

**HISTOPATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN
IM MUSKELGEWEBE
WÄHREND DER ERHOLUNGSPHASE NACH
IMMOBILISATION UND SYSTEMISCHER
INFLAMMATION
IM MODELL AN DER RATTE**

Franziska Busch

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 Herrn apl. Prof. Dr. med. M. Blobner

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

**HISTOPATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN
IM MUSKELGEWEBE
WÄHREND DER ERHOLUNGSPHASE NACH
IMMOBILISATION UND SYSTEMISCHER INFLAMMATION
IM MODELL AN DER RATTE**

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

von
Franziska Busch
aus
Heidelberg

München 2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Tag der Promotion: 09. Februar 2007

Für meinen Vater

Η φύσις ουδέν ποιεί μάτην.

(Aristoteles)

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	2
2.1	Der Sepsisbegriff.....	2
2.1.1	Definitionen	2
2.1.2	Inzidenz und Mortalität.....	4
2.1.3	Diagnose von Sepsis und Systemic Inflammatory Response Syndrome.....	5
2.1.4	Pathogenese	5
2.1.5	Therapie	7
2.2	Neuromuskuläre Manifestationen kritisch kranker Patienten	8
2.2.1	Critical Illness Polyneuropathy (CIP).....	8
2.2.2	Critical Illness Myopathy (CIM)	10
2.2.3	Langzeitschäden durch CIP und CIM.....	14
2.3	Tiermodelle.....	15
2.3.1	Inflammationsmodelle	16
2.3.2	Immobilisationsmodelle	19
2.3.3	Kombinationsmodell.....	22
2.4	Der Skelettmuskel und seine Myopathologien	22
2.4.1	Normalstruktur der quergestreiften Muskulatur	22
2.4.2	Histochemische Muskelfasertypen	23
2.4.3	Allgemeine histopathologische Reaktionen der Skelettmuskulatur	25
2.4.4	Spezielle Muskelpathologie.....	31
3	Eigene Untersuchungen	33
3.1	Zielvorstellung.....	33
3.2	Material und Methodik	34
3.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	34
3.2.2	Verwendete Tiermodelle	34
3.2.2.1	Inflammationsmodell.....	34
3.2.2.2	Immobilisationsmodell	35
3.2.3	Versuchsplan und Versuchsgruppen.....	35
3.2.4	Narkose	38
3.2.4.1	Anästhesie zur Gelenksfixation und den Injektionen	38
3.2.4.2	Anästhesie am Tag der Messung	38
3.2.4.3	Narkose-Monitoring am Tag der Messung.....	39
3.2.5	Instrumentierung.....	41
3.2.5.1	Bakterieninjektion.....	41
3.2.5.2	Immobilisation	41
3.2.5.3	Gefäßpräparation	43
3.2.5.4	Serumgewinnung, Leber- und Muskelentnahme	44
3.2.6	Konservierung der Muskeln und Herstellung der histologischen Präparate.....	45
3.2.7	Färbungen	47
3.2.7.1	Hämatoxylin-Eosin(H.E.)-Färbung	47
3.2.7.2	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung)	48
3.2.8	Mikroskopische Untersuchung	49
3.2.8.1	Auswertung H.E.-Färbung.....	49
3.2.8.2	Auswertung PAS-Färbung.....	50
3.2.8.3	Auswertung am PC	51
3.2.9	Statistische Bewertung der Befunde.....	52

INHALTSVERZEICHNIS

3.3	Ergebnisse.....	53
3.3.1	Ausfälle.....	53
3.3.2	Klinisches Erscheinungsbild.....	53
3.3.3	Inflamationsparameter.....	54
3.3.3.1	Mortalität.....	54
3.3.3.2	Körpergewicht.....	54
3.3.3.3	Lebergewicht.....	57
3.3.3.4	Methämoglobin.....	58
3.3.3.5	Blutbild.....	61
3.3.4	Hämodynamische Messparameter.....	62
3.3.5	Muskelgewichte.....	63
3.3.6	Histologische Ergebnisse der H.E.-Auswertung.....	64
3.3.6.1	Kalibervariationen.....	64
3.3.6.2	Ödem.....	65
3.3.6.3	Myophagie.....	67
3.3.6.4	Anguläre Fasern.....	70
3.3.6.5	Zentrale Kerne.....	72
3.3.6.6	Atrophische Fasern.....	75
3.3.6.7	Faserdurchmesser.....	78
3.3.6.8	Breite des endomysialen Bindegewebes.....	80
3.3.6.9	Entzündungszellen.....	83
3.3.7	Histologische Ergebnisse der PAS-Auswertung.....	86
3.3.7.1	Fasertypenverteilung.....	86
3.3.7.2	Fasertypengruppierung.....	88
3.3.7.3	Fasertypenprädominanz.....	89
4	Diskussion.....	92
4.1	Diskussion der Methoden.....	92
4.1.1	Tiermodell.....	92
4.1.2	Rehabilitation.....	95
4.1.3	Aufbereitung der Muskelproben und histologische Färbungen.....	96
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	98
4.2.1	Inflamationsparameter.....	98
4.2.1.1	Mortalität.....	98
4.2.1.2	Körpergewicht.....	98
4.2.1.3	Lebergewicht.....	99
4.2.1.4	Methämoglobin und Blutbild.....	99
4.2.2	Physiologische Messparameter.....	100
4.2.3	Muskelgewichte.....	101
4.2.4	Muskuläre Kontraktionskraft.....	102
4.2.5	H.E.-Auswertung.....	103
4.2.5.1	Kalibervariationen und Ödem.....	103
4.2.5.2	Myophagie, Anguläre Fasern und Zentrale Kerne.....	104
4.2.5.3	Atrophische Fasern.....	106
4.2.5.4	Faserdurchmesser.....	108
4.2.5.5	Breite des endomysialen Bindegewebes.....	109
4.2.5.6	Entzündungszellen.....	110
4.2.6	PAS-Auswertung.....	111
4.2.6.1	Fasertypenverteilung.....	111
4.2.6.2	Fasertypengruppierung.....	111
4.2.6.3	Fasertypenprädominanz.....	112

INHALTSVERZEICHNIS

4.3	Abschließende Betrachtung und Ausblick	112
5	Zusammenfassung	114
6	Summary	116
7	Literaturverzeichnis	118
8	Tabellenverzeichnis	126
9	Abbildungsverzeichnis	128
10	Abkürzungsverzeichnis.....	130
11	Danksagungen.....	132

1 EINLEITUNG

Im Verlauf einer intensivmedizinischen Behandlung von mehr als sieben Tagen treten häufig neu erworbene neuromuskuläre Störungen in Erscheinung, die mit einer deutlichen Muskelatrophie und einer ausgeprägten Muskelschwäche einhergehen (BOLTON, 2005). Betrifft diese Muskelschwäche auch die Atemmuskulatur, so äußert sich dies oft in einer erschwerten Entwöhnung vom Beatmungsgerät und kann unter Umständen lebensbedrohlich sein. Die Folgen sind in jedem Fall ein verlängerter Aufenthalt auf der Intensivstation und eine verzögerte Rehabilitation des Patienten (DE JONGHE et al., 2004). Seit der ersten Beschreibung durch BOLTON et al. (1984), ist man sich sicher, dass die auftretenden Symptome nicht allein einer Inaktivitätsatrophie durch die lange Bettruhe zuzuschreiben sind, sondern einen eigenen Krankheitskomplex darstellen, der entweder die peripheren Nerven (Critical Illness Polyneuropathy, CIP), die Skelettmuskulatur (Critical Illness Myopathy, CIM) oder beides (Critical Illness Polyneuromyopathy, CIPM) betreffen kann (FRIEDRICH et al., 2005). Langzeitfolgen der CIPM können in über 90% der Fälle noch bis zu 5 Jahre nach Entlassung aus der Intensivstation nachgewiesen werden (FLETCHER et al., 2003).

Eine der Hauptursachen für die Entwicklung der CIPM ist eine schwere Sepsis oder allgemeiner die systemische Inflammationsreaktion (SIRS) des Organismus auf eine Noxe. Zudem bedingen die Schwere der Erkrankung oder die Gabe von Muskelrelaxanzien zur Erleichterung der mechanischen Beatmung eine langfristige Bewegungsunfähigkeit der intensivmedizinischen Patienten. Schon bei alleiniger Immobilisation können gravierende Schädigungen der Skelettmuskulatur in Form von Muskelfaserdegenerationen und einer Reduktion der Kontraktionskraft beobachtet werden (IBEBUNJO und MARTYN, 1999). Modelle mit systemischer Inflammation rufen ähnliche Veränderungen hervor. Eine Kombination von Immobilisation und Inflammation, erstmalig in unserer Arbeitsgruppe untersucht, bedingt einen deutlichen additiven Schädigungseffekt der beiden Faktoren (UNTERBUCHNER, 2006; LENZ, in Vorb.).

Um den Langzeiteffekt von CIPM besser zu verstehen, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Untersuchung der Auswirkungen von Immobilisation und systemischer Inflammation, isoliert und in Kombination, auf die Histopathologie der Skelettmuskulatur in der Erholungsphase nach einer 12-tägigen Schädigungsphase.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Der Sepsisbegriff

2.1.1 Definitionen

Ursprünglich bedeutete das Wort „Sepsis“ soviel wie Fäulnis oder Verwesung, ein Abbau biologischen Materials durch Bakterien und Pilze. Eine moderne Definition des Sepsisbegriffs wurde 1989 von der Arbeitsgruppe um den amerikanischen Intensivmediziner BONE veröffentlicht: „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 ist auch heute noch gebräuchlich.

Im August 1991 fand eine Konsensuskonferenz des „American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine“ (ACCP/SCCM) statt mit dem Ziel, einige Begriffe wie Sepsis und ihre Folgeerscheinungen neu und klar zu definieren, um Missverständnisse durch unterschiedliche Benutzung der Wörter für die Zukunft zu vermeiden und den einheitlichen Gebrauch der Begriffe zu fördern (BONE et al., 1992). Im Einzelnen wurden folgende Begriffe definiert:

Infektion: Die entzündliche Antwort ursprünglich sterilen Gewebes auf die Anwesenheit oder die Invasion von pathogenen Mikroorganismen.

Bakteriämie: Anwesenheit von vermehrungsfähigen Bakterien im Blut. (Dasselbe Prinzip gilt auch für die Begriffe Virämie, Fungämie, Parasitämie etc.)

Sepsis: Eine, den primären Infektionsort überschreitende, systemische Entzündungsreaktion als Antwort auf eine Infektion.

SCHRIFTTUM

Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS):

Generalisierte, hyperinflammatorische Immunantwort des Organismus, hervorgerufen durch eine Vielzahl verschiedener Noxen. Dies schließt die Sepsis als ein SIRS mit infektiöser Ätiologie mit ein (s. Abb. 1). Andere mögliche Ursachen sind: Polytraumata und ausgedehnte Weichteilverletzungen, Verbrennungen, Ischämien, hämorrhagischer Schock, immunmedierte Organschäden, Tumorerkrankungen und nicht-infektiöse Entzündungen wie Pankreatitis.

Schwere Sepsis: Sepsis mit Organdysfunktion, Perfusionsstörungen oder Sepsis-induzierter Hypotension (systolischer Blutdruck < 90 mmHg oder Abfall des Blutdrucks um ≥ 40 mmHg vom Normwert ohne andere erkennbare Ursachen)

Septischer Schock: Schwere Sepsis mit Sepsis-induzierter Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr. Zusätzlich bestehen Perfusionsstörungen mit Laktatazidose, Oligurie oder einer akuten Veränderung des mentalen Status. Als Patienten mit septischem Schock bezeichnet man auch diejenigen, 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. Die Mortalität bei einem septischen Schock ist sehr hoch.

Multiple Organ Dysfunktion Syndrome (MODS):

Das Multiorgandysfunktionssyndrom ist definiert als das Auftreten von veränderten Organfunktionen bei akut kritisch kranken Patienten, wodurch die Homöostase im Organismus gestört wird. Es handelt sich hierbei um einen dynamisch fortschreitenden Prozess, der bis zum kompletten multiplen Organversagen führen kann. MODS entsteht primär durch direkte Einwirkung der Noxe oder des Traumas (z.B. Lungenkontusion) oder sekundär als häufige Komplikation eines SIRS.

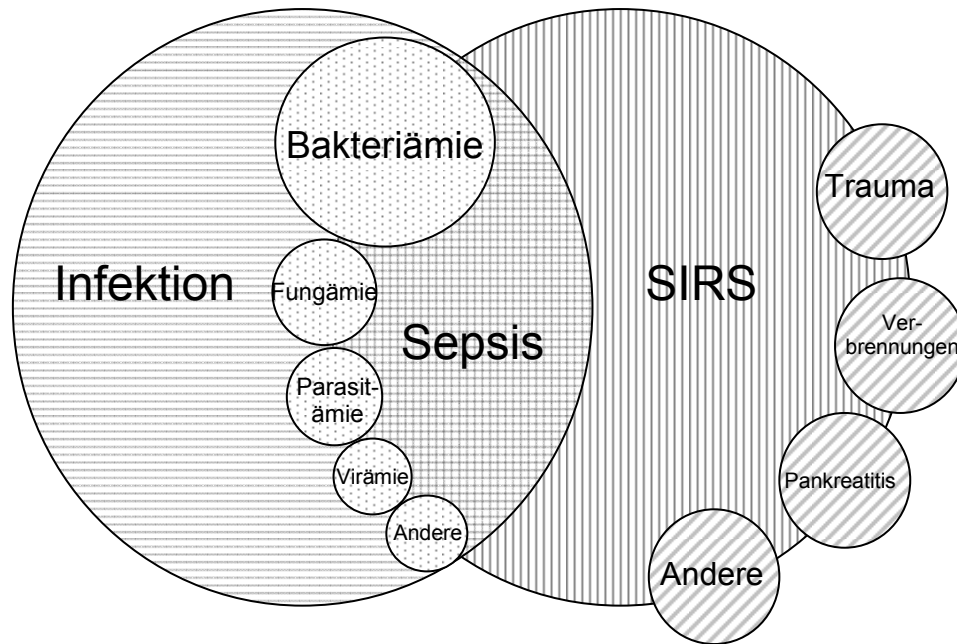


Abbildung 1: Zusammenhänge zwischen Infektion, Sepsis und Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), sowie einiger infektiöser und nicht infektiöser Ursachen; nach BONE et al. (1992)

2.1.2 Inzidenz und Mortalität

Etwa die Hälfte aller kritisch kranken Patienten auf Intensivstationen haben mit systemischen Entzündungsreaktionen und ihren Folgeerscheinungen zu kämpfen. In den USA erkranken jedes Jahr etwa 500.000 Patienten an Sepsis. Obwohl durch einschlägige intensivmedizinische Fortschritte die Überlebenszeit der Patienten in den letzten Jahrzehnten bedeutend verlängert werden konnte, liegt die Mortalitätsrate noch immer zwischen 30 und 50% (BOLTON, 2005). So versterben in den USA pro Jahr etwa 210.000 Patienten an den Folgen einer Sepsis (RIEDEMANN et al., 2003). Es ist anzunehmen, dass auch in Deutschland ähnliche Letalitätsraten existieren, obwohl konkrete Zahlenangaben hierfür fehlen (NEUGEBAUER et al., 1995). Mittlerweile gilt Sepsis neben den Herzerkrankungen als zweithäufigste Todesursache bei Intensivpatienten (NIEDERMAN und FEIN, 1990; PARRILLO et al., 1990) und stand 1992 an dritter Stelle aller infektiösen Todesursachen nach infektiösen Lungenerkrankungen und AIDS (BONE et al., 1997).

2.1.3 Diagnose von Sepsis und Systemic Inflammatory Response Syndrome

Um das Systemic Inflammatory Resonse Syndrome (SIRS) in kritisch kranken Patienten nachzuweisen, müssen nach dem Kriterienkatalog der ACCP/SCCM Konsensuskonferenz mindestens zwei der folgenden Symptome vorhanden sein:

- eine Körpertemperatur von $> 38\text{ °C}$ oder $< 36\text{ °C}$
- eine Herzfrequenz von > 90 Schlägen/min
- eine erhöhte Atemfrequenz von > 20 Atemzügen/min oder Hyperventilation mit einem PaCO_2 von < 32 mmHg
- eine Leukozytose mit > 12.000 Zellen/ mm^3 oder eine Leukopenie mit < 4000 Zellen/ mm^3 oder $> 10\%$ unreife Zellen (Linksverschiebung im Differentialblutbild)

Eine Sepsis liegt dann vor, wenn eine systemische inflammatorische Reaktion (SIRS) nach oben benannten Kriterien festgestellt wurde und diese nachweislich infektiösen Ursprungs ist.

2.1.4 Pathogenese

Die meisten Patienten, die länger als eine Woche auf einer Intensivstation behandelt werden müssen, entwickeln ein SIRS, entweder als Primäreignis oder sekundär als Komplikation von invasiven Maßnahmen wie endotracheale Intubation oder das Legen von intravaskulären Zugängen (BOLTON, 2005).

Eine Sepsis führt in ca. 30% der Fälle zu multipler Organdysfunktion. Fehlfunktionen verschiedener Organe treten meist schon lange vor der Entwicklung eines echten Organversagens auf. Organdysfunktionen können aber auch durch verschiedene andere, nicht infektiöse Ursachen ausgelöst werden. Lange war man sich unsicher, wie die Vielzahl sehr unterschiedlicher Ätiologien von SIRS dieselben Effekte auf die Organfunktionen des Körpers haben können. Heute erklärt man dieses Phänomen im Allgemeinen durch eine systemische Ausschüttung von Zytokinen. Man ist sich inzwischen sicher, dass Sepsis und ihre Folgeerscheinungen, wie MODS oder der septische Schock, verschiedene Stadien ein und derselben Erkrankung darstellen. Sie sind hauptsächlich einer starken systemischen Immunantwort des Organismus zuzuschreiben, ausgelöst durch Makrophagenzytokine, die spezifisch an die Rezeptoren der Endorgane binden (BONE et al., 1997).

SCHRIFTTUM

Eine Invasion von Mikroorganismen in den Körper ruft eine Reihe von Abwehrmechanismen zur Bekämpfung der Infektion hervor. Dies schließt sowohl humorale als auch zelluläre Mechanismen ein. Zu den humoralen Faktoren zählen das Komplement-, das Kallikrein-Kinin- und das Gerinnungs-Fibrinolyse-System. Die zelluläre Immunantwort umfasst neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen (NEUGEBAUER et al., 1995). Die anfängliche Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch aktivierte Gewebemakrophagen induziert die Freisetzung weiterer humoraler Faktoren, also lokal aktivierte proinflammatorische Mediatoren wie die Interleukine IL-1, IL-2 und IL-6, TNF- α , Arachidonsäure, Koagulationsfaktoren, freie Sauerstoffradikale und verschiedene Proteasen (BOLTON, 2005). Zeitgleich zu den proinflammatorischen Zytokinen werden auch natürliche Zytokininhibitoren und antiinflammatorische Mediatoren systemisch freigesetzt, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern (BONE et al., 1997).

Bei guter Immunkompetenz des Individuums werden die eingedrungenen Mikroorganismen eliminiert und das natürliche Gleichgewicht des Organismus wiederhergestellt. Bei gestörter Immunitätslage des Patienten und/oder hoher Pathogenität der Erreger kann es jedoch zu einer unverhältnismäßig starken, unkontrollierten Inflammationsreaktion (SIRS) kommen. Die Abwehrsysteme und ihre Mediatoren richten sich dann gegen das Individuum selbst, wobei sie sich in ihrer Wirkung im Sinne einer positiven Feed-back-Reaktion noch verstärken (NEUGEBAUER et al., 1995). Die zellulären und humoralen Faktoren interagieren untereinander und mit Adhäsionsmolekülen, die bei septischen Patienten in erhöhtem Maße im Blutstrom vorkommen (COWLEY et al., 1994). Diese Adhäsionsmoleküle binden gleichermaßen an Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen und fördern auch das Auftreten von randständigen, so genannten „rollenden“ Neutrophilen und Fibrin-Thrombozyten-Aggregaten, die den Kapillarstrom behindern. Die so verlangsamten Neutrophilen bleiben an der Endothelwand haften („sticking“) und wandern schließlich durch diese hindurch ins umliegende Gewebe, wo sie immunaktiv werden. Das Durchwandern der Neutrophilen, die so genannte Diapedese, ist verantwortlich für ausgedehnte Endothelschäden, durch die die Kapillarpermeabilität verstärkt wird und vermehrt lokale Gewebsödeme entstehen. Bei der Sepsis sind Protein-C-Spiegel im Blut stark reduziert (RIEDEMANN et al., 2003). Zahlreiche Endothelschäden machen die endothelabhängige Aktivierung von Protein C schwierig und begünstigen somit die Thromboseentstehung (FAUST et al., 2001). Die Aktivierung von Stickstoffmonoxid (NO), das eine gefäß-erweiternde Wirkung besitzt, führt zur Weitstellung der Arteriolen. Das Blut versackt in den Gefäßen, der Kapillarfluss wird noch weiter verlangsamt. Dadurch erreichen trotz adäquater

Zufuhr viele essentielle Nährstoffe wie Sauerstoff und Glukose die Organparenchyme nicht mehr in ausreichender Menge, was zu dem Syndrom der multiplen Organdysfunktion entscheidend beiträgt (GLAUSER et al., 1991).

Wenn es nicht gelingt die Homöostase im Körper wiederherzustellen, so können die massive Vasodilatation, zusammen mit der Flüssigkeitstranssudation ins Gewebe und der schlechten Verteilung des Blutflusses, zum septischen Schock, Organdysfunktion bis hin zum multiplen Organversagen und schließlich zum Tod des Patienten führen (BONE et al., 1997).

2.1.5 Therapie

Der rapide pathogenetische Verlauf von Sepsis und SIRS macht deutlich, dass der Erkrankung nur durch eine möglichst frühzeitige Diagnose und Therapie entgegengewirkt werden kann. Die angewandten Standardtherapien umfassen eine chirurgische Sanierung des Sepsisherdes, den Einsatz von geeigneten Antibiotika gegen evtl. eingedrungene Bakterien, sowie verschiedene intensivmedizinische Verfahren wie künstliche Beatmung, Volumensubstitution und die Anwendung von vasoaktiven Medikamenten (NEUGEBAUER et al., 1995).

Zudem haben sich in den letzten Jahren eine Vielzahl von Studien mit der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden befasst, die durch eine gezielte Hemmung der Überaktivierung der körpereigenen Abwehr und einer Steigerung der Immunkompetenz aktiv in das Sepsisgeschehen einwirken sollen. Allerdings sind viele der Therapieansätze zur direkten Behandlung der Sepsis, wie z.B. die so genannte Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern gegen die Endotoxine gramnegativer Bakterien oder gegen TNF- α , wie beschrieben von GLAUSER et al. (1991), noch immer sehr umstritten. Auch eine von LEVY et al. (1998) entwickelte entgiftende Plasma-Filtration, bei der verschiedene Zytokine aus dem Plasma entfernt werden sollen, konnte sich bisher noch nicht durchsetzen (LEVY et al., 1998). Zu beachten ist auch, dass die vom Körper exprimierten Entzündungsmediatoren in niedrigen Konzentrationen für den Erhalt der körpereigenen Abwehr durchaus benötigt werden und eine vollständige Blockade einzelner Faktoren sogar negative Konsequenzen haben kann. Die Komplexität der Sepsisgenese lässt zudem vermuten, dass von Kombinationstherapien eher als von Einzelansätzen der größere Nutzen erwartet werden kann. Da bislang noch keine ultimative Therapiemethode existiert, sollten intensive prophylaktische Maßnahmen weiterhin im Vordergrund stehen (NEUGEBAUER et al., 1995).

2.2 Neuromuskuläre Manifestationen kritisch kranker Patienten

Eine Reihe von Folge- und Begleiterscheinungen von Sepsis und SIRS können deren Verlauf weiter verkomplizieren. Hierzu gehören auch neuromuskuläre Manifestationen wie die so genannte Critical Illness Polyneuropathy und die Critical Illness Myopathy, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

2.2.1 Critical Illness Polyneuropathy (CIP)

Polyneuropathie und Myopathie waren möglicherweise schon immer Begleiterscheinungen der Sepsis. Allerdings wurde dies, in einer Zeit, in der die Möglichkeiten zur künstlichen Beatmung und zur effektiven Unterstützung des Blutdrucks von Intensivpatienten noch nicht gegeben waren, lange nicht erkannt, da septische Patienten meist verstarben, lange bevor neuromuskuläre Schädigungen klinisch sichtbar wurden. Anfang der 80er Jahre beobachtete die Arbeitsgruppe um den amerikanischen Neurologen BOLTON, dass einige ihrer Intensivpatienten, die mehr als zwei Wochen künstlich beatmet worden waren, unverhältnismäßig große Schwierigkeiten bei der Entwöhnung vom Beatmungsgerät und eine ausgeprägte Gliedmaßenschwäche zeigten. Eingehende elektrophysiologische und morphologische Untersuchungen identifizierten diesen Zustand als eine primäre, distale, axonale Degeneration der motorischen und sensorischen Nervenfasern (BOLTON et al., 1984), wobei die Schädigungen der motorischen Fasern überwiegen (HUND et al., 1997). Schnell vermutete man, dass diese Polyneuropathie ein Resultat der „toxischen“ Effekte der Sepsis darstelle (BOLTON et al., 1986). Ab diesem Zeitpunkt fing man an, in zunehmendem Maße elektrophysiologische Untersuchungen auf Intensivstationen durchzuführen.

Die Arbeitsgruppe um OP DE COUL beobachtete Veränderungen im Sinne einer schweren, aber reversiblen, axonalen Motorneuropathie bei der Anwendung des Muskelrelaxans Pancuronium, eingesetzt zur Erleichterung der künstlichen Beatmung. Auch bei dem kürzer wirksamen Vecuronium beschrieben sie ähnliche Effekte (OP DE COUL et al., 1985).

Eine Abnahme der peripheren Nervenfunktion wurde vor allem in Kombination mit einer intensivmedizinischen Therapie, den Hauptmerkmalen Sepsis und multipler Organdysfunktion, sowie einem Anstieg der Blutglukose und einem Abfall des Serum-Albumin-Spiegels beobachtet (ZOCHODNE et al., 1987; WITT et al., 1991).

SCHRIFTTUM

Da zu dieser Zeit die Bezeichnung „critical illness“ sehr häufig auf Patienten mit Sepsis und multiplen Organversagen angewandt wurde, führte man den Begriff „Critical Illness Polyneuropathy“, kurz CIP, ein (ZOCHODNE et al., 1987).

Im Jahr 1991 konnte bei 70% der septischen Patienten mit Multiorganversagen eine CIP diagnostiziert werden (WITT et al., 1991). Es handelt sich also um eine sehr häufig auftretende neuromuskuläre Störung. Allerdings sind neuromuskuläre Untersuchungen bei diesen Patienten schwierig. Daher bleiben viele Fälle klinisch oft unerkannt und kommen unter Umständen erst dann zum Vorschein, wenn deutliche Schwierigkeiten bei der Entwöhnung vom Beatmungsgerät auftreten und pulmonale und kardiologische Ursachen ausgeschlossen werden können (BOLTON, 2005). Bei sehr schweren Fällen von CIP kann eine Entwöhnung sogar unmöglich werden und forcierte Entwöhnungsversuche könnten die Patienten in dem Fall sogar ernsthaft gefährden (HUND et al., 1997).

Die genauen pathophysiologischen Vorgänge zur Entstehung der CIP sind noch immer unklar. Oft geht der CIP eine septische Enzephalopathie voraus. Diese tritt in etwa 70% der septischen Patienten auf (BOLTON, 2005). Entzündungszeichen in den peripheren Nerven fehlen. Es wird vermutet, dass dieselben Mechanismen, die für die systemischen Effekte der Sepsis verantwortlich sind, auch eine axonale Degeneration verursachen könnten, evtl. durch Störungen der Mikrozirkulation der peripheren Nerven (WITT et al., 1991). Durch den verlangsamten Kapillarfluss wird das in dieser Hinsicht sehr empfindliche Nervensystem nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Glukose versorgt. Es ist leicht vorstellbar, dass ein solcher Nährstoffmangel gravierende Auswirkungen auf dieses Organsystem haben kann. Zwar wurden laut HUND et al. (1997) bei Nervenbiopsien keine Veränderungen gefunden, die diese Theorie unterstützen und es erkläre auch nicht die Prädominanz für motorische Nervenfasern, dennoch wird dieser Mechanismus heute weitestgehend anerkannt.

Als Differentialdiagnose zur CIP ist zum einen das *Guillain-Barré-Syndrom* zu nennen. Es entwickelt sich schon vor dem Aufenthalt auf einer Intensivstation und steht oft im Zusammenhang mit einer *Campylobacter jejuni*-Infektion. Eine *Schwäche durch vorübergehende neuromuskuläre Blockade* tritt vor allem bei hoher Dosierung von Muskelrelaxanzien auf, kann aber durch die Befunde von wiederholten Nervenstimulationen leicht von einer echten CIP abgegrenzt werden. Eine weitere Differentialdiagnose stellt die *Critical Illness Myopathy (CIM)* dar. Sie kann alleine oder in Kombination mit CIP vorkommen und ist von dieser abzugrenzen durch elektrophysiologische Messungen wie die indirekte (über den Nerv) oder die direkte Muskelstimulation, durch Bestimmung der Serum-

Kreatinkinase und über Muskelbiopsien. Zuletzt sollte auch auf das Vorkommen von *verschiedenen Mononeuropathien und Plexopathien* hingewiesen werden. Sie entstehen alleine oder zusätzlich zu CIP und CIM, z.B. durch Nervenkompression durch lange Liegezeiten, durch direktes Trauma, Ischämien oder Kompression aufgrund von Blutergüssen (BOLTON, 2005).

Die Behandlung der CIP beginnt eigentlich schon in der Prävention ihrer Entstehung. Hierbei sollte die Vermeidung von entzündlichen Zuständen im Körper wie bei der Sepsis an allererster Stelle stehen, bevor CIP überhaupt auftritt. Dafür muss penibel auf aseptische Verhältnisse bei jeglichen Manipulationen geachtet werden, es sollte eine konstante Überprüfung auf infektiöse Organismen stattfinden und invasive chirurgische Maßnahmen sollten weitestgehend vermieden werden. Sobald CIP diagnostiziert wurde, umfasst die Therapie vor allem die Behandlung der Sepsis und der multiplen Organdysfunktionen. Hierfür sollte zunächst die zugrunde liegende Ursache für die Entstehung der Sepsis erkannt, dementsprechend geeignete Antibiotika eingesetzt und wenn nötig eine chirurgische Revision des Sepsisherdes vorgenommen werden. Die Organfunktionen können durch verschiedene Maßnahmen unterstützt werden. Künstliche Beatmung und adäquate Flüssigkeitssubstitution sind meist unerlässlich. Am Ende stehen Physiotherapie und Rehabilitation (BOLTON, 2005).

2.2.2 Critical Illness Myopathy (CIM)

Anhand von elektrophysiologischen und morphologischen Hinweisen erkannte man einige Jahre nach erstmaliger Beschreibung der CIP, dass ähnliche Vorgänge wie bei der CIP im Rahmen der Intensivtherapie auch primär die Skelettmuskulatur betreffen können. In Anlehnung an die anderen Begriffe, nannte man diese Erscheinung zunächst „myopathy in critical illness“ (ZOCHODNE et al., 1987).

LACOMIS et al. beobachteten nach Applikation von Kortikosteroiden, zur Behandlung von akutem Asthma oder nach Transplantationen, die Entwicklung einer Myopathie mit Myosinverlusten (LACOMIS et al., 1993).

ZOCHODNE (1998) wies darauf hin, dass man sorgsam unterscheiden müsse, zwischen Myopathien, die bereits vor Aufnahme auf eine Intensivstation bestehen, aber unter Umständen erst dort in Erscheinung treten, und den tatsächlich de novo während der Intensivpflege entstandenen Myopathien. Im Vorfeld existierende myopathische Ver-

SCHRIFTTUM

änderungen sind z.B. entzündliche Myopathien, die myotonische Dystrophie, mitochondriale Myopathien, HIV assoziierte Myopathien oder Trichinose. Neu erworbene Myopathien schließen die akute Steroidmyopathie, die septische Myopathie, die akut nekrotisierende Myopathie, die Myopathie durch Hypophosphatämie und die so genannte „myopathy of critical illness“ ein (ZOCHODNE, 1998).

HUND (1999) schloss sich der Meinung an, dass ausgeprägte Muskelschwäche und -atrophie bei kritisch kranken Patienten nicht allein durch physische Inaktivität zu erklären, sondern eher auf neu erworbene neuromuskuläre Schädigungen zurückzuführen seien. Außer durch Neuropathien oder Störungen der neuromuskulären Übertragung, könne die Muskelschwäche auch von Störungen der Funktion oder Struktur des Muskels per se herrühren und zwar häufiger als bis dahin angenommen wurde (HUND, 1999).

Die Prävalenz dieser Komplikation eines Langzeitaufenthaltes auf der Intensivstation liegt bei ca. 80%, unabhängig von der Ursache, die zur Aufnahme auf die Intensivstation führte (FRIEDRICH et al., 2005).

HUND (1999) unterscheidet histologisch drei Typen von myopathischen Veränderungen bei Intensivpatienten, die zusammengefasst als akute quadriplegische Myopathie oder akute Intensivmyopathie bezeichnet werden.

Diese sind im Einzelnen:

- 1) Die diffuse, nicht-nekrotisierende, kachektische Myopathie oder „*Critical Illness Myopathy*“ (*CIM*) im eigentlichen Sinne,
- 2) Eine Myopathie mit selektivem Verlust von dicken Myosinfilamenten oder „*Thick Filament Myopathy*“ und
- 3) Die *akute nekrotisierende Myopathie*.

1) Critical Illness Myopathy (CIM):

Viele Intensivpatienten weisen myopathische Veränderungen auf, die oft mild in der Ausprägung und mit einer CIP gekoppelt sind. Bei einigen Patienten jedoch stellt die Myopathie den Hauptbefund dar. Diesen Krankheitskomplex bezeichnet man als Critical Illness Myopathy (CIM). Histopathologisch fallen vor allem unphysiologische Kalibervariationen, Muskelfaseratrophien, anguläre Fasern, zentrale Zellkerne, Vakuolenbildung, fettige Faserdegeneration, interstitielle Fibrose und die Nekrose einzelner Fasern auf (LATRONICO et al., 1996). Die Veränderungen betreffen meist beide Muskelfasertypen gleichermaßen, hin und wieder kann jedoch Fasertyp 2 stärker betroffen sein (GUTMANN et al., 1996). Entzündliche Veränderungen sind, wie auch bei der CIP, nicht zu erkennen. Der Serum-Kreatinkinase(CK)-Spiegel liegt meist im physiologischen Bereich. Als Ursache vermutet man ähnliche Faktoren, die auch bei der CIP eine wichtige Rolle spielen (CHAD und LACOMIS, 1994). Es wurde herausgefunden, dass sowohl direkte als auch indirekte Einflüsse des Zytokin-Systems auf den Protein-Metabolismus der Skelettmuskulatur bestehen. In experimentellen Sepsismodellen konnten verschiedene ultrastrukturelle, mikro-zirkulatorische und metabolische Veränderungen festgestellt werden, die über Modulation der Enzymsynthese und Blockade von anabolisch wirkenden Hormonen entstehen (COONEY et al., 1997). Für den starken Proteinabbau im Muskel soll hierbei eine Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems verantwortlich sein (HASSELGREN und FISCHER, 1997). Glukokortikoide und die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor sind wichtige Mediatoren des Sepsis-induzierten Muskelproteinabbaus (DE LETTER et al., 2000).

2) Thick Filament Myopathy:

Eine andere Form der Myopathie äußert sich in dem selektiven Verlust von Myosinfilamenten durch Proteolyse. Den Patienten, die diese Form entwickeln, wurden häufig im Voraus z.B. wegen schwerem Asthma oder nach Organtransplantationen Kortikosteroide verabreicht, oft auch in Kombination mit auf Intensivstationen üblichen Gaben von hoch-dosierten Muskelrelaxanzien (HUND, 2001). Mit der Myosin-Adenosin-Triphosphatase-Reaktion lassen sich oft zentral innerhalb der Muskelfasern ungefärbte Bereiche erkennen. Elektronenmikroskopisch äußert sich dies als fokaler oder diffuser Verlust meist selektiv von dicken Myosinfilamenten (LACOMIS et al., 1996). Ein Fortschreiten bis zur diffusen Muskelnekrose ist denkbar. Diese Form der Myopathie ist selten aber unspezifisch und wurde schon bei diversen Erkrankungen beschrieben. Die genaue Pathogenese ist bisher noch nicht

bekannt, aber es wird vermutet, dass eine Therapie mit Kortikosteroiden bei vorhandener Sepsis den Muskelproteinabbau fördert und dieser Effekt noch potenziert wird durch Muskelinaktivität, hervorgerufen durch Denervation, CIP, neuromuskuläre Blockade durch Muskelrelaxanzien oder Unerregbarkeit der Muskelfasermembran. Die Kreatinkinase im Serum kann geringfügig erhöht sein (HUND, 1999).

3) Akute nekrotisierende Myopathie:

Diese Form der Intensivmyopathie ist gekennzeichnet durch ausgeprägte Fasernekrosen mit Vakuolenbildung und Phagozytose. Der Serum-CK-Wert ist meistens deutlich erhöht und es kann eine Myoglobinurie auftreten. Auch hier spielen die Anwendung von hoch-dosierten Kortikosteroiden, Muskelrelaxanzien oder beidem eine tragende Rolle bei der Entwicklung des Krankheitsbildes. In wenigen Fällen schreitet die Erkrankung fort bis zur Rhabdomyolyse (HUND, 2001).

Die Diagnose einer akuten Intensivmyopathie ist idealerweise zu stellen durch eine Kombination aus direkter elektrischer Muskelstimulation, die im Gegensatz zur Nadel-Elektromyographie (EMG) eine Unterscheidung zwischen Myopathie und Neuropathie erlaubt, und Muskelbiopsie, die zwar eine invasive Form der Diagnostik darstellt, aber die myopathischen Veränderungen am deutlichsten offenbart. Es ist noch unklar, ob die drei Formen der akuten Intensivmyopathie möglicherweise verschiedene Manifestationen von demselben pathogenetischen Prozess darstellen, dessen Endausgang durch Muskelfasernekrose und eventuell Rhabdomyolyse gekennzeichnet ist (HUND, 1999).

OP DE COUL et al. (1991) schlossen aus ihren Ergebnissen, dass es sich bei der Pathogenese von CIP und CIM um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Zudem fanden sie im Zuge ihrer Untersuchungen heraus, dass CIP und CIM häufig miteinander assoziiert sind und prägten daher den Begriff „Critical Illness Polyneuromyopathy“ (CIPM) (OP DE COUL et al., 1991). Auch DE LETTER et al. (2001) berichteten von einem kombinierten Auftreten von CIP und CIM. Der genaue Pathomechanismus der CIM ist noch unklar. BOLTON beschrieb, dass der systemische Effekt der Sepsis ein sehr wichtiger prädisponierender Faktor für die Pathogenese der CIP ist (BOLTON, 1996). Die Vermutung liegt nahe, dass dies auch auf die CIM zutrifft. Je mehr über die zugrunde liegenden Pathomechanismen bekannt wird, umso mehr ist man sich heutzutage einig, dass SIRS durch die Ausschüttung einer Reihe von

proinflammatorischen Zytokinen und anderen Metaboliten in die Blutbahn (z.B. TNF- α , Interleukine, Arachidonsäuren) auch verantwortlich ist für das Versagen des „Organs Muskel“, vergleichbar mit anderem Organversagen, wie es bei Sepsispatienten auftritt. Zytokine haben ein großes Potential Sepsis-induzierte Proteolyse von myofibrillären Proteinen im Muskel zu fördern. Externe Faktoren, wie die Verabreichung von hoch-dosierten Glukokortikoiden, tragen zusätzlich zur Entstehung der CIM bei. Zudem verstärken bestehende neuromuskuläre Übertragungsstörungen durch Denervation, CIP, oder Applikation von Muskelrelaxanzien diesen Effekt noch weiter (FRIEDRICH et al., 2005). Es wird außerdem vermutet, dass es neben diesen bekannten, andere noch unbekannte myotoxische Faktoren geben muss, die Myopathien hervorrufen in Patienten ohne Sepsis, die auch keine Glukokortikoide oder Muskelrelaxanzien erhalten. Denkbar wäre, dass auch bei der CIM ein endogen produzierter und humoral verteilter myotoxischer Faktor mit geringem Molekulargewicht eine Rolle spielt, wie es schon für andere vergleichbare neurologische Erkrankungen wie die Multiple Sklerose nachgewiesen wurde (FRIEDRICH et al., 2005).

Eine spezifische Therapie der CIM existiert bisher noch nicht. Allerdings sollte die Diagnose von neuromuskulären Folgeerscheinungen der Sepsis wie CIP und CIM sehr sorgfältig gestellt werden. Das Monitoring derart gefährdeter Patienten schließt wiederholte CK-Messungen und elektrodiagnostische Untersuchungen mit ein. Wie auch bei der CIP steht die Behandlung der Sepsis an erster Stelle. Da Steroide und Muskelrelaxanzien entscheidend zu der Entstehung von CIM beitragen können, sollten sie nicht oder nur kurzfristig und nur in geringen Dosierungen angewandt werden, insbesondere, wenn der Metabolismus und die Elimination dieser Medikamente beim Patienten gestört sind (HUND, 2001).

2.2.3 Langzeitschäden durch CIP und CIM

Bei richtiger Behandlung kann in schweren Fällen von CIP meist nach einigen Monaten, in leichteren Fällen bereits innerhalb weniger Wochen, eine Verbesserung mit progressiver Muskelreinnervation und Wiederherstellung der sensorischen Funktionen festgestellt werden (BOLTON, 2005). Allerdings sollte die Schwere dieser Erkrankung nicht unterschätzt werden. Bei Überlebenden eines akuten Lungenversagens (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), welches sehr häufig mit einer Sepsis in Verbindung steht (NIEDERMAN und FEIN, 1990) und durch eine systemische Entzündungsreaktion ausgelöst werden kann (KREYMANN und WOLF, 1996), wurden noch zwölf Monate nach Entlassung aus der

Intensivstation anhaltende, schwere Funktionsstörungen in Folge von massivem Muskelabbau und Muskelschwäche, sowie eine sehr rasche Ermüdung der Patienten festgestellt. Es wird angenommen, dass an dieser Muskelschwäche unter anderem auch ein Auftreten von CIPM ursächlich beteiligt sein könnte (HERRIDGE et al., 2003). In einer Studie von FLETCHER et al. (2003), in der Überlebende von Langzeitintensivtherapien auf Muskelschwäche und unphysiologische neurologische Befunde untersucht wurden, stellte sich heraus, dass die Schädigungen durch CIP in mehr als 90% der Fälle sogar noch über einen Zeitraum von bis zu fünf Jahren nach der Intensivtherapie nachzuweisen waren. Ähnliche Verhältnisse sind auch bei Patienten mit CIM oder einer Kombination aus CIP und CIM zu erwarten. Einige Patienten mit sehr schwerer Ausprägung von CIPM können unter Umständen sogar dauerhaft quadriplegisch bleiben (WITT et al., 1991).

2.3 Tiermodelle

Tiermodelle sind zur Erforschung verschiedener pathophysiologischer Vorgänge, zur Entwicklung von geeigneten Therapiemöglichkeiten und auch zur Grundlagenforschung häufig immer noch unumgänglich. Die klinischen Erscheinungsformen vieler Erkrankungen sind sehr heterogen und der klinische Datensatz wird zudem maßgeblich beeinflusst von Faktoren wie Alter und Begleiterkrankungen der Patienten, sowie unterstützende Therapiemaßnahmen. Um solche Unregelmäßigkeiten auszugleichen, erfordern klinische Studien deshalb einen enormen Stichprobenumfang, was zu hohen Kosten führt und sehr zeitaufwendig ist. Zudem müssen sowohl Medikamente als auch andere medizinisch-technische Hilfsmittel in ihrer Anwendung ausreichend getestet worden sein, bevor sie am menschlichen Patienten verwendet werden dürfen. Manche Studien sind nur mit invasiven Maßnahmen durchführbar oder es werden Pharmazeutika angewandt, deren Nutzen noch nicht gesichert ist. Daher ist es nötig, realitätsnahe Tiermodelle zu entwickeln, die im Hinblick auf die Fragestellung die gewünschten Untersuchungsergebnisse liefern. Generell sollte ein Tiermodell einfach anzuwenden, gut reproduzierbar und möglichst standardisiert sein (FINK und HEARD, 1990).

Im Folgenden werden verschiedene Tiermodelle vorgestellt, die sich entweder mit der Erzeugung einer systemischen Entzündung befassen (Inflammationsmodelle), oder mit der Entstehung einer Inaktivitätsatrophie (Immobilisationsmodelle).

2.3.1 Inflammationsmodelle

Sepsis stellt in der modernen Intensivmedizin noch immer ein ernstes Problem dar und ist weiterhin einer der Hauptgründe für die hohe Sterblichkeit von Intensivpatienten (BONE et al., 1997). Deshalb ist es von großer Bedeutung ein geeignetes Tiermodell zu finden, das die Vorgänge bei septischen Patienten möglichst realitätsgetreu widerspiegelt. Dies setzt unter anderem auch eine realistische Mortalitätsrate voraus. Hier sind einige der gängigen Sepsismodelle aufgeführt:

• Zäkale Ligatur und Punktion (CLP)

Hierbei wird das Zäkum der Versuchstiere distal der Ileozäkalklappe ligiert, so dass die Eingeweidekontinuität und der peristaltische Fluss erhalten bleiben. Mit einer Kanüle wird die Zäkumwand auf antimesenterialer Seite perforiert. Auf diese Weise gelangen Darmbakterien in die Bauchhöhle und verursachen eine septische Peritonitis. Bei der Erstbeschreibung des Modells mit mehrfacher Punktion mit einer 18 G-Kanüle verstarben die Tiere meist akut innerhalb der ersten 24 bis 48 Stunden (WICHTERMAN et al., 1980). Durch Verwendung einer dünneren Kanüle und nur einmaliger Punktion sind mehrtägige bis -wöchige Überlebenszeiträume möglich (FRIED et al., 1986). Der Vorteil des CLP-Modells liegt darin, dass der Verlauf der hervorgerufenen Sepsis dem in menschlichen Sepsispatienten durch die konsekutive Freisetzung einer endogenen, gemischten mikrobiellen Flora aus einem septischen Fokus sehr nahe kommt (ZANTL et al., 1998). Das Problem der CLP besteht jedoch darin, dass die genaue Menge an übertretenden Darmbakterien nicht bestimmt werden kann und somit keine Standardisierung der Sepsisausprägung zu erreichen ist (FINK und HEARD, 1990). Außerdem kann eine sehr feste Ligierung des Zäkums unter Umständen zu einer kompletten Zäkumnekrose und somit zu einem sehr raschen Krankheitsverlauf mit 100% Letalität führen (ZANTL et al., 1998).

• Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)

Dieses Modell stellt ein im Gegensatz zum CLP-Modell relativ standardisiertes und gut reproduzierbares abdominelles Sepsismodell dar. Hierbei wird ein septischer Fokus durch das Einbringen einer speziellen Kanüle (Stent) in die antimesenteriale Darmwand des Colon ascendens etwa auf Höhe der Ileozäkalklappe angelegt, so dass eine kontinuierliche Verbindung zwischen Darmlumen und Bauchhöhle besteht. Auf diese Weise gelangen wie bei der CLP Darmbakterien in die Bauchhöhle, verursachen eine Peritonitis und infolgedessen

eine Sepsis. Der Vorteil dieser Technik im Vergleich zum CLP-Modell liegt darin, dass man die austretende Bakterienmenge und somit den Verlauf der Sepsis (akut, subakut) je nach Indikation der Untersuchung beeinflussen kann, indem man die Stärke des gewählten Stents und die Verweildauer verändert (ZANTL et al., 1998). Auch mit diesem Modell kommt man dem klinischen Verlauf einer abdominellen Sepsis beim Menschen, die charakterisiert ist durch die kontinuierliche oder intermittierende Freisetzung von Bakterien oder deren Toxinen aus einem Sepsisherd (WICHTERMAN et al., 1980), sehr nahe. Ein chronischer Verlauf der Sepsis ist allerdings auch hier nur schwer zu erreichen. Die meisten Tiere sterben innerhalb der ersten 48 h (ZANTL et al., 1998).

• Endotoxininjektion

Die Erkenntnis, dass gramnegative Bakterien häufig als Infektionsursache bei septischen Patienten festgestellt wurden, löste eine wahre Flut an Sepsismodellen aus, bei denen den Versuchstieren eine bestimmte Menge an Endotoxinen später auch reines Lipopolysaccharid (LPS), ein Hauptbestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, verabreicht wurde (RIEDEMANN et al., 2003). LIN et al. (1998) beschrieben z.B. einen akuten Sepsisverlauf durch die einmalige intraarterielle Verabreichung von *E. coli* LPS (20 mg/kg Körpergewicht) in die *A. carotis communis*. Das Sepsismodell der akuten Endotoxämie durch LPS ist einfach anzuwenden, da es keine komplizierten, invasiven Maßnahmen erfordert und wird auch heute noch sehr häufig verwendet. Mittlerweile ist der Nutzen dieses Modells jedoch stark umstritten, da es die tatsächlichen Verhältnisse im septischen Patienten nicht ausreichend widerspiegelt. Hohe Dosierungen sind zudem sehr aggressiv, so dass die Tiere meist in sehr kurzer Zeit im septischen Schock versterben. Niedrigere Dosierungen andererseits sind nicht letal und die Tiere nehmen oft bereits nach 48 h wieder an Körpergewicht zu. Depot-Gaben oder wiederholte Endotoxin-Verabreichungen über einen längeren Zeitraum können eine Toleranz hervorrufen (BREUILLE et al., 1999).

• Injektion von Entzündungsmediatoren

Die Injektion des Entzündungsmediators Zymosan wurde 1986 erstmals von GORIS et al. beschrieben und 1994 von ROOYACKERS et al. modifiziert. Dieses Sepsismodell besteht in der einmaligen aseptischen, intraperitonealen Injektion von Zymosan (30 mg/100 g Körpergewicht) gelöst in Paraffinöl (GORIS et al., 1986; ROOYACKERS et al., 1994). Zymosan ist ein potenter Aktivator des Komplementsystems und der Makrophagentätigkeit. Es wird zunächst eine akute lokale Entzündungsreaktion im Sinne einer Peritonitis ausgelöst,

gefolgt von einer systemischen Antwort und klinisch sichtbaren Anzeichen einer Sepsis. Diese Symptome sind an allen Tieren während der ersten zwei Tage nach Injektion erkennbar. Die Mortalität liegt bei ca. 20% in dieser akuten Phase. Die überlebenden Tiere beginnen ab Tag fünf wieder an Gewicht zuzunehmen (MINNAARD et al., 2005).

• **Injektion lebender Bakterien**

Durch die intravenöse Injektion von lebenden Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* kann ein septischer Zustand erreicht werden, der in einer geeignet niedrigen Dosierung einen chronischen Verlauf zeigt und bis zu 9 Tage anhält (BREUILLE et al., 1999). Vorteile sind hier wie bei allen Injektionsmodellen die einfache Handhabung, außerdem die gute Reproduzierbarkeit und Standardisierung durch Vorgabe einer bestimmten Bakterienmenge. Dennoch wurde die Injektion von lebenden Bakterien wegen der oft hohen Mortalität in sehr kurzer Zeit häufig kritisiert. Dieses Problem besteht vor allem bei hohen Dosierungen, infolge dessen die Versuchstiere plötzlich und so massiv von lebenden Bakterien förmlich überschwemmt werden, dass sie gar nicht die Möglichkeit haben, mit dem vollen Spektrum an Abwehrmechanismen zu reagieren. Diese Vorgänge gleichen dann eher einer Intoxikation, vergleichbar mit den Effekten bei Endotoxin-Gabe (WICHTERMAN et al., 1980).

• **Corynebakterium parvum-Injektion**

1983 berichteten FARQUHAR et al. von einer granulomatösen Leberentzündung bei Ratten nach einmaliger Applikation von Formalin-inaktiviertem *Corynebakterium parvum* (C.p.), in einer Dosierung von 1,53 mg/kg Körpergewicht, mit einem Höhepunkt der Befunde zwischen Tag drei und sechs nach der Injektion. Allerdings nahmen die Tiere bei dieser Dosierung nicht an Gewicht ab und zeigten auch sonst keine Krankheitsanzeichen, außer einer geringfügig vergrößerten Leber und einer vorübergehenden Splenomegalie (FARQUHAR et al., 1983).

GELLER et al. (1993) beobachteten neben der granulomatösen Hepatitis eine signifikante Steigerung der Stickstoffoxidsynthese in Leberzellen drei bis sieben Tage nach i.v. Injektion von 28 mg/kg Körpergewicht hitzeinaktiviertem C.p.. Im selben Zeitrahmen waren ein Anstieg sowohl der Leberenzyme im Plasma, als auch der Nitrit/Nitrat-Konzentrationen, die als stabile Endprodukte der Stickstoffoxid-Oxidation im Plasma und im Urin messbar sind, zu verzeichnen (GELLER et al., 1993).

Auch in unserem Labor konnte wiederholt zunächst mit einer Dosierung von 60 mg/kg Körpergewicht (MAYER et al., 2001), später mit 56 mg/kg Körpergewicht (FINK et al.,

2003), nach einmaliger i.v. Injektion einer hitzeinaktivierten C.p.-Suspension eine nachweisliche systemische Inflammationsreaktion mit granulomatöser Hepatitis erzielt werden. Eine deutliche Körpergewichtsreduktion und der Anstieg des Stickstoffoxid-Spiegels, gemessen als Plasma-Nitrit/Nitrat-Konzentrationen, gelten als Anzeichen einer schweren systemischen Inflammationsreaktion und dienten deshalb als Kontrollparameter. Die Messungen zeigten für beide Parameter einen typischen selbst-limitierenden Verlauf mit signifikanten Werten zwischen Tag 4 und 6 und allmähliche Normalisierung ab Tag 8 (MAYER et al., 2001; FINK et al., 2003).

Im vorangegangenen Versuch unserer Arbeitsgruppe konnte das Modell der systemischen Inflammation auf einen chronischen Zeitraum von 12 Tagen ausgeweitet und erfolgreich etabliert werden, indem die Versuchstiere drei Mal alle vier Tage eine Injektion C.p. in einer Dosierung von jeweils 56 mg/kg Körpergewicht erhielten. Die Tiere zeigten deutliche Krankheitszeichen wie Piloerektion, vermindertes Putz- und Explorationsverhalten, eine kontinuierliche Abnahme des Körpergewichtes, und erhöhte Methämoglobinwerte (UNTERBUCHNER, 2006; LENZ, in Vorb.).

(In der vorliegenden Studie wurde das zuletzt beschriebene Tiermodell angewandt.)

2.3.2 Immobilisationsmodelle

Neuromuskuläre Dysfunktionen bei Intensivpatienten können einerseits im Sinne von CIP oder CIM in Folge eines Sepsisgeschehens entstehen, andererseits verursacht die Bewegungseinschränkung einzelner Körperteile alleine schon oft gravierende Inaktivitätsatrophien. Kritisch kranke Patienten müssen entweder wegen der Schwere der zugrunde liegenden Erkrankung oder aufgrund einer Immobilisierung mit Gips oder Fixateuren meist über einen längeren Zeitraum Bettruhe einhalten. Um diesen Immobilisationseffekt auf die neuromuskulären Funktionen näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Tiermodelle etabliert:

• Immobilisation mit Gips oder Schiene

HERBISON et al. (1978) fanden deutliche Muskelatrophien, indem sie beide Hintergliedmaßen von Ratten mit Gipsverbänden, die sowohl die Sprung- als auch die Kniegelenke in einer neutralen Position fixierten, über sechs Wochen immobilisierten. Die Immobilisation mit Gips oder Schiene ist leicht und ohne invasive Maßnahmen anzuwenden (HERBISON et

SCHRIFTTUM

al., 1978). Allerdings bedeutet beides für die Versuchstiere ein erhebliches zusätzliches Gewicht (bis zu 40 - 60% des Körpergewichts). Zudem können sich die Verbände lockern und somit eine sichere Immobilisation verhindern. Auch wurden häufig Hautulzerationen beobachtet, die eventuell durch Scheuern oder durch Urineinwirkung entstehen können. Schwellungen oder Ulzerationen können während der Immobilisationsphase von außen nicht erkannt werden (COUTINHO et al., 2002).

• **Steel mesh and cotton immobilisation**

COUTINHO et al. (2002) entwickelten eine völlig neue Methode zur Immobilisation einer Hintergliedmaße. Hierbei wird eine Art T-Shirt aus Baumwollstoff angefertigt, an dessen unteren Saum zwei Stücke (Vorder- und Rückenteil) eines zurechtgeschnittenen planen Stahldrahtgeflechtes angebracht werden. Dieses Konstrukt wird der Ratte in Narkose angelegt, wobei das zu immobilisierende Hinterbein zwischen die beiden Stahlgitter mit Klebeband befestigt wird. Eine Wattepolsterung verhindert Hautulzerationen. Im Vergleich zur Immobilisation mit Gips beträgt das Gewicht dieser Konstruktion nur etwa 4 % des Körpergewichts der Ratten. Außerdem handelt es sich um eine preislich sehr günstige Alternative. Allerdings bedeuten die Anfertigung und das Anlegen dieser Immobilisationsvorrichtung einen relativ hohen technischen und zeitlichen Aufwand. Da durch die fortschreitende Muskelatrophie auch eine Reduktion des Gliedmaßenumfangs eintritt, kann es wie bei der Immobilisation mit Gips oder Schiene unter Umständen zu einer Lockerung der Immobilisation kommen (COUTINHO et al., 2002).

• **Hindlimb unloading**

Hindlimb unloading bedeutet eine Entlastung der Hintergliedmaßen. Hierbei werden die Ratten über eine Drahtfederapparatur an ihrem Schwanz aufgehängt, so dass ihre beiden Hinterbeine keinen Bodenkontakt mehr haben. Die Höhe der Aufhängung wird so eingestellt, dass die Tiere etwa in einem 35 bis 40° Winkel, kopfüber hängend, gerade noch mit den Vorderfüßen auf den Boden kommen. Mit Hilfe der Vorderbeine können sie sich somit im gesamten Käfig fortbewegen. Durch die fehlende Belastung tritt in den beiden Hinterbeinen eine Inaktivitätsmuskelatrophie auf. Dieses Modell wird vor allem in Studien zur Schwerelosigkeit in der Weltraumforschung angewandt. Im Vergleich zu anderen Immobilisationsmodellen, wird in diesem Modell jedoch keine stabile Immobilisation erreicht, da die Tiere die entlasteten Gliedmaßen frei bewegen können (BLOOMFIELD et al., 2002; ITAI et al., 2004).

• Externe Fixation

ZARZHEVSKY et al. (1999) beschrieben die Vorgehensweise zur externen Fixation des Kniegelenkes folgendermaßen: Zunächst werden in Femur und Tibia von lateral jeweils ein Kirschnerdraht eingebracht. Diese werden dann an ihren beiden Enden jeweils mit einem Messingstab verbunden, so dass ein stabiles Rahmengerüst entsteht. Das Kniegelenk wird über diesen Fixateur externe in einem Winkel von etwa 40 bis 50° immobilisiert. Das Gewicht dieser Immobilisationsvorrichtung beträgt insgesamt nur 12 g. Mit diesem Modell wird eine sehr stabile Fixierung erzielt. Der Nachteil liegt jedoch in der Infektionsgefahr, die durch den Kontakt der Fixierungsdrähte zur Außenwelt besteht. Zudem können sich die Tiere unter Umständen an der relativ sperrigen Apparatur verletzen (ZARZHEVSKY et al., 1999).

• Interne Immobilisation mit Kirschnerdrähten

In das zu immobilisierende Hinterbein wird je ein Kirschnerdraht in die Knochen des Sprunggelenkes und des Knies der Tiere eingebracht und zwar so, dass beide Gelenke in Beugstellung jeweils in einem Winkel von ca. 90 ° fixiert werden. Die überstehenden Enden der Drähte werden entfernt und die Haut darüber verschlossen. Das kontralaterale nicht immobilisierte Bein dient als Kontrolle. Zusätzlich wird bei einer Gruppe von Kontrolltieren eine Schein-Immobilisierung, die so genannte Sham-Immobilisation, vorgenommen, um auszuschließen, dass die gefundenen Ergebnisse durch Operationsstress oder systemische Effekte dieser Prozedur bedingt sind bzw. verfälscht werden. Hierbei werden die Tiere den gleichen chirurgischen Manipulationen unterzogen, nur dass die Immobilisation durch Entfernung der Drähte sofort wieder aufgehoben wird. Die Vorteile dieses Modells liegen vor allem in einer gleich bleibend hohen Stabilität der Fixierung unabhängig von der Umfangsreduktion der Gliedmaße und der weitgehenden Asepsis, da die Drahtenden nicht in Kontakt mit der Außenwelt stehen (IBEBUNJO et al., 1997; IBEBUNJO und MARTYN, 1999).

(Die Immobilisationsmethode von IBEBUNJO et al. diente auch als Vorlage für die vorliegende Studie.)

2.3.3 Kombinationsmodell

Eine Reihe von Studien hat sich bereits mit den Auswirkungen von Immobilisation oder Inflammation als isolierte Faktoren auf die neuromuskuläre Funktion und/oder auf das histologische Bild befasst. Da es sich aber, wie schon von OP DE COUL et al. (1991) beschrieben, bei der CIPM um ein multifaktorielles Geschehen handelt, erscheint zur Untersuchung dieses Erkrankungskomplexes die Anwendung eines Modells sinnvoll, in dem die beiden Faktoren Immobilisation und systemische Inflammation gleichermaßen berücksichtigt werden.

Ein solches Kombinationsmodell wurde erstmalig in unserem Labor entwickelt und in der vorangegangenen Studie etabliert (UNTERBUCHNER, 2006; LENZ, in Vorb.). Kombiniert wurde ein Sepsismodell, bei dem eine chronische, systemische Inflammation durch mehrmalige i.v. Injektionen von *Corynebakterium parvum* hervorgerufen wurde, mit einem Immobilisationsmodell mit Kischnerdrähten, wie von IBEBUNJO et al. (1997; 1999) beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Effekte der einzelnen Faktoren auf das neuromuskuläre System durch die Kombination gegenseitig sogar verstärken (UNTERBUCHNER, 2006; LENZ, in Vorb.).

2.4 Der Skelettmuskel und seine Myopathologien

2.4.1 Normalstruktur der quergestreiften Muskulatur

Skelettmuskelfasern sind große vielkernige Zellen, die durch die Fusion mehrerer Myoblasten entstehen. Länge und Breite von Muskelfasern können von einem Muskel zum anderen erheblich variieren. Sie sind in Bündeln von unterschiedlicher Dicke angeordnet, den so genannten Faszikeln. Innerhalb eines Faszikels verlaufen die Muskelfasern parallel. Die Anzahl der Fasern pro Faszikel kann sehr unterschiedlich sein. Den Querschnitt einer Muskelfaser bezeichnet man als Faserkaliber. Dieses wird maßgeblich beeinflusst durch Alter, Geschlecht und Trainingszustand. Das Stütz- und Bindegewebe des Muskels kann man unterteilen in Epimysium, das die bindegewebige Hülle des gesamten Muskels darstellt, Perimysium, das sich aus Ausläufern des Epimysiums zwischen die einzelnen Faszikel zusammensetzt und auch die Blut- und Lymphgefäße sowie die Nervenfaszikel umhüllt, und

schließlich das Endomysium, das als feines Netz jede einzelne Muskelfaser umgibt. Hier liegen auch die Kapillaren und Nervenfasern (SCHRÖDER, 1982).

2.4.2 Histochemische Muskelfasertypen

Man kann Muskelfasern anhand ihrer Kontraktionsgeschwindigkeit einteilen in langsame Zuckungsfasern, so genannte Typ-S-Fasern (S = slow), und schnelle Zuckungsfasern, Typ-F-Fasern (F = fast). Schnelle Zuckungsfasern kontrahieren sich auf ein Aktionspotential hin schnell nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip. Diese Form herrscht in fast allen Skelettmuskeln vor. Die langsamen Zuckungsfasern benötigen mehrere Nervenimpulse, die zu einer langsamer verlaufenden, lang anhaltenden, feiner abgestimmten Kontraktion führen. Diese Fasern sind relativ schmal, myoglobin- und mitochondrienreich, wenig ermüdbar und z.B. in den Augenbewegungsmuskeln, den Muskeln des Mittelohrs und des oberen Ösophagus zu finden (WELSCH, 2003).

Die Typ-F-Fasern lassen sich histochemisch nochmals in drei Subtypen unterteilen:

-schnelle „rote“ Fasern

-schnelle „weiße“ Fasern und

-intermediäre Fasern

Schnelle rote Fasern oder *Typ1-Fasern* haben nativ eine dunkelrote Farbe, sind schlank, enthalten viele Mitochondrien, wenig Glykogen und sind reich mit Kapillaren versorgt. Die ATP-Bildung ist meist aerob, sie kontrahieren sich langsamer als die weißen Fasern, ermüden aber auch weniger schnell.

Schnelle weiße Fasern oder *Typ2A-Fasern* haben nativ eine hellere rote Farbe, sind relativ dick, enthalten wenige Mitochondrien und viel Glykogen. Die ATP-Synthese geschieht hauptsächlich anaerob. Dieser Fasertyp kontrahiert sich schnell und ermüdet schnell.

Intermediäre Fasern oder *Typ2B-Fasern* verhalten sich in vielen Merkmalen intermediär zwischen weißen und roten Fasern. Sie kontrahieren sich jedoch wie die weißen Fasern sehr schnell (WELSCH, 2003).

Färbungen zur Fasertypendifferenzierung:

Um die verschiedenen Muskelfasertypen unterscheiden zu können, gibt es diverse histochemische und enzymhistochemische Färbemethoden. Zwei davon sollen im Folgenden kurz erklärt werden:

Myofibrilläre ATPase-Reaktion:

Die Kontraktionsgeschwindigkeit einer Muskelfaser und die Aktivität ihrer myofibrillären Adenosintriphosphatase (ATPase) korrelieren direkt miteinander. In schnellen Muskeln ist die ATPase dreimal so aktiv wie in langsamen. Außerdem ist sie in schnellen Typ2-Fasern alkalistabil und säurelabil, während es sich bei den langsamen Typ1-Fasern genau umgekehrt verhält. Durch Präinkubation bei verschiedenen pH-Werten, erhöht sich je nach pH-Wert die Aktivität entweder der sauren oder der alkalischen ATPase. Die unterschiedlichen ATPase-Aktivitäten lassen sich dann durch eine unterschiedlich starke Färbung nachweisen, wodurch eine Unterscheidung der verschiedenen Fasertypen möglich ist (SCHRÖDER, 1982).

Perjodsäure-Schiff-(PAS)-Reaktion:

In der PAS-Färbung stellen sich kohlenhydrathaltige Komponenten, wie Glykoproteine, verschiedene Polysaccharide und Mukopolysaccharide rot-violett dar. Im Muskel färben sich hierdurch, je nach Glykogengehalt der Muskelfasern, diese unterschiedlich stark an. Das bedeutet, die langsameren, oxidativen Typ1-Fasern, die wenig Glykogen enthalten, werden bei der PAS-Reaktion kaum oder gar nicht angefärbt, die schnelleren, glykolytischen Typ2-Fasern, mit viel Glykogen, weisen hingegen eine kräftig violette Färbung auf. Intermediäre Fasern färben sich etwas leichter violett an (WELSCH, 2003).

Um Missverständnisse zu vermeiden, ist es wichtig zu wissen, dass die intermediären Fasern in der PAS-Färbung als Typ2B-Fasern bezeichnet werden, im Gegensatz zu den histochemischen Färbungen mit oxidativen Enzymsystemen wie die myofibrilläre ATPase-Reaktion, bei denen die intermediären Fasern die Typ2A-Fasern darstellen (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

2.4.3 Allgemeine histopathologische Reaktionen der Skelettmuskulatur

Die meisten histopathologischen Veränderungen im Muskel sind sehr unspezifisch und eher selten an sich pathognomonisch für eine bestimmte Erkrankung. Allerdings lassen sich durch bestimmte Konstellationen verschiedener Veränderungen Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Krankheitskomplex ziehen. Die Veränderungen im Muskel bestehen im Wesentlichen aus Variationen der Fasergröße wie Kaliberschwankungen, Atrophie und Hypertrophie, aus Kernveränderungen, Degeneration und Regeneration, Bindegewebsvermehrung, zelluläre Reaktionen, und Änderungen in der Fasertypenverteilung (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

Da sie die Grundlage für die histologische Beurteilung von Muskelproben darstellen, wird im Folgenden näher auf diese einzelnen Veränderungen eingegangen:

Kalibervariationen:

Die Querschnitte der Muskelfasern zeigen eine natürliche Variationsbreite, die von vielen Faktoren abhängt. Das Spektrum der Faserdurchmesser liegt ungefähr zwischen 40 und 100 μm , je nach untersuchtem Muskel, Alter, Geschlecht und Trainingszustand. Im histologischen Präparat zeigt sich dem Untersucher physiologischerweise ein relativ homogenes Bild (WELSCH, 2003).

Da die Länge der Muskelfasern innerhalb eines Muskels stark variiert und somit nicht alle Fasern von einem Ende des Muskels zum anderen verlaufen, kann es allerdings passieren, dass sich im histologischen Querschnitt sowohl Muskelfasern befinden, die wie gewünscht etwa auf Höhe der Fasermittte angeschnitten sind, als auch Fasern, die an ihren konisch zugespitzten Faserenden getroffen sind. Dadurch kann der Eindruck von Kaliberschwankungen entstehen, die in diesem Fall jedoch physiologisch sind. Als pathologische Kalibervariation wird ein vermehrtes Auftreten von atrophischen und/oder hypertrophischen Fasern bezeichnet (SCHRÖDER, 1982). Eine solche Veränderung sieht man oft bei myopathischen Erkrankungen (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

Faseratrophie:

Eine Faseratrophie liegt dann vor, wenn die Faserdurchmesser deutlich kleiner als 40 μm sind. Ursachen hierfür können Läsionen des Zentralnervensystems, Denervation oder verschiedene Myopathien sein, aber auch Inaktivität, Hungern, Senilität oder Kachexie (SCHRÖDER, 1982). Während die atrophischen Fasern bei Myopathien eher einzeln verteilt auftreten, sind sie bei Denervationen oft in kleineren oder auch größeren Gruppen zu finden (DUBOWITZ und BROOKE, 1973). Eine Atrophie kann entweder beide Fasertypen gleichermaßen betreffen oder sich auf einen beschränken. Bei Inaktivitätsatrophie durch Immobilisation z.B. ist häufig eine selektive Typ2-Faseratrophie zu verzeichnen. Eine deutliche Reduktion der Fasergröße ist erst nach zwei oder mehr Wochen erkennbar. Später folgen meist verschiedene Degenerationserscheinungen (SCHRÖDER, 1982).

Eine Sonderform der atrophischen Fasern stellen die angulären Fasern dar. Der Begriff „angular“ aus dem Englischen bedeutet eckig und resultiert daraus, dass solche Fasern im Querschnitt stark eingedellt sind und somit eine „igelige“ Kontur besitzen. Sie liegen einzeln verteilt zwischen den anderen Fasern und können durch Denervierung entstehen, kommen aber auch bei endokrinen Myopathien und zahlreichen anderen Erkrankungen vor. Ihr Auftreten ist also relativ unspezifisch. Auch regenerierte Muskelfasern können atrophisch erscheinen, solange noch keine Reinnervation stattgefunden hat (SCHRÖDER, 1982).

Faserhypertrophie:

Ab einem Durchmesser von etwa 100 bis 200 μm spricht man von einer Muskelfaserhypertrophie. Dabei ist die physiologische Aktivitäts- oder Trainingsbedingte Muskelhypertrophie von den pathologischen Formen wie die kongenitale Muskelhypertrophie zu unterscheiden. Sie kommen vor allem bei muskeldystrophischen Prozessen wie der myotonischen Dystrophie vor. Aber auch kompensatorische Faserhypertrophien bei chronischen Denervationsprozessen im Sinne chronischer Polyneuropathien können sehr ausgeprägt sein (SCHRÖDER, 1982).

Zentrale Kerne:

Jede Muskelfaser enthält eine große Anzahl, oft mehrere Hunderte bis Tausende, randständig gelegene Faserkerne (WELSCH, 2003). Normalerweise kommt beim Menschen unter 100 Fasern höchstens eine Faser mit einem binnenständigen Kern vor. 2 bis 3 Fasern auf 100 deuten schon auf eine pathologische Veränderung hin (SCHRÖDER, 1982).

Eine große Anzahl zentraler Kerne findet man fast ausschließlich bei Myopathien. Sie werden häufig mit der myotonischen Dystrophie assoziiert und sind das Hauptmerkmal bei der so genannten zentronukleären Myopathie. Eine Ausnahme unter den neurogenen Muskelerkrankungen stellen die chronischen peripheren Neuropathien dar, bei denen unter Umständen auch viele zentrale Zellkerne auftreten können (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

Fasernekrosen und Myophagie:

Am häufigsten unter den Fasernekrosen ist die segmentale Fasernekrose, auch bekannt als Zenkersche, wachstartige oder hyaline Degeneration. Sie betrifft nur einzelne Sarkomere und ist in fortgeschrittenen Stadien leicht an den verklumpten, homogen erscheinenden, „hyalinen“ Faserabschnitten oder später an leeren Sarkolemmschläuchen zu erkennen. Ihr Vorkommen ist völlig unspezifisch, denn sie ist bei fast allen Muskelerkrankungen zu finden, vor allem aber bei akuten nekrotisierenden Myopathien wie der Rhabdomyolyse. Am Ende des Faseruntergangs, unabhängig ob es sich dabei um eine segmentale oder eine ausgedehntere Muskelfasernekrose handelt, steht der Abbau des nekrotischen Muskelgewebes durch Makrophagen. Dieser Vorgang wird als Myophagie bezeichnet (SCHRÖDER, 1982). Die nekrotischen Fasern werden hierbei oft komplett von Makrophagen ausgefüllt (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

Faseraufspaltungen:

Longitudinale Faseraufspaltungen treten bei verschiedenen Prozessen auf, insbesondere nach Quetschtraumen und experimentell induzierten oder andersartigen Faserhypertrophien, sowie bei myotonischer Dystrophie und anderen primären Myopathien. Auch bei neurogenen Erkrankungen sind meist die hypertrophischen Fasern betroffen. In der Regel vereinigen sich

SCHRIFTTUM

die aufgespaltenen Muskelfaseranteile proximal und distal der Aufspaltungsstelle wieder mit den anderen Faseranteilen, so dass im Einzelfall schwer zu unterscheiden ist, ob es sich eher um regenerierte, unvollständig fusionierte oder um aufgespaltene, vorher intakte Fasern handelt (SCHRÖDER, 1982). Im histologischen Querschnitt erkennt man sie als größere Muskelfasern, die aus mehreren kleineren Stückchen zusammengesetzt sind. In einigen Fällen werden die Faserspaltstücke durch Bindegewebssepten voneinander getrennt. Entlang dieser Septen reiht sich häufig eine Vielzahl von Faserzellkernen auf (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

Regeneration von Muskelfasern:

Skelettmuskulatur regeneriert generell schlecht. Stark geschädigtes Muskelgewebe stirbt meist ab und wird durch bindegewebiges Narbengewebe ersetzt. Dadurch entsteht zwangsläufig ein Funktionsverlust. Wenn Zellmembran und Basallamina jedoch intakt sind und die Blut- und Nervenversorgung nicht unterbrochen ist, können Muskelfasern auch regenerieren. Dies geht von den Muskelfasern selber aus oder von so genannten Satellitenzellen, kleine, undifferenzierte, mononukleäre Zellen, die den Muskelfasern innerhalb der Basallamina unmittelbar anliegen (WELSCH, 2003).

Bindegewebsvermehrung:

Eine unspezifische Proliferation des interstitiellen Fett- und Bindegewebes kommt bei den verschiedensten myogenen, neurogenen und entzündlichen Erkrankungen vor (SCHRÖDER, 1982). Man unterscheidet eine perimysiale und eine endomysiale Fibrose, wobei letztere eindeutiger auf ein pathologisches Geschehen hinweist. Hierbei werden einzelne Muskelfasern aus ihren Zusammenhang gerissen und oft weit voneinander entfernt. Meist entwickelt sich eine Bindegewebsvermehrung eher sekundär zur Primärerkrankung, bei der Duchenne'schen Muskeldystrophie allerdings stellt sie den Hauptbefund dar (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

Zelluläre Reaktionen:

Bei pathologischen Muskelveränderungen nimmt die zelluläre Immunantwort oft verschiedene Formen an. Eine zelluläre Reaktion kann innerhalb der Fasern stattfinden, wie oben beschrieben bei der Myophagie, oder aber im Interstitium. Auf Gefrierschnitten ist der Leukozyten-Zelltyp meist schwieriger zu erkennen als in fixiertem Material. Die zelluläre Infiltration besteht zumeist aus Histiozyten, die sich dann zu Makrophagen entwickeln, und Lymphozyten. Selten spielen neutrophile Granulozyten oder Plasmazellen eine Rolle. Neben den Myophagien stellt sich eine starke zelluläre Reaktion auch in der massiven Anhäufung von Entzündungszellen um geschädigte oder nekrotische Fasern herum dar. Zelluläre Reaktionen wie die Infiltration durch Entzündungszellen sind nicht spezifisch und werden oft als Zeichen einer echten Muskelentzündung (Myositis) misinterpretiert (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

Fasertypenverteilung:

Stoffwechsel, Struktur und Kaliber der einzelnen Muskelfasern hängen von der neuromuskulären Impulsübertragung ab. Die enzymhistochemisch unterschiedlichen Typ1- und Typ2-Fasern liegen normalerweise „schachbrettartig“ nebeneinander und werden von verschiedenen Neuronen innerviert. Geht der Neurit eines peripheren Nerven zugrunde, dann wird sein Versorgungsgebiet vom Nachbarneuriten synaptisch mitversorgt (s. Abb. 2) (RIEDE und SCHÄFER, 1995). Diese so genannte kollaterale Reinnervation tritt vor allem nach akuter partieller Denervation auf (SCHRÖDER, 1982) und lässt sich anhand der Entstehung größerer Felder enzymhistochemisch einheitlich reagierender Muskelfasern erkennen (RIEDE und SCHÄFER, 1995). Ab einer Anzahl von ca. 50 Fasern eines Typs wird dieses pathologische Bild als *Fasertypengruppierung* bezeichnet (SCHRÖDER, 1982). Das histologische Präparat sollte Gruppen von beiden Fasertypen nebeneinander enthalten, um eine Verwechslung mit einer Fasertypenprädominanz (s. u.) ausschließen zu können. Die Gruppierungen können unter Umständen ganze Faszikel betreffen (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

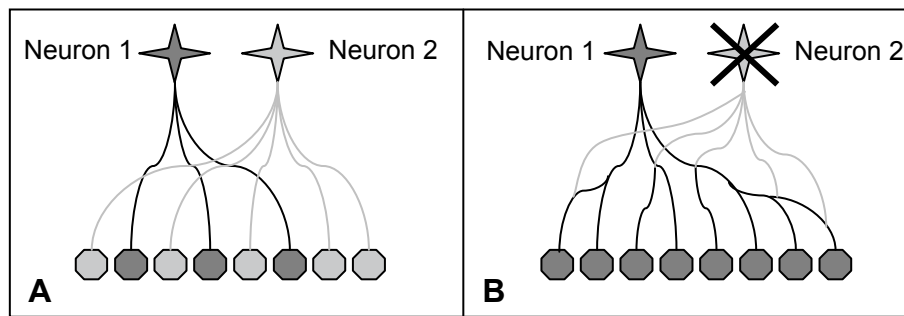


Abbildung 2: Fasertypengruppierung infolge kollateraler Reinnervation; nach RIEDE und SCHÄFER (1995)

- A** Normale Verhältnisse: Neuron 1 und Neuron 2 innervieren jeweils verschiedene Muskelfasern
- B** Zustand nach Ausfall von Neuron 2: Die diesem Neuron zugehörigen Fasern werden jetzt von Neuron 1 innerviert und enzymhistochemisch bestimmt

Die physiologische Verteilung der Fasertypen liegt bei gemischten Skelettmuskeln von Typ1 zu Typ2 etwa bei 1:2. Werden die Typ2-Fasern weiter unterteilt in ihre Subtypen, so ergibt sich ein Verhältnis von je einem Drittel Typ1, Typ2A und Typ2B. Bei der *Fasertypenprädominanz* tritt ein Fasertyp gehäuft auf. Als Typ1-Faserprädominanz bezeichnet man es, wenn mehr als 55% der Fasern dem Fasertyp 1 angehören. Eine Typ2-Faserprädominanz liegt vor, wenn Typ2-Fasern mehr als 80% von der Gesamtzahl der Fasern ausmachen. Für Typ2A und 2B gelten auch jeweils die 55% (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

Die Fasertypenverhältnisse sollten im Hinblick auf verschiedene Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht, physikalische Fitness und Trainingszustand sehr vorsichtig interpretiert werden, da diese die Ergebnisse entscheidend verändern können. Allein schon zwischen verschiedenen Muskeln eines Individuums kann die Fasertypenzusammensetzung beträchtlich variieren (DUBOWITZ und BROOKE, 1973). Manche Muskeln bestehen sogar physiologischerweise hauptsächlich aus einem einzigen Fasertypen, wie z.B. der *Musculus (M.) soleus*, der bei der Ratte nahezu vollständig aus Typ1-Fasern besteht (HERBISON et al., 1978; MINNAARD et al., 2005). Einen hauptsächlich gemischten Muskel stellt bei der Ratte z.B. der *M. gastrocnemius* dar (ARIANO et al., 1973).

Eine pathologische Typ1-Faserprädominanz findet man bei verschiedenen Myopathien, vor allem bei genetisch determinierten Dystrophien. Typ2-Faserprädominanz tritt bei Motoneuronen-Erkrankungen auf (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

Eine *Fasertypendefizienz* liegt vor, wenn einer der Fasertypen weniger als 10% der Gesamtfasern ausmacht (DUBOWITZ und BROOKE, 1973).

2.4.4 Spezielle Muskelpathologie

Die speziellen Muskelerkrankungen lassen sich einteilen in neurogen ausgelöste Muskelkrankheiten, auch als neurogene Muskelatrophien bezeichnet, Muskelerkrankungen, die vom Skelettmuskel selbst ausgehen, so genannte Myopathien, entzündliche, tumorartige und neoplastische Muskelerkrankungen, sowie Muskelveränderungen, die mit neuromuskulären Endplattenläsionen einhergehen (RIEDE und SCHÄFER, 1995).

Neurogene Muskelatrophien beruhen auf einer Störung oder Erkrankung der innervierenden Nervenfasern und treten bei degenerativen Prozessen des zentralen und/oder peripheren Nervensystems auf. Vorrangige morphologische und histopathologische Merkmale sind die deutliche Atrophie und muskuläre Hypotonie des Gesamtmuskels, sowie eine ausgeprägte Muskelfaseratrophie mit Formveränderung der Muskelfasern hin zu vorwiegend eckigen Faserquerschnitten. Durch Zusammenrücken der Faserkerne entsteht der Eindruck einer relativen Kernvermehrung, oft auch in Form von regelrechten Kernhaufen. Die Anzahl der Myofibrillen nimmt drastisch ab und die Muskelzellmembranen wirken wellig oder faltig. Muskelfasernekrosen treten erst bei länger anhaltenden Krankheitszuständen auf. Von der neurogenen Atrophie nach Nervenschädigung sind meist beide Muskelfasertypen betroffen, Typ2-Fasern jedoch im Allgemeinen stärker. Eine selektive Typ2-Faseratrophie kann man häufig nach der Stilllegung des Muskels ohne Nervenläsion, also im Zuge einer Inaktivitätsatrophie, und bei metabolisch induzierter Inaktivität beobachten (RIEDE und SCHÄFER, 1995).

Unter dem Begriff *Myopathie* werden alle diejenigen Muskelerkrankungen zusammengefasst, die entweder auf einen krankhaften, in der Skelettmuskulatur selbst entstandenen Prozess zurückgehen (progressive Muskeldystrophien, kongenitale und mitochondriale Myopathien) oder auf einer Mitbeteiligung der Skelettmuskulatur bei einer Allgemeinerkrankung des Organismus beruhen (metabolische, endokrine, ischämische, vaskuläre, toxische und

SCHRIFTTUM

paraneoplastische Myopathien). Bei den Myopathien sind die Muskelfasern im Allgemeinen regellos betroffen. Es treten häufig Kalibervariationen auf und auch zentrale Zellkerne können vermehrt beobachtet werden. Zahlreiche Muskelfasernekrosen und Faserregenerate bestimmen zudem das histologische Bild (RIEDE und SCHÄFER, 1995).

Entzündliche Muskelläsionen oder auch *Myositiden* können nochmals unterteilt werden in die eher selten auftretenden infektiösen Myositiden, die häufiger vorkommenden autoaggressiven Myositiden und die entzündlichen tumorartigen Läsionen. Infektiöse Myositiden sind entweder bakterieller, viraler oder parasitärer Ursache, selten auch mit Pilzen assoziiert. Ein Beispiel für die autoimmunmedierten Myositiden stellt die so genannte Polymyositis oder Dermatomyositis dar (RIEDE und SCHÄFER, 1995).

Endplattenläsionen sind Erkrankungen der motorischen Endplatte, die mit einer Störung der Impulsübertragung einhergehen. Als Beispiel ist hier vor allem die Myasthenia gravis zu nennen, bei der Autoantikörper zu einem Abbau der für die neuromuskuläre Übertragung notwendigen Azetylcholinrezeptoren führen. Wundstarrkrampf bzw. Tetanus und Botulismus sind ebenfalls in diese Kategorie einzuordnen (RIEDE und SCHÄFER, 1995).

Die *neoplastischen Läsionen* umfassen vor allem Rhabdomyome und Rhabdomyosarkome (RIEDE und SCHÄFER, 1995).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielvorstellung

Ziel des Gesamtprojektes ist es, die Auswirkungen von chronischer systemischer Inflammation und Immobilisation auf die neuromuskuläre Funktion und das histologische Bild der Skelettmuskulatur im Rattenmodell zu untersuchen. In einem vorangegangenen Projekt wurden die neuromuskulären (UNTERBUCHNER, 2006) und die histopathologischen Veränderungen (LENZ, in Vorb.) direkt nach der 12-tägigen Inflammations- und Immobilisationsphase beobachtet. In der vorliegenden Studie wird das Augenmerk insbesondere auf die Veränderungen in der Rehabilitationsphase im Anschluss an die gesetzte Schädigung gerichtet. Es soll hierbei ermittelt werden, inwiefern die Erholung des neuromuskulären Systems allein von der vorangegangenen Immobilisation bzw. der Inflammation abhängt und welchen Effekt eine Kombination der beiden Faktoren hinterlässt.

Die genaue Beschreibung des Aufbaus und der Durchführung der neuromuskulären Funktionstests innerhalb dieses Projekts, sowie detaillierte Ergebnisse sind der Arbeit von BUYAR (in Vorb.) zu entnehmen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich im Speziellen mit der Untersuchung und Beschreibung der in diesem Zusammenhang entstandenen histopathologischen Veränderungen im Muskel.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG in der Fassung vom 25.05.1998, BGBl I S.1105, zuletzt geändert am 06.08.2002, BGBl I S. 3082) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2 Material und Methodik

3.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Durchführung der Untersuchungen werden 258 männliche Sprague-Dawley Ratten (Fa. Charles River Deutschland, Sulzfeld) benötigt. Die Tiere werden mindestens 7 Tage vor Aufnahme in den Versuch angeliefert und in Gruppen von jeweils maximal fünf Tieren in Käfigen (Makrolon Typ 4) eingesetzt. Diese Akklimatisierungsphase gewährleistet eine Anpassung der Tiere an ihre Umgebung, sowie einen mikrobiellen Abgleich untereinander. Futter (ALTROMIN-Haltung 1324, Fa. Altromin, Lage) und Wasser aus einer Nippeltränke stehen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Einstreu in den Käfigen besteht aus entkeimtem und entstaubtem Weichholzgranulat (Fa. Altromin, Lage/Lippe).

Die Raumtemperatur im Tierstall beträgt 20 bis 23 °C, bei konstantem Luftwechsel und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60%. Ein Beleuchtungsprogramm erzeugt einen Wechsel zwischen Hell- (50 bis 100 Lux im Käfig) und Dunkelphasen von jeweils 12 Stunden.

3.2.2 Verwendete Tiermodelle

3.2.2.1 Inflammationsmodell

Als Inflammationsmodell dient die wiederholte Applikation von hitzeinaktiviertem Corynebakterium parvum (C.p.). Um eine ausreichend starke, chronische Inflammationsreaktion über zwölf Tage aufrecht zu erhalten, wird den Versuchstieren insgesamt drei Mal im Abstand von jeweils vier Tagen eine bestimmte Menge Bakterien parenteral appliziert. Die Ratten der Kontrollgruppe erhalten in gleicher Weise drei Mal eine volumenäquivalente Menge 0,9%ige Kochsalzlösung (NaCl).

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der C.p.-Injektionen und als Verlaufskontrolle der systemischen Inflammation, wird vor jeder Injektion bei allen Tieren die MetHb-Konzentration im Blut bestimmt. Als weiterer Parameter dient die tägliche Gewichtskontrolle der Tiere. Eine chronische Inflammationsreaktion bedingt eine deutliche Reduktion des Körpergewichts.

3.2.2.2 Immobilisationsmodell

Als Modell für die Immobilisation dient die Fixation von Knie- und Sprunggelenk eines Hinterlaufs über zwölf Tage mit Kirschnerdrähten. Die Drähte werden so in die Knochen eingebracht, dass beide Gelenke unbeweglich in einem Winkel von ca. 90° fixiert sind und weder Streck- noch Beugebewegungen durchführbar sind. Bei einem Teil der Tiere wird eine Schein-Immobilisierung vorgenommen, die so genannte Sham-Immobilisation. Hierbei werden die Kirschnerdrähte direkt nach dem Einbringen wieder entfernt. Diese Tiere erhalten somit dasselbe Operationstrauma wie die immobilisierten Tiere, können sich danach aber frei bewegen. Um Seitendifferenzen auszuschließen, wird randomisiert entweder das rechte oder das linke Hinterbein operiert. Das immobilisierte bzw. sham-immobilisierte Bein wird als Op-Bein bezeichnet, das jeweils andere, kontralaterale Bein dient als Kontrolle.

3.2.3 Versuchsplan und Versuchsgruppen

Nach der Akklimatisierungsphase im Tierstall werden die Ratten mit einem Ausgangskörpergewicht von 275 bis 325 g in den Versuch aufgenommen. Dieser beginnt am Tag -12 mit der Immobilisation (Immob) bzw. Sham-Immobilisation (Sham) eines Hinterlaufs, sowie der ersten Injektion von C.p.-Suspension bzw. Kochsalzlösung. Weitere Injektionen finden an den Tagen -8 und -4 statt. Am Tag 0 werden bei allen immobilisierten Tieren die Kirschnerdrähte in einer Kurznarkose entfernt. Die sham-immobilisierten Tiere werden einer erneuten Scheinoperation unterzogen. Im Anschluss an diese zweite Operation folgt die Erholungsphase, wobei vier unterschiedlich lange Erholungszeiträume unterschieden werden: 0 Tage, 4 Tage, 12 Tage und 36 Tage. Der letzte Tag der Erholungsphase in jeder Zeitgruppe entspricht dem so genannten Messtag, an dem die neuromuskulären Funktionstests und nach vorangegangener Euthanasie durch Blutentzug die Probenentnahmen stattfinden. Die Einteilung der Tiere in die verschiedenen Untergruppen geschieht randomisiert.

Am Tag der Messung werden die Ratten in tiefe Allgemeinanästhesie versetzt und in vivo folgende Messgrößen erhoben: Neben der regelmäßigen Kontrolle der Vitalparameter, Elektrolyte und Blutgase im Rahmen des Narkose-Monitorings, sowie der Messung der MetHb-Konzentration, wird mit Hilfe der evozierten Mechanomyographie eine Messung der Muskelkontraktionskraft des Musculus (M.) tibialis cranialis sowohl vom Op-Bein als auch vom Kontrollbein vorgenommen. Zusätzlich wird die Pharmakodynamik von Succinylcholin

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

getestet. Genaue Vorgehensweise und Ergebnisse beider Messungen sind Thema einer anderen Doktorarbeit (BUYAR, in Vorb.). Weiterhin werden aus dem gewonnenen Blut bzw. Serum der Ratten der Gehalt von α_1 -saurem Glykoprotein (α_1 -AGP) und von Plasma-Cholinesterase, sowie von TNF- α , IL-6 und IL-10 ermittelt. In vitro wird die Expression der Azetylcholinrezeptoren auf dem M. tibialis cranialis bestimmt. Auch dies ist Thema der Arbeit von BUYAR (in Vorb.). Nach der Euthanasie durch Blutentzug wird für die histologische Beurteilung ein Bauch des M. gastrocnemius jeweils von Op- und Kontrollbein entnommen.

Während der 12-tägigen systemischen Inflammation werden die Tiere täglich gewogen, klinisch beurteilt und die Immobilisation auf ihre Stabilität überprüft.

Aufgrund verschiedenartiger Ausfälle reduziert sich im Laufe des Versuchs die Gesamtzahl der Tiere, die in die Versuchsauswertung eingehen, von 258 auf 160 Tiere (s. Kap. 3.3 Ergebnisse). Dadurch ergeben sich Gruppengrößen von $n = 40$ Tieren pro unterschiedlichen Erholungszeitpunkt bzw. von $n = 10$ Tieren pro Schädigungskombination (s. Abb. 3).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

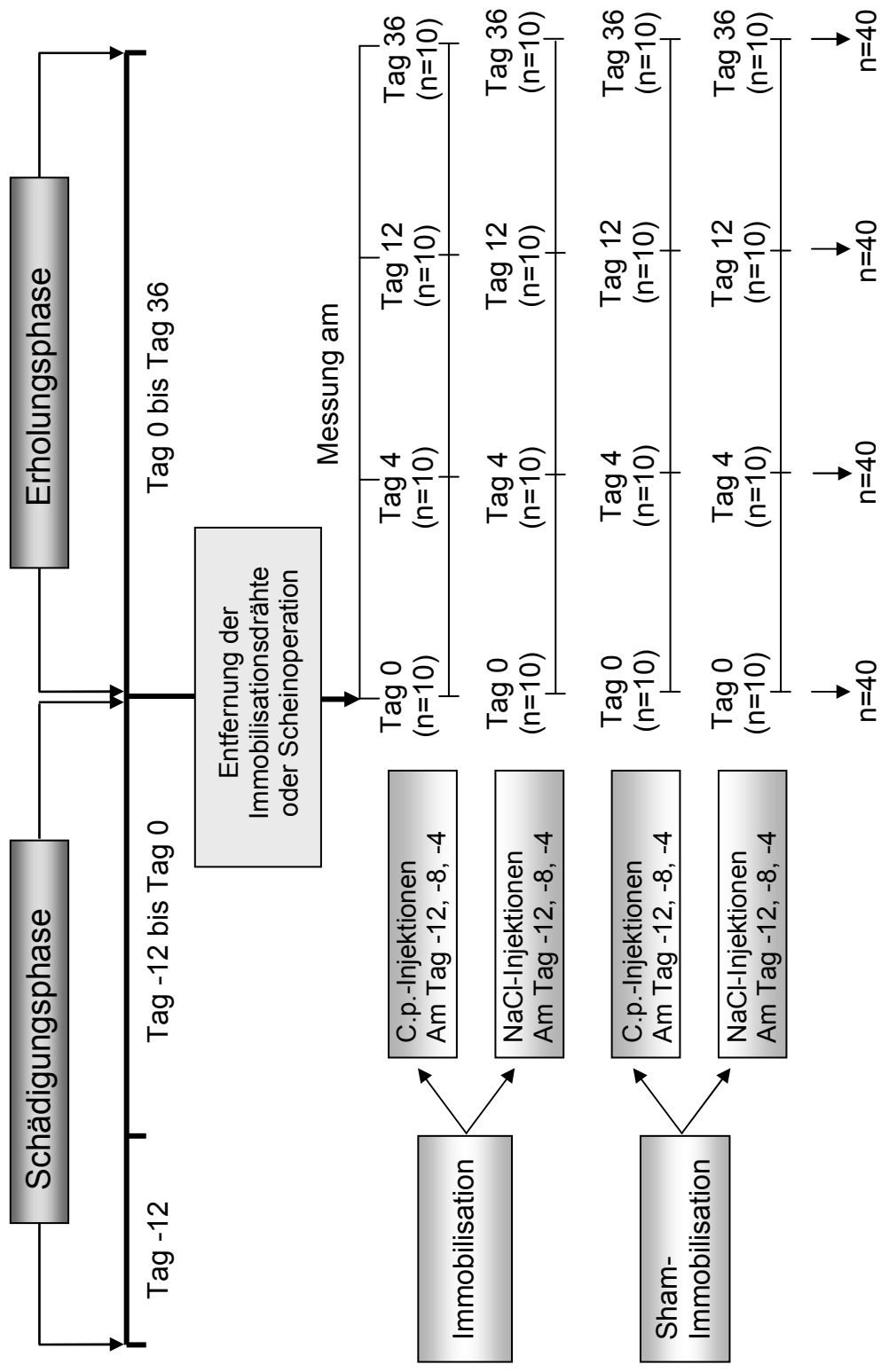


Abbildung 3: Graphische Darstellung zur Gruppeneinteilung der ausgewerteten Tiere

3.2.4 Narkose

3.2.4.1 Anästhesie zur Gelenksfixation und den Injektionen

Sämtliche kleinere Interventionen an den Ratten, wie die Immobilisierungs- bzw. Schein-Immobilisierungsoperation, sowie die mehrfachen C.p.- bzw. NaCl-Injektionen und auch die Entfernung der Kirschnerdrähte am Tag 0, werden in Inhalationsnarkose durchgeführt.

Die Narkoseeinleitung erfolgt in einer Ganzkörper-Plexiglaskammer mit Sevofluran (Fa. Abbott, Wiesbaden). Nach Bewusstseinsverlust werden die Tiere aus der Kammer entnommen und mit ihrer Schnauze in eine mit einer Gummimembran abgedichteten Kopfkammer gesteckt. Bei Spontanatmung und einem kontinuierlichen Fluss von 4 bis 6 Vol.% Sevofluran in reinem Sauerstoff erreichen die Tiere schnell das erwünschte chirurgische Toleranzstadium. Nach Abschluss der Manipulationen, wird die Sevofluran-Zufuhr beendet und die Tiere erhalten bis zum Erwachen reinen Sauerstoff. Die Aufwachphase dauert nur wenige Minuten.

3.2.4.2 Anästhesie am Tag der Messung

Am jeweiligen Messtag, zum Ende der gruppenspezifischen Beobachtungszeit, wird die Narkose ebenfalls mit Sevofluran in einer Ganzkörperkammer eingeleitet. Sobald die Anästhesie tief genug ist, werden die Tiere mit Hilfe eines zu diesem Zwecke veränderten Kinderlaryngoskops (Laryngoskop mit zurechtgesägtem Macintosh-Spatel Größe 1, Fa. Dräger Medizintechnik, Lübeck) endotracheal intubiert. Den Tubus stellt eine zurechtgeschnittene Venenverweilkanüle (14-16 G, BD Venflon™ Pro, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) dar. Die Tiere werden zunächst mit einem Atemzugvolumen von 10 ml/kg Körpergewicht bei einer Atemfrequenz von 60/min volumenkontrolliert beatmet (Small Animal Ventilator, Model 683, Fa. Harvard Apparatus, South Nattick, USA). Nun erfolgt die Gefäßpräparation und Kanülierung der rechten Vena (V.) jugularis externa und ebenso der rechten Arteria (A.) carotis communis. In dieser Zeit wird den Tieren zur Aufrechterhaltung der Anästhesie über den Tubus 4 bis 6 Vol.% Sevofluran in einem Sauerstoff-Luft-Gemisch (FiO₂: 40%) zugeführt. Sobald die Gefäßzugänge gelegt sind, ist es möglich, arterielles Blut zur Ermittlung der Blutgaswerte zu gewinnen und infolge dessen das Atemminutenvolumen

so einzustellen, dass sich der arterielle Kohlendioxidpartialdruck (PaCO_2) im Bereich zwischen 35 und 45 mmHg befindet.

Über den Zugang zur V. jugularis externa kann nun die Narkose auf die intravenöse Gabe von Fentanyl (Fentanyl-Janssen, Fa. Janssen-Cilag, Tilburg, Niederlande) in einer Dosierung von 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ und Propofol (Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg) in einer Dosierung von 20 - 40 $\text{mg}/\text{kg}/\text{h}$ umgestellt werden. Die Dosierungen werden über zwei Perfusoren (Syringe Pump, Fa. Harvard Apparatus, Holliston, USA) gesteuert und bei Bedarf je nach Narkosetiefe nachreguliert.

3.2.4.3 Narkose-Monitoring am Tag der Messung

Zur Kontrolle der Narkosetiefe, um kritischen Situationen vorzubeugen, aber auch um die Versuchsbedingungen möglichst konstant zu halten, ist es wichtig während der gesamten Narkosedauer eine umfassende Narkose-Überwachung anhand verschiedener Parameter durchzuführen. Im Einzelnen sind dies der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), die Herzfrequenz, die Atmung, die Körpertemperatur, Blutgase, Hämoglobin, Hämatokrit, verschiedene Elektrolyte und der Blutzucker.

Blutdruck: Er wird invasiv über den Katheter in der rechten A. carotis communis gemessen. An eben diesen Katheter schließt sich ein Druckdom (MX 960, Fa. Medex, Haslingden, Rossendale, Groß Britannien) an. Ein Beutel mit 0,9%iger NaCl-Lösung dient zur Erzeugung des Gegendruckes, sowie auch als Gegenspülung. Hinter dem Druckdom läuft die Verbindung weiter zur Messapparatur (Cardiicap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland). Ein Druckausgleich vor Versuchsbeginn dient der Kalibrierung des Gerätes.

Herzfrequenz: Sie erhält man durch Auszählen der systolischen Zacken der arteriellen Blutdruckkurve.

Atmung: Die Überwachung der Atmung übernimmt ein Atemgasmonitor (Capnomac Ultima, Fa. Datex, Helsinki, Finnland). Angezeigt werden die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von CO_2 und O_2 , der FiO_2 , sowie die Atemfrequenz und der Beatmungsdruck.

Körpertemperatur: Eine in den Enddarm eingeführte Temperatursonde (EXACON[®], Fa. Asmuth Medizintechnik, Minden) misst die Körperinnentemperatur; die Messwerte werden am Monitor des Cardiicap II (s.o.) angezeigt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Arterielle Blutgase, Elektrolyte und Blutglukose: Zu festgelegten Messzeitpunkten wird der Ratte jeweils 175 µl arterielles Blut in einer heparinisierten Kapillare (MULTI CAP, Fa. Bayer, Fernwald) entnommen. Mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes (Rapidlab 860, Fa. Bayer Vital, Fernwald) erhält man den pH-Wert im Blut, den arteriellen Sauerstoffpartialdruck (PaO₂), den arteriellen Kohlendioxidpartialdruck (PaCO₂), den Basenexzess (BE) und das Standard-Bicarbonat (HCO³⁻), außerdem auch das Gesamthämoglobin, den Hämatokrit, das Methämoglobin und einige Elektrolyte (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻). Der Blutzuckergehalt wird mit einem Schnelltestgerät (ACCU-CHEK[®], Sensor, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) ermittelt.

Während des gesamten Versuchsablaufs sollten möglichst konstante Bedingungen herrschen. Dies beinhaltet auch die Aufrechterhaltung von stabilen hämodynamischen und physiologischen Verhältnissen. Um das zu erreichen, müssen für verschiedene Parameter Grenzwerte festgelegt werden. Diese sind im Einzelnen:

- MAP > 75 mmHg
- pH: 7,35 bis 7,45
- Basenexzess: - 2 bis + 2
- PaCO₂: 35 bis 45 mmHg
- Blutzucker: > 70 mg/dl
- Körpertemperatur: 36 bis 38 °C

Um die Körpertemperatur des Tieres möglichst konstant zwischen 36 und 38 °C zu halten, wird eine über dem Tier angebrachte Wärmelampe nach Bedarf ein- oder ausgeschaltet. Falls nötig, kann zur Korrektur abweichender Werte im Säure-Basen-Haushalt eine Veränderung des Atemminutenvolumens vorgenommen oder 8,4%iges Natriumbicarbonat (Fa. DeltaSelect, Pfullingen) intravenös verabreicht werden. Ein Anstieg des Blutdruckes oder der Herzfrequenz wird als unbewusste Schmerzreaktion gewertet. Dem wird durch Vertiefung der Narkose entgegengewirkt.

3.2.5 Instrumentierung

3.2.5.1 Bakterieninjektion

Nach Narkoseeinleitung wird die Ratte in Rückenlage positioniert und ihr Kopf in eine spezielle Kopfkammer gesteckt. Über diese Kopfkammer wird dem Tier unter Spontanatmung das Narkosegas Sevofluran zugeführt. Danach legt man eine Venenverweilkanüle (BD Vasculon™ Plus, 26 G, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) in die Vena dorsalis penis. Aus dieser wird zunächst mit einer Glaskapillare 175 µl Blut zur Bestimmung des MetHb-Spiegels entnommen. Den Tieren, die der C.p.-Gruppe zugeordnet sind, werden daraufhin 56 mg/kg Körpergewicht hitzeinaktiviertes C.p. (Fa. Roche, Penzberg) in einem Gesamtvolumen von 0,6 ml injiziert. Abschließend wird die Venenverweilkanüle mit 0,4 ml physiologischer Kochsalzlösung (Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg) gespült und dann entfernt. Die Versuchstiere der NaCl-Gruppe erhalten in gleicher Abfolge anstatt des C.p. eine Injektion mit 1,0 ml physiologischer Kochsalzlösung in die Vene.

3.2.5.2 Immobilisation

Nach der Bakterieninjektion erfolgt die Immobilisierungs- bzw. Schein-Immobilisierungsoperation. Dazu verbleibt das Tier in Rückenlage mit dem Kopf in der Kopfkammer, über die weiterhin Narkosegas zugeführt wird. Die zu operierende Hintergliedmaße wird geschoren und gründlich desinfiziert (Sterilium pure, Fa. Bode Chemie, Hamburg). Das Versuchstier wird mit Ausnahme der zu operierenden Extremität mit steriler Klebefolie abgedeckt (Secu-Drape®, Fa. Sengewald Klinikprodukte, Rohrdorf-Thansau). Unter diesen sterilen Kautelen erfolgt die Inzision der Haut und Unterhaut im plantaren Bereich des Calcaneus. Über diesen Schnitt wird ein Kirschnerdraht (Durchmesser 1 mm, Fa. Bühler Instrumente Medizintechnik, Tuttlingen) durch den Calcaneus in die distale Tibia per Hand eingeschraubt. Der derart eingebrachte Draht fixiert somit das Sprunggelenk in einem Winkel von ca. 90° intern. Die überstehenden Enden des Kirschnerdrahtes werden bündig am Knochen abgewickelt und die Hautinzision mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (ETHICON™, PROLENE™, 4-0, Fa. Johnson & Johnson, St-Stevens-Woluwe, Belgien) verschlossen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Immobilisation des Kniegelenks erfolgt durch einen kleinen Hautschnitt oberhalb der Tuberositas tibiae. Über diesen wird ein zweiter, identischer Kirschnerdraht durch das Kniegelenk in den distalen Femur vorgeschoben. Auch hier werden die Enden bündig am Knochen abgewickelt und die Hautinzisionen vernäht. Auf diese Weise ist auch das Kniegelenk in einem Winkel von ca. 90° intern fixiert.

Da das Hüftgelenk bei diesem Modell nicht fixiert wird, sind die Tiere weiterhin in der Lage sich frei im Käfig zu bewegen.

Die Gruppe der sham-immobilisierten Tiere unterzieht sich derselben Operation mit identischer Einbringung der zwei Kirschnerdrähte zur Fixierung von Knie- und Sprunggelenk. Die Drähte werden hier allerdings sofort wieder entfernt, sobald ihre korrekte Lage überprüft wurde. Die Narkose an sich, die Narkosedauer und das operative Trauma sind demnach bei immobilisierten und sham-immobilisierten Tieren identisch. Einziger Unterschied zwischen den Gruppen ist die post-operativ bestehende Unbeweglichkeit eines Beines in der Immobilisations-Gruppe.

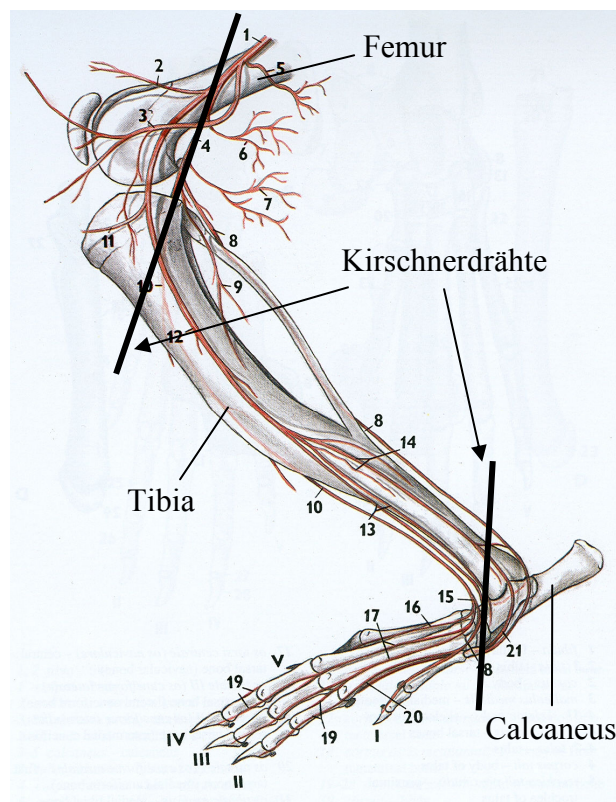


Abbildung 4: Darstellung der Lage der eingebrachten Kirschnerdrähte; Knochen und Gefäßversorgung des distalen Abschnitts der rechten Hintergliedmaße bei der Ratte, Ansicht von medial; nach POPESKO (2002)

3.2.5.3 Gefäßpräparation

Am Ende der Beobachtungszeit, dem Messtag, werden die Tiere nach Narkoseeinleitung und endotrachealer Intubation in Rückenlage verbracht und an ein Beatmungsgerät angeschlossen. Um die Anästhesie von Inhalations- auf Injektionsanästhetika umstellen zu können und aus Gründen des hämodynamischen Monitorings, erfolgt die Präparation der V. jugularis externa und der A. carotis communis. Hierfür wird die Haut über der Präparationsstelle auf der rechten Halsseite geschoren und desinfiziert (Sterilium pure, Fa. Bode Chemie, Hamburg).

Es erfolgt ein Hautschnitt paramedian oberhalb des rechten Schlüsselbeins. Das subkutane Gewebe wird stumpf durchtrennt und die im Sulcus jugularis zwischen M. brachiocephalicus und M. sternooccipitalis gelegene V. jugularis externa freipräpariert. Das Ausspannen der Vene auf die Branchen einer Mikropinzette erzeugt eine vorübergehende Blutleere im Gefäß, um bei Punktion der Vene und Platzierung der Katheter einen Blutverlust zu vermeiden. Über eine kleine Inzision werden zwei Polyethylen-Katheter (Fa. Dispomedica, Hamburg) in die Vene eingeführt und bis in die V. cava cranialis vorgeschoben. Ein zirkulärer Knoten mit nicht einschneidendem Faden um das Gefäß und den darin liegenden Kathetern fixiert die Katheter in der Vene. Ab diesem Zeitpunkt kann nun die Anästhesie umgestellt werden. Anstatt der gasförmigen Narkosemittel über den Tubus, werden intravenöse Narkose- und Schmerzmittel über die Katheter verabreicht, außerdem je nach Bedarf auch Natriumhydrogencarbonat oder Glukose 50% (Fa. DeltaSelect, Pfullingen).

Zur Freilegung der A. carotis communis muss sie ventrolateral der Trachea aufgefunden und von den sie begleitenden Strukturen, dem Truncus vagosympathicus und der V. jugularis interna, schonend stumpf freipräpariert werden. Mit derselben Technik wie zur Venenpunktion wird ein Polyethylenkatheter unter Blutleere in die A. carotis vorgeschoben und mit einem Knoten fixiert. Dieser Katheter dient der Blutentnahme zur arteriellen Blutgasanalyse, der arteriellen Blutdruckmessung und der Tötung des Tieres am Versuchsende durch Blutentzug.

3.2.5.4 Serumgewinnung, Leber- und Muskelentnahme

Nachdem am Versuchstag im Rahmen der evozierten Mechanomyographie die Messung der Muskelkontraktionskräfte der Musculi (Mm.) tibiales craniales beider Hintergliedmaßen durchgeführt wurde und alle benötigten Messwerte erhoben wurden (BUYAR, in Vorb.), wird das Versuchstier durch Vertiefung der Narkose bis in toxische Konzentrationen und letztendlich durch Blutentzug euthanasiert.

Das Blut wird dem Tier über den arteriellen Zugang an der A. carotis communis mit Hilfe von EDTA-Blutbildmonovetten (S-Monovette[®], Fa. Sarstedt, Nümbrecht) entzogen, in Eppendorf-Cups mit 2 ml Probenvolumen (Fa. Eppendorf Netheler-Hinz, Hamburg) umgefüllt und bei 4 °C mit 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert (Varifuge 3.OR, Fa. Heraeus Sepatech, Osterode/Harz). Das so gewonnene Serum wird in kleinere Eppendorf-Cups mit 0,6 ml Probenvolumen umpipetiert und bis zur weiteren Untersuchung im Gefrierschrank (Fa. Heraeus Sepatech, Osterode) bei -70 °C aufbewahrt. Zu einem späteren Zeitpunkt werden hieraus die Sepsisparameter TNF- α , IL-6, IL-10 und α_1 -saures Glykoprotein bestimmt. Die Ergebnisse werden in der Arbeit von BUYAR (in Vorb.) besprochen.

Am Ende steht die Entnahme verschiedener Gewebeproben, die dann für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung stehen. Dies sind im Einzelnen:

Leber: Zum Nachweis der granulomatösen Leberentzündung, die mit der systemischen Inflammation durch das C.p. einhergeht. Die Leber wird zunächst als Ganzes gewogen, dann wird einer der Leberlappen abgetrennt, in ein Gefriermedium (Tissue Freezing Medium[®], Fa. Jung, Nussloch) eingebettet und bei -70 °C gelagert.

Mm. tibiales craniales, Mm. gastrocnemii: Sie werden jeweils von beiden Hintergliedmaßen entnommen, gewogen und für weitere Untersuchungen konserviert. Dabei werden die Mm. tibiales craniales und je einer der beiden Bäuche der Mm. gastrocnemii zum Zwecke der Azetylcholinrezeptorenbestimmung auf Trockeneis eingefroren und bei -70 °C aufbewahrt. Die Ergebnisse hierzu sind der Arbeit von BUYAR (in Vorb.) zu entnehmen. Der jeweils andere Bauch der Mm. gastrocnemii wird für die histologische Untersuchung in der vorliegenden Arbeit verwendet.

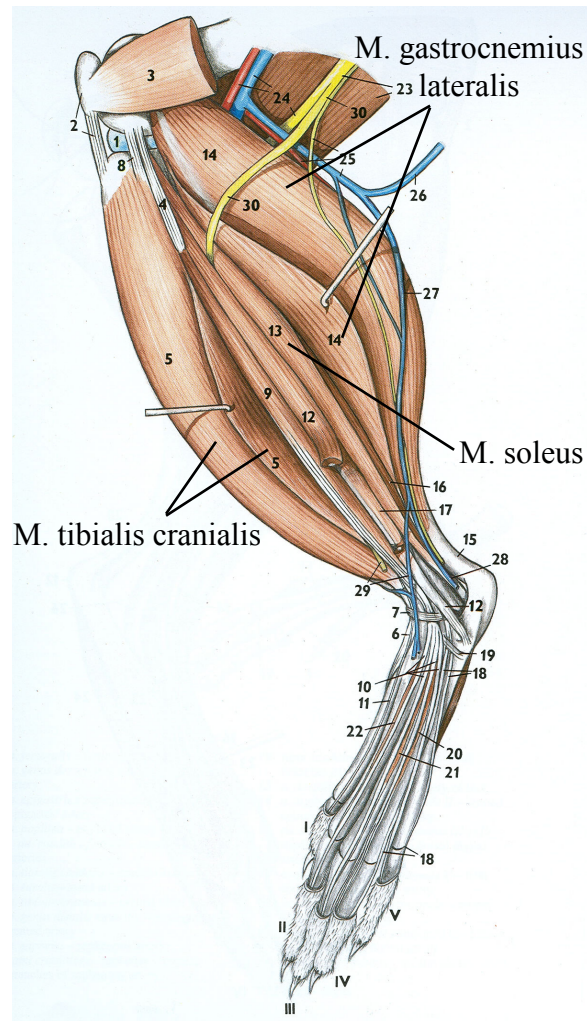


Abbildung 5: Knochen und Skelettmuskulatur des distalen Abschnitts der linken Hintergliedmaße bei der Ratte, Ansicht von lateral; nach POPESKO (2002)

3.2.6 Konservierung der Muskeln und Herstellung der histologischen Präparate

Die Muskeln werden nach ihrer Entnahme gewogen. Hiernach wird jeder Muskel mit einem Skalpell (Disposable scalpel, No. 21, Fa. Feather safety razor, Osaka, Japan) quer zur Faserrichtung in drei Teile geschnitten. Diese Muskelteilstücke werden mit ihrer Anschnittsfläche auf je ein flaches Korkscheibchen (selbst gefertigt aus Flaschenkorken) platziert und mit einem speziellen Einfriermedium (Tissue Freezing Medium[®], Fa. Jung, Nussloch) umhüllt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

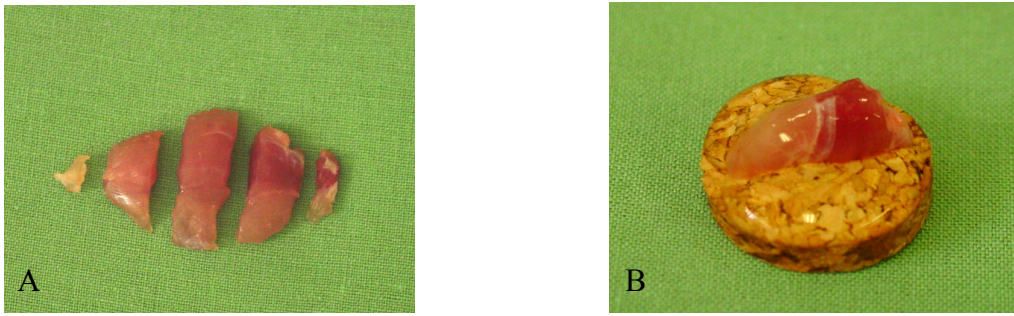


Abbildung 6: Ein Bauch des *M. gastrocnemius* in drei Teile geteilt (A); Einer der Muskelblöcke auf einem Korkplättchen, umgeben von durchsichtigem Einfriermedium (B)

In ein Dewar-Gefäß (Fa. Isotherm, Karlsruhe), gefüllt mit flüssigem Stickstoff, wird ein Becherglas mit Isopentan (2-Methylbutan, 99,5+%, HPLC-grade, Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) gestellt. Mit Hilfe einer Pinzette werden nun die Muskelstücke samt Korkplättchen für ein paar Sekunden in das Isopentan getaucht, bis das vorher durchsichtige Einfriermedium eine durchgehend weiße Farbe annimmt. Die Muskelproben sind somit eingefroren und bereit zum Schneiden. Zur Zwischenlagerung dient ein -70°C -Gefrierschrank.

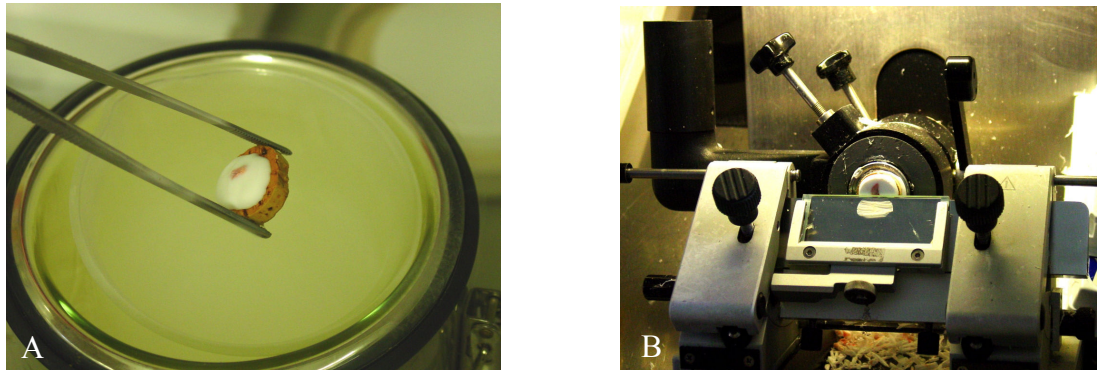


Abbildung 7: Einfrieren der Muskelprobe (A); Anfertigen der Schnitte am Kryotom (B)

Die histologischen Schnitte werden an einem Kryotom (HM 500 O, Fa. Microm, Waldorf) bei einer Kammertemperatur von ca. -24°C , quer zur Muskelfaserrichtung, mit einer Schnittdicke von $10\ \mu\text{m}$ angefertigt und je drei Schnitte auf einen Objektträger (Super Frost[®] Plus, $25 \times 75 \times 1,0\ \text{mm}$, Fa. Menzel, Braunschweig) aufgefroren. Von jedem Muskelblock werden je ein Objektträger für die H.E.- und einer für die PAS-Färbung hergestellt. Somit entstehen also von jedem Muskel drei Objektträger, d.h. insgesamt neun Schnitte, für jede Färbung. Der Transport zurück zum -70°C -Gefrierschrank findet auf Trockeneis statt.

3.2.7 Färbungen

3.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin(H.E.)-Färbung

Die H.E.-Färbung stellt die typische Routinefärbung in der Histologie dar. Als Übersichtsfärbung erlaubt sie eine Beurteilung der Präparate unter vielen verschiedenen Gesichtspunkten.

Zunächst werden die Muskelschnitte auf den Objektträgern 10 Minuten lang mit Ethanol 100% pro analysi (Fa. Merck, Darmstadt) durch Flüssigkeitsentzug fixiert.

Zur Rehydrierung durchlaufen die Schnitte daraufhin eine absteigende Alkoholreihe (96%, 80%, 70% für jeweils 3 Minuten) (Fa. Merck, Darmstadt) und werden dann für 2 Minuten in Aqua destillata (Aqua dest.) (Fa. Delta-Select, Pfullingen) getaucht. Als nächster Schritt folgt die Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer (Hausapotheke Klinikum rechts der Isar, gem. Romeis Nr. 648) über 7 Minuten, wobei Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an rauem endoplasmatischen Retikulum sind, blau-violett gefärbt werden. Die angefärbten Strukturen sind vor allem negativ geladene Zellbestandteile wie Kernsäuren (DNA, RNA), manche Muzine und extrazelluläre Proteoglykane. Die anschließenden 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser verstärken die Blau-Färbung.

Die Schnitte werden noch einmal kurz in Aqua dest. getaucht, bevor die Plasmafärbung mit Eosin durchgeführt wird. Hierbei werden die azidophilen Zytoplasmaanteile rot gefärbt. Das verwendete Eosin besteht aus einer 0,1%igen wässrigen Lösung (Wässrige Eosin-Dinatrium-Lösung, Hausapotheke Klinikum rechts der Isar). Zu 200 ml Färbelösung werden 80 µl Eisessig 100% (Fa. Merck, Darmstadt) zugesetzt. Dies dient der Steigerung der Farbeintensität. Zur Färbung der Muskelschnitte reicht bereits eine Einwirkzeit von einer Minute aus, um kräftig gefärbte Präparate zu erhalten. Danach wird kurz mit Aqua dest. gespült. Es folgt nun eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96% für jeweils 2 Minuten), die in Ethanol 100% endet, zunächst für eine Minute, um alle Reste der Färbelösung zu entfernen, und dann noch mal 10 Minuten in einer sauberen Glasküvette. Dies dient der erneuten Dehydrierung bevor die Präparate durch das Eindecken mit Deckgläschen (24 x 50 mm, Fa. Menzel, Braunschweig) haltbar gemacht werden.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Vor dem Eindecken werden die Objektträger einmal 5 Minuten und in einer zweiten Küvette noch mal 10 Minuten in RotiHistol[®] (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) eingelegt. Danach werden die Objektträger einzeln aus der Küvette entnommen und unter Verwendung von Roti[®]-Histokitt (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) eingedeckt. Die Objektträger werden zum Trocknen in der Raumluft belassen und bis zur Betrachtung unter dem Lichtmikroskop bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

3.2.7.2 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung)

Bei der PAS-Färbung handelt es sich um eine histochemische Färbemethode. Sie dient der Unterscheidung der Muskelfasertypen anhand ihres Glykogengehaltes. Außer Glykogen färben sich unter anderem auch viele neutrale und einige sulfatierte Mukopolysaccharide, Hyalin und die Basalmembranen an. Je nach Gehalt dieser Substanzen wird eine unterschiedlich starke rosa-violett-Färbung hervorgerufen.

Die PAS-Färbung erfolgt nach folgendem Protokoll:

Am Anfang steht die Oxidation der im Muskel enthaltenen 1,2-Glykole zu Aldehyden. Das Oxidationsmittel ist hierbei eine 1%ige wässrige Perjodsäurelösung, die vor jedem Färbvorgang frisch hergestellt werden muss aus 1 g Perjodsäurepulver pro analysi (Fa. Merck, Darmstadt) auf 100 ml Aqua dest. Die Einwirkzeit auf die Objektträger mit den Muskelschnitten beträgt 10 Minuten. Danach wird in 3 Küvetten mit Aqua dest. kurz gespült.

Die gebildeten Aldehyde werden mit Schiff'schem Reagenz (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) über 15 Minuten nachgewiesen. Hiernach werden die Schnitte in 3 Küvetten mit Sulfitwasser für jeweils 2 Minuten eingetaucht. Auch das Sulfitwasser ist für jede Färbung frisch anzusetzen (s. u.).

Die Objektträger werden 15 Minuten in fließendem Leitungswasser gespült. Danach schließt sich die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun nach Mayer für 7 Minuten an.

Es folgt noch einmal eine 10-minütige Spülung unter fließendem Leitungswasser und dann eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%) für je 5 Sekunden. Am Ende steht die Fixierung in Ethanol 100% für 10 min und das Eindecken der Objektträger mit RotiHistol[®] und Roti[®]-Histokitt (siehe H.E.-Färbung).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Herstellung des Sulfitwassers:

Folgende Bestandteile werden gemischt und dann auf 3 Glasküvetten aufgeteilt:

600 ml Aqua dest.

36 ml 10%ige wässrige Natrium-Disulfit-Lösung (Hausapotheke Klinikum rechts der Isar)

30 ml 1 N HCl (Fa. Merck, Darmstadt)

3.2.8 Mikroskopische Untersuchung

Die histologische Auswertung am Lichtmikroskop (Fa. Carl Zeiss, Jena) wird geblindet vorgenommen, d. h. die Gruppenzugehörigkeit der zu untersuchenden Muskeln ist dem Untersucher beim Auswerten nicht bekannt.

3.2.8.1 Auswertung H.E.-Färbung

Die Auswertung der durch H.E.-Färbung gefärbten Muskelquerschnitte geschieht nach folgenden Kriterien:

Vergrößerung mit 10er-Objektiv:

Die Muskelschnitte werden mäanderförmig durchgemustert, um zum einen die Homogenität der Faserkaliber zu beurteilen. Das Vorhandensein von pathologischen Kalibervariationen, d.h. ein verstärktes Auftreten von Faseratrophien und -hypertrophien wird mit einem einfachen Ja / Nein-Grading-System bewertet.

Zum anderen werden die Schnitte bei dieser Vergrößerung auf das Vorhandensein eines endomysialen Ödems untersucht. Auch hier wird ein einfaches Ja / Nein-Grading-System angewandt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Vergrößerung mit 20er-Objektiv:

Es werden mit Hilfe eines Raster-Okulars (E-P1 10 x /20, Fa. Carl Zeiss, Jena) in fünf Gesichtsfeldern eines Schnittes alle Fasern mit folgenden Veränderungen ausgezählt:

- 1) Atrophie
- 2) angulärer Querschnitt
- 3) ein oder mehrere zentrale Zellkerne
- 4) Myophagie, d.h. der Abbau der degenerierten Faser durch Gewebsmakrophagen

Vergrößerung mit 40er-Objektiv:

In einem repräsentativen Gesichtsfeld werden die um zehn zufällig ausgewählte Muskelfasern herum gelegenen Entzündungszellen, die sich eindeutig im Endomysium befinden, ausgezählt.

Zuletzt wird von jedem Muskel an einer repräsentativen Stelle mit einer am Lichtmikroskop installierten Digitalkamera (Cyber-shot DSC-S75, Fa. SONY, Tokyo, Japan) ein digitales Foto gemacht und im PC gespeichert.

3.2.8.2 Auswertung PAS-Färbung

Die Auswertung der Schnitte, die einer PAS-Färbung unterzogen werden, erfolgt folgendermaßen:

Vergrößerung mit 10er-Objektiv:

Es wird beurteilt, ob eine Muskelfasertypengruppierung vorliegt. D.h. mindestens 50 Fasern eines Fasertyps liegen an einer Stelle zusammen, ohne dass dazwischen Fasern des anderen Typs vorhanden sind. Diese Veränderung der Fasertypenverteilung wird mit einem einfachen Ja / Nein-Grading beurteilt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Weiterhin wird bestimmt, ob eine Fasertypenprädominanz vorliegt. D.h. ein Fasertyp herrscht im gesamten Muskel oder in größeren Arealen des Muskels vor, während der jeweils andere Fasertyp in diesen Arealen verschwindend gering oder gar nicht auftritt. Auch diese Veränderung wird mit einem Ja / Nein-Grading beurteilt, allerdings mit dem Zusatz, welchen Fasertypen es betrifft.

Vergrößerung mit 20er-Objektiv:

In einem repräsentativen Gesichtsfeld, in dem weder Fasertypengruppierung noch -prädominanz auftreten, wird mit Hilfe von zwei Handzählern (Four Digit Hand-Held Tally Counter, Fa. Karl Hecht, Sondheim) die Anzahl der Fasern des jeweiligen Fasertyps aus insgesamt 100 Fasern gezählt und dadurch das prozentuale Verhältnis von Typ 1- zu Typ 2-Fasern ermittelt.

3.2.8.3 Auswertung am PC

Die gespeicherten Digitalfotos von der H.E.-Färbung werden in einem weiteren Schritt gesondert ausgewertet:

Am Computerbildschirm werden die Fotos immer mit derselben Vergrößerung geöffnet und mit einem Lineal wird jeweils an 10 zufällig gewählten Stellen die Breite des endomysialen Bindegewebes gemessen und danach ein Mittelwert gebildet. In gleicher Weise wird der Faserdurchmesser von 10 zufällig ausgewählten Fasern an ihrer jeweils schmalsten Stelle gemessen und auch hier der Mittelwert bestimmt.

Als Maßstab zur Umrechnung von mm am Bildschirm in μm dient ein geeichtes Objektmikrometer (positiv 5+ 100/100y, D = 0,17 mm, Fa. Carl Zeiss, Jena), welches ebenso wie die Muskelpräparate mit der Digitalkamera fotografiert wird. Das entstandene Bild wird am Computerbildschirm in derselben Vergrößerung wie die Präparatbilder geöffnet, so dass durch Abmessen des Abstandes zweier Maßstriche auf der Skala des fotografierten Mikrometers mit demselben Lineal, welches für die Auswertung der Präparatbilder verwendet wird, eine Umrechnungsformel erstellt werden kann. Mit dieser Formel werden die erhaltenen Mittelwerte von Faserdurchmesser und Breite des endomysialen Bindegewebes in μm umgerechnet.

3.2.9 Statistische Bewertung der Befunde

Die Ergebnisse werden mit Hilfe von ANOVAs (Analysis of Variance) für wiederholte Messungen oder mit faktoriellen ANOVAs auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Als Zwischengruppenfaktoren gelten der Erholungszeitpunkt (0; 4; 12; 36 Tage), die Beweglichkeit des operierten Beins (Immobilisation vs. Sham-Immobilisation) und die injizierte Substanz (C.p. vs. NaCl). Binnengruppenfaktor ist das untersuchte Bein (Op-Bein vs. Kontrollbein). Werden hierbei signifikante Unterschiede ermittelt, so wird dies posthoc mit gepaarten oder ungepaarten 2-seitigen t-Tests weiter geprüft. Statistische Signifikanz wird bei einem $p < 0,05$ angenommen. In den Tabellen werden die Ergebnisse als Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (\pm SD) dargestellt. Alle statistischen Berechnungen erfolgen anhand von SPSS 12.0 für Windows (Fa. SPSS, München).

Für einige histologische Untersuchungskriterien (Kalibervariationen, Ödem, Fasertypengruppierung und -prädominanz), die mit einem einfachen Ja / Nein-Grading-System bewertet werden, ist eine statistische Auswertung nicht möglich, da es sich um dichotome Daten handelt und man hierzu deutlich höhere Fallzahlen benötigen würde. Unterschiede zwischen den Gruppen können daher nicht statistisch belegt, sondern lediglich beschrieben werden.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Ausfälle

Im Laufe des Versuchs sind folgende Ausfälle zu verzeichnen: 55 Tiere versterben an den Folgen der C.p.-Injektion. Bei zwei Tieren ist keine Inflammationsreaktion nach C.p.-Gabe anhand von Körpergewicht und Methämoglobin-Spiegel festzustellen. Weitere 18 Tiere müssen vom Versuch ausgeschlossen werden, da ihre Immobilisation unzureichend ist oder sich das betroffene Bein infiziert hat. Andere Probleme, die zum Ausschluss jeweils einer weiteren Ratte führen, sind Schwanzspitzennekrose, Injektionsschwierigkeiten, pulmonale Embolie oder Knochenfrakturen während der Immobilisationsoperation, Schwierigkeiten beim Entfernen der Immobilisationsdrähte und eingeschränkte Mobilität der Gliedmaße nach Entfernen der Immobilisationsdrähte. Insgesamt 17 Ratten müssen außerdem wegen auftretenden Komplikationen im Verlauf der Präparation und Operation am Messtag euthanasiert werden. Hierunter fallen sowohl operative Traumata, wie dissezierte Aa. carotidae, Rupturen der Sehne des M. tibialis cranialis und Knochenbrüche, als auch Schwierigkeiten bei der Nervenstimulation.

3.3.2 Klinisches Erscheinungsbild

Nach den C.p.-Injektionen zeigen die Tiere eine zunehmende Störung des Allgemeinbefindens, welche sich in einem reduzierten Explorations- und Putzverhalten und einem glanzlosen, struppigem Fell äußert. Die Immobilisation eines Hinterlaufs mit Kirschnerdrähten hat kaum einen Einfluss auf das Verhalten der Tiere. Bereits nach kurzer Zeit bewegen sich die Tiere ohne größere Einschränkungen in ihren Käfigen. Nach Entfernung der Drähte am Tag 0 dauert es etwa ein bis zwei Tage bis die vollständige Mobilität der Gliedmaße wieder hergestellt ist und die Tiere sie voll belasten.

3.3.3 Inflammationsparameter

3.3.3.1 Mortalität

Insgesamt 156 Tiere erhalten C.p.-Injektionen. Davon versterben 55 allein an den Folgen der systemischen Inflammationsreaktion. Die Mortalitätsrate in Bezug auf C.p. liegt somit bei 35,2%.

3.3.3.2 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Versuchstiere wird ab ihrer Versuchsaufnahme am Tag -12 täglich bestimmt. Somit lässt sich der Gewichtsverlauf sowohl während der Schädigungsphase als auch zu den unterschiedlichen Erholungszeitpunkten nachvollziehen. In Tabelle (Tab.) 1 sowie in Abbildung (Abb.) 8 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Tiere aller Erholungsgruppen zusammengefasst, so dass der unterschiedliche Verlauf zwischen den verschiedenen Schädigungskombinationen direkt verglichen werden kann. Gezeigt werden die Werte an den Tagen -12, -8, -4 und 0, also am Aufnahmetag, an dem sowohl die Immobilisations- oder Sham-Immobilisationsoperation, als auch die 1. Injektion vorgenommen wird, an den Tagen der weiteren Injektionen und am letzten Tag der Schädigungsphase, an den sich die Erholungsphase anschließt. Am Tag -12 ist das Gewicht aller Tiere nahezu gleich. Die Ratten der beiden NaCl-Gruppen nehmen bis zum Tag 0 kontinuierlich an Gewicht zu. So liegt das Gewicht der Tiere der NaCl/Sham-Immobilisations(Sham)-Gruppe am Tag -12 bei 307 ± 16 g, am Tag 0 bei 347 ± 22 g. Das Gewicht der NaCl/Immobilisations(Immob)-Gruppe beträgt am Tag -12 311 ± 16 g und am Tag 0 340 ± 22 g. Im Gegensatz hierzu ist bei den Tieren der C.p.-Gruppen eine deutliche Gewichtsreduktion zu verzeichnen. So fällt das Körpergewicht der C.p./Sham-Tiere von Tag -12 bis Tag 0 von 314 ± 13 g auf 298 ± 20 g. Noch höher ist der Gewichtsverlust innerhalb der C.p./Immob-Gruppe. Hier reduziert es sich von 313 ± 18 g auf 279 ± 25 g. Auffällig sind auch die geringeren Gewichte der immobilisierten Tiere sowohl in der NaCl- als auch in der C.p.-Gruppe im Vergleich zu den entsprechenden Sham-Gruppen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

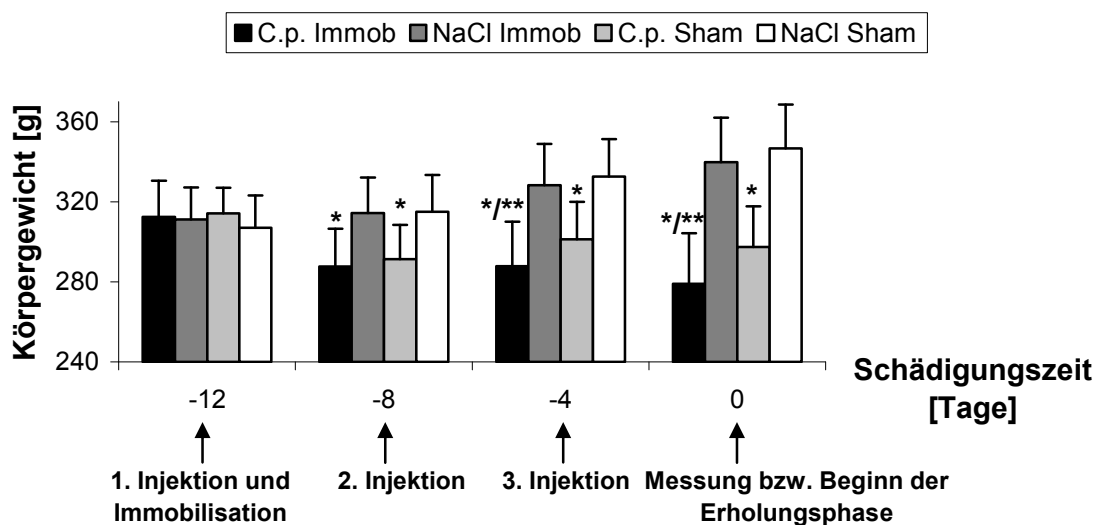
Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen des Körpergewichts während der Schädigungsphase in Gramm (Die Werte der Tiere aller Erholungsgruppen sind hier zusammengefasst, d.h. es handelt sich in jeder Gruppe jeweils um 40 Tiere.)

Schädigungsphase	Körpergewicht [g]			
	Sham-Immobilisation		Immobilisation	
	NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
Tag -12	307 ± 16	314 ± 13	311 ± 16	313 ± 18
Tag -8	315 ± 18	291 ± 17 *	314 ± 18	288 ± 19 *
Tag -4	333 ± 19	301 ± 19 *	328 ± 21	288 ± 22 */**
Tag 0	347 ± 22	298 ± 20 *	340 ± 22	279 ± 25 */**

* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Gewichtsverlauf in der Schädigungsphase



* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Abbildung 8: Verlauf des Körpergewichts der Tiere aller Erholungsgruppen in der Schädigungsphase

In Tab. 2 und Abb. 9 sind die Werte der Tiere innerhalb der Erholungsgruppen am Ende der jeweiligen Erholungszeiträume dargestellt. Das heißt, die Mittelwerte und Standardabweichungen setzen sich hier pro Erholungszeitpunkt und Schädigungsgruppe jeweils aus 10

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tieren zusammen und nicht wie in Tab. 1 aus 40 Tieren. Somit entsteht zwischen den Tabellen eine scheinbare Diskrepanz der Werte am Tag 0.

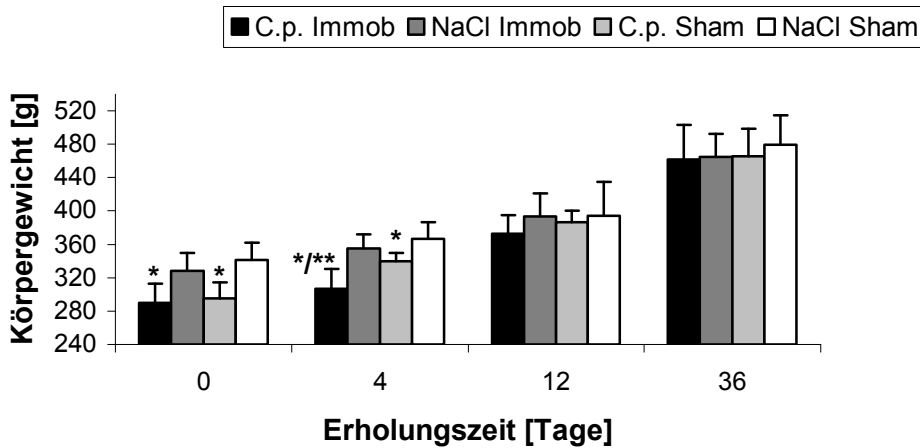
Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen des Körpergewichts am Ende der jeweiligen Erholungszeit in Gramm (Es handelt sich in jeder Gruppe jeweils um 10 Tiere.)

Erholungsphase	Körpergewicht [g]			
	Sham-Immobilisation		Immobilisation	
	NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	341 ± 21	295 ± 19 *	328 ± 22	290 ± 23 *
4 Tage Erholung	367 ± 20	340 ± 10 *	355 ± 17	307 ± 24 **
12 Tage Erholung	394 ± 41	387 ± 14	394 ± 28	373 ± 22
36 Tage Erholung	479 ± 36	466 ± 33	465 ± 28	462 ± 42

* p < 0,05 vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** p < 0,05 vs. entsprechende Sham-Gruppe

Gewichtsverlauf in der Erholungsphase



* p < 0,05 vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** p < 0,05 vs. entsprechende Sham-Gruppe

Abbildung 9: Verlauf des Körpergewichts am Ende der jeweiligen Erholungszeit

In der Erholungsphase, beginnend am Tag 0, ist in allen Schädigungsgruppen eine positive Gewichts Bilanz zu erkennen. Nach 4 Tagen Erholung nehmen auch die Tiere der C.p.-

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Gruppen wieder zu. Das Gewicht in der C.p./Sham-Gruppe steigt innerhalb dieser vier Tage von 295 ± 19 g auf 340 ± 10 g, in der C.p./Immob-Gruppe von 290 ± 23 g auf 307 ± 24 g. Dennoch bleibt das Körpergewicht der C.p.-Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen NaCl-Gruppen und auch der C.p./Immob-Gruppe im Vergleich zur entsprechenden Sham-Gruppe noch bis zum 4. Erholungstag signifikant erniedrigt. Auch am Tag 12 erreichen die Tiere der C.p./Immob Gruppe das Gewicht der anderen Tiere nicht. Erst nach einer Erholungszeit von 36 Tagen sind keine Unterschiede zwischen den Schädigungsgruppen mehr erkennbar.

3.3.3.3 Lebergewicht

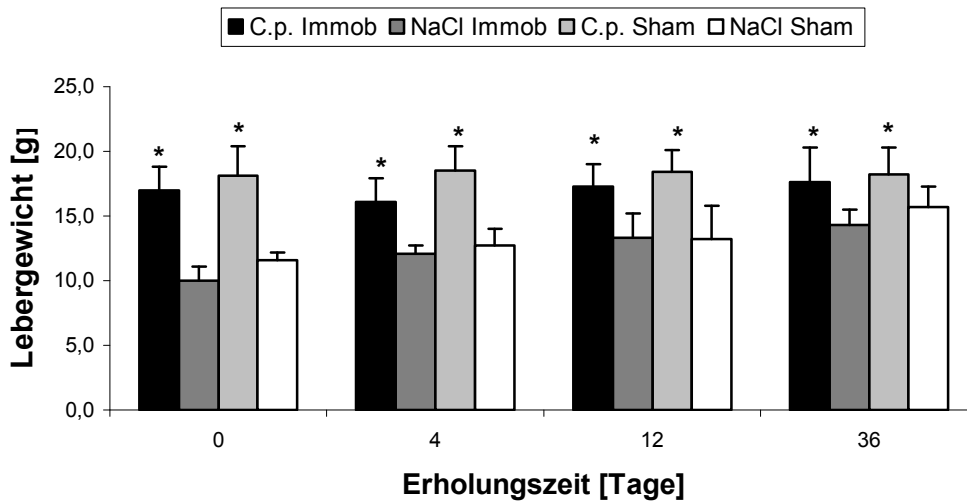
Das Lebergewicht wird nach Euthanasie der Tiere und Leberentnahme am jeweiligen Messtag, der das Ende der Erholungszeit darstellt, ermittelt. Anhand der abgebildeten Werte in Tab. 3 sieht man, dass die Lebergewichte der beiden C.p.-Gruppen im Vergleich zu denen der NaCl-Gruppen signifikant erhöht sind und das anhaltend bis zum 36. Erholungstag. So beträgt das Lebergewicht am Tag 36 in der C.p./Sham-Gruppe $18,2 \pm 2,1$ g, während es in der NaCl/Sham-Gruppe bei $15,7 \pm 1,6$ g liegt. Die Tiere der C.p./Immob-Gruppe weisen am selben Tag ein Lebergewicht von $17,6 \pm 2,7$ g auf im Vergleich zu den NaCl/Immob-Tieren mit $14,3 \pm 1,2$ g. Im Laufe der Erholungszeit findet zudem eine leichte Zunahme der Lebergewichte innerhalb der NaCl-Gruppen statt. In Abb. 10 sind die Werte noch einmal graphisch dargestellt.

Table 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der Lebergewichte am Ende der jeweiligen Erholungszeit in Gramm

Erholungsphase	Lebergewicht [g]			
	Sham-Immobilisation		Immobilisation	
	NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	$11,6 \pm 0,6$	$18,1 \pm 2,3$ *	$10,0 \pm 1,1$	$17,0 \pm 1,8$ *
4 Tage Erholung	$12,7 \pm 1,3$	$18,5 \pm 1,9$ *	$12,1 \pm 0,6$	$16,1 \pm 1,8$ *
12 Tage Erholung	$13,2 \pm 2,6$	$18,4 \pm 1,7$ *	$13,3 \pm 1,9$	$17,3 \pm 1,7$ *
36 Tage Erholung	$15,7 \pm 1,6$	$18,2 \pm 2,1$ *	$14,3 \pm 1,2$	$17,6 \pm 2,7$ *

* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

Lebergewicht in der Erholungsphase



* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

Abbildung 10: Lebergewichte am Ende der jeweiligen Erholungszeit

3.3.3.4 Methämoglobin

Die Methämoglobin(MetHb)-Wert-Bestimmungen in der Schädigungsphase finden an den Tagen -12, -8, -4 und 0 statt, also jeweils an den Injektionstagen. Am Tag -12 liegen die MetHb-Werte aller Tiere unter einem Prozentanteil vom Gesamthämoglobin (s. Tab. 4). Dies bleibt bei den Tieren der NaCl-Gruppen bis Versuchsende so bestehen. Die Werte der C.p.-Gruppen allerdings zeigen einen starken Anstieg in der Schädigungsphase, der auch in der Erholungsphase noch bemerkbar ist. Hier sind die Werte bis Tag 4 noch signifikant gegenüber den Werten der entsprechenden NaCl-Gruppen (s. Tab. 5). Die graphische Darstellung der Werte in Abb. 11 und 12 verdeutlicht die Unterschiede zwischen NaCl- und C.p.-Gruppen noch weiter. Wie bei den Werten des Körpergewichts besteht auch hier aufgrund der unterschiedlichen Gruppengrößen eine scheinbare Diskrepanz zwischen den Werten der beiden Tabellen am Tag 0.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Methämoglobin(MetHb)-Werte der Tiere aller Erholungsgruppen während der Schädigungsphase in Prozentanteil am Gesamthämoglobin (Es handelt sich in jeder Gruppe jeweils um 40 Tiere.)

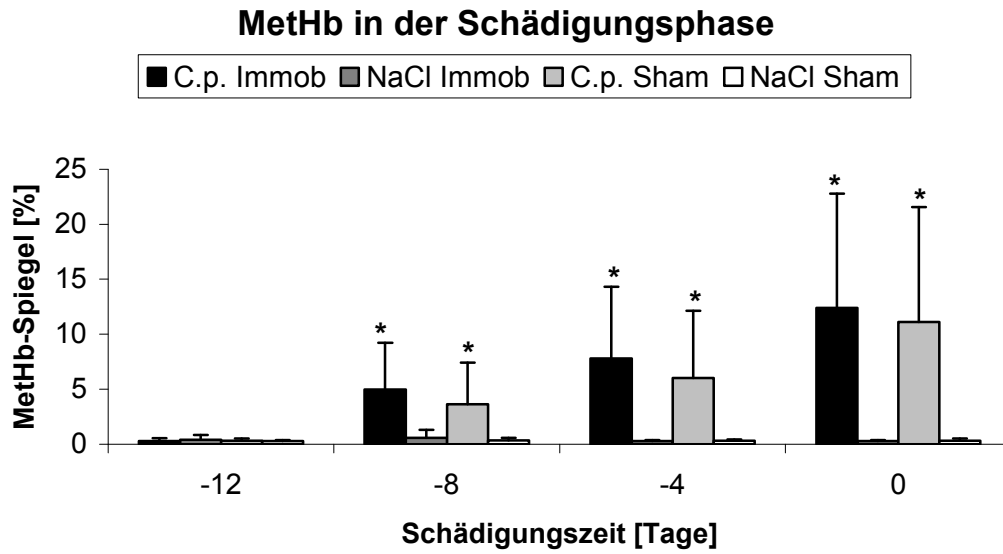
Schädigungs- phase	MetHb [%]			
	Sham-Immobilisation		Immobilisation	
	NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
Tag -12	0,29 ± 0,09	0,31 ± 0,20	0,40 ± 0,45	0,28 ± 0,26
Tag -8	0,34 ± 0,25	3,63 ± 3,80 *	0,59 ± 0,71	4,98 ± 4,24 *
Tag -4	0,32 ± 0,12	6,02 ± 6,09 *	0,28 ± 0,10	7,80 ± 6,52 *
Tag 0	0,31 ± 0,21	11,11 ± 10,47 *	0,28 ± 0,09	12,39 ± 10,40 *

* p< 0,05 vs. entsprechende NaCl-Gruppe

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Methämoglobin(MetHb)-Werte am Ende der jeweiligen Erholungszeit in Prozentanteil am Gesamthämoglobin (Es handelt sich in jeder Gruppe jeweils um 10 Tiere.)

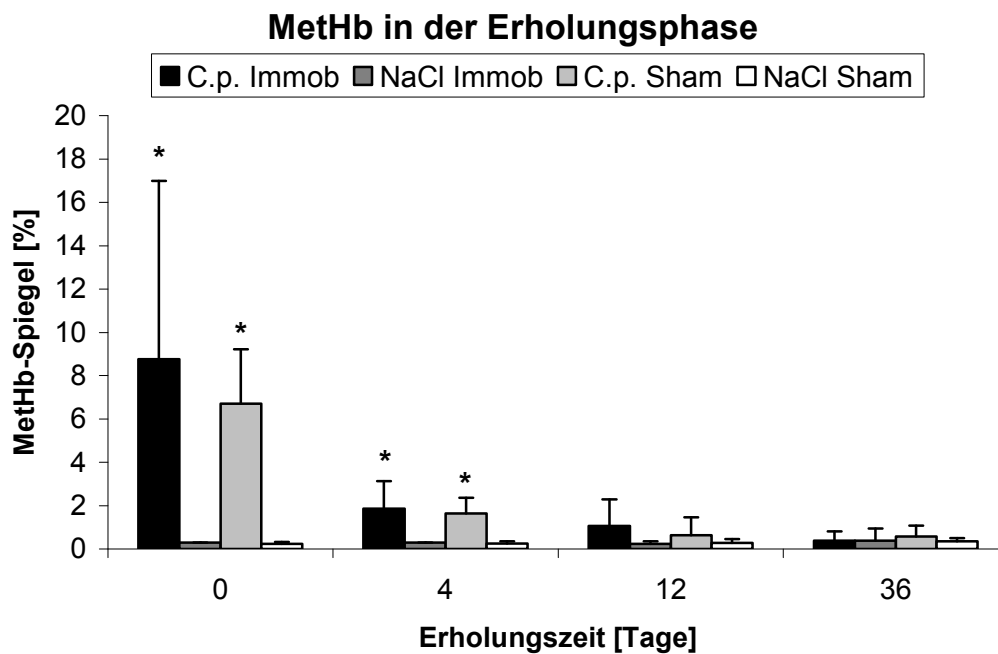
Erholungs- phase	MetHb [%]			
	Sham-Immobilisation		Immobilisation	
	NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	0,24 ± 0,09	6,70 ± 2,52 *	0,30 ± 0,00	8,75 ± 8,24 *
4 Tage Erholung	0,25 ± 0,11	1,64 ± 0,72 *	0,30 ± 0,00	1,86 ± 1,26 *
12 Tage Erholung	0,28 ± 0,18	0,64 ± 0,82	0,24 ± 0,11	1,07 ± 1,22
36 Tage Erholung	0,35 ± 0,15	0,58 ± 0,49	0,39 ± 0,55	0,39 ± 0,43

* p< 0,05 vs. entsprechende NaCl-Gruppe



* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

Abbildung 11: Verlauf des MetHb-Spiegels der Tiere aller Erholungsgruppen in der Schädigungsphase



* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

Abbildung 12: Verlauf des MetHb-Spiegels am Ende der jeweiligen Erholungszeit

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.3.3.5 Blutbild

Das Blutbild am Ende der jeweiligen Erholungszeit (s. Tab. 6) zeigt in beiden C.p.-Gruppen eine Reduktion der Erythrozytenzahl, die noch bis Tag 12 der Erholung signifikant gegenüber den Werten der NaCl-Gruppen bleibt. Auch die Thrombozyten- und die Leukozytenzahl nehmen durch die C.p.-Gabe deutlich ab.

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der Erythrozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenzahl am Ende der jeweiligen Erholungszeit

Erholungs- phase	Erythrozyten [Mill./ μ l]			
	Sham-Immobilisation		Immobilisation	
	NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	6,97 \pm 0,82	4,49 \pm 0,88 *	6,46 \pm 0,87	4,21 \pm 0,63 *
4 Tage Erholung	6,62 \pm 0,60	4,41 \pm 0,43 *	6,54 \pm 0,64	4,55 \pm 0,75 *
12 Tage Erholung	6,72 \pm 0,40	5,44 \pm 0,84 *	6,82 \pm 0,69	5,13 \pm 0,60 *
36 Tage Erholung	7,07 \pm 0,62	7,26 \pm 1,20	7,25 \pm 0,64	6,84 \pm 0,83

* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

Erholungs- phase	Thrombozyten [1.000/ μ l]			
	Sham-Immobilisation		Immobilisation	
	NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	785 \pm 135	394 \pm 80	744 \pm 185	561 \pm 273
4 Tage Erholung	655 \pm 81	559 \pm 204	794 \pm 175	567 \pm 150
12 Tage Erholung	575 \pm 258	513 \pm 97	691 \pm 147	499 \pm 110
36 Tage Erholung	753 \pm 104	551 \pm 113	735 \pm 126	510 \pm 99

Keine signifikanten Unterschiede

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Erholungsphase	Leukozyten [1.000/ μ l]			
	Sham-Immobilisation		Immobilisation	
	NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	8,74 \pm 7,55	5,37 \pm 1,88	7,72 \pm 3,09	7,33 \pm 2,87
4 Tage Erholung	7,83 \pm 4,24	7,30 \pm 4,04	7,61 \pm 2,28	6,32 \pm 1,85
12 Tage Erholung	10,18 \pm 7,94	4,84 \pm 3,52	9,33 \pm 9,30	3,93 \pm 1,30
36 Tage Erholung	6,51 \pm 2,70	3,97 \pm 1,22	6,45 \pm 2,13	3,48 \pm 1,33

Keine signifikanten Unterschiede

3.3.4 Hämodynamische Messparameter

Die hämodynamischen Parameter werden während der gesamten Dauer der neuromuskulären Funktionstests am Messtag bei allen Ratten stabil gehalten (s. Kap. 3.2.4.3 Narkose-Monitoring am Tag der Messung). Abweichungen von den gesetzten Ober- und Untergrenzen werden korrigiert. Die Werte zwischen und innerhalb der Gruppen unterscheiden sich nicht. Daher beinhalten die Mittelwerte die Parameter aller Versuchstiere.

Zu Beginn der Messung beträgt der MAP 124 ± 22 mmHg, es wird eine Herzfrequenz von 367 ± 40 / min ermittelt, der arterielle pH-Wert liegt bei $7,39 \pm 0,03$ und der BE bei $-0,1 \pm 2,2$. Der Blutzuckerspiegel erreicht im Mittel einen Wert von 100 ± 20 mg/ dl. Die Körpertemperatur wird mit Hilfe einer Wärmelampe auf $36,9 \pm 0,1$ °C gehalten. Nach Beenden der neuromuskulären Funktionstests liegt der MAP der Ratten durchschnittlich bei 131 ± 26 mmHg, die Herzfrequenz bei 377 ± 40 / min, der arterielle pH-Wert bei $7,37 \pm 0,04$ und der BE bei $-0,9 \pm 2,3$. Der Blutzuckerspiegel fällt geringfügig auf 95 ± 18 mg/ dl und die Körpertemperatur beträgt $37,0 \pm 0,2$ °C. Der PaO₂ ist zu jeder Zeit größer als 90 mmHg.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.3.5 Muskelgewichte

Die Muskelgewichte des M. gastrocnemius von Op-Bein und Kontrollbein sind in Tab. 7 dargestellt. Nach 0 Tagen Erholung beträgt das Muskelgewicht im Op-Bein in der NaCl/Sham-Gruppe $1,57 \pm 0,15$ g, in der C.p./Sham-Gruppe $1,13 \pm 0,09$ g, bei den Tieren der NaCl/Immob-Gruppe $1,08 \pm 0,24$ g und bei denen der C.p./Immob-Gruppe $0,94 \pm 0,15$ g. Es ist also ein deutlicher Gewichtsverlust sowohl in den beiden C.p.-Gruppen gegenüber den NaCl-Gruppen, als auch zwischen Immobilisation und Sham-Immobilisation zu verzeichnen. Am stärksten sind die Muskeln der Tiere betroffen, die sich in der C.p./Immob-Gruppe befinden. Nach 36 Tagen Erholung liegen die Werte des Op-Beins bei $2,32 \pm 0,13$ g in der NaCl/Sham-Gruppe, bei $2,47 \pm 0,26$ g in der C.p./Sham-Gruppe, bei $2,13 \pm 0,22$ g in der NaCl/Immob-Gruppe und bei $1,97 \pm 0,24$ g in der C.p./Immob-Gruppe. Die Muskelgewichte nehmen also in allen Gruppen zu im Vergleich zum Ausgangswert. Allerdings bleiben die Werte der beiden Immob-Gruppen weiterhin signifikant erniedrigt gegenüber der jeweiligen Sham-Gruppe. Die Muskelgewichte der Kontrollbeine unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Schädigungsgruppen nur wenig und nehmen alle im Laufe der Erholungszeit zu.

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Muskelgewichte des M. gastrocnemius in Op-Bein und Kontrollbein in Gramm

Gruppen		M. gastrocnemius [g]			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	$1,57 \pm 0,15$	$1,13 \pm 0,09$ *	$1,08 \pm 0,24$ **	$0,94 \pm 0,15$ **
	Kontrollbein	$1,75 \pm 0,14$	$1,31 \pm 0,11$ *	$1,69 \pm 0,10$	$1,27 \pm 0,18$ *
4 Tage Erholung	Op-Bein	$1,74 \pm 0,18$	$1,47 \pm 0,10$ *	$1,07 \pm 0,18$ **	$0,87 \pm 0,15$ */**
	Kontrollbein	$1,87 \pm 0,17$	$1,55 \pm 0,09$ *	$1,87 \pm 0,12$	$1,50 \pm 0,21$ *
12 Tage Erholung	Op-Bein	$1,95 \pm 0,18$	$1,90 \pm 0,14$	$1,34 \pm 0,18$ **	$1,28 \pm 0,15$ **
	Kontrollbein	$2,01 \pm 0,20$	$2,02 \pm 0,10$	$2,03 \pm 0,15$	$1,97 \pm 0,11$
36 Tage Erholung	Op-Bein	$2,32 \pm 0,13$	$2,47 \pm 0,26$	$2,13 \pm 0,22$ **	$1,97 \pm 0,24$ **
	Kontrollbein	$2,38 \pm 0,15$	$2,50 \pm 0,24$	$2,43 \pm 0,17$	$2,38 \pm 0,20$

* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

3.3.6 Histologische Ergebnisse der H.E.-Auswertung

3.3.6.1 Kalibervariationen

In Tab. 8 wird die Anzahl der Muskeln mit Kalibervariationen aufgeführt. Sie sind in allen Schädigungsgruppen und zu allen Erholungszeitpunkten zu finden. Die höchste Anzahl mit 6 von 10 Muskeln lässt sich am 12. Erholungstag im Op-Bein der C.p./Immob-Gruppe feststellen. Innerhalb der NaCl/Immob-Gruppe sind im Op-Bein am Tag 4 bei 5 von 10 Muskeln Kalibervariationen zu sehen. Es scheint also eine leichte Häufung bei den immobilisierten Tieren an den Tagen 4 und 12 der Erholungsphase vorzuliegen. Abb. 13 zeigt einen Muskel mit pathologischen Kalibervariationen. Hier liegen sowohl atrophische als auch hypertrophe Fasern nebeneinander und bieten somit einen inhomogenen Gesamteindruck.

Table 8: Anzahl der Muskeln von n=10 Tieren pro Schädigungsgruppe und Erholungstag, bei denen Kalibervariationen gesehen werden, im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins

Gruppen		Kalibervariationen			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	2 von 10	3 von 10	2 von 10	2 von 10
	Kontrollbein	0 von 10	3 von 10	1 von 10	1 von 10
4 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	4 von 10	5 von 10	3 von 10
	Kontrollbein	4 von 10	3 von 10	4 von 10	2 von 10
12 Tage Erholung	Op-Bein	3 von 10	2 von 10	3 von 10	6 von 10
	Kontrollbein	1 von 10	2 von 10	3 von 10	4 von 10
36 Tage Erholung	Op-Bein	3 von 10	2 von 10	4 von 10	2 von 10
	Kontrollbein	2 von 10	1 von 10	3 von 10	3 von 10

Ohne statistische Auswertung

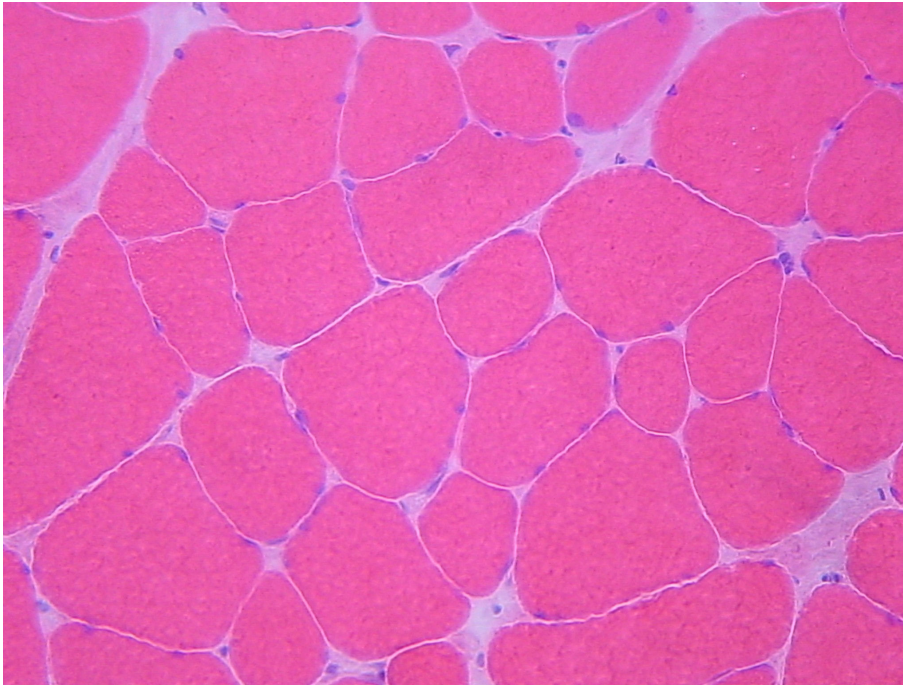


Abbildung 13: Pathologische Kalibervariationen im Op-Bein bei einem Tier der NaCl/Immob-Gruppe nach 36 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung

3.3.6.2 Ödem

Aus Tab. 9 lässt sich die Verteilung der Muskeln erkennen, bei denen ein Ödem zu sehen ist. Eine Häufung fällt vor allem innerhalb der C.p./Immob-Gruppe auf, nämlich im Op-Bein am Tag 4 der Erholungsphase. Hier werden bei 8 von 10 Muskeln Ödeme gesehen. 4 von 10 Muskeln mit Ödemen treten in der C.p./Immob-Gruppe außerdem im Op-Bein am Tag 0 und 12 und im Kontrollbein am Tag 4 auf, sowie auch in der NaCl/Immob-Gruppe im Op-Bein am Tag 4. Ein vermehrtes Auftreten von Ödemen betrifft also hauptsächlich die immobilisierten Tiere um den 4. Erholungstag. In Abb. 14 sieht man einen Muskel mit peri- und endomysialem Ödem.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Table 9: Anzahl der Muskeln von n=10 Tieren pro Schädigungsgruppe und Erholungstag, bei denen ein Ödem gesehen wird, im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins (bei n=8 oder 9 sind die anderen Muskeln aufgrund von Artefakten nicht auswertbar)

Gruppen		Ödem			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	1 von 8	3 von 10	2 von 10	4 von 10
	Kontroll-Bein	0 von 9	2 von 9	0 von 10	0 von 10
4 Tage Erholung	Op-Bein	1 von 10	2 von 10	4 von 10	8 von 10
	Kontroll-Bein	1 von 10	3 von 10	1 von 10	4 von 10
12 Tage Erholung	Op-Bein	3 von 10	2 von 10	0 von 10	4 von 10
	Kontroll-Bein	3 von 10	2 von 10	0 von 10	2 von 10
36 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	1 von 10	0 von 10	1 von 10
	Kontroll-Bein	0 von 10	2 von 10	0 von 10	1 von 10

Ohne statistische Auswertung

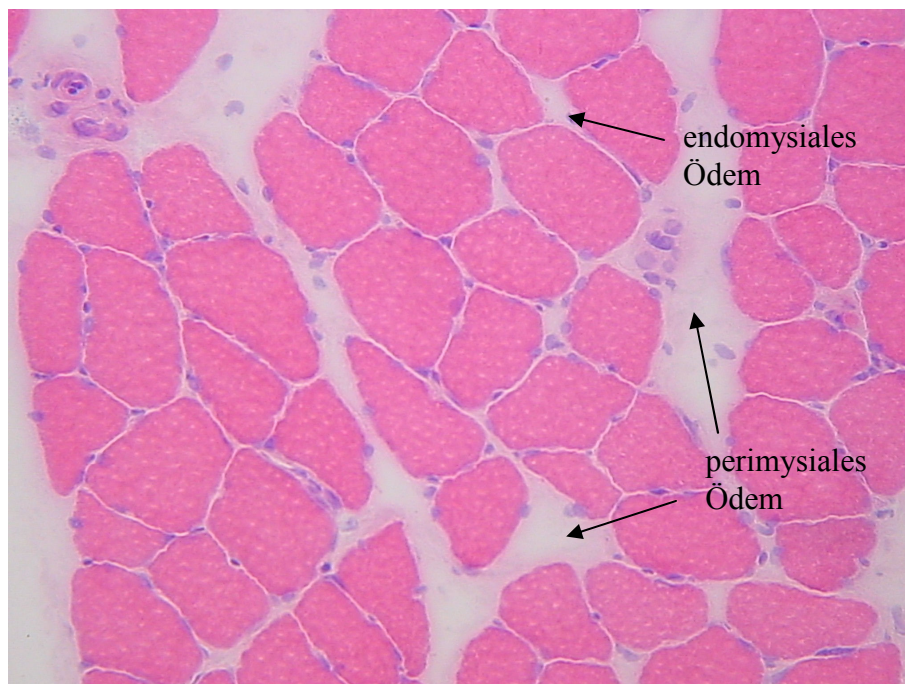


Abbildung 14: Perimysiales und endomysiales Ödem im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe nach 12 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.3.6.3 Myophagie

Die Anzahl der Muskelfasern mit Myophagie ist der Tab. 10 zu entnehmen. Wie auch anhand von Abb. 15 und 16 zu erkennen, ist sowohl im Op-Bein als auch im Kontrollbein ein starker Anstieg bis Tag 4 der Erholungsphase zu verzeichnen, der danach langsam zurückgeht. Dies betrifft im Op-Bein alle Schädigungsgruppen außer der NaCl/Sham-Gruppe, insbesondere jedoch die C.p.-Gruppen, im Kontrollbein ausschließlich die beiden C.p.-Gruppen. Am 36. Erholungstag beträgt die Anzahl der Myophagien im Op-Bein in der C.p./Sham-Gruppe im Mittel noch $1,70 \pm 2,75$ und in der C.p./Immob-Gruppe $2,00 \pm 2,26$, während sie in den jeweiligen NaCl-Gruppen bei $0,60 \pm 0,84$ bzw. $0,90 \pm 1,52$ liegt. Ähnlich stellt es sich auch im Kontrollbein dar. Abb. 17 zeigt eine beginnende Myophagie. Die Gewebsmakrophagen dringen von einer Seite in die Muskelfaser ein und bauen sie ab. Bei der fortgeschrittenen Myophagie in Abb. 18 ist von den befallenen Muskelfasern kaum noch etwas zu sehen, sie sind komplett von Makrophagen ausgefüllt.

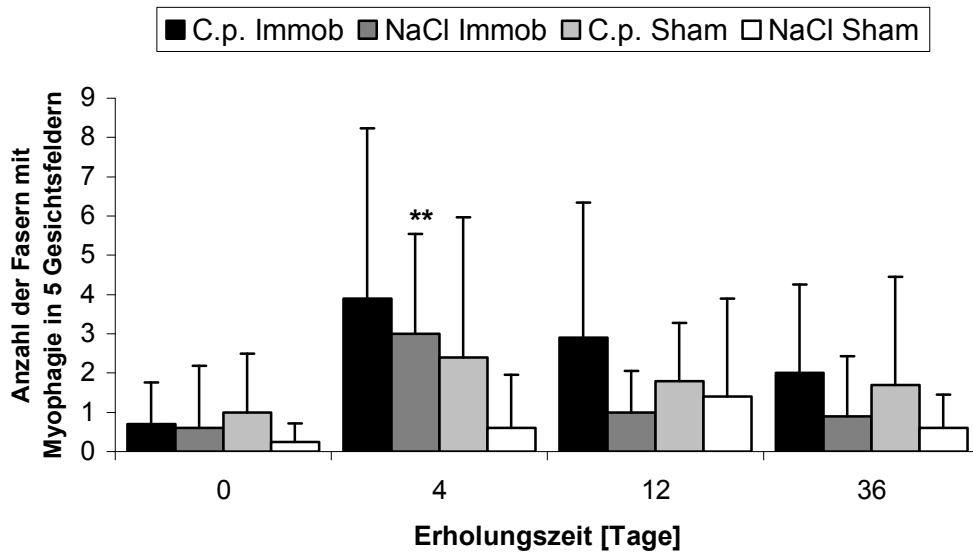
Table 10: Anzahl der Fasern mit Myophagie in 5 Gesichtsfeldern im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen

Gruppen		Myophagien			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	$0,25 \pm 0,46$	$1,00 \pm 1,49$	$0,60 \pm 1,58$	$0,70 \pm 1,06$
	Kontrollbein	$0,11 \pm 0,33$	$1,78 \pm 2,54$	$0,20 \pm 0,42$	$0,50 \pm 0,71$
4 Tage Erholung	Op-Bein	$0,60 \pm 1,35$	$2,40 \pm 3,57$	$3,00 \pm 2,54$ **	$3,90 \pm 4,33$
	Kontrollbein	$0,40 \pm 0,70$	$3,80 \pm 5,77$	$0,70 \pm 0,67$	$2,30 \pm 2,50$
12 Tage Erholung	Op-Bein	$1,40 \pm 2,50$	$1,80 \pm 1,48$	$1,00 \pm 1,05$	$2,90 \pm 3,45$
	Kontrollbein	$1,10 \pm 1,45$	$3,20 \pm 3,68$	$0,60 \pm 1,07$	$2,70 \pm 2,79$ *
36 Tage Erholung	Op-Bein	$0,60 \pm 0,84$	$1,70 \pm 2,75$	$0,90 \pm 1,52$	$2,00 \pm 2,26$
	Kontrollbein	$1,00 \pm 1,05$	$1,30 \pm 2,11$	$0,60 \pm 1,58$	$2,20 \pm 3,36$

* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

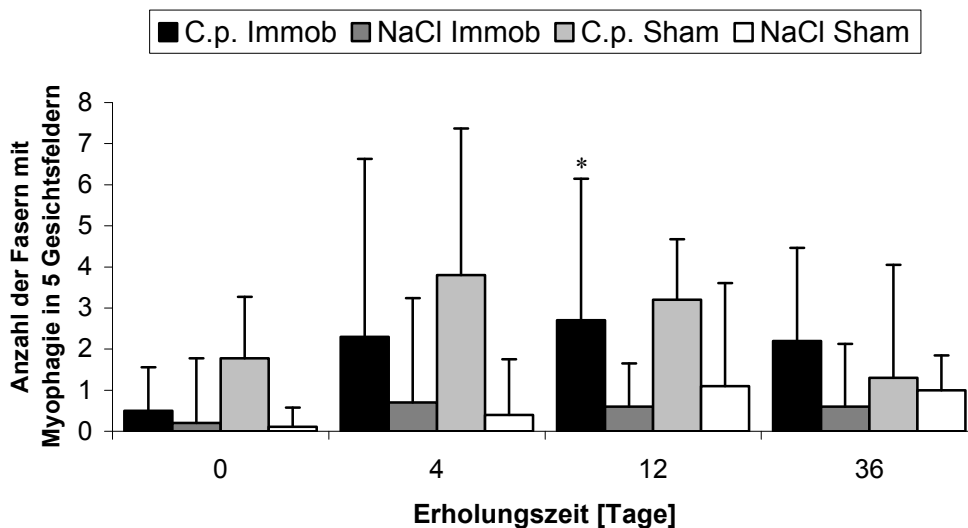
Myophagien im M. gastrocnemius des Op-Beins



** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Abbildung 15: Anzahl der Fasern mit Myophagie in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins

Myophagien im M. gastrocnemius des Kontrollbeins



* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

Abbildung 16: Anzahl der Fasern mit Myophagie in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins

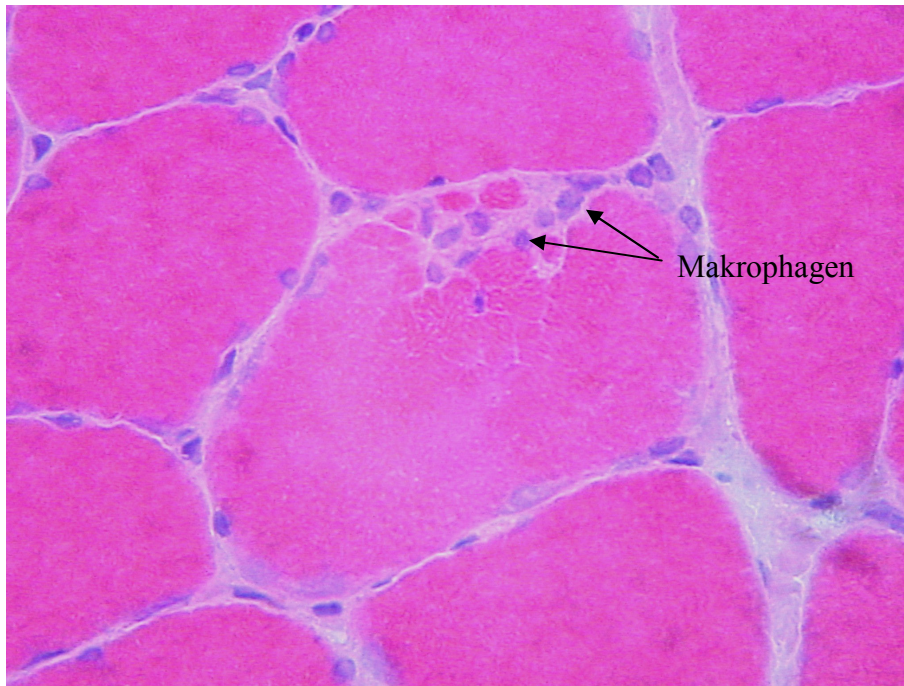


Abbildung 17: Beginnende Myophagie im Kontrollbein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe nach 12 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 560-fache Vergrößerung

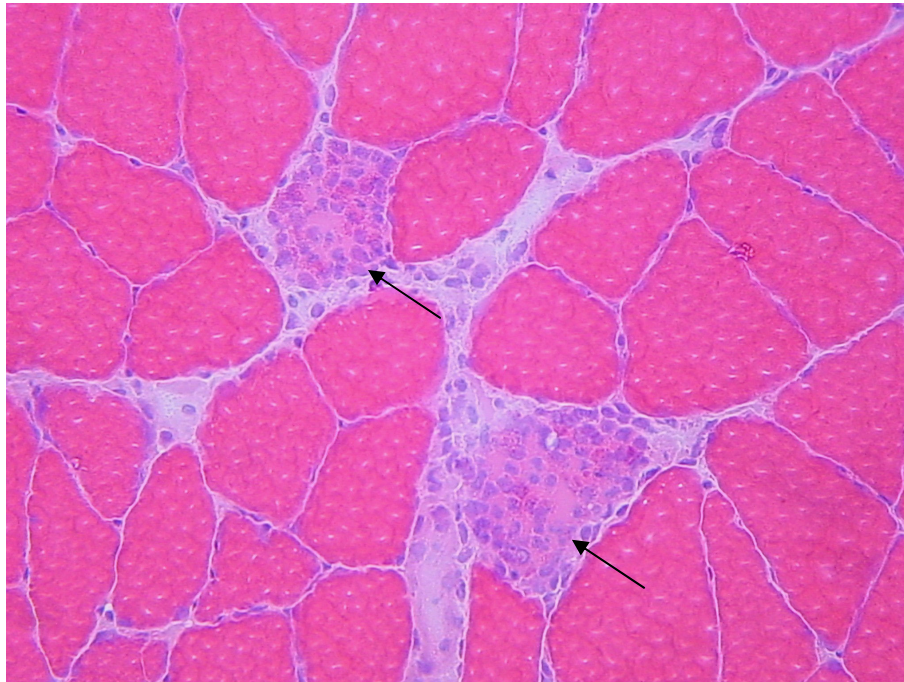


Abbildung 18: Fortgeschrittene Myophagie im Kontrollbein bei einem Tier der C.p./Sham-Gruppe nach 4 Tagen Erholung, die betroffenen Muskelfasern werden komplett von Makrophagen ausgefüllt (Pfeile); H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.3.6.4 Anguläre Fasern

In Tab. 11 ist die Anzahl der angulären Fasern in 5 Gesichtsfeldern des M. gastrocnemius dargestellt. Aus den aufgeführten Werten, sowie auch anhand von Abb. 19 und 20, erkennt man im Op-Bein der Immob-Gruppen einen Anstieg der Werte am Tag 4, der danach langsam zurückgeht. Dabei ist der Wert der NaCl/Immob-Gruppe von $7,60 \pm 8,62$ und derjenige der C.p./Immob-Gruppe von $2,50 \pm 2,37$ gegenüber denen der entsprechenden Sham-Gruppen signifikant erhöht. Innerhalb der Sham-Gruppen, sowie in Bezug auf die Kontrollbeine, lassen sich keine wesentlichen Unterschiede feststellen. Abb. 21 zeigt einen Ausschnitt eines Muskels mit angulären Fasern.

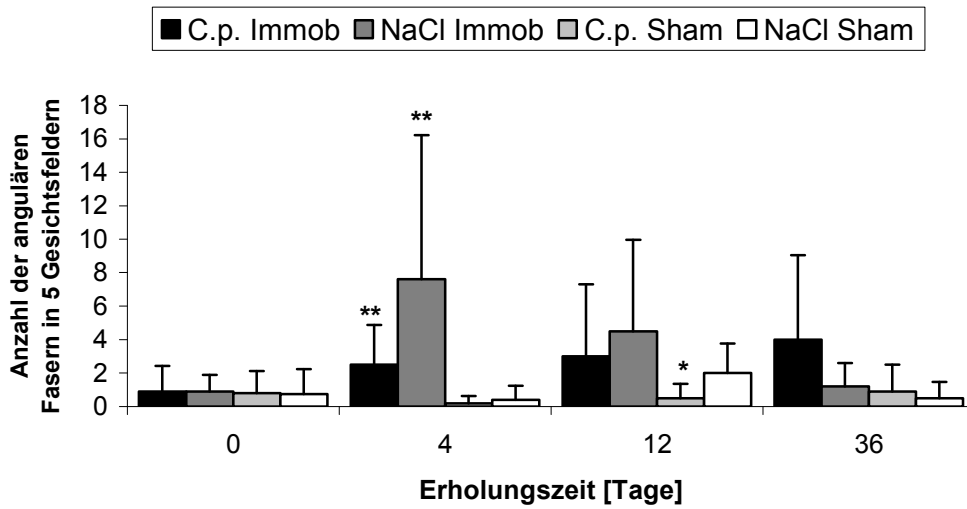
Tabelle 11: Anzahl der angulären Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen

Gruppen		Anguläre Fasern			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	0,75 ± 1,49	0,80 ± 1,32	0,90 ± 0,99	0,90 ± 1,52
	Kontrollbein	0,00 ± 0,00	1,56 ± 1,51 *	0,40 ± 1,26	0,30 ± 0,67 **
4 Tage Erholung	Op-Bein	0,40 ± 0,84	0,20 ± 0,42	7,60 ± 8,62 **	2,50 ± 2,37 **
	Kontrollbein	0,50 ± 1,27	1,00 ± 0,82	0,90 ± 0,99	0,50 ± 1,27
12 Tage Erholung	Op-Bein	2,00 ± 1,76	0,50 ± 0,85 *	4,50 ± 5,46	3,00 ± 4,29
	Kontrollbein	1,30 ± 1,64	0,40 ± 0,70	1,20 ± 1,23	0,90 ± 1,10
36 Tage Erholung	Op-Bein	0,50 ± 0,97	0,90 ± 1,60	1,20 ± 1,40	4,00 ± 5,03
	Kontrollbein	0,50 ± 0,85	0,10 ± 0,32	0,50 ± 0,85	0,70 ± 0,82 **

* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Anguläre Fasern im M. gastrocnemius des Op-Beins

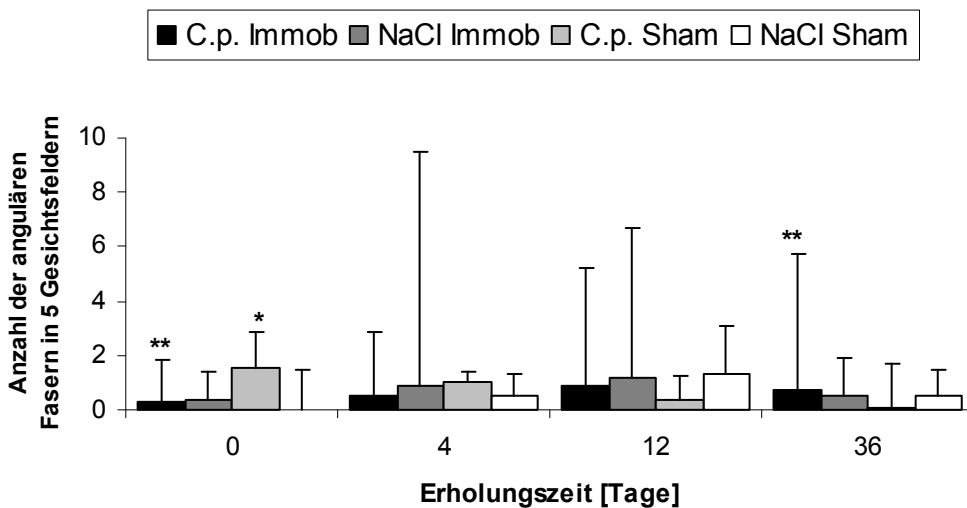


* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Abbildung 19: Anzahl der angulären Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins

Anguläre Fasern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins



* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Abbildung 20: Anzahl der angulären Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins

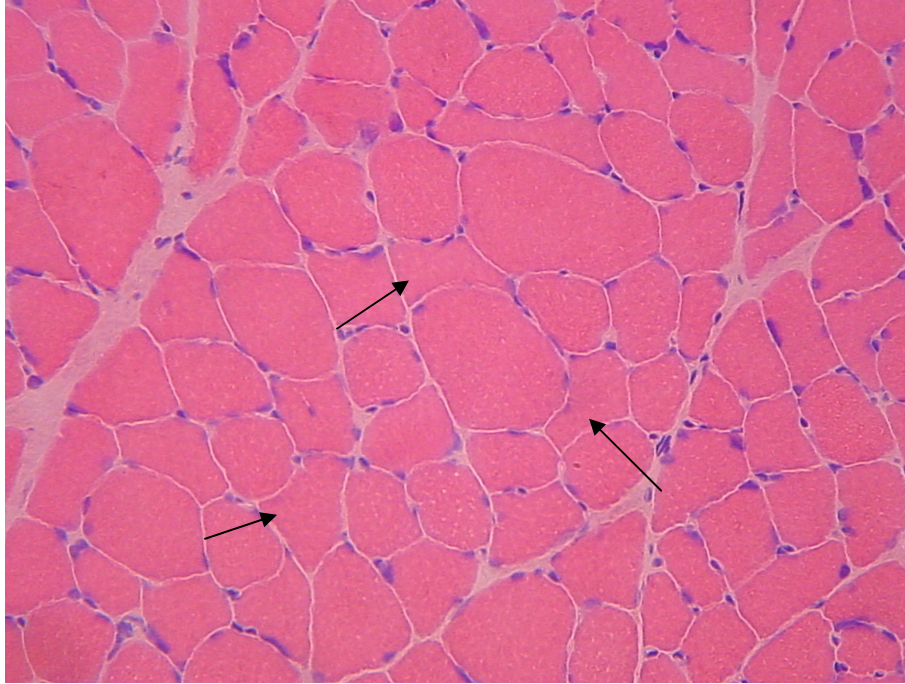


Abbildung 21: *Anguläre Fasern (Pfeile) im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe nach 4 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung*

3.3.6.5 Zentrale Kerne

In Bezug auf die Anzahl der Fasern mit zentralen Kernen gibt es zwischen den verschiedenen Schädigungsgruppen statistisch gesehen zwar keine signifikanten Unterschiede, allerdings lässt sich in Tab. 12 ein Anstieg der Werte an den Tagen 4 und 12 der Erholungsphase sowohl im Op-Bein, als auch geringfügiger im Kontrollbein erkennen. Die Veränderungen betreffen im Op-Bein besonders die C.p./Immob-Tiere, aber auch die C.p./Sham- und die NaCl/Immob-Tiere, im Kontrollbein nur die Tiere der beiden C.p.-Gruppen. Auffallend ist ein Peak am Tag 0 in der C.p./Sham-Gruppe, sowohl im Op-, als auch im Kontrollbein. Allerdings handelt es sich hierbei um ein einzelnes Ausreißertier, was sich auch anhand der großen Standardabweichungen nachvollziehen lässt. Die Säulendiagramme der Abb. 22 und 23 verdeutlichen den Verlauf der Werte zusätzlich. In Abb. 24 ist eine Muskelfaser mit mehreren zentralen Kernen dargestellt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 12: Anzahl der Fasern mit zentralen Kernen in 5 Gesichtsfeldern im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen

Gruppen		Zentrale Kerne			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	0,63 ± 1,06	20,00 ± 58,35	3,40 ± 3,66	3,30 ± 2,67
	Kontrollbein	1,56 ± 2,24	28,11 ± 80,97	1,50 ± 1,27	1,80 ± 1,62
4 Tage Erholung	Op-Bein	1,00 ± 1,56	10,70 ± 19,45	8,20 ± 13,31	13,00 ± 13,79
	Kontrollbein	0,10 ± 0,32	4,20 ± 3,71	1,60 ± 1,58	2,50 ± 1,51
12 Tage Erholung	Op-Bein	2,00 ± 1,89	5,60 ± 6,98	5,70 ± 12,88	16,60 ± 22,52
	Kontrollbein	1,00 ± 1,33	4,80 ± 2,49	1,50 ± 1,90	5,30 ± 4,22
36 Tage Erholung	Op-Bein	2,70 ± 3,92	5,40 ± 7,31	3,50 ± 4,97	4,40 ± 3,92
	Kontrollbein	1,00 ± 1,56	3,00 ± 2,45	1,50 ± 1,65	4,10 ± 2,85

Keine signifikanten Unterschiede

Zentrale Kerne im *M. gastrocnemius* des Op-Beins

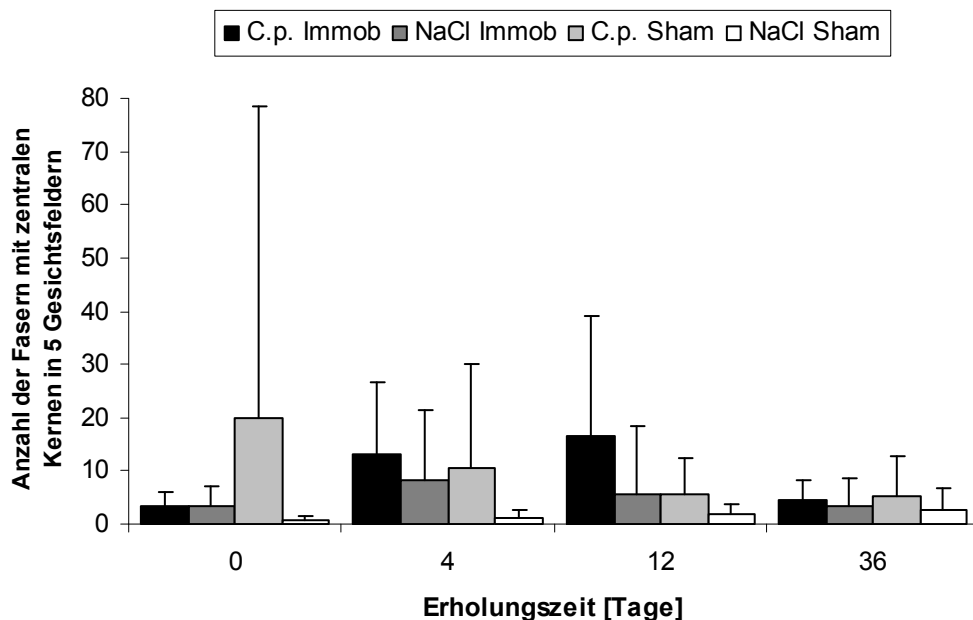


Abbildung 22: Anzahl der Fasern mit zentralen Kernen in 5 Gesichtsfeldern im *M. gastrocnemius* des Op-Beins

Zentrale Kerne im M. gastrocnemius des Kontrollbeins

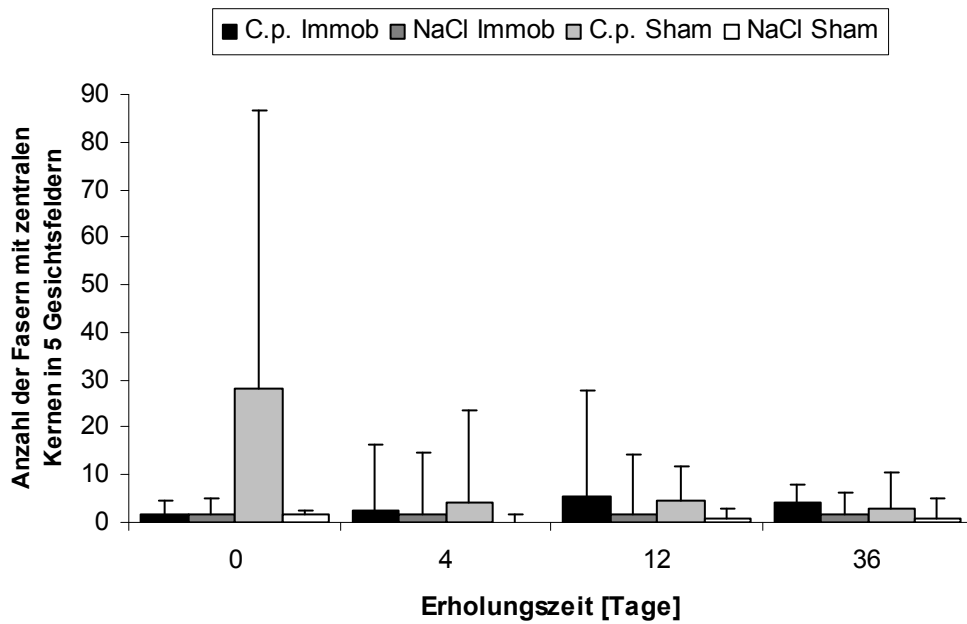


Abbildung 23: Anzahl der Fasern mit zentralen Kernen in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins

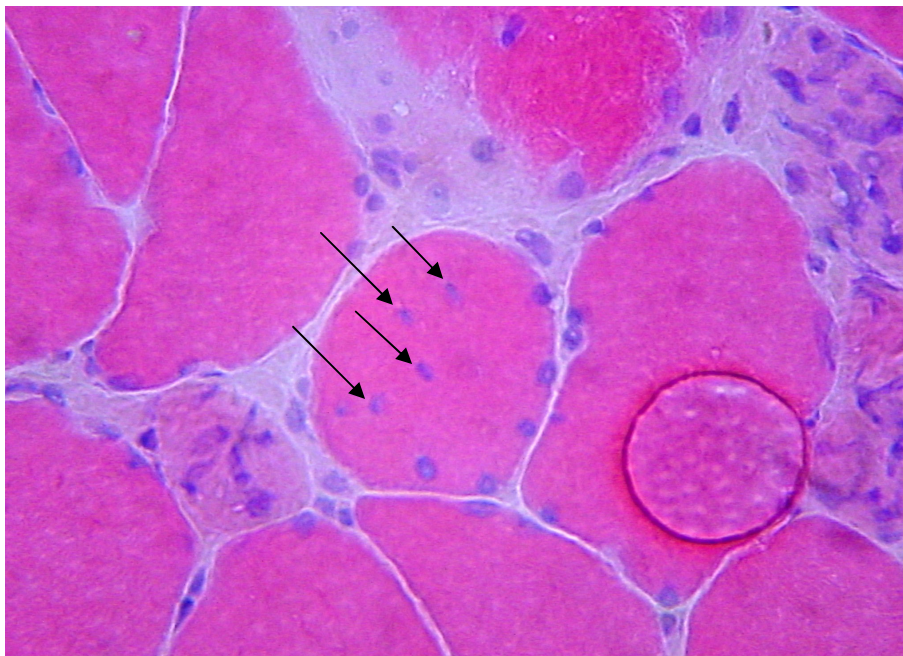


Abbildung 24: Faser mit zentralen Zellkernen (Pfeile) im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Sham-Gruppe nach 36 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 560-fache Vergrößerung

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

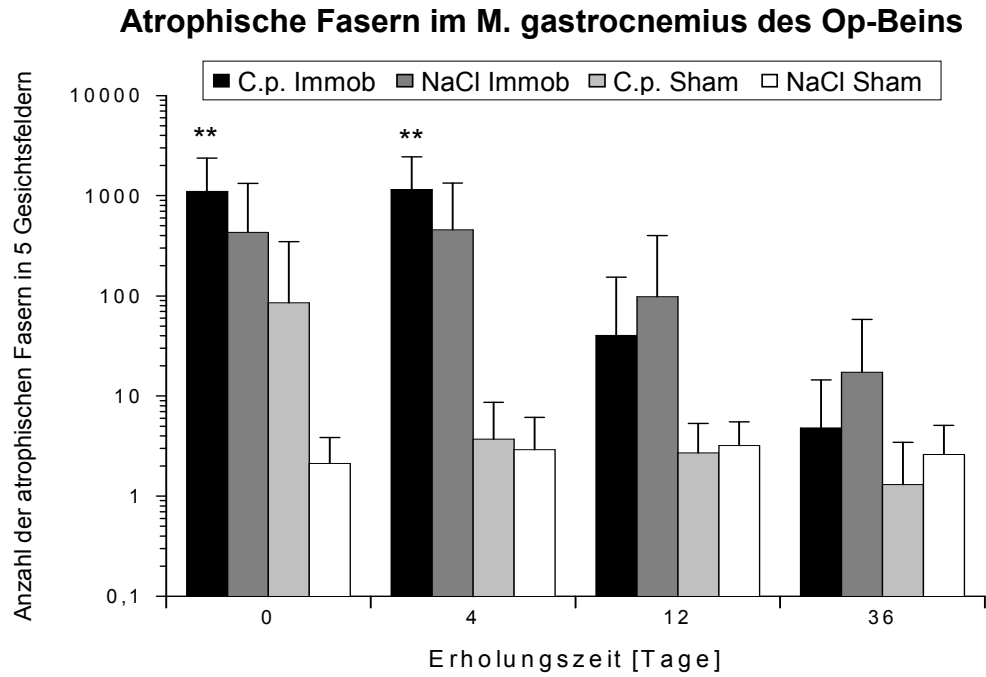
3.3.6.6 Atrophische Fasern

Die Anzahl der atrophischen Fasern in 5 Gesichtsfeldern des M. gastrocnemius ist in Tab. 13 dargestellt. Die Werte in der NaCl/Sham-Gruppe und in den Kontrollbeinen, bis auf bei einem Ausreißertier am Tag 0, bleiben in der ganzen Beobachtungszeit konstant niedrig. In den Op-Beinen sind deutlich erhöhte Werte in den Immob-Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Sham-Gruppen noch bis zum Ende der Erholungszeit und in der C.p./Sham-Gruppe am Tag 0 zu erkennen. Die graphische Darstellung der Werte in Abb. 25 und 26 ist am besten mit logarithmischer Skalierung der Y-Achse möglich. In den Abbildungen 27 bis 29 sind Ausschnitte von Muskeln mit einzelnen atrophischen Fasern (Abb. 27), einer Gruppenatrophie (Abb. 28) und von einem komplett atrophierten Muskel (Abb. 29) gezeigt.

Table 13: Anzahl der atrophischen Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen

Gruppen		Atrophische Fasern			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	2,13 ± 1,73	85,40 ± 261,98	429,60 ± 900,65	1.106,20 ± 1.259,35 **
	Kontrollbein	0,56 ± 0,88	78,78 ± 231,09	1,90 ± 2,13	4,20 ± 5,81
4 Tage Erholung	Op-Bein	2,90 ± 3,21	3,70 ± 4,99	457,40 ± 883,85	1.150,50 ± 1.288,31 **
	Kontrollbein	2,60 ± 3,53	2,90 ± 2,38	2,20 ± 2,25	2,90 ± 1,91
12 Tage Erholung	Op-Bein	3,20 ± 2,30	2,70 ± 2,63	98,20 ± 300,36	40,30 ± 113,85
	Kontrollbein	2,50 ± 2,27	2,40 ± 2,17	2,90 ± 1,52	3,00 ± 2,45
36 Tage Erholung	Op-Bein	2,60 ± 2,50	1,30 ± 2,16	17,20 ± 40,80	4,80 ± 9,67
	Kontrollbein	2,20 ± 1,48	1,30 ± 1,83	2,10 ± 1,73	2,40 ± 2,76

** p < 0,05 vs. entsprechende Sham-Gruppe



** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Abbildung 25: Anzahl der atrophischen Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins

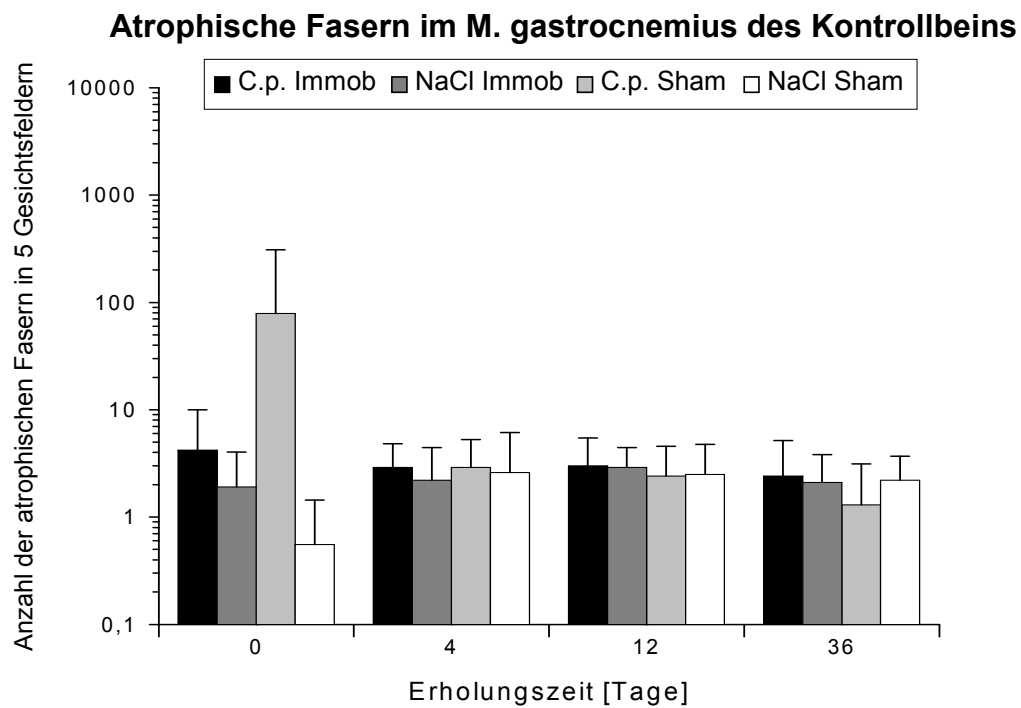


Abbildung 26: Anzahl der atrophischen Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

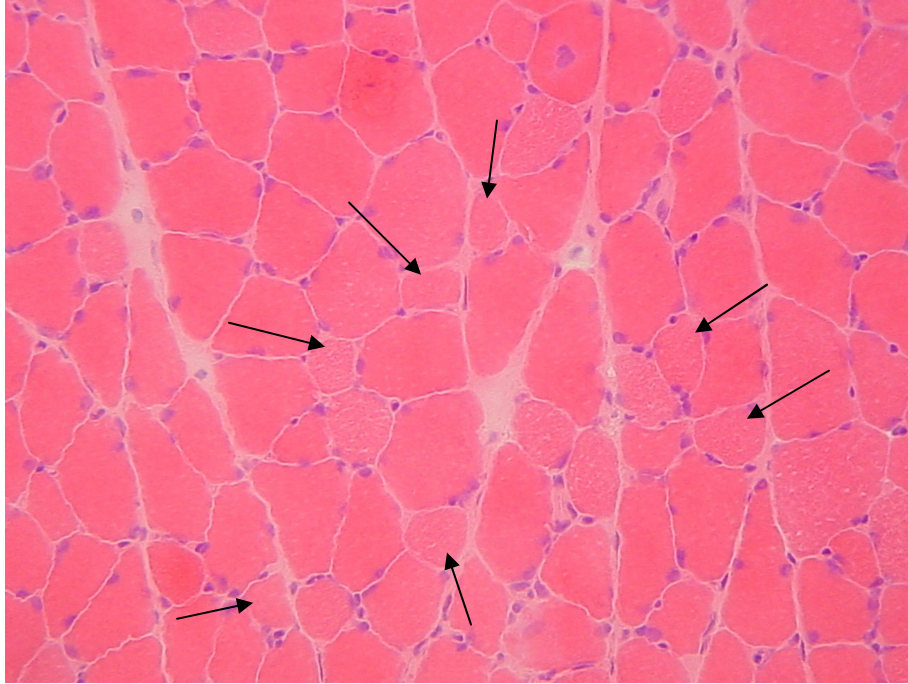


Abbildung 27: Einzelne atrophische Fasern (Pfeile) im Op-Bein bei einem Tier der C.p./ Immob-Gruppe nach 4 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung

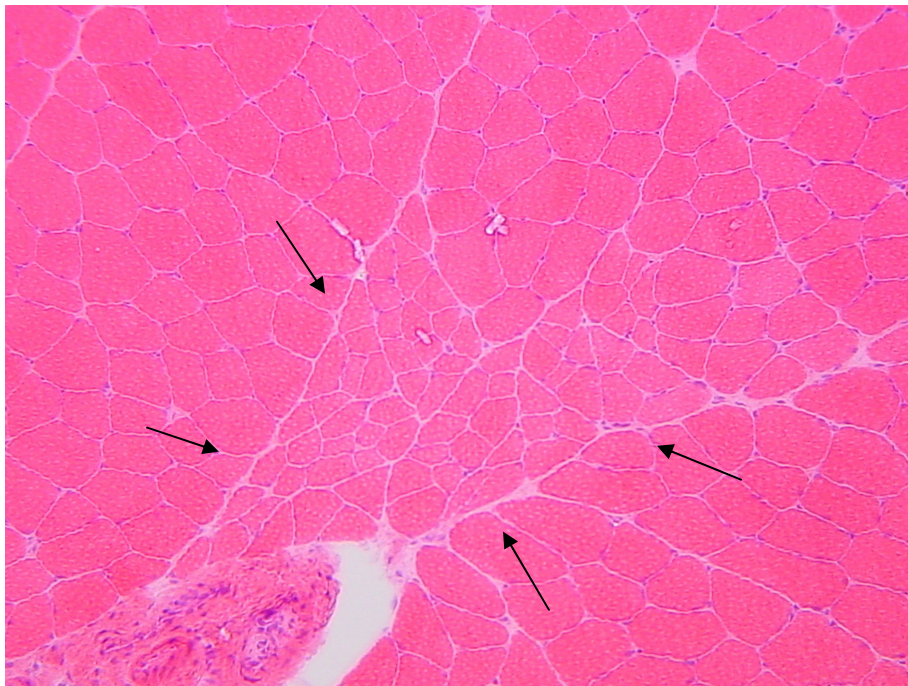


Abbildung 28: Gruppenatrophie (zwischen den Pfeilen) im Op-Bein bei einem Tier der NaCl/ Immob-Gruppe nach 12 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 140-fache Vergrößerung

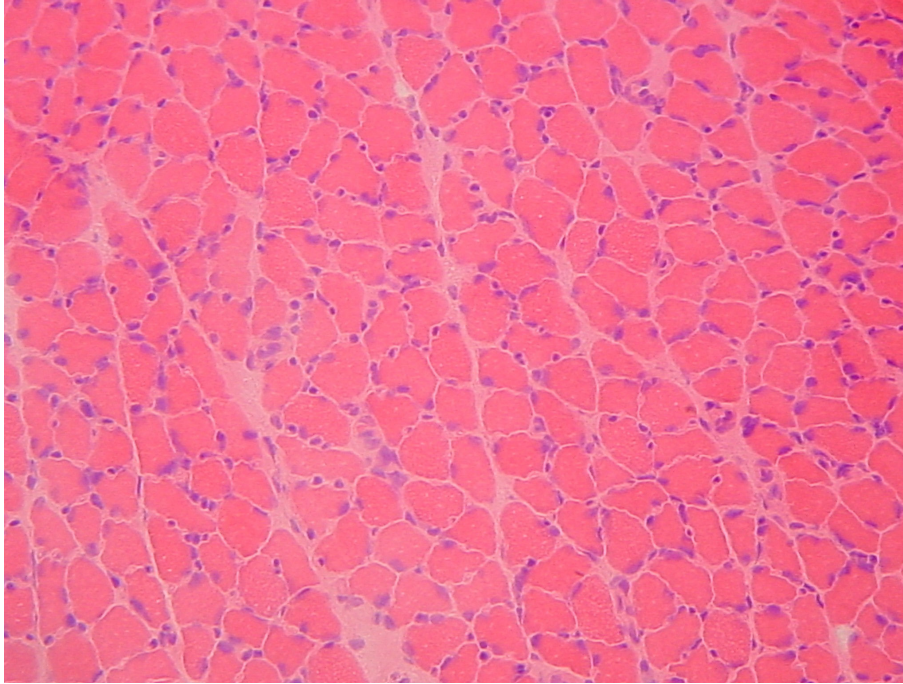


Abbildung 29: Kompletter atrophierter Muskel mit Atrophie aller Muskelfasern im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe nach 4 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung

3.3.6.7 Faserdurchmesser

Die Faserdurchmesser werden am Computerbildschirm an möglichst repräsentativen digitalen Fotos der jeweiligen Muskeln ermittelt. Am Tag 0 beträgt der Faserdurchmesser im Op-Bein in der NaCl/Sham-Gruppe $46,16 \pm 2,83 \mu\text{m}$. Im Vergleich dazu in der C.p./Sham-Gruppe nur $37,23 \pm 3,25 \mu\text{m}$, in der NaCl/Immob-Gruppe $37,34 \pm 5,09 \mu\text{m}$ und in der C.p./Immob-Gruppe gar nur noch $32,79 \pm 3,83 \mu\text{m}$ (Tab.14). Daran kann man erkennen, dass die einzelnen Schädigungsfaktoren einen deutlichen Effekt auf den Faserdurchmesser aufweisen, der noch übertroffen wird durch die Kombination der beiden Faktoren. Der systemische Effekt der Inflammation ist auch an den Werten der Kontrollbeine ersichtlich, die in der C.p./Sham-Gruppe bei $38,97 \pm 3,15 \mu\text{m}$ und in der C.p./Immob-Gruppe bei $41,79 \pm 4,99 \mu\text{m}$ liegen. Dieser Effekt ist jedoch ab dem 4. Erholungstag schon nicht mehr sichtbar, wohingegen die reduzierten Faserdurchmesser im Op-Bein besonders in den Immob-Gruppen noch bis zum Ende der Erholungszeit deutlich zu erkennen sind. Im Verlauf der Erholungszeit nehmen alle Faserdurchmesser unabhängig von der Schädigungsgruppe aufgrund des Wachstums der Tiere zusätzlich geringfügig zu. In Abb. 30 und 31 sind die Werte graphisch dargestellt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

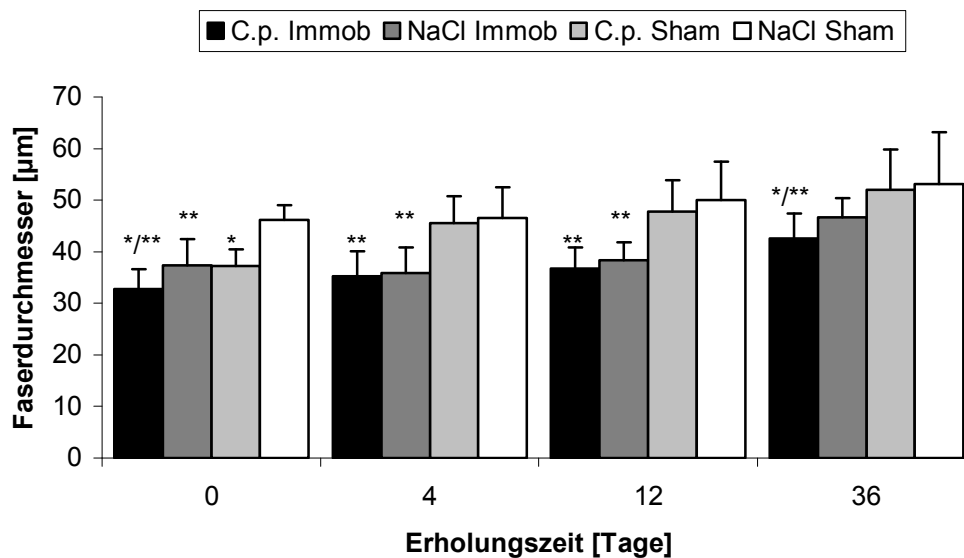
Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Faserdurchmesser im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins in Mikrometer

Gruppen		Faserdurchmesser [μm]			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	46,16 \pm 2,83	37,23 \pm 3,25 *	37,34 \pm 5,09 **	32,79 \pm 3,83 */**
	Kontrollbein	52,29 \pm 7,87	38,97 \pm 3,15 *	46,04 \pm 4,78	41,79 \pm 4,99
4 Tage Erholung	Op-Bein	46,51 \pm 6,01	45,50 \pm 5,31	35,90 \pm 4,99 **	35,21 \pm 4,85 **
	Kontrollbein	49,34 \pm 7,05	46,99 \pm 4,04	51,51 \pm 6,05	47,11 \pm 7,16
12 Tage Erholung	Op-Bein	50,00 \pm 7,42	47,74 \pm 6,13	38,37 \pm 3,50 **	36,77 \pm 4,04 **
	Kontrollbein	50,76 \pm 6,34	51,50 \pm 5,34	50,74 \pm 4,92	50,24 \pm 6,83
36 Tage Erholung	Op-Bein	53,17 \pm 10,01	52,04 \pm 7,75	46,66 \pm 3,71	42,53 \pm 4,82 */**
	Kontrollbein	51,40 \pm 8,60	58,00 \pm 8,49	56,87 \pm 6,15	52,60 \pm 7,78

* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Faserdurchmesser im *M. gastrocnemius* des Op-Beins

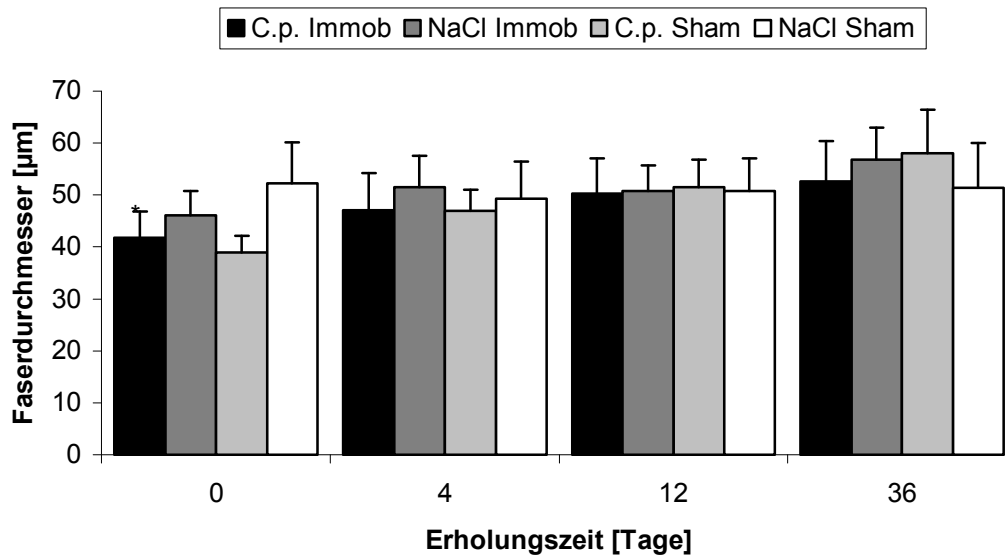


* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Abbildung 30: Durchschnittliche Faserdurchmesser im *M. gastrocnemius* des Op-Beins

Faserdurchmesser im M. gastrocnemius des Kontrollbeins



* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

Abbildung 31: Durchschnittliche Faserdurchmesser im M. gastrocnemius des Kontrollbeins

3.3.6.8 Breite des endomysialen Bindegewebes

Auch die Breite des endomysialen Bindegewebes wird wie der Faserdurchmesser am Computerbildschirm gemessen. Wie aus Tab. 15 und den Abbildungen 32 und 33 zu entnehmen, ist eine Zunahme des Bindegewebes vor allem im Op-Bein sehr deutlich an den Tagen 0 und 4 der Erholung zu verzeichnen. Am stärksten sind hiervon die C.p./Immob-Tiere betroffen. Aber auch in den Kontrollbeinen ist hauptsächlich innerhalb der C.p.-Gruppen eine leichte Vermehrung des Bindegewebes zu erkennen. Die Werte bleiben hier bis zum Ende der Erholungszeit gegenüber denen der NaCl-Gruppen erhöht. Abb. 34 ist ein Ausschnitt aus einem stark geschädigten Muskel mit Bindegewebszubildungen. Die einzelnen Muskelfasern werden aus ihrem Zusammenhang gerissen und weit von einander entfernt. Dadurch und durch die starken Kaliberschwankungen der sich in Auflösung befindlichen, degenerierten Muskelfasern wirkt das histologische Bild strukturlos und unaufgeräumt.

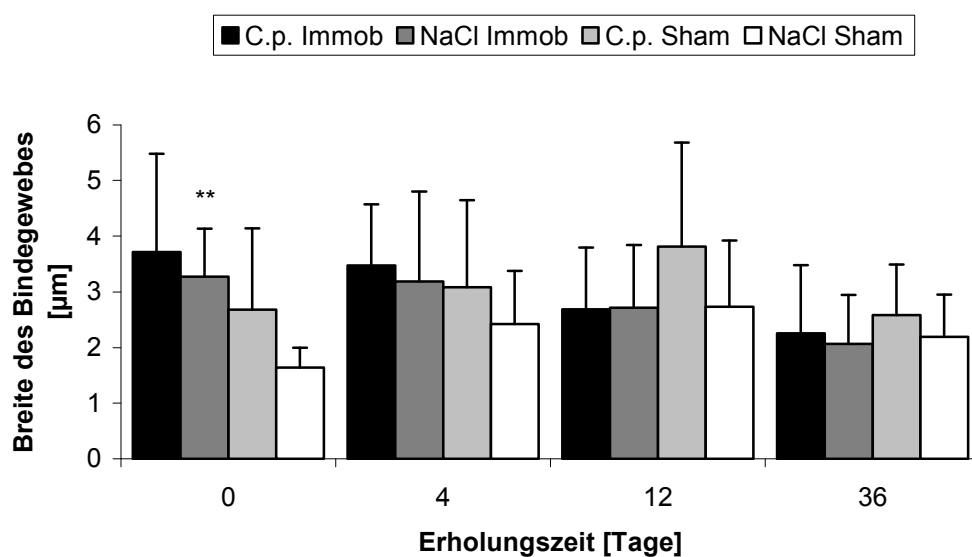
EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Breite des endomysialen Bindegewebes im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins in Mikrometer

Gruppen		endomysiales Bindegewebe [μm]			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	1,64 \pm 0,36	2,68 \pm 1,46	3,27 \pm 0,86 **	3,71 \pm 1,77
	Kontrollbein	1,75 \pm 0,34	2,56 \pm 1,05	2,03 \pm 0,71	2,19 \pm 0,87
4 Tage Erholung	Op-Bein	2,42 \pm 0,96	3,09 \pm 1,56	3,19 \pm 1,61	3,47 \pm 1,10
	Kontrollbein	1,96 \pm 0,79	2,68 \pm 1,29	2,24 \pm 0,87	2,76 \pm 1,36
12 Tage Erholung	Op-Bein	2,74 \pm 1,19	3,81 \pm 1,87	2,71 \pm 1,13	2,69 \pm 1,11
	Kontrollbein	2,69 \pm 1,20	2,81 \pm 1,25	2,07 \pm 0,57	3,18 \pm 1,82
36 Tage Erholung	Op-Bein	2,19 \pm 0,76	2,59 \pm 0,90	2,06 \pm 0,88	2,26 \pm 1,22
	Kontrollbein	2,33 \pm 0,80	3,29 \pm 2,01	1,94 \pm 0,59	2,93 \pm 1,49

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Endomysiales Bindegewebe im *M. gastrocnemius* des Op-Beins



** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Abbildung 32: Durchschnittliche Breite des endomysialen Bindegewebes im *M. gastrocnemius* des Op-Beins

Endomysiales Bindegewebe im M. gastrocnemius des Kontrollbeins

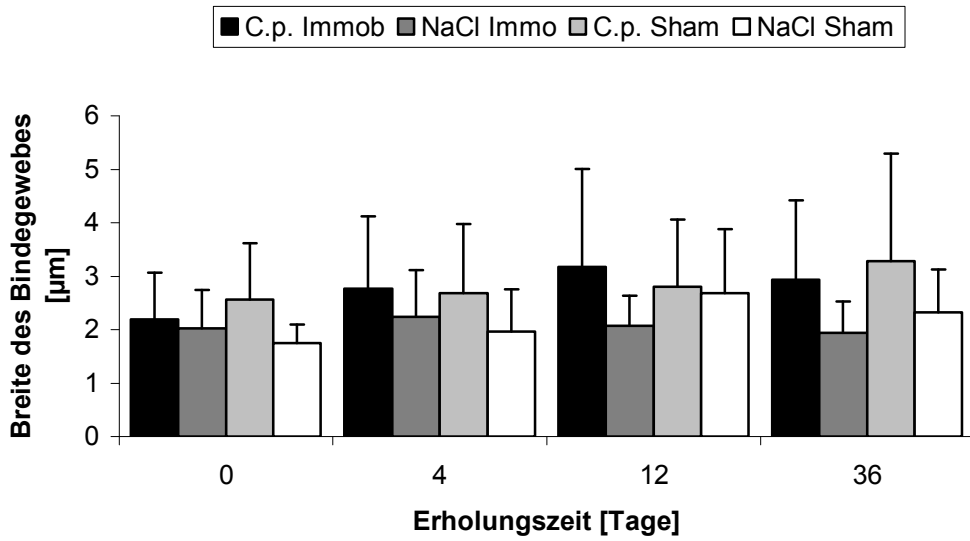


Abbildung 33: Durchschnittliche Breite des endomysialen Bindegewebes im M. gastrocnemius des Kontrollbeins

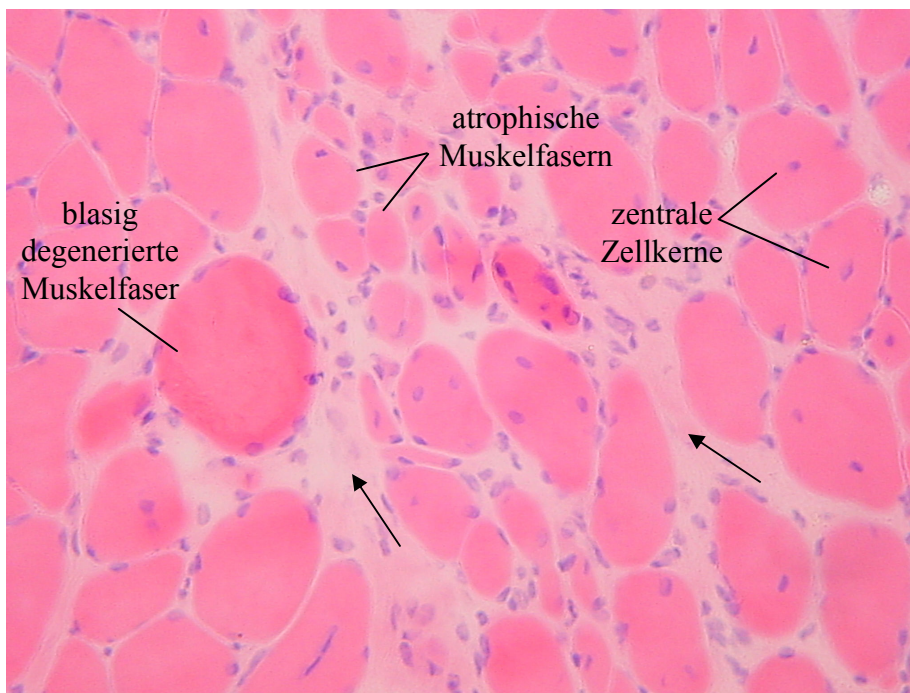


Abbildung 34: Verbreitertes Bindegewebe (Pfeile) im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe am Tag 0; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.3.6.9 Entzündungszellen

Die endomysiale Infiltration durch Entzündungszellen (Makrophagen, Lymphozyten) beherrscht am Tag 0 sowohl im Op- als auch im Kontrollbein vor allem innerhalb der C.p.-Gruppen das histologische Bild. Die ausgezählten Werte sind gegenüber denen der entsprechenden NaCl-Gruppen signifikant erhöht, in der C.p./Sham-Gruppe noch bis Tag 4. Ebenso verhält es sich im Op-Bein der NaCl/Immobilisierungs-Gruppe im Vergleich zur entsprechenden Sham-Gruppe. Der Zusammenhang zwischen C.p.-Injektion und zellulärer Infiltration tritt jedoch im Verlauf der Erholung eindeutig hervor. Die Werte der C.p.-Gruppen bleiben bis Tag 36 erhöht, was besonders deutlich im Kontrollbein zu erkennen ist (Tab. 16, Abb. 35 und 36). Die endomysiale sowie die perivaskuläre Infiltration sind in Abbildungen 37 und 38 zu sehen.

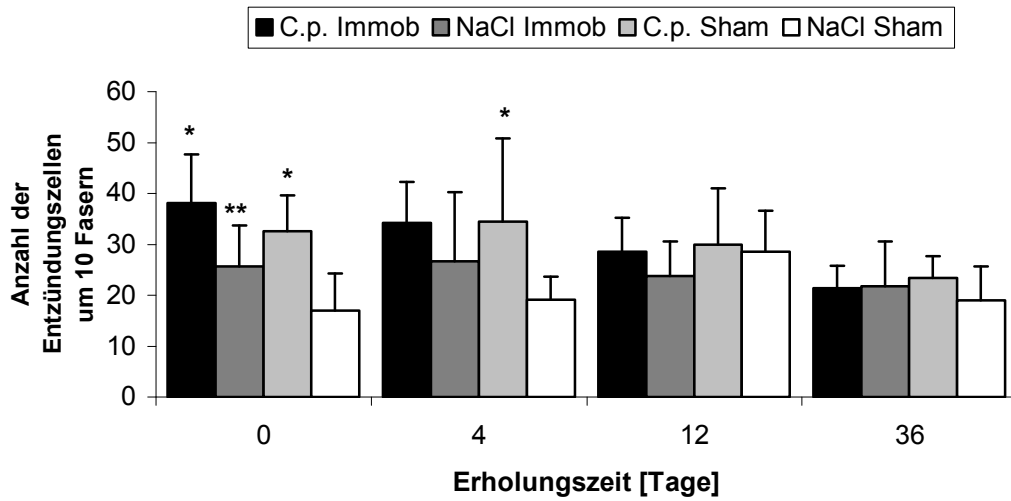
Tabelle 16: Anzahl der Entzündungszellen um 10 Muskelfasern im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen

Gruppen		Entzündungszellen			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	17,00 ± 7,29	32,60 ± 7,00 *	25,60 ± 8,09 **	38,10 ± 9,63 *
	Kontrollbein	18,11 ± 8,75	32,44 ± 9,62 *	20,20 ± 3,85	32,10 ± 7,58 *
4 Tage Erholung	Op-Bein	19,10 ± 4,56	34,50 ± 16,28 *	26,70 ± 13,61	34,20 ± 8,01
	Kontrollbein	17,20 ± 3,61	33,90 ± 12,97 *	20,50 ± 4,84	25,80 ± 11,90
12 Tage Erholung	Op-Bein	28,50 ± 8,14	30,00 ± 10,97	23,80 ± 6,73	28,60 ± 6,59
	Kontrollbein	27,60 ± 10,92	29,80 ± 10,52	23,90 ± 8,08	29,60 ± 10,17
36 Tage Erholung	Op-Bein	19,00 ± 6,68	23,40 ± 4,30	21,70 ± 8,83	21,40 ± 4,35
	Kontrollbein	20,10 ± 5,24	24,90 ± 7,09	18,00 ± 6,18	26,40 ± 7,14 *

* p < 0,05 vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** p < 0,05 vs. entsprechende Sham-Gruppe

Entzündungszellen im M. gastrocnemius des Op-Beins

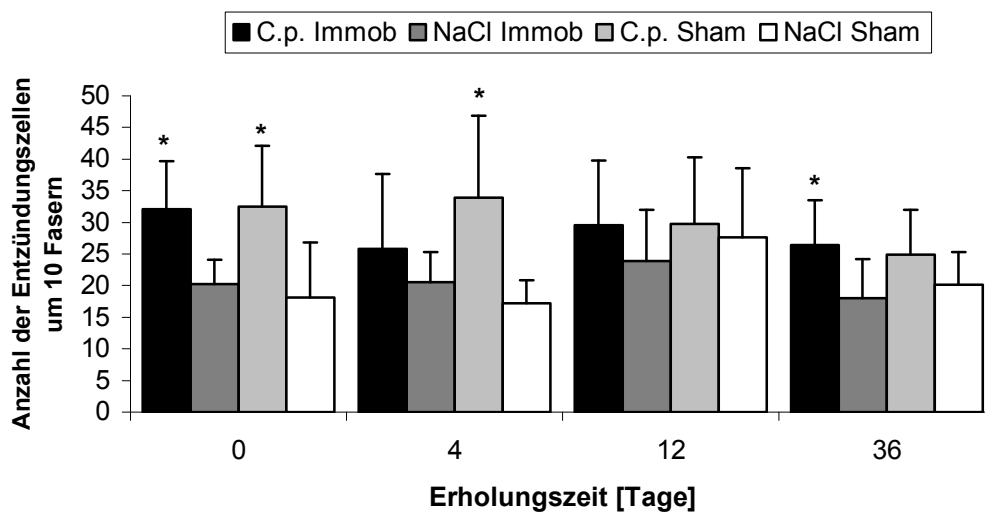


* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

Abbildung 35: Anzahl der Entzündungszellen um 10 Muskelfasern im M. gastrocnemius des Op-Beins

Entzündungszellen im M. gastrocnemius des Kontrollbeins



* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

Abbildung 36: Anzahl der Entzündungszellen um 10 Muskelfasern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins

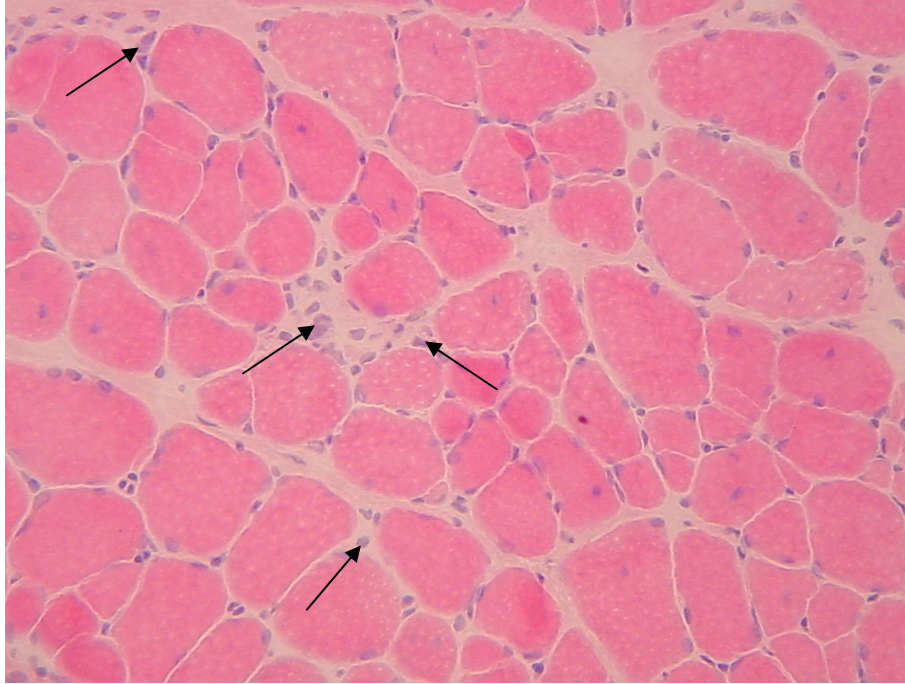


Abbildung 37: Endomyxiale Entzündungszellen (Pfeile) im Op-Bein bei einem Tier der C.p./ Sham-Gruppe am Tag 0; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung

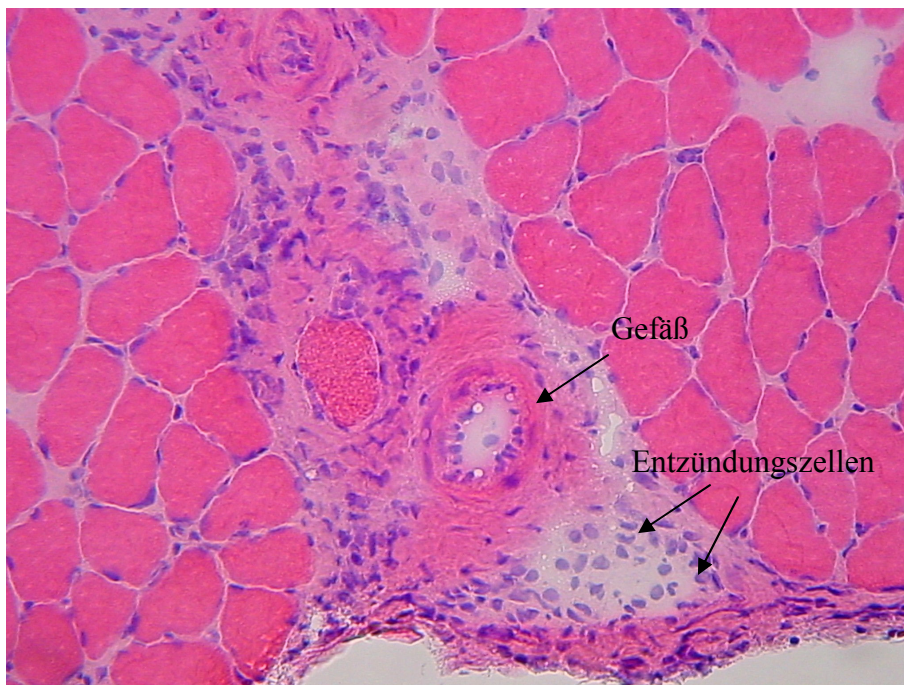


Abbildung 38: Perivaskuläre Infiltration mit Makrophagen und Lymphozyten im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immobilization-Gruppe am Tag 0; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung

3.3.7 Histologische Ergebnisse der PAS-Auswertung

3.3.7.1 Fasertypenverteilung

Die Verteilung der Fasertypen unterscheidet sich in den verschiedenen Schädigungsgruppen und zu allen Erholungszeitpunkten kaum. Der Anteil der Typ1-Fasern liegt nach den vorliegenden Ergebnissen grob bei 25%, der Anteil der Typ2-Fasern etwa bei 75% (Tab. 17 und 18). In Abb. 39 ist ein Muskel mit physiologischer Fasertypenverteilung in der PAS-Färbung abgebildet.

Tabelle 17: Anteil der Typ1-Fasern im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins in Prozent

Gruppen		Fasertyp1 [%]			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	25,8 ± 8,5	24,8 ± 10,8	34,8 ± 9,4	26,2 ± 5,2 *
	Kontroll-Bein	23,3 ± 4,2	22,7 ± 11,1	21,1 ± 8,8	26,7 ± 7,9
4 Tage Erholung	Op-Bein	27,9 ± 5,7	23,2 ± 4,7	30,0 ± 5,9	29,1 ± 6,9 **
	Kontroll-Bein	19,0 ± 8,9	21,6 ± 5,4	24,6 ± 4,7	20,3 ± 9,3
12 Tage Erholung	Op-Bein	25,2 ± 4,2	25,0 ± 3,8	27,1 ± 4,3	27,9 ± 5,2
	Kontroll-Bein	23,8 ± 3,9	23,5 ± 6,8	20,7 ± 6,5	24,4 ± 10,1
36 Tage Erholung	Op-Bein	25,5 ± 3,0	25,3 ± 4,9	20,6 ± 7,5	24,3 ± 8,0
	Kontroll-Bein	22,6 ± 9,3	22,2 ± 8,6	19,6 ± 5,4	24,0 ± 9,1

* p< 0,05 vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** p< 0,05 vs. entsprechende Sham-Gruppe

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 18: Anteil der Typ2-Fasern im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins in Prozent

Gruppen		Fasertyp2 [%]			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	74,3 ± 8,5	75,2 ± 10,8	65,2 ± 9,4	73,8 ± 5,2 *
	Kontroll-Bein	76,7 ± 4,2	77,3 ± 11,1	78,9 ± 8,8	73,3 ± 7,9
4 Tage Erholung	Op-Bein	72,1 ± 5,7	76,8 ± 4,7	70,0 ± 5,9	70,9 ± 6,9 **
	Kontroll-Bein	81,0 ± 8,9	78,4 ± 5,4	75,4 ± 4,7	79,7 ± 9,3
12 Tage Erholung	Op-Bein	74,8 ± 4,2	75,0 ± 3,8	72,9 ± 4,3	72,1 ± 5,2
	Kontroll-Bein	76,2 ± 3,9	77,5 ± 5,3	79,3 ± 6,5	75,6 ± 10,1
36 Tage Erholung	Op-Bein	74,5 ± 3,0	74,7 ± 4,9	79,4 ± 7,5	75,7 ± 8,0
	Kontroll-Bein	77,4 ± 9,3	77,8 ± 8,6	80,4 ± 5,4	76,0 ± 9,1

* $p < 0,05$ vs. entsprechende NaCl-Gruppe

** $p < 0,05$ vs. entsprechende Sham-Gruppe

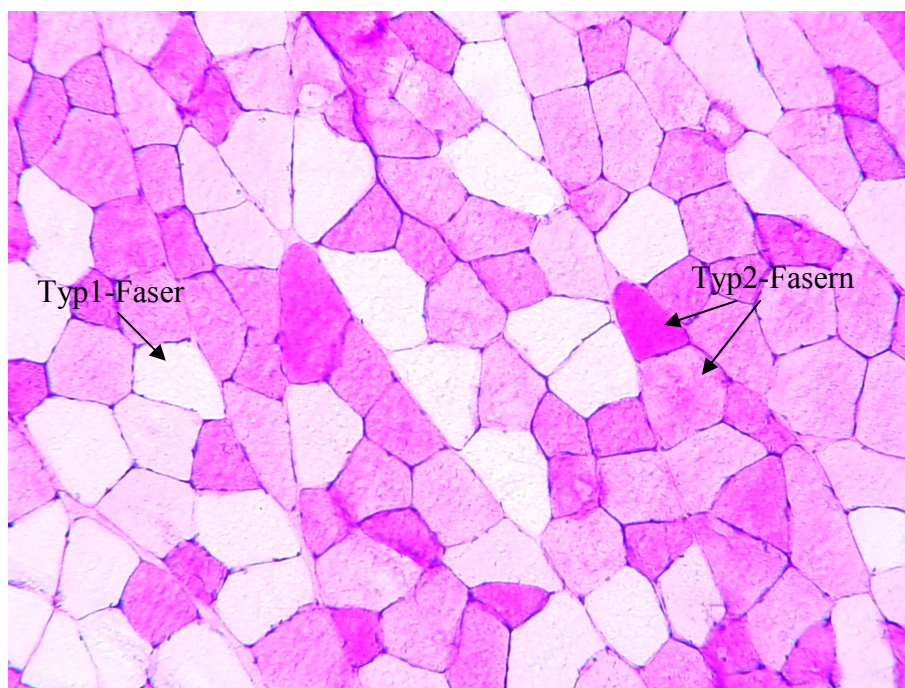


Abbildung 39: Normalverteilung der Typ1- und Typ2-Fasern im Op-Bein bei einem Tier der NaCl/Immob-Gruppe nach 36 Tagen Erholung; PAS-Färbung, 280-fache Vergrößerung

3.3.7.2 Fasertypengruppierung

Eine pathologische Fasertypenverteilung, wie die Fasertypengruppierung, tritt in den vorliegenden Ergebnissen in allen Schädigungsgruppen und zu allen Erholungszeitpunkten, sowohl im Op- als auch im Kontrollbein, mit einer geringen Häufung in der NaCl/Immob-Gruppe auf (Tab. 19). In Abb. 40 ist eine solche Fasertypengruppierung zu sehen, die in diesem Fall eine beträchtliche Fläche im Muskel einnimmt.

Tabelle 19: Anzahl der Muskeln von $n=10$ Tieren pro Schädigungsgruppe und Erholungstag, bei denen eine Fasertypengruppierung gesehen wird, im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins

Gruppen		Fasertypengruppierung			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10
	Kontrollbein	1 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10
4 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	0 von 10	1 von 10	0 von 10
	Kontrollbein	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10
12 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	1 von 10	1 von 10	0 von 10
	Kontrollbein	0 von 10	0 von 10	1 von 10	0 von 10
36 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	0 von 10	1 von 10	1 von 10
	Kontrollbein	0 von 10	1 von 10	0 von 10	0 von 10

Ohne statistische Auswertung

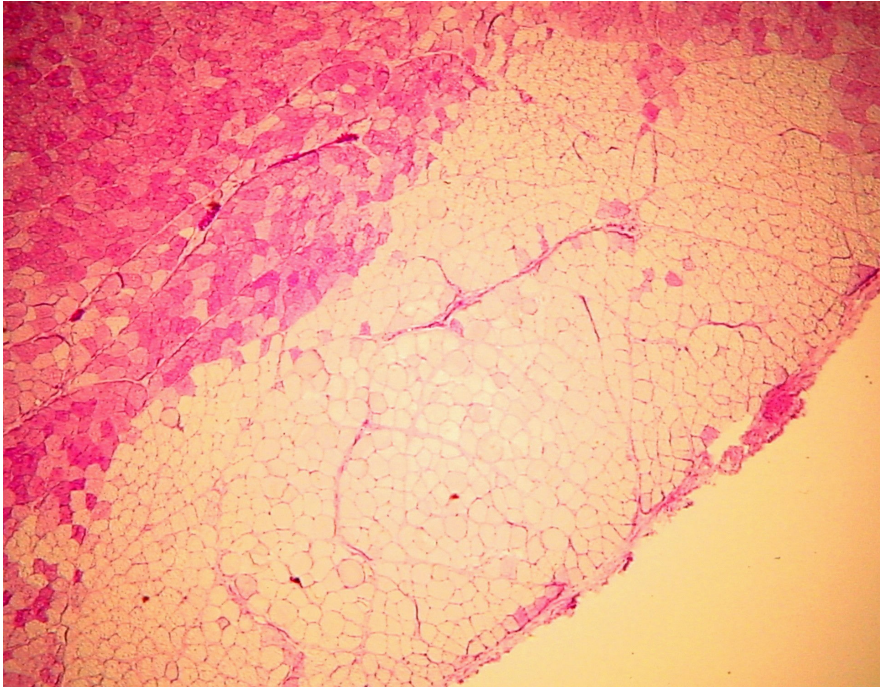


Abbildung 40: Fasertypengruppierung im Op-Bein bei einem Tier der NaCl/Immob-Gruppe nach 12 Tagen Erholung; PAS-Färbung, 35-fache Vergrößerung

3.3.7.3 Fasertypenprädominanz

Auch die Fasertypenprädominanz ist in unterschiedlicher Häufigkeit in allen Schädigungsgruppen zu jeder Zeit zu finden. Insgesamt werden mehr Typ2-Prädominanzen gesehen als Typ1-Prädominanzen (Tab.20 und 21). Als Beispiel ist in Abb. 41 eine Typ1-Prädominanz gezeigt. Die Typ1-Fasern herrschen hier deutlich vor und sind nur von einzelnen Typ2-Fasern durchsetzt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Table 20: Anzahl der Muskeln von $n=10$ Tieren pro Schädigungsgruppe und Erholungstag, bei denen eine Fasertypenprädominanz der Typ1-Fasern gesehen wird, im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins

Gruppen		Fasertypenprädominanz Typ1			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	2 von 10	1 von 10	0 von 10	1 von 10
	Kontroll-Bein	3 von 10	1 von 10	0 von 10	0 von 10
4 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10
	Kontroll-Bein	0 von 10	1 von 10	0 von 10	0 von 10
12 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10
	Kontroll-Bein	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10
36 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10
	Kontroll-Bein	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10

Ohne statistische Auswertung

Table 21: Anzahl der Muskeln von $n=10$ Tieren pro Schädigungsgruppe und Erholungstag, bei denen eine Fasertypenprädominanz der Typ2-Fasern gesehen wird, im *M. gastrocnemius* des Op-Beins und des Kontrollbeins

Gruppen		Fasertypenprädominanz Typ2			
		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
0 Tage Erholung	Op-Bein	1 von 10	1 von 10	0 von 10	1 von 10
	Kontroll-Bein	0 von 10	3 von 10	3 von 10	1 von 10
4 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	2 von 10	0 von 10	0 von 10
	Kontroll-Bein	3 von 10	2 von 10	2 von 10	4 von 10
12 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10
	Kontroll-Bein	1 von 10	3 von 10	3 von 10	1 von 10
36 Tage Erholung	Op-Bein	0 von 10	1 von 10	1 von 10	1 von 10
	Kontroll-Bein	2 von 10	1 von 10	3 von 10	1 von 10

Ohne statistische Auswertung

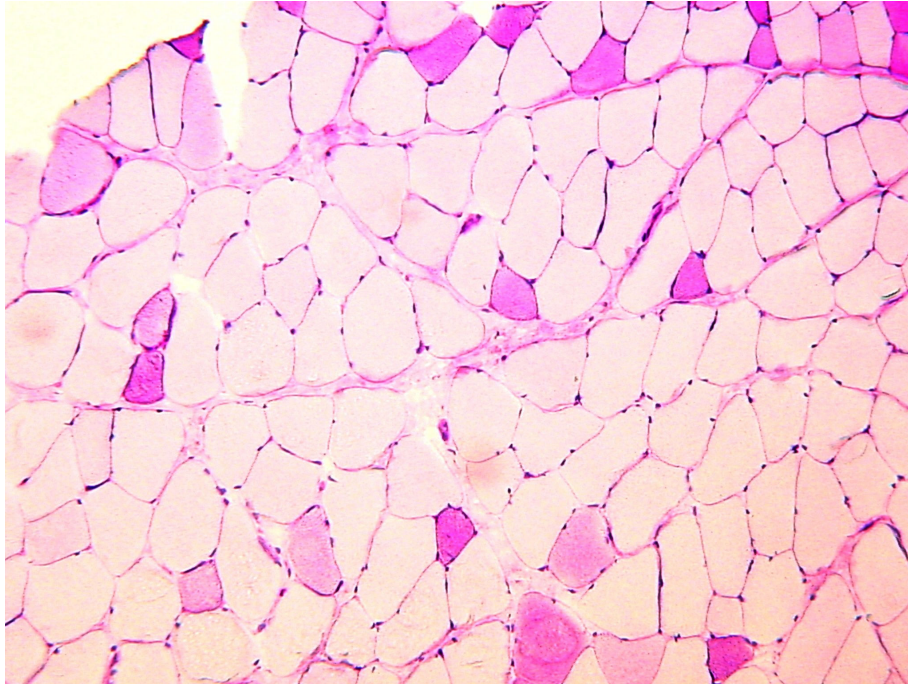


Abbildung 41: Fasertypenprädominanz der Typ1-Fasern im Kontrollbein bei einem Tier der C.p./Sham-Gruppe nach 4 Tagen Erholung; PAS-Färbung, 280-fache Vergrößerung

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Tiermodell

Der Entstehung der Critical Illness Polyneuromyopathy (CIPM) liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde (OP DE COUL et al., 1991). Alle bisher publizierten Studien, die sich mit der Erforschung der Auswirkungen von systemischer Entzündung oder Immobilisation auf das neuromuskuläre System befasst haben, beschränken sich allerdings auf die Untersuchung nur jeweils einzelner Faktoren. In unserem Labor wurde erstmalig ein Tiermodell entwickelt, in dem eine Kombination der beiden Schädigungsfaktoren Immobilisation und chronische systemische Inflammation angewandt und erfolgreich etabliert werden konnte (UNTERBUCHNER, 2006; LENZ, in Vorb.). Dadurch wird es möglich, die Effekte von Inflammation und Immobilisation sowohl einzeln, als auch in Form einer kombinierten Schädigung auf die Muskelmorphologie zu untersuchen.

Um dem Ziel unserer Studie gerecht zu werden, ist es wichtig, zum einen ein Inflammationsmodell zu wählen, bei dem eine ausreichend starke, reproduzierbare, chronische Inflammationsreaktion über 12 Tage in den Tieren hervorgerufen wird, zum anderen ein Immobilisationsmodell, mit dem eine anhaltend stabile Immobilisation realisierbar ist.

Inflammationsmodelle, die z.B. auf der Applikation von Endotoxinen oder Lipopolysacchariden (LIN et al., 1998), von Entzündungsmediatoren (MINNAARD et al., 2005), oder von lebenden Bakterien (BREUILLE et al., 1999) beruhen, sind zwar einfach in der Durchführung, da keine aufwändigen operativen Techniken erlernt werden müssen, sind aber eher als Akutmodelle zu betrachten, da die Tiere meist innerhalb weniger Stunden im septischen Schock versterben. Dieser Verlauf ist so rapide, dass der Organismus gar nicht die Möglichkeit hat, mit dem vollen Spektrum seiner Abwehrmechanismen reagieren zu können (WICHTERMAN et al., 1980). Speziell im Hinblick auf die Endotoxingabe ist man zudem mittlerweile der Ansicht, dass sie die Verhältnisse im septischen Patienten nicht ausreichend

DISKUSSION

widerspiegelt (REMICK und WARD, 2005). Endotoxine sind im Blut von septischen Patienten nur in sehr geringen Konzentrationen zu finden. Man benötigt eine vielfach höhere Dosis an Endotoxinen, um eine Sepsis auszulösen, als in einer lethalen Dosis an gram-negativen Keimen zu isolieren ist. An sich gibt es wenig Anhaltspunkte, dass Endotoxine tatsächlich eine ausschlaggebende Rolle bei der klinischen Sepsis spielen (WICHTERMAN et al., 1980). Andere Modelle, die den Vorgängen bei menschlichen Patienten durch Erzeugung eines septischen Fokus etwas näher kommen, wie das Einbringen von fäkalem Material in die Bauchhöhle (LANG et al., 1983), die „Zäkale Ligatur und Punktion“ (CLP) (WICHTERMAN et al., 1980), oder die „Colon Ascendens Stent Peritonitis“ (CASP) (ZANTL et al., 1998), erfordern meist einen relativ hohen operativen Aufwand. Dies gilt auch für andere Peritonitis-Modelle, wie z.B. das von ALEXANDER et al. (1989), bei dem intraperitoneal kleine osmotische Pumpen implantiert werden, die kontinuierlich oder intermittierend eine bestimmte Menge lebender *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* Bakterien in die Bauchhöhle abgeben (ALEXANDER et al., 1989). Im Gegensatz zu diesem Modell kann bei den Modellen mit Viszeralperforation wie CLP und CASP die abgegebene Bakterienmenge nicht genau bestimmt werden, was eine Standardisierung schwierig macht. Dennoch wird das CLP-Modell, bei dem ein Teil des Zäkums ligiert und mit einer Kanüle (ursprünglich zweifach) punktiert wird, noch immer für viele Studien verwendet, da die Kontamination mit einer gemischten Flora in Anwesenheit von nekrotischem Material verschiedenen klinischen Problemen wie einer perforierten Appendizitis oder Divertikulitis sehr ähnelt (FINK und HEARD, 1990). Zudem wurde dieses Modell durch Verringerung der Kanülengröße und nur einer Punktion mittlerweile so modifiziert, dass im Gegensatz zum ursprünglich eher akuten Verlauf nun auch ein chronischer Inflamationsverlauf von vier bis fünf Tagen zu erreichen ist (TSUKAGOSHI et al., 1999). Ein längerer, über mehr als 10 Tage anhaltender Krankheitsverlauf mit einer hohen Reproduzierbarkeit ist aber bisher mit keinem dieser beschriebenen Modelle gelungen.

Für die Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe diente das einfach anzuwendende und in unserem Labor seit längerem etablierte Modell der mehrmaligen intravenösen *Corynebakterium parvum*(C.p.)-Injektion, bei dem eine systemische Inflamationsreaktion mit granulomatöser Hepatitis hervorgerufen wird (FARQUHAR et al., 1983). Die Krankheitsausprägung nach einmaliger Injektion zeigt einen typischen selbst-limitierenden Verlauf mit einem Maximum zwischen Tag 4 und 6 und einer allmählichen Normalisierung ab Tag 8 (MAYER et al., 2001; FINK et al., 2003). Da sich neuromuskuläre Folgeerscheinungen einer systemischen Inflamationsreaktion (SIRS) im Sinne einer CIP

DISKUSSION

oder CIM erst nach etwa sieben Tagen entwickeln (DE LETTER et al., 2001), wurden die Injektionen drei Mal alle vier Tage wiederholt und so eine chronische Inflammation über 12 Tage aufrecht erhalten. Die Mortalitätsrate unter den C.p.-Tieren von ca. einem Drittel spiegelt die klinische Relevanz dieses Modells wider. Auch die anderen Inflammationsparameter während der Schädigungsphase, wie der Verlust von Körpergewicht, der deutliche Anstieg des Methämoglobingehalts, als stellvertretender Parameter für die Bildung des Inflammationsmarkers NO, sowie die Veränderungen im Blutbild deuten darauf hin, dass mit C.p. eine anhaltend starke Inflammationsreaktion zu erzielen ist. Bereits in der vorangegangenen Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass C.p. ein potentes Infektivum darstellt, das eine gravierende systemische Wirkung auf die oben aufgeführten Parameter ausübt (LENZ, in Vorb.).

Das verwendete Immobilisationsmodell soll die chronische Ruhigstellung der Muskulatur von kritisch kranken Patienten auf Intensivstation nachahmen. Da in der vorliegenden Studie die Erholung dieser durch Inaktivitätsatrophie geschwächten Muskulatur untersucht werden soll, muss ein Modell gewählt werden, bei dem die Immobilisation nach einer bestimmten Zeit wieder aufgehoben werden kann. Dies schließt Immobilisationsmethoden aus, bei denen neuromuskuläre Strukturen irreversibel geschädigt werden, wie z.B. Rückenmarks- oder Nervendurchtrennungen, ebenso die Applikation von neurotoxischen Substanzen wie Tetrodotoxin. Bei diesen Modellen wird die Kommunikation zwischen Muskel und zentralem Nervensystem unterbrochen. Im Krankheitskomplex der CIPM bleibt die Kontinuität der motorischen Einheit jedoch zumeist intakt. Unter den verschiedenen reversiblen Immobilisationsmodellen, wie z.B. die Entlastung der Hintergliedmaßen (hindlimb unloading) (BLOOMFIELD et al., 2002; ITAI et al., 2004) oder die Immobilisation mit Gips oder Kunststoff-Cast (HERBISON et al., 1978; VENOJARVI et al., 2004; KRAWIEC et al., 2005), kommen die Modelle, bei denen eine Immobilisation mit Gelenksfixation vorgenommen wird, der eingeschränkten Beweglichkeit von kritisch kranken Patienten am nächsten. Diese teilen sich noch einmal auf in Immobilisationsmodelle mit externer Gelenksfixation (ZARZHEVSKY et al., 1999) und solche mit interner Fixation, wie z.B. von IBEBUNJO und MARTYN (1999) beschrieben. Hierbei bleibt die Kommunikation zwischen zentralen und peripheren Nervensystem und den Muskelfasern erhalten, wodurch eine partielle isometrische Muskelkontraktion weiterhin möglich ist. Die Vorteile der internen Fixation mit Kirschnerdrähten im Vergleich zur externen Fixation liegen in der weitestgehenden Asepsis, da die Drahtenden unter der Haut versenkt werden und somit nicht in Kontakt mit der Außenwelt stehen, und es besteht keine Verletzungsgefahr durch sperrige

DISKUSSION

Apparaturen mit unter Umständen scharfen Kanten, wie es beim Fixateur externe möglich ist. Das Modell aus der Arbeitsgruppe um IBEBUNJO wird in unserem Labor schon länger erfolgreich an Ratten angewandt und diente auch der eigenen Studie als Grundlage.

Für die Ausprägung der Muskelinaktivitätsatrophie ist auch die Stellung, in der die Hintergliedmaße immobilisiert wird, ausschlaggebend. COUTINHO et al. (2002) fanden heraus, dass sich sowohl die Reduktion der Muskelgewichte als auch die Muskelfaseratrophie viel deutlicher in den Muskeln zeigt, die sich während der Immobilisation in einer verkürzten Position befinden. Die Muskeln in gestreckter Position zeigen kaum Unterschiede zu denen des kontralateralen Kontrollbeines. Grund hierfür ist eine Vermehrung der Sarkomere im Muskel, wie man es auch beim postnatalen Knochenwachstum beobachten kann, bei dem die Muskeln durch die passive Dehnung zum Mitwachsen angeregt werden (COUTINHO et al., 2002). Die Fixation des Knie- und Sprunggelenks in 90°-Beugstellung, wie im eigenen Modell, stellt demzufolge eine optimale Gliedmaßenstellung dar.

4.1.2 Rehabilitation

Die Ergebnisse einiger Studien, wie die von FLETCHER et al. (2003), zeigen, dass die neuromuskulären Schäden durch CIPM noch lange nach der Behandlung der Patienten auf Intensivstation bestehen bleiben. In Anlehnung daran, sollten in der vorliegenden Studie die Veränderungen der Skelettmuskulatur in der Rehabilitationsphase nach Immobilisation und chronischer Inflammation untersucht werden. Es sollte hierbei ermittelt werden, inwiefern die Erholung allein von der vorangegangenen Immobilisation bzw. der Inflammation abhängt und welchen Effekt eine Kombination der beiden Faktoren aufweist. Hierzu wurde nach einer 12-tägigen Schädigungsphase eine unterschiedlich lange Erholungsphase angeschlossen. Die Erholungszeiträume wurden auf 4, 12 und 36 Tage festgelegt. In dieser Zeit konnten sich die Versuchstiere nach Entfernung der Immobilisationsdrähte und Beenden der C.p.-Injektionen rehabilitieren.

In verschiedenen Studien zur Erholung nach Immobilisation konnte eine deutliche Verzögerung der Muskelregeneration festgestellt werden. ZARZHEVSKY et al. (1999) berichteten, dass die Muskeln von über vier Wochen mit externer Fixation immobilisierten Ratten nach weiteren vier Wochen Reimmobilisation ihr Ursprungsgewicht noch nicht wieder erreicht hatten. Auch auf histologischer Ebene lassen sich ähnliche Ergebnisse finden. ITAI et al. (2004) beobachteten, dass der durchschnittliche Muskelfaserdurchmesser der atrophierten

DISKUSSION

Muskulatur selbst nach 35 Tagen Erholung noch immer signifikant reduziert war und dass die histologischen Regenerationsprozesse die Zeit, die zur Wiederherstellung des Muskelgewichtes nötig war, sogar noch überdauerten (ITAI et al., 2004).

In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, dass auch die systemische Inflammation ein hohes Schädigungspotenzial auf die Skelettmuskulatur besitzt. MINNAARD et al. (2005) entdeckten 11 Tage nach einmaliger Injektion von Zymosan, einem Entzündungsmediator, sowohl eine signifikante Reduktion der Muskelgewichte und der Muskelfunktion, als auch deutliche Muskelfaseratrophien, zum Teil mit Fasertyp-spezifischer Atrophie.

Anhand des in der eigenen Arbeit eingesetzten Kombinationsmodells lässt sich gut differenzieren, in wieweit die einzelnen Faktoren Immobilisation und Inflammation oder deren Kombination für den Langzeitverlauf von neuromuskulären Schädigungen verantwortlich sind.

4.1.3 Aufbereitung der Muskelproben und histologische Färbungen

Präparation des Gewebes:

Zur histologischen Untersuchung von Muskelproben muss das Gewebe konserviert werden. Die Konservierung kann durch Fixierung in Formalin und nachfolgend durch die Einbettung in Paraffin vorgenommen werden. Paraffinschnitte sind bei der Muskelbiopsiediagnostik jedoch unüblich. Insbesondere die enzymhistochemischen Untersuchungen und eine große Anzahl histologischer Färbungen sind nur an unfixierten Kryostatschnitten durchführbar. Am besten eignet sich hierfür das Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Allerdings muss darauf geachtet werden, dass der Einfrierprozess so rasch wie möglich abläuft, damit so genannte Gefrierartefakte, wie intrazelluläre Kristallbildungen, vermieden werden. Taucht man das Muskelgewebe direkt in den -160°C kalten flüssigen Stickstoff, so bildet sich um das Gewebe eine Schicht gasförmigen Stickstoffs und wirkt als Isolierschicht. Die Abkühlung wird dadurch verlangsamt. Deshalb hat es sich bewährt, die Muskelproben in durch flüssigen Stickstoff gekühltes Isopentan einzufrieren. Dieses kälteleitende Medium begünstigt ein schnelleres Durchfrieren der Proben. Um die histochemischen Eigenschaften der Muskeln zu erhalten, sollten zwischen der Entnahme der Muskelproben und ihrer Tiefkühlung nicht mehr als 30 Minuten vergehen (SCHRÖDER, 1982).

DISKUSSION

Das Auffrieren der Muskelblöcke auf Korkscheibchen geschieht wie von DUBOWITZ und BROOKE beschrieben und dient der besseren Handhabung der oft winzig kleinen Muskelstückchen. Eine Schnittdicke von 10 µm hat sich als geeignet erwiesen, um alle wichtigen Strukturen im Muskel erkennen zu können (DUBOWITZ und BROOKE, 1973). Zu dicke Schnitte haben den Nachteil, dass sich bestimmte Strukturen überlagern können und dadurch schlecht zu differenzieren sind. Schnitte mit sehr geringer Schnittdicke andererseits sind schwierig herzustellen, da beim Schneiden am Kryotom und beim Aufnehmen auf das Objektträgerglas oft Risse oder Falten entstehen.

Die Lagerung der gefrorenen Muskelproben im Gefrierschrank bei -70 °C und die konsequente Tiefkühlung bei allen folgenden Bearbeitungsschritten gewährleistet, dass die Proben bis zur histologischen Auswertung keine erkennbaren Schäden nehmen.

Hämatoxylin-Eosin(H.E.)-Färbung:

Bei der H.E.-Färbung handelt es sich um eine der ältesten Routinefärbungen in der Histologie. Sie ist gut und einfach durchführbar und erlaubt dem Untersucher sich eine Übersicht über die morphologischen Strukturen des zu untersuchenden Gewebes zu verschaffen. Diesen Vorteil machen sich viele Studien zu nutze (ITAI et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2005). Trotzdem gibt es auch einige neuere Studien, die diese Färbemethode vernachlässigen und nur noch sehr spezielle, meist enzymhistochemische Färbungen einsetzen. Für die Zwecke der vorliegenden Studie erscheint die H.E.-Färbung sehr geeignet, da man auf diese Weise die vielen verschiedenen zu untersuchenden morphologischen Veränderungen im Muskel mit einer einzigen Färbemethode sichtbar machen kann.

Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung):

Die PAS-Färbung als histochemische Färbemethode wird zusätzlich zur H.E.-Färbung gewählt, um neben den morphologischen Veränderungen auch eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Muskelfasertypen treffen zu können. Das Ziel dieser PAS-Auswertung liegt hauptsächlich darin, Abweichungen im Sinne einer veränderten Fasertypenverteilung und pathologische Merkmale wie Fasertypengruppierung und Fasertypenprädominanz zu erkennen. Zu diesem Zweck wird alternativ auch häufig die enzymhistochemische

myofibrilläre ATPase-Reaktion verwendet (HERBISON et al., 1978; IBEBUNJO und MARTYN, 1999). Allerdings ist dies eine relativ teure und im Hinblick auf Artefakte sehr anfällige Färbemethode. Für die vorliegenden Untersuchungen liefert die PAS-Färbung ausreichend gute Ergebnisse.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Inflammationsparameter

4.2.1.1 Mortalität

Die Mortalitätsrate der C.p.-Tiere, die an den Folgen der systemischen Inflammation verstarben, liegt bei 35,2%. Ein ähnlicher Wert konnte auch in der vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe verzeichnet werden (UNTERBUCHNER, 2006; LENZ, in Vorb.). Durch die Applikation von C.p. wird demnach eine gut reproduzierbare, starke Inflammationsreaktion erzielt.

4.2.1.2 Körpergewicht

Eine Sepsis oder systemische Entzündungsreaktion (SIRS) geht mit schweren metabolischen Störungen des Gesamtorganismus einher (FRIED et al., 1986). Oft herrscht eine hyperkatabole Stoffwechselsituation vor, die sich, evtl. in Verbindung mit einer Infektionsbedingten, akuten Anorexie, in einem deutlichen Verlust des Körpergewichts äußert (BREUILLE et al., 1999).

Auch in der vorliegenden Studie nehmen die Tiere der C.p.-Gruppen während der Inflammationsphase stark an Gewicht ab. Da die Tiere aller Gruppen mit durchschnittlich gleichem Ausgangskörpergewicht in den Versuch aufgenommen werden, dürfte dies als Beweis angesehen werden, dass die Infektion bei diesen Tieren manifest geworden ist. Ein geringfügig niedrigeres Körpergewicht der immobilisierten (Immob) Tiere sowohl der NaCl- als auch der C.p.-Gruppe im Vergleich zu den sham-immobilisierten (Sham) Tieren, lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass durch die Gelenksfixation ein zusätzlicher Stressfaktor

DISKUSSION

erzeugt wird, der zu einem gesteigerten Energieumsatz führt, wodurch verstärkt körpereigene Reserven aufgebraucht werden (JASPERS et al., 1988). Weitere Einflüsse, die durch den Stress der Narkosen und der chirurgischen Eingriffe auf die Tiere eingewirkt haben könnten, werden durch die Sham-Operationen ausgeglichen, da somit alle Tiere die gleiche Behandlung erfahren haben.

In der Erholungsphase lassen sich bis Tag 4 signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Tieren der C.p.-Gruppen und der entsprechenden NaCl-Gruppen, als auch innerhalb der C.p.-Gruppe zwischen Immob- und Sham-Tieren feststellen. Die Applikation von C.p. an sich bewirkt also schon eine Verzögerung der Erholung des Körpergewichts, die Kombination von C.p. und Immobilisation jedoch lässt die Tiere noch langsamer an Gewicht zulegen, als die Kombination von C.p. und Sham-Immobilisation oder die Immobilisation alleine. Auch am zwölften Erholungstag, an dem zwar keine Signifikanzen mehr vorhanden sind, erkennt man, dass die C.p./Immob-Gruppe noch nicht ganz die Werte der drei anderen Schädigungsgruppen erreicht hat. Erst am 36. Erholungstag sind die Körpergewichte aller Gruppen wieder einheitlich.

4.2.1.3 Lebergewicht

Die absoluten Lebergewichte der Tiere aus den C.p.-Gruppen sind im Vergleich zu denen der entsprechenden NaCl-Gruppen selbst nach 36 Tagen Erholung noch immer signifikant erhöht. Die deutliche Lebervergrößerung ist ein Zeichen der systemischen Inflammation durch C.p., die mit einer granulomatösen Hepatitis einhergeht (FARQUHAR et al., 1983).

Eine geringe Zunahme der Lebergewichte innerhalb der NaCl-Gruppen im Verlauf der Erholung ist vermutlich mit dem natürlichen Wachstum der Tiere zu erklären, das auch eine gewisse Vergrößerung der inneren Organe zur Folge hat.

4.2.1.4 Methämoglobin und Blutbild

Methämoglobin (MetHb) entsteht aus Hämoglobin durch die Oxidation des zweiwertigen Eisens der Hämgruppe zu dreiwertigem. Diese Reaktion wird begünstigt durch das vermehrte Auftreten von Stickstoffmonoxid (NO) bzw. dessen stabile Endprodukte Nitrat und Nitrit (NO₃/NO₂) im Blut, wie es häufig im Verlauf einer systemischen Entzündungsreaktion der Fall ist. NO wird in verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Neurone und

DISKUSSION

Herzmuskelzellen oder über die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase in Makrophagen und der Gefäßwandmuskulatur gebildet. GELLER et al. (1993) stellten eine erhöhte Aktivität der induzierbaren NO-Synthetase nach C.p.-Verabreichung auch in Leberzellen fest. Methämoglobin ist im Gegensatz zu Hämoglobin nicht fähig, Sauerstoff im Blut zu binden. Ein erhöhter MetHb-Spiegel äußert sich unter anderem in einer mehr oder weniger ausgeprägten zyanotischen Verfärbung der Schleimhäute. Die Messung des MetHb-Wertes in der vorliegenden Studie stellt eine gute Verlaufskontrolle der systemischen Inflammation dar. Während die Mittelwerte der NaCl-Tiere konstant unter 1 Prozentanteil am Gesamthämoglobin bleiben, lässt sich bei den C.p.-Tieren in der Schädigungsphase ein deutlicher Anstieg des MetHb-Gehaltes verzeichnen, der auch in der Erholungsphase noch bis Tag 4 signifikant gegenüber den entsprechenden Werten der NaCl-Gruppe bleibt. Am zwölften Tag der Erholung sind keine signifikanten Unterschiede mehr zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass die Produktion der Entzündungsmediatoren wie NO langsam zurückgeht.

Im Blutbild ist in den C.p.-Gruppen eine deutliche Reduktion der Erythrozyten- und der Thrombozytenzahl zu erkennen, die bei den Erythrozyten noch bis zum 12. Erholungstag signifikant bleibt.

Diese Ergebnisse sind gut anhand des Krankheitsverlaufs der C.p.-Infektion zu erklären. In mehreren Studien wird über den selbst-limitierenden Charakter der Inflammationsreaktion nach C.p.-Verabreichung berichtet. Der Höhepunkt der Krankheitsausprägung nach einmaliger Injektion liegt zwischen Tag 4 und 6 und eine Normalisierung der Befunde tritt ca. ab Tag 8 ein (MAYER et al., 2001; FINK et al., 2003). Ein ähnlicher Verlauf lässt sich in der vorliegenden Studie in der Erholungsphase nach der 3. Injektion erkennen.

4.2.2 Physiologische Messparameter

Die hämodynamischen Parameter wurden während der neuromuskulären Funktionstests am Messtag bei jeder Ratte und zu jedem Zeitpunkt stabil gehalten. Eine Verfälschung der Messergebnisse durch perioperative Einflüsse ist somit eher unwahrscheinlich, da die Tiere aller Gruppen denselben Bedingungen ausgesetzt waren.

4.2.3 Muskelgewichte

Die absoluten Muskelgewichte des M. gastrocnemius im Op-Bein der C.p./Sham-Gruppe erweisen sich im Vergleich zur NaCl/Sham-Gruppe bis zum 4. Erholungstag als signifikant reduziert. Der Effekt der alleinigen Schädigung durch C.p. im Hinblick auf die Muskelatrophie endet also nach diesem Zeitpunkt. Im Gegensatz hierzu lässt sich ein signifikanter Effekt der isolierten Immobilisation auf die Muskelgewichte anhand der Ergebnisse der NaCl/Immob-Tiere noch bis zum Ende der Erholung am Tag 36 nachweisen. Interessanterweise erzeugt die Kombination von C.p. und Immobilisation im Vergleich zur reinen Immobilisation oder Inflammation einen zusätzlichen Gewichtsverlust des Muskels, der im Op-Bein selbst nach 36 Tagen noch deutlich zu erkennen ist. Aufgrund dieser Ergebnisse ist der Schluss zu ziehen, dass die Immobilisation als Schädigungsfaktor einen Hauptgrund für die verzögerte Erholung der erzeugten Muskelatrophie darstellt und die Schwere der Atrophie durch die Kombination mit einer systemischen Inflammation noch verstärkt wird. In Prozentzahlen ausgedrückt, bewirkt die chronische Inflammation durch C.p. alleine im Vergleich zur NaCl/Sham-Gruppe eine Atrophie des M. gastrocnemius im Op-Bein am Tag 0 um 28,2%, die alleinige Immobilisation um 31,2% und die Kombination der beiden Faktoren um 40,1%. Nach 36 Tagen Erholung beträgt der Gewichtsverlust des Muskels nach reiner Immobilisation noch 8,2%, nach Immobilisation und C.p. sogar noch 15,1% im Vergleich zu den Werten der NaCl/Sham-Tiere.

Die Ergebnisse von Immobilisations- und Inflammationseffekt für sich betrachtet, lassen sich in der Literatur bestätigen. BREUILLE et al. (1999) beobachteten sechs Tage nach Inflammation durch Applikation lebender E. coli-Bakterien eine signifikante Muskelatrophie sowohl im M. gastrocnemius als auch im M. soleus. COUTINHO et al. (2002) fanden beim M. soleus nach 3-wöchiger Immobilisation einen Gewichtsverlust von $44 \pm 6\%$ gegenüber dem Kontrollbein. ZARZHEVSKY et al. (1999) verzeichneten nach einer 4-wöchigen Immobilisation über externe Fixierung beim M. gastrocnemius im Mittel sogar ein Gewichtsverlust von 58,8%. Wie auch in der vorliegenden Studie erreichten die Muskelgewichte nach einer Erholungszeit von in dem Fall vier Wochen nicht die Werte der Muskeln des kontralateralen, nicht-immobilisierten Beins. Der Gewichtsverlust betrug hier am Ende der Erholung noch immer 28,9% (ZARZHEVSKY et al., 1999). Leichte Abweichungen lassen sich in der Aussage von WARREN et al. (2004) finden. Hier verursachte eine 4-wöchige Entlastung der Hintergliedmaßen (hindlimb unloading) beim M. gastrocnemius einen Gewichtsverlust von 24%, beim M. soleus von 53%. Allerdings ließ sich

DISKUSSION

bei den Muskelgewichten des M. gastrocnemius bereits nach 14 Tagen Erholung kein signifikanter Unterschied zu denen der Kontrollgruppe mehr feststellen. Nur der M. soleus hatte sich auch nach 28 Tagen Erholungszeit noch nicht wieder vollständig regeneriert (WARREN et al., 2004). Man muss hier jedoch dahingehend differenzieren, dass eine Entlastung der Hintergliedmaßen keine stabile Immobilisation erzeugt, da die Tiere ihre Beine zwar nicht belasten, sie aber trotzdem in der Luft noch bewegen können. Daher ist es nicht verwunderlich, dass in diesem Fall die Inaktivitätsatrophie weniger stark ausgeprägt auftritt und auch schneller wieder zurückgeht. Demgegenüber lassen sich die Ergebnisse der Immobilisation durch externe Fixierung eher mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichen. Zudem entspricht nur eine Immobilisation mit Gelenksfixation den Verhältnissen der eingeschränkten Bewegungsfähigkeit kritisch kranker Patienten (IBEBUNJO und MARTYN, 1999).

Die ermittelten Muskelgewichte in der vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe, in der die Effekte der Immobilisation und Inflammation ohne Erholung betrachtet wurden, gleichen unseren Ergebnissen am Tag 0 (UNTERBUCHNER, 2006).

Die Ursache für die ausgeprägte Muskelatrophie bei Immobilisation und auch Inflammation scheint vor allen Dingen in einem drastischen Abbau kontraktiler, muskulärer Proteine begründet zu sein. BREUILLE et al. (1999) beschrieben einen Verlust von Muskelproteinen im M. gastrocnemius um 40%. KRAWIEC et al. (2005) machen hierfür hauptsächlich eine Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems verantwortlich (KRAWIEC et al., 2005). Neben diesen aktiven Proteolysevorgängen im Muskel ist es unter Umständen auch vorstellbar, dass die Beteiligung einer CIP über eine Denervationsatrophie ebenfalls zur Verringerung der Muskelmasse beiträgt (HUND, 2001).

4.2.4 Muskuläre Kontraktionskraft

Die genauen Ergebnisse und die Diskussion der neuromuskulären Funktionstests am Ende der 12-tägigen Schädigungsphase bzw. der jeweiligen Erholungsphase sind den Arbeiten von UNTERBUCHNER (2006) bzw. BUYAR (in Vorb.) zu entnehmen. Dennoch soll auch in der vorliegenden Arbeit ein kleiner Überblick dieser Ergebnisse gegeben werden, um den Zusammenhang zwischen klinischen und histologischen Befunden herzustellen.

DISKUSSION

In der vorangegangenen Studie der eigenen Arbeitsgruppe, die sich mit den Veränderungen während der Schädigungsphase befasste, ergaben die neuromuskulären Funktionstests der immobilisierten Tiere eine signifikante Reduktion der maximalen Einzelkontraktionskraft und der maximalen tetanischen Kraft im Op-Bein gegenüber dem Kontrollbein und auch im Vergleich zu den Tieren der sham-immobilisierten Gruppen. Auch die systemische Inflammation alleine hatte eine deutliche Minderung der muskulären Kontraktionskraft zur Folge. Die Kombination der beiden Faktoren führte zu einer zusätzlichen Aggravierung der Muskelschwäche. Anlehnend an die Ergebnisse von IBEBUNJO und MARTYN (1999) und anhand eigener Untersuchungen wurde vermutet, dass die Muskelschwäche primär auf einer Muskelatrophie beruht. Zusätzlich scheint auch eine Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren eine wichtige Rolle zu spielen (UNTERBUCHNER, 2006).

Die Ergebnisse in der vorliegenden Studie bestätigen diejenigen der vorangegangenen. Auch hier führt am Tag 0 sowohl die Immobilisation, als auch die systemische Inflammation zu einer Minderung der muskulären Kontraktionskraft. Ebenso kann durch die Kombination beider Faktoren ein additiver Effekt beobachtet werden. In der Erholungsphase zeigt sich jedoch, dass die Immobilisation deutlich stärker für die verzögerte Rehabilitation verantwortlich ist, als die Inflammation. Während die Werte in der C.p./Sham-Gruppe sich bereits nach 4 Tagen Erholung denen der NaCl/Sham-Gruppe angleichen, zeigen die Tiere der Immob-Gruppen noch bis zum 36. Erholungstag schwere muskuläre Defizite (BUYAR, in Vorb.).

4.2.5 H.E.-Auswertung

4.2.5.1 Kalibervariationen und Ödem

Kalibervariationen sind bei den eigenen Untersuchungen im M. gastrocnemius in allen Schädigungsgruppen und zu allen Erholungszeitpunkten zu finden. Die Ergebnisse sind statistisch nicht auswertbar, da sie anhand eines einfachen Ja/Nein-Grading-Systems ermittelt wurden. Dennoch ist tendenziell zu erkennen, dass die Kalibervariationen vermehrt an den Tagen 4 und 12 und vor allem in den Immobilisationsgruppen auftreten. Das relativ häufige Vorkommen von Kalibervariationen in diesem Muskel, sowohl im Op- als auch im Kontrollbein, lässt sich vermutlich dadurch begründen, dass im M. gastrocnemius physiologische Kaliberschwankungen nicht selten sind und diese von pathologischen

DISKUSSION

Zuständen oft schwer zu unterscheiden sind. Auch in den Untersuchungen der vorangegangenen Studie wurden Kaliberschwankungen im M. gastrocnemius unabhängig von einer Immobilisation oder Inflammation in Op- und Kontrollbein gesehen (LENZ, in Vorb.). Kalibervariationen im Allgemeinen weisen laut DUBOWITZ und BROOKE (1973) häufig auf myopathische Erkrankungen hin. Auch HUND (1999) berichtete von pathologischen Kalibervariationen bei seiner Beschreibung der CIM.

Lokale Gewebsödeme entstehen vermehrt im Verlauf einer systemischen Entzündungsreaktion. Hierfür verantwortlich sind ausgedehnte Endothelschäden, durch die die Kapillarpermeabilität erheblich verstärkt wird. Zudem können Ödeme auch in der Erholungsphase entstehen als Ausdruck vermehrter Belastung der vorher immobilisierten Gliedmaße. In verschiedenen Studien entdeckte man, dass ein Hauptanteil der Zunahme im Muskelgewicht kurz nach Remobilisation eher der Entstehung von Ödemen zuzuschreiben sei, als einer wirklichen Erholung des Muskels (ITAI et al., 2004). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die genannten Befunde. Zwar ist auch für dieses Merkmal eine statistische Auswertung nicht möglich, aber auch hier zeichnen sich Tendenzen ab. Die Ödeme treten hauptsächlich innerhalb der C.p.-Gruppen auf mit leichter Häufung bei den C.p./Immob-Tieren. Diese Veränderungen sind sowohl im Op- als auch im Kontrollbein zu finden und haben ihren Höhepunkt am Tag 4, also kurz nach Remobilisation der Gliedmaße.

4.2.5.2 Myophagie, Anguläre Fasern und Zentrale Kerne

Als Myophagie bezeichnet man den Abbau von nekrotischen Muskelfasern durch Makrophagen. Eine große Anzahl an Myophagien ist daher mit dem vermehrten Auftreten von Muskelfasernekrosen in Verbindung zu bringen. Nekrosen von Muskelfasern wiederum wurden häufig im Zusammenhang mit einer CIM beobachtet (LATRONICO et al., 1996). Auch ZOCHODNE et al. fanden verstärkt Muskelfasernekrosen in Muskelbiopsien kritisch kranker Patienten (ZOCHODNE et al., 1994). LENZ (in Vorb.) beschreibt ein Auftreten von Myophagien nach der 12-tägigen Schädigungszeit vor allem in der C.p./Immob-Gruppe in Op- und Kontrollbein, sowie im Op-Bein der NaCl/Immob-Gruppe. In den eigenen Ergebnissen lässt sich ein klarer Verlauf erkennen, bei dem die Anzahl der Myophagien sowohl im Op-Bein als auch im Kontrollbein am 4. Tag der Erholung stark ansteigt und dann langsam wieder abfällt. Betroffen sind hiervon im Op-Bein vor allem die Tiere der beiden C.p.-Gruppen, insbesondere der C.p./Immob-Gruppe. Aber auch bei den NaCl/Immob-Tieren

DISKUSSION

ist am Tag vier ein Anstieg zu verzeichnen mit signifikant erhöhten Werten im Vergleich zu den NaCl/Sham-Tieren. Die Effekte der alleinigen Immobilisation verschwinden zum Tag 12 jedoch relativ schnell wieder, während diejenigen der C.p.-Injektion weiter bestehen bleiben. Am Kontrollbein ist deutlich der systemische Effekt der Inflammation zu erkennen. Die Werte der NaCl-Gruppen bleiben hier durchgehend niedrig und sind mit physiologisch im Muskel vorkommenden Ab- und Umbauvorgängen zu erklären.

Das Auftreten von angulären Fasern ist relativ unspezifisch. Häufig entstehen sie durch Denervation (SCHRÖDER, 1982). Demzufolge ist eine verstärkte Anwesenheit dieser Fasern auch bei einer axonalen Nervendegeneration wie der CIP zu erwarten. HUND (1999) beschreibt anguläre Fasern als eines der Kennzeichen der CIM. Die vorliegenden Ergebnisse im Op-Bein zeigen auch hier einen Anstieg am Tag 4 und dann einen langsamen Rückgang. Allerdings ist im Gegensatz zur Myophagie bei den angulären Fasern eine stärkere Kopplung an die Immobilisation zu verzeichnen. Die Werte der beiden Immob-Gruppen sind dabei signifikant erhöht gegenüber den entsprechenden Sham-Gruppen. Im Kontrollbein sind die Werte aller Schädigungsgruppen konstant niedrig, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der systemische Effekt der Inflammation hier keine Rolle spielt.

Große Anhäufungen von zentralen Kernen findet man hauptsächlich bei Myopathien, unter Umständen aber auch bei chronischen peripheren Neuropathien wie der CIP (DUBOWITZ und BROOKE, 1973). Zentrale Kerne gehören ebenso wie Myophagien und anguläre Fasern zu den Veränderungen, die häufig bei einer CIM beobachtet werden (HUND, 1999). Laut ITAI et al. stellen Fasern mit zentral gelegenem Kern solche Fasern dar, die sich im Begriff der Reparatur oder Regeneration befinden. Nach Muskelfasernekrose folgt die Muskelfaserregeneration über Satellitenzellen, die sich als Myoblasten durch Fusion zu reifen Muskelfasern entwickeln. Fasern mit zentralen Zellkernen verkörpern somit unreife Muskelfasern im Regenerationsprozess (ITAI et al., 2004). In den eigenen Ergebnissen ist ein Anstieg der Anzahl an Fasern mit zentralem Kern im Op-Bein vor allem bei den C.p./Immob-Tieren mit einem Maximum um Tag zwölf zu erkennen. Im Kontrollbein ist dieser Verlauf ähnlich, aber weniger prominent und betrifft hier nur die Tiere der beiden C.p.-Gruppen, was auf den systemischen Effekt des C.p. hinweist.

Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse für Myopathie, anguläre Fasern und zentrale Kerne liegt die Vermutung nahe, dass histologische Veränderungen im geschädigten Muskel in Form von Aufräum- und Regenerationsprozessen erst nach Beendigung der Schädigungsphase mit einer Verzögerung von einigen Tagen eintreten. Es gibt Anhaltspunkte in der

DISKUSSION

Literatur, die diesen Verlauf bestätigen. ITAI et al. (2004), die nach 5-wöchiger Entlastung der Hintergliedmaßen weder am Tag 0 noch nach 7 Tagen Erholung auffällige Fasernekrosen oder Myophagien entdecken konnten, dafür aber bis zum 35. Erholungstag noch Fasern mit zentralen Zellkernen, schlossen daraus und aus den Ergebnissen anderer Studien, dass die Nekrose- und Abbauprozesse in den frühen Stadien der Remobilisation stattfinden, so dass nach einer Woche Erholung die Regenerationsprozesse gegenüber den Phagozytosevorgängen überwiegen.

4.2.5.3 Atrophische Fasern

Es gibt viele Gründe für eine Faseratrophie wie z.B. Läsionen des Zentralnervensystems, Denervation oder verschiedene Myopathien, aber auch Inaktivität, Hungern, Senilität oder Kachexie (SCHRÖDER, 1982). Bei Myopathien treten die atrophischen Fasern eher einzeln verstreut auf, bei Denervationen meist in kleineren oder größeren Gruppen (DUBOWITZ und BROOKE, 1973). In den vorliegenden Untersuchungen sind sowohl einzelne als auch gruppenartig zusammen liegende atrophisierte Fasern zu beobachten. Zudem vermittelten einige Muskeln den Eindruck als beständen sie komplett aus atrophischen Fasern. Diese Beobachtung machten auch DUBOWITZ und BROOKE (1973). Die Atrophie betrifft in diesem Fall alle in einem Muskel vorhandenen Muskelfasern. Da in solchen Präparaten alle Fasern gleichermaßen atrophisiert sind, ist es dem Untersucher nicht möglich die Atrophie anhand des Größenvergleichs mit nicht atrophisierten Fasern zu erkennen (DUBOWITZ und BROOKE, 1973). Dadurch ist es oft schwierig, eine Unterscheidung zwischen einem gerade noch physiologischen, nicht atrophisierten Muskel und einem komplett atrophisierten Muskel, bei dem jede einzelne Faser als atrophisiert gezählt werden müsste, zu treffen. Nur eindeutig und in starkem Maße verkleinerte Fasern können vom Untersucher als solche erkannt werden. Im Laufe der eigenen Untersuchungen zeigte sich, dass eine komplette Atrophie des Muskels erst ab einem durchschnittlichen Faserdurchmesser von $< 30 \mu\text{m}$ für den Untersucher lichtmikroskopisch eindeutig sichtbar war. Muskelfasern gelten aber schon ab einem Faserdurchmesser von $< 40 \mu\text{m}$ als atrophisiert (SCHRÖDER, 1982). Hier stößt der Untersucher auf die Grenzen seiner visuellen Unterscheidungsfähigkeit. In der vorliegenden Studie sollte die absolute Anzahl der atrophischen Fasern in 5 Gesichtsfeldern ermittelt werden. Bei komplett atrophisierten Muskeln wurden somit alle Fasern in diesen Gesichtsfeldern gezählt, während bei den anderen Muskeln nur einzelne Fasern in die Auswertung eingingen. Dadurch ergeben sich innerhalb der Ergebnisse große Diskrepanzen,

DISKUSSION

wie an den extrem hohen Standardabweichungen zu sehen ist. Dennoch sind die Ergebnisse für die eigene Zielsetzung gut zu verwerten. Anhand der Säulendiagramme mit logarithmischer Skalierung erkennt man einen klaren Zusammenhang zwischen der Anzahl der atrophierten Fasern und den Schädigungsgruppen. Im Op-Bein betrifft die Veränderung vor allem die beiden Immob-Gruppen, deren Werte noch bis Tag 36 gegenüber den entsprechenden Sham-Gruppen erhöht sind. Am Tag 0 ist ein Anstieg der atrophischen Fasern auch innerhalb der C.p./Sham-Gruppe zu verzeichnen, der jedoch schon am vierten Erholungstag nicht mehr sichtbar ist. Im Kontrollbein sind keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen, außer einem „Ausreißer“ in der C.p./Sham-Gruppe am Tag 0, bei dem es sich um ein einzelnes Tier handelt. Der Effekt der Immobilisation scheint hier also dem der Inflammation zu überwiegen.

Faseratrophien werden in der Literatur häufig erwähnt, insbesondere im Zusammenhang mit einer Immobilisation. ZARZHEVSKY et al.(1999) berichteten von dem gehäuften Auftreten von geschrumpften Muskelfasern nach vier Wochen externer Fixation. ITAI et al. (2004) fanden atrophische Fasern in der Erholungsphase noch bis zu fünf Wochen nach Remobilisation. Neben einer echten Atrophie, also der Abnahme der Durchmesser von reifen Muskelfasern durch Nervenläsionen oder Myopathien, können atrophische Fasern in den späteren Stadien der Erholung unter Umständen auch als Zeichen einer Regeneration gedeutet werden, da regenerierte Muskelfasern ebenfalls atrophisch erscheinen können, solange noch keine Reinnervation stattgefunden hat (SCHRÖDER, 1982).

Eine Faseratrophie kann auf einen bestimmten Fasertyp begrenzt sein. Bei Inaktivitätsatrophie durch Immobilisation findet man häufig eine selektive Typ2-Faseratrophie (HERBISON et al., 1978). IBEBUNJO und MARTYN (1999) berichteten von einer zunehmenden Atrophie der Typ2A-Fasern während einer 28-tägigen Immobilisation durch interne Fixation bei der Ratte. Auch beim Menschen wurden ähnliche Ergebnisse gefunden (VANDENBORNE et al., 1998). Aber auch bei alleiniger Inflammation scheint eine bevorzugte Typ2-Atrophie aufzutreten (MINNAARD et al., 2005). SHOWALTER und ENGEL beschrieben dieselben Veränderungen bei Patienten mit akuter quadriplegischer Myopathie (SHOWALTER und ENGEL, 1997). In der vorliegenden Studie wurde ein Zusammenhang zwischen Atrophie und Muskelfasertyp nicht untersucht.

4.2.5.4 Faserdurchmesser

Durch das Ausmessen der Muskelfaserdurchmesser am Computermonitor lassen sich unter dem Lichtmikroskop vom Untersucher nur schwer oder nicht zu erkennende Veränderungen des durchschnittlichen Faserdurchmessers registrieren. Die Durchschnittswerte werden jeweils anhand von zehn zufällig ausgewählten Fasern ermittelt. Unsere Ergebnisse am Tag 0 entsprechen denen der vorangegangenen Studie (LENZ, in Vorb.) und zeigen eine starke Reduktion der Muskelfaserdurchmesser im Op-Bein bei beiden Immob-Gruppen und auch der C.p./Sham-Gruppe im Vergleich zur NaCl/Sham-Gruppe. Ab Tag 4 gleichen sich die Werte der C.p./Sham-Gruppe denen der NaCl/Sham-Gruppe an, die Faserdurchmesser der beiden Immob-Gruppen hingegen bleiben noch über den 36. Tag hinaus deutlich verkleinert. Im Kontrollbein ist eine Reduktion der Faserdurchmesser an den Tagen 0 und 4 vor allem in den C.p.-Gruppen zu erkennen. Spätestens ab Tag 12 liegen jedoch alle Gruppen auf gleicher Höhe. Die Faserdurchmesser aller Gruppen nehmen im Laufe der Zeit geringfügig aber stetig zu, was auf eine allgemeine Weiterentwicklung der sich noch im Wachstum befindlichen Ratten zurückgeführt werden kann. Der Effekt der Immobilisation scheint auch hier auf lange Sicht dem der Inflammation zu überwiegen.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die von ZARZHEVSKY et al. (1999), die nach vier Wochen Immobilisation eine Reduktion der durchschnittlichen Querschnittsfläche der Muskelfasern im *M. gastrocnemius* um 55,7% im Vergleich zum Kontrollbein beobachteten. Auch nach weiteren vier Wochen Erholung hatten sich die Fasern nicht regeneriert und waren noch immer 34,1% kleiner als im kontralateralen Bein (ZARZHEVSKY et al., 1999). Nach ITAI et al. (2004), die im *M. soleus* am 35. Tag der Erholung noch eine Verringerung der Faserquerschnittsfläche von 69% im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe feststellten, ist die Atrophie des Gesamtmuskels hauptsächlich einer Reduktion der Faserdurchmesser im Muskel zuzuschreiben. Ursächlich für die Abnahme des Faserdurchmessers scheint, wie schon für die Muskelgewichte, ein Abbau von Muskelproteinen zu sein. Der katabole Effekt einer Immobilisation (oder Inflammation) verhindert die Proteinsynthese in den Muskelfasern. ZARZHEVSKY et al. (1999) vermuten, dass dieser Zustand, wenn nicht rechtzeitig behoben, nach einer gewissen Zeit eventuell nicht mehr rückgängig zu machen ist.

4.2.5.5 Breite des endomysialen Bindegewebes

Die Zunahme an interstitiellem Bindegewebe im Muskel deutet auf eine beträchtliche Schädigung des Muskels hin und ist bei einer Vielzahl von Muskelerkrankungen als Nebenfund nachweisbar. ZARZHEVSKY et al. (1999) berichten nach Immobilisation von einer substanziellen Vermehrung des Bindegewebes zwischen den Muskelfasern, begleitet von einer großen Anzahl an Adipozyten. ITAI et al. (2004) machten dieselben Beobachtungen nach Entlastung der Hintergliedmaßen. In Muskelbiopsien von kritisch kranken Patienten fand man eine Bindegewebsvermehrung häufig in Kombination mit anderen histologischen Merkmalen einer CIM (HUND, 2001). Eine durch 14-tägige Immobilisation mit einem Kunststoff-Cast entstandene Muskelatrophie des M. soleus werteten ISHIKAWA et al. (2005) sowohl unter morphologischen als auch unter biochemischen Gesichtspunkten aus. In licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen stellte sich das Bindegewebe im geschädigten Muskel nicht mehr geordnet und glatt an den Muskelfasern anliegend dar, sondern zeigte eine aufgewühlte Struktur und riss dabei die einzelnen Fasern weit auseinander. Sie machten dabei die Entdeckung, dass der Gehalt an Hyaluronsäure im Bindegewebe in dem gleichen Maße abnahm, wie er im Serum der Tiere anstieg, und postulierten daher, dass die Hyaluronsäure des Muskels im Blut in Zukunft vielleicht sogar als Marker für Muskeldystrophien dienen könnte (ISHIKAWA et al., 2005).

In den eigenen Ergebnissen erkennt man eine starke Zunahme des endomysialen Bindegewebes im Op-Bein vor allem in den ersten vier Tagen der Erholung. Hierbei ist von C.p./Sham über NaCl/Immob zu C.p./Immob eine Steigerung der Werte zu verzeichnen. Gegen Ende der Erholung hat sich das Bindegewebe in allen Gruppen weitestgehend auf physiologische Werte zurückgebildet, evtl. mit geringfügig höheren Werten in den C.p.-Gruppen. Im Kontrollbein bleibt das Bindegewebe in den C.p.-Gruppen bis Tag 36 noch deutlich verbreitert, während innerhalb der NaCl-Gruppen kaum Unterschiede zu sehen sind. Die Untersuchungen von LENZ (in Vorb.) ergaben eine signifikante Verbreiterung des Bindegewebes vor allem im Op-Bein der immobilisierten Tiere. Sowohl Immobilisation als auch Inflammation scheinen einen starken Effekt auf die Bindegewebsproliferation zu haben, wobei eine Kombination der beiden Schädigungsfaktoren im Op-Bein zunächst die stärkste Reaktion hervorruft. Die histologischen Präparate bestehen hierbei im Extremfall fast nur noch aus Bindegewebe, der Faserverband ist nahezu vollständig zerstört. Auf lange Sicht allerdings scheint die Bindegewebsvermehrung nachhaltiger durch die C.p.-Verabreichung beeinflusst zu werden.

4.2.5.6 Entzündungszellen

Zelluläre Reaktionen können sich in Form von perivaskulären, perimysialen oder endomysialen Infiltrationen zeigen. Die vorliegende Studie beschränkt sich auf die Untersuchung der endomysialen Entzündungszellen. Am Tag 0 der Erholungsphase ist sowohl im Op- als auch im Kontrollbein ein starker Anstieg der Entzündungszellen innerhalb der C.p.-Gruppen zu erkennen, deren Werte gegenüber denen der entsprechenden NaCl-Gruppen signifikant sind. Auch die Anzahl in der NaCl/Immob-Gruppe im Op-Bein erweist sich im Vergleich zur entsprechenden Sham-Gruppe als signifikant erhöht. Im Verlauf der Erholung wird allerdings sichtbar, dass die zelluläre Infiltration stärker mit der systemischen Inflammation zusammenhängt als mit der Immobilisation. Die Werte der C.p.-Gruppen bleiben vor allem im Kontrollbein noch bis zum 36. Tag erhöht. Auch hier gleichen die Ergebnisse am Tag 0 denen der Arbeit von LENZ (in Vorb.).

Eine Infiltration durch Entzündungszellen ist relativ unspezifisch und sollte nicht als Zeichen einer echten Muskelentzündung (Myositis) gewertet werden (DUBOWITZ und BROOKE, 1973). Sie setzt sich hauptsächlich aus Makrophagen und Lymphozyten zusammen. Neutrophile Granulozyten oder Plasmazellen sind eher selten. Nach Immobilisation ist die Infiltration durch Entzündungszellen eher von kurzer Dauer. Andere Autoren beschrieben eine substantielle zelluläre Infiltration 2 Tage nach Wiederbelastung von über 10 Tage entlasteten Hintergliedmaßen (ST PIERRE und TIDBALL, 1994). Bereits nach einer Woche Erholung nach 5-wöchiger Entlastung waren bei ITAI et al. (2004) keine auffälligen Veränderungen mehr zu finden. Auch VENOJARVI et al. (2004) beobachteten 14 Tage nach einer 4-wöchigen Immobilisation mit Kunststoff-Cast nur noch eine schwache Entzündungsreaktion (VENOJARVI et al., 2004). In der eigenen Studie könnte die Immobilisation durch interne Fixierung mit Kirschnerdrähten zu einer kurzfristigen Entzündung im Sinne einer Fremdkörperreaktion geführt haben. Die Inflammationsreaktion nach C.p.-Gabe wird durch die Bakterienantigene der abgetöteten C.p.-Bakterien verursacht. Bei einer CIPM bleiben Entzündungsreaktionen in Form von zellulären Infiltrationen zwar meist aus, dennoch konnten DE LETTER et al. (2000) in Muskelbiopsien von Patienten mit CIPM aktivierte Leukozyten nachweisen, die pro- und antiinflammatorische Zytokine produzierten.

4.2.6 PAS-Auswertung

4.2.6.1 Fasertypenverteilung

Die Verteilung der Typ1- zu den Typ2-Fasern war in allen Schädigungsgruppen und zu allen Zeitpunkten gleich. Der M. gastrocnemius bestand in der vorliegenden Studie aus rund einem Viertel an Typ1-Fasern und zu drei Vierteln aus Typ2-Fasern. Da weder zwischen den Tieren der verschiedenen Schädigungsgruppen, noch zwischen Op- und Kontrollbein Unterschiede festzustellen waren, hatte erwartungsgemäß weder die Immobilisation noch die Inflammation eine Auswirkung auf die Fasertypenzusammensetzung des M. gastrocnemius. Bei LENZ (in Vorb.) waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Verhältnisses der Typ1- zu den Typ2-Fasern zu verzeichnen. Auch bei IBEBUNJO und MARTYN (1999) traten keine Veränderungen der Fasertypenverteilung nach Immobilisation mit Kirschnerdrähten auf.

4.2.6.2 Fasertypengruppierung

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben einige Fasertypengruppierungen in verschiedenen Schädigungsgruppen vor allem in der NaCl/Immobilisation-Gruppe. Auch LENZ (in Vorb.) berichtet von einer Häufung der Fasertypengruppierungen in den immobilisierten Gliedmaßen. Fasertypengruppierungen treten nach kollateraler Reinnervation bei Nervenschädigungen auf. Eine durch Immobilisation und Inflammation entstandene CIP könnte unter Umständen ein solches Bild hervorrufen. Allerdings war die Inzidenz bei den C.p.-Tieren eher gering. Ebenso vorstellbar ist, dass es bei der Immobilisation mit den Kirschnerdrähten zu direkten Nervenverletzungen gekommen sein könnte. Das erklärt aber nicht das Vorkommen in den Kontrollbeinen. Eine begründete Interpretation der Ergebnisse ist somit schwierig.

4.2.6.3 Fasertypenprädominanz

Sowohl Typ1- als auch Typ2-Faserprädominanzen wurden in allen Schädigungsgruppen am Op- und Kontrollbein gesehen, allerdings ohne erkennbare Zusammenhänge. Eine Häufung wurde, anders als vielleicht vermutet, sogar eher in den Kontrollbeinen beobachtet. Auffällig ist nur, dass deutlich mehr Typ2-Faserprädominanzen als Typ1-Faserprädominanzen gezählt wurden, was eventuell darauf hindeuten kann, dass eine Verschiebung zu den Typ2-Fasern stattgefunden hat. Andererseits sind diese Ergebnisse vielleicht auch anhand der normalen Faserverteilung im M. gastrocnemius zu erklären, der nach eigenen Erkenntnissen keine einheitliche mosaikartige Struktur besitzt, sondern aus verschiedenen Arealen mit unterschiedlicher Faserzusammensetzung zu bestehen scheint. Diese Einteilung in Faserareale ist z.B. auch für den M. tibialis cranialis bekannt, der im Querschnitt neben einer kleinen Fläche gemischter Fasern auch eine große Fläche mit ausschließlich Typ2-Fasern enthält (MINNAARD et al., 2005). Somit könnte je nach Schnittebene vorrangig das eine oder andere Fasermuster im Präparat vorherrschen.

4.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Die ermittelten Ergebnisse zeigen, dass ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Auswirkungen von Immobilisation und Inflammation gefunden wurde. Im Hinblick auf die Vorgänge in der Erholungsphase ließen sich einige neue Erkenntnisse ermitteln. So erkennt man z.B. am Verlauf der Muskelgewichte des M. gastrocnemius, dass hierbei die Immobilisation im Vergleich zur systemischen Inflammation einen nachhaltigeren bzw. längerfristigen Effekt ausübt, der Atrophiegrad durch die Inflammation aber zusätzlich erhöht wird. Die histologischen Untersuchungsergebnisse zeigen zusammengefasst folgenden Verlauf: In den ersten Tagen herrschen im Muskel zunächst erhebliche Schädigungsanzeichen wie Kalibervariationen, Ödeme, Myophagien und anguläre Fasern vor. Nach schätzungsweise 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. Wie bei den Muskelgewichten scheint auch bei den atrophischen Fasern und dem Faserdurchmesser der Immobilisationseffekt dem der Inflammation bezüglich der Erholung zu überwiegen. Demgegenüber ist bei den Veränderungen der Bindegewebsmenge und der Infiltration durch

DISKUSSION

Entzündungszellen ein verstärkter Einfluss der systemischen Inflammation zu verzeichnen. Die Ergebnisse der PAS-Färbung brachten keine zusätzlichen Erkenntnisse.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Erholung einer durch Immobilisation und Inflammation geschädigten und atrophierten Muskulatur histologisch nicht allein an der Zunahme der Muskelfaserdurchmesser festzumachen ist, sondern auch umfangreiche Reparatur- und Regenerationsprozesse nach sich zieht, die unterschiedlich lange andauern und verschieden stark von dem einen oder dem anderen Schädigungsfaktor abhängen.

Durch die gewonnenen Erkenntnisse lassen sich zudem gewisse Rückschlüsse auf mögliche therapeutische Ansätze ziehen. Da die Immobilisation entscheidend zu einer verzögerten Erholung des neuromuskulären Systems beizutragen scheint, liegt die Überlegung nahe, eine schnellere Rehabilitation durch möglichst frühe Mobilisation der Patienten zu erzielen. So könnte die Rehabilitationszeit durch den Beginn einer Physiotherapie bereits im Krankenbett vermutlich bedeutend verkürzt werden. Weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet stehen noch aus.

5 ZUSAMMENFASSUNG

„Histopathologische Veränderungen im Muskelgewebe während der Erholungsphase nach Immobilisation und systemischer Inflammation im Modell an der Ratte“

Neuromuskuläre Folgeerkrankungen einer systemischen Inflammationsreaktion (SIRS) treten bei intensivmedizinisch behandelten Patienten in etwa 70% der Fälle auf. Bei über 90% dieser Patienten bleiben schwere neuromuskuläre Defizite noch bis zu 5 Jahre nach Entlassung aus der Intensivstation bestehen. Ziel unserer Studie ist es, anhand histologischer Untersuchung der Skelettmuskulatur zu erforschen, inwiefern die Faktoren Immobilisation und systemische Inflammation, einzeln und in Kombination, an der verzögerten Rehabilitation aufgrund dieser so genannten Critical Illness Polyneuromyopathie (CIPM) ursächlich beteiligt sind.

Die Untersuchungen wurden an 258 männlichen Sprague-Dawley Ratten vorgenommen. Die Tiere bekamen jeweils an den Tagen -12, -8 und -4 entweder hitzeinaktiviertes Corynebakterium parvum (C.p.) oder physiologische Kochsalzlösung (NaCl) intravenös injiziert. Außerdem wurden alle Tiere am Tag -12 entweder einer Immobilisations-operation (Immob) unterzogen, bei der eine Hintergliedmaße (Op-Bein) durch interne Fixierung mit Drähten immobilisiert wurde, oder einer Scheinimmobilisation (Sham), bei der die Drähte sofort nach der Einbringung wieder entfernt wurden. Das jeweils kontralaterale Bein diente als Kontrollbein. Am Tag 0 wurden bei den Immob-Tieren alle Drähte entfernt, die Sham-Tiere erhielten erneut eine Scheinoperation. Danach schloss sich eine unterschiedlich lange Erholungsphase an. Nach 0, 4, 12 oder 36 Tagen Erholung wurde die muskuläre Kontraktionskraft des M. tibialis cranialis mechanomyographisch ermittelt (Thema der Dissertation von BUYAR [in Vorb.]) und die Tiere danach euthanasiert. Als Proben wurden den Ratten Blut, die Leber und verschiedene Muskeln entnommen. Ein Bauch des M. gastrocnemius diente der histologischen Untersuchung.

55 Tiere starben aufgrund der Bakterieninjektion. Als weitere Inflammationszeichen dienten eine Abnahme des Körpergewichts, die Zunahme des Lebergewichts, der Anstieg des Methämoglobin-Spiegels im Blut und verminderte Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen. Unterschiede zwischen C.p.- und NaCl-Tieren verschwanden bis zum Tag 4, außer beim Lebergewicht der C.p.-Tiere, das noch bis zum Ende der Erholung signifikant erhöht blieb. Die Muskelgewichte des M. gastrocnemius erholten sich nicht bis Tag 36 und blieben im Vergleich zum Kontrollbein stark reduziert. Hier hatte die Immobilisation einen längerfristigen Effekt als die alleinige Inflammation. Dieselbe Grundaussage traf auf histologischer

ZUSAMMENFASSUNG

Ebene auch auf die erhöhte Anzahl der Faseratrophien und auf die reduzierten Muskelfaserdurchmesser zu. Andere Schädigungszeichen wie Kalibervariationen, Ödem, Myophagie und anguläre Fasern traten geringfügig gehäuft bei kombinierter Schädigung auf, mit einem Maximum an Tag 4. Regenerationszeichen wie Fasern mit zentralen Kernen bestimmten das histologische Bild etwa ab Tag 12. Verbreitertes Bindegewebe und die Infiltration von Entzündungszellen waren stärker an den Effekt der systemischen Inflammation gekoppelt und waren noch bis Tag 36 zu verzeichnen. Die Fasertypenzusammensetzung änderte sich zu keinem Zeitpunkt.

Im Laufe der Erholungszeit nach Immobilisation und systemischer Inflammation ändert sich das histologische Bild im Skelettmuskel von vorrangiger Muskelfaserdegeneration und einer starken zellulären Immunantwort hin zu deutlichen Anzeichen eines Regenerationsprozesses. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass diese Regeneration auch nach 36 Tagen Erholung in Bezug auf das Muskelgewicht sowie auf histologischer Ebene noch nicht abgeschlossen ist, wobei sich die Faktoren Immobilisation und Inflammation unterschiedlich stark auf die Veränderungen im Muskel auswirken.

6 SUMMARY

“Histopathological changes in muscle fibres during the period of recovery after immobilisation and systemic inflammation in a rat model”

Approximately 70% of the patients in intensive care suffer from neuromuscular disorders in consequence of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Over 90% of these patients retain severe neuromuscular deficits up to five years after discharge from the intensive care unit. This study aims at investigating by means of histological examinations of the skeletal muscles, to what extent each of the two factors immobilisation and systemic inflammation taken for itself and a combination of both factors are responsible for the delayed rehabilitation in consequence of the so called Critical Illness Polyneuromyopathy (CIPM).

The examinations were carried out on 258 male Sprague-Dawley rats. On days -12, -8 and -4 the rats received an intravenous injection of either heat-inactivated *Corynebacterium parvum* (C.p.) or physiological saline solution. In addition, on day -12 either an immobilisation operation during which one of the hind limbs (op-leg) was immobilised through internal fixation by wires, or a sham operation during which the wires were immediately removed again after insertion was carried out on all the rats. The respective contralateral leg served as comparison. On day 0 the wires were removed from the limb of the immobilised rats, while a second sham operation was carried out on the sham-immobilised rats. The operations were succeeded by periods of recovery differing in length. After 0, 4, 12 or 36 days of recovery the force of muscular contraction of the tibialis cranialis muscle was determined mechano-myographically and the rats were subsequently euthanised. Specimen were taken from the blood, liver and several muscles of the rats. One belly of the gastrocnemius muscle was utilised for histological examination.

55 of the animals died in consequence of the bacteria injection. Further indications of an inflammation were a decrease in body weight, an increase in liver weight, an increase in the level of methaemoglobin in the blood and a decrease in the amount of erythrocytes and thrombocytes. The differences between the rats in the C.p.-groups and the rats in the saline-groups disappeared until day 4 with the exception of the liver weight in the C.p.-groups, which continued to be significantly higher than that in the saline-groups throughout the entire period of recovery. The muscle weight of the gastrocnemius muscle in the op-leg was highly atrophic in comparison to the contralateral limb and did not recover until day 36. In this case

SUMMARY

the immobilisation was responsible for the delayed recovery to a greater extent than the inflammation. The same held true on the histological level with respect to the increased amount of atrophic fibres and the reduced fibre diameter. Further myopathic changes such as abnormal variation of muscle fibre size, oedema, myophagy and angulated fibres occurred to a slightly increased extent when the rats had undergone both inflammation and immobilisation, the maximum extent being reached on day 4. Signs of regeneration such as fibres with internalised nuclei predominated the histological picture approximately from day 12 onwards. An increase of connective tissue and an infiltration by inflammatory cells were ascertained more frequently in consequence of the systemic inflammation and were registered up until day 36. The composition of muscle fibre types did not change at any point of time.

During the period of recovery which ensued immobilisation and systemic inflammation, the overall histological picture regarding the skeletal muscles evolved from being predominated by a degeneration of muscle fibres and a strong cellular response, to displaying obvious signs of a regeneration process. The present study showed that even after 36 days of recovery this regeneration was not concluded with respect to muscle weight and on a histological level and that the factors immobilisation and inflammation differed in the extent of the effect that they had on the respective myopathological changes.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ALEXANDER JW, GONCE SJ, MISKELL PW, PECK MD, SAX H

A new model for studying nutrition in peritonitis. The adverse effect of overfeeding
Ann Surg 1989; 209:334-40

ARIANO MA, ARMSTRONG RB, EDGERTON VR

Hindlimb muscle fiber populations of five mammals
J Histochem Cytochem 1973; 21:51-5

BLOOMFIELD SA, ALLEN MR, HOGAN HA, DELP MD

Site- and compartment-specific changes in bone with hindlimb unloading in mature adult rats
Bone 2002; 31:149-57

BOLTON CF

Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: neuromuscular manifestations
Crit Care Med 1996; 24:1408-16

BOLTON CF

Neuromuscular manifestations of critical illness
Muscle Nerve 2005; 32:140-63

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 RC, BALK RA, CERRA FB, DELLINGER RP, FEIN AM, KNAUS WA, SCHEIN RM, SIBBALD WJ

Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine
Chest 1992; 101:1644-55

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

BONE RC, GRODZIN CJ, BALK RA

Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process
Chest 1997; 112:235-43

LITERATURVERZEICHNIS

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

BUYAR S

Muskelfunktion in der Erholungsphase nach Critical Illness Myopathy - der Effekt von Immobilisation und Inflammation anhand eines Rattenmodells
Med Diss TU München (in Vorb.)

CHAD D, LACOMIS D

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

COONEY R, KIMBALL S, VARY T

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

COUTINHO EL, GOMES AR, FRANCA CN, SALVINI TF

A new model for the immobilization of the rat hind limb
Braz J Med Biol Res 2002; 35:1329-32

COWLEY HC, HENEY D, GEARING AJ, HEMINGWAY I, WEBSTER NR

Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study
Crit Care Med 1994; 22:651-7

DE JONGHE B, BASTUJI-GARIN S, SHARSHAR T, OUTIN H, BROCHARD L

Does ICU-acquired paresis lengthen weaning from mechanical ventilation?
Intensive Care Med 2004; 30:1117-21

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, SVELKOUK 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

DUBOWITZ V, BROOKE MH

Muscle Biopsy: A Modern Approach
W.B. Saunders Company Ltd.
London, Philadelphia, Toronto 1973; S. 10-14, 74-102

FARQUHAR D, BENVENUTO JA, KUTTESCH N, LOO TL

Inhibition of hepatic drug metabolism in the rat after *Corynebacterium parvum* treatment
Biochem Pharmacol 1983; 32:1275-80

LITERATURVERZEICHNIS

FAUST SN, LEVIN M, HARRISON OB, GOLDIN RD, LOCKHART MS, KONDAVEETI S, LASZIK Z, ESMON CT, HEYDERMAN RS

Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis

N Engl J Med 2001; 345:408-16

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

FINK MP, HEARD SO

Laboratory models of sepsis and septic shock

J Surg Res 1990; 49:186-96

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

FRIED RC, BAILEY PM, MULLEN JL, STEIN TP, CROSBY LO, BUZBY GP

Alterations in exogenous substrate metabolism in sepsis

Arch Surg 1986; 121:173-8

FRIEDRICH O, FINK RH, HUND E

Understanding critical illness myopathy: approaching the pathomechanism

J Nutr 2005; 135:1813S-7S

GELLER DA, DI SILVIO M, NUSSLER AK, WANG SC, SHAPIRO RA, SIMMONS RL, BILLIAR TR

Nitric oxide synthase expression is induced in hepatocytes in vivo during hepatic inflammation

J Surg Res 1993; 55:427-32

GLAUSER MP, ZANETTI G, BAUMGARTNER JD, COHEN J

Septic shock: pathogenesis

Lancet 1991; 338:732-6

GORIS RJ, BOEKHOLTZ WK, VAN BEBBER IP, NUYTINCK JK, SCHILLINGS PH

Multiple-organ failure and sepsis without bacteria. An experimental model

Arch Surg 1986; 121:897-901

GUTMANN L, BLUMENTHAL D, SCHOCHET SS

Acute type II myofiber atrophy in critical illness

Neurology 1996; 46:819-21

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

LITERATURVERZEICHNIS

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

HERRIDGE MS, CHEUNG AM, TANSEY CM, MATTE-MARTYN A, DIAZ-GRANADOS N, AL-SAIDI F, COOPER AB, GUEST CB, MAZER CD, MEHTA S, STEWART TE, BARR A, COOK D, SLUTSKY AS
One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome
N Engl J Med 2003; 348:683-93

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, GENZWURKER H, BOHRER H, JAKOB H, THIELE R, HACKE W
Predominant involvement of motor fibres in patients with critical illness polyneuropathy
Br J Anaesth 1997; 78:274-8

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

ISHIKAWA T, SHIMIZU M, MIKAWA Y, ZHU BL, QUAN L, LI DR, ZHAO D, MAEDA H
Pathology of experimental disuse muscular atrophy in rats
Connect Tissue Res 2005; 46:101-6

ITAI Y, KARIYA Y, HOSHINO Y
Morphological changes in rat hindlimb muscle fibres during recovery from disuse atrophy
Acta Physiol Scand 2004; 181:217-24

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

KRAWIEC BJ, FROST RA, VARY TC, JEFFERSON LS, LANG CH
Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis
Am J Physiol Endocrinol Metab 2005; 289:E969-80

LITERATURVERZEICHNIS

KREYMANN G, WOLF M

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

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

LACOMIS D, SMITH TW, CHAD DA

Acute myopathy and neuropathy in status asthmaticus: case report and literature review
Muscle Nerve 1993; 16:84-90

LANG CH, BAGBY GJ, BORNSIDE GH, VIAL LJ, SPITZER JJ

Sustained hypermetabolic sepsis in rats: characterization of the model
J Surg Res 1983; 35:201-10

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

LENZ A

Histopathologische Veränderungen am Skelettmuskel nach chronischer Inflammation mit Corynebakterium parvum mit und ohne Immobilisation - Experimentelle Untersuchungen an der Ratte
Vet Med Diss München (in Vorb.)

LEVY H, ASH SR, KNAB W, STECZKO J, CARR DJ, BLAKE DE

Systemic inflammatory response syndrome treatment by powdered sorbent pheresis: the BioLogic-Detoxification Plasma Filtration System
ASAIO J 1998; 44:M659-65

LIN MC, EBIHARA S, EL DWAIRI Q, HUSSAIN SN, YANG L, GOTTFRIED SB, COMTOIS A, PETROF BJ

Diaphragm sarcolemmal injury is induced by sepsis and alleviated by nitric oxide synthase inhibition
Am J Respir Crit Care Med 1998; 158:1656-63

MAYER B, FINK H, BOGDANSKI R, STADLER J, BLOBNER M

Inflammatory liver disease shortens atracurium-induced neuromuscular blockade in rats
Eur J Anaesthesiol 2001; 18:599-604

MINNAARD R, DROST MR, WAGENMAKERS AJ, VAN KRANENBURG GP, KUIPERS H, HESSELINK MK

Skeletal muscle wasting and contractile performance in septic rats
Muscle Nerve 2005; 31:339-48

NEUGEBAUER E, DIMMELER S, TROIDL H

[Mediator systems and infection]
Chirurg 1995; 66:2-10

LITERATURVERZEICHNIS

NIEDERMAN MS, FEIN AM

Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia. A common clinical sequence

Clin Chest Med 1990; 11:633-56

OP DE COUL AA, LAMBREGTS PC, KOEMAN J, VAN PUYENBROEK MJ, TER LAAK HJ, GABREELS-FESTEN AA

Neuromuscular complications in patients given Pavulon (pancuronium bromide) during artificial ventilation

Clin Neurol Neurosurg 1985; 87:17-22

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

PARRILLO JE, PARKER MM, NATANSON C, SUFFREDINI AF, DANNER RL, CUNNION RE, OGNIBENE FP

Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy

Ann Intern Med 1990; 113:227-42

POPESKO P

A colour atlas of the anatomy of small laboratory animals

Vol. 2: Rat, Mouse and Golden Hamster

W.B. Saunders Company Ltd.

London 2002; S. 93-5

REMICK DG, WARD PA

Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis

Shock 2005; 24 Suppl 1:7-11

RIEDE U-N, SCHÄFER H-E

Skelettmuskulatur, In: Riede U-N, Schäfer H-E (Hrsg.)

Allgemeine und spezielle Pathologie

Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1995; S. 1096-112

RIEDEMANN NC, GUO RF, WARD PA

The enigma of sepsis

J Clin Invest 2003; 112:460-7

ROOYACKERS OE, SARIS WH, SOETERS PB, WAGENMAKERS AJ

Prolonged changes in protein and amino acid metabolism after zymosan treatment in rats

Clin Sci (London) 1994; 87:619-26

SCHRÖDER JM

Pathologie der Muskulatur

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1982; S. 1-880

LITERATURVERZEICHNIS

SHOWALTER CJ, ENGEL AG

Acute quadriplegic myopathy: analysis of myosin isoforms and evidence for calpain-mediated proteolysis

Muscle Nerve 1997; 20:316-22

ST PIERRE BA, TIDBALL JG

Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension

J Appl Physiol 1994; 77:290-7

TSUKAGOSHI H, MORITA T, TAKAHASHI K, KUNIMOTO F, GOTO F

Cecal ligation and puncture peritonitis model shows decreased nicotinic acetylcholine receptor numbers in rat muscle: immunopathologic mechanisms? [see comments]

Anesthesiology 1999; 91:448-60

UNTERBUCHNER C

Die Auswirkungen von Immobilisation und systemischer Inflammation auf die neuromuskuläre Funktion anhand eines Rattenmodells

Med Diss TU München 2006

VANDENBORNE K, ELLIOTT MA, WALTER GA, ABDUS S, OKEREKE E, SHAFFER M, TAHERNIA D, ESTERHAI JL

Longitudinal study of skeletal muscle adaptations during immobilization and rehabilitation

Muscle Nerve 1998; 21:1006-12

VENOJARVI M, KVIST M, ATALAY M, JOZSA L, KALIMO H

Recovery from immobilisation: responses of fast-twitch muscle fibres to spontaneous and intensive exercise in rat calf muscles

Pathophysiology 2004; 11:17-22

WARREN GL, STALLONE JL, ALLEN MR, BLOOMFIELD SA

Functional recovery of the plantarflexor muscle group after hindlimb unloading in the rat

Eur J Appl Physiol 2004; 93:130-8

WELSCH U

Muskelgewebe, In: Welsch U (Hrsg.)

Lehrbuch Histologie

Urban & Fischer Verlag, München, Jena 2003; S. 137-50

WICHTERMAN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH

Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal

J Surg Res 1980; 29:189-201

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

LITERATURVERZEICHNIS

ZANTL N, UEBE A, NEUMANN B, WAGNER H, SIEWERT JR, HOLZMANN B, HEIDECHE CD, PFEFFER K

Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis

Infect Immun 1998; 66:2300-9

ZARZHEVSKY N, COLEMAN R, VOLPIN G, FUCHS D, STEIN H, REZNICK AZ

Muscle recovery after immobilisation by external fixation

J Bone Joint Surg Br 1999; 81:896-901

ZOCHODNE D

Myopathies in the intensive care unit

Can J Neurol Sci 1998; 25:S40-2

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 (Pt 4):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

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen des Körpergewichts während der Schädigungsphase in Gramm.....	55
Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen des Körpergewichts am Ende der jeweiligen Erholungszeit in Gramm	56
Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der Lebergewichte am Ende der jeweiligen Erholungszeit in Gramm	57
Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Methämoglobin(MetHb)-Werte der Tiere aller Erholungsgruppen während der Schädigungsphase in Prozentanteil am Gesamthämoglobin	59
Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Methämoglobin(MetHb)-Werte am Ende der jeweiligen Erholungszeit in Prozentanteil am Gesamthämoglobin	59
Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der Erythrozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenzahl am Ende der jeweiligen Erholungszeit.....	61
Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Muskelgewichte des M. gastrocnemius in Op-Bein und Kontrollbein in Gramm.....	63
Tabelle 8: Anzahl der Muskeln von n=10 Tieren pro Schädigungsgruppe und Erholungstag, bei denen Kalibervariationen gesehen werden, im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins	64
Tabelle 9: Anzahl der Muskeln von n=10 Tieren pro Schädigungsgruppe und Erholungstag, bei denen ein Ödem gesehen wird, im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins.....	66
Tabelle 10: Anzahl der Fasern mit Myophagie in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen	67
Tabelle 11: Anzahl der angulären Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen	70
Tabelle 12: Anzahl der Fasern mit zentralen Kernen in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen	73
Tabelle 13: Anzahl der atrophischen Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen	75
Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Faserdurchmesser im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins in Mikrometer	79
Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Breite des endomysialen Bindegewebes im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins in Mikrometer	81
Tabelle 16: Anzahl der Entzündungszellen um 10 Muskelfasern im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins, dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen	83
Tabelle 17: Anteil der Typ1-Fasern im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins in Prozent	86
Tabelle 18: Anteil der Typ2-Fasern im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins in Prozent	87
Tabelle 19: Anzahl der Muskeln von n=10 Tieren pro Schädigungsgruppe und Erholungstag, bei denen eine Fasertypengruppierung gesehen wird, im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins	88

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 20: Anzahl der Muskeln von n=10 Tieren pro Schädigungsgruppe und Erholungstag, bei denen eine Fasertypenprädominanz der Typ1-Fasern gesehen wird, im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins	90
Tabelle 21: Anzahl der Muskeln von n=10 Tieren pro Schädigungsgruppe und Erholungstag, bei denen eine Fasertypenprädominanz der Typ2-Fasern gesehen wird, im M. gastrocnemius des Op-Beins und des Kontrollbeins	90

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zusammenhänge zwischen Infektion, Sepsis und Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), sowie einiger infektiöser und nicht infektiöser Ursachen; nach BONE et al. (1992)..... 4

Abbildung 2: Fasertypengruppierung infolge kollateraler Reinnervation; nach RIEDE und SCHÄFER (1995)..... 30

Abbildung 3: Graphische Darstellung zur Gruppeneinteilung der ausgewerteten Tiere..... 37

Abbildung 4: Darstellung der Lage der eingebrachten Kirschnerdrähte; Knochen und Gefäßversorgung des distalen Abschnitts der rechten Hintergliedmaße bei der Ratte, Ansicht von medial; nach POPESKO (2002)..... 42

Abbildung 5: Knochen und Skelettmuskulatur des distalen Abschnitts der linken Hintergliedmaße bei der Ratte, Ansicht von lateral; nach POPESKO (2002)..... 45

Abbildung 6: Ein Bauch des M. gastrocnemius in drei Teile geteilt (A); Einer der Muskelblöcke auf einem Korkplättchen, umgeben von durchsichtigem Einfriermedium (B)..... 46

Abbildung 7: Einfrieren der Muskelprobe (A); Anfertigen der Schnitte am Kryotom (B)..... 46

Abbildung 8: Verlauf des Körpergewichts der Tiere aller Erholungsgruppen in der Schädigungsphase..... 55

Abbildung 9: Verlauf des Körpergewichts am Ende der jeweiligen Erholungszeit..... 56

Abbildung 10: Lebergewichte am Ende der jeweiligen Erholungszeit..... 58

Abbildung 11: Verlauf des MetHb-Spiegels der Tiere aller Erholungsgruppen in der Schädigungsphase..... 60

Abbildung 12: Verlauf des MetHb-Spiegels am Ende der jeweiligen Erholungszeit..... 60

Abbildung 13: Pathologische Kalibervariationen im Op-Bein bei einem Tier der NaCl/Immob-Gruppe nach 36 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung..... 65

Abbildung 14: Perimysiales und endomysiales Ödem im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe nach 12 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung..... 66

Abbildung 15: Anzahl der Fasern mit Myophagie in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins..... 68

Abbildung 16: Anzahl der Fasern mit Myophagie in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins..... 68

Abbildung 17: Beginnende Myophagie im Kontrollbein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe nach 12 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 560-fache Vergrößerung..... 69

Abbildung 18: Fortgeschrittene Myophagie im Kontrollbein bei einem Tier der C.p./Sham-Gruppe nach 4 Tagen Erholung, die betroffenen Muskelfasern werden komplett von Makrophagen ausgefüllt; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung..... 69

Abbildung 19: Anzahl der angulären Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins..... 71

Abbildung 20: Anzahl der angulären Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins..... 71

Abbildung 21: Anguläre Fasern im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe nach 4 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung..... 72

Abbildung 22: Anzahl der Fasern mit zentralen Kernen in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins..... 73

Abbildung 23: Anzahl der Fasern mit zentralen Kernen in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins..... 74

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 24: Faser mit zentralen Zellkernen im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Sham-Gruppe nach 36 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 560-fache Vergrößerung.....	74
Abbildung 25: Anzahl der atrophischen Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Op-Beins	76
Abbildung 26: Anzahl der atrophischen Fasern in 5 Gesichtsfeldern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins.....	76
Abbildung 27: Einzelne atrophische Fasern im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe nach 4 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung.....	77
Abbildung 28: Gruppenatrophie im Op-Bein bei einem Tier der NaCl/Immob-Gruppe nach 12 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 140-fache Vergrößerung	77
Abbildung 29: Komplett atrophierter Muskel mit Atrophie aller Muskelfasern im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe nach 4 Tagen Erholung; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung	78
Abbildung 30: Durchschnittliche Faserdurchmesser im M. gastrocnemius des Op-Beins	79
Abbildung 31: Durchschnittliche Faserdurchmesser im M. gastrocnemius des Kontrollbeins	80
Abbildung 32: Durchschnittliche Breite des endomysialen Bindegewebes im M. gastrocnemius des Op-Beins.....	81
Abbildung 33: Durchschnittliche Breite des endomysialen Bindegewebes im M. gastrocnemius des Kontrollbeins	82
Abbildung 34: Verbreitertes Bindegewebe im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe am Tag 0; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung	82
Abbildung 35: Anzahl der Entzündungszellen um 10 Muskelfasern im M. gastrocnemius des Op-Beins	84
Abbildung 36: Anzahl der Entzündungszellen um 10 Muskelfasern im M. gastrocnemius des Kontrollbeins.....	84
Abbildung 37: Endomysiale Entzündungszellen im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Sham-Gruppe am Tag 0; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung	85
Abbildung 38: Perivaskuläre Infiltration mit Makrophagen und Lymphozyten im Op-Bein bei einem Tier der C.p./Immob-Gruppe am Tag 0; H.E.-Färbung, 280-fache Vergrößerung.	85
Abbildung 39: Normalverteilung der Typ1- und Typ2-Fasern im Op-Bein bei einem Tier der NaCl/Immob-Gruppe nach 36 Tagen Erholung; PAS-Färbung, 280-fache Vergrößerung	87
Abbildung 40: Fasertypengruppierung im Op-Bein bei einem Tier der NaCl/Immob-Gruppe nach 12 Tagen Erholung; PAS-Färbung, 35-fache Vergrößerung.....	89
Abbildung 41: Fasertypenprädominanz der Typ1-Fasern im Kontrollbein bei einem Tier der C.p./Sham-Gruppe nach 4 Tagen Erholung; PAS-Färbung, 280-fache Vergrößerung	91

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α_1 -AGP	α_1 -saures Glykoprotein
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ACCP/ SCCM	American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine
Aqua dest.	Aqua destillata
BE	Basenexzess
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium
CIM	Critical Illness Myopathy
CIP	Critical Illness Polyneuropathy
CIPM	Critical Illness Polyneuromyopathy
CK	Kreatinkinase
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
C.p.	Corynebakterium parvum
d.h.	das heißt
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCO ³⁻	Bicarbonat
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
Immob	Immobilisation
i.v.	intravenös
K ⁺	Kalium
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M.	Musculus
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MetHb	Methämoglobin
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mm.	Musculi

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
1 N	1-normale Lösung
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Nitrit
NO ₃	Nitrat
O ₂	Sauerstoff
Op-Bein	immobilisierte bzw. sham-immobilisierte Hintergliedmaße
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAS	Periodic Acid Schiff
PE	Polyethylen
pH-Wert	Wasserstoffionen-Wert
s	Sekunde
s.	siehe
SD	Standardabweichung
Sham	Schein-Immobilisation
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
V.	Vena
Vol. %	Volumen Prozent
Vorb.	Vorbereitung
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

11 DANKSAGUNGEN

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

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München, bedanke ich mich, dass es möglich war, die Arbeit an diesem Institut durchzuführen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dipl. Phys. E. Kochs, Direktor der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner, Oberarzt der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München, für die Überlassung des Themas, die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse, sowie für die freundliche Unterstützung bedanken.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Erhardt für die Durchsicht des Manuskriptes und sein großes Maß an Engagement und Herzlichkeit.

Bei Frau Dr. med. Heidrun Fink, Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München, möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die sehr gute Betreuung und die vielen hilfreichen Tipps bei der mehrfachen Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Dr. med. Marc Helming danke ich für die gute Zusammenarbeit, sowohl während des Versuchsprojektes, als auch danach, und für die vielen konstruktiven Gespräche.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. med. Frauke Neff für ihre unermüdliche Hilfe bei der histologischen Beurteilung der Präparate.

Frau Anne Frye danke ich für ihre Mithilfe bei der Aufbereitung der großen Probenanzahl.

Ein sehr großer Dank geht auch an meine Laborkollegin Frau Dr. med. vet. Kristine Kellermann und meinen Mitdoktoranden Herrn Serkan Buyar, ohne deren Beistand in jeder Lebenslage und Humor ich sicherlich am Ende doch noch zum „Grottenolm“ mutiert wäre.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie und meinem lieben Freund Christian für ihre unerschöpfliche Geduld und Unterstützung in jeder Hinsicht.