

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall, Hand- und Plastische Chirurgie  
der Ludwig-Maximilians Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler)

**Läsion, Rekonstruktion und Regeneration des peripheren Nerven -  
Adenovirale Gentherapie mit Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF<sub>165</sub>) am  
Model des Nervus ischiadicus Transplantates der Ratte**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der medizinischen Fakultät für Medizin der  
Ludwig Maximilian Universität zu München**

**durch Rupprecht, Leo, Vladimir, Ernst Milojcic  
aus Prien.**

**November 2012**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Riccardo Giunta

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Jan Sendereck

Prof. Dr. Thomas N. Witt

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2012

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Übersicht.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Kurze Erläuterung der Gliederung der Arbeit .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Anatomie des peripheren Nerven.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Traumata des peripheren Nervensystems.....</b>	<b>13</b>
1.4.1 Klassifikation des peripheren Nerventraumas.....	14
<b>1.5 Therapieansätze bei PNS Traumen .....</b>	<b>16</b>
1.5.1 Chirurgischer Ansatz der Therapie .....	17
<b>1.6 Posttraumatische De- und Regeneration des PNS .....</b>	<b>20</b>
1.6.1 Morphologische Veränderungen nach Neurotmesis .....	20
1.6.2 Molekulare Prozesse nach Neurotmesis.....	24
<b>1.7 Mögliche Schwerpunkte der molekularen Therapie der PNS-Traumata.....</b>	<b>32</b>
<b>1.8 Applikationsmethoden der molekularen Therapieformen .....</b>	<b>33</b>
1.8.1 Nicht-virale Vektoren .....	34
1.8.2 Virale Gentherapie .....	35
<b>1.9 Gentherapie in klinischen Studien .....</b>	<b>41</b>
1.9.1 AdVEGF in klinischen/präklinischen Studien .....	43
<b>1.10 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>44</b>
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>47</b>
<b>2.1 Modell des autologen Nerveninterponats zur Untersuchung des Effekts der adenoviralen Gentherapie mit AdCMVVEGF<sub>165</sub> auf die Regeneration .....</b>	<b>48</b>
2.1.1 Ansatz des Modells .....	48
2.1.2 Operation .....	48
2.1.3 Übersicht über die durchgeführten Evaluationsmethoden .....	54
<b>2.2 AdCMV.VEGF<sub>165</sub>.....</b>	<b>57</b>
<b>2.3 Untersuchung des Therapieeffektes von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des „autologen Nerveninterponats“ mittels funktioneller Parameter .....</b>	<b>58</b>
2.3.1 Dynamische Parameter.....	59
2.3.2 Statische Parameter.....	62
<b>2.4 Untersuchung des Therapieeffektes von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerveninterponats mittels elektrophysiologischer Untersuchung .....</b>	<b>64</b>
2.4.1 Vorbereitung und Ablauf der Untersuchung .....	65

<b>2.5 Untersuchung des Therapieeffektes von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats mittels morphologischer Parameter .....</b>	<b>69</b>
2.5.1 Periphere Nervenpräparate - N.ischiadicus .....	69
2.5.2 Semidünnschnitte proximal/intermediär/distal des Interponats .....	70
2.5.3 Schnitte der Koaptationsstellen.....	78
<b>2.6 Untersuchung des Therapieeffektes von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats mittels Gewichtsbestimmung des M. gastrocnemius .....</b>	<b>80</b>
<b>2.7 Untersuchung des Therapieeffektes von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats mittels Bestimmung der Mikrogefäßdichte - Corrosion Cast.....</b>	<b>80</b>
2.7.1 Injektionsmodell .....	81
2.7.2 Beendigung der Versuche und Erstellung der Präparate.....	81
2.7.3 Auswertung der Mikrogefäßdichte .....	82
<b>2.8 Statistische Auswertung .....</b>	<b>83</b>
<b>2.9 Tierhaltung.....</b>	<b>84</b>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>86</b>
<b>3.1 Titerbestimmung und Verifizierung von AdCMV.VEGF<sub>165</sub>.....</b>	<b>86</b>
<b>3.2 Ergebnisse der funktionellen Parameter nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats .....</b>	<b>87</b>
3.2.1 Dynamische Parameter.....	87
3.2.2 Statische Parameter.....	92
<b>3.3 Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats .....</b>	<b>96</b>
<b>3.4 Ergebnisse der morphologischen Auswertung nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats .....</b>	<b>98</b>
<b>3.5 Semidünnschnitte des Nerven an den Lokalisationen a-b-c-d.....</b>	<b>99</b>
3.5.1 Bildanalyse .....	100
3.5.2 Manueller Axoncount .....	106
3.5.3 Bildanalyse .....	112
3.5.4 HE-Schnitte des Nerven an den Lokalisationen f-g .....	112
<b>3.6 Ergebnisse der Gewichtsmessung des M. gastrocnemius nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantates .....</b>	<b>112</b>
<b>3.7 Ergebnisse der Corrosion-Cast hinsichtlich der Mikroangiogenese nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats.....</b>	<b>114</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>115</b>
<b>4.1 Diskussion des operativen Modells .....</b>	<b>116</b>
<b>4.2 Diskussion des applizierten Wachstumsfaktors VEGF .....</b>	<b>117</b>



<b>4.3 Diskussion der angewandten adenoviralen Applikation.....</b>	<b>117</b>
<b>4.4 Diskussion der funktionellen Regeneration .....</b>	<b>118</b>
4.4.1 Motorische Parameter.....	118
4.4.2 Elektrophysiologische Parameter.....	121
<b>4.5 Diskussion der morphologischen Parameter.....</b>	<b>123</b>
4.5.1 Kritische Analyse der automatisierten Auszählung mittels Definiens software .	124
4.5.2 Diskussion der manuellen Analyse am Counting Grid .....	125
4.5.3 Gesamtzahl der gezählten Axone/2.500µm <sup>2</sup> .....	126
4.5.4 Anzahl großer und kleiner Axone in den Semidünnschnitte .....	127
4.5.5 Die Fibrosierung als Zeichen von Degeneration .....	128
4.5.6 Erörterung der Neurombildung.....	128
4.5.7 Diskussion des Gewichts des M. gastrocnemius als morphologischer Parameter	128
<b>4.6 Diskussion der Zusammenhänge zwischen Funktion und Morphologie .</b>	<b>129</b>
<b>4.7 Schlußfolgerung für eine optimierte Planung kommender Versuche und die Verbesserung der statistischen Aussagekraft .....</b>	<b>130</b>
<b>5. Ausblick .....</b>	<b>134</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>136</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>138</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>161</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>164</b>
<b>10. Abbkürzungen:.....</b>	<b>165</b>
<b>11. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel .....</b>	<b>167</b>
<b>12. Pharmaka und Tiernahrung .....</b>	<b>169</b>
<b>13. Chemikalien, Lösungen und Puffer.....</b>	<b>170</b>
<b>14. Software .....</b>	<b>171</b>
<b>15. Sonstige Materialien .....</b>	<b>172</b>
<b>16. Lösungen .....</b>	<b>173</b>
<b>17. Danksagung.....</b>	<b>174</b>
<b>18. Lebenslauf .....</b>	<b>175</b>



# **1. Einleitung**

## **1.1 Übersicht**

Das Fachgebiet der rekonstruktiven plastischen Chirurgie konnte im Verlauf der letzten Jahrzehnte besonders durch die Entwicklung der mikrochirurgische Nerven Chirurgie profitieren. Dabei hat sie in der Vergangenheit diverse Innovationszyklen durchlaufen <sup>137</sup>. So steht die plastische Chirurgie heute unter anderem vor der Frage, ob und wie sich der Einfluss von applizierten, physiologisch wirksamen Wachstumsfaktoren auf die Regeneration von peripheren Nerven Traumatata auswirkt <sup>183</sup>. Ziel ist es, zusätzliche Strategien zu entwickeln, welche komplementär zu der chirurgischen Rekonstruktion die Ergebnisse und somit die Prognose der Therapie von Nervenläsionen verbessern.

Dabei stellt sich die Frage, in wie fern die neurotrophen, als auch angiotrophen Wirkmechanismen von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) einen positiven Einfluss auf die Regeneration am Transplantat des peripheren Nerven haben <sup>218, 84, 135, 192, 189 187</sup>. Es war das Ziel dieser Arbeit, eine quantitative Aussage über den Effekt beider Eigenschaften von VEGF auf die Regeneration am peripheren Nerven zu treffen.

Die Grundlage dafür lieferte das operative Modell am N. ischiadicus der Ratte, mit welchem ein adäquates Trauma gestellt wird. Mittels applizierter adenoviraler Gentherapie wurden die Zellen des umliegenden Gewebe zur gesteigerten Synthese von VEGF angehalten. Da der Umgang mit dieser Therapieform der Arbeitsgruppe am Modell der Hautlappenplastik bekannt <sup>72</sup> war, bot sich auch in dem neuen Kontext eine solide Erfahrungsgrundlage für dessen Anwendung.

Das Prinzip, die Regulation von Effekten von Wachstumsfaktoren auszunutzen, ist kein neuer Ansatz in der Medizin. Unterdrückung <sup>5, 165 61 62 60</sup> und

Stimulation<sup>214, 12</sup> der lokalen, als auch systemischen VEGF-Sekretion zählen zu den erprobten Forschungsansätzen.

Allerdings indiziert die Kombination aus neurotrophischer und angiogenetischer Wirkung auf die Regeneration eine interessante Einsatzmöglichkeit von VEGF in der rekonstruktiven Chirurgie des peripheren Nervensystems (PNS). Bisher stand dabei die Frage der Regeneration in Folge der direkter Koaptation des peripheren Nerven im Zentrum der Forschung<sup>224 185</sup>. Diese soll durch diese Arbeit mit Blick auf die Regeneration nach im Koaptation eines autologen Nerventransplantats komplimentiert werden.

## **1.2 Kurze Erläuterung der Gliederung der Arbeit**

Angefangen bei der Beschreibung der Anatomie, leitet der Autor den Leser durch die Problematik der Verletzungen des peripheren Nervensystems. Dazu werden die grundlegenden degenerativen und regenerativen Prozesse beschrieben. Anschließend werden die therapeutischen Optionen in einem Fall eines schweren Nerventraumas beschrieben – hierbei steht die adenovirale VEGF-Gentherapie im Fokus der Beschreibung.

Im weiteren Verlauf wird das in diesem Versuch angewandten plastisch-chirurgischen bzw. therapeutischen Modells erläutert. Und zudem auf die funktionellen, der elektrophysiologischen und morphologischen Evaluation eingegangen. Dies gibt den Einstieg in die daraus entstandenen Ergebnisse und gibt schließlich den Anlass für die darauf basierende Diskussion.

## **1.3 Anatomie des peripheren Nerven**

Das PNS besteht aus vegetativen, sensiblen und motorischen Nerven. Das Funktionsprinzip der einzelnen Nerven unterscheidet sich dabei lediglich in der Innervation des Endorgans, der Richtung der Aktionspotentialfortleitung und in dem damit im Zusammenhang stehenden morphologischen Unter-

schied. Auch wird zur Einteilung der Faserqualität die Fortleitungsgeschwindigkeit bzw. der Nervendurchmesser als Kriterium angesetzt. Die Einteilung der Fasern brachten Joseph Erlanger und Herbert Gasser die Verleihung des Nobelpreises 1944.

In beiden Kategorisierungen spielt die Morphologie der Zellgefüge eine zentrale Rolle. So basiert die Eigenschaft einer Nervenzelle auf ihrer Zellverbundstruktur und wird in myelinisierte und nicht-myelinisierte Nervenfasern unterteilt. Unter der Myelinisierung kann man sich einen aus Zellen, den Schwannschen Zellen, bestehenden Isolerring vorstellen. Je nach Faserklasse hat dieser eine unterschiedliche Dicke.  $\alpha$ -Motoneurone sind stark myelinisiert, d.h. sie sind von vielen Schwannschen Zellen umhüllt und weisen einen größeren Durchmesser auf.  $\delta$ -Fasern dagegen sind nur minimal von Schwannschen Zellen umgeben und dementsprechend kleiner im Durchmesser.

Jede Schwannsche Zelle umfasst stets ein Teilstück von 0,25 - 1,5 mm, welches Internodium genannt wird <sup>145</sup>. Zwischen diesen liegen die unmyelinisierten Rannvierschen Schnürringe, welche den freien Fluss von Ladungen über die Zellmembran gewähren und somit die fortlaufende Depolarisierung, die Erregung der Zelle, auffrischen. Sie haben eine Breite von 1,0 - 4,2  $\mu\text{m}$ . Nach Depolarisierung dieser Schnürringe kann anschließend der Impuls wieder mit erhöhter Amplitude durch das schnell leitende myelinisierte Teilstück der Internodien geleitet werden. Diese periodische Fortleitung des Nervenpotentials bezeichnet man als saltatorische Erregungsleitung <sup>145</sup>. Sie ermöglicht eine besonders schnelle Fortleitung in dicken Nervenfasern, was zum einen an der dickeren, damit effizienteren Isolierung der Axone liegt, zum anderen an der geometrischen Berechnung des Kreises.

Fasertyp	Leitungsge- schwindig- keit	Durchmesser	efferent zu:	afferent von / (Einteilung nach Lloyd/Hunt):
A $\alpha$	60-120 m/s	10-20 $\mu$ m	Skelettmuskel (extrafusal)	Skelettmuskel: Muskelspindel (Ia), Golgi- Sehnenorgan (Ib)
A $\beta$	40-90 m/s	7-15 $\mu$ m		Hautrezeptoren (Berührung, Druck)
A $\gamma$	20-50 m/s	4-8 $\mu$ m	Skelettmuskel (intrafusal)	
A $\delta$	10-30 m/s	2-5 $\mu$ m		Hautrezeptoren (Temperatur, schneller Schmerz)
B	5-20 m/s	1-3 $\mu$ m	Präganglionäre autonome Ner- ven	
C (ohne Myelin- scheide)	0,5-2 m/s	0,5-1,5 $\mu$ m	Postganglionäre autonome Ner- ven	langsamer Schmerz-, Ther- morezeptoren

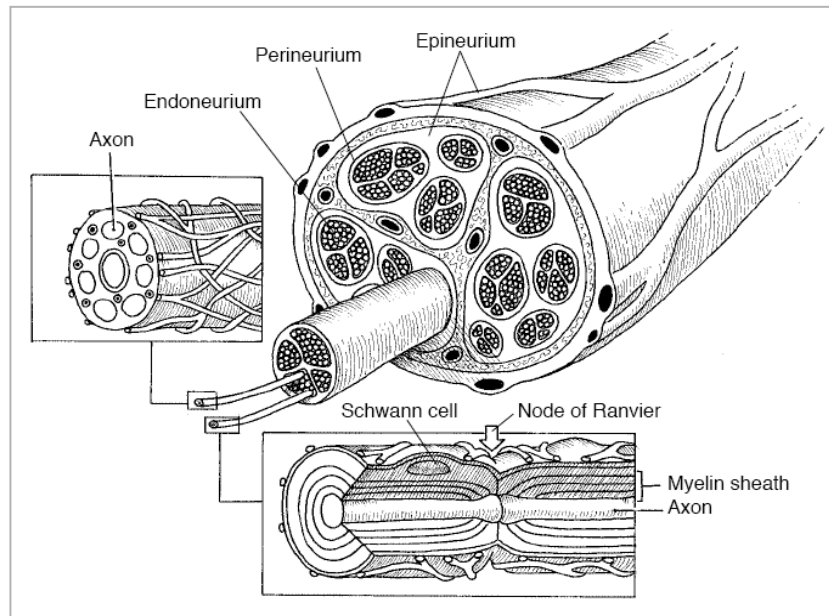
**Tab.1** Einteilung des PNS nach Erlanger und Grassier; Quelle: „Physiologie“, Deetjen, Speckmann, Henschler, Elsevier(Urban & Fischer), 4. Auflage

Diese besagt, dass die Fläche eines Kreises ( $A = \pi \cdot r^2$ ), welche mit dem Querschnitt der Nervenfasern gleichzusetzen ist, exponentiell, der Umfang des Kreises ( $U = \pi \cdot 2r$ ) linear zum Radius ( $r$ ) wächst. Dies bedeutet nichts weiter, als dass ein großfasriges Axon zum einen eine bessere Isolierung, des weiteren ein besseres Verhältnis von Fläche/Umfang hat.

Der periphere Nerv selbst besteht aus vier aufeinander lagernden Schichten: das Epineurium, das Perineurium, das Endoneurium und schließlich die Axone incl. ihrer Saumzellen.

Am äußeren Rand liegt das **Epineurium**, dessen epifaszikuläre Hülle bei der Nervennaht von besonderer Bedeutung ist. Das darunter liegende interfaszikuläre Epineurium bettet die Nervenfaszikel in ein Bindegewebbett.

Die einzelnen Faszikel sind durch die bindegewebige Schicht des **Perineuriums** umsäumt. Bestehend aus flachen Schichten perineuraler Zellen, ist beidseits von einer Basalmem-



**Abb.1** Querschnitt eines peripheren Nerven

Quelle: Lundborg G: *Nerve Injury and Repair*. New York: Churchill Livingstone, 1988, S. 33)

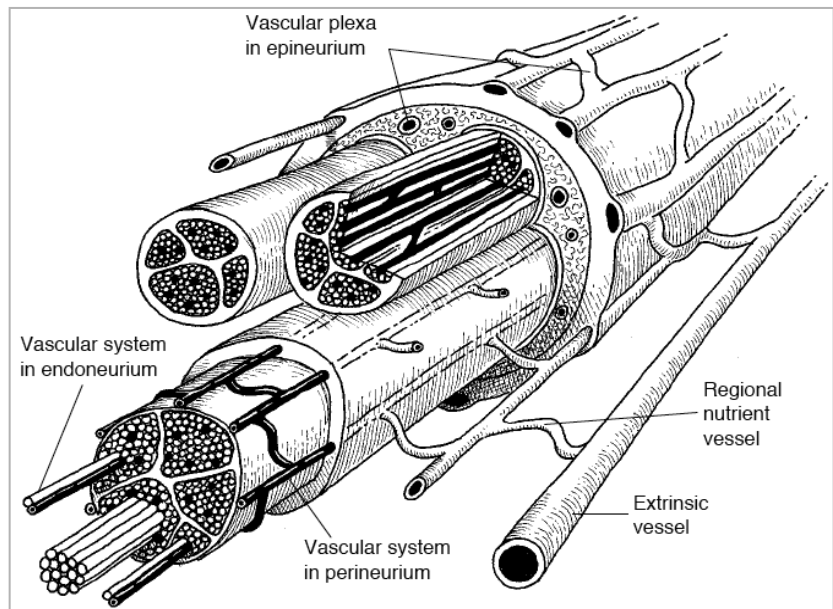
bran bedeckt und durch die Zonulae Occludentes (ZO), spezielle Zell-Zell-Verbindungen, miteinander verbunden. Dieses verleiht dem Nerven seine funktionale, flexible Gewebestabilität <sup>115</sup>. Im Vergleich zu den äußeren Schichten des Epineuriums hat es eine relativ schwache Bindung zu dem umliegenden Gewebe.

Die innerste bindegewebige Schicht des Nerven, das **Endoneurium** besteht aus einer kollagenen Zellmatrix und bettet die Axone jeglicher Faserqualität.. Es wird von längs der Nervenachse gerichteten Kollagenfibrillen durchzogen.

Nach Versuchen von Sunderland kommt es im anatomischen Verlauf eines peripheren Nerven zu repetitiven Teilungen und Wiederezusammenschlüssen einzelner Nerven-Faszikel <sup>197</sup>. Dies formt den faszikulären Plexus eines je-

den peripheren Nerven. Durch diese permanente Verlaufsänderung kommt es zu stetigen Änderungen der Topographie eines Querschnittes. Der resultierende Effekt des gewundenen Verlaufes der einzelnen Faszikel ist die erhöhte Dehnbarkeit des Nerven bei longitudinal wirkenden Kräften. Des Weiteren kommt es durch die bindegewebigen Einlagerungen zwischen den Faszikeln zu einem gewissen Schutz vor horizontalen Kräften auf den Nerven. Trotz der kaum vorhandenen Elastizität des Nerven wird bei einwirkenden Kräften auf die Elastizität des umliegenden Gewebes zurückgegriffen und die Faszikel als solche geschützt<sup>195</sup>. Die ausgeprägteste Form dieser faszikulären Verstrickungen zeigt sich im lumbalen als auch im brachialen Plexus. Die distalen Abschnitte der motorischen Nerven (z.B. des N. Medianus) zeigen dagegen ein wesentlich weniger ausgeprägtes Muster<sup>195</sup>.

Die **Gefäßversorgung** des peripheren Nerven besteht aus einem komplexen Gefüge von Gefäßen. Dieses verteilt sich auf drei Ebenen, die mit den Bindegewebshüllen des Epi-/Peri- und Endoneuriums korrelieren. In der jeweiligen Höhe verlaufen Gefäße longitudinal zur Nervenachse und sind in der Querachse mit Koaptation verbunden.



**Abb.2** Darstellung der Blutversorgung am peripheren Nerven; Quelle: Lundborg G: *Nerve Injury and Repair*. New York: Churchill Livingstone, 1988, p 43.)



Die Perfusion zieht somit von der äußersten auf die innerste Ebene. Aufgelagert befindet sich der epineurale Gefäßplexus, der durch die regionalen Arteriae (Aa) nutrients gespeist wird <sup>145</sup>.

## **1.4 Traumata des peripheren Nervensystems**

Für die Entstehung von Nervenläsionen ist die Intensität der einwirkenden Energie sowie deren Art und Dauer sind dabei die prognostisch entscheidenden Größen <sup>144, 194</sup>. Die Widerstandskraft des jeweiligen Nerven wird durch die Mikroanatomie der Fazikel definiert. <sup>195</sup>.

Es gibt prinzipiell drei verschiedene Haupttypen: Zug-, Kompressions- und Schnitttraumen.

Beim Zugtrauma kommt es zu einer Überforderung der elastischen Widerstände des peripheren Nerven durch eine in der Längsachse wirkende Kraft. Auf Grund des kollagenen Anteils des Endoneuriums und der gewundenen Führung der Nervenfaszikel ist diese Widerstandsfähigkeit sehr hoch <sup>195</sup>, kann aber in Abhängigkeit der Einwirkungsdauer und der Intensität der Kraft überschritten werden. Die Kontinuität bleibt dabei meist erhalten. Die häufigsten klinischen Beispiele sind Plexusparesen (Erb/ Duchenne Parese) bzw. Verletzungen des Plexus brachialis bei Motorradunfällen.

Eine weitere typische Nervenläsion ist die Schnittverletzung. Sie ist Grund für ca. 30 % der klinischen Verletzungen des PNS <sup>22</sup>. Auf Grund der besten Rekonstruierbarkeit dieser Verletzung, d.h. die glatte Durchtrennung des Nerven, ist diese Verletzung das meist benutzte Modell zur Forschung an der Verletzung des PNS.

Die dritte Art der PNS-Verletzung ist die Kompressionsläsion. Typisch sind hierbei Kompressionen, welche sich durch eine unphysiologische Lagerung ergeben („Saturday Night Palsy“ des N.radialis). Durch die Quereinwirkung

der Kraft auf den Nerven bleibt bei dieser Form die Kontinuität unangetastet. Versuche zeigten, dass schon die kurzfristige Einwirkung der Kompression die typische klinische Symptomatik hervorruft. Diese ischämischen Einflüsse sind in einem Zeitrahmen von bis zu 8 Stunden reversibel <sup>150</sup>. Ist die Kompression anhaltend, so scheint die Ischämie zur Nebensache zu werden <sup>149</sup> <sup>150</sup>.

#### 1.4.1 Klassifikation des peripheren Nerven Traumas

Der Erfolg der Regeneration des Nerven nach einem Trauma basiert auf dem Ausmaß bzw. dem Typ der Verletzung. Hierzu wurden klinische Klassifikationen entwickelt, die eine Korrelation zwischen den histologischen Veränderungen und der klinischen Ausprägung der Verletzung aufzeigen. Es sind dies die Seddon <sup>177</sup> und die Sunderland <sup>194 196</sup> Klassifikation. Erweitert wurden diese beiden Standard-Klassifikationen durch Dellon und McKinnon im Jahre 1989 <sup>39</sup>.

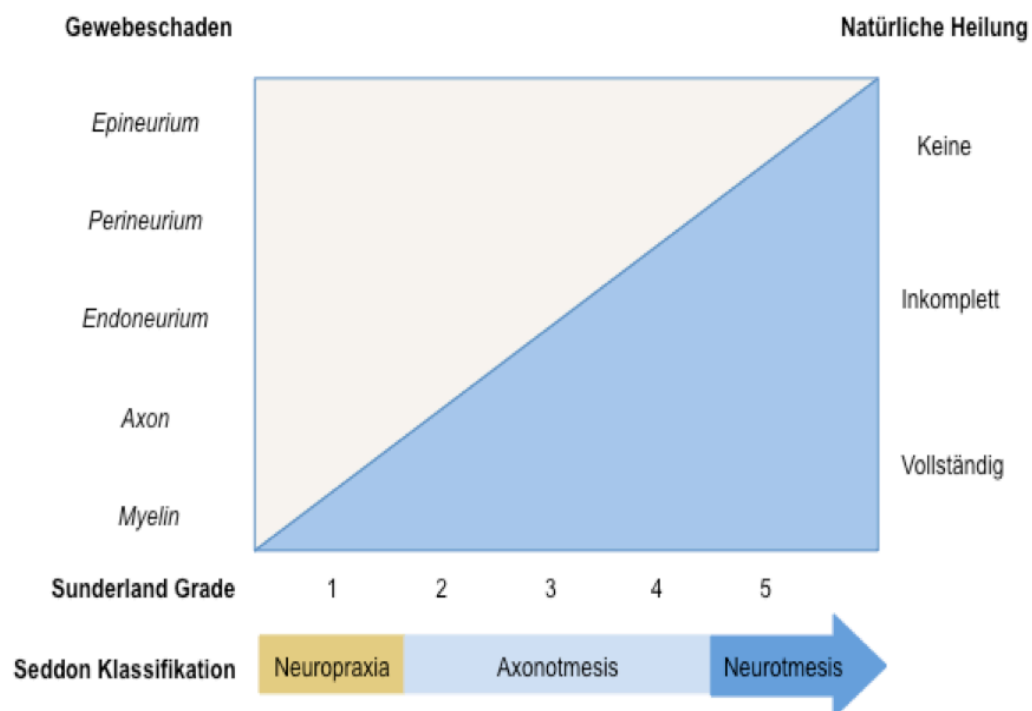
Seddon	Sunderland	Pathologische Kriterien
Neuropraxia	Typ 1	Lokale Myelinschäden- normalerweise Folge von Kompression
Axonotmesis	Typ 2	Verlust der Axon-Kontinuität; Endo-/Peri-/Epineurium intakt
	Typ 3	Verlust der Axon-Kontinuität und Schaden des Endoneuriums; Peri-und Epineurium intakt
	Typ 4	Verlust der Axon-Kontinuität, Schaden des Endo-und Perineurium. Epineurium intakt
Neurotmesis	Typ 5	vollständige physiologische Durchtrennung des Nerven-Trunkus.

**Tbl.2** Tabellarische Zusammenfassung der Einteilung des peripheren Nerven Traumas nach Sunderland und Seddon

Seddon <sup>177</sup> klassifiziert nach der Kontinuität der einzelnen anatomischen Strukturen der Nerven. Sind diese insgesamt erhalten, nennt er diesen **Grad**

**1 „Neuropraxia“.** Dabei wird vermutet, dass es zu einer lokalen Blockade des Nerven kommt, welche durch einen Ionen-Block hervorgerufen wird.

**Grad 2** wird als „**Axonotmesis**“ bezeichnet. Hierbei liegt eine Ruptur des Axons und der jeweiligen Myelinscheide vor. Die bindegewebigen Anteile des Peri-/ Epi- und Endoneuriums sind allerdings erhalten. Es kommt zur Degeneration der distal der Schädigung gelegenen axonalen Anteile des betroffenen Nerven, was wiederum zur Deinnervation des Endorgans führt. Trotz dieser ist die klinische Prognose für die Regeneration sehr gut. Dem liegt zugrunde, dass die Aussprossung der Nerven aus dem proximalen Ende des Nerven-Stumpfes durch das erhaltene Myelin geleitet wird. Dabei gibt es kaum Narbenbildungen und somit wenige Komplikationen. Der **3. Grad** der Klassifikation wird als „**Neurotmesis**“ bezeichnet. Damit wird eine komplette Durchtrennung jeglicher nervalen Strukturen beschrieben, was zu einem kompletten Verlust der Innervation des Endorgans führt.



**Abb.3** Übersicht der Heilungschancen nach dem peripheren Nervenstrauma in Assoziation mit der Klassifikation nach Sunderland/Seddon  
Quelle: Neurosurg. Focus, 2004 American Association of Neurological Surgeons

Ohne eine chirurgische bzw. therapeutische Intervention ist einer Reinnervation sehr unwahrscheinlich, zumal die noch bei Grad 2 vorhandene mesenchymale "Führung der Axonsprosse" nicht möglich ist. Es kommt hier zu einer ausgeprägten Narbenbildung.

Sunderland <sup>196</sup> geht noch weiter und beschreibt fünf Kategorien von Nervenverletzungen. Der dortige **Typ 1** gleicht dem Grad 1 der Seddon Klassifikation - Neuropraxia, **Typ 2** dem Grad 2 – Axonemesis. Ab Typ 3 unterscheiden sich die beiden Einteilungen. So beschreibt **Typ 3** bei Sunderland eine Axonemesis, also den Riss des Axons mit der dazugehörigen Myelinscheide, die zusätzlich mit einer Verletzung des Endoneuriums einhergeht. Je nach Ausmaß der Endoneuriumverletzung hat dies Auswirkung auf die klinische Regeneration. Die **Typen 4 und 5** von Sunderland spezifizieren den Grad 3 - Neurotmesis. So beschreibt **Typ 4** eine fast komplette Unterteilung des Nerven, wobei das Epineurium als Struktur noch eine zumindest partielle Kontinuität aufzeigt. **Typ 5** wiederum ist als kompletter Verlust der nervalen Kontinuität definiert und zwingt - genau wie **Typ 4** - zu einem therapeutischen Eingriff, um die Chance auf Regeneration zu erlangen.

Diese von Sunderland 1951 erstellte Klassifikation wurde von Dellon und McKinnon im Jahre 1989 <sup>39</sup> noch um den Typ 6 erweitert. Diese beschreibt eine Mischverletzung von mindestens zwei der unter Typ 1 - 5 aufgeführten Schweregrade.

Im vorliegenden Experiment steht die Degeneration nach Neurotmesis, entsprechend dem Typ 5 nach Sunderland, im Vordergrund der Untersuchung.

## 1.5 Therapieansätze bei PNS Traumen

Der Schwerpunkt der Therapie des peripheren Nerventraumas besteht in der rekonstruktiven chirurgischen Behandlung. Die der erstmaligen Beschrei-

bung des peripheren Nervensystems und dessen Wiederherstellung (300 v.Chr. durch Herophilus und 900 n. Chr. Von Rhazes) erfolgte lange vor der Geburt der modernen Medizin. Erst im 18. Jahrhundert wurden wissenschaftliche Kausalzusammenhänge der Wiederherstellung der Nervenkontinuität und dem Wiedererlangen der physiologischen Funktionen beschrieben <sup>197</sup>.

Die sich daran anknüpfende Entwicklung wurde durch den Fortschritt in der chirurgischen Behandlung getragen <sup>197</sup>.

Erst in den vergangenen zwei Jahrzehnten entwickelten sich experimentelle Therapien auf Basis von pharmakologischen Stoffen, Immunmodulatoren, Wachstums-Faktoren und Leitungstuben. Ziel ist es die Regeneration mittels zu der rekonstruktiven Nerven Chirurgie komplementäre Therapieformen zu verbessern <sup>115 137</sup>.

### **1.5.1 Chirurgischer Ansatz der Therapie**

Die physische Kontinuität des Gewebes ist Grundvoraussetzung für die bestmögliche Heilung nach einem Nerven Trauma. In Abhängigkeit von dem Grade der Verletzung ist diese noch gegeben oder muss mittels chirurgischer Intervention wiederhergestellt werden. Diese Kausalität wurde im Jahr 1775 Cruikshank erstmals aufgezeigt <sup>115</sup>.

Mit der Einführung des OP-Mikroskopes in den 60'ger Jahren, als auch durch die immer feineren Materialien ermöglichen dabei ein maximal atraumatisches Arbeiten des Chirurgen und initiierten das Feld der Mikrochirurgie.

Zeitliche Behandlungsschemata wurden durch Forschungsergebnisse von Mackinnon <sup>128</sup> Ende der 80er Jahre, deren Kernaussage die baldmöglichste, posttraumatische Wiederherstellung der Nervenkontinuität mittels chirurgischer Intervention weiterentwickelt. So wandte man sich von der bisherigen

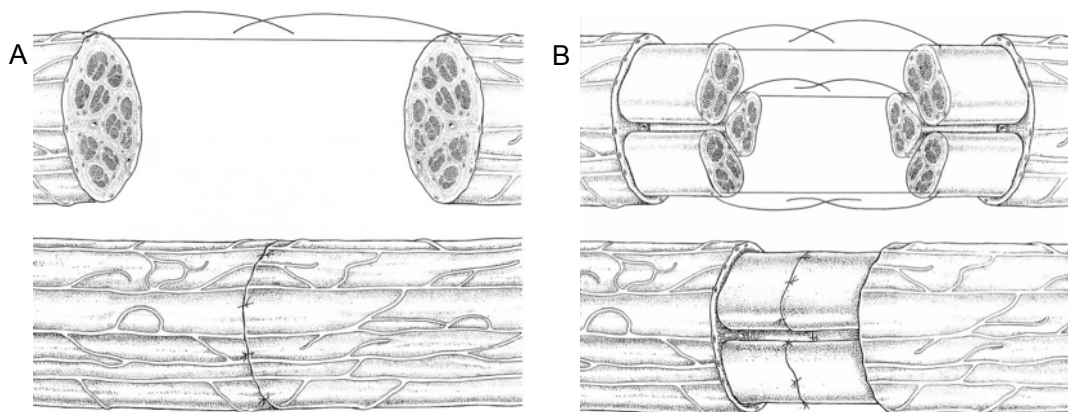
Praxis ab, erst einige Wochen bis zur Wiederherstellung der Nervenkontinuität ins Land ziehen zu lassen.

In Abhängigkeit von der Größe und Durchblutung des Defektes ergeben sich für den Operateur zwei chirurgische Optionen.<sup>183</sup> . Diese beiden werden im nächsten Abschnitt unter dem Titel direkte Koaptation (manulativer Eingriff) und Nerventransplantat (Überbrückungs-Eingriff) beschrieben.

In jedem Fall ist die Wiederherstellung der Kontinuität Voraussetzung für die Wiedereinsprossung ohne Neuombildung. Trotz dieser Erkenntnis und bestmöglichen Umsetzung in der Praxis erlangen nur etwa 50 % der Patienten mit einem hochgradigen Nerventrauma Restitution der physiologischen Funktionen<sup>115</sup>. Entscheidend für diese Größe sind multiple Faktoren wie die Kontinuität der Struktur, Durchblutung und Gewebespannung.

#### 1.5.1.1 Die direkte Koaptation

Die Technik der direkte Koaptation ist in die epineurale und die interfaszikuläre Koaptation zu unterteilen.



**Abb. 5** A: Schematische Darstellung der Epineuralen Nahtführung am peripheren Nerven; B: Schematische Darstellung der Faszikelnahrt am peripheren Nerven.

Quelle: <sup>122</sup> „Lundborg. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. The Journal of hand surgery (2000) vol. 25 (3) pp. 391-414“

Bei der epineuralen Naht wird die Kontuität des Nerven durch einfache Einzelknöpfnähte des Epineuriums hergestellt. Bei der interfaszikulären Koaptation werden die einzelnen Faszikel bzw. deren epineurale Scheiden miteinander vernäht. Mittels dieser Technik können zuvor durchtrennten gebündelten Nervenfasern wieder bestmöglich aufeinanderpassen. Befürworter dieser Technik vertreten die Ansicht, dass hierdurch den wieder aussprossenden Axonen die korrekte Orientierung zum adäquaten Endorgan erleichtert und dadurch die Heilungsprognose verbessert wird. Hierdurch soll ein bestmöglichstes Wiederherstellen der Kontinuität gewährt werden –dies wird auch „Rematching“ genannt.

Gegen den Einsatz der Faszikelnahnt gibt es allerdings auch kritische Stimmen. Bedenken werden dahingehend erhoben, dass sich der Mehraufwand nicht in den Ergebnissen widerspiegelt. Im Gegenteil ist durch die größere Intervention am Nervengewebe eine Narbenbildung und eine Störung der Mikrogefäßversorgung wahrscheinlicher <sup>108</sup>.

#### **1.5.1.2 Nerventransplantat (autogen / allogene / xenogene)**

Wenn es aufgrund von zu großer potentieller Spannung nicht möglich ist, eine direkte Koaptation zwischen proximalem und distalem Ende aufzubauen, kommt es zum Einsatz eines Transplantats oder anderer Maßnahmen, um die Lücke spannungsfrei zu schließen. Im optimalen Fall sollte das Transplantat ca. 10 % länger ist als die zu überbrückende Strecke und somit jegliche Spannung zwischen den readaptierten Nervenenden vermieden wird <sup>115, 206</sup>. Neben dem Einsatz von Nerventransplantaten ist auf den von biologischer bzw. synthetischer neuronaler Tubes ist eine weitere Optionen zur Überbrückung eines ausgedehnten nervalen Defekte zu verweisen <sup>127, 35, 123</sup>.

Bei den nervalen Transplantaten sind drei Herkunftstypen zu unterscheiden. Diese sind autogene - körpereigene - , allogene - rasseneigene - und xenogene – rassenfremde – Transplantate. Klinisch etabliert haben sich hauptsächlich die autogenen Transplantate. Die beiden anderen Typen befinden sich aufgrund der Problematik der Immunreaktion noch in der experimentiellen

Phase<sup>115 51</sup>. In dieser kommt es in der Regel zu einer vermehrten Einwanderung von T-Zellen und zytotoxischen Zellen, wodurch die Narbenbildung gefördert und damit die Reinnervation gehemmt wird<sup>78</sup>.

Den Vorteilen der allogenen und xenogenen Transplantation stehen die Nachteile des autologen Transplantats gegenüber. Das autologe Transplantat muss aus einem Spendernerv des jeweiligen Patienten gewonnen werden. Damit wird die OP verlängert, der Patient wird zusätzlich traumatisiert und büßt an anderer Stelle Funktionen ein. Ungeachtet der Transplantatgewinnung handelt es sich bei den autologen Nerven-Transplantaten um das etablierte Vorgehen bei großen Nervendefekten<sup>82 115 183</sup>.

## **1.6 Posttraumatische De- und Regeneration des PNS**

Die Beschreibung der posttraumatischen Prozesse ist in der weiteren Beschreibung in die morphologischen Veränderungen und die molekularen Prozesse unterteilt. Hier wird auf die Veränderungen bei Neurotmesis eingegangen.

### **1.6.1 Morphologische Veränderungen nach Neurotmesis**

Die Degeneration der betroffenen Nerven hat zwei Hauptmerkmale, die beide durch den Calcium-Influx aus dem extrazellulären Raum in das Axon initiiert werden<sup>68</sup>.

Zum einen kommt es zu einer Umstellung der Syntheseleistung des betroffenen Axons. Proximal brechen die umliegenden Gliazellen mit ihren Fortsätzen in die Synapse des betroffenen Neurons und führen zu einer Unterbrechung der synaptischen Fortleitung. Hierdurch wird das Neuron für die Zeit der Regeneration entkoppelt und konzentriert sich die Syntheseleistung voll auf die Regeneration. Diese zeigt sich morphologisch durch die sog. Chromatolyse – der Verlagerung des Zellkerns von der Peripherie ins Zentrum der Zelle<sup>22</sup>. Parallel kommt es zu einer sichtbaren Anhäufung von Nissl-



Granula, ein Komplex aus endoplasmatischem Retikulum und Ribosomen, als Zeichen der erhöhten Syntheseaktivität. Diese ist als Verbildlichung der Änderung der Zellkernfunktion zu verstehen. Das Ergebnis ist eine Umstellung der Zellkernfunktion von Neurotransmitter-Synthese auf Protein bzw. Lipid-Synthese zur Regeneration der ursprünglichen Zellfunktion, welche ihr Maximum nach zehn Tagen erreicht.

Das zweite charakteristische Element der morphologischen Veränderung zeigt sich durch den Prozess der Wallerschen Degeneration<sup>77</sup>. Diese betrifft das gesamte distal des Trauma gelegene Segment, als auch einen variablen Anteil des proximalen Nervenstumpfs. Zum einen zeigt sich der Zerfall der von der Zelle abgetrennten Axone und des weiteren kommt es zur Fragmentierung der Markscheide. Die groben Einzellfragmente liegen hier in Form von sog. Myelinovoiden vor, welche sich zuerst in der Mitte der Internodien zeigen. Der Abbau des weiteren Zelldebris erfolgt zuerst durch die Schwannschen Zellen, dann in zunehmendem Maße durch proliferierende Makrophagen histozytärer Herkunft. Diese bauen die phagozytierten Zellfragmente zu Neutralfetten ab und werden daher in diesem Stadium als Fettkörnchenzellen benannt<sup>191</sup>. Nach etwa sieben Tagen sind diese manifest und weitere sechs bis zehn Wochen nachweisbar. Dies geht mit der Veränderung des endoneuralen Interstitiums und der Nervenhülle einher. Das anfangs dilatierte Endoneurium schrumpft nach dem Abbau der Axon- und Markscheidenzerfallsprodukte um bis zu 50 % zusammen. Dabei bleibt die perineurale Hülle erhalten. An den Nervenstümpfen direkt an der Traumalokalisation kommt es zu einer Masse an Schwannschen Zellen, Gewebsmakrophagen, Fibroblasten und Entzündungszellen.

Bei der Wallerschen Degeneration handelt es sich um ein typisches Muster degenerativer Veränderungen, welche ein Wiedereinsprossen des geschädigten Nerven in den distalen Nervenstumpf ermöglicht. Dieses Wiedereinsprossen ist eine Grundlage für die Regeneration und damit die Wiedererlangung der Funktion des betroffenen Nerven.

Auch am Endorgan hinterlässt die Deinnervation typische Zeichen. Am Beispiel des quergestreiften Muskels kann man feststellen, dass nach nur zwei Monaten post Trauma der Diameter der Fasern um 70 % verkleinert ist und die Zellkerne aus ihrer normalen peripheren Stellung in das Zentrum der Zelle rücken. Des Weiteren fällt auf, dass es zu einer starken Vermehrung von Fibroblasten kommt, welche für einen starken Anstieg des kollagenen bindegewebigen Anteils verantwortlich sind<sup>94</sup>. Die atrophisierten Fasern werden so im Verlauf mehr und mehr von dieser immer stärker anwachsenden kollagenen Schicht getrennt. Im Falle des Untergangs der motorischen Endplatten, welcher nach circa 2 Jahren eintritt, ist der Prozeß nicht reversibel.

Der Schweregrad der zugrunde liegenden Läsion ist für die Erfolgsaussichten einer Regeneration von größter Bedeutung. Eine restitui ad integrum bei hochgradigen Verletzungen ist wenn überhaupt nur durch Intervention zu erzielen, zumal die Kontinuität und wenn nötig deren Wiederherstellung von zentralem Interesse ist. Vorausgegangen ist dabei der Prozess der Wallerschen Degeneration<sup>22</sup>, durch welchen die perineurale Hülle erhalten bleibt. Im fließenden Übergang zu den degenerativen Zeichen kommt es 4 Tage nach der Axontemessis zu einer proliferativen und mitotischen Vermehrung der Schwannschen Zellen. In Abhängigkeit von der Faserqualität zeigt sich hierbei zu einer Vermehrung der Zellen bis auf ca. das Zehnfache, wobei der Höhepunkt um den 20. Tag erreicht ist.

Die längsorientierte Zellanordnung der proliferierenden Schwannschen Zellen heißen „Hanke-Büngnerschen Bänder und spielen eine besondere Rolle bei der Regeneration. Dabei sind im speziellen die Fortsätze der Schwannschen Zellen nominklazieret, welche mit den Neuronen wieder in den Zelldebris aussprossen. Nachdem der proximale Nervenstumpf den Prozess der Demarkierung durchlaufen hat, bildet sich am proximalen Axonstumpf innerhalb weniger Tage eine morphologische Verdickung, welche als Wachstumskolben bezeichnet wird<sup>144</sup>. Dies ist gleichzusetzen mit einem Auswuchs des proximalen Axons in Richtung des distalen Nervenstumpfes

und tritt schon in den ersten 24 Stunden nach dem Traumageschehen ein. Der eigentliche Prozess der nervalen Ausprossung ist abhängig von der Struktur und Dynamik der Aktinfilamente und Mikrotuben. Wachstumskolben mit einem hohen Anteil von filamentösem Aktin (F-Aktin) produzieren kontinuierlich Zellfortsätze, welche wiederum aus Filopodia und Lammelin bestehen. Diese beiden Elemente sind das Herzstück der Ausprossung und eine „Antennenfunktion“ für die Erkennung von neurotrophen Signalen. Die Polymerisation und Akkumulation von F-Aktin ist eine der Hauptwirkungen von Neutropinen auf diesen Prozess <sup>125</sup>.

Die Geschwindigkeit der axonalen Wiedereinsprossung wird durch drei bekannte Faktoren bestimmt <sup>22</sup>:

1. Chromatolyse - die Umstellung der Syntheseleistung der Zelle
2. Aktivität der Wachstumskolben
3. Widerstand des Gewebes zwischen proximalem und distalem Nervenstumpf

Das optimale Szenario ist dabei die Wiedereinsprossung des Axons in seine ursprüngliche Markscheide. Mit 1-4 mm/Tag ist u.a. abhängig vom Abstand der Nervenstümpfe <sup>145</sup>. Allerdings gibt es verschiedene Varianten, die nicht zu diesem Status führen. Schwannzell- und Fibroblastenwucherungen sind zum Beispiel Grundlage für die Ausbildung eines Narbenneuroms <sup>145</sup>. So initiieren blind wuchernden Nervenenden die Bildung von Neuomen, in deren Vermeidung ein wichtiges Ziel der regenerativen Therapie besteht. Sie können zu Phantomschmerz der jeweiligen Nervenenden führen. Das Hoffmann-Tinel-Zeichen ist eine oft beschriebenes klinisch-/diagnostisches Zeichen.

Ist das Axon in eine originäre Myelinscheide eingesprossen, kommt es zu einem lokalen Stopp des weiteren Myelinabbaus. Nunmehr entwickelt sich eine Remyelinisierung. Ähnlich wie bei der embryonalen Ausprossung lagern sich mehr und mehr Schwannsche Zellen um das Axon an und bilden so im

Laufe der Zeit wieder eine mehrschichtige Myelinscheide. Der Durchmesser steigt dabei wieder stetig an und erlangt schließlich sein originäres Niveau. Dieser Prozess beginnt ungefähr zwei Wochen nach dem Wiedereinsprossen. Der größte morphologische Unterschied zu dem unverletzten Faszikel ist die engere Staffelung der Raviersch Schnürringe. Kommt es nicht zu einer Wiederherstellung der Verbindung zu einem passenden Organ, geht der Komplex schließlich unter und eine Regeneration ist nicht mehr möglich.

Am Endorgan kann es schließlich nach erfolgreicher Einsprossung der passenden Neurone zur Wiederherstellung der physiologischen Funktion kommen. Ein mikroskopisch zu beobachtendes Phänomen der Reinnervation des Skelettmuskels ist die Änderung des Verhältnisses von Faser I und Faser II Typen <sup>94</sup>.

### **1.6.2 Molekulare Prozesse nach Neurotmesis**

Eine besondere Rolle tragen hierbei die Schwannschen Zellen. Neben der Proliferation und der Phagozytose beginnen diese im Verlauf der Wallerschen-Degeneration Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren zu exprimieren. Außerdem bilden sie Zelladhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrices, zu der z.B. Laminin, Fibrin und Plasminogen gehören. Durch die Sekretion von Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen sorgen die Schwannsche Zellen für ein ideales neurotrophen, d.h. die Regeneration förderndes Milieu. Über die Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. „Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM), L1 und N-cadherin, die auf der Oberfläche der Schwannschen Zellen exprimiert werden, wird der Kontakt zwischen dem auswachsenden Axonkegel und den Molekülen der extrazellulären Matrix hergestellt, und die Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle werden wieder herunterreguliert. Die Remyelinisierung der Schwannschen Zellen wird durch den Kontakt mit dem Axolem initialisiert <sup>29</sup>.

In dem zeitlichen Verlauf der Remyelinisierung wird in der Literatur auf die Veränderung der Nervenfaserdurchmesser verwiesen. Zum einen fällt die

Dichte der Nerven initial nach der Durchtrennung und steigt darauffolgend in einem Zeitrahmen von ca. 6 Monaten auf höhere Werte als vor der Neurotmesis. Dies ist damit zu begründen, als dass die Qualität der Axone einen kleinen Durchmesser aufweist und somit trotz höherer Werte nicht die selbe Funktionalität aufweist. Erst nach 6 Monaten fängt die Dichte der Nerven zu Gunsten der größeren Axone zu sinken <sup>129</sup>.

Die Fähigkeit der Regeneration hängt dabei von dem Milieu neurotrophen Faktoren, eine Untergruppe von Zytokinen, ab <sup>167</sup>. Diese sind für das neuronale Überleben, Axonwachstum, für die Differenzierung und für die Neurotransmission essentiell <sup>11 125 52 18 203 225</sup>. Eine weitere Stoffklasse mit neurotrophen Effekt ist die der neuroaktiven Steroide. Zu dieser Gruppe gehören Dehydroepiandrosteron (DHEA), Progesteron und Testosteron <sup>168</sup> - soll aber im weiteren Verlauf nicht weiter besprochen werden.

Speziell soll hier auf die zwei Klassen, den Neurotrophen, und dem VEGF eingegangen werden.

Neurotrofine sind eine Familie von Stoffen denen strukturelle und funktionelle Verwandtschaft <sup>18</sup>, im PNS, aber auch im zentralen Nervensystem (ZNS) zugesprochen wird. Bei diesen handelt es sich unter anderem um: (1) „Nerve Growth Factor“ (NGF) und weitere Mitglieder dieser Familie von Stoffen - „Brain derived Neurotrophic Growth Factor“ (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3), Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) und Neurotrophin-6/7 (NT-6/7) <sup>10, 176, 66, 18</sup>; (2) „Neurokinin B neurotrophic factors“ (CNFT) und „Leukemia inhibitory factors“ (LIF); (3) „Transforming Growth Factor“ (TGF)- $\beta$ , als auch „Glia cell-line derived neurotrophic factor“ (GDNF) <sup>203</sup>

Dabei binden sie an zwei Klassen von Rezeptoren – den „tropomyosin receptor kinase“ (trk) der Tyrosin-Kinase Rezeptoren und einem Mitglied der Tumornekrose Faktoren alpha (TNF- $\alpha$ ) Rezeptor Familie, dem sog. p75 Rezeptor <sup>18</sup>. Die Signalkaskaden beider Rezeptorenarten interagieren miteinander, was für die Wirksamkeit wichtig und im zellulären Umfeld für die Po-

lymerisation und Akkumulation von F-Aktin verantwortlich ist. Alle Neurotrophine binden mit niedriger Affinität an den Neurotrophin-Rezeptor p75 (p75 NTR) und mit hoher Affinität an spezifische Tyrosinkinase Rezeptoren (Trk-R), NGF an trkA, BDNF und NT-4/5 an trkB, NT-3 an trkC <sup>18, 29</sup>.

Über diese Bindungen führen gemäß der Eigenschaft der Rezeptoren über Phosphorylierungskaskaden zu weitreichenden neurotrophen Effekten <sup>125</sup>.

- NGF: stimuliert die Nervenregeneration und ist ein axonales Führungsmolekül;
- NT-3: stimuliert die Nervenregeneration, ist ein axonales Führungsmolekül und stimuliert das Neuritenwachstum;
- NT-4/5: stimuliert die Nervenregeneration;
- BDNF: essentiell für die Nervenregeneration, erhöht den Durchmesser und die Myelindicke regenerierter Axone;
- FGF-2: stimuliert Schwannsche Zellaktivität und Neuritenwachstum.

Der Prototyp eines neurotrophen Faktors NGF wurde 1951 von Viktor Hamburger, Stan Cohen und Rita Levi-Montalcini isoliert <sup>181</sup>. Es konnte bewiesen werden, dass NGF eine neuroprotektive Wirkung hat. <sup>125 18 136</sup>. Somit ist die Erforschung dieser neurotrophen Mediatoren-Familie im Verhältniss zu der Erforschung des Neurotrophen Wirkung des VEGF relativ alt.

Dabei wurde die neurotrophe Wirkung von VEGF erst 1998 durch die Arbeitsgruppe um Soker et al. festgestellt <sup>186</sup>. Wie der Name beschreibt, war die Wirkung von VEGF primär auf die Angiogenese erforscht wurde.

### **Historie:**

Die Entwicklung der Erkenntnisse über die Angiogenese-Faktoren wird nachfolgend in einer Zusammenfassung anhand von Jahresgeschehnissen dargestellt:

**1927:** W. Lewis stellt fest, dass der Prozess der Vaskularisierung des Zellumfelds von Tumor zu Tumor unterschiedlich ist. Somit ist auf eine Beeinflussung des Vaskularisierungsprozesses durch diesen zu schließen <sup>150</sup>.

**1939:** Gordon Ide et. al. verbildlichen mit Hilfe einer Technik von J. Sandison die Neangiogenese im Kaninchenohr. Sie postulieren erstmals, dass diesem Prozess ein Wachstumsfaktor zu Grunde liegen muss <sup>54</sup>

**1948:** Isacc Michaelson vermutet einen direkten Zusammenhang zwischen einem Wachstums Faktor, den er "Faktor X" nennt, und Krankheiten beim Menschen. Sein Augenmerk fällt auf die Retinopathie als Ausdruck einer pathologischen Überexpression des „Faktor X" <sup>54</sup>.

**1968:** Die ersten physikalischen Eigenschaften des „Faktor X“, wie z.B. die Löslichkeit, werden bestimmt <sup>75 46</sup>.

**1971:** Folkmann schlägt die Hemmung der Angiogenese als Ansatz zur Heilung von Tumoren vor. Er beginnt den „Tumor Angiogenese Faktor“ zu isolieren <sup>59 63</sup>.

**1985:** Zwei potente Angiogenese Faktoren "Acid and basic Fibroblast Growth Factor"- werden durch K. Thomas und F. Esch isoliert <sup>204 48</sup>.

**1989:** N. Ferrara isolieren, sequenzieren und klonen den VEGF <sup>116 106</sup>.

**1991:** Das erste VEGF-assoziierte Gen wird identifiziert <sup>131</sup>.

**1992:** E.Keshet und K. Plate stellen eine verstärkte Expression von VEGF in der Hypoxie fest. Des Weiteren werden die ersten Rezeptoren identifiziert <sup>182 160</sup>

**1993:** J.Kim und N. Ferrara belegen mittels Suppression des VEGF durch monoklonale Antikörper im Tumor die Abhängigkeit von Tumorwachstum und Angiogenese <sup>107</sup>.

**1995:** G.-H. Fong entwickelt ein Knockout-(FLT1)-Modell an der Maus, durch welches die grundlegende Bedeutung der Angiogenese-Rezeptoren für die Entwicklung des Vaskulären Systems nachgewiesen wird <sup>64 178</sup>.

**1996:** Erste Untergruppen von VEGF A, B,C, D, werden isoliert <sup>26 151 103 114</sup>.

**1998:** Durch Soker et. al. wird erstmals ein Zusammenhang zwischen Angiogenese und Neurogenese aufgestellt. Dabei werden Gemeinsamkeiten der Axon-Guidance und Angiogenese festgestellt <sup>186</sup>.

**2001:** Der erste organspezifische VEGF wird identifiziert <sup>112</sup>.

#### **1.6.2.1 VEGF als neurotropher Faktor**

Diese Entwicklungsgeschichte macht deutlich, wie komplex die Wirkungsweise des VEGFs ist. So zeigt sich nicht nur, dass der Stoff über verschiedene Wirkungsweisen verfügt <sup>54</sup>. Vielmehr scheint es auch unterschiedlich spezifische Stoffe mit einer Varianz an Effektivität zu geben <sup>112</sup>.

Die bekannten physiologischen Wirkungen können nach folgendem Muster unterschieden werden: (1) Mitogenese, Endotheliale Regeneration, Angiogenese <sup>55 69</sup>; (2) Förderung der Gefäßpermeabilität und hämodynamische, gefäß-dilatierende Effekte <sup>44 220</sup>; (3) Chemotaktische Wirkung in der Peripherie und Koloniebildung im Knochenmark <sup>32 21</sup>.

Im Zusammenspiel mit dem Fibroblast Growth Factor (FGF) <sup>2</sup>, der Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) <sup>147 172</sup>, der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) <sup>24 96</sup> und das Angiopoetin (Ang) <sup>97 219</sup> trägt VEGF eine entscheidende Rolle in der embryogenen und inflammatorischen Angiogenese <sup>224</sup>.

Die VEGF-Familie hat fünf beschriebene Mitglieder: VEGF- A, -B, -C, -D, und PlGF. Das am besten bekannte Mitglied ist VEGF-A, dessen Form sich aus zwei identischen 23 kiloDalton (kDa) großen Untereinheiten aus Glykoproteine zusammensetzt <sup>58</sup>. Dieses besteht aus acht Exons und sieben Introns <sup>56</sup>. Durch alternatives Splicing entstehen die diversen Isoformen der Molekülgruppe <sup>8 112</sup>. Die angefügte Ziffer zeigt dabei die Zahl der Basenpaare an,

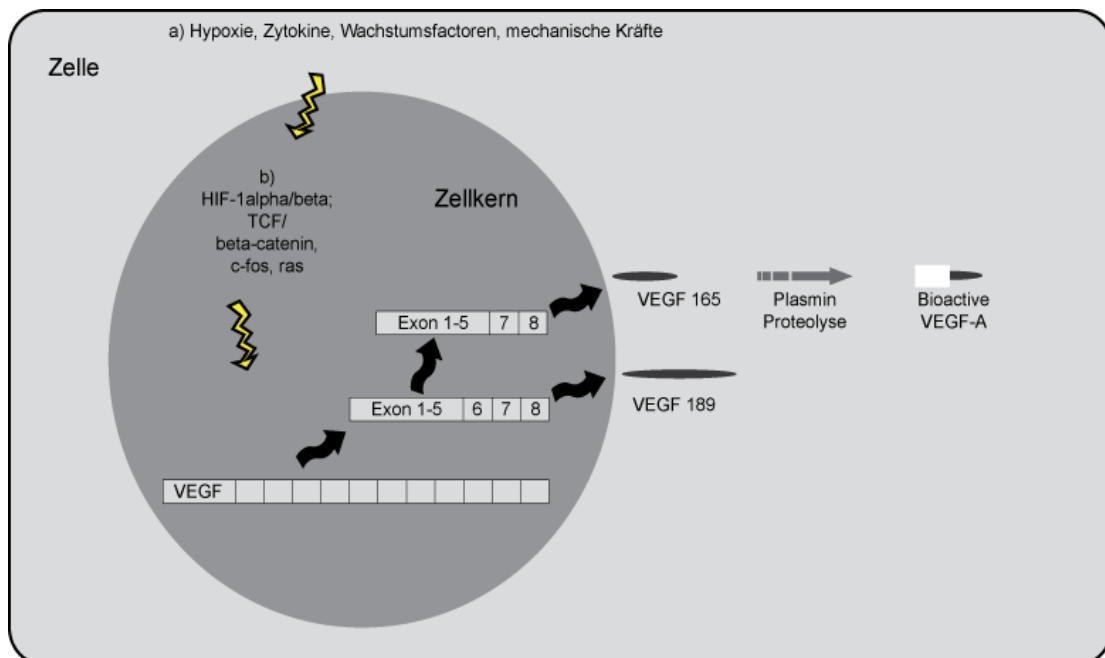


welche nach dem alternativen Splicing-Prozess durch die Transduktion der Ribonucleic Acid (RNA)-frequenz im Endprodukt des Protein exprimiert werden. Im Falle von ruppVEGF<sub>165</sub> handelt es sich um die häufigste Isoform. Andere sind VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub>.

Die „längeren“ von VEGF<sub>189</sub>, und VEGF<sub>206</sub> binden an Heparin- und Heparin-ähnliche Oberflächen der extrazellulären Matrix (ECM). VEGF<sub>121</sub> dagegen hat im Prozess des alternativen Splicings die Exons sechs und sieben verloren, wodurch diese Funktion nicht existiert. VEGF<sub>165</sub> fehlt das Exon sechs, wodurch beide Eigenschaften erhalten sind. Es bindet zum einen an ECM, kommt des Weiteren aber auch in löslicher Form vor.

Neben den unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten und Eigenschaften der Moleküle selbst gibt es noch zusätzlich unterschiedliche Rezeptor-Affinitäten.

VEGF<sub>165</sub> bindet mittels der durch Exon sieben codierten Sequenz an den Tyrosin-Kinase-Rezeptor VEGFR1/Flt1 und VEGFR2/KDR/Flk1. Ferner wurde eine zusätzliche Affinität zu dem Neuropilin-Rezeptor (NRP-1 und NRP-2)



**Abb. 6** Rekombination des viralen Gens; Zusammenfassende, vereinfachte bildliche Darstellung der initiiierenden Faktoren der VEGF-Synthese bzw. dem darauf folgenden Splicing zur Synthese der unterschiedlichen VEGF-Subtypen.

festgestellt, was die neurotrophe Wirkung von VEGF<sub>165</sub> erklärt <sup>186</sup>.

Die Expression, Verfügbarkeit und Aktivität von VEGF-A wird durch diverse physiologischen als auch pathologischen Faktoren moduliert. Hypoxie, Entzündungsmediatoren, Transskriptions-Faktoren, Einwirkungen durch Stress oder auch rein physische Kraft sowie die Dysregulation durch Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene sind Auslöser der Synthese. Auf diese hier im Detail einzugehen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Deshalb konzentrieren wir uns auf die neu gewonnenen Erkenntnisse des Einflusses von VEGF-A auf neuronale Zellprozesse. Dabei eröffneten sich mit der Entdeckung der neurotrophischen Wirkung 1998 völlig neue Fragestellungen und Perspektiven des Wachstumsfaktors, welcher bis zu diesem Zeitpunkt für seine gefäßbezogene Wirkung bekannt war <sup>186</sup>. VEGF<sub>165</sub> bindet mittels der durch Exon sieben codierten Sequenz an den Rezeptor VEGFR1/Flt1 und VEGFR2 /KDR/ Flk1.

Ferner wurde eine zusätzliche Affinität zu dem Neuropilin-Rezeptor (NRP-1 und NRP-2) festgestellt, was die neurotrophe Wirkung von VEGF<sub>165</sub> erklärt <sup>186</sup>. Diese Neurolipin-Rezeptoren finden sich auf den Wachstumskolben der aussprossenden Axone nach einem Nerven trauma, als auch auf Neuriden im embryonalen Auswuchs der peripheren Nerven <sup>186, 198</sup>. Darüber hinausgehend haben sie einen Effekt auf die Sekretion der chemorepulsiven Stoffe, die bei dem Sprossungsprozess der Wachstumskolben eine wichtige Mediatorenrolle besitzen. Wie oben beschrieben, sind Schwannsche Zellen für das Medium entscheidend.

Trotz der neueren Erkenntnis, dass VEGF sich direkt auch auf die Nervenregeneration auswirkt, muss auch der indirekte Effekt berücksichtigt werden. Diese angiogenetische Wirkung von VEGF hat eine entscheidende Rolle beim Wiederaufbau der neuen nervalen Strukturen, zumal die verbesserte Perfusion eine angepasste Versorgung ermöglicht <sup>134 55</sup>.

	<u>Isoformen</u>	<u>Rezeptor</u>	<u>Löslichkeit</u>	<u>Produzierendes Gewebe</u>	<u>Pharmakodynamik</u>
VEGF-A	121; 165; 189; 206	VEGFR-1;-2 VEGF <sub>165</sub> bindet an Neuropilin- 1 und 2 ;VEGF <sub>145</sub> an Neuropilin 2	VEGF <sub>121</sub> ist löslich; um so länger das Molekül, desto stärker greifen Sie an Heparan-Sufat	So gut wie ubiquität; besonders in fenestrierten Endothelien	Vaskulogenese; Angiogenese; Vaskuläre hoeostatis, Gefäßpermeabilität; Recruitment von Knochenmarkszellen
VEGF-B	167, 186	VEGFR-1 und Neuropilin-1	186 ist löslich, 167 bindet an Herperansulfat	Herz; Skelettmuskel; Gefäßmuskelzellen	Angiogenese; Recruitment von Knochenmarkszellen
VEGF-C	Unveränderte und Veränderte Form	VEGFR-2;-3; Neuropilin-2; Veränderte Form verstärkt Rezeptorenbildung	Löslich	Neuroendokrine Organe; Lunge; Herz; Gefäßmuskelzellen	Lymphangiogenese; Angiogenese
VEGF-D	Unveränderte und Veränderte Form	VEGFR-2;-3; Veränderte Form verstärkt Rezeptorenbildung	Löslich	Neuroendokrine Organe; Lunge; Herz; Magen-Darm-Trakt; Skelettmuskel; Gefäßmuskelzellen	Angiogenese
VEGF-E	-	VEGFR-2; Neuropilin-1	Löslich	Viruszellen	Angiogenese
VEGF-F		VEGFR-2	Bindet an Herperansulfat	Schlangengift	Angiogenese und Gefäßpermeabilität
<b>Tbl. 3</b> VEGF -Hauptgruppen und die Eigenschaften					

Bei einer Neurotmesis werden die Gefäße des betroffenen Abschnitts unterbrochen und die ausreichende Versorgung ist nicht mehr gewährleistet. Nachdem VEGF schon lange als Angiogenesefaktor bekannt ist, wurden Versuche unternommen, welche die Effekte von VEGF auf die Vaskulisierung des peripheren Nerven nach Neurotmesis untersuchten. Die Ergebnisse belegten, dass VEGF einen stark positiven Effekt auf die Neovaskularisierung

der Nervenläsion hat. Gleichzeitig zeigt sich eine Korrelation zwischen dieser Neovaskularisation und einer verstärkten Reinnervation am Nerven<sup>84</sup>. Dabei zeigte sich, dass die Stimulierung der Angiogenese und die der Neurogenese in Abhängigkeit zueinander stehen<sup>134</sup>.

## **1.7 Mögliche Schwerpunkte der molekularen Therapie der PNS-Traumata**

Komplementär zu der chirurgischen Therapie der Neurotmesis wurden in der Vergangenheit neurotrophe Faktoren hinsichtlich der regenerativen Wirksamkeit auf experimenteller Basis erprobt. Ansatzpunkte dieser neuen Strategien basieren auf zwei Hauptgruppen der im Kapitel „Molekulare Prozesse nach Neurotmesis“ beschriebene neurotrophen Faktoren, den Neurotrophinen und VEGF<sup>152 203 76 168 6 193 224</sup>. In zu dieser Arbeit ähnlichen operativen Modellen wird dabei die Applikation von NGF<sup>176</sup>, BDNF<sup>88 207</sup>, CNTF<sup>117</sup> erläutert.

Insbesondere wurde VEGF auf Grund seiner weitreichenden Wirkungsmechanismen in diversen anderen Indikationen eingesetzt. Die angiotrophe Wirkung steht im Vordergrund. Zu diesen gehören: periphere arterielle Verschluss Krankheit<sup>199</sup>; periphere, vaskuläre Polyneuropathie<sup>175</sup>; koronare Herzkrankheit<sup>120</sup>; Haut-Lappenplastik<sup>86</sup>; VEGF als Protektor der Leber<sup>113</sup>; Knochenbrüche<sup>25</sup>. Wie aus der Historie der VEGF-Forschung zu erkennen ist, spielte der Einsatz von VEGF in der Angiogeneseforschung die Initiatorenrolle. Auf der anderen Seite des therapeutischen Spektrum steht die Inhibition überschießender VEGF-Synthese<sup>62</sup> z.B. in der Tumorthherapie<sup>59 61</sup> und der vaskulären Retinopathien<sup>5</sup>. Nicht nur auf experimenteller Basis<sup>59 63</sup> hat dies zur Entwicklung von Angiogenese Blockern geführt, sondern hat in der Behandlung der diabetischen Retinopathie<sup>83</sup> auch eine konkrete klinische Applikation.

Die Neurotrophine wurden in der Vergangenheit in weiteren Indikationen erforscht. Auf Grund der ubiquitären neurotrophischen Wirkung<sup>66 125</sup> zeigt sich ein

Therapiespektrum, welches sich auf die Genese diverser neuro-pathologischer und regenerativer Indikationen bezieht. So wurde NGF in der Therapie von Alzheimer, Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose äußerst umfangreich getestet<sup>152 4 3 157</sup>. CNTF im Jahre 1997 Fälle von Anorexie beschrieben bzw. der erhebliche Gewichtsverlust<sup>157</sup>.

## **1.8 Applikationsmethoden der molekularen Therapieformen**

Im Prinzip lassen sich zwei Hauptgruppen der Applikation unterscheiden<sup>111</sup>:

1. Protein-Therapie
2. Gentransfer

Bei der direkten Applikation des Proteins, der sog. „Protein-Therapie“, ist von großem Vorteil, dass pharmakologische Eigenschaften des Stoffes, die Pharmakodynamik und -kinetik, meist gut bekannt sind. Auch hat der Anwender die Kontrolle über die applizierte Menge und die Gewissheit, dass Langzeiteffekte mit großer Wahrscheinlichkeit nicht eintreten werden, zumal die Moleküle meist nur kurze Halbwertszeiten aufweisen. Zum Nachteil gehört, dass, die Kosten für rekombinante Moleküle oft sehr hoch sind. Auch ist die Halbwertszeit der Stoffe sehr gering, was eine schnelle Abnahme der Konzentration am Wirkungsort mit sich bringt. Eine Verzerrung der Ergebnisse ist dadurch Möglich<sup>111</sup>. Des Weiteren macht die direkte Applikation von einigen Proteinen, wie HIF-1 $\alpha$  und PR39, auf Grund von Ladung und Größe nicht direkt appliziert werden<sup>95 118</sup>.

Der Begriff des „Gentransfers“ ist identisch mit dem der „Gentherapie“. Ziel des Gentransfers ist es, ein funktionelles Gen in die Desoxyribonuclein Säure (DNA) der Zielzelle einzuschleusen und somit entweder eine Fehlfunktion auszubessern oder eine Zusatzfunktion herzustellen. Eine funktionierende Genexpression in der Zielzelle ist vorauszusetzen. Die Applikation der DNA kann wiederherum mit diversen sog. Vektoren geschehen.

Versuche haben bewiesen, dass die Applikation von nackter DNA nur zu einem sehr geringen Teil in die Zelle gelangt und dort kaum merklich zu einer Synthese des kodierten Teilstückes führt<sup>158 171</sup>. Daher ist es sinnvoll, einen sog. nicht-viralen Carrier bzw. einen viralen Vektor für die Steigerung der Transfektionseffektivität zu benutzen. Die erfolgreiche Transduktion ist Ziel und gleichzeitig die größte Herausforderung<sup>209</sup>. Anpassung des Vektoren auf die jeweilige Zielzelle, Genstabilität, sowie auf die wirtschaftlichen Faktoren der Vektoren-produktion sind unter anderem kritische Themen auf diesem Gebiet.

### **1.8.1 Nicht-virale Vektoren**

Die nicht-viralen Vektoren in drei Hauptklassen zu unterteilen: (i) chemische, (ii) bio-chemische und (iii) physikalische Vektoren.

Nackte Plasmide oder liposomale DNA-Komplexe sind die am meisten benutzten Moleküle für diesen Zweck<sup>126, 148</sup>.

Im ersteren Fall der applizierten Plasmiden gelangt nur ein kleiner Teil in den Zellkern. Hier verharrt er in einer episomalen Stellung (er ist nicht in das Genom der Zielzelle integriert), was zu einer zeitlich limitierten Expressierung in sowohl proliferierenden als auch nicht-proliferierenden Zellen führt. Mit Bezug auf die Expressionsdauer der jeweiligen Plasmide wurde einen Zeitspanne von drei bis vier Wochen beschrieben. Realistisch sind jedoch wesentlich kürzere Zeiträume. Obwohl weitere Vorteile wie die Produktion und die Hochskalierbarkeit für diese Vektoren sprechen, ist die limitierte Transfektion von sehr einschränkendem Gewicht. So kommen die nicht-viralen Vektoren kaum als Applikationsmethode für die Gentherapie in Frage, sondern sind vielmehr bei der Induktion von Immunreaktionen, z.B. bei DNA-Impfungen, von Interesse.

Ein neueres, physikalisches Verfahren ist die sogenannte Magnetofektion. Das Prinzip dieser Methode basiert auf Assoziation eines nicht-viralen Gen-

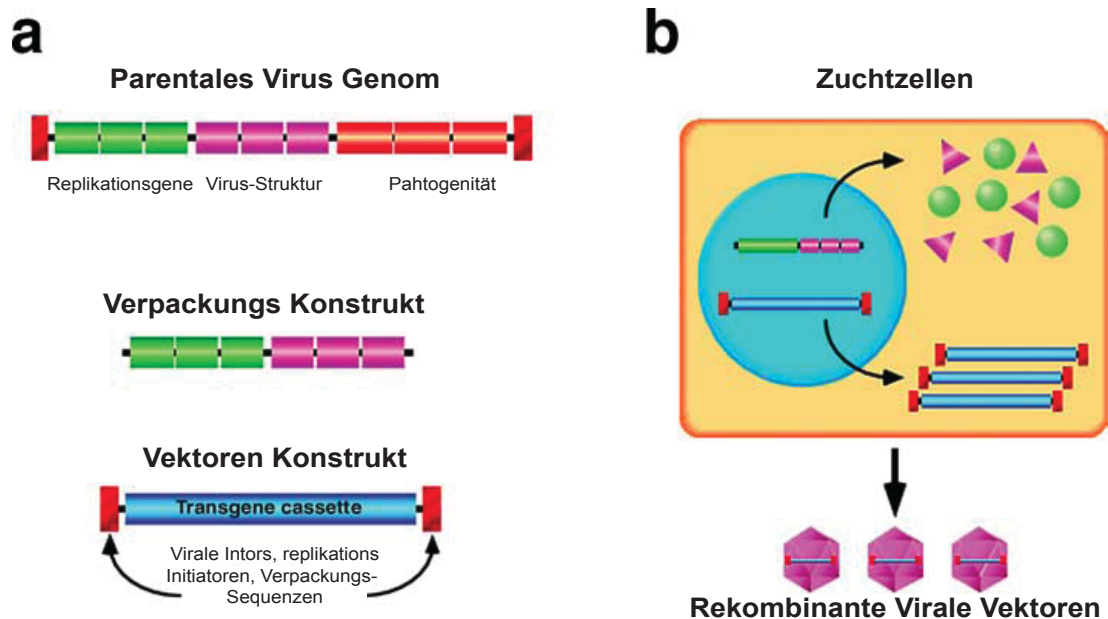
vektors mit paramagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln, z.B. durch eine Hülle aus Polyethylenimin <sup>159</sup>. Mittels regulierbaren Eisen-Bor-Neodym-Permanentmagneten kann im Zielgebiet eine hohe Genexpression durch suggestives Auflösen der magneto-sensiblen Nanopartikel erreicht werden <sup>92</sup>. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden erfolgreiche Versuche an der Hautlappenplastik der Ratte durchgeführt, bei denen VEGF<sub>165</sub>- mittels sogenannten „Magnetobubbles“ lokal appliziert wurde <sup>87</sup>.

### **1.8.2 Virale Gentherapie**

Seit ca. 20 Jahren existiert der Ansatz der Gentherapie in der Medizin. Nach der anfänglichen Euphorie und gewissen Erfolgen musste die Forschung allerdings viele Rückschläge verkraften, und so ist sie immer noch nicht im klinischen Alltag angekommen.

Ein Virus verfügt grundsätzlich über die Eigenschaft, seine eigene Erbinformation mit Hilfe der Zielzelle zu exprimieren und somit einen Syntheseweg für seine spezifischen Proteine zu finden. So ist das in dieser Therapieform angewandte Virus normalerweise nicht darauf angelegt, die Host-Zellen zur Vermehrung der viralen Erbmasse zu benutzen. Diese Abänderung der Genexpression führt zu einem Untergang der Wirt-Zelle. Es wird vielmehr eine Art Symbiose angestrebt, in welcher mittels der maupilierten viralen Erbinformation eine Gensequenz in der Hostzelle transduziert wird. Trotz Vorsichtsmaßnahmen kann es zu pathologischen Effekten kommen, die auf einer erfolgreichen Infektion mit einem Virus basieren.

Um diese Viren, die normalerweise die Rolle von Pathogenen besitzen, zu nützlichen Transportmedien „umzubauen“, ist es erforderlich, die eigentlichen pathogenen Gensequenzen des Virus von jenen zu trennen, welche die Replikation und produktive Prozesse kodieren. Dafür müssen die jeweiligen Sequenzen identifiziert werden.



**Abb.7** Herstellung viraler Vektoren; a) Umwandlung eines Virus in einen rekombinanten Vektor. Dabei wird schematisch ein virales Genom gezeigt, welches als solches für den menschlichen Körper pathologisch ist. Geflankt wird dieses durch Cis-Sequenzen, welche für die Replikation und Kapselung kodieren. Das „Verpackungs-Konstrukt“ beinhaltet diese Gene, die für die Replikation und Struktur gene kodieren. Schließlich wird es im „Vektoren Konstrukt“ eingefügt, welches zusätzliche regulatorische Sequenzen beinhaltet. b) Durch den Prozess der Transfektion, Infektion durch einen Hilfsvirus oder stabilen Zelllinien gelangen die „Verpackungs-“ und „VeConstructs“ in die Hostzelle. Die Proteine für die Replikation und Viruszusammensetzung sind durch den „packaging construct“ exprimiert. Schließlich wird das Vektoren-genom in eine Hülle der Virusbestandteile eingehüllt, und der rekombinante Virale Vektor entsteht.

Quelle: GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine; Inder M. Verma and Matthew D. Weitzman; Laboratory of Genetics, The Salk Institute, La Jolla, USA

Im nächsten Schritt werden zu vernachlässigende Basen ausgeschnitten und schließlich das Transgen, welches sich aus der zu exprimierenden Sequenz und den regulatorischen Elementen zusammensetzt, mit dem rekombinanten Virusgenom für die Transduktion und Replikation fusioniert. Dabei gilt der Grundsatz, dass je mehr Gensequenzen entfernt werden, desto weniger Replikationsdefekte entstehen und um so geringer das Risiko ist, dass es sich bei dem rekombinanten Virusvektor um einen infektiösen Virus handelt <sup>110</sup>. Es zeigen sich insbesondere vier Problemzonen <sup>124 209</sup>: Ineffizienter Gen-



transfer; Spezifität der Gentransduktion; Dauer der Genexpression; Sicherheit. Jeder Vektorentyp hat gewisse Grundeigenschaften, welche auch bei der Auswahl der therapeutisch angewandten Vektoren von Bedeutung ist (siehe Tab. 5, S.36)

Vector	Potentielle Genomgröße [kilo Base= kb] 5	Zielzellen	Klinische Versuche	Eigenschaften
Adenovirus assoziierte Viren	Gering <4 kb	Diverse; teilende und sich nicht teilende Zellen	+	Langsamer Beginn der Transduktion; Integration ins Genom; ineffiziente Produktion der Viren; kostspielig
Adenovirus	Mittel <7,5 kb	Diverse; langsame Transduktion in Neuronen	+	Kurzlebige Expression; starke Immunantwort
Herpes Simplex Virus (HSV)	Hoch >30kb	Diverse; Neuronen; Stammzellen; Muskelzellen	-	Latente Entzündungsreaktion; langlebige Expression; geringe Toxizität
Alphavirus	Mittel <7,5kb	Diverse; Neurons, Gliazellen	+	Kurzlebige, aber sehr intensive Expression, geringe Immunogenizität
Lentivirus	Mittel 8kb	Diverse; teilende und sich nicht teilende Zellen	-	Integration ins Genom der Zielzelle; langlebige Expression; Sicherheitsbedenken;
Retrovirus	Mittel 8kb	Nur auf teilende Zellen	+	Integration ins Genom der Zielzelle; langlebige Expression

**Tbl. 4** Virale Vektoren

Quelle: <sup>124</sup> Latest development in viral vectors for gene therapy. Trends in biotechnology (2003) vol. 21 (3) pp. 117-22

### 1.8.2.1 RNA Viren als Vektoren

**Retrovirus:** Die Pionierarbeit der Gentherapie wurde mit Hilfe von Murine Leukemia Virus (MLV), einem Retrovirus, durchgeführt. Das Virus ist in der Lage, über einen spezifischen Rezeptor sein Capsid in die Zielzelle einzuschleusen und über die namensgebende reverse Transkriptase das Transgen in das Genom der Zielzellen einzubauen, wobei die Lokalisation dieser

Transgen-Sequenz variieren kann <sup>155 141</sup>. Durch diesen Einbau kommt es zu einer suffizienten, langzeitlichen Expression der Genfrequenz. Allerdings ist es dem Virus nur möglich, sich in solche Zellen einzubauen, welche sich teilen, was wiederum das Anwendungsspektrum relativ stark eindämmt. Um den Zielzellen basierten Tropismus zu umgehen, wurden Retroviren mit Hüllproteinen anderer Viren, wie dem G-Glycoprotein des „Vesicular Stomatitis Virus (VSV)“, pseudotypisiert. Dies hatte zur Folge, dass die Stabilität des G-pseudotypisierten VSV deutlich erhöht wurde und in höheren Titern appliziert werden konnte. Auch wurden das Zielzellenspektrum deutlich erweitert <sup>23</sup>, das Capsid verändert und die Eigenschaften stark verbessert. Es wurden Vektoren entwickelt, die eine selbst in-/aktivierende Funktion haben <sup>91</sup>. Im Rahmen dieser Erfolge waren es ebenfalls retrovirale Vektoren, die in der ersten klinischen Studie am Menschen mit „Adenonsin-desaminase Deficeny“ getestet wurden <sup>15</sup>. Hier und in weiteren Studien wurden positive Ergebnisse erzielt <sup>17 27</sup>.

#### 1.8.2.2 DNA-Viren als Vektoren

Im Unterschied zu den retroviralen Vektoren beinhalten Viren einzel- oder doppelsträngige DNA als virales Genom. Die wichtigsten DNA-Vektoren sind das Adeno-assoziierte Virus, der Adenovirus (AdV) und der Herpes Simplex Virus (HSV). Andere, nicht so häufig eingesetzte DNA-Vektoren sind Epstein-Barr-Virus (EBV), Parvovirus (PV) und Vaccinia Virus (VV).

Die größten Vorteile dieser Vektoren liegen in der „Packaging“-Kapazität, der breiten Anwendbarkeit bezüglich der Zielzellen und der effizienten viralen Infektion mit darauf folgender Transduktion.

**Herpes-Simplex-Virus:** Der Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1) ist der am meisten beforschte HSV und soll daher hier beispielhaft aufgeführt werden. Es ist ein ca. 20 nm (Diameter) großes Virus, welches sich aus vier Kompartimenten zusammensetzt: Hülle, Bedeckung, Kapsid, virales Genom.

Neurotropismus, eine lang andauernde Genexpression ohne Integration des viralen Genoms, in das Genom der Zielzelle, als auch ein sehr großes Genom sind die herausstehenden Eigenschaften des HSV. Des Weiteren besitzt der HSV-1 eine hohe Infektiosität, was zu einer effizienten Transduktion führt und gleichzeitig ein breites Spektrum von Zielzellen eröffnet. Einschränkungen für den Gebrauch dieses Vektors resultieren aus der fehlenden Erfahrung bezüglich rekombinanter HSVs am Patienten, der latenten langzeitlichen Expression in spezifischen Geweben und der Zielsteuerung der Vektoren.

**Adeno-assoziierte Viren:** Bei den rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (AAVs) handelt es sich um nicht pathogene humane Parvoviren, welche mit einer einsträngigen DNA als Genom ausgestattet sind. Ein großer Vorteil von AAV ist, dass er auch an Zellen angewandt werden kann, die sich in einer Stresssituation wie Strahlung und andere genotoxische Faktoren befinden. Auch können AAV in sich nicht-teilende Zellen eingelagert werden, wodurch sie in eine Unabhängigkeit von dem Mitosezyklus der Zelle versetzt werden. Allerdings ist die Produktion sehr aufwendig und somit erheblich teurer als die Produktion anderer Vektoren. Des Weiteren steht nur eine begrenzte Transkriptionskassette zur Verfügung <sup>209</sup>.

**Adenoviren:** Adenoviren (ADV) sind nicht umhüllte, doppelsträngige, ca. 70 - 90 nm große DNA-Viren, welche seit dem Jahr 1953 bekannt sind <sup>47</sup>. In einer ikosaederförmigen Gestalt umgibt das Kapsid den Kern des Virus, welcher das Genom beinhaltet. Die humane ADV besteht aus mehr als 50 verschiedenen Serotypen, welche sämtlich ein breites Spektrum an Zielzellen indizieren und replizieren können <sup>13</sup>. Auch wenn frühe Versionen der ADV starke Nebenwirkungen aufwiesen, sind die heutigen Generationen von Vektoren wesentlich stabiler <sup>174</sup>.

ADV- Vektoren sind in der Lage, einen besonders effizienten Gentransfer mit anschließenden hohen Titern zu generieren. Des Weiteren zeichnet sich der

Vektor durch eine hohe in-vivo Stabilität mit transienter Genexpression aus

124

	Retroviral				Adeno-viral	HSV-1
	AAV	Onco	Lenti	Foamy		
Virales Genom	ssDNA	RNA	RNA	RNA dsDNA	dsDNA	dsDNA
Integration in Zielzellen DNA	Y/N <sup>b</sup>	Y	Y	Y	N	N
Nicht-teilende Zellen	Y	N	Y	YL	Y	Y
Dauer der Expression	L	L	L	NL	S	S
Induktion der T-Zell Antwort	N	N	N	N	Y	Y
Preexistente Immunität	Y	N	N <sup>c</sup>	N	Y	Y
Sicherheitsbedenken	Insertionelle Mutagenese	Insertionelle Mutagenese	Entzündungsreaktion, Zytotoxizität	Entzündungsreaktion, Zytotoxizität	Entzündungsreaktion, Zytotoxizität	Entzündungsreaktion, Zytotoxizität
a. Integration ist im Falle der Abwesenheit von rep. Protein ineffizient b. Ausgenommen HIV-Patienten Y: yes; N: no; L: long; S: short.						

**Tab. 5** Spezifische Eigenschaften der Vektoren;  
 Quelle: <sup>110</sup>. Gene therapy with viral vectors. Annual  
 review of pharmacology and toxicology (2003) vol. 43 pp. 413-39

In der Gentherapie besitzt hat der Typ 5 die größte Relevanz <sup>110</sup>. Die doppelstängige DNA-Struktur hat eine Größe von 36 kb, wobei durch intensives Splicing über 50 verschiedene Proteine entstehen. Elf davon sind Struktur-Proteine des Virus. Ein Lebenszyklus des Virus wird durch eine Früh-, Mittel- und Spätphase eingeteilt, wobei das mittlere Zeitfenster die Replikationsphase widerspiegelt. Jedes Stadium ist indes mit spezifischen Proteinen assoziiert, die wiederum u.a. für die Regulation der Zellfunktionen verantwortlich sind.

Es wird hierbei in „frühe“, „spätere“ und „späte Genexpression“ unterschieden (early, delayed and late expression). E1A als immediate early gene, stimuliert die Expression der weiteren Gensequenzen, den delayed early gene - E1B, E2A, E2B, E3 sowie E4 kommen – denen auch wichtige regulatorische Funktionen zukommen. So bildet das von E1B kodierte Protein, 19KE1B, mit E1A einen Komplex und unterbricht hierdurch die Expressionskaskade, die sonst weiterlaufen würde<sup>9 146</sup>. Auch schützt es die virale DNA vor dem Abbau. Die Region von E2 kodiert Replikationsproteine, welche nach ca. sechs bis acht Stunden seit Infektion durch das Virus exprimiert und schließlich zwischen der 18. und 20. Stunde ihren Expressionshöhepunkt erreichen<sup>146</sup>. E3 codiert für ein Protein, Gp19KE3, welches Teil der Immunabwehr des Virus ist. So verhindert es die Lyse der infizierten Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten. Hierbei bindet es im endoplasmatischen Retikulum mit HLA-Klasse-I zu einem Histokompatibilitäts-Protein-Komplex. Zusätzlich wird die E1A-vermittelte erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Tumornekrosefaktoren und aktivierten Makrophagen durch E3-Proteine wieder gesenkt<sup>215</sup>. Eine effiziente und starke Induktion der Expression wird durch die Einbettung eines vom Cytomegalie-Virus (CMV) stämmigen Promotor-Region gefördert<sup>190</sup>.

## **1.9 Gentherapie in klinischen Studien**

Im Jahr 1989 berichteten Rosenberg und seine Kollegen über die erste Gentherapie am Menschen<sup>169</sup>. Seit diesem Zeitpunkt wurden bis zur Jahresmitte 2007 über 1.340 klinische Studien zugelassen, bzw. durchgeführt.

- 1989:** Erstmals erfolgt eine retrovirale Gentransduktion für eine Resistenz gegen Neomycin in Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL)- metastasiertes Melanom<sup>169</sup>.
- 1999:** Die 18 jährige Patientin stirbt an einer extrem überschießenden Entzündungsreaktion nach adenovirale Ornithin-

Transcarbamylase-Defizienz Therapie <sup>163</sup>. Dies führt zu einer lähmenden Wirkung auf die Aktivitäten aller Forschungsteams in diesem Bereich <sup>33</sup>.

- 2000:** Mit der Therapie der sog. „x-linked severe combined immune deficiency“ (SCID-X) gelingt ein großer Erfolg <sup>27</sup>.
- 2002:** Im Rahmen der gleichen SCID-X Studie entwickeln zwei der zehn behandelten Kinder eine leukämieähnliche Pathologie <sup>80</sup>, die jedoch mit einer angepassten Chemotherapie in Remission gebracht wird <sup>80</sup>. Aufgrund dessen werden ähnliche Versuche in den USA und Frankreich gestoppt. In Großbritannien und Australien werden diese Versuche jedoch weitergeführt und zeigen letztendlich trotz dieses Zwischenfalls positive Resultate in der Behandlung der SCID-X <sup>67 71</sup>.
- 2006:** Im Rahmen einer klinischen Studie Phase I/II werden an „x-linked chronic granulomatous disease“ (X-CGD) erkrankte Patienten mit retroviral vorbehandelten CD-34 positiven Zellen des peripheren Blutes behandelt <sup>154 1</sup>.
- 2006:** Es wird eine erfolgreiche Immuntherapie von zwei Patienten mit metastasiertem Melanom beschrieben <sup>140</sup>.
- 2006:** In zwei unabhängigen Studien wird Verbesserung von Parkinsonsymptomen mit Hilfe einer lokal applizierten Gentherapie beschrieben <sup>153 16</sup>.

Dem zu Folge hat sich das Feld der Gentherapie in den vergangenen Jahren trotz der diversen Rückschläge enorm entwickelt. Bei der Auswahl der Indikation ist eine sehr klare Gewichtung festzustellen. Fast 85 % aller Versuche zielen auf die Tumor-, Herzgefäß- und Erbkrankheiten. Dabei besitzt die Tumorthherapie den mit 65% größten Anteil (S. Abb. 8).

Hinsichtlich der Auswahl der transduzierten machen Antigene, Cytokine und Tumor Suppressor Gene zwar gut die Hälfte der transferierten Gene aus. Andere Gensequenzen liegen mit jeweils ca. 8 % nicht weit unter den Anteilen der Erstgenannten. ( S. Abb. 9)

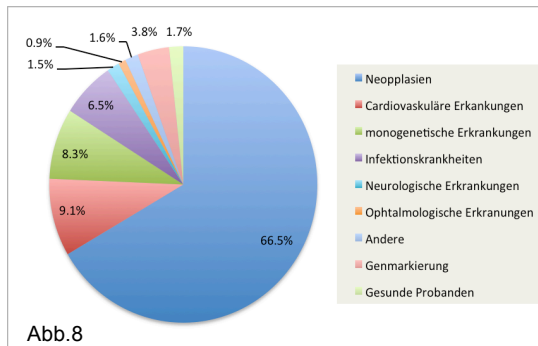


Abb.8

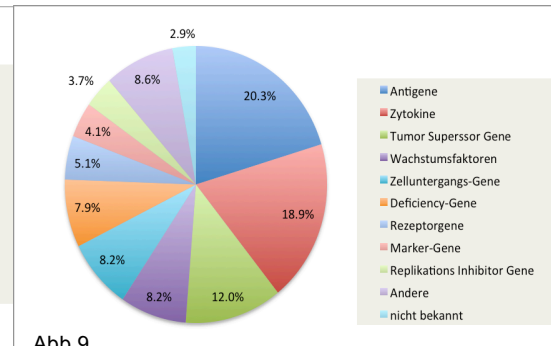


Abb.9

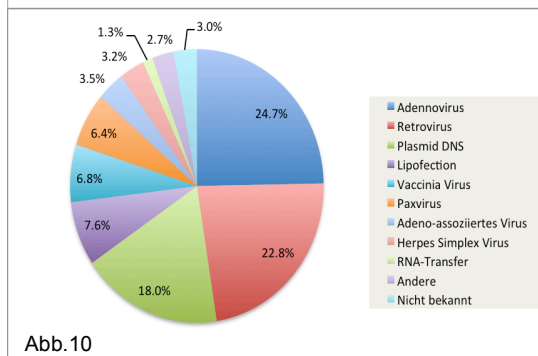


Abb.10

**Abb. 8** Gentherapeutische Indikationen in medizinischen Studien (n= 1309)

**Abb.9** Genetherapeutische Zielgene (n=1309);

**Abb.10** Vektoren in klinischen Studien (n=1339);

Quelle aller Abbildungen <sup>45</sup> : Gene therapy clinical trials worldwide to 2007- an update. The Journal of Gene Medicine (2007) vol. 9 (10) pp. 833-42

Die Auswahl der Vektoren werden Adenovirus-, Retrovirus- und Plasmid-Vektoren werden mit je ca. 20 %, in ca. einem Fünftel aller Versuche benutzt. Weitere Vektoren wie Vaccina Virus, Paxvirus, und Adeno-assoziiertes Virus fallen wesentlich weniger ins Gewicht (S. Abb. 10).

### 1.9.1 AdVEGF in klinischen/präklinischen Studien

Durch AdVEGF besteht die experimentell erprobte Möglichkeit die lokale Sekretion von VEGF zu initiieren. Bisher werden die meisten klinischen Studien mit AdVEGF-165 in Bezug auf die Therapie von kardiovaskulären Ereignissen angewendet. REVASC- Studie (Randomised Evaluation of VEGF for Angiogenesis in Severe Coronary Disease) <sup>164</sup>, RAVE-Studie (Regional An-

giogenesis with VEGF)<sup>161</sup>, KAT II-Studie (Kuopio Angiogenesis Trail II)<sup>81</sup> sind für durchgeführte Studien.

In einer weiteren Versuchsreihe konnte Makinen<sup>132</sup> mit seiner Versuchsgruppe einen positiven Effekt der intraarteriellen AdVEGF-Applikation bei peripheren Ischämien zeigen. Auch fallen die NORTHERN (NOGA Angiogenesis Revascularization Therapy: Evaluation by Radionuclide Imaging)-Studie<sup>222</sup> und NOVA (NOGA Delivery of VEGF for Angina)-Studie<sup>222</sup> in das Feld der kardio-vaskulären AdVEGF-Forschung.

In der experimentellen plastischen Chirurgie ist die Anwendung von AdVEGF in multiplen Indikationen in präklinischen Tierversuchsstudien untersucht. Zu diesen gehören z.B. die Hautlappenplastik<sup>72</sup>, die Pulmonale Hypertension<sup>53</sup> als auch der Einsatz im Model mit Knochenfrakturen<sup>201</sup>. Ähnlich zu den in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Versuchen wurde in den diversen Rattenmodellen der angiotrophe Effekt von VEGF auf das Gewebe nachgewiesen.

Mit der Erforschung der weitergehenden Wirkungsweisen von VEGF hat sich dieses Feld erweitert. Die neurotrophen Eigenschaften<sup>186</sup> von VEGF legen eine Erforschung im Bereich der neuro-regenerativen Forschung am peripheren Nervensystem nahe und sind Ansatzpunkt der im weiteren Verlauf beschriebenen Arbeit. Die Anwendung der adenoviralen Gentherapie zur Induktion der lokalen VEGF Synthese ist eine in der experimentellen plastischen Chirurgie eingesetzte Methode<sup>202 121</sup>.

## **1.10 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der im weiteren Verlauf beschriebenen Arbeit ist es die neurotrophe Wirkung von VEGF<sub>165</sub> auf die Regeneration des autologen Transplantats der peripheren Nerven zu beschreiben. Hierfür wird in jedem Tier ein 2 cm langes Nerveninterponat proximal der Bifurkatio gehoben und reverse an der gleichen Stelle mittels epineuraler Technik koaptiert. In der Folge wird den Tie-



ren der Versuchsgruppe modifizierte Adenoviren für die VEGF<sub>165</sub> Therapie injiziert. Die Kontrollgruppe erfuhrt nach equivalenter chirurgischer Intervention die äquivalente Injektionsmenge NaCl.

Im weiteren Verlauf wird die Wirkung von VEGF<sub>165</sub> auf die Regeneration des autologen Nerventransplantats auf mehreren Ergebnisebenen quantifiziert.

Über die gesamte Versuchsdauer von 17 Wochen werden wöchentlich die motorischen Funktionsparameter - Sciatic Function Index, Static Sciatic Index - abgenommen. Die wöchentliche Abnahme dieser Werte ermöglicht die Abbildung der motorischen Regeneration über den gesamten Zeitverlauf.

Zu Versuchsende werden zudem elektrophysiologische Messungen am operierten, als auch am unoperierten N. ischiadicus durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung ist es die Nervenleitgeschwindigkeit des N. ischiadicus und die Muskelsummenaktionspotentiale (Amplitude, Latenz) des Endorgans, den Mm. interossei plantares abzuleiten. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, als auch der un-operierten Seite kann hiermit die Regeneration auf neuronaler Funktionsebene aufgestellt werden.

Um die bis zu diesem Zeitpunkt gewonnenen Parameter in einem morphologischen Kontext interpretieren zu können werden den Tieren nach der Perfusion die Nervenpräparate der operierten und un-operierten Seite entnommen. Die Koaptationsstellen werden nach dem Auftreten von Narbenneuromen untersucht. Dazu wird eine Morphometrie der Axone aufgestellt, in der zum einen auf die klassischen Methoden der Axonzählung, zudem aber auf ein neuartiges Verfahren der automatisierten Morphometry mittels Software zurückgegriffen wird. Diese Auswertungen beschreiben den neuronalen Regenerationsstatus der Tiere beider Gruppen. Des Weiteren wird das Muskelgewicht des beidseitig entnommenen M. gastrocnemius bestimmt und evaluiert, ob dies einen Rückschluss auf die Therapie zulässt.

Um den vaskulären Status der jeweiligen Nervenpräparate abzubilden können wir auf das Verfahren der sog. „Corrosion Cast“ zurückgreifen. Auf

Grund der Methoden können dafür nicht die selben Tiere verwendet werden, die der Mophometrischen Untersuchung unterzogen werden. Aus diesem Grund werden nach dem Versuchende 2 Tiere/Gruppe diesem Verfahren ausgewertet.

Im Gesamtbild ergibt sich durch die Versuche ein Bild, welches sich auf die zeitlich abbildbare motorische Regeneration aufzeigt und diese in Kontext mit den elektrophysiologischen und morphologischen Parametern stellt. Zudem ist es eingeschränkt möglich einen Zusammenhang zu der Evaluation der neuralen Gefäßstrukturen aufzubauen. Dabei ist anzunehmen, dass die potentiell positiven Effekt von VEGF auf die Regeneration des koaptatierten Nerveninterponats darstellbar sind.

## **2. Materialien und Methoden**

In dem Versuchsmodell wurden 18 Ratten vom Typ Crl:CD(SD) mit einem durchschnittlichen Gewicht von ca. 300 g eingesetzt. Diese wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und jeweils derselben Operation unterzogen. Dabei handelt es sich um die Hebung eines 2 cm langen autologen Nerveninterponats des Nervus ischiaticus der rechten Seite, welches im Anschluss reverse in den entstandenen Defekt reimplantiert wurde. Dieses Modell stellt die Transplantation eines autologen Nerveninterponats auf Basis eines zu überbrückenden Defekts nach. Durch die Reversion des Interponats wird die Ortfremde des Nervenranplantat simuliert, welche hinsichtlich der klinischen Praxis einen höheren Praxiswert ergibt.

Jedem Tier der VEGF-Gruppe (n = 10) wurde nach erfolgreicher Koaptation des Interponats virales Serum mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in das umliegende Muskelgewebe gespritzt. Der Kontrollgruppe (n = 8) wurde statt dessen NaCl in gleicher Mengen an die entsprechenden Stellen injiziert. Die Zuteilung der Tiere war bis zum Ende der Versuchs bzw. bis zur Auswertung der Versuchsleitung nicht bekannt, weshalb der Versuch als doppelblind zu werten ist.

Die Quantifizierung der Regeneration erfolgte in zwei Phasen. Zum einen wurde die motorische Regeneration mittels funktionaler Werte –dem Sciatic Function Index, Static Sciatic Index - wöchentlich abgenommen. Damit wurde der zeitabhängige Vergleich der motorischen Regeneration ermöglicht. Zu Versuchsende wurden dann weitere Werte ermittelt. Untersuchungen der Nervenleitgeschwindigkeit und der Aktionspotentiale an den Motorischen Endplatten wurden kurz vor der Perfusion der Tiere mittels elektrophysiologischer Messmethoden evaluiert. Des weiteren wurden morphologische Werte des Musculus (M.) gastrocnemius und des Nervus (N.) ischiadicus beider Seiten post-letal erhoben.

## **2.1 Modell des autologen Nerveninterponats zur Untersuchung des Effekts der adenoviralen Gentherapie mit AdCMVVEGF<sub>165</sub> auf die Regeneration**

### **2.1.1 Ansatz des Modells**

Das Modell des autologen Nerventransplantats in Form eines reversen Interponats des N. ischiadicus der Ratte stellt einen gängigen Versuchsaufbau dar<sup>88</sup>. Der bei dem Heben des Interponats entstehende Defekt im Verlauf des Nerven kann als Trauma interpretiert werden, bei welchem das irreversibel geschädigte Nerveninterponat soweit reseziert wird, dass glatte Schnittkanten des proximalen und distalen Nervenstumpfes entstehen.

### **2.1.2 Operation**

Die Grundlage für die Gentherapie mit AdCMV.VEGF-165 ist die chirurgische Überbrückung des artifiziellen Defektes mit Hilfe eines autologen Nerventransplantats.

Um eine Vergleichbarkeit mit den rein chirurgisch behandelten Tieren aufzustellen, wurden zwei Gruppen gebildet. Mit einer Gruppenstärke (n) von 10 (VEGF-Gruppe) bzw. 8 (Kontrollgruppe) Tieren wurden die Versuche gestartet. Die identische Operation (OP) wurde in beiden Gruppen durchgeführt und anschließend eine Gruppe (VEGF-Gruppe) durch einen adenoviralen Vektor mit VEGF<sub>165</sub> indirekt behandelt. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde an gleicher Stelle eine Natriumchlorid (NaCl)-Lösung injiziert.

Der Grund für die unterschiedliche Größe ergab sich dabei retrospektiv aus dem Problem der Automutilation. Diese Problematik zeigte sich bei zwei Tieren der Kontrollgruppe vor Abnahme der ersten Ergebnisse eine Woche postoperativ. Bei Tieren der VEGF-Gruppe tauchte dieses Problem ebenfalls auch, doch an späterer Stelle und daher wurden die Ergebnisse diese Tiere so weit es ging mit bewertet.

#### **2.1.2.1 Narkose**

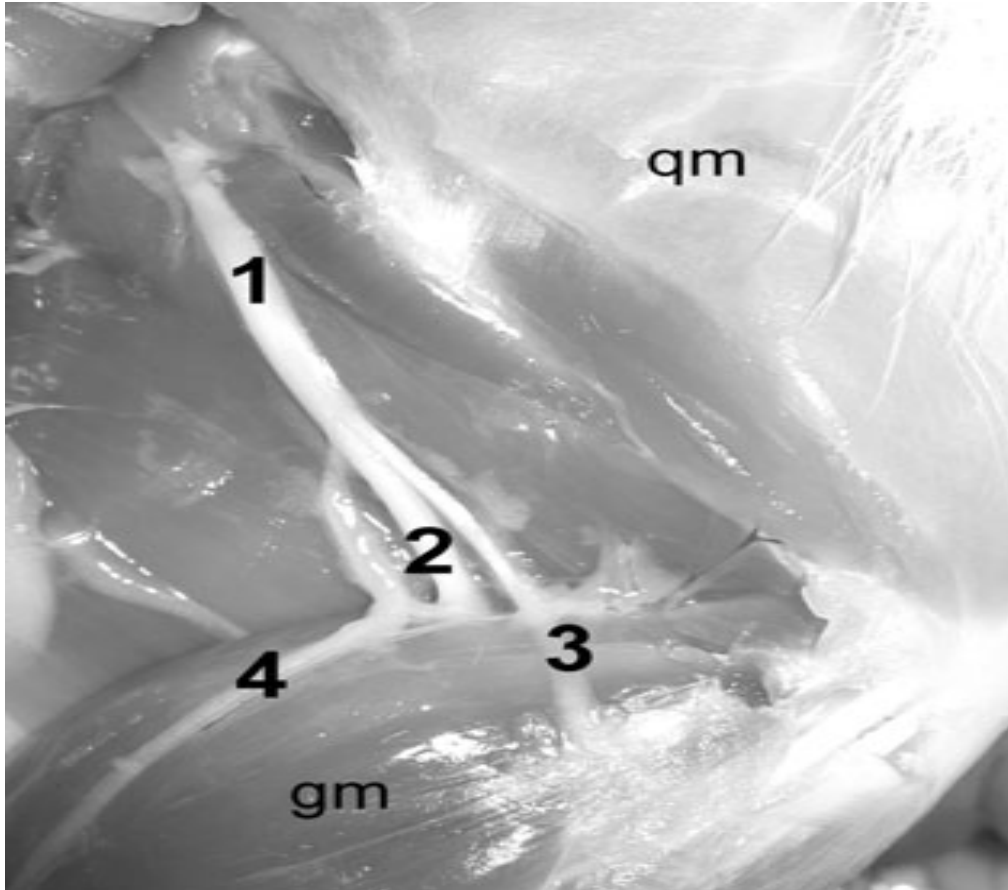
Es wurde nach dem bekannten Schema einer standardgemäßen Inhalationsnarkose mit Isofluran verfahren.. Diese wurde durch Spontanatmung von 3,5 % Isofluran ( $C_3H_2ClF_5O$ ; Attane<sup>TM</sup> Isoflurane, Provect AG, Lyssach, Schweiz) und medizinischem Sauerstoff bei einem Flow von 1,5 l/min eingeleitet. Die Aufrechterhaltung wurde durch Spontanatmung von 2 - 2,5 % Isofluran und Sauerstoff bei einem Flow von 0,8l/min. gewährleistet.

#### **2.1.2.2 Zugang**

Nach Rasur, Säuberung und Desinfektion mit 70 %-igem Ethoanol des rechten Hüft- und Oberschenkelbereichs wurde zunächst die Orientierung vorgenommen. Die Haut wurde im Parallelverlauf zum Femur, ca. 0,3 cm kaudal hiervon, auf einer Länge von 2 - 3 cm mit einem Skalpell (No. 21) durchtrennt. Um den N. ischiadicus freizulegen wurden die Muskelbäuche der Mm. semitendinosus und biceps femoris stumpf mit einer Metzenbaumschere getrennt. Dadurch exponiert sich der unter den Muskeln liegende N. ischiadicus. Mit Hilfe einer Mikroschere und Uhrmacherpinzette wurde der Nerv vom umliegenden Bindegewebe vorsichtig befreit und möglichst weit nach proximal dargestellt. Der Hautschnitt und die Muskelpräparation wurden nach Bedarf angepasst, jedoch so minimal-invasiv wie möglich gehalten. Im folgenden operativen Schritt wurde das autologe Nerveninterponat mit der Länge von 2 cm möglichst proximal gehoben.

Bei dieser Entnahme sind insbesondere drei Eckpunkte zu beachten.

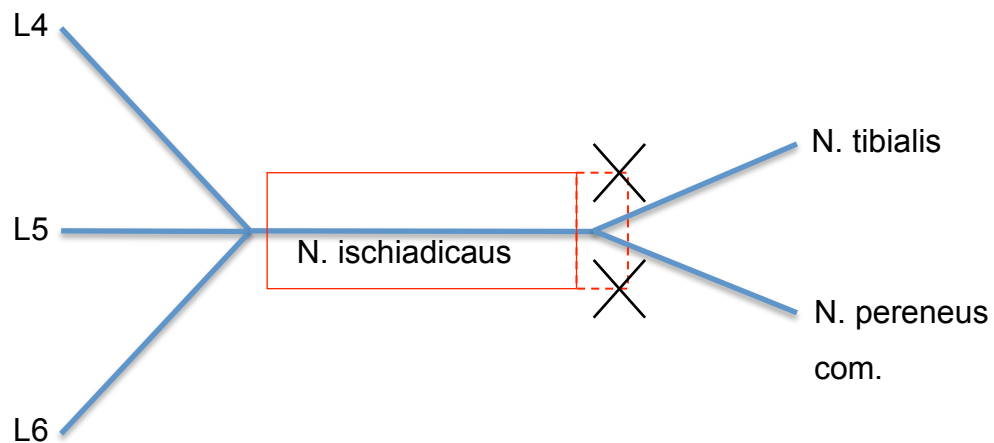
Die vorgeschriebene Länge von 2 cm des Interponats strikt eingehalten werden. Dadurch wird die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nach der OP sichergestellt. Des weiteren wird hierdurch der Prozess der Primärheilung am Interponat unterbunden. Dies wäre im Falle der autologen Transplantation im klinischen Fall nicht möglich und somit auch in diesem Versuch nicht ziehführend.



**Abb.11** Anatomische Übersicht des frei präparierten N. ischiadicus (1); N.tibialis (2); N. peroneus (3); N. surae- ramus superficialis (4); M. gastrocnemius (gm); M. quadriceps (qm)

Des Weiteren ist darauf zu achten, dass der distale Schnitt am Interponat proximal der Bifurkation des N. ischiadicus in N.Tibialis/N. Peroneus com. gesetzt wird.

Da diese Gabelung in ihrem proximalen Ansatz nur schwer ohne Hilfsmittel auszumachen ist, wurde in diesem operativen Stadium mit Hilfe des Operationsmikroskopes (Axiovert® 25, Fa. Zeiss, Jena) gearbeitet. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass mit der Durchtrennung der gesamte ungegabelte N. ischiadicus gesetzt wird.



**Abb. 12** Schematische Darstellung der Lokalisation der Hebung am N. ischiadicus

Als dritter Eckpunkt ist seitens des Operateurs auf die atraumatische Behandlung des Nerven zu achten. Dies gilt für die Operation insgesamt, insbesondere aber für den behandelten N. ischiadicus samt seines herausgeschnittenen Interponats und den beiden Nervenenden.

Wie oben im Anatomierteil beschrieben, sind die Nervenfasern extrem empfindliche Zellen, welche nur auf Grund ihrer Anordnung und der umliegenden Bindegewebsschichten elastisch sind <sup>195</sup>. Wird durch das Operationsbesteck direkter Druck auf das nervale Gewebe ausgeübt, kann dies die Axone schädigen und eine vergleichende Messung erschweren. Aus diesem Grunde wurde bei den Operationen jegliche Manipulation am Nerven unter dem oben genannten Operationsmikroskop von Zeiss durchgeführt. Damit ist ein wesentlich genaueres Arbeiten möglich und somit die Minimierung des Risikos einer Ergebnisbeeinflussung durch volatile Schädigungen gewährleistet.

Ist das Nerveninterponat vorsichtig aus dem Verlauf des Nerven herausgetrennt, wird dieses gehoben und anschließend um 180° in der Längsachse gewendet. Das Drehen des Nerventransplantats hat zur Folge, dass die Nahtstellen bei der Implantation nicht kongruent zueinander angesetzt werden und somit dem Modell eines autologen Transplantats am ehesten entsprechen. Die Koaptation erfolgt ebenfalls mikroskopisch.

### **2.1.2.3 Nervennaht**

Bei der Koaptation des Nerveninterponats kann nach mehreren Techniken verfahren werden. Aufgrund der spezifischen Resektionsstelle unterscheiden sich die Kaliber der jeweils zu vernähenden Enden kaum. Daher ist ein Trunkus-Transplantat <sup>115</sup> die am nächstliegende Simulation.

Die Nervennaht wird in epineuraler Technik mit Ethilonfäden der Stärke 9/0 nach mikrochirurgischem Muster durchgeführt. Das Epineurium des Nerven dient als Leitgewebe für den Durchstich der Nadel (siehe Abb.5, S15)

Seine spezifischen Eigenschaften erlauben ein Zusammenziehen der beiden Enden, so dass das Interponat möglichst passgenau End-zu-End angelegt werden kann. Nach der Verknotung der Fäden ist somit das Modell des „re-versen, autologen Nerveninterponat“ abgeschlossen.

### **2.1.2.4 Vorbereitung der Viren für die Injektionsbehandlung**

Um die Objektivität des Doppel-Blind-Versuchs zu wahren, darf auch der Versuchsdurchführende keine Kenntnis über die Zuordnung der einzelnen Tiere zu den unterschiedlichen Behandlungsgruppen haben. Dementsprechend wurden die mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> bzw. NaCl gefüllten Spritzen nach Nummern markiert. Für jedes operierte Tier gab es eine Spritze mit dem Füllvolumen von 200 µl. Die Nummerierung der Spritzen war für den Operateur keiner Gruppe zuteilbar und somit hatte er keine Kenntnis darüber, ob das jeweilige Tier der VEGF- oder der Kontrollgruppe zuzurechnen war.

Diese Inkognito-Verfahrensweise wurde bis zur letzten Auswertung aufrechterhalten. Nachdem alle Ergebnisse erstellt waren, wurde die Zuordnung der Tiere offengelegt und somit die Gruppenzugehörigkeit der jeweiligen Ergebnisse durchgeführt.



#### 2.1.2.5 Applizierung des AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

Nach Eröffnung und autologer reverser Reimplantation des nervalen Interponats wurde den Tieren die adenovirale Vektorie bzw. das NaCl gespritzt. Die Spritzen unterschieden sich hierbei nicht. Die Injektion (Microlance™ 36G Nadel, FA. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden; 1 ml Spitze Fa. Codan medical, Rødby, Denmark) erfolgte in das muskuläre, dem Interponat direkt anliegende Gewebe. Jeweils 200 µl



**Abb. 13** Ablichtung der intraoperativen Injektion des Serums oder der 0.9 %-igen NaCl-Lösung wurden einmalig in vier Fraktionen an unterschiedlichen Stellen symmetrisch entlang des Interponats injiziert.

#### 2.1.2.6 Postoperative Versorgung


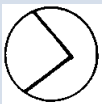




Die postoperative Versorgung der Tiere wird im Abschnitt „Tierhaltung“ beschrieben.

### 2.1.3 Übersicht über die durchgeführten Evaluationsmethoden

Die Innervation des N. ischiadicus und seiner Endäste versorgt motorisch am Oberschenkel den M. biceps femoris, am Unterschenkel den M. gastrocnemius, M. soleus, M. extensor digitalis longus, M. extensor hallucis longus, fibularis tertius, M. fibularis longus und M. fibularis brevis. Sensibel innerviert er die Hautareale distal des Tarsalgelenkes.

Eine Typ-5-Läsion nach Sunderland des N. ischiadicus führt somit zu folgenden Ausfällen:

1. Verkleinerung des Tarsalgelenkwinkels (M. biceps femoris, M. gastrocnemius/soleus) und daraus resultierende Verlängerung der Auflagefläche des Fußes;
2. fehlende Zehenspreizung;
3. fehlende sensible Innervation distal des Tarsalgelenkes – Automutilationsneigung der Tiere

Nerven-Läsion	Abbildung der Hintergliedmaße	Winkeldarstellung (Tarsalgelenk) <sup>2</sup>	Abbildung der Zehenspreizung (Fußhaltung)	Abnormalitäten
Keine				keine
N. Ischiadicus (Typ 5)				1. Fuß- Abdrucklänge (>nor.) 2. Zehen-Spreizung (<nor.) 3. Dorsoflexion des Knöchels (°<nor.)

**Tab. 6** Verbildlichung der Funktionseinschränkung nach N. Ischiadicus Typ-5-Läsion;

Modifiziert nach: Bain et al. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posteriortibialnerve lesions in the rat. Plastic and reconstructive surgery (1989) vol. 83 (1) pp. 129-38

Die Ausfälle können nach sensibler und motorischer Art der Denervierung unterteilt werden. Das Interesse dieser Arbeit gilt speziell der motorischen Regeneration, zumal diese im Rahmen diverser Tests am eindeutigsten beschrieben werden kann <sup>104</sup>. Hierfür wurden alle operierten Tiere 17 Wochen lang post-OP begleitet und wöchentlich funktionellen Tests unterzogen.

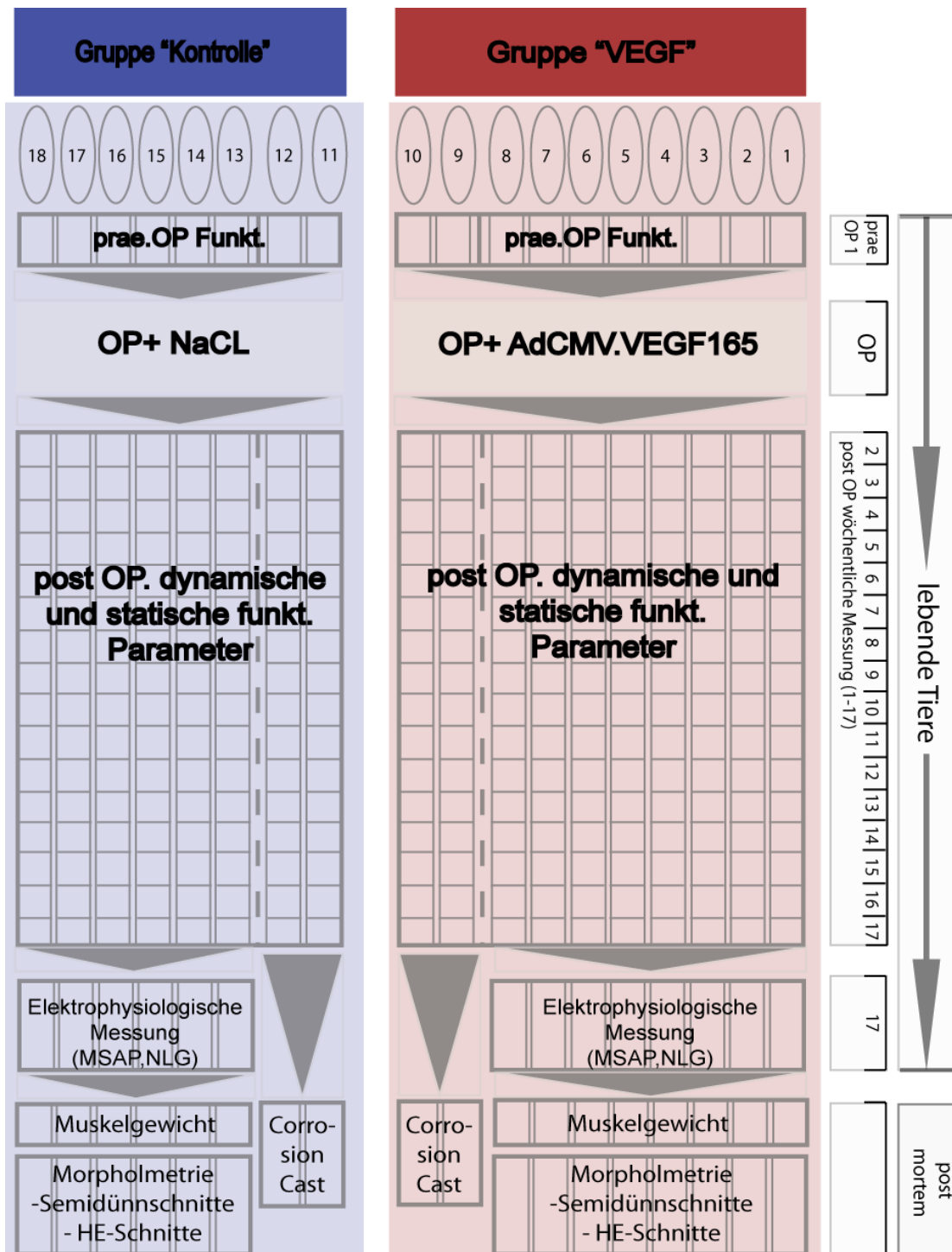
Nach 17 Wochen wurden die Tiere in weitere Untergruppen zur Evaluierung der Regeneration verschiedenen Auswertungsmethoden zugeteilt.

Beide Hauptgruppen, „VEGF“ und „Kontrolle“, wurden jeweils in zwei Untergruppen aufgeteilt. „VEGF 1“ und „Kontrolle 1“ wurden je sechs Tiere zuge-  
lost. Die beiden übrigen Tiere pro Hauptgruppe wurden den Gruppen „VEGF 2“ und „Kontrolle 2“ zugeteilt.

Die Tiere der Gruppen „VEGF 1“ und „Kontrolle 1“ wurden in München am veterinärmedizinischen Institut, LMU München, Prof. K. Matiassek, einer elektromyographischen Messung unterzogen. Nach der anschließenden Euthanasie der Tiere wurde das Gewicht des M. gastrocnemius festgestellt und die Nervenpräparate für die morphologische Beurteilung entnommen. Diese wurde mit Hilfe von Professor Schlegel und dem Institut für Pathologie des Helmholtz-Zentrums, München, durchgeführt.

Jeweils zwei Tiere der Gruppen „VEGF“ und „Kontrolle 2“ wurden in Kooperation mit Professor M. Konerding, Anatomisches Institut / Johannes Gutenberg Universität Mainz, einem Corrosion Cast unterzogen.

### 2.1.3.1 Versuchsplan



**Abb. 14** Versuchsplan des durchgeführten Experiments; Im vertikalen Verlauf ist der zeitliche Ablauf der jeweiligen Untersuchungen beschrieben. Die Horizontale stellt die Verteilung der Versuchstiere da.

## 2.2

### **AdCMV.VEGF<sub>165</sub>**

Die viralen Vektoren wurden vom Institut für Virologie und Immunologie der TU-München/Klinikum rechts der Isar zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung und Gewinnung basiert auf der Arbeit von Dr. T. Holzbach<sup>85</sup> und wurde durch das Institut für Virologie der TU-München durchgeführt.

Bei dem angewandten Virus handelt es sich um einen AdCMV.VEGF<sub>165</sub>. Dieser ist ein replikationsdefizientes Adenovirus, Serotyp 5 mit der cDNA der humanen VEGF-Isoform 165 als Reportergen. Diese kodierende Gensequenz ist mit konstitutiven Zytomegalievirus (CMV)-immediate-early Promotor<sup>142 130</sup> ergänzt. Die Replikationsgene des Adenovirus, im Speziellen die Sequenz E1Am, wurden eliminiert. Diese Deletion wurde auch nach Vermehrung des Vektors in HEK 293 Zellen geprüft und ist somit als sicher einzustufen. AdCMV.VEGF<sub>165</sub> diente als Vektor für die VEGF-Versuchsgruppe.

Die Herstellung des Virus wurde durch das Institut für Virologie und Immunologie der TUM durchgeführt. Es wurden dabei die Vektoren in einer HEK-293-Zellkultur unter Brutbedingungen (37 °C, CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %) angezüchtet (erfolgte in Brutschränken der Firma Life Sciences International, Frankfurt). Bei den HEK 293 Zelllinien, welche von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, abstammen, handelt es sich um eine kontinuierliche, primäre, humane embryonale Nierenzelllinie. Diese wurde mit humanen Adenoviren, Typ 5, transformiert und produzierte anschließend die erwünschten E1-Proteine.

Nach der Infektion der Zellen wurden diese für 36 h kultiviert, und anschließend konnte der virale Vektor mit Hilfe von Ultrazentrifugation und Dialyse von dem Rest der Zellen getrennt und damit gewonnen werden. Dem Gewinn des Virus folgte die Titerbestimmung mittels des sog. Plaque-Tests, welcher eine quantitative Messung der biologischen Aktivität des Virus ermöglicht. Der zweite Kontrollmechanismus für die gewünschte Charakteristik des Virus wurde durch den Nachweis der Replikationsdefizienz. Dabei muss

gewährleistet werden, dass die produzierten viralen Vektoren tatsächlich nach der Amplifikation in den HEK 293-Zellen lokalisiert ist eine Rekombination des Virus auf der Reproduktionssequenz, der E1A-Region, ausgeschlossen werden kann. Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist hier die Grundlage für die Prüfung der viralen DNA und somit auch ein grundlegender Test für die Arbeitssicherheit. Eine potentielle Infektion mit dem alterierten Virus könnten den Versuchstieren, schließlich aber auch den durchführenden Personen schaden.

Ist sichergestellt, dass der virale Vektor die Produktion des Zielprotein VEGF<sub>165</sub> induziert, kann er im Laufe der OP dem Zielgewebe appliziert werden.

Die genaueren Abläufe werden im Kapitel „Virusapplikation“ erläutert.

## **2.3 Untersuchung des Therapieeffektes von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des „autologen Nerveninterponats“ mittels funktioneller Parameter**

Die funktionellen Parameter spiegeln sich in den Fußabdrücken wider, welche über den gesamten Verlauf des Versuches wöchentlich gemessen wurden. Die erste präoperative Messung wurde an beiden Füßen abgenommen, wodurch insgesamt 19 Werte pro Tier die Entwicklung in einen Zusammenhang mit dem Faktor Zeit setzten.

Methodisch sind die Parameter in zwei Gruppen, bzw. fünf Grundwerte und zwei sich aus diesen ableitende Quotienten zu unterteilen. Bedingt durch die gesetzte Typ-5-Läsion des autologen Nerveninterponats des N. ischiadicus kommt es durch fehlende Innervation zu einer geänderten Fußhaltung mit daraus resultierendem geändertem Laufmuster bzw. Haltungsmuster. Die Zehen können nicht mehr gespreizt werden, das Tarsalgelenk wird verstärkt gebeugt und in Folge dessen wird der Fuß mit der gesamten Fläche aufgesetzt<sup>7</sup>. Diese Konsequenzen der Nervenläsion sind in zwei Methodiken an den Tieren ablesbar.

Die erste Methodik ist die Abnahme der „dynamischen“ Parameter. Diesen werden die Abstände der Zehen 1- 5, 2 - 4 und die Fußabdruckslänge zugeordnet. Mit Hilfe des Sciatic Function Index (SFI) können diese in ein Verhältnis gesetzt werden, welches den Grad der Regeneration widerspiegelt <sup>38 90</sup>.

Die zweite Methodik besteht aus den „statischen“ Parametern. Diese setzen sich aus den Zehenabständen 1 - 5 und 2 - 4 zusammen. Mit dem Static sciatic Index (SSI) können auch diese in ein Verhältnis gesetzt werden. Die Fußabdrucklänge wird hier nicht berücksichtigt.

Bei beiden Methodiken handelt es sich um nicht-invasive Untersuchungen, welche ohne Narkose des jeweiligen Tiers durchgeführt werden können. Die Ergebnisse dieser Methodiken spiegeln die Funktionalität nicht nur des Nerven, sondern der gesamten motorischen Einheit wider. Dabei ist insbesondere die Auswertung der dynamischen Parameter in der Literatur als „Gold-Standard“ für die Evaluation der Regeneration beschrieben <sup>109</sup>.

## **2.3.1 Dynamische Parameter**

### **2.3.1.1 Grundlagen**

Die dynamischen Parameter werden in der Literatur umfangreich behandelt. Sie gelten als Standarduntersuchung für die Funktionalität des peripheren Nerven <sup>7 90</sup>. Bereits seit den 1970er Jahren sind die dynamischen Parameter als Standardmethodik zur Auswertung am ischiadicus Modell von Ratten beschrieben <sup>90</sup>. Die Fußabdrücke werden am laufenden Tier abgenommen, und der Fußabdruck wird in Bezug auf die nachfolgend beschriebenen Strecken vermessen:

Die Fußabdrucklänge wird zwischen der Spitze des dritten Zehs und dem davon am weitest entfernten Ende der Verse gemessen. Die hierdurch abgebildete Strecke zwischen den beiden Messpunkten verläuft parallel zur Fußachselängsachse. Die Zehenabstände 1 - 5 und 2 - 4 werden als Streck-

ken zwischen den jeweilig genannten Zehen gemessen. Diese Strecken stehen ungefähr senkrecht zur Fußlängsachse.

#### **2.3.1.2 Versuchsaufbau, Vorbereitung und Ablauf**

Für die Abnahme der dynamischen, also beim Laufen entstandenen Fußabdrücke wurde eine Laufbahn mit den Maßen 110 x 10 cm gebaut. Die Seitenwände wurden ca. 20 cm hoch angelegt, sodass sich das Tier nur vorwärts bewegen konnte. Des Weiteren wurde an dem Zielende der Laufbahn eine künstliche „Höhle“ mit dunklen Tüchern angelegt. Die Erfahrung zeigt, dass bei diesen Tieren der ausgeprägte Trieb besteht, einem solchen Versteck zielstrebig entgegentzulaufen. Vor der eigentlichen Messung wurden die Tiere mit Hilfe von zwei „Probeläufen“ bestmöglich an die Umgebung gewöhnt und zu einem zielsicheren Laufen erzogen. Die Laufstrecke wurde bei jedem Tier nach den zwei Probeläufen mit weißem Papier (A4 Druckerpapier) ausgelegt. Auch wenn dies eine sehr einfache Möglichkeit für die Aufnahme der gefragten Parameter darstellt, wird sie in der Literatur als verlässlich beschrieben.

Es gibt neuere Ansätze, statt dieser einfachsten Aufnahmetechnik neue automatisierte Software-Systeme einzusetzen. Hierdurch würde zwar eine schnellere Auswertung ermöglicht. Diese Techniken unterscheiden sich in der Aussagekraft aber nicht ausschlaggebend von den konventionellen händischen Methoden <sup>74 37</sup>.

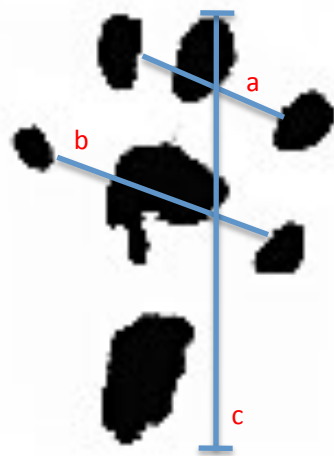
Nach den Eingewöhnungsläufen wurden den Tieren die Hinterläufe mit herkömmlicher Tinte angefärbt. Dafür wurden die Tiere im Brust-Schulter-Bereich fixiert und die Hinterläufe mit sanftem Druck auf ein Stempelkissen aufgedrückt. Anschließend wurde das Tier am Anfang der Laufstrecke in den „Lauftunnel“ gesetzt. Es lief sodann, wie bei dem „Eingewöhnungslauf“ gelernt, in die Höhle am Ende der Strecke.



Anhand der entstandenen Tinten-Fußabdrücke wurden die Strecken auf dem Papier händisch abgemessen und anschließend in der Ergebnistabelle eingetragen.

Folgende Strecken wurden ausgemessen:

- Fußabdrucklänge = Print-Lenght = PL
- Abstand zwischen 1. und 5. Zeh = Toe-Spread (1-5) = TS
- Abstand zwischen 2. und 4. Zeh = intermediate Toe-Spread (2-4)= IST



**Abb.15** Fußabdruck und Zehenspreizung einer gesunden Ratte; a) ITS: intermediate toe spread, b) TS: toe spread, c) PL: Printh lenght

### 2.3.1.3 Sciatic Function Index

Durch die Arbeitsgruppen um De Medicaneli <sup>38</sup> und Hruska <sup>90</sup> wurde Ende der 1970er, bzw. Anfang der 1980er Jahre eine Methode zur Bestimmung der motorischen Regeneration des N. ischiadicus der Ratte vorgestellt. Die dabei zugrunde liegende Läsion wird bei dieser Methode außer Acht gelassen. Vielmehr ermöglicht die Messmethode den indirekten Rückschluss über die Funktionalität auf den Schweregrad der Läsion. Im Laufe der Jahre wurde das Grundprinzip dieser Methode leicht modifiziert, jedoch nie tatsächlich in Frage gestellt. Dies geschah maßgeblich durch die Arbeitsgruppe um Bain

et. al.<sup>7</sup>, welche schließlich den Begriff des „Sciatic Function Index“ (SFI) prägte. Dieser Begriff bezeichnet einen Quotienten mehrerer Einzelparameter und stellt ein Verhältnis zwischen der Funktion der operierten zu der nichtoperierten Gliedmaße auf. Dabei ist dieser bis heute als „Gold-Standard“ hinsichtlich der von motorischen Funktionalität am N. ischiadicus-Modell der Ratte beschrieben. Die einfließenden Parameter sind der TS, IST und PL (siehe einen Paragraphen weiter oben).

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

**Abb. 16**<sup>7</sup>; Formel zur Errechnung des SFI; Einzelne Faktoren: E= operierte Seite; N= nicht-operierte Seite; TS= Toespread=Zehenspreizung 1.-5. Zehe; IST= intermediate toe spread= Zehenspreizung 2.-4.

### 2.3.2 Statische Parameter

Die statischen Parameter sind, genau wie die dynamischen funktionellen Parameter, Werte mit einer erwiesenermaßen hohen Aussagekraft über die Funktionalität des Endorgans. Dieses steht auch in dieser Messung unweigerlich im direkten Zusammenhang mit der Innervation, kann aber auch durch rein muskuläre Abnormalien beeinflusst werden. Im Vergleich zu den dynamischen sind die statischen Parametern in der Literatur nicht so oft beschrieben<sup>20</sup>.

Ein Unterschied zu der Ausmessung der Abstände bei den dynamischen Parametern besteht darin, dass die Werte an der jeweils der Messstrecke zugewandeten Seite des Zehs abgenommen werden. Die Werte fallen dadurch im Vergleich zu den dynamischen Parametern kleiner aus und sind nicht direkt vergleichbar.

### **2.3.2.1 Versuchsaufbau, Vorbereitung und Ablauf**

Hierbei wurde die Versuchsratte in einer Plexiglaskammer auf eine transparente Plexiglas-Platte gestellt und der Abstand zwischen den einzelnen Zehen mittels einer Kamera im Lot von unten aufgenommen. Auf gleicher Höhe mit dem Rattenfuß befand sich eine in der Kammer eingebrachte Maßeinheit, so dass die Bilder relationsgenau vermessen werden konnten. Mit Hilfe der frei erhältlichen Software „ImageJ-Version 10.2“ (NIH, Rodville Pike, USA) wurden die Bilder im Anschluss an die Aufnahme per Computer ausgemessen und als Ergebnisse eingetragen.

Mit dieser Methodik wurden folgende Strecken ausgemessen:

- Abstand zwischen 1. und 5. Zeh = Toe-Spread = TS
- Abstand zwischen 2.- und 4. Zeh = Intermediate Toe-Spread = IST

### **2.3.2.2 Static Sciatic Index**

Der „Static Sciatic Index“ (SSI) ist ebenso wie der SFI eine Kenngröße der Reinnervation und gilt als funktionelle Maßeinheit. Im Gegensatz zu dem SFI ist der SSI in der Literatur wesentlich weniger ausführlich beschrieben, allerdings keineswegs weniger aussagekräftig<sup>20 184</sup>.

Ähnlich wie schon bei der Diameter-Vermessung für den SFI werden die Spreizmaße der Zehen, also dem TS zwischen 1. und 5. Zehe und dem IST zwischen 2. und 4. Zehe ausgemessen. Im Gegensatz zu der Berechnung des SFI ist die Abdrucklänge nicht miteingerechnet. Dies beruht auf der Tatsache, dass das von unten aufgenommene Bild der nicht eingefärbten Füße keine klare Auflagefläche des Fußes erkennen lässt und somit zu variabel für eine valide Messung ist.

Im Jahr 2000 wurde durch die Arbeitsgruppe um Bervar<sup>14 19</sup> bestätigt, dass der Wert des „Print length“ (PT) nur im dynamischen Abdruck eine Relevanz hat, jedoch bei dem statischen Bild als nicht-signifikant außer Acht gelassen

werden kann. Dementsprechend weicht die Formel zur Berechnung des „Static Sciatic Index“ (SSI) um den Parameter der PL vom SFI ab.

Die Formel zur Berechnung des SSI setzt sich folgendermaßen zusammen:

$$SSI = 108,44 \times \left[ \frac{(ETS - NTS)}{NTS} \right] + 31,85 \times \left[ \frac{(EITS - NITS)}{NITS} \right] - 5,49$$

**Abb. 17**<sup>184</sup>: Formel zur Erreichung des SSI; Einzelne Faktoren: E= operierte Seite; N= nicht-operierte Seite; TS= Toe spread=Zehenspreizung 1.-5. Zehe; IST= intermediate toe spread= Zehenspreizung 2.-4.

Das Ergebnis dieser Berechnung ist eine Annäherung an den Verlaust der Funktionalität. Die Skala rangiert dabei zwischen 0, was einer 100 %-igen und 100, was einer 0 %-igen Funktionalität entspricht.

## 2.4 Untersuchung des Therapieeffektes von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats mittels elektrophysiologischer Untersuchung

Die elektrophysiologische Messung ist eine feste und etablierte Größe für die Evaluation der Nerven/Muskel Funktionalität<sup>170 139 180 34</sup>. Auch wenn die Aussagen über die Korrelation zu den Messungen der Morphologie bzw. der funktionellen Messung in der Literatur als nicht eindeutig beschrieben werden<sup>217</sup>, sind sie es ein wertvoller, unabhängiger Parameter. Dieser kann eine Aussage, bzw. ein Indiz über den Umfang der Regeneration geben<sup>89</sup>.

Aus diesem Grund wurde die elektrophysiologische Messung auch als Parameter für die Regeneration nach der im vorliegenden Versuch durchgeführten Operation und nachfolgende Behandlung verwendet. Gleichzeitig dürfen auch diese Ergebnisse allerdings nicht überbewertet werden<sup>34</sup>.

Messgrößen dieser Untersuchung sind zum einen die Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) und zum anderen die Muskelsummenaktionspotentiale (MSAP-englisch: „Compound Muscle Action Potential“ –CMAP)<sup>211</sup>.

Beide Werte dienen einer Beschreibung der Funktionalität der gesamten neuromotorischen Einheit. Die Nervenleitgeschwindigkeit ist in diesem Zusammenhang als Maß für den Grad der Myelinisierung des peripheren Nerven zu interpretieren<sup>34</sup>, hat aber keine Aussagekraft über die Innervation am Endorgan. Diese wird durch die MSAPs beschrieben, welche am proximalen Nerv durch Elektrostimulation provoziert und über dem Muskel abgelesen werden. Sie geben somit Auskunft über ein wesentlich breiteres Spektrum von Faktoren. Dies ist zum einen die Homogenität der Fortleitung des Stimulationspulses im Nerv. Zum anderen gibt sie Aufschluss über die neuromuskuläre Überleitung bzw. die Muskelfunktionalität selbst.

Im vorliegenden Versuch wurden die Tiere beider in München ausgewerteten Gruppen „VEGF 1“ und „Kontrolle 1“ (je n = 6) der NLG-Testung unterzogen.

#### **2.4.1 Vorbereitung und Ablauf der Untersuchung**

Die Tiere wurden vor dem Beginn der Untersuchung mit einer intraperitonealen Injektion nach dem MMF-Schemata {2 mg/kg Midazolam (Ratiopharm/Germany); 150 µg/kg Medetomidine (Pfizer/Germany); 5 µg/kg Fentanyl (Deltaselect/Germany)} in Narkose versetzt.

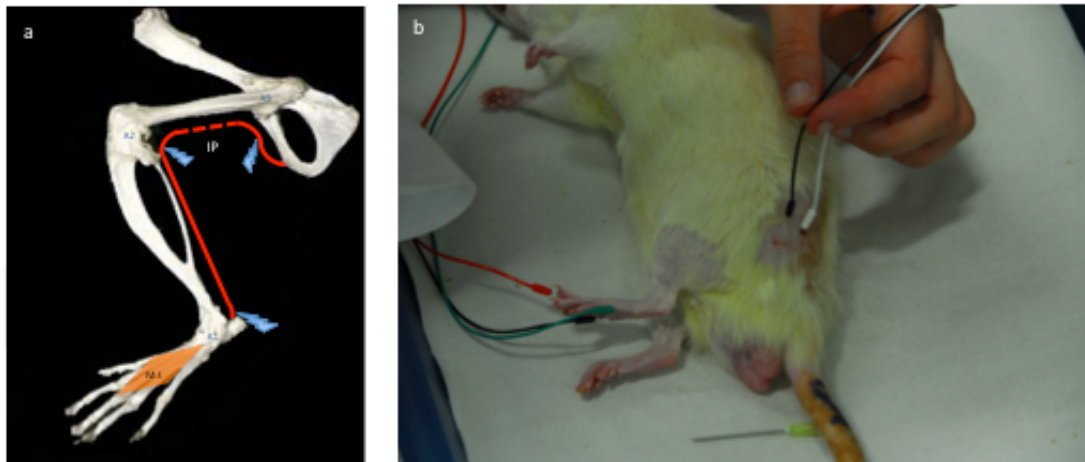
Alle beschriebenen Messungen wurden mit Hilfe eines elektrophysiologischen Diagnostikgerätes, Viking Quest, und der dazugehörigen Software (Viasys Healthcare/ Germany) durchgeführt.

Für eine Messung wurden an dem Tier monopolare Stimulations- und Ableitungs-Elektroden angebracht. Die monopolaren Nadel-Elektroden (Länge: 12 mm; Diameter: 0,3 mm; Viasys Healthcare Supplies 2003- Katalognummer: 019-404700; Nicolet/Germany) wurden unter Berücksichtigung der Anatomie möglichst nahe an den Verlauf des Nerven platziert. Um dies festzustellen, wurden Probeimpulse abgegeben.

Ein zweiter wichtiger Faktor für die Vergleichbarkeit der Werte war die Absicherung, dass jeder Nerv gleich stark, also supramaximal stimuliert wurde.

Dies bedeutete, dass jede Faser des gesamten Nerven und nicht nur Teile dessen bei der Stimulation mit dem applizierten Impuls erregt und sodann ein Summen-Aktionspotential aus sendet wurde.

Hierzu wurde bei jedem Tier die individuelle Reizstärke für die maximale Amplitude festgestellt. Diese entspricht einer maximalen Anzahl erregter Muskelfasern. Dieser Wert lag bei allen Tieren ungefähr bei einer Stimulationsintensität von 3,8 mA. Um abzusichern, dass eine maximale Stimulationsintensität bei allen Tieren zum Einsatz kommt, wurden die Messungen mit einer Reizstärke von 5,4 mA stimuliert. Dieser Wert entspricht dem Intensitätswert für die maximale Amplitude plus ca. 30 %. Er wurde in Anlehnung an die von Dr. A. Rupp<sup>170</sup> dokumentierten Erfahrungen festgelegt.



**Abb. 18** Verlauf des N. Ichiadicus sowie elektro-physiologische Stimmlationsorte  
a) Schematische Darstellung des Verlaufes vom N. ischiadicus bei der operierten Ratte. (IP: Interponat; A1, A3: Stimmlationsstellen; Mm. interosie plantares)  
b) Versuchspfoto mit den angebrachten Elektroden am gesunden, nicht-operierten Bein des Versuchstieres

Ferner erfolgte die Stimulation in den Messungen mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Impulsdauer von 0,2 ms.

Für die Messung der Elektrophysiologie wurden insgesamt fünf monopolare Nadelelektroden für jede Messung auf einer Seite platziert.

Für die Ermittlung der NLG wurden drei Elektroden platziert. Zwei werden für die Messung der Nervenaktionspotentiale entlang der N. ischiadicus benötigt, die dritte Elektrode dient als Null-Elektrode.

**A1:** Liegt dem faserreichsten Endast des N. ischiadicus, dem N. tibialis, auf Höhe der Ferse des Tieres in Höhe des Tarsus an.

**A3:** Diese Elektrode liegt am proximalen Oberschenkel, dem Femur des Tieres an. Sie ist als Trochanter-Elektrode nomenklatiert.

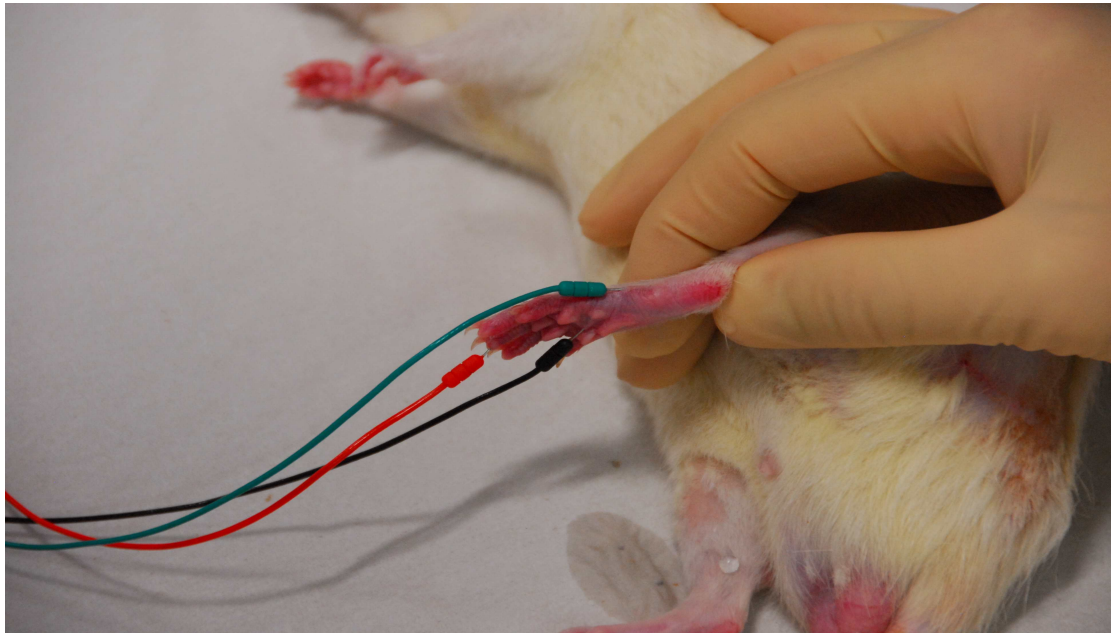
**Null-Elektrode:** Diese Elektrode ist lateral in einem Abstand von ca. 1 cm zu der Elektrode A3 platziert.

Um die NLG der stimulierten Messstrecke bestimmen zu können, muss die Entfernung der Messpunkte in ihrer Länge definiert sein. Dafür wurde das jeweilige Bein des Tieres maximal extensiert und die Abstände zwischen A1 und A3 vermessen. Daraufhin erfolge die Stimulation auf der Strecke A1 → A3 in retrograder Manier.

Die NLG ist definiert als der Quotient von Abstand A1-A3 und der vergangenen Zeit zwischen supramaximaler Stimulation an Position A1 und Ableitung proximal auf Position A3.

$$NLG = \text{Strecke zwischen A1 und A3} / \text{Latenzzeit zwischen A1 und A3}$$

Für die Abnahme des MSAP wurden zusätzlich zwei weitere Elektroden zur Ableitung des Signals in der Region der Endorgane angebracht, welches über die schon beschriebenen Elektroden A1-A3 abgegeben wird. Dabei wird die aktive (negative) Nadelelektrode subkutan direkt über den Mm. interossei plantares (Mm. int.pl.) angebracht. Des Weiteren wird die Referenzelektrode auf Höhe der 3. Zehen über dem M. abductor hallucis longus platziert.



**Abb.19** Ablichtung der Elektrodenlokalisationen am Fuß eines Versuchstieres

Die Stimulation erfolgt anterograd über die Elektroden A1 und A3. Somit wurden pro Seite zwei Messstrecken abgeleitet.

- A1 → Mm. int. pl.
- A3 → Mm. int. pl.

Die abgeleiteten MSAPs wurden in Bezug auf die maximale Amplitude und die Dauer der Erregung ausgewertet. Hierbei ist die maximale Amplitude als der Maximalausschlag der Graphen in dem Abschnitt der gemessenen Dauer definiert. Die Dauer wiederum ist als Periode zwischen dem ersten sichtbaren und dem letzten mit der Enervierung im Zusammenhang stehenden Ausschlag definiert.

Der gesamten elektrophysiologischen Untersuchung können somit folgende Messparameter entnommen werden.

- A1 → Mm.int.pl. (r.;l.) MSAP, incl. Amplitude, Dauer
- A3 → Mm.int.pl. (r.;l.) MSAP, incl. Amplitude, Dauer
- NLG (r.;l.)



## **2.5 Untersuchung des Therapieeffektes von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats mittels morphologischer Parameter**

Neben der funktionellen Evaluierung wurde in den hiesigen Versuchen eine weitere Säule in der Evaluierung der Wirkung von VEGF<sub>165</sub> am peripheren Nerven untersucht. Diese ist die morphometrische Untersuchung, welche auf der Evaluierung post-mortal gewonnener Präparate basiert.

1. N. ischiadicus beidseits
2. M. gastrocnemius -beidseits

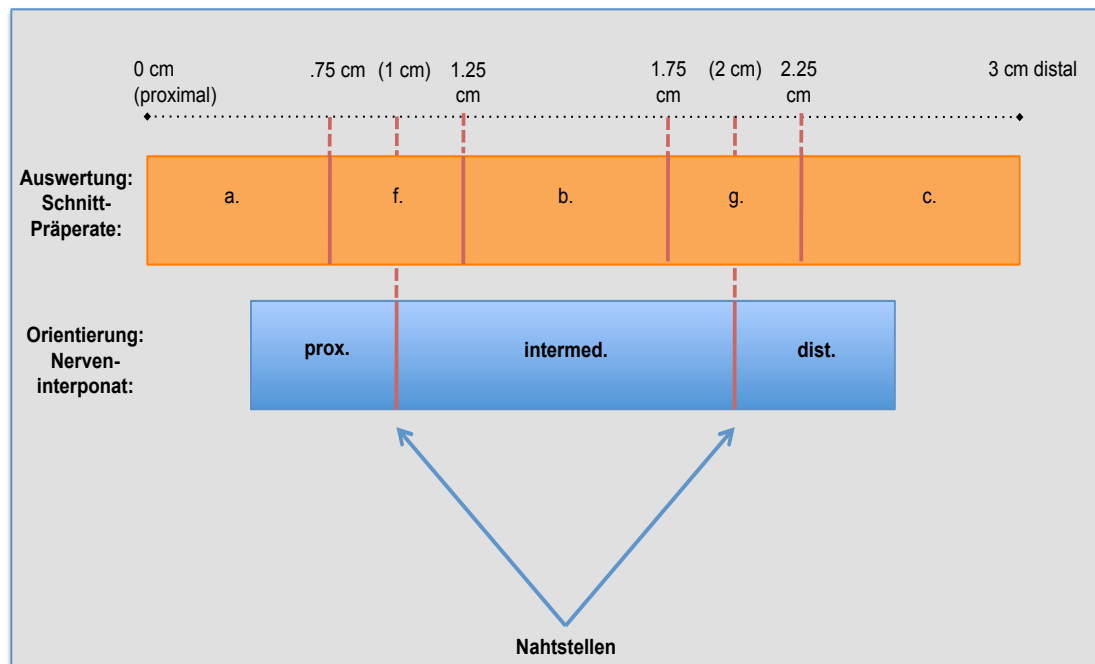
Für diese Gewinnung der Präparate wurden 12 der 16 operierten Tiere verwendet, 6 Tiere der VEGF-Gruppe und 6 Tiere der Kontroll-Gruppe. Die Auswertung fand 17 Wochen „post Op“ statt.

### **2.5.1 Periphere Nervenpräparate - N.ischiadicus**

Der Verlauf des N. ischiadicus wurde, wie im Rahmen der primären Operation, über einen parallel zum Femur laufenden Hautschnitt und durch Wegpräparieren der Muskeln freigelegt. Es war darauf zu achten, dass der Nerv selbst geschont wird. Um den Nerv bestmöglich darzustellen, wurde das umliegende Gewebe radikal entfernt. Somit gelang es, ein ca. 3 cm langes Nervenstück frei zu präparieren, welches vorsichtigst gehoben wurde. Diese Prozedur wurde beidseits aufeinander folgend durchgeführt.

Aus dem ca. 3 cm langen Nervenstück konnten die erforderlichen Präparate für die morphologische Auswertung der operierten, aber auch der nicht operierten Kontroll-Seite entnommen werden. Die Feinpräparation wurde unter Einsatz der Kopflupe (PEAK Head Lupe) durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Nerv stets mit kardioplegischer Lösung (Custidiol®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH) angefeuchtet war. Mit Mikroschere und Pinzette wurden die nachfolgend benannten Nerventeilstücke aus dem entnomme-

nen Präparat vorsichtig zurecht geschnitten. Diese Schnitte erfolgten quer zum Nervenfaserverlauf:



**Abb.20** Schematische Darstellung der morphologischen Schnitte

## 2.5.2 Semidünnschnitte proximal/intermediär/distal des Interponats

Semidünnschnitte in Toluidinblau-Färbung sind eine in der Pathologie sehr bewährte Methode, um feine Nervenstrukturen genau darstellen zu können. Hier dienten sie zur Analyse des Regenerationsgrades anhand von Axon-count, Axondicke und Fibrosierungsgrad.

### 2.5.2.1 Gewinnung und Herstellung der Semidünnschnitte

Semidünnschnitte wurden aus den Nerventeilpräparaten a., b. und c. erstellt. (siehe Abschnitt periphere Nervenpräparate). Auch wurde je Tier ein Präparat aus dem kontralateralen N. ischiadicus auf Höhe der Probe „a.“ der operierten Seite entnommen. Dieses Präparat der nicht operierten Seite wird in der folgenden Ergebnissanalyse als Probe „d.“ bezeichnet.

Für die Herstellung der Semidünnschnitte sind folgende Einzelschritte notwendig (nach dem Protokoll der GSF/ Helmholtz-Zentrum München, Institut für Neuropathologie):

**Fixierung:** Nach der Präparation werden die Nervenstücke in eine 3 %-ige Glutharaldehyd-Cacodylapuffer-Lösung gelegt. Sodann wird mit Hilfe von Waschlösung eine dreimalige, 20 minütige Waschung der Präparate durchgeführt und mit Chromosmiumsäure für 1-2 h nachfixiert.

**Entwässerung:** Für die Entwässerung werden die vorbehandelten Präparate in ansteigend starke Äthanollösungen (30 %, 50 %; 70 %; 90 %, 96 %) für je 15 Minuten eingelegt. Im Anschluss daran folgt eine dreimalige Entwässerung mit 100 %-igem Äthanol, wobei auch hier jeweils 15 Minuten pro Einlagerung veranschlagt werden. Als letzter Schritt der Entwässerung erfolgt eine zweimalige, je 30minütige Einlagerung in Propylenoxid.

**Einbettung:** Für die Einbettung der Präparate für die Semidünnschnitte wird Epon (gebrauchsfertig - siehe Materialien) verwendet. Dieses wurde einen Tag vor Verwendung hergestellt und schließlich in kleine Kapseln gegossen, in die zuvor das Nervenpräparat eingebettet worden war. Bei diesem Schritt ist es wichtig, die Ausrichtung des Nerventeilstücks zu beachten. Die Schnitttrichtung soll in dem späteren Präparat quer zur Nervenfaser erfolgen.

**Polymerisation:** Die vorbehandelten Nervenstücke werden in den Epon-Blöcken über zwei Tage in einem 60 °C warmen Brutschrank auspolymerisiert.

**Schnitte:** Die polymerisierten Blöcke werden getrimmt und unter Beachtung, der schon erwähnten Längsausrichtung im Querschnitt mit dem Ultramikrotom (Leica, Ultracut E) in einer Dicke von 1 µm zugeschnitten. (1 g Toluidinblau in 60 ml 1% Natriumbicarbonat mit 40 ml Glycerin)

Somit entstanden pro Tier vier Schnitte, a-b-c-d, die jeweils für die spezielle Auswertung verwendet werden konnten. Dies ergab eine Gesamtzahl von 12

x 4= 48 Schnitte, die für die Evaluation der beiden Gruppen theoretisch zur Verfügung standen.

#### **2.5.2.2 Verwertung der gewonnenen Semidünnschnitte**

Die Semidünnschnitte des quergeschnittenen N. ischiadicus wurden in drei unabhängig voneinander durchzuführenden Analysen der Auswertung unterzogen.

- Bildanalyse mittels Definiens-Software
- Manueller Axoncount mittels „Counting Grid“ und semiquantitative Analyse der Fibrosierung, Leukozyteninfiltration und epineuralen Neurombildung
- Qualitative Analyse der Semidünnschnitte durch Professor Schlegel, Helmholtz-Zentrum München, Institut für Pathologie

#### **2.5.2.3 Bildanalyse**

Die automatisierte Bildanalyse wurden mit Hilfe digitalisierter Schnittbilder und Definiens-Bildanalyse-Software in Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum München, Institut für Pathologie, durchgeführt.

Mittels des Objekträger-Scanners von Zeiss (Miramax Desk, Zeiss/Germany) wurde die Bilderfassung eines jeden Schnittpräparates unter sehr hoher Auflösung durchgeführt.

Entscheidend war hierbei, dass jedes Bild, unabhängig von der eigentlichen Größe des Bildausschnitts, eine Auflösung von  $1 \text{ Pixel} = 0,23252^2 \mu\text{m}^2$  aufweist. Bei Export-Dateien musste darauf geachtet werden, dass diese identische Auflösung beibehalten wurde, damit die Bilder vergleichbar blieben.

Diese Bilder wurden in das Bildanalyse-Programm Definiens (Definiens Enterprise Image Intelligence TM XD Suite, Definions, München/Deutschland) importiert und hier mit einem speziell dem peripheren Nerven angepassten Analyse Raster analysiert. Das Programm ist in der La-

ge, Strukturen anhand von Pixelfarben und Kontrasten zu identifizieren und diese je nach ihrer Qualifizierung zu quantifizieren.

Um eine möglichst aussagekräftige Analyse zu erlangen, wurden aus jedem Bild eines Schnittes vier bis fünf qualitativ hochwertige, exemplarische Flächen (Sublets) extrahiert und diese schließlich repräsentativ der Bildanalyse unterzogen. Dies geschah unter einem für alle Bilder und „Sublets“ geltenden Analyse-Raster, welches speziell an die Strukturen des PNS angepasst wurde.

Die Bildanalyse Software verfügt somit über folgende fest definierte Parameter, auf Basis deren die Bewertung Pixel für Pixel durchgeführt wurde.

- Definition der zu analysierenden Fläche
- Definition der Pixel-Kontraste bzw.-Farbtiefen für (i) Nervenfasern, (ii) Bindegewebe, (iii) weißer, artefazieller Hindergrund
- Schwellwert zur Differenzierung von großen und kleinen Nervenfasern - dieser wurde auf 250 Px Fläche festgelegt. (Hierbei handelt es sich um einen Erfahrungswert aus dem Institut für Neuropathologie, Helmholtz-Zentrum, München.) Dies entspricht nach Umrechnung über  $1 \text{ Px} = 0.23254^2 \mu\text{m}^2$  einem Diameter von gut  $4 \mu\text{m}$ .

Nach dem Einscannen der Bilder und der manuellen Selektion der repräsentativen Flächen, den sog. Sublets, wurden diese durch die Software nach folgenden Basisdaten untersucht:

- Anzahl der großen Axone / Gesamtfläche [Pixel],
- Anzahl der kleinen Axone/ Gesamtfläche [Pixel],
- beurteilte Gesamtfläche [Pixel],
- Fläche der großen Axone [Pixel],
- Fläche der kleinen Axone [Pixel],
- Füllfläche der Axone [Pixel],

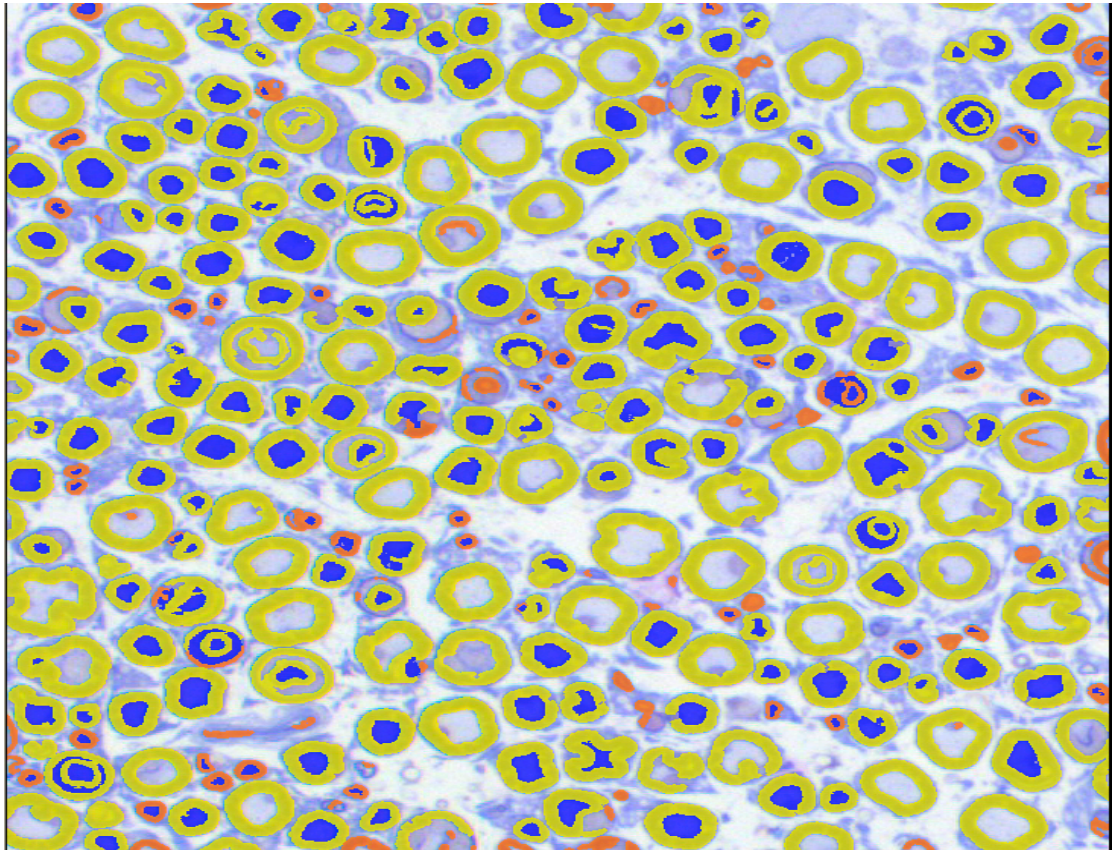
- Fläche des bindegewebigen Anteils [Pixel],
- Artefaktfläche [Pixel], die aus der Analyse ausgeblendet werden.

Da jede der extrahierten Flächen eine unterschiedliche Größe hat, ist es notwendig, eine Vergleichsfläche zu definieren. Diese ist vorliegend mit  $2.500 \mu\text{m}^2$  festgelegt. Jede Anzahl von Daten/ Fläche, die aus den Bildern gewonnen wird, ist somit auf diese Größenordnung zu normen.

Ein Pixel ist eine quadratische Form mit einer Kantenlänge von jeweils  $0,2325 \mu\text{m}$ . Somit gilt:

$$\text{Fläche [X Pixel]} = X * 0.05405625 \mu\text{m}^2 = \text{Fläche } [\mu\text{m}^2]$$

Bei einem Schwellenwert von 250 Pixel zur Unterscheidung von kleinen und großen Fasern ergab sich somit eine Basisdatentabelle, die in eine Vielzahl von Werten umgerechnet werden konnte.



**Abb. 21** Beispielbild der automatisierten Bildanalyse mittels Definiens Software;  
Gelb: als "groß" identifizierte Axone; Orange: als "klein" identifizierte Axone;  
weiß: Artefakt

Von Bedeutung sind insbesondere:

- die Flächenanteile der großen bzw. kleinen Axone am gesamten nervalen Gewebe
- Anteil der großen bzw. kleinen Axone an der Gesamtzahl der Axone
- bindegewebiger Anteil

Die Bildanalyse erstellte eine rein numerische Auswertung der Bilder, welche auf den genannten Kriterien basierte. Durch das vereinheitlichte Softwareraster wurden die Ergebnisse aus den Bildern gut vergleichbar und geben eine fundierte Argumentationsgrundlage für spätere Rückschlüsse. Wie besprochen, besteht durch die vereinheitlichte Analyse eine potentielle Fehlerquel-

le, welche aber über die Beibehaltung der Objektivität relativiert und über die Anzahl der Bilder ausgeglichen werden konnte.

#### **2.5.2.4 Manueller Axoncount und semiquantitative Analyse von Fibrosierung, Leukozyteninfiltration und Neurombildung**

Ziel war es, eine zwischen den Schnitten vergleichbare Quantität an unterschiedlich kalibrierten Axonen (klein, mittel, groß), als auch eine semiquantitative Beschreibung der Fibrosierung, der Leukozyteninfiltration und der Neurombildung zu erstellen.

Eine gesamte Auszählung aller Nervenfasern im Präparat ist zu zeitaufwendig und fehleranfällig, so dass statt dessen einheitliche repräsentative Flächen für die Auszählung der Fasern für die Analyse benutzt wurden. In der Medizin wird dieses u.a. von Labormedizinern zur Auszählung von Blutkörperchen verwendet.

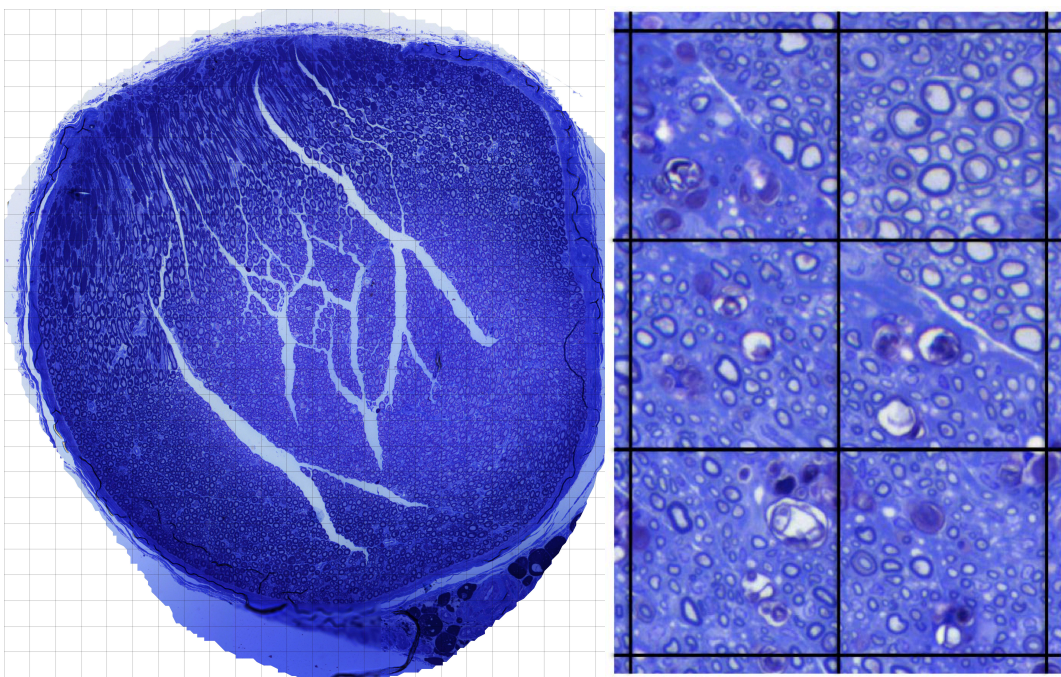
Um ein Raster, dem sog. „Counting grid“ dem eigentlichen Bild zu unterlegen, benutzten wir die zuvor digitalisierten Bilddateien der Schnitte. Diese wurden in Photoshop (Adobe Photoshop CS4) importiert, mit dem wir in der Lage waren, ein virtuelles Raster dem Bild zu unterlegen. Die Kantenlänge eines jeden Quaders wird dabei auf 137 Pixel festgelegt. Dadurch ergibt sich eine Innenfläche von  $2.500 \mu\text{m}^2$ . Pro Bild werden sechs repräsentative Flächen ausgewertet, welche nach dem Zufallsprinzip ausgewählt werden. Bei der Auswahl der auszuwertenden Flächen war zu beachten, dass die Fläche nicht durch perineurale Gewebsbestandteile oder Artefakte durchkreuzt wird. In diesem Fall würde die Anzahl der Neurone pro Fläche durch anderweitige Einflüsse gesenkt werden und wäre daher nicht mehr repräsentativ.

Die morphologische manuelle Analyse wurde in zwei Teile gegliedert; zum einen in den manuellen Axoncount, der in große, mittlere und kleine Fasern unterteilt. Des Weiteren wurden die Kriterien Fibrosierung, Neurombildung und Leukozyteninfiltration als semiquantitative Parameter in den Stufen 1 (schwach ausgeprägt), 2 (mittel ausgeprägt) und 3 (stark ausgeprägt) analy-



siert. Für den semiquantitativen Teil der Analyse war die Information des gesamten Bildes von Interesse. Dabei wurde nicht in repräsentative Flächen unterteilt, sondern vielmehr der gesamte Querschnitt des gescannten Schnittes betrachtet. Die Fibrosierung war zum einen anhand einer geringeren Zelldichte von Neuronen bzw. höheren Anzahl von Fibrozyten sowie der Quantität der bindegewebigen Strukturen zwischen den einzelnen Axonen zu erkennen. Zum anderen war eine stärkere Fibrosierung an der Intensität der bindegewebigen Schichtungen um die Gefäße festzumachen. Die Fibrosierung bezog sich primär auf den Anteil der Bindegewebsanteile in den peri- und endoneuralen Schichten. Die Epineuralschicht war hingegen bei der Analyse des Neuroms mitberücksichtigt.

Vergleichend wurde der Fibrosierungsgrad aufgrund des Anteils von peri- und endoneuralem Bindegewebe eingeteilt, welcher mit der schlechteren Heilung progradient ansteigt. Gleichartig wurde das gewonnene Bild in Bezug auf das Vorkommen von Neuomen analysiert, welche Folge einer nicht



**Abb. 22** Bild mitsamt des durch Photoshop applizierten „Counting-Grid“ zur händischen Auszählung von exemplarischen Flächen

euronenaussprossung sind.

Letztlich wurde die Leukozyteninfiltration als semiquantitativ analysiertes Merkmal ermittelt, welche eine Aussage über die in das Gewebe infiltrierten weißen Blutzellen gibt.

Jede der ausgewählten Flächen wurde nun in Bezug auf die Anzahl von großen, mittleren und kleinen Neuronen ausgezählt. Eine Unterscheidung der verschiedenen Neuronenarten war sehr gut durch Augenmaß vorzunehmen, zumal diese relativ stark geclustert sind und es wenige nicht definierbare „Zwischenfasern“ gibt. Dabei wurden nur jene quergeschnittene Fasern mitberücksichtigt, welche keine Überschneidung mit dem „Counting Grid“ hatten.

### **2.5.3 Schnitte der Koaptationsstellen**

Wie in der Abb. 20 (S. 66) dargestellt, sind f. und g. die Koaptationsstellen des Nerven transplantates. Diese Bereiche sind bei der Nervenregeneration besonders in Bezug auf die Neuombildung von Interesse<sup>210</sup>. Zu einer solchen Neuombildung kann es kommen, wenn die Leitschiene des von proximal aussprossenden Axons nicht mehr vorhanden ist bzw. zu weit entfernt liegt. Aufgrund dessen bildet sich leicht eine Aufknäulung in Form eines gutartigen Tumors des aussprossenden Nervengewebes. In der klinischen Symptomatik führen diese Abnormalitäten zu einer Schmerzsymptomatik. Kommt es zum Auftreten von solchen Neuomen, ist die Funktion des Endorgans eingeschränkt.

#### **2.5.3.1 Gewinnung und Herstellung der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Wie schon die Teilstücke a., b., c. und d. für die Erstellung der Semidünnschnitte entnommen wurden, wurden die Teilstücke f. und g. aus demselben Nervenpräparat gewonnen. Diese wurden sodann zur Konservierung in

hochprozentigem Formalin aufbewahrt. Nach ca. 3 Tagen wurden sie weiterverarbeitet. Um dünne und gleichmäßige Schnitte herstellen zu können, muss das Material Stabilität und eine gleichmäßige Konsistenz aufweisen. Hierzu wurde das Gewebe in heißem Paraffinwachs getränkt, welches bei Abkühlung erstarrte. Da Paraffin nicht wasserlöslich ist, musste das Gewebe zuvor in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden. Anschließend wurde der Alkohol durch ein Intermedium (z.B. Xylol) entfernt und im Anschluss daran das Xylol durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Die von Paraffin durchtränkten Gewebestücke wurden nun in ein Gießschälchen gelegt, mit heißem Paraffin überschichtet und zu einem Paraffinblock verarbeitet, wobei die Einbettkassette, die mit der jeweiligen Fallnummer gekennzeichnet war, den Blockträger bildete. Das Gewebe wird derart angeordnet, dass die zu schneidende Präparatfläche dicht auf dem Boden lagen. Nach Erkalten des Paraffins wird der Block aus der Gießform geschlagen.

Dieser Gewebe-Paraffinblock wurde sodann mit Hilfe eines Mikrotoms in 2 – 5 µm dicke Schnitte geteilt. Diese wurden auf den Objektträger aufgelegt und mit Deckplättchen abgedeckt.

Sodann konnte die Hämatoxylin-Eosin (HE)- Färbung durchgeführt werden. Diese Färbemethode ist Routine in der konventionellen Histologie. Sie bietet eine gute Darstellung zellulärer Bestandteile, wobei nach den durch Hämatoxylin im Blau-Spektrum abgefärbten Kernbestandteilen und den durch Eosin im Rot-Spektrum markierten cytoplasmatischen Zellbestandteilen differenziert werden kann. Die Bearbeitung der Präparate erfolgte in zwei Arbeitsschritten:

#### **Entparafinisierung (i)→ Färbung (ii).**

i) Xylol 1: 100 % 10 Min. →Xylol 2: 100% 10 Min. →Ethanol 100 % 5 Min.→Ethanol 96 % 5 Min. →Ethanol 70 % 5 Min. →Ethanol 50 % 5 Min.→Aqua dest. 15 Sek.

ii) Hämalun 4 Min. → Bläuen in Leitungswasser 10 Min. → Eosinlösung 1 % 30 Sek. → Ethanol 50 % 10 Sek. → Ethanol 70 % 10 Sek. → Ethanol 96 % 10 Sek. → Ethanol 100 % 10 Sek. → Isopropanol 100 % 10 Sek. → Xylol 1 100 % 10 Min. → Xylol 2 100 % 10 Min.

Nach diesen Arbeitsschritten wurden die Objekte eingedeckt und konnten anschließend unter dem Licht-Mikroskop ausgewertet werden.

Letztendlich wurden die Schnitte anhand von mikroskopischen Merkmalen semiquantitativ nach folgenden Kriterien analysiert: (1) kein oder kaum darstellbares Neurom; (2) leicht ausgeprägte Neurombildung am Nerven; (3) stark ausgeprägte Neurombildung am Nerven.

## **2.6 Untersuchung des Therapieeffektes von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats mittels Gewichtsbestimmung des M. gastrocnemius**

Noch vor der Entnahme des Nervenpräparates wurde jedem in München ausgewerteten Tier der M.gastrocnemius beidseits entnommen, equivalent an den Sehnenansätzen präpariert und gewogen. Der Quotient des rechten zum linken Muskelgewichts konnte dann Aufschluss über eine mögliche Atrophie im Rahmen der Deinnervierung geben<sup>50 119</sup>. Um eine Vergleichbarkeit der Muskelgewichte unter den Tieren zu gewährleisten, wurde dieses in Relation zu dem Körpergewicht des jeweiligen Tieres gestellt werden.

## **2.7 Untersuchung des Therapieeffektes von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats mittels Bestimmung der Mikrogefäßdichte - Corrosion Cast**

Die Mikrogefäßdarstellung der neuralen Gefäßplexi wurde mit Hilfe von Professor Konderding, Lehrstuhl für Anatomie, Gutenberg-Universität-Mainz, durchgeführt. Das „Microvascular Corrosion Casting“ ist eine an dreidimensionalen Gefäßausgusspräparaten durchgeführte Rasterelektronenmikroskopie, mittels derer ein kontrastreiches Bild des neurovaskulären Plexus er-

stellt wird. Diese Bilder geben Aufschluss über intravaskuläre Distanzen, Segmentlängen, Aufzweigungshäufigkeiten, Durchmesser oder Aufzweigungswinkel<sup>138 133</sup>, sind gleichzeitig sehr artefakt-anfällig<sup>216</sup>.

### **2.7.1 Injektionsmodell**

Nach der im Kapitel „Narkose“ beschriebenen Anästhesie wurden die Tiere betäubt. Wie im Kapitel „Operation“ beschrieben, wurden diese Tiere jeweils gruppenspezifisch blind behandelt und im Anschluss 17 Wochen post OP begleitet. Dabei wurde der SFI und der SSI für diese Tiere erhoben.

### **2.7.2 Beendigung der Versuche und Erstellung der Präparate**

Um die nötigen Präparate für die Corrosion Cast der vier Tiere zu erhalten, mußten die Gefäße in ihrer gesamten Struktur erhalten bleiben und gleichzeitig das umliegende Gewebe, welches den Blick für den Pathologen versperrt, herausgelöst werden.

Um dies zu gewährleisten wurden zwei Abfolgen von Arbeitsschritten durchgeführt:

Für den ersten Schritt wurde das jeweilige Tier mit Hilfe von Isofluran, wie im Kapitel „Narkose“ beschrieben, vornarkotisiert. Dem Tier wurde zusätzlich 0,3 ml Heparin und anschließend 0,4 ml Narkoren i.p. injiziert.

Um den polymerisierenden Stoff Mercor zu injizieren, wurde der Brustkorb geöffnet und ein großkalibriger Zugang in die Aorta des narkotisierten Tieres gelegt. Über diesen Zugang wurden zunächst ca. 40 ml einer mit Heparin versetzten 0,9 %-igen NaCl-Lösung (200 ml NaCl+ 0,5 ml Heparin) injiziert. Im Anschluss daran wurde das Tier mit ca. 30 ml einer 2,5 %-igen Glutharaldehyd-Lösung fixiert. Der entscheidende Schritt für die später folgende Mikrogefäßdarstellung war die nun folgende Injektion von 80 ml einer Mercor-Härter Mischung. Der Härter selbst ist wiederum mit Methylmethacrylat im Verhältnis von 9/1 vorgemischt. Kurz vor der Injektion wird dieses Gemisch

mit Mercox im Verhältnis 1 : 4 aufbereitet und wie auch alle anderen injizierten Stoffe auf 37 °C Körpertemperatur erwärmt.

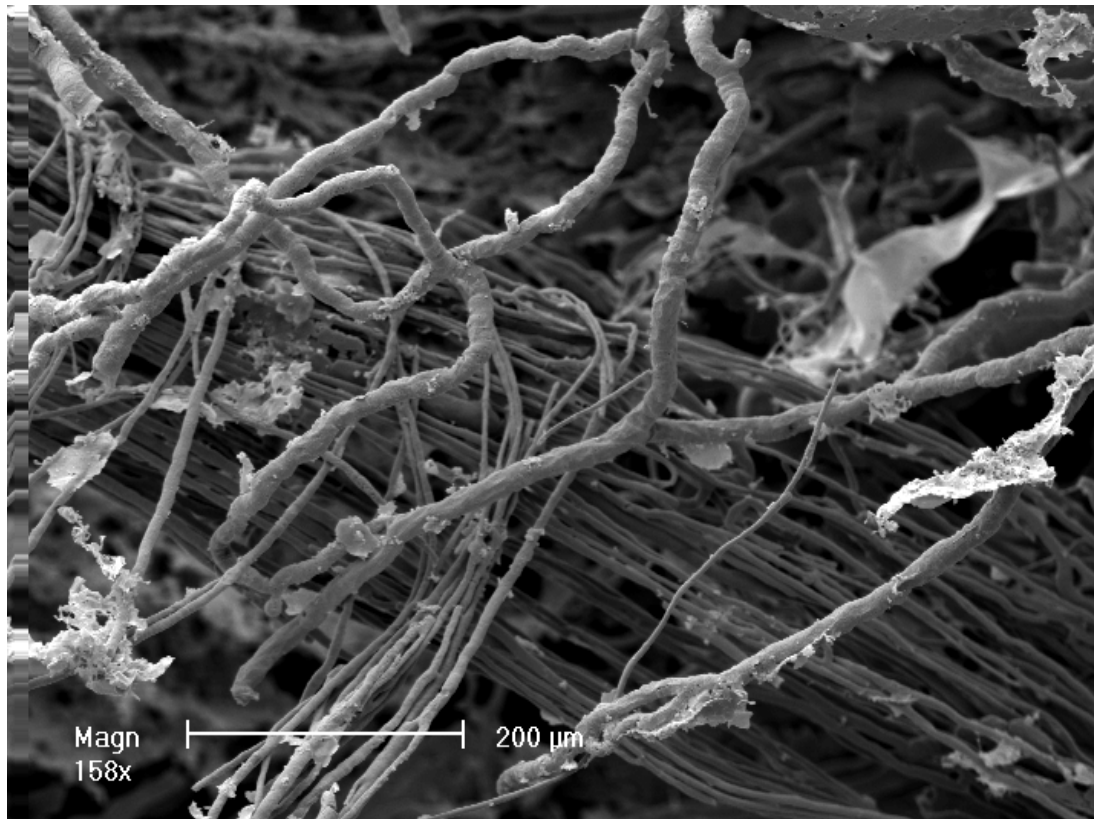
Nachdem das Mercoxgemisch vollständig injiziert war, wurde das nun perfundierte verstorbene Tier für ca. 30 Minuten in ein körpertemperaturwarmes Wasserbad gelegt. In diesem gewichtsneutralen Zustand konnte die sich in den Gefäßen befindliche Mercoxhärter-Lösung aushärten. Sodann wurde das operierte Bein des jeweiligen Tieres dem Femur entlang eröffnet und das bekannte Nervensegment großräumig herausgetrennt. Es ist darauf zu achten, dass der Nerv und das umliegende Gewebe möglichst atraumatisch behandelt werden. Ansonsten bestände die Gefahr, die feinen, durch Mercox erhärteten Gefäße zu zerstören, so dass eine relevante Auswertung unmöglich würde. Dieses Nervensegment wurde schließlich im Anschluß in

Die Auswertung als solche wurde am Institut für Anatomie, Gutenberg-Universität-Mainz, zusammen mit Professor Konerding durchgeführt<sup>216</sup>. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) können die Gefäße des Neural-Plexus am Betroffenen N. ischiadicus dargestellt werden.

### **2.7.3 Auswertung der Mikrogefäßdichte**

Die kleine Anzahl der untersuchten Tiere sowie die Artefaktanfälligkeit des Verfahrens erlauben keine quantitative Aussage über den Grad der Mikrovaskularisierung. Vielmehr war es das Ziel, anhand der Bilder einen qualitativen Wert in Form einer semiquantitativen Bestimmung zu erlangen.

Für die Auswertung der Mikrogefäßdichte wurden vier Tiere verwendet: Zwei Tiere der VEGF-Gruppe (Tiere: VEGF II; VEGF IX) und der Kontroll-Gruppe (K 1; K4). Hinsichtlich der logistischen Grundvoraussetzungen konnte an diesen Tieren die Endauswertung nur hinsichtlich der Mikrogefäßdichte erfolgen. Die funktionelle Messung der Regeneration wurde, wie bei allen anderen Tieren, anhand des SFI und SSI durchgeführt.



**Abb.23** Corrosion Cast; beispielhafte Darstellung der Mikrogefäße

## 2.8 Statistische Auswertung

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München (Dipl. Math. R. Busch) wurde die statistische Auswertung durchgeführt.

Da aufgrund der geringen Tieranzahl keine Normalverteilung vorlag, wurden die Daten mittels des Mann-Whitney-Tests für unabhängige Variablen gegeneinander getestet. Die p-Werte wurden mit Hilfe der Statistik Software (Statistical Package for the Social Science - SPSS, Version 11.6; SPSS Inc. Chicago, USA) berechnet.

In Absprache mit Frau Busch wurden folgende Schwellwerte für den p-Wert mit Blick auf die statistische Aussagekraft festgelegt:  $0.2 \geq p > 0.05$  = Trend;

$0.05 \geq p > 0.01$  = signifikant;  $0.01 \geq p > 0.001$  = hoch signifikant;  $0.001 \geq p$  = sehr hoch signifikant

Die Korrelation diverser Parameter eines Tieres wurde mittels des Spearman's Test festgestellt. Der hierbei errechnete Rho-Wert gibt den Betrag für die Korrelation an. Er liegt zwischen  $-1 < 0 < 1$ . Eins steht für die 100 %-ige Übereinstimmung der Werte, 0 für die Null-Korrelation und -1 für eine negative Korrelation. Es handelt sich bei diesem Test um einen nicht-parametrischen Test. Dabei werden die einzelnen Werte der Größe nach geordnet und dann diese Reihenfolge von Gruppe zu Gruppe verglichen.

Auch kann aus diesen Werten eine statistische Signifikanz errechnet werden. Hierfür gelten wiederum die schon bekannten P-Werte

## **2.9 Tierhaltung**

Das Tierversuchsvorhaben ist gemäß § 8 Abs. 1 des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18.05.2006 bei der Regierung von Oberbayern angemeldet und gemäß Genehmigungsnummer 55.2-1-54-2531-66-06 der Regierung von Oberbayern am 21.08.2006 zugelassen.

In dieser Studie wurden männliche Crl:CD(SD)-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 300 g verwendet. Alle Tiere stammten aus den Charles River Laboratorien, Sulzfeld. Die Tiere wurden präoperativ zu viert und postoperativ zu zweit in Makrolon-Standardkäfigen Typ III gehalten. Futter (Rattenpellets 1320, Altromin GmbH, Lage) und Wasser (Trinkwasser aus Nippeltränken bei täglichem Wechsel) erhielten die Tiere ad libitum. Gemäß den Vorgaben zur Versuchstierhaltung wurden die Tiere in speziellen Tierhaltungsräumen aufbewahrt. Der Tag-Nacht-Rhythmus mit jeweils zwölfstündigen Hell- und Dunkelphasen wurde durch eine automatische Beleuchtungssteuerung mit einer Lichtintensität bis 100 lx simuliert. Die Raumtemperatur betrug 20 - 25 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 - 70 %.



Die Operationen wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

Postoperative Analgesie wurde durch subkutane Injektion von 0,02 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, München) alle zwölf Stunden über einen Zeitraum von drei Tagen gesichert. Zur Verhinderung möglicher Automutilation wurde Perphenazin-Enanthat (Decentan- Depot, Merck, Darmstadt) in einer Dosis von 5 mg/kg KG in 1 %-iger Lösung in mittelkettigen Triglyceriden (Miglyol 812®, Caesar & Loretz, Hilden) intramuskulär injiziert. Die erste Injektion erfolgte einen Tag präoperativ, die weiteren Injektionen im Abstand von jeweils drei Tagen über den gesamten Versuchszeitraum. Die Euthanasie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 150 mg/kg KG Pentobarbital (Narcoren®, Fa. Merial, Hallbergmoos).

### 3. Ergebnisse

Alle Ergebnisse liefern einen generalisierbaren Trend, der sich durch die AdCMV.VEGF<sub>165</sub> und die Kontroll-Gruppe hindurch deutlich niederschlägt. In einem zweiten Schritt können die Ergebnisse der VEGF-Behandlungen bzw. der Kontrolle differenziert werden. So zeichnet sich in den meisten Fällen eine Ergebnislage ab, die sich positiv für die mit VEGF behandelten Tiere darstellt.

#### 3.1 Titerbestimmung und Verifizierung von AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

Die Titerbestimmung erfolgt nach der Amplifikation. Der dafür benutzte Plaque test erbrachte einen Virustiter von  $6 \times 10^8$  pfU/ml.

Bei einer Verdünnung von  $1 \times 10^{-8}$  konnten in dem eingesetzten Volumen von 200 µl zwölf Plaques eindeutig gezählt werden. Durch die Formel:

$$\frac{\# \text{ Plaques}}{d \times V} = \text{pfU/ml} \quad \begin{array}{l} d = \text{Verdünnungsfaktor} \\ V = \text{Volumen des verdünnten Virus in ml pro Petrischale} \end{array}$$

errechnete sich folgender Titer:

$$\frac{12}{1 \times 10^{-8} \times 0,25 \text{ ml}} = 6 \times 10^8 \text{ pfU/ml}$$

Die Verifizierung des AdCMV.VEGF<sub>165</sub> ist notwendig, um eine eventuelle Wiedergewinnung der Replikationskompetenz des Virus während des Amplifikationsprozesses auszuschließen. In seltenen Fällen kann die bzw. kann ein Teil der E1A-Region des Transgens mit seinen replikationsbefähigenden Sequenzen von stabilen Zelllinien während der Amplifikation übertragen werden. Der Ausschluss einer solchen Replikation wurde mit Hilfe einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Agarosegel-Elektrophorese sicherge-

stellt. So wurde E1A als Replikationskompetenz ausgeschlossen und gleichzeitig eine Positivkontrolle für E2A durchgeführt.

Die Untersuchung des Virusgenom von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> auf E1A war negativ. Der Positiv-Test für die E2A Region war dagegen in allen Fällen positiv.

Für das Viren-Serum war somit sichergestellt, dass eine Replikation in vivo nicht möglich ist. Der Titer des viralen Serums war  $6 \times 10^9$  pfU/ml.

### **3.2 Ergebnisse der funktionellen Parameter nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats**

Die funktionellen Parameter der versuchsbegleitenden Auswertung sind in die statischen und funktionellen Werte unterteilt. Im Falle der dynamischen Werte werden die einzelnen Parameter für jede Woche in dem SFI-Wert gebündelt. Die statischen Einzelparameter werden im SSI zusammengefasst.

#### **3.2.1 Dynamische Parameter**

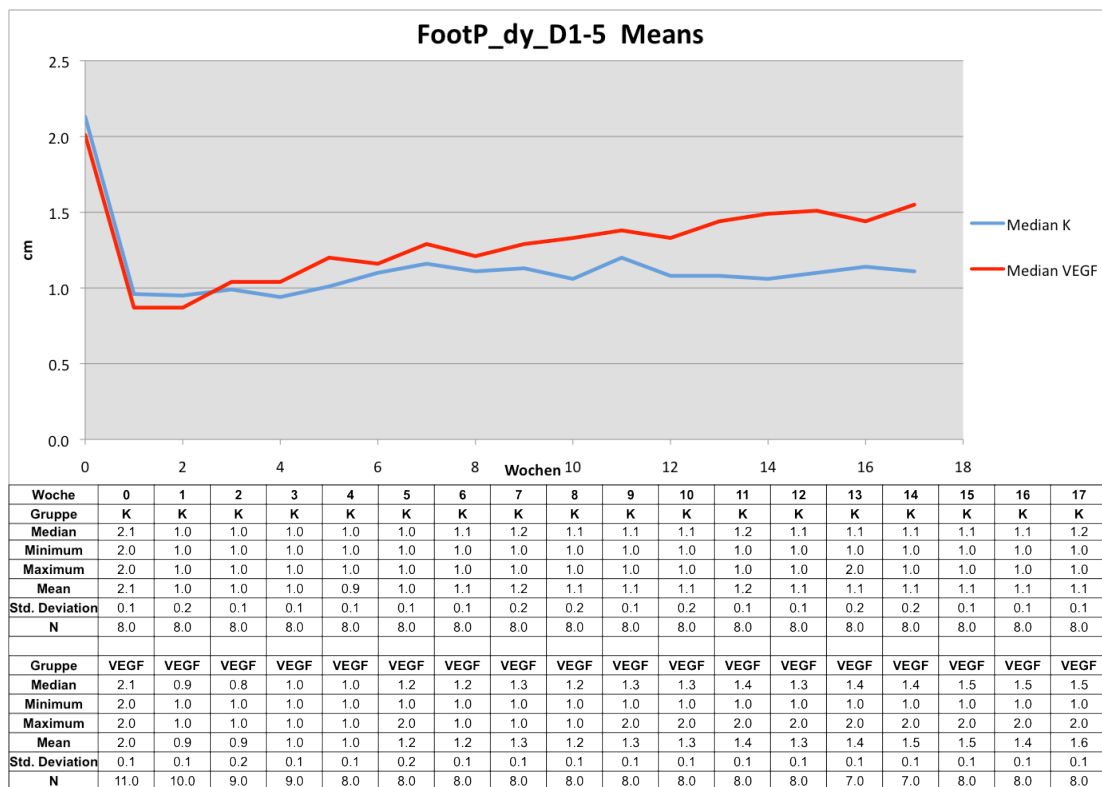
##### **3.2.1.1 Zehenspreizung D1-5**

Der Abstand des 1. vom 5. Zeh hatte bei beiden Gruppen einen Ausgangswert von ca. 2 cm. Auf Grund des nervalen Ausfalls sind die Tiere nach der Operation nicht in der Lage, die Füße auf der operierten rechten Seite zu spreizen. Somit fällt dieser Wert auf der operierten Seite auf weniger als 1 cm ab. Dies entspricht nicht mehr als der Fußbreite, welche ohne jegliche Spreizung der einzelnen Zehen zustande kam. Über die Zeit entwickelte sich eine Wiedergewinnung der Spreizfähigkeit. Dies kann als progrediente Reinnervation interpretiert werden. Dabei sind die Gruppenunterschiede sehr eindeutig.

Die Tiere mit VEGF-Behandlung erreichten im Durchschnitt einen Wert von fast 1,60 cm, wobei die Tiere ohne VEGF-Behandlung bei gut 1 cm stagnierten. Die genauen Werte sind in der Ergebnistabelle aufgeführt.

## Statistische Auswertung:

Ab der 9. Woche zeigen sich kontinuierlich bis zum Versuchsende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Dabei weisen diese in der 14., 15. und 17. Woche eine hohe und sehr hohe Signifikanz auf.

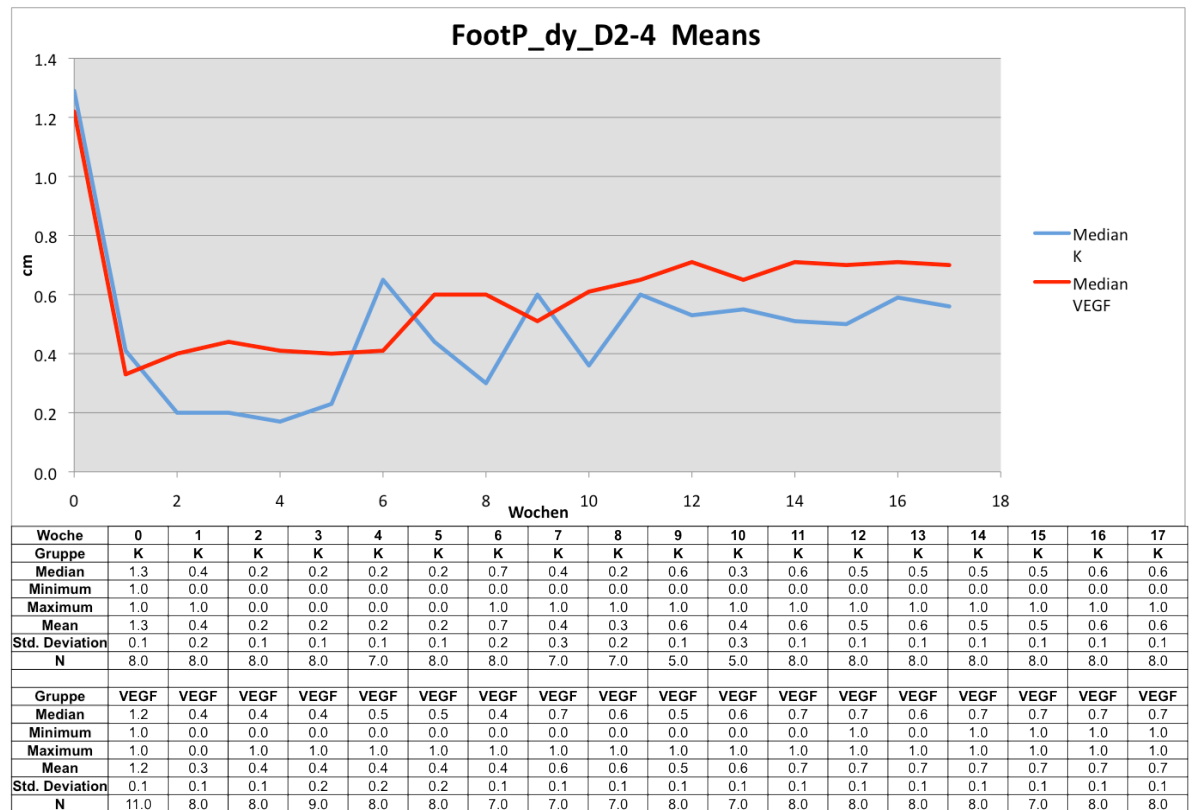


**Abb.24** Ergebnisse der dynamisch gemessenen Zehenabstände D1-D5

### 3.2.1.2 Zehenspreizung D2-4

Ähnlich wie in der Abnahme der Spreizung zwischen Zeh 1 und 5, kam es bei diesem Parameter, dem Abstand zwischen 2. und 4. Zeh, zu einem Einbruch der Werte in der post-operativen Messung. Im Laufe der 17 Wochen langen, wöchentlichen Messung zeigte sich tendenziell ein gruppenunabhängiger Verlust der Funktionalität. Der präoperativ gemessene Ausgangswert von ca. 1,3 cm fällt bei den Tieren postoperativ auf etwa 0,4 cm ab. Am Ende der Versuchsdauer erreichten die Tiere der Kontrollgruppe im Median einen Wert von 0,6 cm, die der VEGF-Gruppe einen von 0,7 cm.

**Statistische Auswertung:** Ab der 2. Woche ergeben sich bis auf Ausnahmen in der 1., 7., 9. und 11. Woche signifikante Unterschiede bzw. ein Trend zwischen den beiden Gruppen.

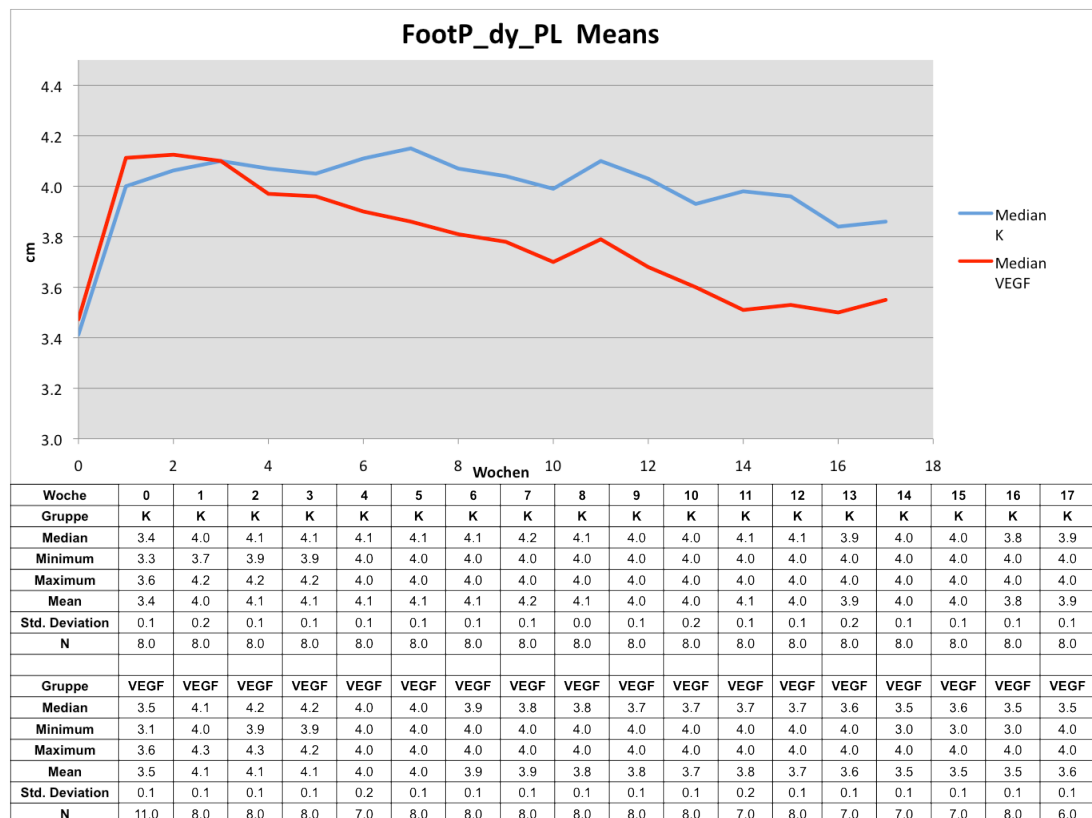


**Abb.25** Ergebnisse der dynamisch gemessenen Zehenabstände D2-D4

### 3.2.1.3 Abdrucklänge (Print - Length)

Die Vergrößerung der Abdrucklänge, die von der Spitze des 3. Zehs bis zum Ende des Versenabdruckes gemessen wurde, ergibt sich aus einer Verkleinerung des Tarsalgelenkwinkels. Der im Verlauf des Versuches aufgezeigte gruppenunabhängige Trend zur Verkürzung des Abdrucks lässt sich als Parameter für die Reinnervation der verantwortlichen Muskeln, dem M. biceps femoris und M. gastrocnemius/soleus interpretieren. Dieser war in beiden Versuchsgruppen festzustellen.

Hierbei ergibt sich, dass die Abdrucklänge im Durchschnitt in beiden Gruppen um ca. 20 % postoperativ zunahm. Im Laufe der Versuchsdauer zeigten sich in der mit VEGF behandelten Gruppe Werte, die annähernd wieder den präoperativen Ausgangswerten entsprachen. Im Fall der Kontrollgruppe werden diese nicht erreicht. Vielmehr verbessern sich die postoperativen Werte nur um wenige Prozent.



**Abb.26** Ergebnisse der dynamisch gemessenen Fußabdrucklänge

### Statistische Auswertung:

Im zeitlichen Verlauf des Versuches zeigen sich ab der 7. Woche nahezu ausschließlich signifikante, teilweise auch hoch und sehr hoch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Schon in den Wochen 4 und 5 zeigt sich ein Trend mit einem p-Wert von 0.079 und 0.103.

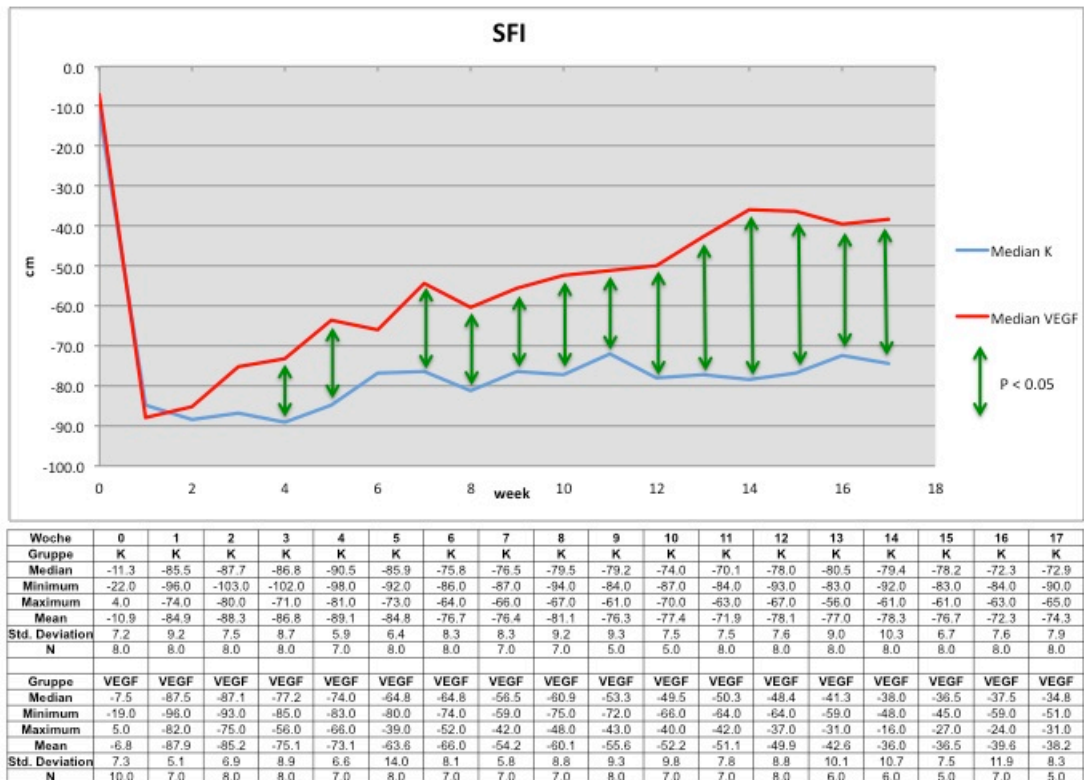
#### **3.2.1.4 SFI- Koeffizient**

Der SFI ist ein Quotient, der die dynamischen Parameter in ein aussagekräftiges Verhältnis setzt.

Nach der Formel werden die Werte für den SFI von jedem Tier/Woche berechnet. Dabei ergeben sich Werte, die sich um ein Zahlenspektrum von 0 und -100 annähern. -100 entspricht einer 100 %-igen Verlust der Funktionalität. Ein SFI von 0 dagegen ist der Normalwert bei 100 %-iger Funktionalität.

Es ist deutlich erkennbar, dass es nach der Operation in beiden Gruppen zu einem signifikanten Einbruch der Funktionalität kommt. Von einem Ausgangswert in beiden Gruppen von ca. - 10 fallen die Werte gruppenunabhängig auf fast - 90 ab. Mit Blick auf den Ausgangswert von - 10 kann verdeutlicht werden, dass diese Werte tatsächlich nur eine Annäherung sind und deswegen bei der anschließenden Diskussion nicht mit den absoluten Zahlen, sondern mit dem auf diesen basierenden Trend argumentiert werden darf. So geht es um eine Beschreibung einer Tendenz, welche wiederum eine sehr hohe relative Aussagekraft hat.

Im Laufe der Messungen zeigt sich aber eine deutlich bessere Regeneration der Funktionalität auf Seiten der mit VEGF behandelten Gruppe. Diese erreicht nach 17 Wochen einen Wert, der nur ca. 30 % unter dem präoperativen Ausgangswert liegt. In der Kontrollgruppe hat die Funktionalität nach 17 Wochen einen Wert von ca. 74 % erreicht und liegt damit fast doppelt so tief wie VEGF-Gruppe.



**Abb.27** Ergebnisse des errechneten SFI

## Statistische Auswertung:

In der statistischen Berechnung der Signifikanz der SFI-Werte aus beiden Gruppen zeigten sich bis auf die Werte der Wochen 1,2 und 6 signifikante, teilweise sogar hoch und sehr hoch signifikante Werte.

### 3.2.2 Statische Parameter

Die statistischen Parameter wurden nur mittels der Zehenabstände ausgemacht. Wie beschrieben, unterscheiden sich hier zwei Parameter.

#### 3.2.2.1 Zehenspreizung D1-5

Die Werte, welche im Laufe der Versuchsdauer erhoben wurden, haben die gleiche Tendenz, wie sie bei den dynamischen Parametern beschrieben



wurden. So kam es nach der OP in beiden Gruppen zu einer deutlichen Abnahme der Zehenspreizung.

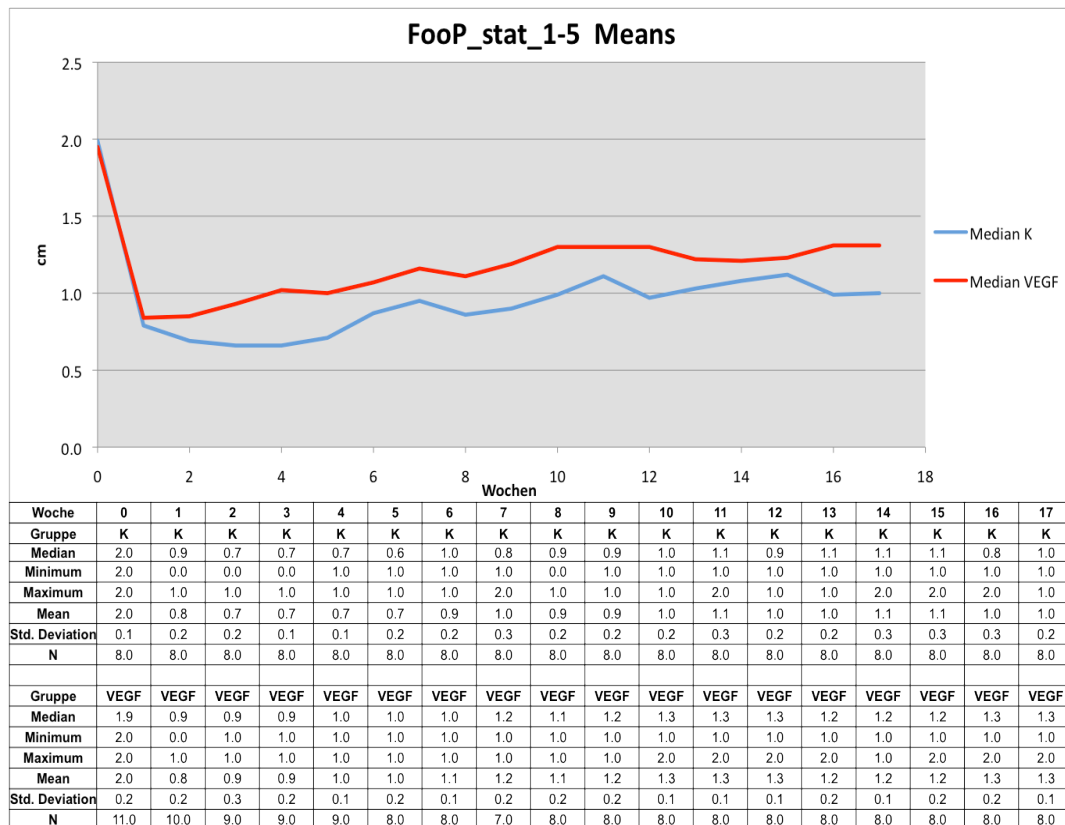


**Abb.28** Beispielhafte Abbildung der Messung des statischen Fußabdrucks

Nach einem Abstand von ca. 1,5 cm fallen die Werte postoperativ auf ca. 0,6 cm ab. Im Laufe des Versuches stiegen die Werte bis auf knapp 70 % des Ausgangswertes wieder an. Die Kontrollgruppe hat wies einen wesentlich langsameren Wert auf und beträgt in der 17. Woche gut 50 %.

#### **Statistische Auswertung:**

Bei der Hälfte der Werte zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Allerdings sind die Unterschiede in den Wochen elf und 14 im späteren Verlauf der Versuche nicht signifikant und stören das Bild.



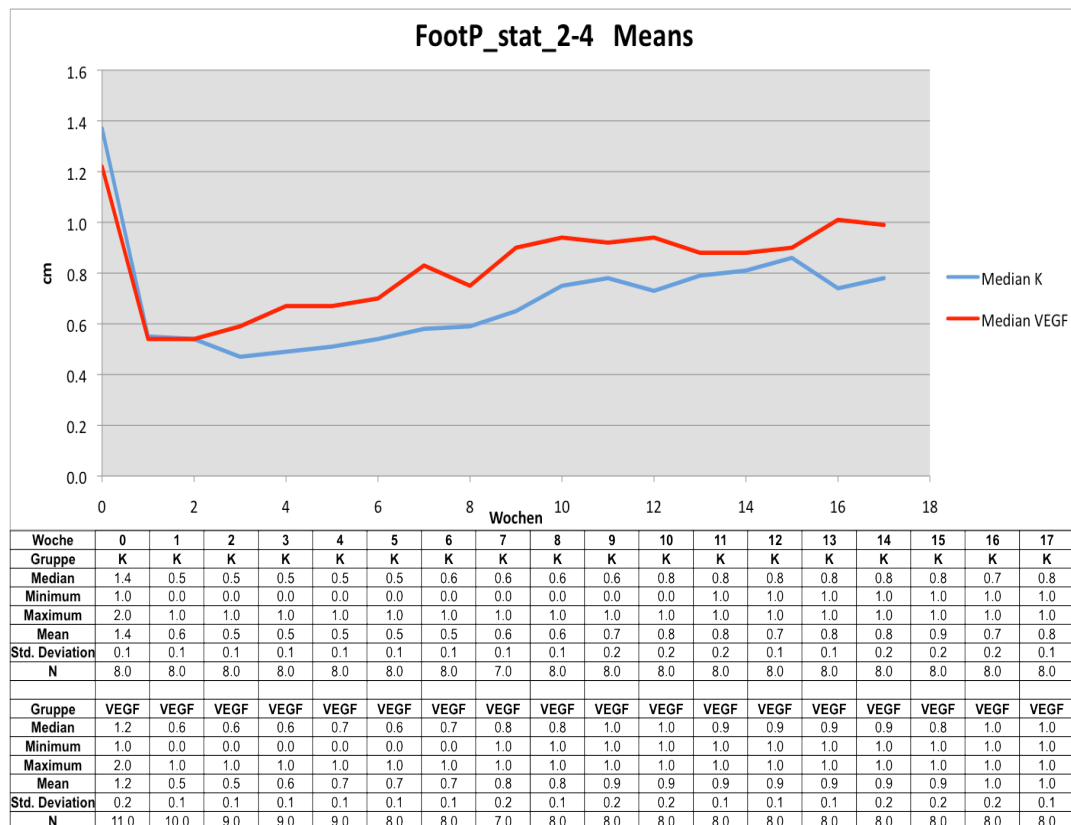
**Abb.29** Ergebnisse der statisch gemessenen Zehenabstände D1-D5

### 3.2.2.2 Zehenspreizung D2-4

Wie schon bei den Werten des statischen Parameters D 1 - 5, zeigte sich bei der Zehenspreizung D 2 - 4 ein postoperativer Abfall auf ca. 40 % des Ausgangswertes von ca. 1,3 cm. Im Laufe der Zeit regenerierten sich die mit VEGF behandelten Tiere auf ca. 80 %, wobei die Kontrollgruppe eine Regeneration von knapp 60 % aufzeigte.

#### Statistische Auswertung:

Ähnlich wie bereits in den Ergebnissen der statischen Zehenspreizung von D 1 - 5 beschrieben, zeigt sich auch hier eine Reihe von signifikanten Unterschieden in den jeweiligen Wochenergebnisse. Allerdings konnten bei diesen Ergebnissen in der 14., 15. und 16. Wochen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



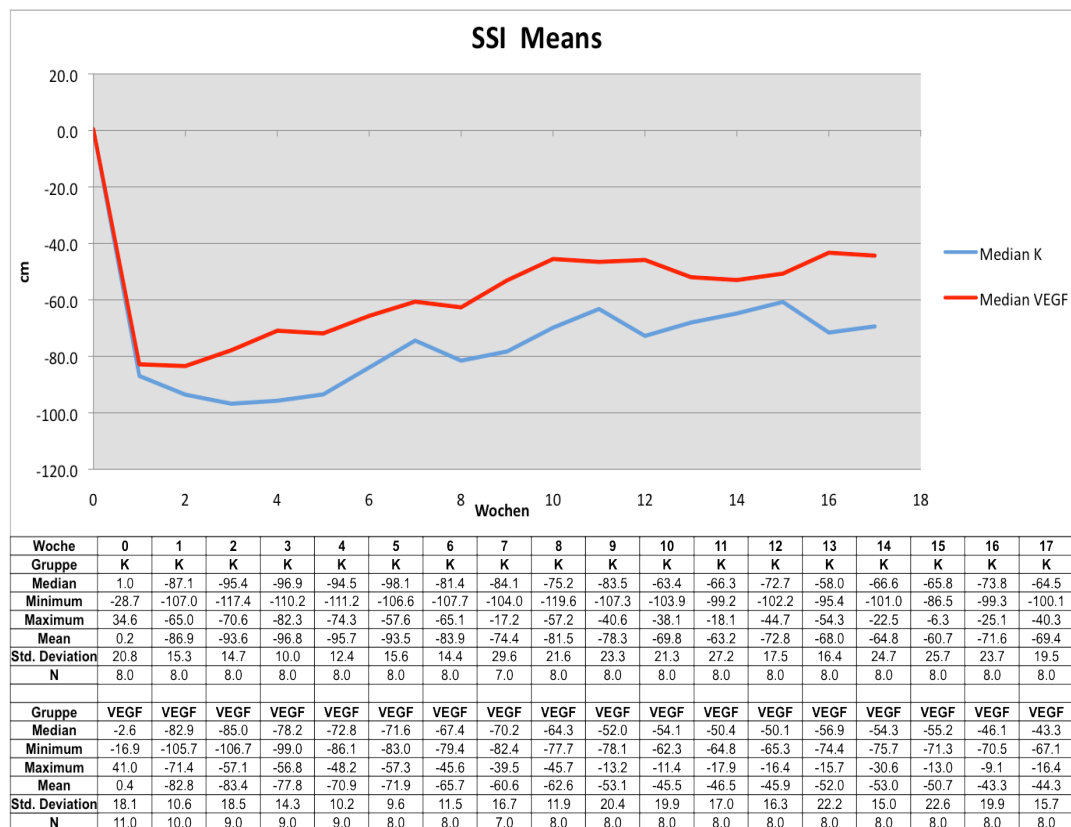
**Abb.30** Ergebnisse der statisch gemessenen Zehenabstände D2-D4

### 3.2.2.3 SSI- Koeffizient

Ähnlich wie bei dem SFI berechnet sich der SSI aus den Einzelparametern.<sup>184</sup> Der Median des SSI aller Tiere fällt im Verlauf von der postoperativen Messung von - 0,16 auf einen Wert von - 92 in der zweiten postoperativen Woche. Mit einem Fehler von +/- 10 sind die Werte für beide Gruppen hierbei gut vergleichbar. Im Laufe der Versuche bestätigte sich dann auch hier die Tendenz einer besseren Regeneration der mit VEGF behandelten Gruppe. Nach 17 Wochen zeigten die Tiere der VEGF Gruppe einen 40 % besseren Wert als die Kontrolle.

#### Statistische Auswertung:

Die Unterschiede zwischen den Gruppen zeigen in 10 Fällen über den zeitlichen Verlauf von 17 Wochen signifikante Unterschiede. Dabei sind die Werte der Woche 12 als hochsignifikant ( $p = 0,001$ ) und die der Wochen 10 und 4 als sehr hochsignifikant ( $p = 0,0001$ ) berechnet.



**Abb.31** Ergebnisse des errechneten SSI

### 3.3 Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats

Die Ergebnisse der hier durchgeführten motorischen Neurographie setzten sich aus fünf Einzelparametern/je Seite je Tierseite zusammen. Daraus errechnete sich ein Quotient aus der operierten (rechts) und unoperierten (links) Seite, welcher für den Vergleich zwischen mehreren Tieren, unabhängig von individuellen Varianzen, verwendet werden konnte.

Die MSAP sind nach Amplitude und Dauer unterteilt. Dabei wurde an zwei unterschiedlichen Stellen am Bein stimuliert und in beiden Fällen distal über die Mm. interossei plantares (Mm. int. pl) das MSAP abgenommen. Die NLG wurde zwischen den beiden für die MSAP verwendeten Stimulationsstellen abgeleitet.

Hierdurch werden die bei den verschiedenen Tieren gefundenen Ergebnisse, unabhängig von deren jeweiliger Konstitution, repräsentativ vergleichbar.

1. (A1 → Mm.int.pl.) Amplitude - rechts/links
2. (A1 → Mm.int.pl.) Dauer - rechts/links
3. (A3 → Mm.int.pl.) Amplitude - rechts/links
4. (A3 → Mm.int.pl.) Dauer - rechts/links
5. NLG - rechts/links

Die Durchschnittswerte zeigen gruppenunabhängige ähnliche Ergebnisse. Die NLG beider Gruppen hatte nach 17 Wochen ein Niveau von ca. 60 % der Vergleichsseite eines jeden Tieres erreicht. Dies entspricht etwa einem absoluten Wert von 25 m/sek. auf der operierten Seite.

Es zeigte sich eine klare Verschlechterung der Werte postoperativ, wobei dieses Ergebnis gruppenunabhängig bei allen operierten Tieren festzustellen ist. Im Vergleich zur nicht operierten Kontrollseite der Tiere zeigte sich, dass sich jeweils die Amplitude und NLG der operierten Seite beider Gruppen nach 17 Wochen auf einem wesentlich geringeren Niveau befanden. Bei der Erregungsdauer war erwartungsgemäß der gegensätzliche Trend zu finden. Diese Werte nahmen zu.

Für die weitere Evaluierung ist auf einen besonderen Faktor hinzuweisen. So war bei der Aufzeichnung der Messungen ein Unterschied der Raumtemperatur in Höhe von 2 °C zu verzeichnen. Die Tiere der VEGF-Gruppe wurden bei ca. 21,5 °C, die Tiere der Kontrollgruppe bei ca. 23,5 °C gemessen.

### Statistische Auswertung:

Die statistische Relevanz wurde mittels der jeweiligen Quotienten der operierten zur nicht operierten Seite berechnet. Dabei zeigten sich keine durch den Whitney-Mann-Test berechneten statistischen Signifikanzen. Obwohl die Mediane beider Gruppen sämtlich eine bessere Entwicklung der mit VEGF behandelten Tiere aufzeigen, sind die Varianzen zu hoch, um diese Werte mit einer statistischen Signifikanz zu belegen.

	Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation		Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Quotient_muskl. Messampl. Tarsus_r/l	K	17%	7%	64%	23%	21%		VEGF	28%	11%	43%	28%	15%
Quotient_muskl. Messampl. Trochanter_r/l	K	11%	6%	125%	38%	58%		VEGF	13%	7%	31%	15%	10%
Quotient_muscl. Erreg.-dauer Tarsus_r/l	K	70%	19%	181%	81%	59%		VEGF	115%	47%	156%	107%	40%
Quotient_muscl. Erreg.-dauer Trochanter_r/l	K	40%	24%	104%	56%	33%		VEGF	53%	46%	88%	61%	17%
Quotient_NLG_r/l	K	49%	46%	57%	50%	4%		VEGF	54%	42%	64%	54%	8%
Quotient_Ampl. / Dauer Trochanter_r	K	12%	8%	24%	13%	7%		VEGF	15%	13%	37%	20%	10%
Quotient_Ampl. / Dauer Trochanter_l	K	43%	20%	88%	47%	26%		VEGF	86%	31%	137%	80%	40%
Quotient_Ampl. / Dauer Tarsus_r	K	33%	15%	47%	34%	12%		VEGF	37%	14%	64%	37%	19%
Quotient_Ampl. / Dauer Tarsus_l	K	100%	78%	237%	124%	59%		VEGF	162%	37%	233%	156%	76%
Quotient (Ampl./Dauer) Trochanter_r/l	K	34%	15%	121%	51%	47%		VEGF	26%	9%	38%	25%	13%
Quotient (Ampl./Dauer) Tarsus_r/l	K	37%	11%	59%	37%	20%		VEGF	28%	9%	37%	26%	12%

**Tab. 7** Ergebnisse der elektrophysiologische Untersuchung

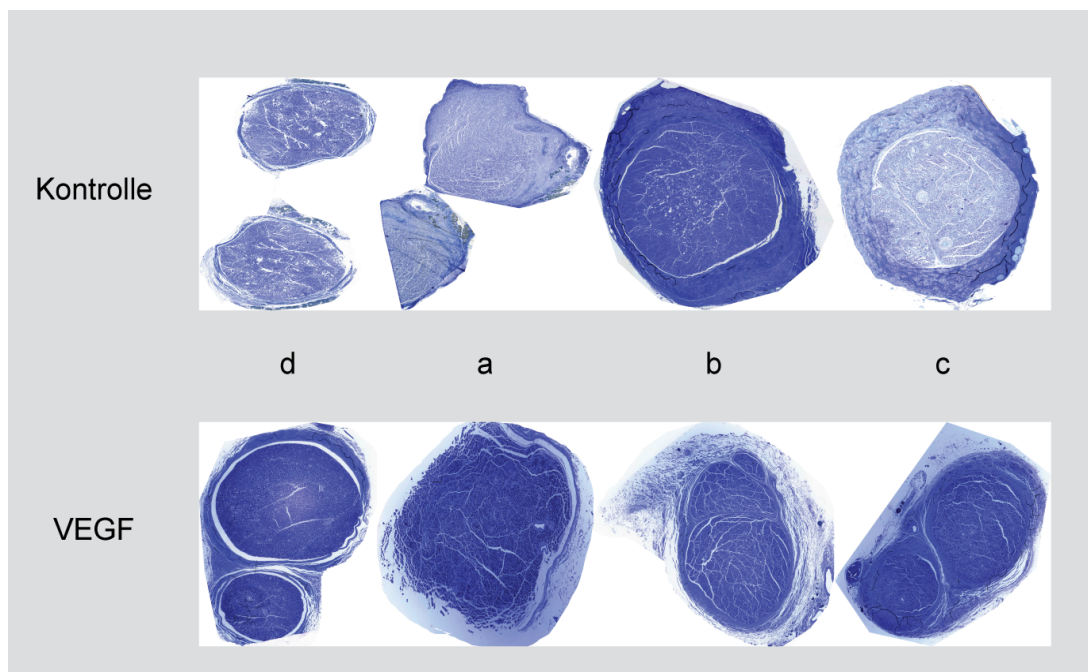
### 3.4 Ergebnisse der morphologischen Auswertung nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerventransplantats

Die morphologische Auswertung der peripheren Nerven stützt sich auf fünf an unterschiedlichen Stellen im Verlauf des Nerven entnommenen morphologischen Schnitten. Die Schnitte mit der Bezeichnung a, b, c und d wurden, wie im Material und Methodenteil beschrieben, zu Semidünnschnitten verarbeitet und aufwendig ausgewertet.

In der zweiten, wesentlich weniger aufwendigen Auswertung wurden H/E-Schnitte nur semiquantitativ ausgewertet.

### 3.5 Semidünnschnitte des Nerven an den Lokalisationen a-b-c-d

Es zeigt sich über beide Gruppen (VEGF-Behandlung & Kontrolle) eine Abnahme der großen, stark myelinisierten und eine gleichzeitige Zunahme der kleinen, dünn myelinisierten Fasern von proximal über das Nerveninterponat nach distal. Parallel dazu kam es entlang derselben Achse zu einer Zunahme der Fibrose- und Neurombildung.



**Abb. 32** Gruppenspezifische Semidünnschnitte/ Schnitthöhe (a,b,c,d)

Trotz der einheitlichen Tendenz in den Resultaten war die Intensität dieser Entwicklung klar von Gruppe zu Gruppe unterscheiden. Demzufolge zeigte sich in der Gruppe der VEGF-behandelten Tiere eine wesentlich weniger ausgeprägte Abnahme der großen Fasern, bei gleichzeitig kaum ansteigen-



der Anzahl kleiner Fasern. Auch ist die Neurom- und Fibroseentwicklung weit weniger stark entwickelt.

### 3.5.1 Bildanalyse

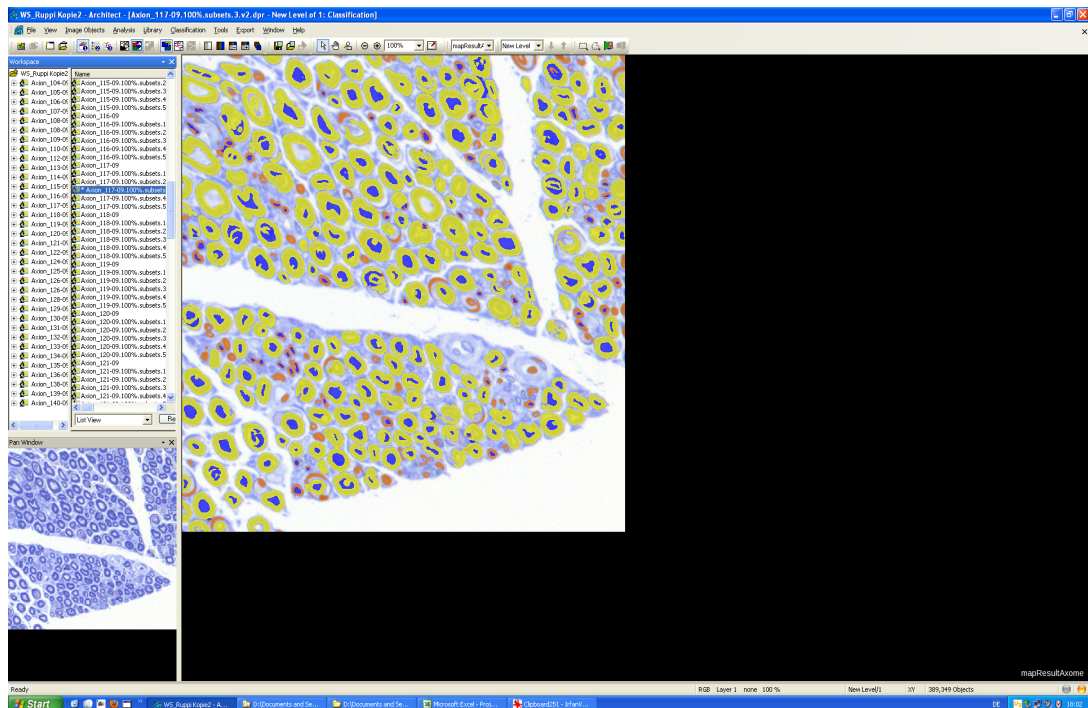
Die Bildanalyse mittels Definitions-Software ist ein objektives Verfahren, welches sich nur auf die Analysewerte der elektronisierten Bilder stützt. Dabei wurden in jedem Sublet folgende Parameter unterschieden:

- Anzahl großer Axone [def. > 250Px Fläche]
- Anzahl kleiner Axone [def. < 250Px Fläche]
- Gesamtfläche aller großen Axone [Pixel = Px]
- Gesamtfläche aller kleinen Axone [Px]
- Gesamtfläche des bindegewebigen Anteils [Px]
- Gesamtfläche des Sublets [Px]
- Gesamtfläche der Artefakte [Px]

Mit Hilfe dieser Grundparameter wurden durch Microsoft Excel diverse sich davon ableitende Parameter errechnet. Die bedeutsamsten davon sind:

- Anteil der großen Axone/Gesamtzahl aller Axone
- Anteil der kleinen Axone/Gesamtzahl aller Axone
- Fläche der großen Axone/Gesamtfläche des nervalen Gewebes
- Fläche der kleinen Axone/Gesamtfläche des nervalen Gewebes
- Fläche des bindegewebigen Anteils/Gesamtfläche des nervalen Gewebes
- Anzahl der Axone/2.500  $\mu\text{m}^2$





**Abb. 33** Screenshot mit Abbildung der Definions-Software

Die Ergebnisse zeigten einen schon vermuteten Trend, der sich in beiden Gruppen wiederfindet. So nahm der Anteil der großen Axone von proximal nach distal stetig ab ( $a < b < c$ ). An selbiger Stelle gab es einen Zuwachs des Anteils der kleinen Axone sowie des bindegewebigen Anteils von proximal nach distal ( $a > b > c$ ). Allerdings entwickelten sich die Werte in der Kontroll-Gruppe besonders stark im Sinne des jeweiligen Trends. So fiel der Anteil der großen Axone in Gruppe K von 51 % über 27 % auf 18 % ab. Gleichzeitig kommt es zu einer Erhöhung des Anteils der kleinen Axone von 49 % über 73 % auf 82 %. Die Flächenanteile der kleinen Axone verschoben sich von 5 % über 11 % auf 12 %, die des bindegewebigen Anteils entwickelten sich ebenfalls von 34 % über 50 % auf 67%. Somit war festzustellen, dass der Anteil der großen Axone sich von proximal nach distal stark verringert und sowohl die kleinen Axone als auch der bindegewebige Anteil demgegenüber anstiegen.

Im Falle der VEGF-behandelten Gruppe war dieser Trend wesentlich schwächer ausgeprägt. So verringerte sich der Anteil der großen Axone von proximal 54% über 38 % auf distal 48 %. Der Anstieg des Anteils der kleinen Axone fiel dementsprechend gering aus und ging von 46 % über 64 % auf 52 % hoch. In der Flächenverteilung der jeweiligen Faserqualitäten bzw. dem bindegewebigen Anteil ergab sich ein vergleichbares Bild.

Auf dem Schnitt der Kontrollseite sind die Analysewerte unabhängig von der Gruppe gleich. Sie zeigten die Werte eines normalen, nicht pathologisch veränderten peripheren Nerven. So war der Anteil der großen Axone noch höher, der Anteil der kleinen Axonen und der bindegewebige Anteil nochmals geringer als in dem proximalsten Schnitt der operierten Seite, a. Außerdem gab es keine merklichen Gruppenunterschiede.

Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte Tendenz.

#### **Statistische Auswertung:**

In der statistischen Auswertung wurden die Parameter zwischen den Gruppen unterschieden. Diese waren allesamt postmortal erhoben und beurteilten somit keinen zeitlichen Verlauf. Aufteilung nach Schnitthöhen:

**Schnitthöhe a:** Auf Schnitthöhe a) gibt es keine statistischen Signifikanzen zwischen der VEGF-Gruppe und der Kontrollgruppe. Vielmehr zeigte sich ein relativ homogenes Bild, welches sich über beide Gruppen erstreckt. Dies entsprach den Erwartungen.

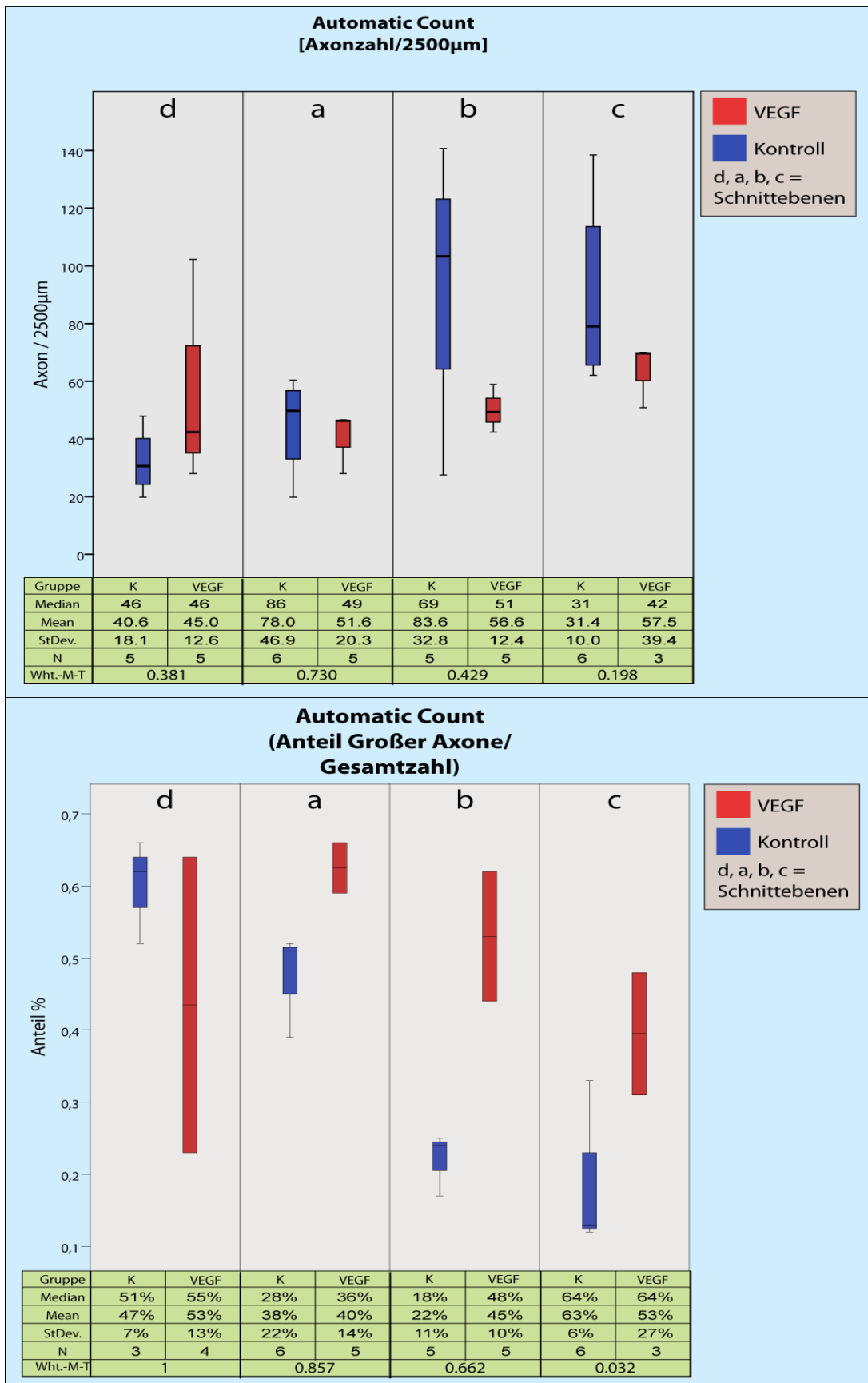
**Schnitthöhe b:** Wie schon in der Schnitthöhe a) ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Grund hierfür war die Streuung der Werte insbesondere in der Kontrollgruppe. Eine Standardabweichung von fast 40 Prozent gegenüber dem Median war fast doppelt so groß wie die der VEGF-Gruppe.

**Schnittthöhe c:** In allen fünf p-Werten waren hier zumindest statistische Trends ( $0.2 > p > 0.05$ ) nachzuweisen. Dabei war der Wert für den Anteil der großen Axone an dem gesamtnervalen Gewebe in der VEGF-Gruppe kleiner als jener der Kontrollgruppe. P entsprach dem Wert von 0.151.

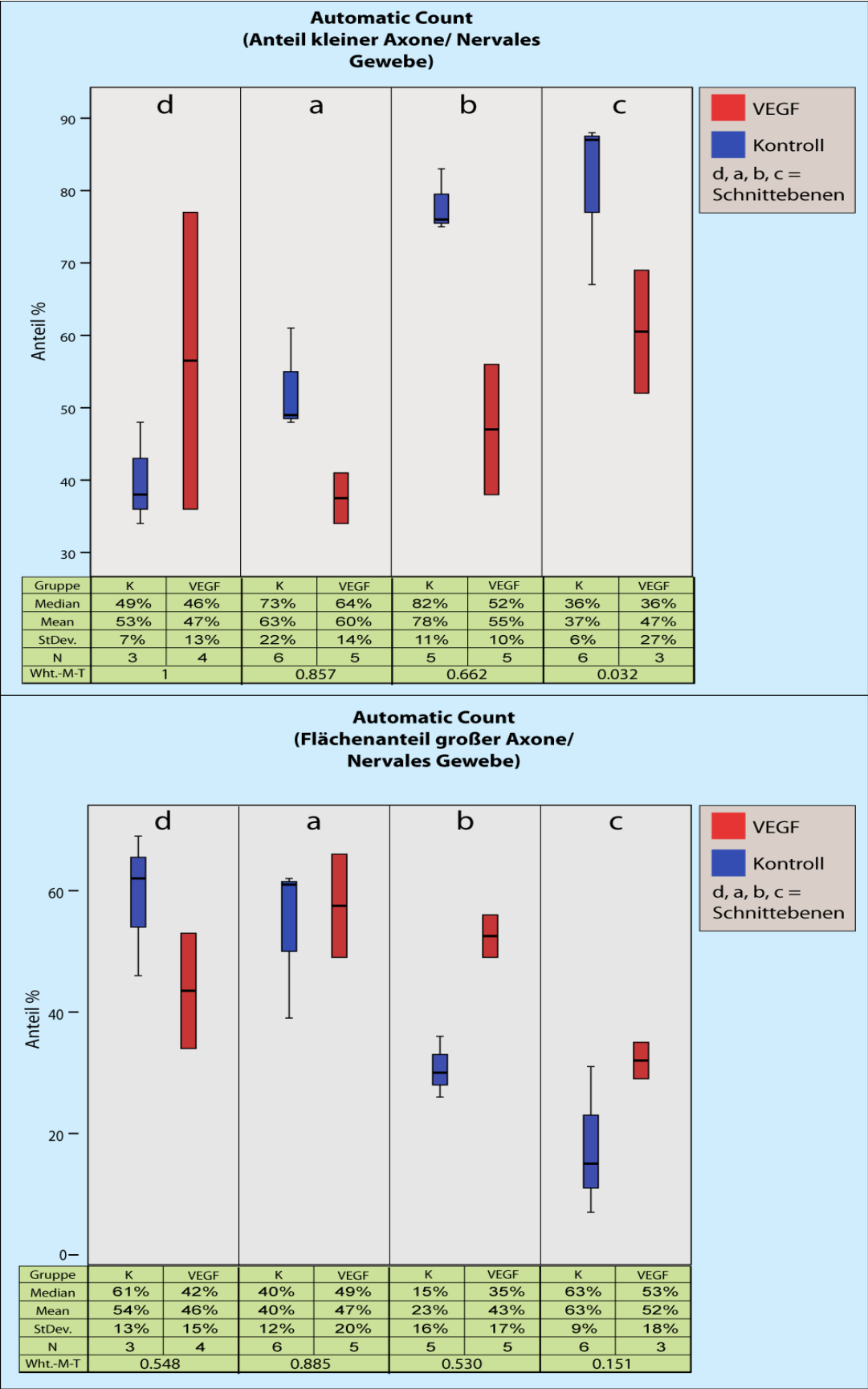
Bei den beiden übrigen Wertereihen zu den Flächenanteilen, dem Anteil der kleinen Axone und des Bindegewebes am gesamtnervalen Gewebe, war dieses Verhältnis umgekehrt proportional. Für die kleinen Axone sowie den bindegewebigen Anteile errechnete sich ein p-Wert von 0.095.

Bei der Verteilung zwischen großen und kleinen Axonen sind die Werte jeweils mit einem p-Wert von 0.032 statistisch signifikant.

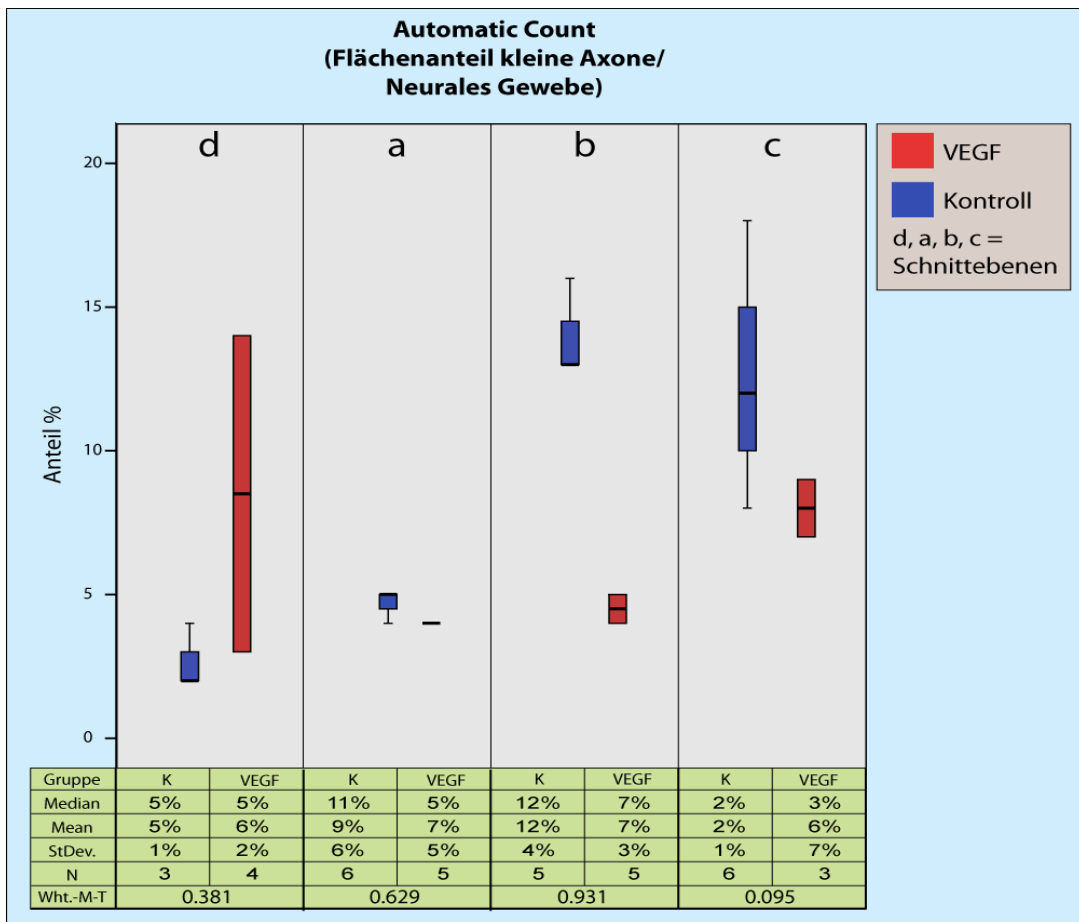
**Schnittthöhe d:** Erwartungsgemäß waren die Unterschiede zwischen den Schnitten der nicht behandelten Seiten marginal, wenn überhaupt vorhanden. Es gab dementsprechend keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 34** Ergebnisse Software-Morphometrie; Nr.1



**Abb. 35** Ergebnisse Software-Morphometrie; Nr.2



**Abb. 36** Ergebnisse Software-Morphometrie; Nr.3

### 3.5.2 Manueller Axoncount

Im Falle der manuellen Auszählung der Nervenfasern im Semidünnschnitt wurden die zuvor für die Bildanalyse digitalisierten Schnitte unter Einsatz des Programms Adobe Photoshop mit einem virtuellen Raster belegt, bestehend aus Quadraten mit der Fläche von  $2.500 \mu\text{m}^2$ .

Aus jedem Schnitt wurden sechs repräsentative Quadranten zufällig ausgewählt und nach diversen Kriterien händisch ausgewertet. Dabei wurden folgende Parameter ausgezählt.

- Anzahl der großen Axone/  $2500 \mu\text{m}^2$
- Anzahl der mittleren Axone/  $2500 \mu\text{m}^2$
- Anzahl der kleinen Axone/  $2500 \mu\text{m}^2$
- Semiquantitative ( $1 < 2 < 3$ ) Bewertung der Fibrosierung

- Semiquantitative (1<2<3) Bewertung der Neurombildung
- Semiquantitative (1<2<3) Bewertung der Leukozyteninfiltration
- Semiquantitative (1<2<3) Bewertung der Gefäßfibrosierung

Der Wert 1 der semiquantitativen Bewertung entspricht dabei keinem bzw. einem minimal ausgeprägten, 2 einem mittelstark und 3 einem stark Auftreten des bewerteten Parameters.

Aus diesen Basisdaten wurden per Microsoft Excel folgende Parameter für die Evaluation errechnet:

- Gesamtanzahl aller Axone/ 2500µm<sup>2</sup>
- Anteil der großen Axone/Gesamtzahl aller Axone
- Anteil der mittleren Axone/ Gesamtzahl aller Axone
- Anteil der kleinen Axone/Gesamtzahl aller Axone

Die Auswertung der Ergebnisse ergab folgenden Tendenz: Der Anteil der großen Axone nahm von proximal (a) nach distal (b und c) ab. Im Gegenzug erhöhte sich der Anteil der kleinen Axone. Die Axone mittleren Kalibers zeigten eine leichte Abnahme ihres Gesamtanteils. Die semiquantitative Bewertung der Fibrosierung, Neurombildung, Leukozyteninfiltration und Gefäßfibrosierung zeigte ebenfalls ein verstärktes Auftreten der jeweiligen Parameter von proximal nach distal.

Im Falle der Kontrollgruppe war dieser Trend sehr prominent ausgeprägt. Während der Anteil der mittleren Fasern von 36 % auf 24 % abfiel, verringerte sich der Anteil der großen Fasern rapide von knapp 25 % auf ungefähr 6 % von a nach b und c. Im gleichen Zuge erhöhte sich der Anteil der kleinen Fasern von 41 % auf 73 %. Auffällig war hierbei, dass schon der Anteil von großen Axonen im Schnitt a im Vergleich zu dem Kontrollschnitt der nicht operierten Seite, d, wesentlich geringer ausfiel. Dort lag er bei 39 %.

Auch in der semiquantitativen Bewertung kam es zu einem starken Anstieg aller Parameter von einem schwachen hin zu einem mittel bis stark ausgeprägten Auftreten. Dies betrifft insbesondere die Fibrosierung und die Neurombildung.

Die VEGF behandelten Tiere zeigten zwar auch den schon angesprochenen Trend. Dieser war jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt. Die Anteile der großen Axone fallen von 33 % über 20 % auf 24 % und die der mittleren Axone von 36 % über 29 % auf 32 %. Gleichzeitig ergab sich ein wesentlich weniger starker Anstieg der Anteile der kleinen Axone von 33 % über 47 % auf 44 %. Der direkte Vergleich vom proximalen Schnitt a mit dem Kontrollschnitt d zeigte, dass die Werte für diverse Parameter annähernd übereinstimmend waren. Es war kein Gruppenunterschied der Parameter im Schnitt d festzustellen.

#### **Statistische Auswertung:**

Für jede Schnitthöhe wurden folgende Parameter statistisch mit dem Mann-Whitney Test von Gruppe zu Gruppe berechnet:

- Anteil der großen Axone/ Gesamtzahl aller Axone
- Anteil der mittleren Axone/ Gesamtzahl aller Axone
- Anteil der kleinen Axone/ Gesamtzahl aller Axone
- Semiquantitative (1<2<3) Bewertung der Fibrosierung
- Semiquantitative (1<2<3) Bewertung der Neurombildung
- Semiquantitative (1<2<3) Bewertung der Leukozyteninfiltration
- Semiquantitative (1<2<3) Bewertung der Gefäßfibrosierung

#### **Einteilung nach Schnitthöhen:**

**Schnitthöhe a:** Wie schon in den Ergebnissen der Bildanalyse waren auf hier keine wesentlichen Unterschiede zu ermitteln.



**Schnittthöhe b:** Bei der Berechnung der Schnittthöhe b ergaben sich in drei Parametern signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe VEGF und der Kontrollgruppe. So waren die großkalibrigen Axone bei den Tieren der Gruppe VEGF mit einem p-Wert= 0,009 signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Dies trifft mit umgekehrten Werten für die kleinen Fasern zu. Diese sind in der Kontrollgruppe mit einem p-Wert = 0,03 signifikant gegenüber der VEGF-Gruppe erhöht. Bei den Fasern mittleren Kalibers zeigte sich ein indifferentes Bild.

Es berechnete sich auch ein signifikanter Unterschied in der semiquantitativen Quantifizierung der Neurombildung (p-Wert = 0,004) und der Fibrosierung (p-Wert = 0,045). Hier waren die Werte für die Kontrollgruppe maßgeblich erhöht. Auch zeigte sich im Fall der Leukozyteninfiltration ein statistisch berechneter Trend (p-Wert = 0,091) mit einer Erhöhung bei der Kontrollgruppe.

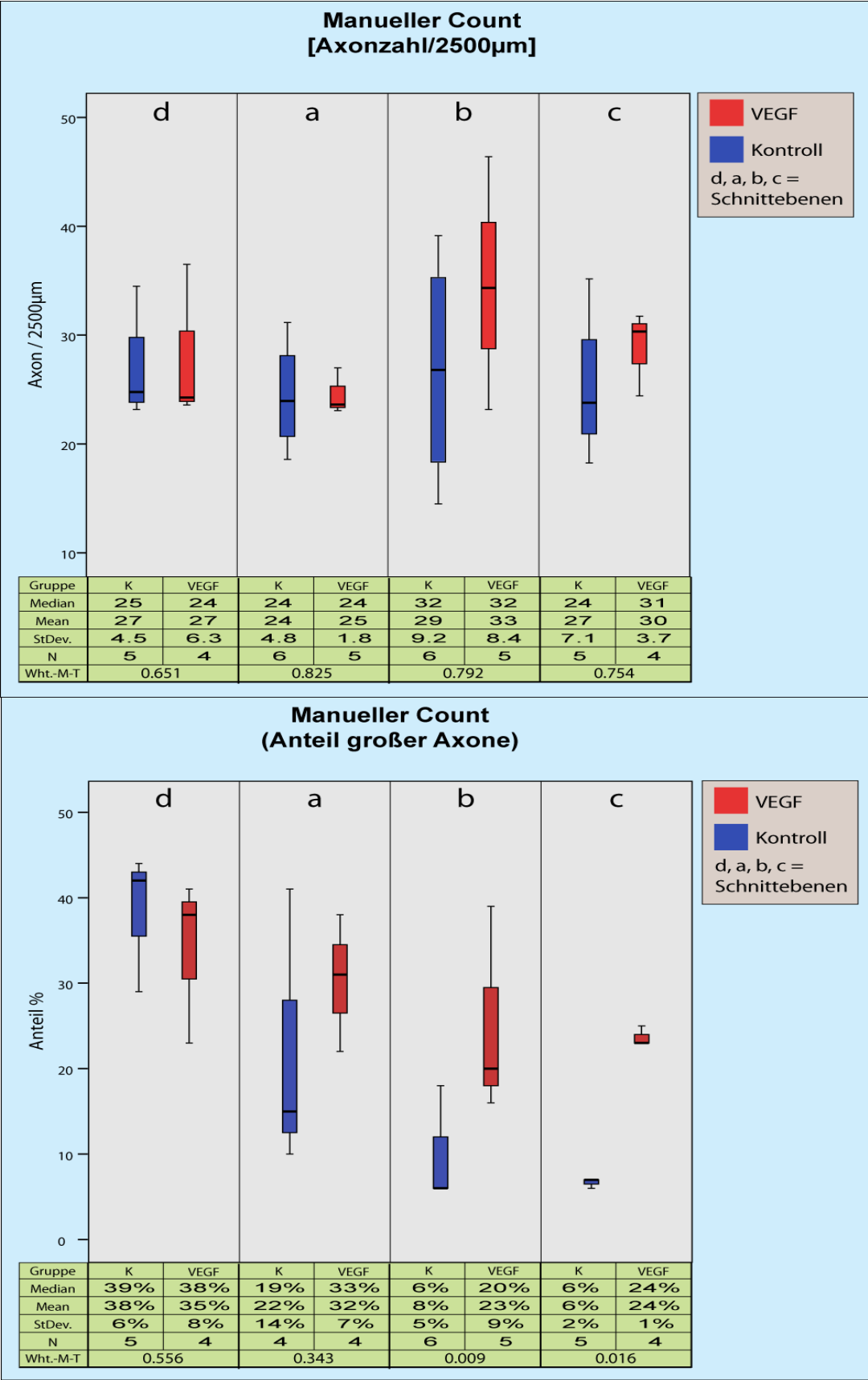
**Schnittthöhe c:** Bei der Berechnung der Schnittthöhe c) ergaben sich ebenfalls signifikant erhöhte Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in folgenden Parametern:

Anteil der kleinen Axone/Gesamtzahl aller Axone; p-Wert = 0,016

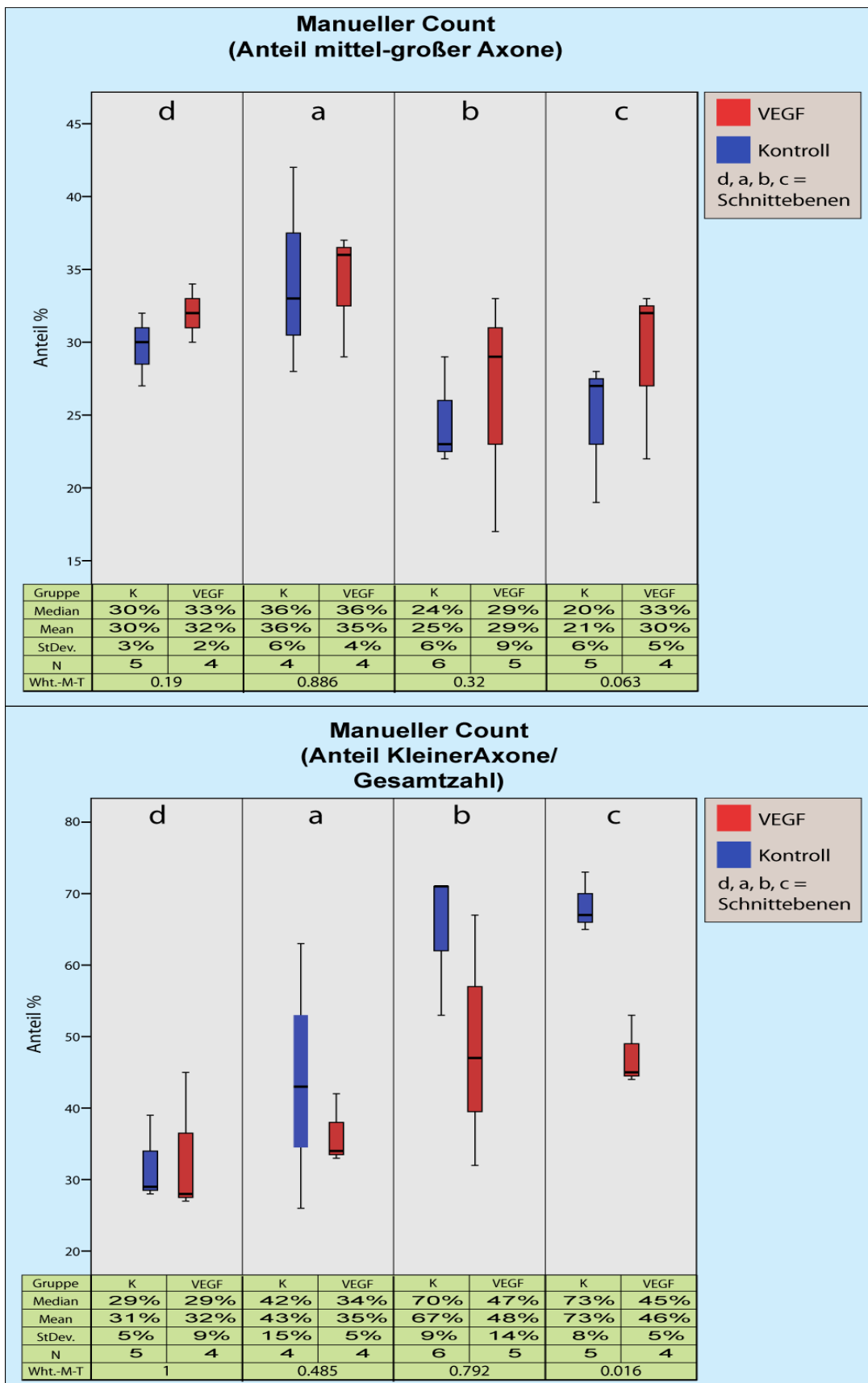
Anteil der großen Axone/Gesamtzahl aller Axone; p-Wert = 0,016

Bei weiteren Werten errechnete sich ein statistischer Trend ( $0.05 < p < 0.2$ ). So war die Anzahl der mittleren Fasern bei der VEGF-Gruppe gegenüber der Kontrolle erhöht. (p-Wert= 0.063)

**Schnittthöhe d:** Auf der Kontrollseite gab es keine besonderen statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Parameter.



**Abb. 37** Ergebnisse Manuelle-Morphometrie; Nr.1



**Abb. 38** Ergebnisse Manuelle-Morphometrie; Nr.2

### 3.5.3 Bildanalyse

Im Rahmen einer Begutachtung der Schnitte durch Professor Schlegel, Institut für Pathologie TUM wurde der in den beiden unabhängigen Bildanalysemethoden festgestellte Trend bestätigt. Zum einen zeigt sich in den Bildern gruppenunabhängig die Tendenz, dass die großkalibrigen Axone von der Kontrollseite hin zu der operierten und dort wiederum von proximal nach distal abnehmen. Auch ist ein deutlicher Anstieg des kleinkalibrigen Anteils der Fasern und der Fibrosierung bzw. Neurombildung zu verzeichnen.

### 3.5.4 HE-Schnitte des Nerven an den Lokalisationen f-g

Wie in der händischen Bildbewertung des „Manual Counts“, entspricht die Zahl 1 keinem bzw. minimalen, 2 einem mittelstark und 3 einem stark ausgeprägten Auftreten des bewerteten Parameters.

Gruppendurchschnitt (semiquantitativ 1<2<3)	K	VEGF	p-Wert
f	2.3	1.2	0.01
g	2.7	1.8	0.045

**Tbl.8** Ergebnisse der HE-Schnitt Auswertung

#### Statistische Auswertung:

In beiden Auswertungen zeigen sich statistisch relevante Gruppenunterschiede. In der proximalen Schnitthöhe (f) zeigt sich ein  $p = 0.01$ , in der distalen Schnitthöhe (g) von 0.046.

### 3.6 Ergebnisse der Gewichtsmessung des M. gastrocnemius nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerven-transplantates

Die Muskelgewichte wurden 17 Wochen post mortem am gehobenen M. gastrocnemius gemessen. Um eine Relation zu dem gesamten Körpergewicht des Tieres herzustellen, wurden beide Muskeln eines Tieres jeweils in

Relation zum Körpergewicht des betreffenden Tieres gesetzt. So zeigte sich der Anteil des Gewichts eines jeden M. gastrocnemius am Körpergewicht. Hierdurch wurde ein Seitenvergleich von operierter zu unoperierter Seite hergestellt. Dieser Vergleich lieferte auch eine tier- und somit gruppenbezogene Aussage über den Rückgang des Muskels nach Versuchsende.

Muskelgewicht und Quotienten	K-average	VEGF-average
MG_Gstrocn._r_W17[g]	2.1	2.0
MG_Gstrocn._l_W17[g]	4.1	3.6
Tiergewicht_W17 [g]	628	557
Muskelgewicht/Körpergewicht_r_W17	0.336%	0.368%
Muskelgewicht/Körpergewicht_l_W17	0.657%	0.651%

**Tbl. 9** Auswertung des M. GastrocnemiusGastrocnemius der operierten Seite

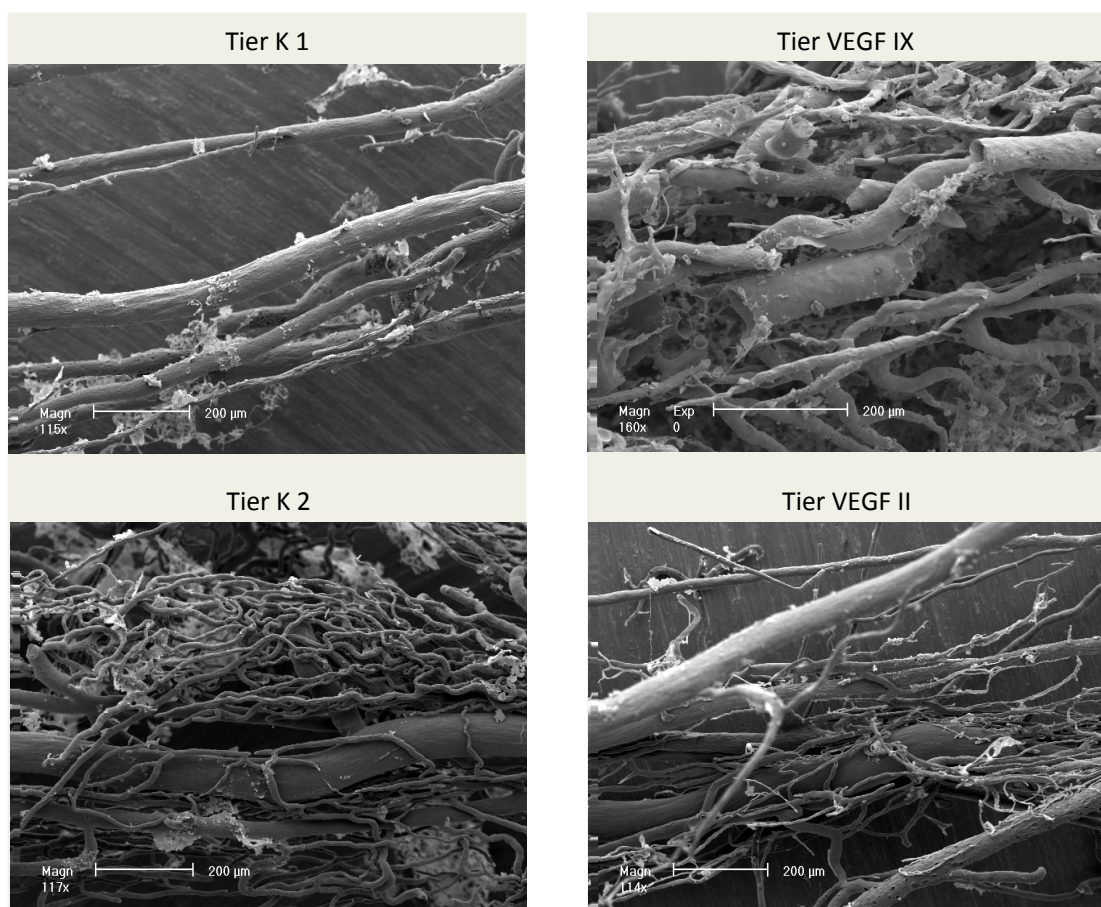
Die Vergleichsergebnisse ließen keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen. Der berechnete Anteil des M. gastrocnemius der operierten Seite am Körpergewicht ist in beiden Gruppen mit circa 0,35% nur etwa halb so groß wie der mit circa 0,65% berechnete Anteil der Gegenseite.

#### **Statistische Auswertung:**

Statistisch wurde der Quotient des Anteils vom M. gastrocnemius am Körpergewicht eines Tieres zwischen der rechten zur linken Seite berechnet. Hierbei ergab sich keine statistische Relevanz der Werte.

### 3.7 Ergebnisse der Corrosion-Cast hinsichtlich der Mikroangiogenese nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am Modell des autologen Nerven-transplantats

Die alleinige Aussage, die aus den Bildern des Corrosion-Cast gezogen werden kann, erlaubt den Schluss, dass die Gefäßkaliber der VEGF-Gruppe deutlich stärker sind als jene der Kontroll-Gruppe bzw. jene der unoperierten Kontrollseite. Die Gefäße der Kontrollgruppe und der Kontrollseite sind von ähnlicher Größe.



**Abb.39** Beispielbilder der Corrosion-Cast Auswertung

Für die angesetzte semiquantitative Analyse der Gefäßdichte waren die Bilder qualitativ nicht ausreichend.

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche lassen sich als Diskussionsgrundlage folgendermaßen zusammenfassen:

- Der applizierte Vektor zeigt seine Wirksamkeit hinsichtlich der VEGF-Produktion<sup>85</sup>.
- Die Parameter der motorischen Regeneration sind initial post operativ gruppenübergreifend stark reduziert. Im zeitlichen Verlauf zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zu Gunsten der mit VEGF behandelten Gruppe.
- Die elektrophysiologische Messung und die Gewichtsmessung des betroffenen Endorgans (M. Gastrocnemius) bzw. des N. ischiadicus zeigen keine statistisch relevanten Unterschiede.
- Die morphometrische Untersuchung nach Versuchsende zeigt signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl großer Axone, des Fibrosierungsgrades und der Neurombildung.
- Die Evaluation mittels Corrosion Cast läßt keine quantitative Aussage über den Zustand der neuralen Gefäßplexi und deren Neoangiogenese zu.

In der Diskussion wird auf folgende Punkte eingegangen:

- Das zugrunde liegende Tiermodell, die Applikation von VEGF mittels adenoviraler Vektoren
- Effekt der VEGF-Behandlung auf die funktionellen, morphologischen und elektrophysiologischen Parameter.
- Zusammenhängende Bewertung aller Ergebnisse und die kritischen Punkte bei der Interpretation.

- Schlußfolgerung und Ausblick der erprobten Therapie auf Basis der bekannten und neu gewonnenen Feststellungen.

Das Modell des autologen Nerven­transplantats in Kombination mit adenoviraler Therapie von VEGF ist nach unserer Kenntnis ein Novum auf dem Gebiet der Forschung im Bereich der rekonstruktiven Chirurgie<sup>42 208 135</sup>. Insbesondere die Kombination der diversen Auswertungsparameter ermöglicht dabei eine Evaluation aus multiplen Blickwinkeln.

Ziel dieser Arbeit ist es, Zusammenhänge zwischen der Therapie und ihren Effekten auf diverse Evaluationsmethoden aufzudecken.

Diese Erkenntnisse lassen den Rückschluss auf die übergeordnete Hypothese zu, nach welcher VEGF für diese signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen verantwortlich ist. Gleichzeitig stellt sich jedoch die Frage, ob auch weitere signifikante Werte anderer Evaluationsmethoden, speziell die Morphometrie, mit den Werten des SFI korrelieren und somit auch aus diesen Ergebnissen eine gleichartige Schlussfolgerung bzgl. der Funktionalität gezogen werden kann.

#### **4.1 Diskussion des operativen Modells**

In der Praxis der plastischen-rekonstruktiven Chirurgie hat die Koaptation von Nervenenden in einem ausgedehnten Nervendefekt durch Interposition eines autologen Transplantates große Relevanz<sup>166 137</sup>. Im Falle von ausgedehnten nervalen Defekten gilt diese Methode trotz ihrer Nachteile weiterhin als Standard<sup>115</sup>. Die klinischen Behandlungsergebnisse lassen jedoch nach wie vor zu wünschen übrig<sup>122</sup>.

Im Tiermodell konnte von Jenq et al gezeigt werden, daß die Koaptation eines Interponates zu statistisch besseren Regenerationswerten als die se-



kundäre Wundheilung führt<sup>99 100</sup>. Auf dieser klinischen Grundlage basiert das in dieser Versuchsreihe angewandte Tierversuchsmodell am N. ischiadicus der Ratte, welches zuvor in diversen anderen Studien genutzt wurde (unter anderem Ijkema-Paasen et al.<sup>93</sup>, Scharpf et al.<sup>173</sup>, Jenq et al.<sup>100</sup>). Die Länge des Transplantates in unserer Versuchsreihe ist mit 2 cm sehr lang bemessen<sup>88</sup>. Damit konnte insbesondere eine primäre Wundheilung ausgeschlossen werden.

Ein in diesen Studien immer wieder beschriebenes Phänomen ist die Automutilation der Tiere, die nach Durchtrennung von peripheren sensomotorischen Nerven einer Extremität auftreten kann<sup>211 93 42</sup>. Die Injektion von Dexamethason® wirkte diesem auf der Autotomie basierenden Phänomen entgegen. Im Rahmen der Versuche trat das Phänomen bei 2 Tieren aus der VEGF Gruppe auf. Dabei bleibt zu offen, ob diese Zahl mit der Wahl von weiblichen Tieren bzw. der Vorbeugung mittels Antibeißspray hätte weiter reduziert werden können<sup>41</sup>.

Auf Basis dieses operativen Modells wurde nur in 28 von 69 untersuchten Publikationen des Review von Vleggeert-Lankamp et al. auf die Qualität und Funktionalität der Nervenfasern eingegangen<sup>211</sup>.

## **4.2 Diskussion des applizierten Wachstumsfaktors VEGF**

VEGF, implizit das Splicingprodukt VEGF 165, hat in der Literatur sowohl eine vielbeschriebene angiogenetische als auch eine neurotrophe Wirkung<sup>56 187-189 135</sup>. Es ist das Ziel dieser Arbeit die genannten Wirkungsmechanismen in Form der indirekten Messparameter zu beurteilen.

## **4.3 Diskussion der angewandten adenoviralen Applikation**

Die adenovirale Applikation muss aus zwei Gesichtspunkten gesehen und beurteilt werden. Zum einen wurde das Adenovirus nach der Deletion der vi-

ralen E1-Gensequenz als sehr effiziente und stabile Transduktionsform bezeichnet<sup>105 13 143</sup>. In der klinischen Forschung eingesetzt war diese auch in unseren Versuchen die Grundlage der länger wirkenden lokalen VEGF-Synthese<sup>221</sup>. Wie dargestellt wurden die Vorversuche hinsichtlich der Wirksamkeit des eingesetzten AdCMV.VEGF<sub>165</sub> durch Dr. T.Holzbach beschrieben<sup>85</sup>. Andere Methoden, wie die nicht-virale Gentransduktion mittels nackter DNA-Plasmide oder der Applikation reiner Wachstumsfaktoren mittels Pumpen oder weitere Hilfsmittel wurden im Vorhinein abgewogen<sup>88 87 143</sup>.

Andererseits treten zwar die teilweise fatalen Nebenwirkungen der adenoviralen Vektoren in Erscheinung<sup>163</sup>. Auf Grund der geringen Prävalenz schränken diese in dem Tiermodell die Praktikabilität jedoch nicht ein. Hier überwiegen die eindeutigen Vorteile dieser Applikationsform<sup>110, 209</sup>.

## **4.4 Diskussion der funktionellen Regeneration**

Die Diskussion der funktionellen Regeneration setzt sich zusammen aus den motorischen und elektrophysiologischen Parametern.

### **4.4.1 Motorische Parameter**

Der „Gold-Standard“<sup>109, 104</sup> der Bewertung ist definiert als die Quantifizierung der Funktionalität anhand des dynamischen Parameters „SFI“. Bei diesem Wert kommt es zu einer im zeitlichen Verlauf klar darstellbaren Differenzierung der Entwicklung zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen.

Im Rahmen dieser Studie konnten statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich des Wiedergewinns der Funktionalität zu Gunsten der mit VEGF behandelten Tiere in allen Parametern festgestellt werden. Die p-Werte aller Parameter zeigten einen mindestens signifikanten, wenn nicht sogar hoch ( $p < 0,001$ ) oder sehr hoch signifikanten ( $p < 0,0001$ ) Unterschied ab der 16. Woche der Versuchsreihe. Häufig sind diese Unterschiede aber schon wesentlich früher auszumachen.

Anhand dieser Parameter läßt sich ein Rückschluss auf die Reinnervation der Nervenfasern nach einer Läsion des N. ischiadicus ziehen<sup>90, 38, 93 42</sup>.

In den Versuchen von Dijkstra et al.<sup>42</sup>, die in einer Versuchsgruppe auch eine Hebung, Reversierung und Reimplantation eines autologen N. ischiadicus-Transplantats anwandten, werden sehr schlechte Reinnervations-Werte anhand der dynamischen Parameter (SFI) beschrieben. Es konnte dort keine nennenswerte Verbesserung der Innervation festgestellt werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen der entsprechenden Kontrollgruppe in unseren Versuchen. Laut Dijkstra et al.<sup>42</sup> erreichten die Tiere nach einem Beobachtungszeitraum von zehn Wochen keinen höheren Regenerationswert als 40 %. Auch in unserer Studie war der SFI-Wert der Kontrollgruppe (K-Gruppe = unbehandelt) selbst nach 17 Wochen nicht höher als ca. 30 %. Im Vergleich dazu zeigt sich bei der VEGF-Gruppe ein signifikanter Unterschied bei Werten um 60 %. Dieser Wert zeigt sich im Vergleich zu anderen Versuchen als äußerst positives Resultat. Im Vergleich liegen die Ergebnisse anderer Gruppen, die mit dem Model des autologen Nerventransplantates agieren, in einem Regenerationsbereich von ca. 50%<sup>42</sup>. Auch ist die wesentlich höhere Ausfallrate auf Basis der Automutilation anderer Arbeitsgruppen zu vermerken<sup>41</sup>.

Trotz der eindeutig guten Ergebnislage in unseren Versuchen ist auf einige kritische, auch bereits in der Literatur erwähnte Gesichtspunkte hinzuweisen.

Zunächst ist die Frage der Vergleichbarkeit der dynamischen Fußabdrücke anzusprechen. So wird von<sup>212</sup> beschrieben, dass sich die Fußabdrücke in Abhängigkeit zur Ganggeschwindigkeit der Tiere durch den im Material- und Methodenteil beschriebenen Laufkanal unterscheiden. Um diesen Faktor möglichst weitgehend einzudämmen, wird von Walker et al. die Aufnahme der Fußabdrücke per Video-Analyse empfohlen. Auch Dijkstra et al. greifen u.a. auf diese Technik zurück<sup>42</sup>.

Zur Rechtfertigung der in unseren Versuchen verwendeten Methode, Tinte zur Abnahme der Fußabdrücke einzusetzen, ist allerdings anzumerken, dass dieses Verfahren in der Literatur als sehr gut und zuverlässig beschrieben ist<sup>101, 109, 7</sup>. Auch ist der Versuchsaufbau wesentlich einfacher und kostengünstiger. Die von uns beschriebene Gewöhnung der Tiere an den Laufgang durch „Probelaufe“ trug dazu bei, die Tiere bestmöglich an die Umgebung zu gewöhnen und somit eine vertraute Situation herzustellen, in der die Tiere einem relativ konstanten Verhaltensmuster folgten und Schreck- oder Missempfindungsreaktionen weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

Ein weiterer Kritikpunkt in der Literatur ist die Berechnung des SFI-Wertes unter Berücksichtigung von Parametern der kontralateralen Seite<sup>40</sup>. Dieser ergebnisverfälschende Effekt wurde von uns dadurch ausgeschlossen, dass wir jeden SFI in jeder Woche mit den präoperativen Ausgangswerten der ipsilateralen Seite berechneten. Eventuelle Gangveränderungen der kontralateralen Seite, die auf einer Gewichtsverlagerung durch die Deinneravation beruhten, konnten somit ausgeblendet werden.

Zusätzlich zur Ermittlung der dynamischen Parameter (SFI) haben wir unseren Tieren die statischen Parameter in Form des SSI (inkl. Zehenabstand 1 - 5 und 2 - 4) abgenommen. Damit wurde ein Vergleichswert geschaffen, der sehr ähnliche Werte aufzeigt und u.a. in sämtlichen Einzelparametern in der 16. und 17. Woche signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wiedergibt. Diese Vorgehensweise stellt nach der einschlägigen Literatur ein gleichwertiges Verfahren zur Evaluierung der Funktionalität<sup>20, 184</sup> dar. Bedenken dahin gehend, dass die Abnahme der SFIs mittels Tinte durch die Unterschiede der tierabhängigen Ganggeschwindigkeiten nicht hinreichend aussagekräftig sein könnte, lassen sich somit klar einschränken, wenn nicht sogar ausschließen.

Angesichts der eindeutigen Ergebnisse der motorischen Parameter sind die eingesetzten Methoden in diesem Versuch auch als „Gold-Standard“ anzuse-

hen. In der Literatur <sup>104</sup> trifft diese Feststellung insbesondere auf den SFI zu, der auch in unseren Ergebnissen die größte statistische Signifikanz aufweist.

#### **4.4.2 Elektrophysiologische Parameter**

Die elektrophysiologische Untersuchung, welche in unserem Fall mittels Bestimmung der CMAP (Amplitude und Dauer) sowie der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) quantifiziert wurde, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

Nach der Erhebung von Vleggeert-Lankamp et al. <sup>211</sup> wurde eine ganze Reihe von historischen Publizierungen untersucht, die unterschiedlichste Werte für die Messung der Signifikanz von CMAP (Amplitude, Dauer) und der Nervenleitgeschwindigkeit aufweisen. Dabei wurde insbesondere die Aussagekraft der CMAP hervorgehoben. Auch erscheint die NLG, insbesondere in zeitlich lang angelegten Studien, ein gutes Mittel zur Evaluation. Im Gegensatz gibt es aber auch Stimmen in der Literatur, welche die Methode als eine für die Quantifizierung der Regeneration nicht valide Methode darstellen <sup>43</sup>

170

Unabhängig von dieser in der Literatur dargestellten Meinung gab es in unseren Fällen u.a. zwei mögliche Störfaktoren, die uneinheitliche Werte zur Konsequenz haben könnten. (I) Die Elektroden wurden nicht richtig angelegt (II) die Oberflächentemperatur war, wie auch von Vleggeert-Lankamp et al. <sup>211</sup> als Möglichkeit diskutiert, ein entscheidender Faktor, welcher sich auf die Parameter auswirkte.

Bei der Hauttemperatur als alternierendem Faktor zeichnet sich in unserem Versuchsaufbau ein anderes Bild. Dazu muss gesagt werden, dass die Tiere im Laufe des Abends, bzw. im Laufe der Nacht zunächst elektrophysiologisch untersucht und schließlich perfundiert wurden. Dabei wurden die beiden Gruppen nacheinander abgearbeitet. Die Kontrolltiere konnten größten-

teils am frühen Abend, die der VEGF-Gruppe erst um ca. zwei Uhr morgens untersucht werden. Da die Raumtemperatur zu diesen Zeiten im Frühsommer von ca 24 °C am Abend auf ca. 19 °C in den Morgenstunden gefallen war, könnte dies die Hautoberflächentemperatur der später untersuchten Tiere der VEGF-Gruppe so beeinflussen, dass diese gleich große Werte bei den elektrophysiologischen Parametern aufweisen. Eine solche Korrelation ist in der Literatur beschrieben<sup>205, 211</sup>.

Kritisch für die Evaluation ist die Einbeziehung der Temperaturabhängigkeit der gemessenen Potentiale, welche in einer nicht-linearen Abhängigkeit zur Oberflächentemperatur stehen<sup>205</sup>. Die von uns während der Versuche gemessenen Raumtemperaturunterschiede könnten damit einen nicht unerheblichen Effekt auf die Werte haben. Bei einer Messung mit konstanten Temperaturen in einem späteren Versuch sollten sich demnach die Ergebnisse der VEGF-Gruppe verbessern bzw. besser darstellen als jene der Kontrollgruppe. Diese Aussage wäre aber nur mit weiteren Versuchen zu verifizieren.

Auch wäre in diesen Versuchen eine Exploration der elektrophysiologischen Werte im zeitlichen Verlauf wünschenswert. Diese geben eine Momentaufnahme der 17. post-op Woche wieder, welche nicht im zeitlichen Zusammenhang interpretiert werden konnte.

Auch entsprechen die von uns als physiologisch abgeleiteten Werte der nicht operierten Vergleichsseite jenen, welche in der Literatur dokumentiert wurden. Für das Modell des N. ischiadicus der Ratte wurden eine NLG von ca. 50 m/s, einer CMAP-Dauer (A3-Mm.Interossei pl.) von ca. 4,5 ms und einer Amplitude von ca. 5 mV dokumentiert. Allerdings ist die Variabilität sowohl auf der operierten als auch auf der Kontrollseite sehr hoch. Die NLG scheint wesentlich stabiler zu sein und zeigt nicht so starke Schwankungen zwischen den Einzeltieren.

Wie schon im Material- und Methodenteil beschrieben, beinhaltet die Ableitung der CMAP eine größere Anzahl von unbekannten Variablen, wodurch

die Interpretation der Ergebnisse erschwert wurde <sup>170</sup>. Eine Auswertung und Interpretation der CMAP-Werte war somit in diesem Versuch nicht möglich. Ähnlich wie in anderen Beispielen ist die Abweichung der Werte der Einzeltiere zueinander zu hoch <sup>30</sup>.

Es kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Auswertung mittels elektrophysiologischer Parameter zwar eine in der Literatur gut beschriebene Methode ist. Allerdings finden sich auch kritische Stimmen, die eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse bezweifeln. Die wünschenswerte Zuverlässigkeit konnte derweil auch nicht mittels der von uns durchgeführten Versuche erzielt werden. Wie von Dorfman et al. beschrieben, konnte auch bei uns die elektrophysiologische Evaluation nicht als Parameter für die Quantifizierung der Regeneration herangezogen werden <sup>43</sup>.

#### **4.5 Diskussion der morphologischen Parameter**

Bei der morphometrischen Evaluation der Nervenpräparate handelt es sich um eine in der Literatur beschriebene Analyse der Regeneration <sup>36 129 99, 100</sup>. In dem erwähnten Review nach Vleggeert-Lankamp werden die Erkenntnisse der Forschung während des Zeitraumes von 1974 - 2005 nach englischsprachigen Publikationen zu dem Thema N. ischiadicus Regeneration eines Nerventransplantats aufgearbeitet <sup>211</sup>. Hiernach kommt die Arbeitsgruppe zu dem Ergebnis, dass von den 69 verglichenen Studien nur eine die proximalen, intermediären und distalen Schnittebenen der Interpontate differenziert beschreibt <sup>211</sup>.

Bei beiden aufgezeigten Methoden, der automatisierten und manuellen Auszählung der Semidünnschnitte, wurde auf drei Parameter Wert gelegt. 1. Gesamtzahl der Neurone; 2. Anteil der großen bzw. kleinen Axone an der Gesamtzahl; 3. Fibrosierungsgrad. In der manuellen Auswertung wurden diese Faktoren noch um die Neurombildung erweitert.

Die Wahl der Evaluation der Myelinisierung wurde wie in der Publikation von Geuna et al. hier auf Basis der Querschnittsfläche getroffen <sup>70</sup>. Das Verhältnis von kleinen zu großen Axonen wurde von Mackinnon et al. beschrieben <sup>129</sup>.

Die molekularen Grundlagen werden mittels dieser morphometrischen Methoden nicht beurteilt. Vielmehr geben sie Auskunft über die morphologischen Prozesse, die unter den Begrifflichkeiten der „antero-/retrograde Wallersche Degeneration“ und „Wiedereinsprossung der Axone“ <sup>68, 195, 22</sup> erklärt sind.

Eine Korrelation mit den funktionellen Ergebnissen der Studie ist nicht zwingend notwendig <sup>36 217</sup>, aber gleichzeitig auch durchaus logisch und bereits beschrieben <sup>162</sup>.

Des weiteren zeigt sich die Denervation auch am Beispiel der innervierten Endorgane, in diesem Fall dem M. gastrocnemius <sup>119</sup>.

#### **4.5.1 Kritische Analyse der automatisierten Auszählung mittels Definitions software**

Bevor in die eigentliche Diskussion dieser Parameter eingetreten wird, ist auf einen wichtigen Punkt der Analysetechnik hinzuweisen. So bestand eine Schwierigkeit der Auswertung bezüglich der Heterogenität der einzelnen Bilder. Trotz gleicher Schnitt- und Färbetechnik der Nerven konnte es nicht gewährleistet werden, dass alle Schnittbilder die gleiche Farbintensität bzw. Färbeschärfe haben. Für die automatisierte Auswertung mittels Software musste ein Mittelwert des Analyserasters definiert werden, der alle Bilder bestmöglich analysiert und diese somit direkt vergleichbar wurden. Dabei muss ein Analysefehler hingenommen werden, welcher sich allerdings über die Menge der Bilder ausgleicht. Die Erfahrungen des kooperierenden Teams des Helmholtz-Zentrums (GSF-Neuropathologie) sprachen dafür,



statt einer individuellen Anpassung des Regelsatzes auf jedes einzelne Bild einen repräsentativen „Mittelwert“ zu finden. Bei der Verwendung eines Mittelwertes kommt es allerdings zwangsläufig zu Problemen in den Grenzbereichen. Wenn ein Bild besonders dunkel oder hell ist, lassen sich Axonen nicht klar identifizieren, so dass es bei einer Berücksichtigung dieser Bilder zu einer Verzerrung der Analyse kommen könnte.

Des weiteren ist anzumerken, dass die Präparate des N. ischiadicus einige Monate in Glutharaldehyd lagerten und bei der Erstellung der Semidünnschnitte teilweise nicht mehr zu verwerten waren. Dies führte zu einer reduzierten Fallzahl von auszuwertenden Schnitten.

#### **4.5.2 Diskussion der manuellen Analyse am Counting Grid**

Die Methodik des manuellen Auszählen am Counting Grid wurde in unserer Versuchsreihe unabhängig aufgebaut. So wurde mit der Photoshop-Maske eine klar definierte Größeneinheit von  $2.500\mu\text{m}^2$  definiert, die in immer gleich bleibender Form über alle Schnitte gelegt wurde. Nach dem Prinzip des Chalkey-Counts<sup>65</sup> wurden repräsentative replizierbare Areale in dem Querschnitt gewählt und die Fasern in diesem Bereich ausgewertet. Auch wenn mit der Repräsentanz eines Durchschnittswertes (es wurden 6 Felder/Schnitte ausgewertet) gearbeitet wurde, ist diese manuelle Analyse durch die Auffassung des Betrachters beeinträchtigt. Dieser ist für die Auswahl der sechs Beispielfelder und die jeweilige Vermessung der Axondurchmesser verantwortlich, was zudem auch sehr zeitaufwendig ist<sup>102</sup>.

Die Ergebnisse der manuellen Auszählung am Counting-Grid zeigen deutlich mehr signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen als dies in der automatisierten Auszählung der Fall ist. Insbesondere die Kontrollgruppe weist hier die in der Literatur beschriebenen typischen Degenerationszeichen nach einer Neurotmesis auf<sup>36, 217, 104, 211, 98</sup>. Bei steigender Gesamtzahl der Fasern fällt der Anteil der großen Axone deutlich ab, der Anteil der kleinen Axone nimmt hingegen deutlich zu. Die Zählung der distal lie-

genden Schnitthöhe „c“ zeigt dabei niedrigere Werte als die intermediäre Schnitthöhe „b“. Die Fibrosierung und Neurombildung ist damit einhergehend höher. Im Falle der VEGF behandelten Gruppe sind die Werte signifikant besser. Insbesondere Schnitthöhe „b“ und „c“ zeigen deutliche Regenerationszeichen.

#### **4.5.3 Gesamtzahl der gezählten Axone/2.500µm<sup>2</sup>**

Die Gesamtzahl aller Axone bezieht sich auf die fest definierte Fläche von 2.500µm<sup>2</sup>. Anders als bei Delmenhorst et al. wird bei unserer Analyse nicht die Gesamtzahl aller im N. ischiadicus laufenden Nervenfasern in die Auswertung mit einbezogen <sup>41</sup>. Auf Grund der in der erwähnten Veröffentlichung gezeigten Varianz (1.000 bis zu 8.000 Axonen des N. ischiadicus) der Ergebnisse ist diese Entscheidung in Frage zu stellen.

Die Anzahl von Axonen in einem fest definierten Feld von 2.500µm<sup>2</sup>, die sowohl in der manuellen, als auch in der automatischen Analyse gleich definiert ist, scheint von Vorteil, weil Areale von histologisch nicht ausreichender Qualität (falsche Schnittführung, unzureichende Abfärbung, etc.) ausgespart bleiben. Gleichzeitig kommt in der automatisierten Evaluation ein weiterer subjektiver Schritt hinzu, welcher den Fehler der Analyse vermeintlich erhöht.

In der von uns evaluierten Versuchsgruppe ist der Anstieg der Faserdichte von proximal nach distal eindeutig darstellbar. Insbesondere in der automatisierten Auszählung war dieser distal gut doppelt so hoch wie in proximalen Schnitten („b“= 78; „c“ =84; „a“=40; „d“:31). Dagegen waren die Werte der VEGF behandelten Tiere zwar wesentlich niedriger (max. 56 im Schnitt „c“), allerdings trotzdem leicht erhöht. („d“ Durchschnitt: 27). Es ist in der Literatur beschrieben, dass der Anstieg der Faserdichte nach dem Prozess der Wallerschen Degeneration stark ansteigt (Maximum nach 6 Monaten), um schließlich nach 2 Jahren (bei erfolgreicher Reinnervation des Endorgans) wieder die Ausgangswerte zu erreichen <sup>211 129 98</sup>. Dies gilt für die einfache Durchtrennung des Nerven, sowie im Falle der Interposition eines autologen

Nerventransplantats. Dabei basiert die Aussage nur auf der rein chirurgischen Therapie<sup>100</sup>.

#### **4.5.4 Anzahl großer und kleiner Axone in den Semidünnschnitte**

Gleichzeitig zu diesem Zugewinn an Faserdichte fanden wir eine Abnahme der myelinisierten dicken Fasern im Verhältnis zu den dünnen nicht myelinisierten Fasern. Bei beiden Messmethoden war die Anzahl der kleinen unmyelinisierten Axone in der Kontroll-Gruppe distal der Läsion stark erhöht (im Schnitt „b und c“ fast 80%). In der VEGF behandelten Gruppe waren diese Werte mit 56% (autom. Zählung) und 48% (man. Zählung) wesentlich näher an den Kontroll-Werten der gesunden kontra-lateralen Seite (35%).

Der Anteil der großen Axone an der Gesamtzahl war reversibel verteilt und zeigte somit in der mit VEGF behandelten Gruppe deutlich erhöhte Werte.

Korreliert man diese Feststellungen mit der erwähnten Literatur findet man auch dort Ergebnisse, die dasselbe Bild zeigen<sup>129 98 100 211</sup>.

Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die mit VEGF behandelte Gruppe ein besseres Rematching der Axone auf Basis des operativen Modells erreicht hat. Diese wurden reversiert um genau einen solchen Effekt zu vermeiden. So scheint sich VEGF in diesem Fall positiv auszuwirken, weil sonst die Zahl der Axone weiterhin erhöht und - wie in der Kontrollgruppe gezeigt - kleinere Durchmesser aufweisen würde. Dieses Ergebnis entspricht den beschriebenen molekularen Eigenschaften<sup>187-189</sup>.

Dass die jeweiligen Werte beider Gruppen nach 17 Wochen noch nicht die Ausgangswerte der Kontrollseite aufweisen, unterstützt die These, dass die Reinnervation zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war. Dies kann auch durch die funktionellen Ergebnisse gezeigt werden. Interpretiert man dies anhand der Versuche nach<sup>129</sup>, ist der Anstieg in der von uns gemessenen 17. post-op Woche noch nicht zu Ende, sondern erreicht seinen Höhe-

punkt erst um die 24. Woche. Eine Regeneration konnte dementsprechend noch nicht voll ausgebildet sein.

#### **4.5.5 Die Fibrosierung als Zeichen von Degeneration**

Die Fibrosierung wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden gemessen. In der automatisierten Auswertung wurde diese als Bindegewebsanteil definiert. Die dort gewonnenen quantitativen Ergebnisse sollen als Ausgangspunkt der Diskussion dienen. So zeigt sich ein deutlicher Anstieg des fibrotischen Anteils von proximal nach distal (41%- 51%- 65%) in der Kontrollgruppe, wohingegen die VEGF-Gruppe relativ stabile Werte um 45% aufweist. Die Kontrollseite liegt bei 39% Bindegewebsanteil. So gilt, dass je höher der Bindegewebeanteil ist, desto schlechter ist die Regeneration möglich und desto wahrscheinlicher ist die Neurombildung<sup>200</sup>. Ähnlich wie weitere Wachstumsfaktoren NGF, GDNF und NTN<sup>125</sup> ist VEGF<sub>165</sub> in der Lage die axonale Ausprossung durch Unterdrückung der Semaphorin3A - Wirkung zu fördern<sup>200</sup>.

#### **4.5.6 Erörterung der Neurombildung**

Genau wie der Fibrosierungsgrad ist die Neurombildung auch als ein Zeichen fehlender Regeneration anzusehen. Die Ergebnisse zeigen Parallelen zu jenen der Fibrosierung. Dabei wird von Tannemaat et al. die Fibrosierung als Grundlage für die Neurombildung ausgemacht<sup>200</sup>. Diese These kann durch die Ergebnisse gestützt werden.

#### **4.5.7 Diskussion des Gewichts des M. gastrocnemius als morphologischer Parameter**

Als weiterer morphologischer Parameter wurde in unseren Versuchen die Abnahme der Muskelmasse eines vom N. ischiadicus innervierten Endorgans, in unserem Fall der M. gastrocnemius<sup>119</sup>, evaluiert. Ein Zusammenhang kann anhand unserer Ergebnisse durchaus nachvollzogen werden. Al-

lerdings zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Diese Tatsache ist kritisch zu beurteilen. Denn eine nicht existierende Korrelation zwischen den funktionellen Werten und der Vermessung des Endorgans könnte die Schlussfolgerung nahelegen, dass im Umkehrschluss die funktionellen Werte zu hinterfragen sind.

In diesem Zusammenhang ist allerdings zu beachten, dass die Größe des Muskelgewichts keinen Rückschluss auf die mikroskopische Anatomie oder Morphologie zulässt<sup>104</sup>. Zur Rechtfertigung der funktionellen Parameter kann daher angenommen werden, dass z.B. der fibrotische Anteil des Muskelgewebes in der Kontrollgruppe wesentlich höher ist<sup>104</sup>. Bei den mit VEGF behandelten Tieren dagegen könnte die Reinnervation zu einer Regeneration des atrophischen Muskelgewebes geführt haben, der seinerseits eine erhöhte Funktionalität zur Folge hatte. Hierdurch lässt sich der Unterschied bei den funktionellen Werten bei gleichzeitig nicht unterschiedlichen Muskelgewichten erklären. Für weitere Studien sollte daher zum einen die Morphologie des Muskelgewebes in der Auswertung mitberücksichtigt werden, zum anderen, wie schon im Zusammenhang mit der Axondichte angesprochen, sollten die Versuche verlängert werden, um dem Muskel Zeit zu geben, neben dem funktionellen Gewebe auch Masse aufzubauen. Sodann wären die diesbezüglichen Messergebnisse zu interpretieren.

#### **4.6 Diskussion der Zusammenhänge zwischen Funktion und Morphologie**

Die Ergebnisse, die speziell zu den Nerven-Segmenten „b“ und „c“ signifikante Unterschiede in den Behandlungsgruppen aufweisen, können aus zwei Perspektiven untersucht werden. Zum einen stellt sich die Frage, worin der eigentliche Effekt von VEGF auf die Morphometrie des jeweiligen im Semidünnschnitt abgebildeten Nervensegment besteht. Die zweite Frage

ergibt sich aus dem Vergleich der besagten Parameter auf Grundlage der Spearman-Korrelation mit dem Gold-Standard SFI.

Die neurotrophe Wirkung von VEGF<sub>165</sub>, , gibt die entscheidende Begründungen für die Gruppenunterschiede<sup>57 187</sup>. Wie in Tbl.1 gezeigt, korreliert die Innervation mit der Axondicke. Die mit VEGF behandelten Tiere weisen einen höheren Anteil großer, stark myelinisierten Axone auf, sollten daher auch eine stärkere Regeneration zeigen. Dies ist nach dem abgebildeten Zeitfenster von 17 Wochen der Fall. Im Gegensatz dazu weisen die Tiere der Kontrollgruppe die wesentlich höheren Anteile von kleinen Axonen auf. Die Mediane der VEGF-Gruppe korrelieren stets im Sinne der Hypothese.

Doch muss auch hier auf vereinzelte Abweichungen verwiesen werden. So gibt es Überschneidungen im Spektrum der Werte. Beispielsweise erreicht Tier „VEGF V“ in den Werten für „AC-c-Axon Groß/Gesamt“ einen Wert von 31 %. Dagegen hat Tier „K7“ einen Wert von 35 %.

Der Annahme<sup>36</sup>, dass kein kausaler Zusammenhang zwischen morphometrischen und funktionellen Werten besteht, muss daher widersprochen werden. Andererseits kann ein direkter Zusammenhang zu der Behandlung mit VEGF vermutet, allerdings nicht eindeutig auf zellulärer Ebene bewiesen werden.

In einem mehrere Dekaden zusammenfassenden Review von Vleggeert-Lankamp et al wird die Feststellung bestätigt, dass nur die Kombination aus diversifizierten Evaluationsmethoden eine wirkliche Quantifizierung der Regeneration des PNS zulässt. Die Morphometrie wird hierbei als wichtige Ergebnisquelle beschrieben<sup>211</sup>.

#### **4.7      Schlußfolgerung für eine optimierte Planung kommender Versuche und die Verbesserung der statistischen Aussagekraft**

„Absence of evidence is not the evidence of absence“<sup>213</sup>. Dieser Grundsatz bezeichnet das in der vorliegenden Studie zentrale Problem der großen P-

Werte und einer dadurch fehlenden Signifikanz der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Fakt ist, dass unsere Hypothese nicht durch alle Auswertungsverfahren gestützt wurde. Die methodischen Gründe dafür wurden im jeweiligen Abschnitt erörtert. Ein weiterer Grund für diese zum Teil nicht erreichte Verifikation unserer Hypothese ist, dass die Messwerte eines jeweiligen Parameters in einer Gruppe verschiedentlich sehr große Streubreiten aufwiesen. Gleichzeitig war die Gruppengröße mit teilweise nur drei Werten/Gruppe sehr klein, wodurch diese Extreme nicht durch eine Normalverteilung relativiert werden konnten.

Der Zusammenhang zwischen Gruppengröße, Verteilung der Messerwerte und Power der Versuche stehen in einem direkten Verhältnis und resultieren in dem p-Wert der statistischen Relevanz. Die Power ist definiert als die Wahrscheinlichkeit, mit der die Null-Hypothese des Tests widerlegt werden kann <sup>156</sup>.

Als Konsequenz hieraus müsste in zukünftigen Versuchen die Gruppengröße erweitert werden, um eine höhere Signifikanz zu erreichen. Anhand der Publikationsreihe „Statistic Review 4“ könnte die notwendige Größe der Gruppen bestimmt werden, die eine statistisch relevante Aussagekraft hinsichtlich einer Normalverteilung zulässt <sup>213</sup>.

Für jeden errechneten Wert der verschiedenen Variablen in einer Gruppe ergaben sich nach unseren Berechnungen die Größen der Standardabweichung, die ein Verhältnis der Gruppenmediane (Median Gruppe 1/Median Gruppe 2) und die resultierende statistische Power in Form des p-Wertes wiedergeben.

In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die Mediane eines jeden Wertes zwischen den Gruppen (VEGF u. Kontrolle) stets im Sinne unserer Hypothese unterschieden. Der Median der VEGF Gruppe zeigte immer Werte, die es zuließen, auf einen positiven Einfluss hinsichtlich der Regeneration der peripheren Nerven zu schließen.

Die Korrelation zwischen Funktion des Endorgans und Morphometrie wird in der Literatur kontrovers beschrieben, wobei durch unsere Versuche die Meinung gestützt wird <sup>36 104</sup>. Nach unseren Ergebnissen läßt sich ein kausaler und vorteilhafter Zusammenhang zwischen den beiden beschriebenen Parametern darstellen.

So weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass VEGF den Prozess der Wiedereinsprossung der Axone beschleunigt und somit zu einer schnelleren Wiederherstellung der physiologischen Faserqualitäten führt. Eine eindeutige Begründung dieser Hypothese kann allerdings nicht mit den von uns gewonnenen Daten erbracht werden. Es bedarf hierfür weiterer Versuche, in denen die Tiere nach der VEGF-Behandlung in einem engeren Zeitfenster morphologisch untersucht werden bzw. eine erweiterte Gruppengröße analysiert wird.

Eine vereinfachte Variante besteht darin, die Werte des standardisierten Gruppenunterschiedes (= Differenz der Gruppendurchschnittswerte / Absolute Standardabweichung) und der statistischen Power (P) in dem nach Altman gezeichneten Normogramm einzutragen und anhand dessen die sich im Mittelbereich bildende Gruppengröße abzulesen <sup>213</sup>.

Abschließend muss festgehalten werden, dass die Grundlage der Versuche und das operative Modell gut in der Literatur beschrieben sind. Dort wird an dem Einsatz eines autologen Nerventransplantats zur Überbrückung eines kurzen PNS-Defektes im Primaten-Modell Kritik erhoben <sup>82</sup>. Die für die End-zu-End-Koaptation notwendige longitudinale Elastizität des Nerven sei in Primaten gegeben und daher sei diese Art der Therapie in solchen Fällen auch bei größeren Nervendefekten gerechtfertigt. Der Schwellwert ist dabei nicht genau definierbar <sup>82</sup>.

In dem von uns verwendeten Rattenmodell ist die Grundlage für die Argumentation der End-zu-End Koaptation anders zu bewerten. Die im Primaten-Modell vorhandene longitudinale Elastizität der Nerven ist hier nicht im glei-



chen Maße gegeben. Dies hat zur Konsequenz, dass ein Neventransplantat schon bei kleineren Defekten indiziert ist <sup>82</sup>. Das von uns projizierte Trauma mit den Maßen 2 cm ist damit allemal ausreichend groß, um eine chirurgische Therapie mittels Nerventransplants zu rechtfertigen.

Neben dem operativen Modell ist auch das therapeutische Konzept der Applikation von VEGF<sub>165</sub> nicht in Frage zu stellen. Mit der Entdeckung der direkten neurotrophen Wirkung auf die Aussprossung der Axone, der Schwannzell-Proliferation und dem Zellüberleben nach einer Läsion des PNS über den „Fetal Liver Kinase“- Rezeptor (flk-1) konnte dargestellt werden, wie sich die Wirkung von VEGF<sub>165</sub> darstellt. Auch scheint die Bindung von VEGF<sub>165</sub> auf den Neuropilin-1-Rezeptor eine wichtige Rolle in der neurotrophen Wirkung zu spielen <sup>186 187 224</sup>. Somit ist der Einsatz in der Studie gut zu begründen.

Des Weiteren wurde in den Versuchen von Dr. Thomas Holzbach der hohe lokale Wirkungsgrad des adenoviralen Vektors beschrieben, wobei eine hohe Konzentration des VEGF<sub>165</sub> nachgewiesen werden konnte <sup>86</sup>. Dies lässt auf eine erfolgreiche Sekretion von VEGF in unseren Versuchen schließen.

## 5. Ausblick

Abschließend soll ein Ausblick auf die weitere Forschung auf Grundlage unserer Feststellungen gegeben werden. Dabei steht die Frage im Vordergrund, inwiefern die durchgeführten operativen bzw. therapeutischen Modelle in fortführenden Studien Verwendung finden können bzw. sich durch den hiesigen Einsatz empfohlen haben.

Mit Blick auf eine Perspektive der angewandten Therapie bleibt allein der Einsatz der adenoviralen Gentherapie als Applikationsform von VEGF<sub>165</sub> nicht hinreichend belegt. Zwar gilt die Gentherapie als ein sehr effizientes bzw. spezifisches Verfahren, einen Wirkstoff lokal zu applizieren und dessen Konzentration auf den eigentlichen Wirkungsort zu beschränken<sup>49</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde u.a. die Gentherapie am Beginn ihrer klinischen Erforschung Ende der 80-iger Jahre euphorisch gelobt und als Mittel der Wahl bei jeglichen Krankheitsbildern dargestellt<sup>73</sup>. So finden sich in der Literatur Beschreibungen über ganze Gesundheitssysteme, die nach dieser neuen Art der Therapie ausgerichtet werden sollten<sup>223</sup>.

Doch dieser Euphorie folgten ernüchternde Rückschläge. Es kam zum Auftreten von letalen, inflammatorischen bzw. leukämischen Nebenwirkungen in humanen Versuchen, wodurch die Bedenken der schon zuvor kritischen Vertreter eines reglementierten Einsatzes Auftrieb erhielten<sup>28 163 79</sup>.

Trotzdem hat die Forschung dieses Thema intensiv weiterverfolgt und dementsprechend sollte es bis zum heutigen Zeitpunkt schon etliche potentielle Therapien geben. Bei genauerer Betrachtung stellt man jedoch fest, dass sich nur ca. 1 % aller klinischen Studien im Stadium III befindet. Im Vergleich sind die Regularien dieser Therapieform besonders streng und es hat nach unserer Kenntnis noch kein Medikament das Stadium III der klinischen Erprobung überschritten<sup>209 73</sup>.

Gerade in der jüngsten Vergangenheit verlaublichen jedoch Erfolgsmeldungen, die sich insbesondere auf Erbkrankheiten oder Tumorleiden beziehen<sup>154</sup>  
<sup>31 179 140</sup>. Es handelt sich zumeist um Krankheiten, bei denen mit herkömmlichen Therapien kein Erfolg zu verzeichnen ist. Damit sind die Nebenwirkungen, auch wenn sie später letal enden, nicht gravierender als der pathophysiologische Verlauf der eigentlichen Krankheit. In diesen Fällen scheint eine Abwägung der Risiko-Nutzen-Relation klar.

Ein weiteres Gebiet, in dem Erfolgsmeldungen der VEGF-Therapie zu verzeichnen sind, ist die Ophthalmologie<sup>31</sup>.

Anders ist dies jedoch in der rekonstruktiven Chirurgie. Wie beschrieben, sind die Regenerationsraten nach Behandlung großer PNS-Traumen trotz der langen Therapiegeschichte ernüchternd, in der Regel aber nicht letal. Damit stellt sich die ethische Frage, ob der Einsatz von viralen Vektoren oder im Speziellen der Einsatz von adenoviralen Vektoren mit seinen bisher nicht kontrollierbaren Nebenwirkungen eine wirkliche klinisch anwendbare Applikationsform von Wirkstoffen darstellt. Selbst wenn sich die Regenerationsrate auf Basis der adenoviralen Gentherapie drastisch verbessern würde, wäre die Frage zu beantworten, inwieweit das Risiko der fetalen Nebenwirkung relativiert werden kann. Es bleibt somit abzuwarten, ob und in welchem Umfang die Behandlungssicherheit der viralen Applikation zu verbessern ist und somit die Risiken klar ausgegrenzt werden können.

## 6. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Effekt von lokal applizierten, adenoviral-induzierten VEGF<sub>165</sub> (AdCMV.VEGF<sub>165</sub>) auf die Regeneration des peripheren Nervenstransplantates am N. ischiadicus-Modell der Ratte anhand funktioneller, morphologischer und elektrophysiologischer Parameter zu qualifizieren und wenn möglich zu quantifizieren.

Die Bedeutung des Wachstumsfaktors VEGF im Prozess der Angiogenese sind bekannt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass VEGF als Neuroprotektor für Motoneurone im Rückenmark nach Verletzung von peripheren Nerven fungiert. Die biologischen Effekte von VEGF werden hauptsächlich von 2 Tyrosinkinase Rezeptoren, VEGFR1 und VEGFR2 vermittelt, aber auch eine Bindung von Neuropilin (NP) 1 und 2 an non-Tyrosinkinase Rezeptoren mit essentieller Bedeutung für die Ausbildung des Nervensystems findet statt. Im Modell des peripheren Nervenschadens mit autologem Nervenstransplantat an der Ratte soll der Effekt einer lokalen VEGF Gentherapie mit einem adenoviralen Vektorsystem aufgezeigt werden.

Im Verlauf des rechten N. ischiadicus des Ratte (n=18) wurde eine 2cm lange Strecke reseziert und retrograd als autologes Interponat wieder mikrochirurgisch koaptiert. Im Anschluss erfolgte die Injektion von 200 µl des für VEGF kodierenden, replikationsdefizienten Adenovirus (AdCMV.VEGF<sub>165</sub>, 10<sup>8</sup> pfU) in 4 Fraktionen in die umgebende Muskulatur und das Gleitgewebe. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 18 Wochen wurden zur Kontrolle der Reinnervation wöchentlich walking-track-Untersuchungen und statische Foot-print-Analysen durchgeführt. Am Versuchsende erfolgte die elektrophysiologische Untersuchung des M. gastrocnemicus, die Bestimmung des Muskelgewichts, die Zählung der Axone im N. Ischiadicus und die konventionelle histologische Untersuchung der Koaptationsstellen.

In der gentherapierten Versuchsgruppe zeigten sich in walking-track und foot-print-Analysen signifikant früher Reinnervationszeichen als in den Kon-

trollen, der Innervationsindex zum Versuchsende war mit 66% im Vergleich zu 48% in Relation zur gesunden Gegenseite ebenfalls signifikant erhöht ( $p < 0.05$ ). Das Muskelgewicht war im Vergleich zur Gegenseite mit 57% in der Versuchsgruppe gegenüber 48% bei den Kontrollen erhöht ( $p < 0.05$ ). Elektrophysiologisch zeigte der Vergleich der Messamplituden zwischen Tarsus und Trochanter eine in der Versuchsgruppe signifikant höhere Amplitude ( $p < 0.05$ ) bei im Vergleich zur Kontrollgruppe unveränderter Leitungsgeschwindigkeit. Histologisch zeigte sich in den Versuchsgruppen eine in der Tendenz reduzierte Vernarbung der Koaptationsstellen bei signifikant gesteigerter Axonzahl im N. ischiadicus.

Die Gentherapie mit VEGF führt in dieser Studie zu einer signifikant schnelleren Nervenregeneration mit einem resultierend besseren funktionellen Ergebnis. Diese Ergebnisse sind nicht nur durch eine lokal bessere Wundsituation mit schnellerer Inkorporation des Nerventransplantates durch induzierte Angiogenese zu erzielen, sondern zusätzlich durch eine direkte Wirkung auf die Nervenzelle resp. Axone selbst. Bei hoher Relevanz dieser Erkenntnisse schränkt jedoch das verwendete Vektorsystem einen möglichen klinischen Einsatz ein.

Es können folgende Schlüsse gezogen werden:

Anhand der ausgeprägten Signifikanzen auf Ebene der funktionellen Evaluation ist festzustellen, dass VEGF<sub>165</sub> eine fördernde Wirkung auf die Wiederherstellung der Funktionalität des End-Organs des traumatisierten N. ischiadicus hat. Morphometrische Parameter, wie die Anzahl der großkalibrigen Axone, das Verhältnis der groß- zu den kleinkalibrigen Axonen, bzw. dem Bindegewebsanteil auf verschiedenen Schnittebenen, belegen diese Feststellung auf einer zweiten Ebene.

Die Arbeitshypothese kann mit diesen Ergebnissen prinzipiell bestätigt werden. Die adenovirale Applikation von VEGF wirkt sich am autologen Transplantat des peripheren Nerven positiv auf die Regeneration aus.

## **7. Literaturverzeichnis**

1. (ESGT) ESoGT. One of three successfully treated CGD patients in a Swiss-German gene therapy trial died due to his underlying disease: A position statement from the European Society of Gene Therapy (ESGT). J. Gene Med. 2006; 8:1435
2. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D und Fiddes JC. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. EMBO J 1986; 5:2523-8
3. Aebischer P, Pochon NA, Heyd B, Deglon N, Joseph JM, Zurn AD, Baetge EE, Hammang JP, Goddard M, Lysaght M, Kaplan F, Kato AC, Schluep M, Hirt L, Regli F, Porchet F und De Tribolet N. Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using a polymer encapsulated xenogenic cell line engineered to secrete hCNTF. Hum Gene Ther 1996; 7:851-60
4. Aebischer P, Schluep M, Déglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F und Baetge EE. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. Nat Med 1996; 2:696-9
5. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J und Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. Nat Med 1995; 1:1024-8
6. Ayhan S, Markal N, Siemionow K und Araneo B. Effect of subepineurial dehydroepiandrosterone treatment on healing of transected nerves repaired with the epineurial sleeve technique. Microsurgery 2003
7. Bain JR, Mackinnon SE und Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast Reconstr Surg 1989; 83:129-38
8. Baldwin ME, Roufail S, Halford MM, Alitalo K, Stacker SA und Achen MG. Multiple forms of mouse vascular endothelial growth factor-D are generated by RNA splicing and proteolysis. J Biol Chem 2001; 276:44307-14

9. Barbeau D, Charbonneau R, Whalen SG, Bayley ST und Branton PE. Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene* 1994; 9:359-73
10. Barbin G, Manthorpe M und Varon S. Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem* 1984; 43:1468-78
11. Barras FM, Pasche P, Bouche N, Aebischer P und Zurn AD. Glial cell line-derived neurotrophic factor released by synthetic guidance channels promotes facial nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res* 2002; 70:746-55
12. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K und Isner JM. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97:1114-23
13. Benihoud K, Yeh P und Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10:440-7
14. Bervar M. Video analysis of standing--an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *Journal of Neuroscience Methods* 2000; 102:109-16
15. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA und Anderson WF. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270:475-80
16. Bohn M. Overview of Gene Therapy and Viral Vectors for CNS Applications. 2005:8-22
17. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C und Bordignon C. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997; 276:1719-24
18. Boyd JG und Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol* 2003; 27:277-324

19. Bozkurt a. Ermittlung der funktionellen Regeneration im N. ischiadicus Tiermodell mittels Visual-SSI: ein software-basierter Versuchsaufbau zur Bestimmung des Static Sciatic Index (SSI). 126. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 5:28.04. - 01.05.2009
20. Bozkurt A, Tholl S, Wehner S, Tank J, Cortese M, O'Dey Dm, Deumens R, Lassner F, Schügner F, Gröger A, Smeets R, Brook G und Pallua N. Evaluation of functional nerve recovery with Visual-SSI--a novel computerized approach for the assessment of the static sciatic index (SSI). *Journal of Neuroscience Methods* 2008; 170:117-22
21. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, Lu L, Song HY, Kwon BS, Warren RE und Donner DB. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol* 1995; 62:203-15
22. Burnett MG und Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgical focus* 2004; 16:E1
23. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M und Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:8033-7
24. Cao R, Bråkenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P und Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 2003; 9:604-13
25. Carano RAD und Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003; 8:980-9
26. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W und Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380:435-9
27. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL und Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288:669-72



28. Check E. A tragic setback. *Nature* 2002; 420:116-8
29. Chen Z-L, Yu W-M und Strickland S. Peripheral regeneration. *Annual Review of Neuroscience* 2007; 30:209-33
30. Chiu DT, Lovelace RE, Yu LT, Wolff M, Stengel S, Middleton L, Janecka IP und Krizek TJ. Comparative electrophysiologic evaluation of nerve grafts and autogenous vein grafts as nerve conduits: an experimental study. *Journal of reconstructive microsurgery* 1988; 4:303-9, 311-2
31. Chung DC, Lee V und Maguire AM. Recent advances in ocular gene therapy. *Curr Opin Ophthalmol* 2009; 20:377-81
32. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT und Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990; 172:1535-45
33. Couzin J und Kaiser J. Gene therapy. As Gelsinger case ends, gene therapy suffers another blow. *Science* 2005; 307:1028
34. Cuddon PA. Electrophysiology in neuromuscular disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002; 32:31-62
35. Dahlin LB und Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am* 2001; 12:341-52
36. de Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *Journal of Neuroscience Methods* 1995; 58:29-37
37. de Medinaceli L, DeRenzo E und Wyatt RJ. Rat sciatic functional index data management system with digitized input. *Comput Biomed Res* 1984; 17:185-92
38. de Medinaceli L, Freed WJ und Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982; 77:634-43
39. Dellon AL und Mackinnon SE. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Annals of plastic surgery* 1989; 23:197-202

40. Dellon ES und Dellon AL. Functional assessment of neurologic impairment: track analysis in diabetic and compression neuropathies. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88:686-94
41. Delmenhorst. Genetische Modifikation von Schwann-Zellen der Ratte und des Hundes- in-vitro-Charakterisierung und funktionelle und histologische Untersuchung nach Transplantation im Regenerationsmodell des Nervus ischiadicus der adulten Ratte. *Disseration* 2009:1-123
42. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH und Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *Journal of Neuroscience Methods* 2000; 96:89-96
43. Dorfman LJ. Quantitative clinical electrophysiology in the evaluation of nerve injury and regeneration. *Muscle Nerve* 1990; 13:822-8
44. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M und Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146:1029-39
45. Edelstein ML, Abedi MR und Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J. Gene Med.* 2007; 9:833-42
46. Ehrmann RL und Knoth M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41:1329-41
47. Enders JF, BELL JA, DINGLE JH, FRANCIS T, HILLEMANN MR, HUEBNER RJ und PAYNE AM. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* 1956; 124:119-20
48. Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Böhlen P und Guillemin R. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6507-11
49. Evans CH, Gouze E, Gouze J-N, Robbins PD und Ghivizzani SC. Gene therapeutic approaches-transfer in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58:243-58

50. Evans PJ, Mackinnon SE, Midha R, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y und Hare GM. Regeneration across cold preserved peripheral nerve allografts. *Microsurgery* 1999; 19:115-27
51. Evans PJ, Midha R und Mackinnon SE. The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. *Prog Neurobiol* 1994; 43:187-233
52. Fansa H, Keilhoff G, Wolf G und Schneider W. [Cultivating human Schwann cells for tissue engineering of peripheral nerves]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefäße : Organ der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen* 2000; 32:181-6
53. Farkas L, Farkas D, Ask K, Möller A, Gauldie J, Margetts P, Inman M und Kolb M. VEGF ameliorates pulmonary hypertension through inhibition of endothelial apoptosis in experimental lung fibrosis in rats. *J Clin Invest* 2009; 119:1298-311
54. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25:581-611
55. Ferrara N und Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18:4-25
56. Ferrara N, Gerber H und LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003
57. Ferrara N, Gerber H-P und LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-76
58. Ferrara N und Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:851-8
59. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-6
60. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6

61. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29:15-8
62. Folkman J. Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs. *Cancer Biol Ther* 2003; 2:S127-33
63. Folkman J, Merler E, Abernathy C und Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; 133:275-88
64. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M und Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376:66-70
65. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC und Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995; 177:275-83
66. Frostick SP, Yin Q und Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 1998; 18:397-405
67. Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, King D, Gilmour KC, Sinclair J, Brouns G, Schmidt M, von Kalle C, Barington T, Jakobsen MA, Christensen HO, Al Ghonaïm A, White HN, Smith JL, Levinsky RJ, Ali RR, Kinnon C und Thrasher AJ. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 2004; 364:2181-7
68. George E, Glass J und Griffin J. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *Journal of Neuroscience* 1995
69. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V und Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273:30336-43
70. Geuna S, Tos P, Guglielmone R, Battiston B und Giacobini-Robecchi MG. Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. *Anat Embryol* 2001; 204:1-10

71. Ginn SL, Curtin JA, Kramer B, Smyth CM, Wong M, Kakakios A, McCowage GB, Watson D, Alexander SI, Latham M, Cunningham SC, Zheng M, Hobson L, Rowe PB, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S und Alexander IE. Treatment of an infant with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) by gene therapy in Australia. *Med J Aust* 2005; 182:458-63
72. Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, Holm PS, Konerding MA, Schams D, Biemer E und Gänsbacher B. AdVEGF165 gene transfer increases survival in overdimensioned skin flaps. *J. Gene Med.* 2005; 7:297-306
73. Gottesman MM. Cancer gene therapy: an awkward adolescence. *Cancer Gene Ther* 2003; 10:501-8
74. Grasso G, Sfacteria A, Brines M und Tomasello F. A new computed-assisted technique for experimental sciatic nerve function analysis. *Med Sci Monit* 2004; 10:BR1-3
75. Greenblatt M und Shubi P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41:111-24
76. Gudemez E, Ozer K und Cunningham B. Dehydroepiandrosterone as an enhancer of functional recovery following crush injury to rat; *Microsurgery* 2002; 22:234-41
77. Guertin AD, Zhang DP, Mak KS, Alberta JA und Kim HA. Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 2005; 25:3478-87
78. Gulati AK und Cole GP. Immunogenicity and regenerative potential of acellular nerve allografts to repair peripheral nerve in rats and rabbits. *Acta neurochirurgica* 1994; vol. 126 (2-4) pp. 158-64
79. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval J-L, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M und Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348:255-6

80. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A und Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302:415-9
81. Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivelä A, Vanninen E, Mussalo H, Kauppila E, Simula S, Närvänen O, Rantala A, Peuhkurinen K, Nieminen MS, Laakso M und Ylä-Herttuala S. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003; 107:2677-83
82. Hentz VR, Rosen JM, Xiao SJ, McGill KC und Abraham G. The nerve gap dilemma: a comparison of nerves repaired end to end under tension with nerve grafts in a primate model. *The Journal of hand surgery* 1993; 18:417-25
83. Ho QT und Kuo CJ. Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:1349-57
84. Hobson MI, Green CJ und Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat* 2000; 197 Pt 4:591-605
85. Holzbach. Adenoviraler Gentransfer von VEGF165 – Induktion von Angiogenese und Reduzierung von Nekrose in kritisch durchbluteten Hautlappenplastiken. *Dissertation* 2007:1-124
86. Holzbach T, Taskov C, Neshkova I, Holm PS, Konerding MA, Schams D, Gänsbacher B, Biemer E und Giunta RE. Angiogenesis VEGF165 gene therapy with AdVEGF- a new delay procedure for flaps]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefäße : Organ der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen* 2005; 37:365-74

87. Holzbach T, Vlaskou D, Neshkova I, Konerding MA, Wörtler K, Mykhaylyk O, Gänsbacher B, Machens H-G, Plank C und Giunta RE. Non-viral VEGF(165) gene therapy--magnetofection of acoustically active magnetic lipospheres ('magnetobubbles') increases tissue survival in an oversized skin flap model. *J Cell Mol Med* 2010; 14:587-99
88. Hontanilla B, Aubá C und Gorriá O. Nerve regeneration through nerve autografts after local administration of brain-derived neurotrophic factor with osmotic pumps. *Neurosurgery* 2007; 61:1268-74; discussion 1274-5
89. Howard CS, Blakeney DC, Medige J, Moy OJ und Peimer CA. Functional assessment in the rat by ground reaction forces. *Journal of biomechanics* 2000; 33:751-7
90. Hruska RE, Kennedy S und Silbergeld EK. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci* 1979; 25:171-9
91. Hu WS und Pathak VK. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol Rev* 2000; 52:493-511
92. Huth S, Lausier J, Gersting SW, Rudolph C, Plank C, Welsch U und Rosenecker J. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J. Gene Med.* 2004; 6:923-36
93. IJkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A und Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials* 2004; 25:1583-92
94. IJkema-Paassen J, Meek MF und Gramsbergen A. Long-term reinnervation effects after sciatic nerve lesions in adult rats. *Ann Anat* 2005; 187:113-20
95. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY und Semenza GL. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998; 12:149-62
96. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9:685-93
97. Jain RK und Munn LL. Leaky vessels? Call Ang1! *Nat Med* 2000; 6:131-2

98. Jenq CB und Coggeshall RE. Effects of sciatic nerve regeneration on axonal populations in tributary nerves. *Brain Res* 1984; 295:91-100
99. Jenq CB und Coggeshall RE. The effects of an autologous transplant on patterns of regeneration in rat sciatic nerve. *Brain Res* 1986; 364:45-56
100. Jenq CB und Coggeshall RE. Sciatic nerve regeneration after autologous sural nerve transplantation in the rat. *Brain Res* 1987; 406:52-61
101. Johnston RB, Zachary L, Dellon AL, Seiler WA und Teplica DM. Improved imaging of rat hindfoot prints for walking track analysis. *Journal of Neuroscience Methods* 1991; 38:111-4
102. Josephine Tanck J. Studie zur morphometrischen Auswertung peripherer Nerven. 2004:150
103. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N und Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15:290-98
104. Kanaya F, Firrell JC und Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98:1264-71, discussion 1272-4
105. Kay MA, Glorioso JC und Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001; 7:33-40
106. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J und Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246:1309-12
107. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS und Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993; 362:841-4
108. Kline DG. Surgical repair of peripheral nerve injury. *Muscle Nerve* 1990; 13:843-52
109. Koka R und Hadlock TA. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection. *Exp Neurol* 2001; 168:192-5



110. Kootstra NA und Verma IM. Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43:413-39
111. Laham RJ, Simons M und Sellke F. Gene transfer for angiogenesis in coronary artery disease. *Annu Rev Med* 2001; 52:485-502
112. LeCouter J, Kowalski J, Foster J und Hass P. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 2001
113. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber H-P, Hillan KJ und Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003; 299:890-3
114. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H und Wood WI. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1988-92
115. Lee SK und Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2000; 8:243-52
116. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV und Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-9
117. Lewin SL, Utey DS, Cheng ET, Verity AN und Terris DJ. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope* 1997; 107:992-9
118. Li J, Post M, Volk R, Gao Y, Li M, Metais C, Sato K, Tsai J, Aird W, Rosenberg RD, Hampton TG, Sellke F, Carmeliet P und Simons M. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 2000; 6:49-55
119. Lohmeyer JA, Essmann E, Richerson SJ, Hagel C, Egana JT, Condurache A, Ganske P, Schulz K, Mailänder P und Machens HG. Use of Erythropoietin as adjuvant therapy in nerve reconstruction. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie* 2008; 393:317-23

120. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K und Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98:2800-4
121. Lubiatuski P, Gurunluoglu R, Goldman CK, Skugor B, Carnevale K und Siemionow M. Gene therapy by adenovirus-mediated vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 promotes perfusion of muscle flaps. *Plast Reconstr Surg* 2002; 110:149-59
122. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *The Journal of hand surgery* 2000; 25:391-414
123. Lundborg G, Rosén B, Dahlin L und Danielsen ... N. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: Early .... *Journal of Hand Surgery* 1997
124. Lundstrom K. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 2003; 21:117-22
125. Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA und Beris AE. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Current neurovascular research* 2007; 4:143-51
126. MacColl GS, Novo FJ, Marshall NJ, Waters M, Goldspink G und Bouloux PM. Optimisation of growth hormone production by muscle cells using plasmid DNA. *J Endocrinol* 2000; 165:329-36
127. Mackinnon S und Dellon A. Clinical Nerve Reconstruction with a Bioabsorbable Polyglycolic Acid Tube. *Plast Reconstr Surg* 1990
128. Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Annals of plastic surgery* 1989; 22:257-73
129. Mackinnon SE, Dellon AL und O'Brien JP. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve* 1991; 14:1116-22

130. Maeda H, Danel C und Crystal RG. Adenovirus-mediated transfer of human lipase complementary DNA to the gallbladder. *Gastroenterology* 1994; 106:1638-44
131. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P und Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:9267-71
132. Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E und Ylä-Herttuala S. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther* 2002; 6:127-33
133. Malkusch W, Konerding MA, Klapthor B und Bruch J. A simple and accurate method for 3-D measurements in microcorrosion casts illustrated with tumour vascularization. *Analytical cellular pathology : the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology* 1995; 9:69-81
134. Martin P und Lewis J. Origins of the neurovascular bundle: interactions between developing nerves and blood vessels in embryonic chick skin. *Int J Dev Biol* 1989; 33:379-87
135. Meirer R, Gurunluoglu R und Siemionow M. Neurogenic perspective on vascular endothelial growth factor: review of the literature. *Journal of reconstructive microsurgery* 2001; 17:625-30
136. Michalski B, Bain JR und Fahnestock M. Long-term changes in neurotrophic factor expression in distal nerve stump following denervation and reinnervation with motor or sensory nerve. *J Neurochem* 2008; 105:1244-52
137. Millesi H. Forty-two years of peripheral nerve surgery. *Microsurgery* 1993; 14:228-33
138. Minnich B und Lametschwandtner A. Lengths measurements in microvascular corrosion castings: two-dimensional versus three-dimensional morphometry. *Scanning* 2000; 22:173-7
139. Morbin M, Monaco S, Zanette G und Rizzuto N. IDPN impairs post-traumatic regeneration of rat sciatic nerve. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993; 19:489-99

140. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA und Rosenberg SA. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006; 314:126-9
141. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* 2000; 18:119-28
142. Mühlhauser J, Merrill MJ, Pili R, Maeda H, Bacic M, Bewig B, Passaniti A, Edwards NA, Crystal RG und Capogrossi MC. VEGF165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis in vivo. *Circ Res* 1995; 77:1077-86
143. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260:926-32
144. Mumenthaler M. Läsionen peripherer Nerven. Diagnostik und Therapie. Stuttgart, New York Thieme, 1993.
145. Mumenthaler MS, M. / Müller-Vahl, H. Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome. Vol. 8. Auflage. New York: Thieme, 2003.
146. Mymryk JS und Bayley ST. Multiple pathways for activation of E2A expression in human KB cells by the 243R E1A protein of adenovirus type 5. *Virus Res* 1994; 33:89-97
147. Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, Yang ZY, San H, Shu HB, Liptay S, Gold L, Gordon D und Derynck R. Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10759-63
148. Nishikawa M, Yamauchi M, Morimoto K, Ishida E, Takakura Y und Hashida M. Hepatocyte-targeted in vivo gene expression by intravenous injection of plasmid DNA complexed with synthetic multi-functional gene delivery system. *Gene Ther* 2000; 7:548-55
149. Ochoa J, Danta G, Fowler TJ und Gilliatt RW. Nature of the nerve lesion caused by a pneumatic tourniquet. *Nature* 1971; 233:265-6
150. Ochoa J, Fowler TJ und Gilliatt RW. Anatomical changes in peripheral nerves compressed by a pneumatic tourniquet. *J Anat* 1972; 113:433-55

151. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K und Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2576-81
152. Olson L, Bäckman L, Ebendal T, Eriksdotter-Jönhagen M, Hoffer B, Humpel C, Freedman R, Giacobini M, Meyerson B und Nordberg A. Role of growth factors in degeneration and regeneration in the central nervous system; clinical experiences with NGF in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neurol* 1994; 242:S12-5
153. Ostrem J. Rush University Medical Center and UCSF researchers found gene therapy appeared to reduce symptoms of Parkinson's disease by 40 percent.<http://www.rush.edu/webapps/MEDREL/servlet/NewsRelease?id=802>. 2009:1-2
154. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kühlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Lüthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R und Grez M. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 2006; 12:401-9
155. Palù G, Parolin C, Takeuchi Y und Pizzato M. Progress with retroviral gene vectors. *Rev Med Virol* 2000; 10:185-202
156. Park HM. Hypothesis Testing and Statistical Power of a Test\*. 2008:1-41
157. Penn RD, Kroin JS, York MM und Cedarbaum JM. Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). *Neurosurgery* 1997; 40:94-9; discussion 99-100
158. Phillips MI. Somatic gene therapy for hypertension. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:715-21
159. Plank C, Scherer F, Schillinger U, Bergemann C und Anton M. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *Journal of liposome research* 2003; 13:29-32

160. Plate KH, Breier G, Weich HA und Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359:845-8
161. Rajagopalan S, Mohler ER, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS und Annex BH. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003; 108:1933-8
162. Ramaglia V, Tannemaat MR, de Kok M, Wolterman R, Vigar MA, King RHM, Morgan BP und Baas F. Complement inhibition accelerates regeneration in a model of peripheral nerve injury. *Mol Immunol* 2009; 47:302-9
163. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao G-p, Wilson JM und Batshaw ML. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80:148-58
164. Rasmussen HS, Rasmussen CS und Macko J. VEGF gene therapy for coronary artery disease and peripheral vascular disease. *Cardiovasc Radiat Med* 2002; 3:114-7
165. Ray D, Mishra M, Ralph S, Read I, Davies R und Brenchley P. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes* 2004; 53:861-4
166. Ray WZ und Mackinnon SE. Management of nerve gaps: Autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol* 2009
167. Richardson PM, McGuinness UM und Aguayo AJ. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 1980; 284:264-5
168. Roglio I, Giatti S, Pesaresi M und Bianchi R. Neuroactive steroids and peripheral neuropathy. *Brain Research Reviews* 2008

169. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC und Topalian SL. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; 323:570-8
170. Rupp A, Dornseifer U, Fischer A, Schmahl W, Rodenacker K, Jütting U, Gais P, Biemer E, Papadopoulos N und Matiassek K. Electrophysiologic assessment of sciatic nerve regeneration in the rat: surrounding limb muscles feature strongly in recordings from the gastrocnemius muscle. *Journal of Neuroscience Methods* 2007; 166:266-77
171. Sawamura D, Meng X, Ina S, Kon A, Tamai K, Ohe Y und Hashimoto I. Expression vector with DNA of bovine papilloma virus 1 for keratinocyte gene therapy. *J Dermatol Sci* 2000; 23:111-6
172. Schaper W und Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1143-51
173. Scharpf J, Meirer R, Zielinski M, Unsal M, Ramineni P, Nair D und Siemionow M. A novel technique for peripheral nerve repair. *Laryngoscope* 2003; 113:95-101
174. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL und Kochanek S. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 1998; 18:180-3
175. Schratzberger P, Schratzberger G, Silver M, Curry C, Kearney M, Magner M, Alroy J, Adelman LS, Weinberg DH, Ropper AH und Isner JM. Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nat Med* 2000; 6:405-13
176. Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve* 1990; 13:785-800
177. Seddon H. Three types of nerve injury. *Brain* 1943
178. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML und Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376:62-6

179. Sharma A, Tandon M, Bangari DS und Mittal SK. Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy. *Current drug therapy* 2009; 4:117-138
180. Shiraishi S, Le Quesne PM und Gajree T. The effect of vincristine on nerve regeneration in the rat. An electrophysiological study. *J Neurol Sci* 1985; 71:9-17
181. Shooter EM. Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:601-29
182. Shweiki D, Itin A, Soffer D und Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843-5
183. Siemionow M und Sari A. A contemporary overview of peripheral nerve research from the Cleveland Clinic microsurgery laboratory. *Neurol Res* 2004; 26:218-25
184. Smit X, van Neck JW, Ebeli MJ und Hovius SER. Static footprint analysis: a time-saving functional evaluation of nerve repair in rats. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery / Nordisk plastikkirurgisk forening [and] Nordisk klubb for handkirurgi* 2004; 38:321-5
185. Smith MS und Browne JD. The effect of endothelial cell growth factor on peripheral nerve regeneration. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1998; 118:178-82
186. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G und Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; 92:735-45
187. Sondell M, Lundborg G und Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1999; 19:5731-40
188. Sondell M, Lundborg G und Kanje M. Vascular endothelial growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts. *Brain Res* 1999; 846:219-28



189. Sondell M, Sundler F und Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci* 2000; 12:4243-54
190. Stewart DJ, Hilton JD, Arnold JMO, Gregoire J, Rivard A, Archer SL, Charbonneau F, Cohen E, Curtis M, Buller CE, Mendelsohn FO, Dib N, Page P, Ducas J, Plante S, Sullivan J, Macko J, Rasmussen C, Kessler PD und Rasmussen HS. Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF(121) (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Ther* 2006; 13:1503-11
191. Stoll G, Griffin JW, Li CY und Trapp BD. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 1989; 18:671-83
192. Storkebaum E und Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest* 2004; 113:14-8
193. Storkebaum E, Lambrechts D und Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* 2004; 26:943-54
194. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 1951; 74:491-516
195. Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve* 1990; 13:771-84
196. Sunderland S und SMITH J. Nerves and nerve injuries. *Plast Reconstr Surg* 1969
197. Sunderland S und Williams H. Nerve Injuries and Their Repair: A Critical Appraisal. *Plast Reconstr Surg* 1992
198. Takagi S, Kasuya Y, Shimizu M, Matsuura T, Tsuboi M, Kawakami A und Fujisawa H. Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev Biol* 1995; 170:207-22

199. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF und Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994; 93:662-70
200. Tannemaat MR, Boer GJ, Eggers R, Malessy MJA und Verhaagen J. From microsurgery to nanosurgery: how viral vectors may help repair the peripheral nerve. *Prog Brain Res* 2009; 175:173-86
201. Tarkka T, Sipola A, Jämsä T, Soini Y, Ylä-Herttuala S, Tuukkanen J und Hautala T. Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *J. Gene Med.* 2003; 5:560-6
202. Taub PJ, Silver L und Weinberg H. Plastic surgical perspectives on vascular endothelial growth factor as gene therapy for angiogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105:1034-42
203. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 1999; 194 ( Pt 1):1-14
204. Thomas KA, Rios-Candelore M, Giménez-Gallego G, DiSalvo J, Bennett C, Rodkey J und Fitzpatrick S. Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6409-13
205. Todnem K, Knudsen G, Riise T, Nyland H und Aarli JA. The non-linear relationship between nerve conduction velocity and skin temperature. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1989; 52:497-501
206. Trumble TE und McCallister WV. Repair of peripheral nerve defects in the upper extremity. *Hand clinics* 2000; 16:37-52
207. Utley DS, Lewin SL, Cheng ET, Verity AN, Sierra D und Terris DJ. Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122:407-13

208. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patrício JA und Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *Journal of Neuroscience Methods* 2001; 108:1-9
209. Verma IM und Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:711-38
210. Vernadakis AJ, Koch H und Mackinnon SE. Management of neuromas. *Clinics in plastic surgery* 2003; 30:247-68, vii
211. Vleggeert-Lankamp CLAM. The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: a systematic review. *Laboratory investigation. J Neurosurg* 2007; 107:1168-89
212. Walker JL, Evans JM, Meade P, Resig P und Siskin BF. Gait-stance duration as a measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. *Journal of Neuroscience Methods* 1994; 52:47-52
213. Whitley E und Ball J. Statistics review 4: sample size calculations. *Crit Care* 2002; 6:335-41
214. Witzenbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Wagner M, Principe N, Kearney M, Hu JS und Isner JM. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 1998; 153:381-94
215. Wold WS und Gooding LR. Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* 1991; 184:1-8
216. Wolloscheck T, Ravnic D und Konerding MA. [Microvessel visualisation: applications and limitations]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefäße : Organ der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen* 2005; 37:408-14
217. Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, Schmalbruch H und Krarup C. Comparative electrophysiological, functional, and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery* 2005; 25:508-19

- 218. Wongtrakul S, Bishop AT und Friedrich PF. Vascular endothelial growth factor promotion of neoangiogenesis in conventional nerve grafts. *The Journal of hand surgery* 2002; 27:277-85
- 219. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ und Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407:242-8
- 220. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J und Jin H. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27:838-44
- 221. Ylä-Herttuala S und Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003; 9:694-701
- 222. Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I und Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1015-26
- 223. Young LS, Searle PF, Onion D und Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 2006; 208:299-318
- 224. Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals* 2005; 14:207-21
- 225. Zhang F und Lineaweaver WC. Gene transfer with DNA strand technique and peripheral nerve injuries. *Journal of long-term effects of medical implants* 2002; 12:85-96

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** (S.9) Querschnitt eines peripheren Nerven  
Quelle: Lundborg G: Nerve Injury and Repair. New York: Churchill Livingstone, 1988, S. 33)
- Abb. 2** (S.10) Darstellung der Blutversorgung am peripheren Nerven;  
Quelle: Lundborg G: Nerve Injury and Repair. New York: Churchill Livingstone, 1988, p 43.)
- Abb. 3** (S.13) Übersicht der Heilungschancen nach dem peripheren Nervenstrauma in Assoziation mit der Klassifikation nach Sunderland/Seddon Quelle: Neurosurg. Focus, 2004 American Association of Neurological Surgeons
- Abb. 5** (S.16) A: Schematische Darstellung der Epineuralen Nahtführung am peripheren Nerven; B: Schematische Darstellung der Faszikelnah am peripheren Nerven. Quelle: <sup>122</sup>„Lundborg. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. The Journal of hand surgery (2000) vol. 25 (3) pp. 391-414“
- Abb. 6** (S.27) Rekombination des viralen Gens; Zusammenfassende, vereinfachende bildliche Darstellung der initiiierenden Faktoren der VEGF-Synthese bzw. dem darauf folgenden Splicing zur Synthese der unterschiedlichen VEGF-Subtypen.
- Abb. 7** (S.34) Herstellung viraler Vektoren;  
a) Umwandlung eines Virus in einen rekombinanten Vektor. Dabei wird schematisch ein virales Genom gezeigt, welches als solches für den menschlichen Körper pathologisch ist. Geflankt wird dieses durch Cis-Sequenzen, welche für die Replikation und Kapselung kodieren. Das „Verpackungs-Konstrukt“ beinhaltet diese Gene, die für die Replikation und Strukturgene kodieren. Schließlich wird es im „Vektoren Konstrukt“ eingefügt, welches zusätzliche regulatorische Sequenzen beinhaltet.  
b) Durch den Prozess der Transfektion, Infektion durch einen Hilfsvirus oder stabilen Zelllinien gelangen die „Verpackungs-“ und „VeConstructs“ in die Hostzelle. Die Proteine für die Replikation und Viruszusammensetzung sind durch den „packaging construct“ exprimiert, Schließlich wird das Vektoren-genom in eine Hülle der Virusbestandteile eingehüllt, und der rekombinante Virale Vektor entsteht.  
Quelle: <sup>209</sup> GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine; Inder M. Verma and Matthew D. Weitzman; Laboratory of Genetics, The Salk Institute, La Jolla, USA
- Abb. 8** (S.41) Gentherapeutische Indikationen in medizinischen Studien (n= 1309); Quelle: s. Abb.10
- Abb. 9** (S.41) Genetherapeutische Zielgene (n=1309); Quelle: s. Abb.10

- Abb. 10** (S.41) Vektoren in klinischen Studien (n=1339);  
Quelle aller Abbildungen <sup>45</sup>: Gene therapy clinical trials worldwide to 2007- an up date. The Journal of Gene Medicine (2007) vol. 9 (10) pp. 833-42
- Abb. 11** (S.48) Anatomische Übersicht des frei präparierten N. ischiadicus (1);  
N.tibialis (2); N. peroneus (3); N. surae- ramus superficialis (4);  
M. gastrocnemius (gm); M. quadriceps (qm)
- Abb. 12** (S.49) Schematische Darstellung der Lokalisation der Hebung am N. ischiadicus
- Abb. 13** (S.51) Ablichtung der intraoperativen Injektion
- Abb. 14** (S.54) Versuchsplan des durchgeführten Experiments; Im vertikalen Verlauf ist der zeitliche Ablauf der jeweiligen Untersuchungen beschrieben. Die Horizontale stellt die Verteilung der Versuchstiere da.
- Abb.15** (S.59) Fußabdruck und Zehenspreizung einer gesunden Ratte; a) ITS: intermediate toe spread, b) TS: toe spread, c) PL: Printh lenght
- Abb.16** (S.60)
- Abb. 17** (S.62) Nach Smit et al. <sup>184</sup>; Formel zur Erreichnung des SSI; Einzelne Faktoren: E= operierte Seite; N= nicht-operierte Seite; TS= Toe spread=Zehenspreizung 1.-5. Zehe; IST= intermediate toe spread= Zehenspreizung 2.-4.
- Abb. 18** (S.64) Verlauf des N. lichiadicus sowie elektro-physiologische Stimmlationsorte  
a) Schematische Darstellung des Verlaufes vom N.ischiadicus bei der operierten Ratte. (IP: Interponat; A1, A3: Stimmlationsstellen; Mm. interossie plantares)  
b) Versuchsphoto mit den angebrachten Elektroden am gesunden, nichtoperierten Bein des Versuchstieres
- Abb. 19** (S.66) Ablichtung der Elektrodenlokalisationen am Fuß eines Versuchstieres
- Abb. 20** (S.68) Schematische Darstellung der morphologischen Schnitte
- Abb. 21** (S.73) Beispielbild der automatisierten Bildanalyse mittels Definiens Software;  
Gelb: als "groß" identifizierte Axone; Orange: als "klein" identifizierte Axone;  
weiß: Artefakt
- Abb. 22** (S.75) Bild mitsamt des durch Photoshop applizierten „Counting-Grid“ zur händischen Auszählung von exemplarischen Flächen
- Abb. 23** (S.81) Corrosion Cast; beispielhafte Darstellung der Mikrogefäße
- Abb. 24** (S.86) Ergebnisse der dynamisch gemessenen Zehenabstände D1-D5
- Abb. 25** (S.87) Ergebnisse der dynamisch gemessenen Zehenabstände D2-D4
- Abb. 26** (S.88) Ergebnisse der dynamisch gemessenen Fußabdruckslänge
- Abb. 27** (S.90) Ergebnisse des errechneten SFI

**Abb. 28** (S.91) Beispielhafte Abbildung der Messung des statischen Fußabdrucks

**Abb. 29** (S.92) Ergebnisse der statisch gemessenen Zehenabstände D1-D5

**Abb. 30** (S.93) Ergebnisse der statisch gemessenen Zehenabstände D2-D4

**Abb. 31** (S.94) Ergebnisse des errechneten SSI

**Abb. 32** (S.97) Gruppenspezifische Semidünnschnitte/ Schnitthöhe (a,b,c,d)

**Abb. 33** (S.99) Screenshot mit Abbildung der Definions-Software

**Abb. 34** (S.102) Ergebnisse Software-Morphometrie; Nr.1

**Abb. 35** (S.103) Ergebnisse Software-Morphometrie; Nr.2

**Abb. 36** (S.104) Ergebnisse Software-Morphometrie; Nr.3

**Abb. 37** (S.108) Ergebnisse Manuelle-Morphometrie; Nr.1

**Abb. 38** (S.109) Ergebnisse Manuelle-Morphometrie; Nr.2

**Abb. 39** (S.112) Beispielbilder der Corrosion-Cast Auswertung

## **9. Tabellenverzeichnis**

- Tbl. 1** (S.8) Einteilung des PNS nach Erlanger und Grasser; Quelle: „Physiologie“, Deetjen, Speckmann, Henschler, Elsevier(Urban & Fischer), 4. Auflage
- Tbl. 2** (S.12) Tabellarische Zusammenfassung der Einteilung des peripheren Nerventraumas nach Sunderland und Seddon
- Tbl. 3** (S.29) VEGF -Hauptgruppen und die Eigenschaften
- Tbl. 4** (S.35) Virale Vektoren; Quelle: <sup>124</sup> Latest development in viral vectors for gene therapy. Trends in biotechnology (2003) vol.21(3) pp.117-22
- Tbl. 5** (S.38) Spezifische Eigenschaften der Vektoren;  
Quelle: <sup>110</sup>. Gene therapy with viral vectors. Annual review of pharmacology and toxicology (2003) vol. 43 pp. 413-39
- Tbl. 6** (S.52) Verbildlichung der Funktionseinschränkung nach N. Ischiadicus Typ-5-Läsion; Modifiziert nach: <sup>7</sup> Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posteriotibialnerve lesions in the rat. Plastic and reconstructive surgery (1989) vol. 83 (1) pp. 129-38
- Tbl. 7** (S.96) Ergebnisse der elektrophysiologische Untersuchung
- Tbl. 8** (S.110) Ergebnisse der HE-Schnitt Auswertung
- Tbl. 9** (S.111) Auswertung des M. GastrocnemiusGastrocnemius der operierten Seite



## 10. **Abbkürzungen:**

A(a)	Arteria(e)
AAV	Adeno-assoziierten Viren
ADV	Adenovirus
Ang	Angiopoetins
BDNF	Brain derived Neurotrophic Growth Factor
CMAP	Compound Muscle Action Potential
CNFT	Ciliary neurotrophic factors
DNA	Desoyribonuclein Säure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECM	extrazellulären Matrix
F-Aktin	filamentösem Aktin
FGF	Fibroblast Growth Factor
GDNF	Glia cell-line derived neurotrophic factor
HSV	Herpes Simplex Virus
ITS	Intermediate toe spread
kDa	kiloDalton
LIF	Leukemia inhibitory factors
M	Musculus
MLV	Murine Leukemia Virus
Mm. int.pl.	Mm. interossei plantares
MSAP	Muskelsummenaktionspotentiale
N	Nervus
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NGF	Nerve Growth Factor
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit

NRP	Neuropilin-Rezeptor
NT	Neurotrophin
NTR	Neurotrophin-Rezeptor
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PL	Printhe length
PNS	Periphere Nervensystem
PV	Parvovirus
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonuclein Säure
SFI	Sciatic Function Index
SSI	Static sciatic Index
TGF	Transforming Growth Factor
TGF	Transforming Growth Factor
TIL	Tumor-infiltrierenden Lymphozyten
TNF	Tumor-Nekrose Faktoren alpha
trk	Topomyosin receptor kinase
Trk-R	Tyrosinkinase Rezeptoren
TS	Toe spread
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
VV	Vaccinia Virus
X-CGD	x-linked chronic granulomatous disease
ZNS	Zentralen Nerven System
ZO	Zonulae Occludentes

## **11. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel**

Brutschränke für die Zellkultur (Fa. Life Sciences International, Frankfurt)

Brutschränken (Firma Life Sciences International, Frankfurt)

ELISA-Kit (Quantikine®, R&D Systems, Minneapolis, USA)

Espresso-Maschine (Jura, Schweiz)

Ethilon® 4-0 ;9-0 (Fa. Ethicon Products, Norderstedt)

Gefrierschrank / -80°C (Hera freeze, Fa. Heraeus Holding, Hanau)

Handschuhe steril (Sempermed, Fa. Lohmann & Rauscher, Neuwied)

Hybridisierbrutschrank (7601, Fa. GLF, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)

Kanülen 36G-20G (Microlance™, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden)

Kopflupe (PEAK Head Lupe)

Laboruhr (Fa. Oregon Scientific, Villingen)

Laborwaage (Fa. Ohaus, Giessen)

Mikropipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Mikrowellenofen (Fa. Siemens, München)

Nadel-Elektroden (Länge: 12 mm; Diameter: 0,3 mm; Viasys Healthcare)

Neubauer-Zählkammer (Fa. Schubert & Weiß, Schwandorf)

Nylonmembranen (Fa. Bioscience Schleicher & Schuell, Dassel)

Objekträger-Scanners von Zeiss (Miramax Desk, Zeiss/Germany)

Operationsmikroskope (Axiovert® 25, Fa. Zeiss, Jena)

Orbitalschüttler (Duomax® 2030, Fa. Heidolph Instruments, Schwabach)

PCR-Thermocycler (Robo Cyclers® Gradient 40, Fa. Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)

Photokamera / digital (D200, Nikon, Japan)

Photomikroskop (Axiophot®, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen)

Skalpellklingen 11, 23 (Fa. Aesculap, Tuttlingen)

Spritzen 1-10ml (Fa. Codan Medical, Rødby, Dänemark)

Stromgerät für die Elektrophorese (EC 105) (Fa. E-C Apparatus Corporation, St.Petersburg, Florida)

Supplies 2003- Katalognummer: 019-404700; Nicolet/Germany)

Surgical Skin Marker (Securline®, Fa. Precision Dynamics, San Fernando, USA)

Ultramikroton (Leica, Ultracut E)

Venenverweilkanülen 24G (Ventoflon™ Pro, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden)

Viking Quest, und der dazugehörigen Software (Viasys Heathcare/ Germany)

Vortexer Minishaker MS 2 (Fa. IKAR Werke, Stauffen)

Wasserbad (Fa. Memmert, Schwabach)

Werkbank (Fa. Hereus Instruments, Hanau)

## **12. Pharmaka und Tiernahrung**

Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, München)-Isofluran (Attane™ -- Isoflurane, Provet AG, Lyssach, Schweiz)

Fentanyl (Deltaselect/Germany)

Isofluran 3% (Provet AG, Lyssach, Schweiz)

Medetomidine (Pfizer/Germany)

Midazolam (Ratiopharm/Germany)

Pentobarbital (Narcoren®, Fa. Merial, Hallbergmoos)

Perphenazin-Enanthat (Decentan-Depot®, Fa. Merck, Darmstadt)

Rattenpellets (1320, Fa. Altromin, Lage)

Streptomycin (Fa. Biochrom, Berlin)

Triglyzeride (Miglyol 812®, Fa. Caesar & Loretz, Hilden)

### **13. Chemikalien, Lösungen und Puffer**

Äthanol 30/50/70/90/96% (Fa. Merck, Darmstadt)

Aqua dest. (Aqua dest., Ampuwa® Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, BRD)

Complete™-Mini tablet (Fa. Boehringer, Mannheim)

EDTA (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

Ethanol (Fa. Merck, Darmstadt)

Formaldehyd (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

Glutaraldehyd (Fa. Fluka Chemie, Buchs)

Glycerin (Fa. Fluka Chemie, Buchs)

L-Arginin (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

L-Glutamin (Fa. Biochrom, Berlin)

Ladder 1kb (Fa. PEQ Lab Biotechnologie, Frankfurt)

Natriumchlorid, NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)

Nucleotidtriphosphat, dCPT (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Paraformaldehyd (PFA, Fluka, Neu-Ulm, BRD)

Polyethylenglycol (Fa. Serva, Heidelberg)

Primer E1A, E2A (Fa. MWG Biotech, Ebersberg)

Restriktionsendonukleasen (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Salzsäure, HCl (Fa. Merck, Darmstadt)

Toluidinblau (Merck, Darmstadt, BRD)

Trypsin (Fa. Biochrom, Berlin)

## **14. Software**

Definiens Enterprise Image Intelligence TM XD Suite, Definions  
(München/Deutschland)

Image-J; v1.29 (NIH, Rodville Pike, USA)

Mircosoft Excel (Microsoft, USA)

Microsoft Word (Microsoft, USA)

Photoshop (Adobe Creative Suit CS4, USA)

SPSS® v11.5 (SPSS Inc., Chicago, USA)

## **15. Sonstige Materialien**

Chirurgische Pinzette (No. 08-231-130, Allgaier Instrumente GmbH, Frittlingen, BRD)

Chirurgische Schere (No. 04-124-145, Allgaier Instrumente GmbH, Frittlingen, BRD)

Deckgläser (Menzel, Braunschweig, BRD)

Glasstreifen für Glasmesser (Leica, Nussloch, BRD)

Inzisionsfolie (Opraflex®, Lohmann GmbH, Neuwied, BRD)

Metzenbaum-Schere (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, BRD)

Objektträger (Menzel, Braunschweig, BRD)

Pappe (Obi-Baumarkt, München, BRD)

Rivanol 0,1 % (Riedel de Haën, Seelze, BRD)

Silikonröhrchen (13 mm lang, Durchmesser 1,5 mm, Wandstärke 0,4 mm)

Skalpell (No. 21, Medizin AG, Köln, BRD)

Stempelfarbe rot/blau ohne Öl (Pelikan, BRD)

Stempelkissen (Pelikan, München, BRD)

Uhrmacher-Pinzette (Dumont, No. 5, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, BRD)

Vannas-Mikroschere (No. 15003-08, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, BRD)



## 16. Lösungen

Cacodylatpuffer 0.1 mol/l: 21,4 g Dimethylarsinsäure (Trihydrat); 1000 ml Aqua dest.

Na- Citrat 100 mmol/l: 2,94 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 100 ml Aqua dest.

Cu-Sulfat 20 mmol/l: 0,96 g Kupfersulfat, 100 ml Aqua dest.

K-Ferrizyanid 5 mmol/l: 0,165 g Kaliumhexacyanoferrat [III], 100ml Aqua dest.

NaOH-Maleat-Puffer 0,2mol/l, pH6: A: 8 g NaOH, 1000 ml Aqua dest.; B: 19,6 g Maleinsäure-Anhydrid, 8 g NaOH, 1000 ml Aqua dest.; 26,9 ml A + 50,0 ml B + 200ml Aqua dest.

Fixierlösung 2,5% Glutaraldehyd + Phosphatpuffer 0,1 mol : 1. Phosphatpuffer 0,1 mol: 840ml von Lösung A: (17,8 g di-NaHydrogenphosphat - 2- hydrat in 1000 ml Aqua dest. lösen.) plus 240 ml von Lösung B: (13,6 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1000ml Aqua dest. lösen.) und 120 ml Glutaraldehyd 25% (Verhältnis von Puffer : Glutarald. = 9:1)

## **17. Danksagung**

Der Dank für die Entstehung dieser Arbeit gilt insbesondere zwei Leuten. Thomas Holzbach, meinem fachlichen Mentor in dieser Arbeit, sowie Manfred Hecker, meinem Schwiegervater. Des weiteren bedanke ich mich bei allen nicht direkt angesprochenen Unterstützern für Ihr Wirken jeglicher Art.

## 18. Lebenslauf

### Arbeitserfahrung

08/2012-YTD	<b>HiT-Health in Technology</b> , Mitgründer
07/2011-08/2012	<b>Universität Erlangen</b> , HNO Klinik, Assistenzarzt
01/2010-05/2011	<b>Harvard Medical School</b> , Boston / USA Wissenschaftlicher Mitarbeiter, HNO Softwareentwicklung, Design und Implementierung eines klinischen Test für das Otolith-Organ des Innenohrs zur Diagnostik von Erkrankungen des Innenohrs

### Medizinische Ausbildung

2005-2009	<b>TU München</b> – Hauptstudium
10/2008-12/2008	<b>Massachusetts Eye&amp;Ear Infirmary / Harvard Medical School</b> – Boston/USA Klinische Rotation – HNO
07/2008-09/2008	<b>Universitätsspital / University Zürich</b> – Schweiz Klinische Rotation – Chirurgie
04/2008-06/2008	<b>Universidad de Venezuela</b> – Caracas / Venezuela Klinische Rotation – Innere Medizin / Infektionserkrankungen
02/2008-04/2008	<b>Chang Gung University</b> – Taipei / Taiwan Klinische Rotation – Innerer Medizin/ Gastro-; Kardio-; Hepatologie
11/2006-12/2006	<b>Aria Hospital</b> – Rasth / Iran – Gynäkologie und plastische Chirurgie Famulatur
08/2006-09/2006	<b>Universidad de Venezuela</b> – Caracas / Venezuela; Handchirurgie, Famulatur
2002-2005	<b>Universität zu Bonn</b> – Vorklinisches Studium
06/2002-08/2002	<b>Universität zu Köln</b> – Nephrologie Pflegepraktikum
05/2002-06/2002	<b>Beethoven Klinik</b> – München – Anästhesie Pflegepraktikum

### Wirtschaftliche Zusatzerfahrung

10/2011-YTD	Planung von HiT im Bereich der Präventionsmedizin
06/2007-06/2009	<b>Bellpepper Mobile AG</b> , Garching / Germany; Mitgründer Marketing / Vertrieb / Investor Relations
10/2007- 02/2008	<b>TVM-Capital (Venture Capital)</b> ; München Analyst
08/2007-09/2007	<b>TVM-Capital</b> , München; Praktikant
03/2007-07/2007	<b>Vivantes GmbH</b> , Berlin; freier Mitarbeiter Analyse von Gesundheitssystemen und Assistenz der Geschäftsführung im Bereich Marketing
2005-2006	<b>Lehrstuhl für Entrepreneurship und Finance</b> (TU München; Prof. Achleitner) Extracurriculärer Student Venture capital and private equity (SS'06) Venture valuation (WS 05/06) Entrepreneurship & Law II (SS'06) Entrepreneur & Finance II (SS'06)
04/2003-05/2003	<b>Hexal AG</b> , Holzkirchen; Praktikant Marketing Abteilung mit Fokus auf Marktanalyse und Platzierung neuer Generika

### Schulzeit /Militär

2001-2002	<b>W10</b> – Lüneburg - Germany Panzeraufklärer, 3. Aufklärungsbataillon , Kompanie 400
1997-1998	<b>Governor Dummer Academy</b> – Byfield, MA - USA High School – (AP Microeconomics, AP Biology)

1993-2001

**Appostellgymnasium** - Köln (Abitur: Deutsch, Biologie, Mathematik, WiSo)

**Verschiedenes**

02/2010- YTD

**McKinsey** – Mentee des “Firsthand” – Programm

2004- YTD

**EYES** (Emerging Young Entrepreneurial Society)

Mitgründer und Mitglied; [www.eyes-online.org](http://www.eyes-online.org)

04/2010-07/2010

**Cambridge center of adult education** – Spanisch Kurse

11/2007-01/2010

**McKinsey** – Mentee des “Capstone” – Programms

04/2006-07/2006

**Spanish active** – München – Spanisch Kurse

02/2004-03/2004

**Centro Firenze** – Florenz, Italien – Italienisch Kurse

1999-2000

Schulsprecher- Planung und Finanzierung von Events bzw. eines neuen Computerzimmers für die Schule.

**Sprachen**

Deutsch

Muttersprache

Englisch

verhandlungssicher

Latein

Latium

Spanish

einfache Grundkenntnisse

Italien

einfache Grundkenntnisse

**Hobbies:**

Feldhockey

seit 1989; 4. bzw. 5. Platz in der deutschen Meisterschaft 1999 und 2000.

Reisen:

Europa, USA, Canada, Brasilien, Venezuela, Cuba, Island, Rußland, Mongolei, China, Vietnam, Kambodscha, Iran, Thailand, Malaysia, Taiwan, Syrien

Other:

Fotographie, Skitouren, Kochen