Ann Neurol 1998; 43:154-5

RUFF RL, SECRIST D  
Inhibitors of prostaglandin synthesis or cathepsin B prevent muscle wasting due to sepsis in the rat  
J Clin Invest 1984; 73:1483-6

SANDS KE, BATES DW, LANKEN PN, GRAMAN PS, HIBBERD PL, KAHN KL, PARSONNET J, PANZER R, ORAV EJ, SNYDMAN DR  
Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group  
Jama 1997; 278:234-40

SCHLAG G, REDL H  
Endothelium as the interface between blood and organ in the evolution of organ failure  
In: SCHLAG G, REDL H, SIEGEL J H (Hrsg.)  
Shock,sepsis and organ failure  
Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1993;210-276

SCHMALBRUCH H

Contracture knots in normal and diseased muscle fibres  
Brain 1973:637-40

SCHMALBRUCH H

Segmental fibre breakdown and defects of the plasmalemma in diseased human muscles.  
Acta Neuropathol 1975; 8; 33:129-41

SCHOTTMÜLLER H

Wesen und Behandlung der Sepsis  
Verh Dtsch Ges Inn Med 1914; 31:257

SCHRÖDER J-M

Pathologie der Muskulatur. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1982; 6-7;  
29-56; 131-139; 385-387

SCHUSTER HP

Studien zur Sepsistherapie - Ende oder Neubeginn einer Ära?  
Intensivmed 1996; 33:157-9

SHOWALTER C, ENGEL A

Acute quadriplegic myopathy: analysis of myosin isoforms and evidence for calpain-mediated proteolysis  
Muscle Nerve 1997; 20:316-22

SPENCER PS, SCHAUMBURG HH

Experimental models of primary axonal disease induced by toxic chemicals  
In: DYCK PJ, THOMAS PK, LAMBERT EH, BUNGE R eds.: Peripheral neuropathy. Vol 1  
Philadelphia: WB Saunders 1984:636-649

STARK M, SZURSZEWSKI J

Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease  
Gastroenterology 1992; 103:1928-49

STIBLER H, EDSTROM L, AHLBECK K, REMAHL S, ANSVED T

Electrophoretic determination of the myosin/actin ratio in the diagnosis of critical illness myopathy  
Intensive Care Med 2003; 29:1515-27

SWASH M, SCHWARTZ MS, SARGEANT MK

Pathogenesis of longitudinal splitting of muscle fibres in neurogenic disorders and in polymyositis  
Neuropathol Appl Neurobiol 1978; 4:99 - 115

UNTERBUCHNER C

Die Auswirkungen von Immobilisation und systemischer Inflammation auf die Muskelkraft anhand eines Rattenmodells  
Med Dis TU München 2006



VAN DEN BERGHE G, WOUTERS P, WEEKERS F, VERWAEST C, BRUYNINCKX F, SCHETZ M, VLASSELAERS D, FERDINANDE P, LAUWERS P, BOUILLON R  
Intensive insulin therapy in the critically ill patients  
N Engl J Med 2001; 345:1359-67

VOISIN L, BREUILLE D, COMBARET L, POUYET C, TAILLANDIER D, AUROUSSEAU E, OBLED C, ATTAIX D  
Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways  
J Clin Invest 1996; 97:1610-7

WERNING A, PECOT-DECHAVASSINE M, STOVER H  
Sprouting and regression of the nerve at the frog neuromuscular junction in normal conditions and after prolonged paralysis with curare  
J Neurocytol 1980; 9:278-303

WITT NJ, ZOCHODNE DW, BOLTON CF, GRAND'MAISON F, WELLS G, YOUNG GB, SIBBALD WJ  
Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure  
Chest 1991; 99:176-84

WITZMANN FA, KIM, D.H., FITTS, R.H.  
Hindlimb immobilization: length- tension and contractile properties of skeletal muscle  
J Appl Physiol 1982; 53:335-45

YI-LING-CHEN, YU C-K, LEI H-Y  
Propionibacterium acnes induces acute TNF $\alpha$ -mediated apoptosis of hepatocytes followed by inflammatory T-Cell-mediated granulomatous hepatitis in mice  
J Biomed Sci 1999; 6:349-56

ZIFKO UA, ZIPKO HT, BOLTON CF  
Clinical and electrophysiological findings in critical illness polyneuropathy  
J Neurol Sci 1998; 159:186-93

ZOCHODNE DW, BOLTON CF, WELLS GA, GILBERT JJ, HAHN AF, BROWN JD, SIBBALD WA  
Critical illness polyneuropathy. A complication of sepsis and multiple organ failure  
Brain 1987; 110:819-41

ZOCHODNE DW, RAMSAY DA, SALY V, SHELLEY S, MOFFATT S  
Acute necrotizing myopathy of intensive care: electrophysiological studies  
Muscle Nerve 1994; 17:285-92

## 11. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. W.Schmahl danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dipl. phys. E. Kochs, Direktor der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München, danke ich für die Bereitstellung der Rahmenbedingungen, unter denen diese Arbeit erstellt wurde.

Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner möchte ich vielmals für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit bei der praktischen Durchführung und statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die Vermittlung der Dissertation, die Durchsicht des Manuskriptes und die jederzeit freundliche und geduldige Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei Frau Dr. med. Heidrun Fink für die Betreuung meiner Arbeit, die jederzeit herzliche Unterstützung und Aufmunterung, sowie für die mehrfache Durchsicht des Manuskriptes.

Mein besonderer Dank gilt Frau F. Neff für die großartige Hilfe bei der Beurteilung der Präparate.

Frau Christine Heinze und Frau Anne Frye danke ich für ihre große Hilfe bei der praktischen Durchführung und bei der Einarbeitung.

Herrn Mark Helming und Herrn Christoph Unterbuchner möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Anregungen danken.

Besonderer Dank gilt meinem Mann und meinen Eltern, die mir während des Studiums und in der Zeit danach immer zur Seite standen.

## 12. Lebenslauf

Name: Andrea Lenz, geb. Dübener

Geburtsdatum: 01.12.1971

Geburtsort: Staßfurt

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Reinhard Dübener, Rentner  
Irmgard Dübener, Krankenschwester

Schulbildung: 1978 – 1988 Polytechnische Oberschule in Güsten  
1988 – 1990 Erweiterte Oberschule in Staßfurt  
Abschluss. Allgemeine Hochschulreife

9/1990 – 8/1991 Berufsbildendes Jahr in der Anhaltischen Diakonissenanstalt Dessau

9/1991 – 9/1994 Berufsausbildung zur Krankenschwester am Paul-Gerhardt-Stift, Wittenberg

10/1994 – 8/1997 Tätigkeit als Krankenschwester in der Intensivtherapie an der Anhaltischen Diakonissenanstalt Dessau

9/1997 – 2/2003 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Leipzig

Februar 2003 Approbation als Tierärztin

Mai 2003 Beginn der Dissertation in der Klinik für Anästhesiologie und am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München

August 2004 Geburt meines Sohnes Lennard

März 2006 Geburt meiner Tochter Lucia

Dateiname: Lenz\_Andrea.doc  
Verzeichnis: E:  
Vorlage: \\smuc1300\Q139929\Daten\Templates\Office2000\Normal.dot  
Titel: Histopathologische Veränderungen am Skelettmuskel nach chronischer  
Inflammation mit *Corynebacterium parvum* mit und ohne Immobilisation-Experimentelle  
Untersuchungen an der Ratte  
Thema:  
Autor: Andrea Lenz  
Stichwörter:  
Kommentar:  
Erstelldatum: 12.02.2007 19:18:00  
Änderung Nummer: 12  
Letztes Speicherdatum: 06.03.2007 21:28:00  
Zuletzt gespeichert von: Thomas Lenz  
Letztes Druckdatum: 07.03.2007 09:30:00  
Nach letztem vollständigen Druck  
Anzahl Seiten: 107  
Anzahl Wörter: 41.989 (ca.)  
Anzahl Zeichen: 283.011 (ca.)