

Aus der Klinik für
Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**„Präklinische Studie zur In-situ-Regeneration von Defekten
des Nervus alveolaris inferior.“**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Ansgar Christian Hergt
aus Templin

Kiel **2015**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Größner-Schreiber

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 09.02.2017

gez. Prof. Dr. H.-J. Klomp
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Sensorische Nervenfasern	3
1.2	Einteilungen der Nervschädigung nach Sunderland und Seddon	3
1.3	Prävention von Nervschädigungen	3
1.4	Körpereigene Nervregeneration	4
1.5	Therapiemöglichkeiten bei Nervdurchtrennung	5
1.5.1	Nervnähte	6
1.5.2	Donornerv als Interponat	6
1.5.3	Alloplastische Nerversatzinterponate	7
1.5.4	Allogene Nerversatzinterponate	7
1.5.5	Weitere Nerversatzinterponate	8
1.6	Möglichkeiten zur Überprüfung der Regeneration	8
1.6.1	Elektromyographie (EMG)	8
1.6.2	Jaw-Opening Reflex (JOR)	9
1.7	Rekombinanter humaner Nerve Growth Factor (rhNGF)	10
1.7.1	Aufbau von NGF	10
1.7.2	Wirkung von rhNGF	11
1.7.3	Applikation von NGF	12
2	ZIELE DER STUDIE	14
3	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	Auswahl der Tiere	15
3.2	Tierhaltung	15
3.3	Einteilung der Gruppen	16
3.4	Vorbereitung der OP	16
3.5	Ablauf der ersten OP	17
3.6	Ablauf der Messungen	20
3.7	Nachsorge	23
3.8	Injektion von Wachstumsfaktoren	23

3.9	Ende der Messungen und Opferung der Tiere	23
3.10	Statistische Auswertung.....	24
4	ERGEBNISSE	25
4.1	Klinischer Verlauf der Untersuchung	25
4.2	Messungen der Schwellenwerte	25
4.2.1	<i>Nervrekonstruktion mit Muskelgewebe</i>	26
4.2.2	<i>Nervrekonstruktion mit Fettgewebe</i>	27
4.2.3	<i>Donornerv</i>	29
4.2.4	<i>Gruppenvergleich</i>	30
5	DISKUSSION	32
6	ZUSAMMENFASSUNG	37
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	39
8	LITERATURVERZEICHNIS	41
9	DANKSAGUNG	55
10	LEBENS LAUF	57

1 Einleitung

Traumatische Nervschädigungen können durch Kompression, Überdehnung, Quetschung, Zerreißung, Überhitzung/Hitzeschäden und z.B. iatrogene Durchtrennung entstehen. Nicht nur in der orthognathen Kieferchirurgie spielen diese Läsionen eine Rolle (Agbaje et al. 2014), auch in der häufiger durchgeführten zahnärztlichen Chirurgie treten sie auf. Bei der operativen Entfernung von Weisheitszähnen, Wurzelspitzenresektionen oder der Insertion von Implantaten kann es u.a. zu einer Verletzung des Nervus alveolaris inferior kommen (Hillerup 2007, Tay und Zuniga 2007, Jones 2010).

Hierbei ist davon auszugehen, dass schon das Setzen einer Leitungsanästhesie im Unterkiefer zu einer Nervläsion mit darauffolgenden Gefühlsstörungen führen (Hillerup 2007) kann. In einem Urteil vom Oberlandesgericht Hamm (08.10.97-3U61/97(+)) heißt es hierzu: „Die Inzidenz bleibender Schädigung des Nervus alveolaris inferior bei der Leitungsanästhesie liegt zwischen 1:400.000 und 1:750.000.“ Somit ist dieses Risiko einer Nervverletzung als sehr gering einzuschätzen, allerdings wird dieser Eingriff täglich tausende Male durchgeführt. Ein deutlich höheres Risiko der iatrogenen Schädigung des Nervus alveolaris inferior oder Nervus lingualis besteht bei der operativen Entfernung von Weisheitszähnen und als Folge fazialer Traumata (Ghaeminia et al. 2009). In einer Studie aus dem Jahr 2005 wurden 86 % aller MKG- und Oralchirurgen aus Kalifornien zur Verletzung des Nervus alveolaris inferior und Nervus lingualis als Folge der operativen Entfernung von dritten Molaren innerhalb eines Zeitraumes von 12 Monaten befragt. Hierbei berichteten 94,5 % der Chirurgen von Schädigungen des Nervus alveolaris inferior. Permanente Schädigungen wurden von 78 % der Befragten beschrieben (Robert et al. 2005). Robert et al. berichteten, dass das Verhältnis von reversiblen und irreversiblen Nervschädigungen bei der Extraktion von Weisheitszähnen 4:1.000 beim Nervus alveolaris inferior beträgt (Robert et al. 2005).

Nach Tay und Zuniga sind 52,1 % aller Verletzungen des Nervus trigeminus auf Zahnextraktionen zurückzuführen. Der Nervus alveolaris inferior wird mit 64,4 % am häufigsten verletzt; der Nervus lingualis am zweithäufigsten (28,8 %) (Tay und Zuniga 2007).

Die Inzidenz einer Schädigung des Nervus alveolaris inferior liegt bei etwa 5 %, mit einer dauerhaften Schädigung des Nerven in 0,3 % der Fälle (Valmaseda-Castellon et al. 2001).

Fasst man die häufigsten zahnärztlichen operativen Eingriffe (Weisheitszahnextraktion, Osteotomien, Wurzelspitzenresektionen und Zystektomien) zusammen, kommt es in 2,2 % der Fälle zu einer Sensibilitätsstörung des Nervus alveolaris inferior, wie eine Studie mit 1.107 Eingriffen zeigte (Schultze-Mosgau und Reich 1993). Aber auch die Insertion von dentalen Implantaten birgt, insbesondere bei älteren Patienten aufgrund des oftmals atrophierten Unterkiefers, die Gefahr einer Verletzung des Nervus alveolaris inferior (Marquardt et al. 2007, Basa und Dilek 2010). Im Jahr 2010 wurden allein in Deutschland weit mehr als 1 Million Implantate gesetzt, mit steigender Tendenz (DGI Hamburg 2010).

Die resultierenden Sensibilitätsstörungen bei Verletzung des Nervus alveolaris inferior können sowohl die Zähne und das Zahnfleisch des Unterkiefers auf der betroffenen Seite, als auch die Unterlippe der ipsilateralen Seite betreffen.

Sensibilitätsstörungen werden klinisch weiter in Anästhesie, Parästhesie, Hypästhesie und Hyperästhesie sowie Dysästhesie differenziert. Die Konsequenzen aus den genannten Schädigungsarten variieren zwischen einer Gefühlsverminderung, einer Überempfindlichkeit oder einem völligen Verlust der Oberflächendiskrimination in der vom Nerv versorgten Region. In einigen Fällen entstehen nach traumatischer Nervschädigung Dysästhesien. Die damit einhergehenden Missempfindungen können der Ursprung einer chronischen Schmerzerkrankung sein (Marx und Stern 2003, Poort et al. 2009, Zuniga 2009). Dies ist für den Patienten unangenehm, da die Teilnahme am sozialen Leben eingeschränkt wird. Reden, Küssen, das Auftragen von Make-Up und die Rasur sind durch den Verlust der Oberflächendiskrimination nur erschwert möglich. Beim Trinken und Essen kann es beispielweise zum Herauslaufen von Speisen und Flüssigkeiten auf der betroffenen Seite kommen (Pogrel 2002, Hood et al. 2009, Cheung et al. 2010). Zusätzlich besteht die Gefahr von Biss- oder Brandverletzungen an der Unterlippe. Hieraus entsteht eine erhebliche Verminderung der Lebensqualität des Patienten mit möglichen negativen psychologischen Nebenwirkungen (Abarca et al. 2006, Pogrel et al. 2011).

1.1 Sensorische Nervenfasern

Es kann allgemein zwischen den motorischen Nervenfasern, welche Informationen für Bewegungsabläufe übermitteln und sensorischen Nervenfasern, die Signale des Sensibilitätsempfindens übertragen, unterschieden werden.

Die sensorischen Informationen im Innervationsbereich des Nervus alveolaris inferior werden im Nucleus caudatus auf das zweite Neuron umgeschaltet. Beim Eintreffen eines Schmerzreizes wird dieser entweder gehemmt oder verstärkt, bevor die Information weiter in das Rückenmark läuft (Melzack und Wall 1965).

Die sensorischen Fasern werden weiter in myelinisierte A-Fasern und unmyelinisierten C-Fasern differenziert. Schmerzreize werden durch unmyelinisierte Fasern übertragen. Diese sind langsam leitend, bei Verletzung widerstandsfähiger und regenerieren leichter. Myelinisierte Fasern sind schnell leitend und übertragen Propriozeption (Wahrnehmung der Körperbewegung) und Temperatur. Diese Fasern sind entwicklungsgeschichtlich erst später entstanden und weniger regenerationsfähig bei Verletzungen. Sie wirken im Nucleus caudatus als Gegengewicht zu den schmerzübertragenden marklosen Fasern. Wird dieses Gleichgewicht gestört, kommt es zu einer überschießenden Reaktion der unmyelinisierten Fasern und somit zu Schmerzen (Jones 2010).

1.2 Einteilungen der Nervschädigung nach Sunderland und Seddon

Die Art der Therapie bei der Nervverletzung sowie der Erfolg der Regeneration hängen maßgeblich vom Typ bzw. Umfang der Schädigung ab. Zur qualitativen Beurteilung von Nervschädigungen haben sich die Einteilungen nach Sunderland (5 Grade) oder Seddon (3 Grade) im klinischen Bereich etabliert (Gehlen und Delank 2010).

1.3 Prävention von Nervschädigungen

Zur Vermeidung bzw. Minimierung des Risikos von Nervverletzungen sind bildgebende Verfahren, wie z.B. die digitale Volumentomografie (DVT), von Vorteil (Du Toit et al. 2014). Sie ermöglichen nicht nur im Bereich der dentoalveolären Chirurgie eine präoperative Risikoabschätzung durch die dreidimensionale

Darstellung, sondern auch in der zahnärztlichen Implantologie, bei der Grenzfälle durch navigationsgeführtes Implantieren (Marquardt et al. 2007) gelöst werden können.

1.4 Körpereigene Nervregeneration

Wird ein Nerv komplett durchtrennt (Neurotmesis), regeneriert das proximale Ende. Das distale Ende geht zu Grunde (Waller-Degeneration). Die Regeneration des Nerven setzt innerhalb von 24 Stunden ein. Die Regenerationsgeschwindigkeit eines Axons liegt durchschnittlich bei 1 bis 2 mm pro Tag (Mohler und Hanel 2006).

Faktoren wie Alter des Patienten (Bruce et al. 1980), Art und Größe des Nerven sowie Lokalisation des Nervdefektes beeinflussen die Regeneration. (Müller-Vahl et al. 2014).

Die indirekte körpereigene Spontanregeneration läuft in Form einer Schutzneurotisation ab. Es handelt sich hierbei um das Wiedererlangen der Schutzsensibilität. Diese kommt der ursprünglichen Sensibilität des Nerven sehr nahe, ist aber im Vergleich zum ursprünglichen Sensibilitätsempfinden teilweise fehlerhaft bzw. vermindert. Die Regeneration kommt aus benachbarten Versorgungsbereichen nicht geschädigter Nervanteile und ist daher nur als indirekt zu betrachten (Müller-Vahl et al. 2014).

Die Heilung im peripheren Nervensystem, welche nach drei Monaten ihren Höhepunkt erreicht (Jones 2010), erfolgt durch Proliferation von Axonen am proximalen Ende des Nervstumpfes. Bis zum Erreichen des distalen Nervstumpfes kann es, je nach Defektgröße, Wochen bis Monate dauern (Sunderland 1990, Thanos et al. 1998). Hierzu benötigen die Zellen für die Regeneration eine Leitschiene, sogenannte Büngner-Bänder (Von Büngner 1890). Büngner-Bänder wirken mit Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren regenerativ. Haben Nerven diese Leitschiene nicht, kommt es zur Deafferenzierung, d.h. zum Verlust der Afferenzen und somit zum Verlust der Sinnesreizinformation aus der Peripherie. Ein Fehlen der Leitschiene kann auch zur Ausbildung eines Neuroms (Nervenknäuel) führen. Dies wurde bei Therapieversuchen mit Nervinterponaten festgestellt, welche einen geringen Durchmesser aufwiesen (Wolford und Stevao 2003). Ein Neurom besteht aus sich vermehrt bildendem fibrösem Narbengewebe sowie schnell regenerationsfähigen marklosen Schmerzfasern. Die myelinisierten Nervenfasern

regenerieren langsamer und benötigen mehr Nährstoffe und Sauerstoff. Aufgrund des Ungleichgewichtes zwischen myelinisierten und unmyelinisierten Fasern kommt es zur vermehrten Aktivität der marklosen Schmerzfasern und somit zur Aussendung von Schmerzreizen. Die überschießende Entwicklung der unmyelinisierten Fasern und das zugrunde gehen der myelinisierten Fasern wird durch das avaskuläre Narbengewebe begünstigt (Jones 2010). Auch Schwann-Zellen spielen beim Regenerationsprozess eine wichtige Rolle. Sie dedifferenzieren beim Ausbleiben von Axonsignalen (nach Trauma) nach kurzer Zeit und beginnen mit der Produktion von Wachstumsfaktoren (Konofaos und Ver Halen 2013). Ein autarkes Überleben der Zellen ist hierbei möglich. Ist der Kontakt zum distalen Axon wiederhergestellt, differenzieren sie sich und beginnen mit der Produktion von Myelinscheiden (Jessen und Mirsky 1999).

1.5 Therapiemöglichkeiten bei Nervdurchtrennung

Wird intraoperativ eine Durchtrennung des Nerven diagnostiziert, sollte die Koaptation beider Endigungen versucht werden, da andernfalls eine Degeneration (Waller-Degeneration) des Nerven eintritt. Um die Prognose für die Regeneration nicht zu verschlechtern und die postoperativen Komplikationen gering zu halten, scheint eine Koaptation innerhalb der ersten drei Tage nach Nervdurchtrennung optimal zu sein (Dahlin 2008). Bei scharfer Nervdurchtrennung sollte die Rekonstruktion innerhalb von 72 Stunden (Dahlin 2008), bei stumpfer Durchtrennung innerhalb von 2-3 Wochen durchgeführt werden, da in diesem Zeitraum das Regenerationspotential des Nerven am höchsten ist (Chimutengwende-Gordon und Khan 2012).

Bei einer intraoperativ nicht bemerkten Nervverletzung ist eine sichere Differenzierung bezüglich einer dauerhaften oder temporären Schädigung postoperativ nur schwer zu stellen (Poort et al. 2009). Sollte es nicht zu einer körpereigenen Spontanregeneration des Nerven kommen, wie z.B. bei einer Neurotmesis, ist oft eine chirurgische Intervention indiziert und wird entsprechend der Defektgröße durchgeführt. Da eine, während der Behandlung unbemerkte, komplette Durchtrennung des Nerven oftmals erst nach längerer Zeit sicher diagnostiziert werden kann, ist die komplette Funktionsrückkehr des Nerven oft limitiert.

1.5.1 Nervnähte

Sofern ein spannungsfreies Vernähen beider Nervendigungen möglich ist (Hausamen et al. 1974), kann der Defekt mit Hilfe einer Naht überbrückt werden. Das proximale Ende wird mit dem distalen Ende vernäht. Man unterscheidet zwischen perineuralen und epineuralen Nähten sowie dem Vernähen von Nervenfaszikelgruppen. Die epineurale Naht ist die am häufigsten verwendete Methode, da bei den beiden anderen Techniken die Gefahr der zusätzlichen Traumatisierung der einzelnen Nervenfasern höher ist und somit das Regenerationspotential herabgesetzt wird. Die zu Hilfenahme einer mikroskopischen Vergrößerung ist von Vorteil (Hausamen et al. 1974). Eine weitere Möglichkeit der Koaptation ist die Verwendung von Fibrinkleber. Klinische Studien haben gezeigt, dass mit der Verwendung von Fibrinkleber ähnliche Erfolge erzielt werden können wie mit dem Vernähen mit Nähten (Ornelas et al. 2006, Whitlock et al. 2012).

1.5.2 Donornerv als Interponat

Ist eine spannungsfreie Koaptation der Nervenden nicht durchführbar, müssen andere Therapieverfahren gewählt werden. Der heutige Goldstandard zur Versorgung größerer Nervdefekte ist die Verwendung autologer Nervtransplantate. Die für den Nervus trigeminus am häufigsten verwendeten Spenderregionen sind das Bein (Nervus suralis) oder der Hals (Nervus auricularis magnus). Der Nachteil bei Verwendung autologer Nervtransplantate ist die nicht immer optimal passende Größe des Donornerven (Durchmesser, Anzahl Faszikel, Länge) (Wolford und Stevao 2003) sowie die Notwendigkeit eines Zweiteingriffes. Damit verbundenen ist eine zusätzliche Entnahmemorbidity mit der Gefahr der Verletzung von Nachbarstrukturen sowie der Sensibilitätsverlust im Entnahmebereich (Gordon et al. 2003). Daher ist bei der Entnahme des Nervus auricularis magnus ein Taubheitsgefühl hinter dem Ohr und der dorsolateralen Gesichtshälfte nicht zu vermeiden (Gordon et al. 2003). Mit einem Sensibilitätsverlust entlang des seitlichen Fußes ist bei Entnahme des Nervus suralis zu rechnen, welches vergleichsweise von Patienten besser toleriert wird als der Sensibilitätsverlust nach Entnahme des Nervus auricularis magnus (Cornelius et al. 1997, Takasaki et al. 2003, Miloro und Stoner 2005).

1.5.3 Alloplastische Nerversatzinterponate

Als alloplastisches Material zur Defektüberbrückung wurden in Studien Mikrosphären (Röhrchen), welche z.B. aus Silikon, Kollagen, Polyester oder Polyethylen gefertigt sind und direkt im Nervdefekt zwischen beiden Nervendigungen vernäht werden, eingesetzt (Scholz et al. 2010). Derartige Konstrukte bieten nicht nur Schutz für den regenerierenden Nerv gegen das umliegende Gewebe, sondern wirken auch gleichzeitig als Leitschiene für die einsprossenden Axone. Außerdem können sie als Depot für Wachstumsfaktoren fungieren (Scholz et al. 2010, Richner et al. 2014). Verschiedene Versuche wurden hierzu am Nervus ischiadicus der Ratte durchgeführt (De Boer et al. 2012, Wang et al. 2014).

Ein Nachteil von nicht-resorbierbaren Materialien besteht oft in der Induktion von Fremdkörperreaktionen mit resultierender Narbenbildung. Diese kann sich negativ auf die Regeneration des Nerven auswirken (Kompression) (Mackinnon et al. 1984). Die Verwendung von Gore-Tex-Membranen zur Regeneration des Nervus alveolaris inferior und Nervus lingualis sind aus diesem Grund ebenfalls wenig empfehlenswert (Pitta et al. 2001). Resorbierbare Materialien wie Polyglycolsäure (PGA), Polylactid-co-Glycolid (PLGA) oder Polycaprolacton (PCL) scheinen vergleichsweise überlegen zu sein (Dellon und Mackinnon 1988, Meek et al. 2001). PGA wird auch als resorbierbares Nahtmaterial verwendet und ist ebenfalls vollständig biologisch abbaubar (Kiyotani et al. 1996, Nakamura et al. 2004). Röhrchensysteme aus resorbierbaren/nicht-resorbierbaren Materialien sind bei Nervdefekten zwischen 1,5 cm und 2 cm am besten anwendbar (Rustemeyer und Dicke 2010, Wang et al. 2014). Bei größeren Defekten sinkt das Regenerationspotential des Nerven (Weber et al. 2000).

1.5.4 Allogene Nerversatzinterponate

Die Verwendung allogener Transplantate stellt eine Alternative zum autologen Nervtransplantat dar. Hierzu wird ein Donornerv von einem toten, humanen Spender entnommen. Vorteilhaft ist, dass dem Empfänger kein körpereigener Nerv entnommen werden muss, Entnahmemorbidity und Sensibilitätsverluste bleiben dem Patienten erspart. Nachteilig bezüglich der Verwendung allogener

Spendernerven könnte die Ablehnung des Patienten sein, totes, humanes Spendermaterial zu erhalten. Das Risiko der Übertragbarkeit von Krankheiten, wie z.B. Creutzfeldt-Jakob sowie die notwendige Immunsuppression sind ebenfalls als nachteilig zu bewerten (Brenner et al. 2002, Ramasamy et al. 2003). In einer retrospektiven klinischen Studie wurde die Regeneration von sensorischen und motorischen Nerven bei Defekten zwischen 5 mm und 50 mm untersucht. Eine Funktionsrückkehr wurde bei 87 % der Patienten festgestellt, bei 5 % der Probanden war eine Revisionsbehandlung notwendig, es gab keine unerwünschten Nebenwirkungen bei der Behandlung (Brooks et al. 2011).

1.5.5 Weitere Nerversatzinterponate

Weitere Möglichkeiten zu Defektüberbrückung bei peripheren Nerven bieten Arterien und Venen, Sehnen, aber auch Muskelgewebe und Fettgewebe werden als Interponate verwendet (Konofaos und Ver Halen 2013).

Bei größeren Defekten bleibt nur ein Donornerv als Therapieoption. Da der Nervus alveolaris inferior in einem knöchernen Kanal verläuft, können aber die vorliegenden Kenntnisse bezüglich der Nervrekonstruktion nicht umstandslos auf den Nervus alveolaris inferior übertragen werden.

1.6 Möglichkeiten zur Überprüfung der Regeneration

Um die Funktion eines sensorischen menschlichen Nerven zu überprüfen, reichen eine Berührung oder das Bemerkens von Temperaturveränderungen. Vielfach wird auch der Zweipunktdiskriminationstest oder der Pin Prick-Test angewendet (Müller-Vahl et al. 2014). Genauere und objektive Möglichkeiten sind die Überprüfung des Nerven mit somatosensorisch evozierten Potentialen (SSEP) sowie die Anwendung des Pain and Thermal Sensitivity (PATH) Testsystems (Ghali et al. 1990, Jones et al. 1990, Schultze-Mosgau und Reich 1993, Calabria et al. 2013).

1.6.1 Elektromyographie (EMG)

Die Elektromyographie (EMG) ist eine weitere diagnostische Möglichkeit, um eine Erkrankung am Muskel bzw. eine Reizleitungsstörung des versorgenden Nerven zu

bestimmen. Hierbei wird ein motorischer oder gemischter Nerv elektrisch gereizt und über die Antwort des gereizten Muskels (Muskelsummenaktionspotential) abgeleitet. Die Summe der elektrischen Aktivität der Muskelfasern bildet das Muskelsummenaktionspotential (Bischoff et al. 2014). Bei tief gelegenen Muskelanteilen und bei Nerven die eine hohe Reizschwelle aufweisen, eignen sich Nadelelektroden zur Stimulation. Diese haben eine Länge von 50 mm mit einem Durchmesser von ca. 0,3 mm und einen schrägen Anschliff (Bischoff et al. 2014). Die Kathode wird in die Region des Nerven eingebracht. Es sollte darauf geachtet werden, diese so nah wie möglich in die Region des Nerven zu bringen, um nicht zusätzlich hohe Stromstärken zur Depolarisation des Nerven zu benötigen. Die Stimulationsintensität sollte langsam gesteigert werden (Bischoff et al. 2014). Ein peripherer Nerv wird proximal und distal stimuliert. Das evozierte Potential wird von dem durch den Nerv versorgenden Muskel elektromyographisch abgeleitet und aufgezeichnet. Die Amplitude des evozierten Muskelpotentials gibt Aufschluss über die Anzahl der aktivierten Nervenfasern und den Zustand des Nerven (gesund/krank). Misst man die Zeit zwischen Reizapplikation und Ableitung kann zusätzlich die Leitungsgeschwindigkeit des Nerven bestimmt werden (Batz et al. 2004).

1.6.2 *Jaw-Opening Reflex (JOR)*

Um die Nervregeneration im vorliegenden Versuchstiermodell zu untersuchen, wurde sich der Jaw-Opening Reflex (JOR) des Kaninchens zunutze gemacht, welcher ein gut erforschter Reflex zur kontinuierlichen Überprüfung der Nervfunktion ist (Renton et al. 2005, Fukuhara et al. 2011). Es handelt sich hierbei um einen Hirnstammreflex des Nervus trigeminus, dessen afferente Fasern Kaninchenmaul und Kaninchenschnauze sensibel innervieren (Nervus alveolaris inferior) und dessen efferente Fasern bilateral zum Musculus digastricus ziehen. Der JOR lässt sich mit Hilfe der Elektrostimulation am Nerv provozieren und die Reflexantwort mit Hilfe der Elektromyographie (EMG) messen. Ein Wiederauftreten der Reflexantwort nach Nervverletzung kann ein Indikator für die Regeneration der Axone oder Reorganisation des Sensibilitätsempfindens an der Schnauze sein. Durch die elektrische Stimulation des Nervus alveolaris inferior und Ableitung am Musculus digastricus lässt sich die Funktionsfähigkeit des Nerven anhand des JOR gut

überprüfen (Fukuhara et al. 2011). Für die Überprüfung der Regeneration des Nervus alveolaris inferior beim Menschen ist dieses Verfahren aber nicht anwendbar, da der JOR beim Menschen nicht vorhanden ist.

1.7 Rekombinanter humaner Nerve Growth Factor (rhNGF)

Viktor Hamburger und Levi Montalcini entdeckten und isolierten 1951 erstmals einen diffundierenden Faktor, welcher sowohl in In-vitro- als auch bei In-vivo-Untersuchungen fördernd auf die Entwicklung und das Wachstum sensorischer und sympathischer Nervenfasern wirkt (Levi-Montalcini und Hamburger 1951).

1974 wurde beschrieben, dass Nerve Growth Faktor (NGF) von Nervendingungen aufgenommen und retroaxonal zum Perikaryon transportiert wird (Stockel et al. 1974). Des Weiteren wurde in darauffolgenden In-vitro- und In-vivo-Studien festgestellt, dass NGF zu einer erhöhten Regeneration und Wachstum von Axonen bei sympathischen sowie sensorischen Nervenfasern führt (Levi-Montalcini 1976, Gundersen und Barrett 1979, Gundersen und Barrett 1980, Campenot 1982).

Nach Nervverletzungen werden zur Unterstützung des Reparaturprozesses körpereigene, durch Schwann-Zellen produzierte Wachstumsfaktoren wie Nerve Growth Faktor (NGF) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und ciliary neurotrophic factor (CNTF) freigesetzt. Die Konzentration von NGF steigt im distalen Anteil des Nerven (Saika et al. 1991) und die Anzahl von Rezeptoren für den Wachstumsfaktor steigt ebenfalls (Ciardelli und Chiono 2006). NGF erreicht durch retrograden axonalen Transport das Soma der Nervenzelle (Saika et al. 1991, Anderson et al. 1998). Die Förderung des Regenerationsprozesses durch Wachstumsfaktoren wurde durch Studien an Kaninchen (Strauch et al. 2001, Zhang et al. 2002) sowie Katzen und Hunden (Yates et al. 2004, Chung et al. 2008) bestätigt. Natürliche NGF-Depots befinden sich in der Glandula submandibularis der Maus (Cohen 1960), in Schlangengift sowie in der Prostata (Harper et al. 1979, Harper und Thoenen 1980, Harper et al. 1982).

1.7.1 Aufbau von NGF

NGF besteht aus α - β - und γ -Untereinheiten. Diese bilden zusammen den 7S-Komplex (Smith et al. 1968) der zwei identische β -Ketten enthält, welche 118

Aminosäuren lang sind und ein Gewicht von 13 Kilodalton haben. Der aktive, für das Wachstum zuständige Teil ist der 2.5S-Komplex oder β -NGF (Bocchini und Angeletti 1969). Rekombinantes humanes NGF wurde 1978 durch Goldstein et al. isoliert (Goldstein et al. 1978) und 1983 erstmals experimentell in vitro kloniert (Ullrich et al. 1983). Verschiedene Forschergruppen produzierten rekombinantes humanes NGF mit Hilfe eukaryonter Organismen oder Hefen in vitro (Kanaya et al. 1989, Iwane et al. 1990, Barnett et al. 1991, Buxser et al. 1991, Vigentini et al. 2006).

1.7.2 Wirkung von rhNGF

NGF bindet an zwei unterschiedliche Arten von Rezeptoren. Zum einen an den zu den Tumornekrose-Faktoren (TNF) gehörenden p75-Rezeptor, an welchen auch die Neurotrophine BDNF, NT-3 und NT-4/5 binden. Zum anderen bindet NGF mit einer deutlich höheren Affinität an den spezifischen Rezeptor Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A (Trk-A-Rezeptor). Es erfolgt eine Dimerisierung mit anschließender Phosphorylierung des Rezeptors (Kaplan et al. 1991a, Kaplan et al. 1991b, Jing et al. 1992). Darauf folgt die Rekrutierung verschiedener zytosolischer Proteine, wie PLC γ (Phospholipase C γ) und Phosphoinositol-3-Kinase zum Rezeptor (Obermeier et al. 1994). Das G-Protein SOS (Son of Sevenless) führt zur Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs (Schlaepfer et al. 1994), dieser ruft eine Genexpression in der Zelle hervor (Selzer et al. 2014). PLC γ bindet an den Trk-A-Rezeptor und katalysiert die Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inosiltriphosphat (IP $_3$). Es kommt zum IP $_3$ vermittelten Ca $^{2+}$ Einstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum, DAG aktiviert die Proteinkinase C. Trk-A führt außerdem zur Aktivierung der PI3Kinase. Diese aktiviert wiederum durch Akt-Stimulierung die Proteinkinase B. Proteinkinase C, Proteinkinase B sowie der ERK/MAPK-Signalweg werden durch Bindung von NGF an Trk-A aktiviert und sind maßgebend am Überleben der Zelle sowie deren Proliferation beteiligt (Selzer et al. 2014).

Studien haben gezeigt, dass der Wachstumsfaktor NGF vom proximalen Anteil des zu regenerierenden Nerven aufgenommen wird und über den retrograden axonalen Transport das Soma der Nervenzelle erreicht (Oppenheim 1991, Lindsay 1996), (siehe Abbildung 1). Die erste Untersuchung zum retrograden Transport von NGF wurde an einer Maus durchgeführt. Die Zellkörper der NGF-sensiblen sympathischen Fasern, welche die Irismuskulatur innervieren, liegen im superioren zervikalen

Ganglion. Nach Injektion von NGF in die vordere Augenkammer kam es zu einer Anlagerung des Wachstumsfaktors im superioren zervikalen Ganglion (Hendry et al. 1974). Daraus lässt sich ableiten, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen NGF-Aufnahme am Axon und deren Anlagerung in Zellkörpern gibt.

Bei fehlenden Wachstumsfaktoren kommt es zu keiner Aussprossung der Axone (Frostick et al. 1998). Durch zusätzliche Zufuhr neurotroper Faktoren kann das Axonwachstum verbessert und die Regenerationszeit erheblich verkürzt werden (Pollock 1995). Somit kommt NGF eine hohe Bedeutung in der Regeneration von peripheren Nerven zu (Richner et al. 2014).

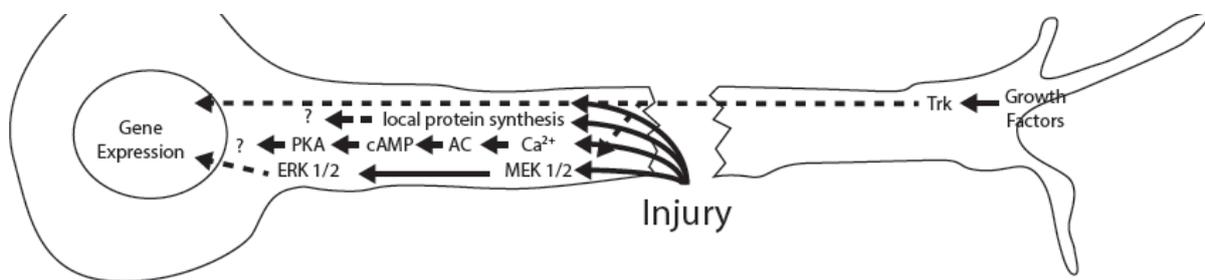


Abbildung 1: Wirkung von NGF (Growth Factors) am Trk-A-Rezeptor bei Nervdurchtrennung

umgezeichnet nach Quelle: <http://jn.physiology.org/content/100/6/3209> (30.10.14)

1.7.3 Applikation von NGF

In den klinischen Untersuchungen von Otto und Mitarbeitern sowie Rich und Mitarbeitern stellte sich heraus, dass es sowohl durch die direkte NGF-Applikation, als auch durch das Anlegen von NGF-Depots in Form von Silikon-Kammern zu einer vermehrten Bildung myelinisierter Nervenfasern und einer besser ausgebildeten Nerv-Morphologie kommt (Otto et al. 1987, Rich et al. 1989). Sowohl die systemische (Du et al. 2011), als auch die lokale Applikation (Wang et al. 2009) von NGF führen zu einer verbesserten Wiedererlangung der Funktionalität sowie der Morphologie des Nerven nach einer Verletzung. Die Übertragung mit Hilfe von Stammzellen, Gentherapie sowie Polymertransporter wurde bei Regenerationsversuchen des verletzten Rückenmarks untersucht (Blesch et al. 2002). Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren ist ein System vorteilhaft, welches zum einen vor äußeren Einflüssen schützt und zum anderen eine langsame Abgabe des Wachstumsfaktors an die Umgebung ermöglicht (Pfister et al. 2007). Nanopartikel

sind in diesem Zusammenhang ein innovativer Ansatzpunkt bei der Forschung nach Applikationssystemen und werden häufig in Studien zur Knochenneubildung erfolgreich angewendet (Cao et al. 2014). Neben Materialien wie Chitosan und Silikon werden auch Poly-lactic-co-glycolic-acid (PLGA) Röhrchen verwendet (Romagnoli et al. 2013, Martin-Palma et al. 2014). PLGA-Nanopartikel dienen als Medikamententräger und können mit Wachstumsfaktoren gekoppelt werden, die sie kontinuierlich an ihre Umgebung abgeben (De Boer et al. 2010, Qi et al. 2013, Romagnoli et al. 2013). Die Freisetzung erfolgt durch einen Diffusionsgradienten (Barras et al. 2002, Fine et al. 2002, Burdick et al. 2006). Sie ist also unkontrolliert und läuft so lange, bis der Wachstumsfaktor verbraucht ist. Es besteht auch die Möglichkeit, die Abgabe in Abhängigkeit vom Axonwachstum anzupassen (Sakiyama-Elbert und Hubbell 2000, Pfister et al. 2008). Es handelt sich hierbei um aktive Abgabesysteme (Kiryukhin 2014). Nach Tartard und Mitarbeitern ist die kontrollierte Abgabe von Wachstumsfaktoren in biologisch abbaubaren Röhrchensystemen vorteilhaft (Tatard et al. 2005).

2 Ziele der Studie

Ziel dieser Studie war es, in einem Tiermodell, in welchem die Regeneration des Nervus alveolaris inferior in situ morphologisch und funktionell verfolgt werden kann, verschiedene autologe Gewebe und einen Wachstumsfaktor zur Nervrekonstruktion zu testen. Hierbei wurde geprüft, ob mit der Verwendung von Fett- oder Muskelgewebe als Interponat eine Nervfunktion wiederhergestellt werden kann und wie sich das Gewebe im Vergleich zum bisherigen Goldstandard Donornerv auf die Nervregeneration auswirkt. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob es vorteilhafter ist Muskelgewebe oder Fettgewebe als Interponat zu verwenden. Außerdem wurde getestet, ob der Wachstumsfaktor NGF einen positiven Einfluss auf die Nervregeneration hat. Da diese Überprüfung mit Hilfe des Jaw-Opening Reflex (JOR) des Kaninchens gut möglich ist wurde dieses Tiermodell ausgewählt, um die speziellen Bedingungen durch einen Knochenkanal abzubilden.

3 Material und Methoden

Das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein – V31 Tierschutz – hatte nach sorgfältiger Prüfung gemäß §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes (Nr. V 312-72241.121-14 (91-8/06)) keine Einwände gegen die Durchführung der Studie.

3.1 Auswahl der Tiere

Die Versuche wurden an 20 weiblichen Kaninchen der Rasse New Zealand (Ch. River-Laboratories, Sulzfeld) im Alter von 3 Monaten durchgeführt. Tiere dieser Rasse wurden bereits in vorangegangenen Studien erfolgreich genutzt.

Das Gewicht der Tiere betrug im Durchschnitt 2,25 kg. Alle Tiere konnten durch eine individuelle Tätowierung an der Ohrinnenseite identifiziert werden. Kaninchen verfügen über einen Mundöffnungsreflex (Jaw-Opening Reflex), der bei elektrischer Stimulation des dritten Astes des Nervus trigeminus ausgelöst wird. Es kommt hierbei zur Kontraktion des Musculus digastricus, was wiederum die adäquate Reflexantwort des JOR ist.

3.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden regelmäßig von einer Tierpflegerin versorgt sowie tierärztlich betreut.

Die Haltung erfolgte vom ersten Tag der Operation (OP) bis einschließlich 2 Tage post operationem in Käfigen (Plastic Rabbit Cage Unit[®] Tecniplast GmbH, Hohenpreißenberg) mit den Maßen 63,5 x 63,5 x 45 cm. Die Beleuchtung wurde nach einem definierten Licht-Dunkel-Rhythmus geregelt (Helligkeitsphase von 6:00 Uhr bis 14:00 Uhr, Helligkeitswert 500 Lux). Die Lufttemperatur betrug zwischen 18 °C und 20 °C, bei einer Durchschnittsluftfeuchtigkeit von 42 %. Des Weiteren hatten die Tiere in jeweils zwei Gehegen (8 Tiere pro Gehege), mit einer jeweiligen Größe von etwa 3 m², Auslauf. Der komplette Einstreuwechsel wurde im 2-Wochen Rhythmus durchgeführt. Kotecken wurden täglich gereinigt. Futter (ssniff[®] K-H, ssniff

Spezialdiäten GmbH, Soest) wurde immer ausreichend bereitgestellt, Wasser in 750 ml Flaschen ebenfalls ad libitum.

3.3 Einteilung der Gruppen

Die Kaninchen wurden in 5 Gruppen à 4 Tiere randomisiert zugeteilt. Bei der ersten Gruppe (Gruppe 1) wurde der Defekt mit Hilfe von Muskelgewebe aus dem Musculus quadriceps femoris rekonstruiert, zusätzlich wurde ein rekombinanter humaner neurotroper Wachstumsfaktor (rhNGF) (rHu NGF- $\beta^{\text{®}}$, AppliChem, Darmstadt) injiziert. Bei der zweiten Gruppe wurde der Defekt ebenfalls mit Muskelgewebe rekonstruiert, allerdings ohne Injektion von Wachstumsfaktor (WF) (Gruppe 2). Bei der dritten Gruppe wurde zur Rekonstruktion Fettgewebe aus der Iliakalregion entnommen, zusätzlich wurde WF injiziert (Gruppe 3). In der vierten Gruppe wurde der Defekt mit Hilfe von iliakalem Fettgewebe ohne Gabe von WF rekonstruiert (Gruppe 4). Gruppe 5 fungierte als Kontrollgruppe. Hier wurde der Nerv entnommen, umgedreht und an den Nervenenden koaptiert. Dieses Vorgehen soll den Goldstandard des autologen Nervtransplantates simulieren (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gruppeneinteilung mit dem zugehörigen Interponat

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Muskelgewebe mit WF	Muskelgewebe	Fettgewebe mit WF	Fettgewebe	Donornerv (Kontrollgruppe)

3.4 Vorbereitung der OP

Nach Feststellung des Körpergewichtes der Tiere wurde eine kombinierte Allgemeinanästhesie mittels intramuskulärer Injektion von Rompun[®], Bayer, Leverkusen (Xylazin, 2 %, 0,2 ml/kg Körpergewicht), Ketavet[®], Upjohn, Heppenheim (Ketamin, 10 %, 0,5 ml/kg Körpergewicht) in gewichtsadaptierter Dosierung durchgeführt (Tabelle 2). Zum Schutz der Augen während der Narkose wurde Bepanthen[®]-Augensalbe (Bayer, Leverkusen) verwendet. Die ausreichende

Narkosetiefe wurde über den fehlenden Lidschlussreflex bestimmt, außerdem gab eine abnehmende Atemtiefe Aufschluss über die Tiefe der Narkose. Alle Kaninchen wurden submandibulär rasiert und auf eine weiche Unterlage gelegt. Eine konstante Umgebungstemperatur von 37 °C im Operationsbereich wurde durch Wärmflaschen sichergestellt.

Tabelle 2: Medikation der Tiere mit Mengenangabe für die OP

Medikament	Menge	Wirkung
Ketamin 10 %	0,5 ml/kg KG	Anästhetikum
Xylazin 2 %	0,2 mg/kg KG	Anästhetikum
Carprofen 5 %	0,08 ml/kg KG	Analgetikum

3.5 Ablauf der ersten OP

Als Zugang zum Unterkiefer wurde ein extraoraler submandibulärer Zugang gewählt. Da dadurch keine Verbindung zur Maulhöhle besteht wird der Grad der Verkeimung gering gehalten. Das Operationsgebiet wurde desinfiziert (Kodan Tinktur forte[®], Schülke & Mayr, Norderstedt).

Mit dem Skalpell (Nr.15, Gebr. Martin, Tuttlingen) erfolgte ein etwa 4 cm langer Schnitt vom Unterkiefer-Winkel bis zur regio des Foramen mentale submandibulär entlang des Unterkieferrandes. Mit einer Knochensäge (Piezosurgery[®] Gerät, Mectron, Köln) wurde ausgehend vom Austrittspunkt am Foramen mentale ein Zugang zum Nervkanal des Nervus alveolaris inferior geschaffen. Unter zusätzlichem Schutz des Nerven mit einem Elevatorium nach Freer (Aesculap, Tuttlingen) wurde so die laterale kortikale Begrenzung mit dem piezochirurgischem Gerät bis in den Ansatzbereich des Musculus masseter am Kieferwinkel osteotomiert. Der Nervus alveolaris inferior wurde einseitig dargestellt (siehe Abbildung 2). Anschließend wurde mit einem Skalpell (Nr.15, Gebr. Martin, Tuttlingen) eine Kontinuitätsunterbrechung des Nerven von 2 cm (Neurotmesis) herbeigeführt. Der Nervdefekt wurde bei allen Tieren am rechten Kiefer vollzogen. Bei den Tieren 1-8 (Gruppe 1 und 2) wurde der Defekt mit Muskelgewebe aus dem Musculus quadriceps femoris rekonstruiert. Hierzu wurde ein Längsschnitt medial des

Oberschenkels durchgeführt, das subkutane Fett- und Bindegewebe durchtrennt und der Musculus quadriceps femoris dargestellt (Abbildung 3). Im Längsverlauf des Muskelbauches wurde unter Schonung der Ansätze ein 2 cm langes Muskelpräparat zur Interposition präpariert und in den Nervdefekt eingelegt. Die mikrochirurgische Koaptation zu den bestehenden Nervenden erfolgte mit Resolon-Nähten Gr. 7/0 (Resorba[®], Nürnberg). Bei den Tieren 9-16 (Gruppe 3 und 4) wurde der Defekt mit Hilfe von Fettgewebe rekonstruiert. Hierzu wurde ein iliakaler Längsschnitt durchgeführt und ein etwa 2 cm großes Stück Fettgewebe zur Rekonstruktion entfernt. Dieses wurde extrakorporal auf die Nervkanaldicke von ca. 3 mm auspräpariert und ebenfalls zur Überbrückung zwischen die beiden Nervenden interponiert. Die Koaptation zu den Nervenden wurde ebenfalls mit einer mikrochirurgischen Naht Resolon Gr. 7/0 (Resorba[®], Nürnberg) durchgeführt (Abbildung 4). Bei den Tieren 17-20 (Gruppe 5) wurde ein 2 cm langer Teil des Nerven entnommen, dieser wurde umgedreht und an den jeweiligen Nervenden mit einer mikrochirurgischen Naht Resolon Gr. 7/0 (Resorba[®], Nürnberg) koaptiert. Der zweischichtige Wundverschluss aller Defektrekonstruktionen erfolgte periostal und kutan mit Einzelknopfnähten (Vicryl[®] 5/0, Braun, Melsungen). Die periostale Schicht wurde hierbei sorgfältig auf den lateralen kortikalen Kanaldefekt platziert. Die Blutstillung während der Operation erfolgte mit dem Bipolar (Erbotom[®], Erbe Swiss, Winterthur, Schweiz), ggf. mit Unterbindung größerer subkutaner Venen (Vicryl[®] 5/0, Braun, Melsungen).

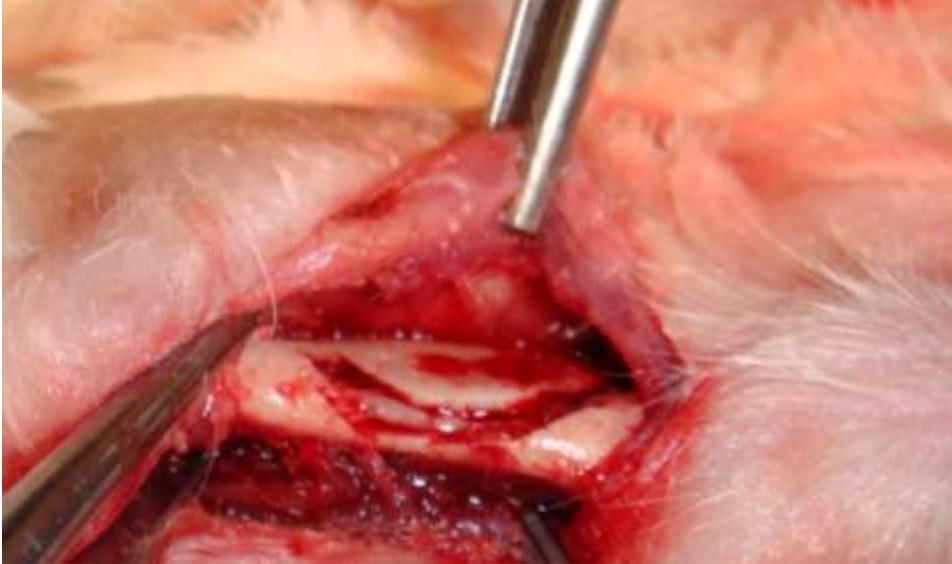


Abbildung 2: Einseitige Darstellung des Nervus alveolaris inferior mit Skalpell und Knochensäge.



Abbildung 3: Darstellung des Musculus quadriceps femoris nach Durchtrennung von Fett- und Bindegewebe.

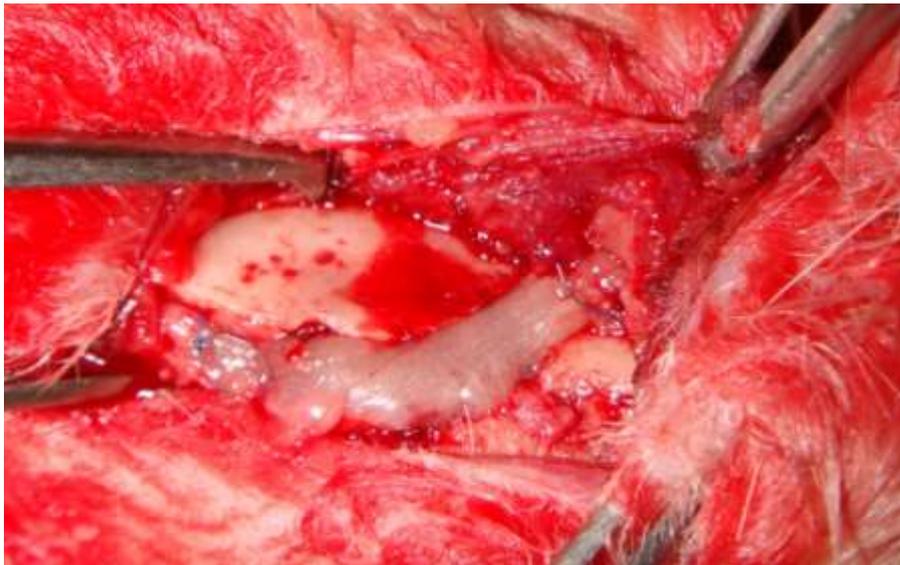


Abbildung 4: Ein ca. 2 cm langes Stück Fettgewebe, welches mit Resolon 7/0 Nathen an den Nervenden koaptiert wurde (Gruppe3+4).

3.6 Ablauf der Messungen

Alle Reflex-Messungen wurden unter Allgemeinanathesie durchgeführt. Ausgenutzt wurde hierbei der Jaw-Opening Reflex (JOR) durch Stimulation des Nervus alveolaris inferior und bilaterale Aufzeichnung eines Elektromyogramms. Gemessen wurde bei jedem Tier vor der OP (vor Herbeiführung des Nervdefektes) und nach 12, 16, 20 und 24 Wochen post OP (nach Herbeiführung der Rekonstruktion) (Abbildung 5). Alle Aufzeichnungen wurden mit dem Standard Diagnostik EMG-Gerät Xltek[®] (Neuromax, Oakville, Kanada) durchgeführt. Hierzu wurden 4 Platinumnadelelektroden (jeweils 2 Ableitungsnadeln und 2 Stimulationsnadeln, 300 µm Durchmesser) genutzt. Zwei Nadelelektroden wurden submukös im Vestibulum vertikal in der unteren Prämolaren-Region in der Nähe des Nervus mentalis auf Seite des Nervdefektes (ipsilateral) platziert. Durch Stimulation der ipsilateralen Seite (Defektseite) konnte die Reizantwort beim defekten Nerv untersucht werden. Zwei weitere Nadeln dienten als Ableitung zur Überprüfung der motorischen Antwort. Sie wurden in den Musculus digastricus venter anterior mit einem Mindestabstand von 1 cm zueinander eingebracht. Einmal auf der ipsilateralen Seite und beim zweiten Messvorgang auf der kontralateralen Seite. Die Ableitung erfolgte also am ipsilateralen Musculus digastricus venter anterior sowie bei einem weiteren Messvorgang am kontralateralen Musculus digastricus venter anterior (Abbildung 6).

An den Musculi digastrici wurden über den gesamten Versuchszeitraum keine Interventionen vorgenommen. Die Reizschwelle beider adäquater Reflexantworten in den EMG-Ableitungen der Musculi digastrici wurde für beide Stimulationen notiert. Der JOR wurde durch rechteckige elektrische Impulse mit einer Dauer von 500 Mikrosekunden und einer Frequenz von 0,1 Hz ausgelöst. Der gesetzte Stromreiz bewegte sich im Messbereich zwischen 0,0 mA - 10,5 mA, wobei mit dem kleinsten Wert 0 mA begonnen und in 0,5 mA-Schritten die Intensität gesteigert wurde. Die geringste Stimulationsintensität, welche eine Reflexantwort auslöste, wurde als JOR-Schwellenwert definiert, aufgezeichnet und die Messung gestoppt. Beim Ausbleiben einer Reizantwort im Messbereich wurde die Messung ebenfalls gestoppt und als fehlende Reizantwort notiert. Eine typische Reflexantwort des ipsilateralen Musculus digastricus ist in Abbildung 7 dargestellt. Die elektromyographische Aufzeichnung mit Ableitung über den Musculus digastricus wurde 3 Millisekunden vor bis 100 Millisekunden nach elektrischer Stimulation mit einer Sampling-Rate von 20 Hz und einer Bandbreitenfilterung von 100 Hz bis 1.000 Hz vorgenommen.

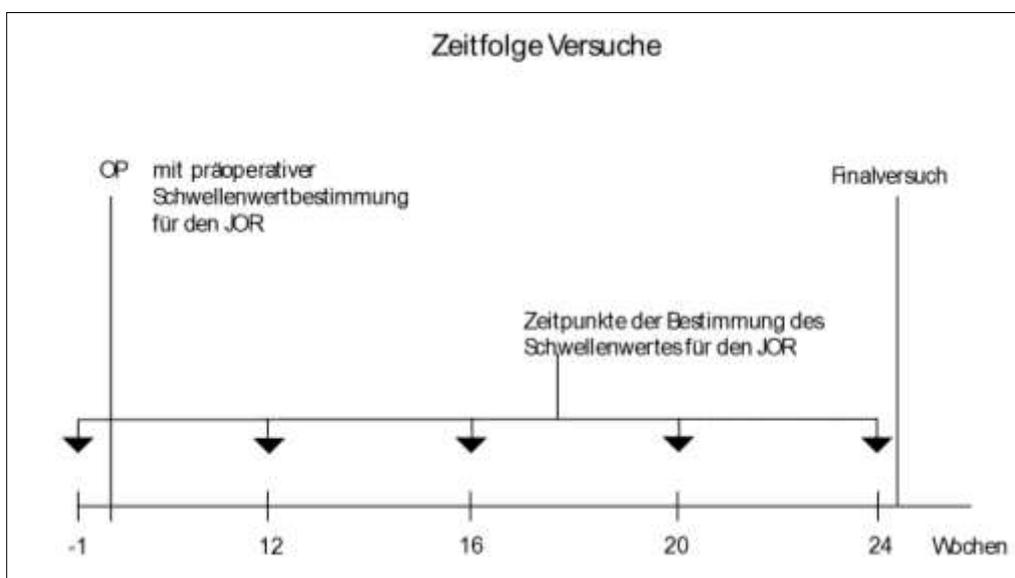


Abbildung 5: Zeitpunkte in Wochen (-1,12, 16, 20, 24), an denen der Schwellenwert für den JOR gemessen wurde.



Abbildung 6: Eingebrachte Nadelelektroden bei Messung des Schwellenwertes (grün=Stimulationsnadeln, rot/schwarz=Ableitungsnadeln).

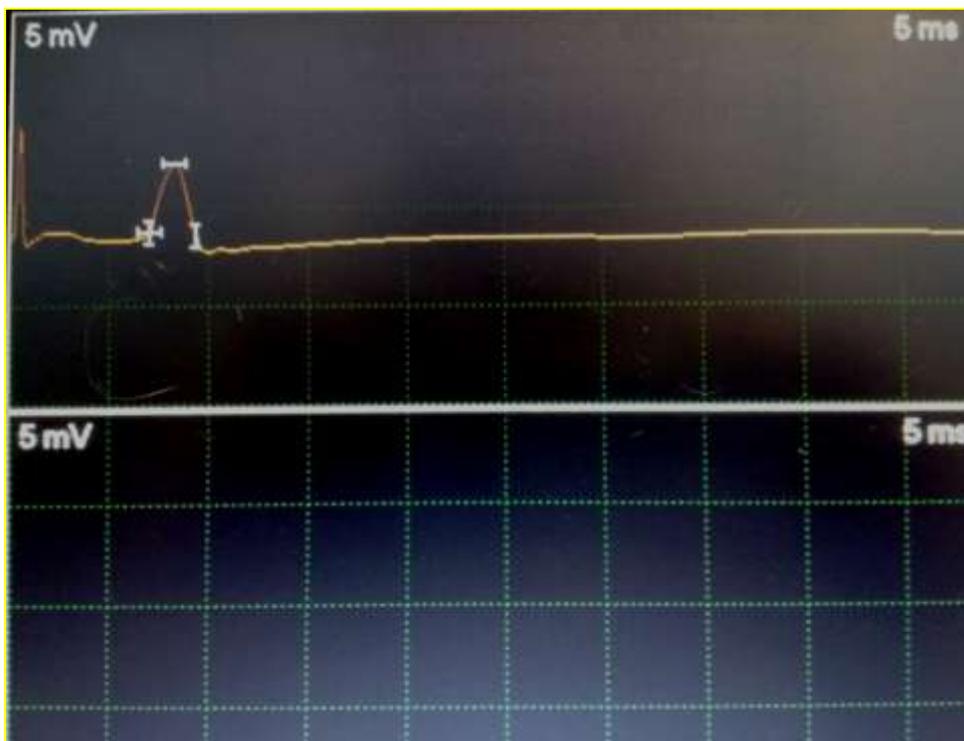


Abbildung 7: Typischer Verlauf einer Reflexantwort bei Reizung des Nerven (vor Defektherbeiführung).

3.7 Nachsorge

Im Anschluss an die OP erhielten die Tiere als Schmerzmittel Carprofen 5 % (0,08 ml/kg Körpergewicht, Rimadyl[®], Pfizer, Berlin) sowie 10 ml isotone Kochsalzlösung intramuskulär zur Kreislaufstimulation. Die Kaninchen wurden zusätzlich überwacht, um sicherzustellen, dass eine selbstständige Nahrungs- und Wasseraufnahme stattfindet. Falls diese bis acht Stunden nach der Messung ausblieb, wurde eine Ernährung mit Critical Care[®] (Albrecht, Aulendorf) durchgeführt. Das Futter wurde mit ein wenig Wasser vermengt, die Applikation erfolgte per os mit einer 20 ml-Spritze.

3.8 Injektion von Wachstumsfaktoren

Den Tieren der Interventionsgruppe 1 und 3 wurde nach zwei Wochen ein rekombinanter humaner neurotroper Wachstumsfaktor (rhNGF) (rHu NGF β° , AppliChem, Darmstadt) injiziert (Konzentration: 40 $\mu\text{g/ml}$, 1 ml). Die Injektion erfolgte beginnend direkt im proximalen Anteil des Nervdefektes bis zum distalen Anteil des Defektes. Die Applikation erfolgte subperiostal entlang des Kanalwanddefektes. Eine zweite Injektion von Wachstumsfaktoren (gleiche Dosis), erfolgte nach weiteren zwei Wochen.

3.9 Ende der Messungen und Opferung der Tiere

Nach 24 Wochen wurde die letzte Serie der Reflexmessungen beendet. Anschließend wurde die schmerzlose Euthanasie durch intravenöse Applikation (über die Ohrmuschelvene) von Embutramid (T61[®], Intervet, Unterschleißheim) durchgeführt.

3.10 Statistische Auswertung

Zur Überprüfung der statistischen Differenzen zwischen den Gruppen wurde eine Varianzanalyse (One-Way ANOVA) durchgeführt. Es wurden die Messzeitpunkte -1, 12, 16, 20 und 24 für die Faktoren Zeitpunkt (vor und nach Defektherbeiführung) und Gruppenzugehörigkeit gewählt. Es folgte die Berechnung der Least square means. Für diese Werte wurde das 95 %-Konfidenzintervall berechnet. Die signifikanten Unterschiede der Paare zueinander wurden mit Hilfe des Tuckey HSD Test berechnet. Differenzen mit einem P-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism[®] (GraphPad Software Inc. 2014, La Jolla, USA) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Klinischer Verlauf der Untersuchung

Im Untersuchungszeitraum nahmen die Tiere durchschnittlich etwa 1,75 kg zu. Sie wogen zu Beginn 2,25 kg und zum Ende der Versuche im Mittel 4 kg. Im Verlauf der Untersuchungen kam es zu Verletzungen der Tiere. Es gab insgesamt drei Tiere mit Bissverletzungen an den Ohren, zwei Tiere erlitten jeweils eine Bissverletzung, ein Tier zog sich zwei Bissverletzungen zu. Ein Tier wies eine Bissverletzung am Unterbauch, ein weiteres an der Vorderpfote auf. Zwei Tiere zogen sich eine Verletzung an der Hinterpfote zu, von denen es bei einem zu Wundheilungsstörungen mit zwischenzeitigem Gewichtsverlust kam. Im Laufe der Behandlung musste die innere Krallen (Pfote Hinterlauf rechts) amputiert werden. Es folgten eine Zwangsernährung mit Critical Care® (Albrecht, Aulendorf), Schmerzmittelgabe sowie eine isolierte Haltung über 5 Tage. Die Bissverletzungen waren nicht im Bereich der OP Wunden. Es traten auch keine Verletzungen im Versorgungsbereich des Nervus alveolaris inferior auf.

4.2 Messungen der Schwellenwerte

Für die Auslösung eines Jaw-Opening Reflexes am gesunden Nerv wurde ein Stromreiz von 1,5 mA (Schwellenwert) benötigt. Bei diesem Schwellenwert handelt es sich um einen vor Defektherbeiführung ermittelten Medianwert. Je geringer der angezeigte Schwellenwert, desto besser ist die Nervfunktion und je höher der Schwellenwert, desto schlechter ist die Nervfunktion. Die Messungen der Schwellenwerte erfolgten nach ipsilateraler Stimulation und kontralateraler/ipsilateraler Ableitung direkt vor der Defektherbeiführung (t_{-1}). Weitere Messungen wurden nach 12(t_{12}), 16(t_{16}), 20(t_{20}) und 24(t_{24}) Wochen durchgeführt. Eine zusätzliche Messung erfolgte bei jedem Tier direkt nach Defektherbeiführung und Rekonstruktion post OP. Bei keinem Tier wurde ein Schwellenwert an diesem Tag im Messbereich bis 10,5 mA gemessen. So konnte sichergestellt werden, dass der Nerv intraoperativ komplett durchtrennt wurde. Auf einen höheren Stromreiz

wurde verzichtet, um eine Schädigung des Nerven mit womöglich folgender Beeinflussung der Testergebnisse im Untersuchungszeitraum zu vermeiden.

4.2.1 Nervrekonstruktion mit Muskelgewebe

4.2.1.1 Muskel ohne WF

Für die Muskelgruppe wurde ein präoperativer Schwellenwert (t_{-1}) von $1,79 \pm 0,38$ mA gemessen (95 % Konfidenzintervall (KI): 1,47-2,10 mA). 12 Wochen postoperativ (t_{12}) erhöhte sich dieser signifikant auf $6,81 \pm 1,33$ (KI: 5,70-7,93) mA ($p < 0,0001$). Für t_{16} stieg der Schwellenwert auf $7,90 \pm 2,06$ (KI: 6,17-9,63) mA und zum Zeitpunkt t_{20} sind $7,99 \pm 2,64$ (KI: 5,78-10,19) mA gemessen worden. Nach 24 Wochen sank der Schwellenwert auf $7,55 \pm 2,40$ (KI: 5,55-9,55) mA (siehe Abbildung 8+13). Die Schwellenwerte zum Zeitpunkt t_{16} ($p < 0,0001$) und t_{20} ($p < 0,0001$) waren signifikant unterschiedlich zum präoperativen Schwellenwert t_{-1} . Die Differenz zwischen präoperativ gemessenen Schwellenwert (t_{-1}) und dem Schwellenwert zum Versuchsende (t_{24}) betrug 5,76 mA. Das entspricht einem Anstieg der Reizschwelle um 422 %. Beide Schwellenwerte unterschieden sich statistisch signifikant voneinander ($p < 0,0001$) (siehe Abbildung 8, Abbildung 13).

4.2.1.2 Muskelgewebe mit WF

In der Gruppe Muskel + WF lag der Schwellenwert präoperativ (t_{-1}) bei $2,38 \pm 1,04$ (KI: 1,50-3,25) mA. Nach 12 Wochen (t_{12}) war ein höherer Reiz von $7,93 \pm 1,69$ (KI: 6,516-9,334) mA notwendig, um eine Reizantwort zu erzielen. Der Schwellenwert veränderte sich nach 16 Wochen (t_{16}) post OP kaum und lag bei $7,48 \pm 1,27$ (KI: 6,42-8,53) mA. Nach 4 weiteren Wochen (t_{20}) fiel er auf $6,33 \pm 1,39$ (KI: 5,16-7,49) mA und stieg zum Versuchsende (t_{24}) auf $7,87 \pm 2,83$ (KI: 0,84-14,89) mA an (siehe Abbildung 9+13). Die Schwellenwerte zum Zeitpunkt t_{12} ($p < 0,0001$), t_{16} ($p < 0,0001$) und t_{20} ($p = 0,0044$) waren signifikant unterschiedlich zum präoperativen Schwellenwert t_{-1} . Die Differenz zwischen t_{-1} und t_{24} betrug 5,49 mA, was einem Anstieg der Reizschwelle um 331 % entspricht. Der Unterschied beider Schwellenwerte war ebenfalls statistisch signifikant ($p = 0,0028$) (siehe Abbildung 9, Abbildung 13).

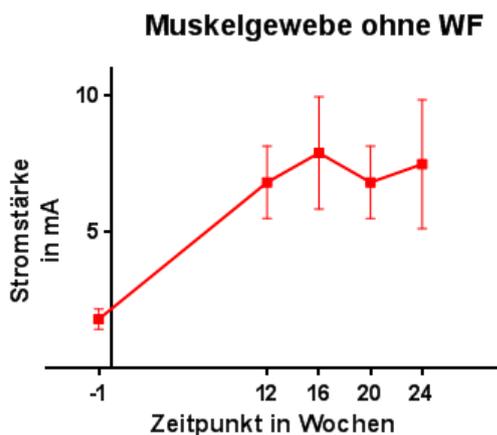


Abbildung 8

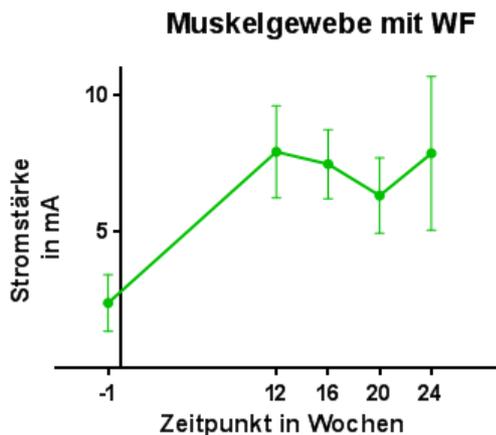


Abbildung 9

Abbildungen 8+9: Schwellenwerte in mA (Mittelwerte + Standardabweichungen) bei den Gruppen 1 und 2 (Muskel + WF und Muskel ohne WF) zum Zeitpunkt präoperativ (t_{-1}) sowie nach 12, 16, 20 und 24 Wochen. In der Gruppe Muskelgewebe ohne WF unterschieden sich die Messwerte zum Zeitpunkt t_{12} ($p < 0,0001$), t_{16} ($p < 0,0001$), t_{20} ($p < 0,0001$) und t_{24} ($p < 0,0001$) signifikant zum Zeitpunkt t_{-1} . In der Gruppe Muskelgewebe + WF gab es ebenfalls signifikante Unterschiede beim Vergleich der Schwellenwerte t_{12} ($p < 0,0001$), t_{16} ($p < 0,0001$), t_{20} ($p = 0,0044$) und t_{24} ($p = 0,0028$) mit dem Ausgangswert t_{-1} .

4.2.2 Nervrekonstruktion mit Fettgewebe

4.2.2.1 Fettgewebe

In der Fettgruppe lag der Schwellenwert zur Auslösung des JOR präoperativ (t_{-1}) bei $1,75 \pm 0,46$ (KI: 1,36-2,14) mA. Die in den folgenden Wochen gemessenen Schwellenwerte unterschieden sich alle signifikant zum Schwellenwert zum Zeitpunkt t_{-1} . Nach 12 Wochen (t_{12}) war ein höherer Reiz von $8,17 \pm 2,36$ (KI: 5,69-10,64) mA ($p < 0,0001$) zur Reflexauslösung notwendig. Dieser sank im Versuchsverlauf etwas und lag zum Zeitpunkt t_{16} bei $8,07 \pm 1,86$ (KI: 6,35-9,79) mA ($p < 0,0001$). 4 Wochen später (t_{20}) verringerte sich der Schwellenwert weiter auf $7,50 \pm 2,28$ (KI: 5,59-9,41) mA ($p < 0,0001$). Zum Ende des Messverlaufes, nach 24 Wochen (t_{24}), wurden $7,44 \pm 2,06$ (KI: 5,72-9,16) mA gemessen (siehe Abbildung 10, Abbildung 13). Die Differenz zwischen t_{-1} und t_{24} betrug 5,49 mA. Das entspricht einem Anstieg der Reizschwelle um 428 %. Der Unterschied beider Schwellenwerte war ebenfalls statistisch signifikant ($p < 0,0001$) (siehe Abbildung 10, Abbildung 13).

4.2.2.2 Fettgewebe + WF

Für die Gruppe Fett + WF konnte präoperativ (t_{-1}) bei einem Reiz von $2,19 \pm 1,15$ (KI: 1,22-3,15) mA der JOR ausgelöst werden. 12 Wochen post OP war ein höherer Reiz von $7,04 \pm 0,92$ (KI: 6,27-7,81) mA zur Reflexauslösung notwendig. Zum Zeitpunkt t_{16} wurde ein Wert von $6,38 \pm 1,45$ mA (KI: 5,16-7,59) gemessen und t_{20} ergab $6,63 \pm 2,46$ (KI: 4,57-8,68) mA. Zum Abschluss der Messungen (t_{24}) war wieder ein höherer Stromreiz von $8,03 \pm 1,82$ (KI: 6,50-9,55) mA zur Reflexauslösung notwendig (siehe Abbildung 11, Abbildung 13). Die Schwellenwerte zum Zeitpunkt t_{12} ($p=0,0003$), t_{16} ($p=0,0377$) und t_{20} ($p=0,0088$) waren signifikant unterschiedlich zum präoperativen Schwellenwert t_{-1} . Die Differenz zwischen t_{-1} und t_{24} betrug 5,84 mA. Dies entspricht einem Anstieg der Reizschwelle um 366 %. Die beiden Schwellenwerte unterschieden sich signifikant voneinander ($p<0,0001$) (siehe Abbildung 11, Abbildung 13).

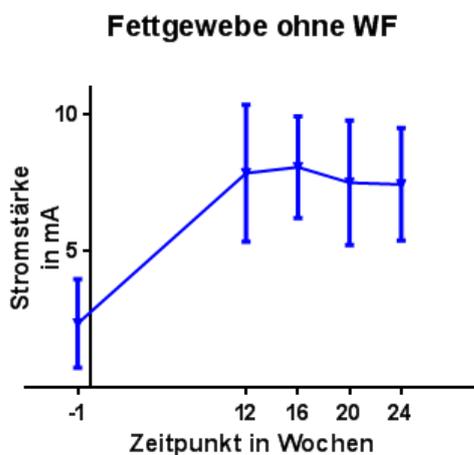


Abbildung 10

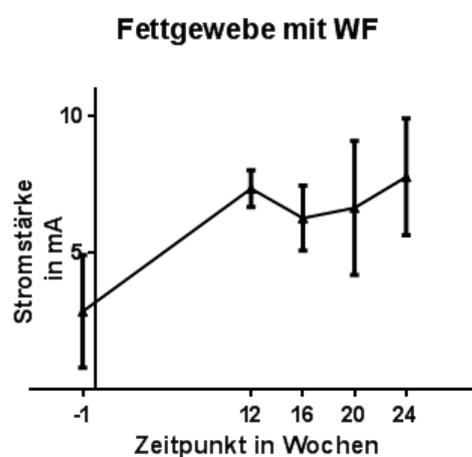


Abbildung 11

Abbildungen 10+11: Schwellenwerte in mA (Mittelwerte + Standardabweichungen) bei den Gruppen 3 und 4 (Fett + WF und Fett ohne WF) zum Zeitpunkt präoperativ (-1) sowie nach 12, 16, 20 und 24 Wochen. In der Gruppe Fettgewebe ohne WF unterschieden sich die Messwerte zum Zeitpunkt t_{12} ($p<0,0001$) t_{16} ($p<0,0001$), t_{20} ($p<0,0001$) und t_{24} ($p<0,0001$) signifikant zum Zeitpunkt t_{-1} . In der Gruppe Fettgewebe + WF gab es ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Schwellenwerten zum Zeitpunkt t_{-1} und den Werten nach 12 ($p=0,0003$), 16 ($p=0,0377$), 20 ($p=0,0088$) und 24 Wochen ($p<0,0001$).

4.2.3 Donornerv

In der Gruppe 5 (Donornerv) wurde vor OP Beginn (t_{-1}) ein Schwellenwert zur Reizauslösung von $1,94 \pm 0,62$ (KI: 1,41-2,46) mA gemessen. Dieser erhöhte sich 12 Wochen nach Nervdurchtrennung und Rekonstruktion (t_{12}) signifikant auf $7,50 \pm 1,41$ (KI: 6,32-8,68) mA ($p < 0,0001$). Im Laufe der Untersuchung verringerte sich die Reizschwelle zum Zeitpunkt t_{16} auf $5,38 \pm 1,53$ (KI: 4,10-6,65) mA. Der Wert war ebenfalls signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($p = 0,0345$). Der Schwellenwert sank 4 Wochen später (t_{20}) weiter auf $4,25 \pm 2,49$ (KI: 2,17-6,33) und lag am Ende des Versuchszeitraumes (t_{24}) bei $4,50 \pm 2,45$ (KI: 2,45-6,55) mA (siehe Abbildung 12, Abbildung 13). Die Differenz zwischen t_{-1} und t_{24} betrug 2,56 mA. Das entspricht einem Anstieg von 232 %. Die beiden Schwellenwerte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Der zum Zeitpunkt t_{20} gemessene Schwellenwert unterschied sich ebenfalls nicht signifikant vom Ausgangsschwellenwert (siehe Abbildung 12, Abbildung 13).

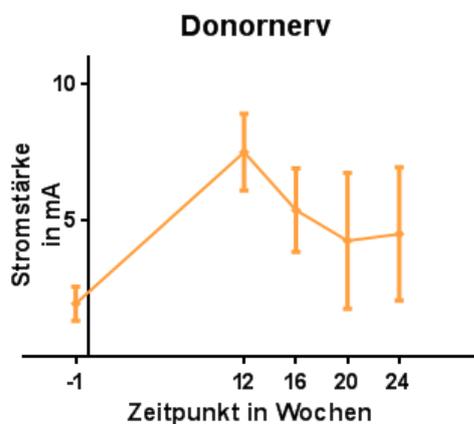


Abbildung 12: Schwellenwerte in mA (Mittelwerte + Standardabweichungen) bei der Gruppe (Donornerv) zum Zeitpunkt präoperativ (-1) sowie nach 12, 16, 20 und 24 Wochen. Die gemessenen Schwellenwerte unterschieden sich nach 12 Wochen ($p < 0,0001$) sowie nach 16 Wochen ($p = 0,0345$) signifikant vom Ausgangswert.

4.2.4 Gruppenvergleich

Ein zusammenfassender Überblick aller Gruppen zu den einzelnen Messzeitpunkten mit Mittelwert und Standardabweichung in mA ist in Abbildung 13 dargestellt. Im unabhängigen Vergleich des Standardverfahrens der Nervrekonstruktion (autologer Nerv) mit Gruppen, bei denen die Nervrekonstruktion mit Muskel und/oder Fett sowie Muskel und/oder Fett sowie zusätzlicher Gabe eines neurogenen Wachstumsfaktors erfolgt ist, zeigen sich signifikante Unterschiede zugunsten des Therapiestandards. Die entsprechenden p-Werte sind in Tabelle 3 dargestellt.

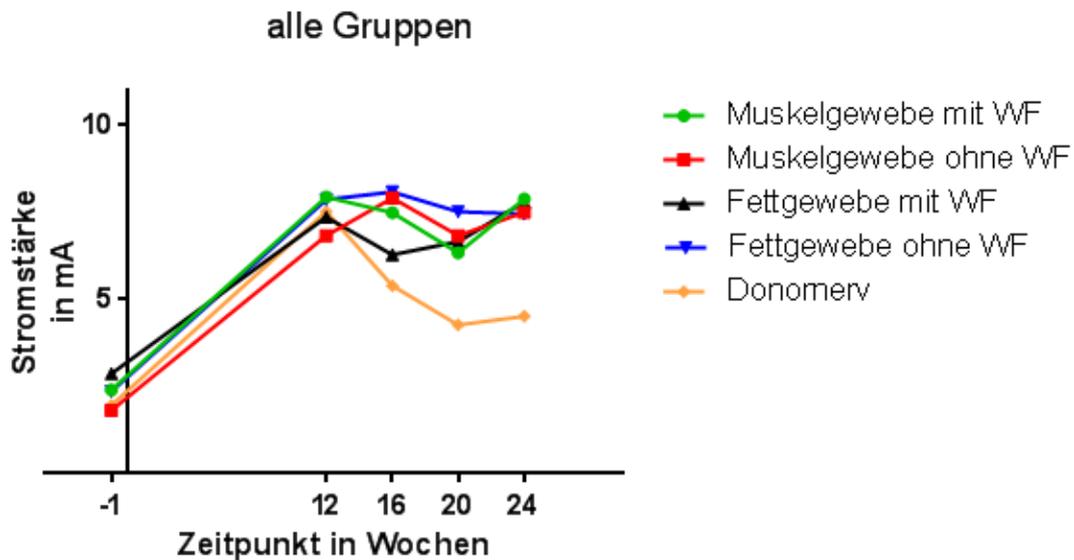


Abbildung 13: Darstellung der Schwellenwerte in mA (Mittelwerte + Standardabweichungen) der Versuchsgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum.

Tabelle 3: Beim Vergleich der Gruppe 5 (Donornerv) mit der Gruppe 1+2, Gruppe 3+4, Gruppe 1+4 bzw. Gruppe 2+3 traten im Untersuchungszeitraum signifikante Unterschiede auf.

	Rekonstruktion mit Muskel (mit und ohne Wachstumsfaktor)	Rekonstruktion mit Fett (mit und ohne Wachstumsfaktor)	Rekonstruktion mit Muskel oder Fett sowie zusätzlicher Gabe eines Wachstumsfaktors	Rekonstruktion mit Fett oder Muskel ohne Gabe eines Wachstumsfaktors
Therapiestandard (Donornerv)	p= 0,0001	p= < 0,0001	p= 0,0012	p= < 0,0001

5 Diskussion

Patienten, bei denen der Nervus alveolaris inferior geschädigt wurde, erfahren aufgrund der daraus folgenden Gefühlseinschränkung insbesondere im Kinn- und Lippenbereich eine Einschränkung der Lebensqualität. Die schnellstmögliche Regeneration mit Wiedererlangung des Sensibilitätsempfindens sollte daher Ziel jeder Therapie sein (Abarca et al. 2006, Pogrel et al. 2011).

Die Stimulation erfolgte am Nervus alveolaris inferior mit Ableitung am Musculus digastricus venter anterior (ipsi- und kontralateral). Es wurden im gesamten Versuchszeitraum keine Eingriffe am Muskel vorgenommen. Zu Beginn wurde bei jedem Tier die Funktion des Musculus digastricus venter anterior (ipsi- und kontralateral) durch Stimulation des gesunden Nervus alveolaris inferior (kontralateral) überprüft, bevor Reflexmessungen an der Nervinterventionsseite (ipsilateral) vorgenommen wurden. Diese erfolgten vor Defektherbeiführung (t_{-1}) sowie nach 12(t_{12}), 16(t_{16}), 20(t_{20}) und 24 (t_{24}) Wochen. Somit konnte die korrekte Funktion von Muskel und Messgerät vor jedem Messvorgang sichergestellt werden. Die Intervalle zur Überprüfung der Regeneration wurden in Anlehnung an den aktuellen klinischen Leitfaden der DGZMK zur Überprüfung von Nervschäden gewählt. Dieser besagt, dass Nachkontrollen bei Nervschädigung erstmals nach 1-2 Tagen und nachfolgend nach 1 Woche, 4 Wochen und anschließend im 4 Wochen Rhythmus stattfinden sollen (Hausamen et al. 2003).

New Zealand Kaninchen wurden als Versuchstiere ausgewählt, da diese Rasse sehr robust ist und auch in anderen klinischen Studien zur Regeneration peripherer Nerven erfolgreich eingesetzt wurde. Dies ermöglicht eine Vergleichbarkeit zwischen den Studien. Durch das Vorhandensein des Jaw-Opening Reflexes (JOR) kann eine eindeutige Aussage (Reflex ja/nein) bei den Messungen zur Überprüfung der Nervregeneration getroffen werden (Ignatiadis et al. 2007, Du et al. 2011, Sahakyants et al. 2013). Andere Tiere die für experimentelle Studien verwendet werden (z.B. Schaf oder Schwein) haben keinen JOR und wären somit nicht geeignet.

In allen 5 Versuchsgruppen (Muskel mit/ohne WF, Fett, mit/ohne WF, Donornerv) konnten nach 12 Wochen erste Schwellenwerte zur Reflexauslösung gemessen werden. Mit dem vorliegenden Nervmodell konnte gezeigt werden, dass die Nervfunktion in allen 5 Gruppen wieder hergestellt werden konnte. Zur Auslösung des JOR war aber ein erhöhter Reiz notwendig. Die Reizschwelle vor Nervdurchtrennung konnte zum Versuchsende nach 24 Wochen in keiner Gruppe erreicht werden. Das Heilungsergebnis ist also nicht vergleichbar mit einem gesunden Nerv. Eine Nachkontrolle der Nervregeneration ist prinzipiell mit dem EMG möglich, die Schwellenwerte sind aber nach der Rekonstruktion höher. Ein zusätzlicher Hinweis für das Wiedererlangen der Sensibilität an der Kaninchenschnauze ist neben den gemessenen Reflexschwellenwerten die Gewichtszunahme der Tiere im Laufe der Untersuchung, da Kaninchen ein reduziertes Sehvermögen haben und auf das Tastempfinden an der Schnauze bei der Nahrungssuche angewiesen sind.

Muskel und Fettgewebe sind prinzipiell als Nervinterponat geeignet (Lutz et al. 2001, Lutz 2004, Meek et al. 2004, Yoshitani et al. 2007, Dornseifer et al. 2011). Die Regeneration von Nervenfasern wird durch die longitudinal angeordnete Basallamina sowie die Interzellulärsubstanz des Muskelgewebes begünstigt (Edgar et al. 1984, Lundborg et al. 1994, Meek et al. 2004). In der klinischen Anwendung eignet sich dieses Interponat zusätzlich, da Entnahmestellen am Körper zumeist ausreichend verfügbar sind. Die Regenerationsergebnisse in klinischen Patientenstudien waren bei der Verwendung von Muskelgewebe als Interponat im Vergleich zum direkten Vernähen beider Nervendigungen recht vielversprechend (Pereira et al. 1991b) und dem Donornerv sogar überlegen (Pereira et al. 1991a). Zusätzlich scheint sich eine Abschirmung des Präparates gegenüber der Umgebung durch den knöchernen Nervkanal positiv auszuwirken. Dies geht aus klinischen Studien mit Venen und Muskelgewebe hervor (Brunelli et al. 1993, Battiston et al. 2000a, Battiston et al. 2000b). Da der knöcherne Nervkanal einen Schutz gegenüber der Umgebung bietet, sind diese Ergebnisse auch auf den Nervus alveolaris inferior übertragbar. Zur Verwendung von Muskelgewebe als Interponat bei der Regeneration des Nervus alveolaris inferior findet sich in der Literatur lediglich ein Fallbericht. Nach Nervdurchtrennung und anschließender Rekonstruktion mit Muskelgewebe ging drei Monate postoperativ die Anästhesie des Nerven in eine Dysästhesie über und

erreichte nach einem Jahr ein befriedigendes Ergebnis bezüglich des Sensibilitätsempfindens des Patienten im Innervationsgebiet (Rath 2002).

Für die Tiere der Fettgruppe konnte ebenfalls ein Schwellenwert nach 12 Wochen verzeichnet werden. Fettgewebe eignet sich also womöglich ebenfalls als Interponat. Erklärend hierfür könnte der Fettgehalt der Schwann-Zellen (80 %) sein (Püschel et al. 2011). Außerdem sind Schwannzellen an der körpereigenen Nervregeneration maßgebend beteiligt (Konofaos und Ver Halen 2013). Fettgewebe ist zudem am Körper leicht zu gewinnen und die Komorbidität erscheint gering. Es liegt in der Literatur eine humane Studie zur Behandlung des Karpaltunnelsyndroms mit Hilfe von Fettgewebe als Interponat vor, mit guten Behandlungsergebnissen (Wallach et al. 2008). Ein Vorteil liegt möglicherweise in der geringen Narbenbildung bei Verwendung von Fettgewebe zur Überbrückung von Nervdefekten (Kiviluoto 1976, Gill et al. 1979, Jacobs et al. 1980). Dumanian und Mitarbeiter dagegen berichteten nach einer Studie an Ratten von vermehrten Neuropathien (Dumanian et al. 1999). Andere Studien konnten dies aber nicht bestätigen (Gill et al. 1979, Jacobs et al. 1980, Van Akkerveeken et al. 1986, McClinton 1996). Untersuchungen bezüglich der Verwendung von Fettgewebe als Interponat bei Defekten des Nervus alveolaris inferior sind bisher nicht publiziert.

Viele klinische Studien untersuchen periphere Nerven, die frei im Gewebe verlaufen, wie zum Beispiel der Nervus ischiadicus der Ratte (Iwakura et al. 2012, Ding et al. 2014, Giusti et al. 2014, Isaacs und Browne 2014). Das vorliegende Versuchstiermodell zur Nervregeneration berücksichtigt die Besonderheit des langstreckigen Verlaufs eines sensiblen Hirnnerven in einem knöchernen kortikalen Kanal (Heine et al. 2010). Der operative Defekt wurde mit einer periostalen Membran bedeckt und befand sich somit in einem von der weichgewebigen Umgebung abgeschirmten Kanal. Das sich regenerierende Nervgewebe ist dadurch zum einen vor äußeren Einflüssen wie z.B. einsprossendem Binde- und Narbengewebe teilweise geschützt, zum anderen fungiert der Nervkanal als natürliche Leitstruktur für das sich regenerierende Nervgewebe. Dies wirkt sich, im Vergleich zu frei im Gewebe verlaufenden Nerven, womöglich begünstigend auf die Regeneration aus. Aktuelle Studien, in denen Nanomaterialien als Leitschiene verwendet wurden, bestätigen diese Annahme (Saracino et al. 2012, Saracino et al. 2013). Auf der einen

Seite kann eine Leitschiene nachteilig sein, da der Nerv gegenüber der Umgebung abgeschirmt wird und so womöglich die Angiogenese des sich regenerierenden Gewebes erschwert wird, was auch für den Nervus alveolaris inferior gilt. Andererseits erschweren aber die limitierenden Membranen die rasche Ersatzgewebebildung und damit narbige Behinderung adäquater axonaler und neurolemmaler Regeneration. Zu beachten ist aber, dass im Knochen sicher eine bessere Durchblutung erfolgen kann als in einer als Leitschiene fungierenden „Röhre“.

In unserer Studie untersuchten wir außerdem das Regenerationspotential des Donornerven. Hierzu wurde der Nervus alveolaris inferior entnommen, umgedreht und anschließend mit einer epineuralen Naht befestigt. Die mit dem Donornerv erzielten Regenerationsergebnisse sind akzeptabel, nicht vergleichbar mit einem gesunden Nerv, aber vergleichbar mit dem bisherigen Goldstandard Nervus auricularis magnus und Nervus suralis (Tzou et al. 2011)

Vergleicht man die Gruppe „Fettgewebe“ mit den Tieren, welche Muskelgewebe als Interponat erhielten, lässt sich keine Aussage treffen, welches Gewebe besser als Transplantat geeignet ist. Lediglich beim Vergleich mit der Gruppe Donornerv, sind Muskel- und Fettgewebe signifikant unterlegen ($p < 0,0001$).

Im vorliegenden Versuch wurde der Wachstumsfaktor rhNGF, mit einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$, nach 2 und 4 Wochen lokal injiziert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Konzentration des Wachstumsfaktors NGF einen signifikanten Einfluss auf die Regeneration des Nerven hat (Lee et al. 2003). Nach Lee und Mitarbeitern liegt das Optimum bei 20 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$. Die somit erzielten Regenerationsergebnisse sind bei diesen Konzentrationen (Silikonröhrchen mit WF) vergleichbar zum Donornerv (Lee et al. 2003).

Tendeziell führt der WF in Kombination mit Fettgewebe als Interponat womöglich zu einer schnelleren Regeneration. Daraus leitet sich ab, dass zu Beginn der Regeneration der WF möglicherweise fördernd wirkt, indem rhNGF die körpereigene rhNGF Produktion anregt (Li et al. 2012). Der Wachstumsfaktor beschleunigt in Kombination mit Fettgewebe die Regeneration, führt aber nicht zur Rückkehr zum Ausgangsschwellenwert. In der Gruppe Muskelgewebe + WF scheint der WF auch

positiv zu wirken. Eine schnellere und verbesserte Regeneration durch rhNGF wird auch durch andere klinische Studien bestätigt (Pollock 1995, Yates et al. 2004, Chung et al. 2008).

Zur Beurteilung der Nervregeneration wurden Reflexmessungen durchgeführt. In dem Versuch musste auf die histologische Beurteilung des Nerven verzichtet werden. Die ursprünglich geplante histologische Auswertung war nicht möglich, da Probleme bei der Aufbereitung des Gewebes (in Italien) auftraten.

Eindeutige klinische Aussagen lassen sich anhand dieser Studie nicht treffen. Eine mögliche Limitation könnte die geringe Anzahl an Versuchstieren sein. Weiterhin ist zu beachten, dass das Regenerationspotential beim Kaninchen besser und vor allem die Regenerationsgeschwindigkeit schneller ist als beim Menschen. Aus diesem Grund ist die direkte Übertragung der Studie auf den Menschen nicht uneingeschränkt möglich. Die Resultate können jedoch als Anhalt gewertet werden. Studien haben gezeigt, dass die Regenerationszeit bei Schädigung des menschlichen Nervus alveolaris inferior im Mittel bei 11 Monaten liegt. Eine Verbesserung des Regenerationszustandes ist nach dieser Zeit eher als gering einzuschätzen (Zuniga et al. 1998).

In der vorliegenden Studie wurde ein Wachstumsfaktor verwendet, mit dem Ergebnis, dass weder die Regenerationszeit verkürzt, noch das Ausmaß der Nervregeneration durch die Applikation des Wachstumsfaktors verbessert werden konnte. Der Anwendung von zellulären Stammzellkomponenten und der Variation der Applikationsart des rhNGF z.B. mit Hilfe der Nanomaterialien oder Mikrosphärentechnologien könnten daher für zukünftige Untersuchungen in diesem Tiermodell eine Bedeutung bei der Verringerung der Regenerationszeit und des Ausmaßes der Regeneration zukommen. Des Weiteren könnte eine Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren miteinander oder eine Veränderung von Applikationszeitpunkt und -häufigkeit positive Heilungseffekte erzielen.

6 Zusammenfassung

Die Rekonstruktion sensibler Nerven nach Durchtrennung ist noch immer eine große Herausforderung. Der Goldstandard, die Verwendung autologer Nervtransplantate bei großen Nervdefekten, stellt aufgrund der Komorbidität sowie der nicht wieder erreichbaren Ausgangssensibilität keine befriedigende Therapieoption dar. Die Anwendung autologen Gewebes in Kombination mit Wachstumsfaktoren als Interponat könnte ein Ansatz für weitere Therapiemöglichkeiten sein.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an einem bereits etablierten Tiermodell die Regeneration des Nervus alveolaris inferior im Nervkanal nach Durchtrennung und anschließender Rekonstruktion mit Hilfe autologer Gewebe und einem Wachstumsfaktor zu untersuchen. Hierzu wurde bei 20 Kaninchen der New Zealand Rasse ein einseitiger operativer Defekt des Nervus alveolaris inferior herbeigeführt. Anschließend erfolgte die Rekonstruktion mit autologem Muskel- bzw. Fettgewebe oder einem autologen Nerv als Donornerv. Ein Teil der Tiere erhielt nach zwei bzw. vier Wochen zusätzlich einen rekombinanten humanen neurotrophen Wachstumsfaktor (rhNGF). Es folgten elektromyographische Messungen über einen Zeitraum von 24 Wochen zur Bestimmung der Reizschwelle, bei der die Auslösung des Jaw-Opening Reflexes (JOR) erfolgt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das Modell zur Simulation einer diffusionsgeminderten Umgebung (knöcherner Nervkanal) geeignet ist. Eine Regeneration des Nervus alveolaris inferior mit Hilfe autologer Gewebe ist möglich. Die Ausgangsfunktion des Nerven kann mit diesem Therapieverfahren aber nicht wiederhergestellt werden, da der präoperative Schwellenwert in der vorliegenden Untersuchung nicht erreicht wurde. Die einzelnen Gruppen zeigten bezüglich der verwendeten unterschiedlichen Gewebe einen tendenziellen Vorteil von Muskelgewebe gegenüber Fettgewebe. Die Injektion von Wachstumsfaktoren zeigte in beiden Gruppen (Fett- und Muskelgewebe) positive Tendenzen, jedoch keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zum Donornerv sind diese Therapieverfahren aber nicht überlegen. In Folgestudien sollte ggf. die Zahl der Versuchstiere erhöht werden. Die Verwendung zusätzlicher Wachstumsfaktoren

sowie eine Veränderung der Applikationszeitpunkte könnte hilfreich sein. Vorteilhaft im vorliegenden Tiermodell ist, dass auf eine Nutzung von Fremdmaterialien verzichtet wurde und das verwendete autologe Gewebe überall verfügbar ist.

7 Abkürzungsverzeichnis

rhNGF	-	rekombinanter humaner Nervenwachstumsfaktor
NGF	-	Nervenwachstumsfaktor (engl. Nerve growth factor)
TNF	-	Tumor Nekrose Faktor
BDNF	-	BDNF-Wachstumsfaktor (engl. Brain-derived neurotrophic factor)
NT-3	-	Neurotrophin-3
DVT	-	3D-Volumentomographie
NT-4/5	-	Neurotrophin-4/5
PLC γ	-	Phospholipase C γ
SOS	-	Gen/Protein Son of Sevenless
ERK/MAPK Signalweg	-	engl. Extracellular-signal Regulated Kinase/mitogen-activated protein
Trk-A-Rezeptor	-	Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A Rezeptor
DAG	-	Diacylglycerol
IP3	-	Inosiltriphosphat
PI3Kinase	-	Phosphoinositid-3-Kinase
JOR	-	Jaw-opening-Reflex (Mundöffnungsreflex)
EMG	-	Elektromyographie
WF	-	Wachstumsfaktor
OP	-	Operation

CNTF	-	CNTF-Wachstumsfaktor (engl. ciliary neurotrophic factor)
SIAI	-	Stimulation ipsilateral, Ableitung ipsilateral
SIAC	-	Stimulation ipsilateral, Ableitung kontralateral
SSEP		somatosensorisch evozierte Potentiale
PATH		Pain and Thermal Sensitivity
EMG		Elektromyographie

8 Literaturverzeichnis

Abarca, M., Van Steenberghe, D., Malevez, C., De Ridder, J., Jacobs, R. (2006): Neurosensory disturbances after immediate loading of implants in the anterior mandible: an initial questionnaire approach followed by a psychophysical assessment. *Clin Oral Investig*, 10, 269-277

Agbaje, J.O., Salem, A.S., Lambrichts, I., Jacobs, R., Politis, C. (2014): Systematic review of the incidence of inferior alveolar nerve injury in bilateral sagittal split osteotomy and the assessment of neurosensory disturbances. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 44, 447-51

Anderson, L.C., Von Bartheld, C.S., Byers, M.R. (1998): NGF depletion reduces ipsilateral and contralateral trigeminal satellite cell reactions after inferior alveolar nerve injury in adult rats. *Exp Neurol*, 150, 312-320

Baatz, G., Berens Von Rautenfeld, D., Gillette, R.L. (2004): *Physikalische Therapie für Kleintiere, Parey Bei Mvs*, 2,

Barnett, J., Chow, J., Nguyen, B., Eggers, D., Osen, E., Jarnagin, K., Saldou, N., Straub, K., Gu, L., Erdos, L. (1991): Physicochemical characterization of recombinant human nerve growth factor produced in insect cells with a baculovirus vector. *J Neurochem*, 57, 1052-1061

Barras, F.M., Pasche, P., Bouche, N., Aebischer, P., Zurn, A.D. (2002): Glial cell line-derived neurotrophic factor released by synthetic guidance channels promotes facial nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res*, 70, 746-755

Basa, O., Dilek, O.C. (2010): Assessment of the risk of perforation of the mandibular canal by implant drill using density and thickness parameters. *Gerodontology*, 28, 213-220

Battiston, B., Tos, P., Cushway, T.R., Geuna, S. (2000a): Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results. *Microsurgery*, 20, 32-36

Battiston, B., Tos, P., Geuna, S., Giacobini-Robecchi, M.G., Guglielmone, R. (2000b): Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. II. Morphological analysis of regeneration. *Microsurgery*, 20, 37-41

Bischoff, C., Dengler, R., Hopf, H.C. (2014): EMG, NLG Elektromyografie, Nervenleitungsuntersuchungen, Thieme Verlag Stuttgart, 3

Blesch, A., Lu, P., Tuszynski, M.H. (2002): Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair. *Brain Res Bull*, 57, 833-838

Bocchini, V., Angeletti, P.U. (1969): The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 64, 787-794

Brenner, M.J., Tung, T.H., Jensen, J.N., Mackinnon, S.E. (2002): The spectrum of complications of immunosuppression: is the time right for hand transplantation? *J Bone Joint Surg Am*, 84-a, 1861-1870

Brooks, D.N., Weber, R.V., Chao, J.D., Rinker, B.D., Zoldos, J., Robichaux, M.R., Ruggeri, S.B., Anderson, K.A., Bonatz, E.E., Wisotsky, S.M., Cho, M.S., Wilson, C., Cooper, E.O., Ingari, J.V., Safa, B., Parrett, B.M., Buncke, G.M. (2011): Processed nerve allografts for peripheral nerve reconstruction: a multicenter study of utilization and outcomes in sensory, mixed, and motor nerve reconstructions. *Microsurgery*, 32, 1-14

Bruce, R.A., Frederickson, G.C., Small, G.S. (1980): Age of patients and morbidity associated with mandibular third molar surgery. *J Am Dent Assoc*, 101, 240-245

Brunelli, G.A., Battiston, B., Vigasio, A., Brunelli, G., Marocolo, D. (1993): Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits. *Microsurgery*, 14, 247-251

Burdick, J.A., Ward, M., Liang, E., Young, M.J., Langer, R. (2006): Stimulation of neurite outgrowth by neurotrophins delivered from degradable hydrogels. *Biomaterials*, 27, 452-459

Buxser, S., Vroegop, S., Decker, D., Hinzmann, J., Poorman, R., Thomsen, D.R., Stier, M., Abraham, I., Greenberg, B.D., Hatzenbuehler, N.T. (1991): Single-step purification and biological activity of human nerve growth factor produced from insect cells. *J Neurochem*, 56, 1012-1018

Calabria, F., Sellek, L., Gugole, F., Trevisiol, L., Bertolasi, L., D'agostino, A. (2013): The use of sensory action potential to evaluate inferior alveolar nerve damage after orthognathic surgery. *J Craniofac Surg*, 24, 514-517

Campenot, R.B. (1982): Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II Local control of neurite growth by nerve growth factor. *Dev Biol*, 93, 1-12

Cao, L., Werkmeister, J.A., Wang, J., Glattauer, V., Mclean, K.M., Liu, C. (2014): Bone regeneration using photocrosslinked hydrogel incorporating rhBMP-2 loaded 2-N, 6-O-sulfated chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 35, 2730-2742

Cheung, L.K., Leung, Y.Y., Chow, L.K., Wong, M.C., Chan, E.K., Fok, Y.H. (2010): Incidence of neurosensory deficits and recovery after lower third molar surgery: a prospective clinical study of 4338 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 39, 320-326

Chimutengwende-Gordon, M., Khan, W. (2012): Recent advances and developments in neural repair and regeneration for hand surgery. *Open Orthop J*, 6, 103-107

Chung, J.Y., Choi, J.H., Shin, I.S., Choi, E.W., Hwang, C.Y., Lee, S.K., Youn, H.Y. (2008): In vitro and in vivo gene therapy with CMV vector-mediated presumed dog beta-nerve growth factor in pyridoxine-induced neuropathy dogs. *J Vet Sci*, 9, 367-373

Ciardelli, G., Chiono, V. (2006): Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosci*, 6, 13-26

Cohen, S. (1960): Purification of a Nerve-Growth Promoting Protein from the mouse Salivary Gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 46, 302-311

Cornelius, C.P., Roser, M., Ehrenfeld, M. (1997): [Microneural reconstruction after iatrogenic lesions of the lingual nerve and the inferior alveolar nerve. Critical evaluation]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 1, 213-223

Dahlin, L.B. (2008): Techniques of peripheral nerve repair. *Scand J Surg*, 97, 310-316

De Boer, R., Borotraeger, A., Knight, A.M., Hebert-Blouin, M.N., Spinner, R.J., Malessy, M.J., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J. (2012): Short- and long-term peripheral nerve regeneration using a poly-lactic-co-glycolic-acid scaffold containing nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor releasing microspheres. *J Biomed Mater Res A*, 100, 2139-2146

De Boer, R., Knight, A.M., Spinner, R.J., Malessy, M.J., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J. (2010): In vitro and in vivo release of nerve growth factor from biodegradable poly-lactic-co-glycolic-acid microspheres. *J Biomed Mater Res A*, 95, 1067-1073

Dellon, A.L., Mackinnon, S.E. (1988): An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg*, 82, 849-856

Ding, T., Zhu, C., Yin, J., Zhang, T., Lu, Y., Ren, J., Li, Y. (2014): Slow-releasing rapamycin-coated bionic peripheral nerve scaffold promotes the regeneration of rat sciatic nerve after injury. *Life Sci*, 122, 92-99

Dornseifer, U., Fichter, A.M., Leichtle, S., Wilson, A., Rupp, A., Rodenacker, K., Ninkovic, M., Biemer, E., Machens, H.G., Matiasek, K., Papadopulos, N.A. (2011): Peripheral nerve reconstruction with collagen tubes filled with denatured autologous muscle tissue in the rat model. *Microsurgery*, 31, 632-641

Du Toit, J., Gluckman, H., Gamil, R., Renton, T. (2014): Implant Injury Case Series and Review of the Literature Part 1: Inferior alveolar nerve injury. *J Oral Implantol*, Epub ahead of Print

Du, Z.J., Wang, L., Lei, D.L., Liu, B.L., Cao, J., Zhang, P., Ma, Q. (2011): Nerve growth factor injected systemically improves the recovery of the inferior alveolar nerve in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 49, 557-561

Dumanian, G.A., McClinton, M.A., Brushart, T.M. (1999): The effects of free fat grafts on the stiffness of the rat sciatic nerve and perineural scar. *J Hand Surg Am*, 24, 30-36

Edgar, D., Timpl, R., Thoenen, H. (1984): The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J*, 3, 1463-1468

Fine, E.G., Decosterd, I., Papaloizos, M., Zurn, A.D., Aebischer, P. (2002): GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur J Neurosci*, 15, 589-601

Frostick, S.P., Yin, Q., Kemp, G.J. (1998): Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*, 18, 397-405

Fukuhara, T., Tsujimura, T., Kajii, Y., Yamamura, K., Inoue, M. (2011): Effects of electrical stimulation of the superior laryngeal nerve on the jaw-opening reflex. *Brain Res*, 1391, 44-53

Gehlen, W., Delank, H.-W. (2010): *Neurologie*, Thieme Verlag Stuttgart, 12, 121-123

Ghaemina, H., Meijer, G.J., Soehardi, A., Borstlap, W.A., Mulder, J., Berge, S.J. (2009): Position of the impacted third molar in relation to the mandibular canal.

Diagnostic accuracy of cone beam computed tomography compared with panoramic radiography. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 38, 964-971

Ghali, G.E., Jones, D.L., Wolford, L.M. (1990): Somatosensory evoked potential assessment of the inferior alveolar nerve following third molar extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 19, 18-21

Gill, G.G., Sakovich, L., Thompson, E. (1979): Pedicle fat grafts for the prevention of scar formation after laminectomy. An experimental study in dogs. *Spine (Phila Pa 1976)*, 4, 176-186

Giusti, G., Lee, J., Kremer, T., Friedrich, P., Bishop, A.T., Shin, A.Y. (2014): The influence of vascularization of transplanted processed allograft nerve on return of motor function in rats. *Microsurgery*, Epub ahead of print

Goldstein, L.D., Reynolds, C.P., Perez-Polo, J.R. (1978): Isolation of human nerve growth factor from placental tissue. *Neurochem Res*, 3, 175-183

Gordon, T., Sulaiman, O., Boyd, J.G. (2003): Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst*, 8, 236-250

Gundersen, R.W., Barrett, J.N. (1979): Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science*, 206, 1079-1080

Gundersen, R.W., Barrett, J.N. (1980): Characterization of the turning response of dorsal root neurites toward nerve growth factor. *J Cell Biol*, 87, 546-554

Harper, G.P., Barde, Y.A., Burnstock, G., Carstairs, J.R., Dennison, M.E., Suda, K., Vernon, C.A. (1979): Guinea pig prostate is a rich source of nerve growth factor. *Nature*, 279, 160-162

Harper, G.P., Glanville, R.W., Thoenen, H. (1982): The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma. Biochemical characterization and partial amino acid sequence. *J Biol Chem*, 257, 8541-8548

Harper, G.P., Thoenen, H. (1980): The distribution of nerve growth factor in the male sex organs of mammals. *J Neurochem*, 34, 893-903

Hausamen, J.-E., Reich, R., Hoffmeister, B. (2003): Differentialtherapie nach Läsionen des N. alveolaris inferior und N. lingualis

Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde. Zugriff unter: http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgmkddocuments/Nervschaedigung_-_Vorgehensweise_nach_Laesionen_der_sensiblen_Mandibularisaeste.pdf

Hausamen, J.E., Samii, M., Schmidseder, R. (1974): Restoring sensation to the cut inferior alveolar nerve by direct anastomosis or by free autologous nerve grafting. Experimental study in rabbits. *Plast Reconstr Surg*, 54, 83-87

Heine, J., Raethjen, S., Geuna, S., Käser, N., Hergt, A., Warnke, P.H., Wiltfang, J., St., B. (2010): In vivo-Modell für das Tissue Engineering peripherer Hirnnerven zur Überbrückung von Defekten des Nervus alveolaris inferior (IAN) mittels solider Gewebe in Büniger-Bändern. 60. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und 41. DÖSAK Jahrestagung. München

Hendry, I.A., Stockel, K., Thoenen, H., Iversen, L.L. (1974): The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res*, 68, 103-121

Hillerup, S. (2007): Iatrogenic injury to oral branches of the trigeminal nerve: records of 449 cases. *Clin Oral Investig*, 11, 133-142

Hood, B., Levene, H.B., Levi, A.D. (2009): Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects. *Neurosurg Focus*, 26, E4

Ignatiadis, I.A., Yiannakopoulos, C.K., Barbitsioti, A.D., Avram, A.M., Patralexis, H.G., Tsolakis, C.K., Papalois, A.E., Xenakis, T.H., Beris, A.E., Soucacos, P.N. (2007): Diverse types of epineural conduits for bridging short nerve defects. An experimental study in the rabbit. *Microsurgery*, 27, 98-104

Isaacs, J., Browne, T. (2014): Overcoming short gaps in peripheral nerve repair: conduits and human acellular nerve allograft. *Hand (N Y)*, 9, 131-137

Iwakura, N., Ohtori, S., Kenmoku, T., Suzuki, T., Takahashi, K., Kuniyoshi, K. (2012): Single versus double end-to-side nerve grafts in rats. *J Hand Surg Am*, 37, 261-269

Iwane, M., Kitamura, Y., Kaisho, Y., Yoshimura, K., Shintani, A., Sasada, R., Nakagawa, S., Kawahara, K., Nakahama, K., Kakinuma, A. (1990): Production, purification and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 171, 116-122

Jacobs, R.R., McClain, O., Neff, J. (1980): Control of postlaminectomy scar formation: an experimental and clinical study. *Spine (Phila Pa 1976)*, 5, 223-229

Jessen, K.R., Mirsky, R. (1999): Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci*, 22, 402-410

Jing, S., Tapley, P., Barbacid, M. (1992): Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron*, 9, 1067-1079

Jones, D.L., Wolford, L.M., Hartog, J.M. (1990): Comparison of methods to assess neurosensory alterations following orthognathic surgery. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg*, 5, 35-42

Jones, R.H. (2010): Repair of the trigeminal nerve: a review. *Aust Dent J*, 55, 112-119

Kanaya, E., Higashizaki, T., Ozawa, F., Hirai, K., Nishizawa, M., Tokunaga, M., Tsukui, H., Hatanaka, H., Hishinuma, F. (1989): Synthesis and secretion of human nerve growth factor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 83, 65-74

Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., Parada, L.F. (1991a): The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, 252, 554-558

Kaplan, D.R., Martin-Zanca, D., Parada, L.F. (1991b): Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*, 350, 158-160

Kiryukhin, M.V. (2014): Active drug release systems: current status, applications and perspectives. *Curr Opin Pharmacol*, 18c, 69-75

Kiviluoto, O. (1976): Use of free fat transplants to prevent epidural scar formation. An experimental study. *Acta Orthop Scand Suppl*, 47, 3-75

Kiyotani, T., Teramachi, M., Takimoto, Y., Nakamura, T., Shimizu, Y., Endo, K. (1996): Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res*, 740, 66-74

Konofaos, P., Ver Halen, J.P. (2013): Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *J Reconstr Microsurg*, 29, 149-164

Lee, A.C., Yu, V.M., Lowe, J.B., Brenner, M.J., Hunter, D.A., Mackinnon, S.E., Sakiyama-Elbert, S.E. (2003): Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Experimental Neurology*, 184, 295-303

Levi-Montalcini, R. (1976): The nerve growth factor: its role in growth, differentiation and function of the sympathetic adrenergic neuron. *Prog Brain Res*, 45, 235-258

Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. (1951): Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*, 116, 321-361

Li, B.H., Kim, S.M., Yoo, S.B., Kim, M.J., Jahng, J.W., Lee, J.H. (2012): Recombinant human nerve growth factor (rhNGF-beta) gene transfer promotes regeneration of crush-injured mental nerve in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 113, e26-34

Lindsay, R.M. (1996): Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 351, 365-373

Lundborg, G., Dahlin, L., Danielsen, N., Zhao, Q. (1994): Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J reconstr Microsurg*, 10, 345-354

Lutz, B.S. (2004): The role of a barrier between two nerve fascicles in adjacency after transection and repair of a peripheral nerve trunk. *Neurol Res*, 26, 363-370

Lutz, B.S., Ma, S.F., Chuang, D.C., Chan, K.H., Wei, F.C. (2001): Interposition of a pedicle fat flap significantly improves specificity of reinnervation and motor recovery after repair of transected nerves in adjacency in rats. *Plast Reconstr Surg*, 107, 116-123

Mackinnon, S.E., Dellon, A.L., Hudson, A.R., Hunter, D.A. (1984): Chronic nerve compression--an experimental model in the rat. *Ann Plast Surg*, 13, 112-120

Marquardt, P., Witkowski, S., Strub, J. (2007): Three-dimensional navigation in implant dentistry. *Eur J Esthet Dent*, 2, 80-98

Martin-Palma, R.J., Hernandez-Montelongo, J., Torres-Costa, V., Manso-Silvan, M., Munoz-Noval, A. (2014): Nanostructured porous silicon-mediated drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 11, 1273-1283

Marx, R.E., Stern, D. (2003): *Oral and Maxillofacial Pathology. A rationale for diagnosis and treatment*, Quintessence Publishing, Berlin, 1, 395-419

- Mcclinton, M.A. (1996): The use of dermal-fat grafts. *Hand Clin*, 12, 357-364
- Meek, M.F., Van Der Werff, J.F.A., Nicolai, J.-P.A., Gramsbergen, A. (2001): Biodegradable p(DLLA- ϵ -CL) nerve guides versus autologous nerve grafts: Electromyographic and video analysis. *Muscle & Nerve*, 24, 753-759
- Meek, M.F., Varejao, A.S., Geuna, S. (2004): Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: review of the literature. *Tissue Eng*, 10, 1027-1036
- Melzack, R., Wall, P.D. (1965): Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150, 971-979
- Miloro, M., Stoner, J.A. (2005): Subjective outcomes following sural nerve harvest. *J Oral Maxillofac Surg*, 63, 1150-1154
- Mohler, L.R., Hanel, D.P. (2006): Closed fractures complicated by peripheral nerve injury. *J Am Acad Orthop Surg*, 14, 32-37
- Müller-Vahl, H., Mumenthaler, M., Schliack, M., Tegenthoff, M. (2014): Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome, Thieme Verlag Stuttgart, 10, 66
- Nakamura, T., Inada, Y., Fukuda, S., Yoshitani, M., Nakada, A., Itoi, S.-I., Kanemaru, S.-I., Endo, K., Shimizu, Y. (2004): Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid collagen (PGA collagen) tube. *Brain Research*, 1027, 18-29
- Obermeier, A., Bradshaw, R.A., Seedorf, K., Choidas, A., Schlessinger, J., Ullrich, A. (1994): Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *EMBO J*, 13, 1585-1590
- Oppenheim, R.W. (1991): Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 14, 453-501
- Ornelas, L., Padilla, L., Di Silvio, M., Schalch, P., Esperante, S., Infante, R.L., Bustamante, J.C., Avalos, P., Varela, D., Lopez, M. (2006): Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part II. Nerve regeneration and histomorphometric assessment. *J Reconstr Microsurg*, 22, 123-128
- Otto, D., Unsicker, K., Grothe, C. (1987): Pharmacological effects of nerve growth factor and fibroblast growth factor applied to the transected sciatic nerve on neuron death in adult rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett*, 83, 156-160

Pereira, J.H., Bowden, R.E., Gattuso, J.M., Norris, R.W. (1991a): Comparison of results of repair of digital nerves by denatured muscle grafts and end-to-end sutures. *J Hand Surg Br*, 16, 519-523

Pereira, J.H., Palande, D.D., Subramanian, A., Narayanakumar, T.S., Curtis, J., Turk, J.L. (1991b): Denatured autologous muscle graft in leprosy. *Lancet*, 338, 1239-1240

Pfister, L.A., Alther, E., Papaloizos, M., Merkle, H.P., Gander, B. (2008): Controlled nerve growth factor release from multi-ply alginate/chitosan-based nerve conduits. *Eur J Pharm Biopharm*, 69, 563-572

Pfister, L.A., Papaloizos, M., Merkle, H.P., Gander, B. (2007): Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. *J Peripher Nerv Syst*, 12, 65-82

Pitta, M.C., Wolford, L.M., Mehra, P., Hopkin, J. (2001): Use of Gore-Tex tubing as a conduit for inferior alveolar and lingual nerve repair: experience with 6 cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 59, 493-497

Pogrel, M.A. (2002): The results of microneurosurgery of the inferior alveolar and lingual nerve. *J Oral Maxillofac Surg*, 60, 485-489

Pogrel, M.A., Jergensen, R., Burgon, E., Hulme, D. (2011): Long-term outcome of trigeminal nerve injuries related to dental treatment. *J Oral Maxillofac Surg*, 69, 2284-2288

Pollock, M. (1995): Nerve regeneration. *Curr Opin Neurol*, 8, 354-358

Poort, L.J., Van Neck, J.W., Van Der Wal, K.G. (2009): Sensory testing of inferior alveolar nerve injuries: a review of methods used in prospective studies. *J Oral Maxillofac Surg*, 67, 292-300

Püschel, G.P., Kühn, H., Kietzmann, T., Höhne, W., Christ, B., Koolmann, J. (2011): *Taschenlehrbuch Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1, 513

Qi, F., Wu, J., Fan, Q., He, F., Tian, G., Yang, T., Ma, G., Su, Z. (2013): Preparation of uniform-sized exenatide-loaded PLGA microspheres as long-effective release system with high encapsulation efficiency and bio-stability. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 112, 492-498

Ramasamy, I., Law, M., Collins, S., Brooke, F. (2003): Organ distribution of prion proteins in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Infect Dis*, 3, 214-222

Rath, E.M. (2002): Skeletal muscle autograft for repair of the human inferior alveolar nerve: a case report. *J Oral Maxillofac Surg*, 60, 330-334

Renton, T., Thexton, A., MCGurk, M. (2005): Objective evaluation of iatrogenic lingual nerve injuries using the jaw-opening reflex. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 43, 232-237

Rich, K.M., Alexander, T.D., Pryor, J.C., Hollowell, J.P. (1989): Nerve growth factor enhances regeneration through silicone chambers. *Exp Neurol*, 105, 162-170

Richner, M., Ulrichsen, M., Elmegaard, S.L., Dieu, R., Pallesen, L.T., Vaegter, C.B. (2014): Peripheral Nerve Injury Modulates Neurotrophin Signaling in the Peripheral and Central Nervous System. *Mol Neurobiol*, 50, 945-70

Robert, R.C., Bacchetti, P., Pogrel, M.A. (2005): Frequency of trigeminal nerve injuries following third molar removal. *J Oral Maxillofac Surg*, 63, 732-736

Romagnoli, C., D'asta, F., Brandi, M.L. (2013): Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 10, 155-161

Rustemeyer, J., Dicke, U. (2010): Prefabricated nerve conduits advance histomorphological and functional outcomes in nerve regeneration of the sciatic nerve of the rat. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 39, 889-896

Sahakyants, T., Lee, J.Y., Friedrich, P.F., Bishop, A.T., Shin, A.Y. (2013): Return of motor function after repair of a 3-cm gap in a rabbit peroneal nerve: a comparison of autograft, collagen conduit, and conduit filled with collagen-GAG matrix. *J Bone Joint Surg Am*, 95, 1952-1958

Saika, T., Senba, E., Noguchi, K., Sato, M., Yoshida, S., Kubo, T., Matsunaga, T., Tohyama, M. (1991): Effects of nerve crush and transection on mRNA levels for nerve growth factor receptor in the rat facial motoneurons. *Brain Res Mol Brain Res*, 9, 157-160

Sakiyama-Elbert, S.E., Hubbell, J.A. (2000): Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix. *J Control Release*, 69, 149-158

Saracino, G.A., Cigognini, D., Silva, D., Caprini, A., Gelain, F. (2012): Nanomaterials design and tests for neural tissue engineering. *Chem Soc Rev*, 42, 225-262

Saracino, G.A., Cigognini, D., Silva, D., Caprini, A., Gelain, F. (2013): Nanomaterials design and tests for neural tissue engineering. *Chem Soc Rev*, 42, 225-262

Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., Van Der Geer, P. (1994): Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 372, 786-791

Scholz, T., Rogers, J.M., Krichevsky, A., Dhar, S., Evans, G.R. (2010): Inducible nerve growth factor delivery for peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast Reconstr Surg*, 126, 1874-1889

Schultze-Mosgau, S., Reich, R.H. (1993): Assessment of inferior alveolar and lingual nerve disturbances after dentoalveolar surgery, and of recovery of sensitivity. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 22, 214-217

Selzer, M., Clarke, S., Cohen, L., Duncan, P., Gage, F. (2014): *Textbook of Neural Repair and Rehabilitation*, Cambridge University Press Cambridge, 2, 400-401

Smith, A.P., Varon, S., Shooter, E.M. (1968): Multiple forms of the nerve growth factor protein and its subunits. *Biochemistry*, 7, 3259-3268

Stockel, K., Paravicini, U., Thoenen, H. (1974): Specificity of the retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res*, 76, 413-421

Strauch, B., Rodriguez, D.M., Diaz, J., Yu, H.L., Kaplan, G., Weinstein, D.E. (2001): Autologous Schwann cells drive regeneration through a 6-cm autogenous venous nerve conduit. *J reconstr Microsurg*, 17, 589-595

Sunderland, S. (1990): The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve*, 13, 771-784

Takasaki, Y., Noma, H., Kitami, T., Shibahara, T., Sasaki, K. (2003): Reconstruction of the inferior alveolar nerve by autologous graft: retrospective study of 20 cases examining donor nerve length. *Bull Tokyo Dent Coll*, 44, 29-35

Tatard, V.M., Venier-Julienne, M.C., Saulnier, P., Prechter, E., Benoit, J.P., Menei, P., Montero-Menei, C.N. (2005): Pharmacologically active microcarriers: a tool for cell therapy. *Biomaterials*, 26, 3727-3737

Tay, A.B., Zuniga, J.R. (2007): Clinical characteristics of trigeminal nerve injury referrals to a university centre. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 36, 922-927

Thanos, P.K., Okajima, S., Terzis, J.K. (1998): Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration. *J reconstr Microsurg*, 14, 423-436

Tzou, C.H., Aszmann, O.C., Frey, M. (2011): Bridging peripheral nerve defects using a single-fascicle nerve graft. *Plast Reconstr Surg*, 128, 861-869

Ullrich, A., Gray, A., Berman, C., Dull, T.J. (1983): Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature*, 303, 821-825

Valmaseda-Castellon, E., Berini-Aytes, L., Gay-Escoda, C. (2001): Inferior alveolar nerve damage after lower third molar surgical extraction: a prospective study of 1117 surgical extractions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 92, 377-383

Van Akkerveeken, P.F., Van De Kraan, W., Muller, J.W. (1986): The fate of the free fat graft. A prospective clinical study using CT scanning. *Spine (Phila Pa 1976)*, 11, 501-504

Vigentini, I., Merico, A., Tutino, M.L., Compagno, C., Marino, G. (2006): Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J Biotechnol*, 127, 141-150

Von Büngner, O. (1890): Über die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen, *Universität Marburg*, 3, 165-237

Wallach, F., Richou, J., Genestet, M., Le Nen, D. (2008): [Free dermal fat graft for coverage of the median nerve following failed carpal tunnel release]. *Chir Main*, 27, 208-215

Wang, L., Zhao, Y., Cheng, X., Yang, Y., Liu, G., Ma, Q., Shang, H., Tian, L., Lei, D. (2009): Effects of locally applied nerve growth factor to the inferior alveolar nerve histology in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 38, 64-69

Wang, Z., Han, N., Wang, J., Zheng, H., Peng, J., Kou, Y., Xu, C., An, S., Yin, X., Zhang, P., Jiang, B. (2014): Improved peripheral nerve regeneration with sustained release nerve growth factor microspheres in small gap tubulization. *Am J Transl Res*, 6, 413-421

Weber, R.A., Breidenbach, W.C., Brown, R.E., Jabaley, M.E., Mass, D.P. (2000): A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. *Plast Reconstr Surg*, 106, 1036-1045

Whitlock, E.L., Kasukurthi, R., Yan, Y., Tung, T.H., Hunter, D.A., Mackinnon, S.E. (2012): Fibrin glue mitigates the learning curve of microneurosurgical repair. *Microsurgery*, 30, 218-222

Wolford, L.M., Stevao, E.L. (2003): Considerations in nerve repair. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 16, 152-156

Yates, J.M., Smith, K.G., Robinson, P.P. (2004): The effect of brain-derived neurotrophic factor on sensory and autonomic function after lingual nerve repair. *Exp Neurol*, 190, 495-505

Yoshitani, M., Fukuda, S., Itoi, S., Morino, S., Tao, H., Nakada, A., Inada, Y., Endo, K., Nakamura, T. (2007): Experimental repair of phrenic nerve using a polyglycolic acid and collagen tube. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 133, 726-732

Zhang, F., Blain, B., Beck, J., Zhang, J., Chen, Z., Chen, Z.W., Lineaweaver, W.C. (2002): Autogenous venous graft with one-stage prepared Schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects. *J reconstr Microsurg*, 18, 295-300

Zuniga, J.R. (2009): Management of third molar-related nerve injuries: observe or treat? *Alpha Omegan*, 102, 79-84

Zuniga, J.R., Meyer, R.A., Gregg, J.M., Miloro, M., Davis, L.F. (1998): The accuracy of clinical neurosensory testing for nerve injury diagnosis. *J Oral Maxillofac Surg*, 56, 2-8

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang (Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die umfassende Betreuung und Unterstützung, insbesondere in der problematischen Phase bei der Anfertigung dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich für die Bereitstellung der Arbeitsmittel und des Umfeldes zur Durchführung der vorliegenden Studie bedanken.

Herrn PD Dr. Dr. S. Becker danke ich herzlich für sein großes Engagement und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Dr. J. Heine für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Anfertigung der Arbeit sowie die umfangreichen Anmerkungen und Korrekturen bedanken.

Herrn PD Dr. Konietschke, Frau Dr. Dr. B. Beck-Broichsitter und Herrn Dr. D. Christofzik danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung der Statistik.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Dr. B. Beck-Broichsitter auch für die vielen Ratschläge und Anmerkungen beim Abfassen der Arbeit.

Meinem Kollegen und Freund Dr. D. Christofzik danke ich besonders für seine Hilfe. Bei Fragen konnte ich mich immer an dich wenden.

Des Weiteren danke ich meinen Göttinger Freunden und Kollegen Herrn Prof. Dr. M. Hülsmann, Herrn PD Dr. D. Ziebolz, Herrn Dr. Holscher, Frau Dr. Kupis, Herrn Dr. Hausdörfer, Herrn ZA Bierbaum und Frau Dr. Choi für Ihre Ratschläge und Hilfestellungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Lea für die tatkräftige und liebevolle Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich jederzeit unterstützt und aufgemuntert haben. Ein großer Dank gilt hierbei meinen Eltern, die

mir während des Studiums und der Promotion den nötigen Freiraum geschaffen haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Ansgar Christian Hergt

Geburtsdatum: 28.07.1985

Geburtsort: Templin

Schulbildung:

1992 – 1998 Grundschule Templin

1998 – 2002 Gymnasium Templin

2002-2004 Privates Internatsgymnasium "Schloss Torgelow"

2004 Allgemeine Hochschulreife

2004 und 2005 Auslandsaufenthalt in Winchester (England) (Sprachschule)

Studium:

10/2005 – 12/2010 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

12/2010 Approbation

Anstellung:

seit 04/2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Poliklinik für Präventive Zahnmedizin, Kariologie und Parodontologie der Universitätsmedizin Göttingen (Prof. Dr. A. Wiegand)

Wissenschaft:

seit 2012 Promotionsarbeit an der Klinik für Mund-,Kiefer- und Gesichtschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Publikationen:

2013: Hergt A: Die intraligamentäre Anästhesie in der Endodontie, Endodontie 2013

Hergt A, Hülsmann M: Wurzelkanalfüllmaterialien und Allergien, Endodontie 2013

2014: Hergt A: Osteoradionekrose, Endodontie 2014

Hergt A, Kirchner B: Osteoradionekrose. Ein Fallbericht, Endodontie 2014

Hergt A C, Heine, J, Becker S T, Raethjen J, Deuschl G, Geuna S, Konietschke F, Reinhardt A, Gaßling V, Sinis N, Kallenbach K, Warnke P, Wiltfang J: Tierexperimentelle Studie zur in-situ Regeneration von Defekten des Nervus alveolaris inferior (IAN) mittels artifizieller Büngner Bänder, 64. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie & 35. Jahrestagung des Arbeitskreises für Oralpathologie und Oralmedizin, Bad Homburg 2014