

Aus dem Institut für Anatomie II: Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Beeinflusst das spezifische Immunsystem die Regeneration im Rückenmark?

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Daniel Rundt
aus Münster/Westfalen

Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 29.10.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Schachner

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. E. Yekebas

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
3	Material und Methoden	6
3.1	Tierexperimenteller Anteil.....	6
3.1.1	Tierzucht	6
3.1.2	Operation	6
3.2	Histologie	7
3.3	Morphologie	8
3.4	Routinefärbungen.....	10
3.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	10
3.4.2	Kresyl-Violett- Färbung nach Nissl	11
3.4.3	Kombinierte Elastika van Gieson-Färbung.....	11
3.4.4	Masson Goldner-Färbung	11
3.5	Immunhistochemische Färbungen	12
3.5.1	Antikörper gegen extrazelluläre Matrix-Proteine	12
3.5.2	Antikörper gegen Makroglia	14
3.5.3	Antikörper gegen neuronale und axonale Strukturen.....	15
3.6	Methodische Voruntersuchungen.....	15
3.7	Verwendete Lösungen und Materialien.....	17
4	Ergebnisse	19
4.1	Morphologie	19
4.1.1	Morphologie des unverletzten Rückenmarks bei der Wildtyp BALB/c Maus.....	19
4.1.2	Morphologie des unverletzten Rückenmarks bei der scid Maus	22
4.2	Allgemeine zelluläre und inflammatorische Reaktion auf die Läsion bei der Wildtyp BALB/c Maus.....	23
4.2.1	Erster postoperativer Tag BALB/c Maus	23
4.2.2	Dritter postoperativer Tag BALB/c Wildtyp.....	26
4.2.3	Siebter postoperativer Tag BALB/c Wildtyp	30
4.2.4	Vierzehnter postoperativer Tag BALB/c Wildtyp	33
4.3	Allgemeine zelluläre und inflammatorische Reaktion auf die Läsion bei der scid Maus	36
4.3.1	Erster postoperativer Tag scid Maus	36
4.3.2	Dritter postoperativer Tag scid Maus	39
4.3.3	Siebter postoperativer Tag scid Maus.....	41
4.3.4	Vierzehnter postoperativer Tag scid Maus.....	43
4.4	Extrazelluläres Matrixprotein Laminin.....	45
4.4.1	Morphologie der anti-Laminin-Färbung am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus	45
4.4.2	Morphologie der anti-Laminin-Färbung am Rückenmark der unverletzten scid Maus.....	46
4.4.3	Anti-Laminin-Färbung in der BALB/c Maus nach Läsion.....	46
4.4.4	Anti-Laminin Färbung in der scid Maus nach Läsion	49
4.5	Extrazelluläres Matrixprotein Kollagen Typ IV	52
4.5.1	Morphologie der anti-Kollagen Typ IV-Färbung am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus	52
4.5.2	Morphologie der anti-Kollagen Typ IV-Färbung am Rückenmark der unverletzten scid Maus.....	52
4.5.3	Anti-Kollagen Typ IV-Färbung in der BALB/c Maus	52

4.5.4	Anti-Kollagen Typ IV-Färbung in der scid Maus.....	55
4.6	Makroglia.....	57
4.6.1	Morphologie der Astrozyten am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus in der anti-GFAP-Färbung	57
4.6.2	Morphologie der Astrozyten am Rückenmark der unverletzten scid Maus in der anti-GFAP-Färbung	58
4.6.3	Anti-GFAP-Färbung in der BALB/c Maus.....	58
4.6.4	Anti-GFAP Färbung in der scid Maus	64
4.6.5	Morphologie der Oligodendrozyten am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus in der anti-CNPase-Färbung.....	68
4.6.6	Morphologie der Oligodendrozyten am Rückenmark der unverletzten scid Maus in der anti-CNPase-Färbung	68
4.6.7	Anti-CNPase-Färbung in der BALB/c Maus	69
4.6.8	Anti-CNPase Färbung in der scid Maus.....	75
4.7	Neuronale Strukturen	79
4.7.1	Morphologie der Axone am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus in der anti-Neurofilament 200-Färbung.....	79
4.7.2	Morphologie der Axone am Rückenmark der unverletzten scid Maus in der anti-Neurofilament 200 Färbung.....	80
4.7.3	Anti-Neurofilament-200 Färbung in der BALB/c Maus	80
4.7.4	Anti-Neurofilament 200 Färbung in der scid Maus.....	88
4.7.5	Morphologie der Neurone und Axone am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus in der anti-PGP 9.5-Färbung	95
4.7.6	Morphologie der Neurone und Axone am Rückenmark der unverletzten scid Maus in der anti-PGP 9.5-Färbung.....	96
4.7.7	Anti-PGP 9.5-Färbung in der BALB/c Maus.....	96
4.7.8	Anti-PGP 9.5 Färbung in der scid Maus.....	101
5	Diskussion	104
5.1	Kontrolltier BALB/c Wildtyp Maus	104
5.1.1	Allgemeine Reaktion auf Verletzung des Rückenmarks	104
5.1.2	Makroglia.....	104
5.1.3	Extrazelluläre Matrixproteine.....	106
5.1.4	Neurone und Axone	107
5.1.5	Reaktion des Immunsystems auf Verletzung des Rückenmarks	108
5.2	scid Maus	109
5.2.1	Allgemeine Reaktion auf Verletzung des Rückenmarks	109
5.2.2	Reaktion des Immunsystems auf Verletzung des Rückenmarks	109
5.2.3	Reaktion zentraler Neurone und Axone auf Verletzung des Rückenmarks	110
6	Zusammenfassung.....	112
7	Literaturverzeichnis	113
8	Danksagung.....	123
9	Lebenslauf	124
10	Erklärung	125

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Nach traumatischer Verletzung des Rückenmarks bleibt bei betroffenen Patienten eine lebenslange sensorische und/oder motorische Funktionseinschränkung zurück, da eine Regeneration der langen auf- und absteigenden Bahnen im Rückenmark nicht erfolgt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist, den zeitlichen Ablauf nach einer Hemitranssektion des Rückenmarks auf zellulärer Ebene in einem Mausmodell der Rückenmarksläsion zu charakterisieren. Da bei regenerativen Prozessen im Rückenmark das Immunsystem eine funktionelle Rolle spielen soll, werden in dieser Arbeit das regenerative Potential der angeborenen immunsupprimierten severe combined immunodeficiency (scid) Maus mit ihrem immunkompetenten Wildtyp BALB/c verglichen.

Folgende Fragen sollen im Einzelnen geklärt werden:

- Wie verhalten sich die ortsständigen Zellen des Rückenmarks nach traumatischer Verletzung?
- Welche Reaktion zeigen die ortsständigen Zellen des Rückenmarks nach traumatischer Verletzung im zeitlichen Ablauf?
- Wie verhalten sich die Zellen des spezifischen und des unspezifischen Immunsystems nach traumatischer Verletzung des Rückenmarks?
- Welche Reaktion zeigen die Zellen des spezifischen und des unspezifischen Immunsystems nach traumatischer Verletzung des Rückenmarks im zeitlichen Ablauf?
- Beeinflusst eine fehlende spezifische Immunantwort die Reaktion der ortsständigen Zellen des Rückenmarks nach traumatischer Verletzung?
- Fördert eine fehlende spezifische Immunantwort die Regenerationsfähigkeit zentraler Neurone und dessen Axone im Rückenmark nach traumatischer Verletzung?

2 Einleitung

Allein in Deutschland erleiden jährlich etwa 1800 Menschen eine traumatische Querschnittslähmung (McKay et al. 1997). Vergleichsweise dazu ist die Inzidenz in den USA, vor allem bedingt um den Anteil der dort häufigeren Schussverletzungen, auf ca. 10000 Fälle pro Jahr erhöht (DeVivo et al. 1997). Etwa 40 Prozent der Patienten haben als Folge eine Tetra-, 60 Prozent eine Paraplegie. Bei wiederum 60 Prozent ist die Lähmung in unterschiedlichem Ausmaß sensorisch und/oder motorisch inkomplett (Schwab et al. 2004). Ohne adäquate Therapie lag die Überlebensrate bei einer akuten traumatischen Querschnittslähmung bis zum Beginn des Zweiten Weltkrieges bei unter 5 Prozent. Bis Mitte der 1970er Jahre bestand die Behandlungsstrategie in zumeist konservativer Frakturausheilung und den damit verbundenen Komplikationen aufgrund der bis zu 12 Wochen langen Liegezeiten. Seit Beginn der 1980er Jahre haben sich moderne Osteosyntheseverfahren an der Wirbelsäule mit weitgehend anatomischer Rekonstruktion der knöchernen Strukturen und früher Mobilisation mit weiterführender Rehabilitation etabliert, so dass heute die Überlebensrate nach akuter Rückenmarksschädigung bei über 95 Prozent liegt (Schwab et al. 2004). Ein großer Teil der Rückenmarksverletzten kann in ein weitgehend selbständiges Leben zurückkehren, behält jedoch aufgrund der Rückenmarksschädigung ein lebenslanges Handicap.

Pathophysiologisch kommt es im Rahmen eines akuten Rückenmarkstraumas zu einer lokalen Schädigung des Rückenmarks durch Axonzerreissung oder Axonquetschung mit nachfolgender Einblutung, Ischämie und Ödembildung (Tator et al. 1995). Folge dieser Schädigung ist der Untergang von Neuronen und Gliazellen. Deafferierte Axonstümpfe retrahieren, bilden sogenannte „retraction bulbs“, während die distalen Axonenden im Sinne der Wallerschen Degeneration (nach A. Waller, 1850) zugrunde gehen. Zentral in der Verletzung gelegen bildet sich die Syrinx, eine Pseudozyste, um die sich die beginnende Narbe aus reaktiven Astrozyten, Fibroblasten und aktivierter Mikroglia, sowie extrazellulären Anteilen wie Laminin und Kollagen bildet (Stichel et al. 1998, Fawcett 1999, Grimpe et al. 2002). Propagiert wird ein Sekundärschaden durch wechselseitige läsionale Phänomene wie Exotoxizität, Ödembildung, Radikalbildung und Entzündung. Die Entzündung setzt sich aus der aktivierten ortsständigen Mikroglia, sowie aus den durch die defekte Bluthirnschranke eingewanderten Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten

zusammen (Schwab et al. 1996). Diese Zellen sezernieren eine Reihe von Chemoattraktoren, die zu einer Lymphozytenakkumulation in der Läsion führen (Fitch und Silver et al. 1997).

Die Abwehrlage im Zentralnervensystem (ZNS) unterscheidet sich grundsätzlich von den Gegebenheiten im übrigen Körper, da zentralnervöse Neurone vom Blutgefäßsystem durch die Bluthirnschranke getrennt sind. Abwehrzellen des Blutes wie beispielsweise Makrophagen oder Lymphozyten treten nur langsam und in sehr geringer Anzahl in das gesunde ZNS über (Hickey et al. 1991, Lawson et al. 1992, Lassmann et al. 1993). Nach Verletzung des ZNS ist die mechanische Barriere der Bluthirnschranke jedoch zerstört, so dass es zu einer Einwanderung von Entzündungszellen in die Läsion kommt (Perry et al. 1987, Andersson et al. 1991).

Grundsätzlich sind die Axone von adulten Neuronen im Zentralnervensystem in der Lage nach Verletzung wiederauszusprossen, allerdings nur für kurze Zeit (Schwab et al. 1996), welches durch den schnellen Kontakt mit der sich in der Läsion bildenden inhibitorischen Umgebung bedingt ist. Diese besteht aus der mechanischen Komponente der sich bildenden Narbe (Stichel et al. 1998, Fawcett 1999) und verschiedenen chemischen Inhibitoren wie das Myelin (Schwab et al. 1988) und die darin befindlichen myelin-assoziierten Inhibitoren (Caropi et al. 1988, Chen et al. 2000, GrandPre et al. 2000, Prinjha et al. 2000) und in der Narbe verankerten Proteinen (Davies et al. 1997). Dazu zählen das NOGO-A (Huber und Schwab 2000, Chen et al. 2000), als erster beschriebener Inhibitor, desweiteren das Myelin-assoziierte-Glycoprotein (MAG, Filbin et al. 1995), Chondroitin Sulfat Proteoglykane (CSPG) und Teascin-C und -R (Faissner 1997, Fawcett 1997, Becker et al. 2000), sowie die Guidance-Moleküle Ephrin-B3 (Miranda et al. 1999) und die Semaphorine der Klasse 3 (Grimpe et al. 2002, De Winter et al. 2002).

Aber auch den Zellen des Immunsystems, die nach Verletzung des Rückenmarks in die Läsion und das umliegende Gewebe einwandern, werden sowohl regenerationsfördernde, als auch inhibitorische Eigenschaften zugesprochen (Lotan und Schwartz 1994, Merrill und Jonakait 1995). So zeigten aktiviererte Makrophagen neben der neuroprotektiven, antiexzitatorischen Eigenschaft (David et al. 1990), eine Myelin-Inhibition und eine daraus resultierende Förderung der Axonregeneration (Rapalino et al. 1998, Gras et al. 2003). Durch die Produktion von

Nervenwachstumsfaktor (NGF) fördern Makrophagen zusätzlich das Aussprossen von Axonen (Heumann et al. 1987).

Im Gegensatz zu den Makrophagen scheint das lymphatische System die Nervenzellregeneration aber eher zu hemmen (Teichner et al. 1993). Nach Läsion des ZNS kommt es zu einer massiven Immunreaktion gegen ZNS-eigene Eiweißbestandteile (Palladini et al. 1987, Kelly et al. 1988). Für die Immunreaktion verantwortlich sind B- und T-Lymphozyten, wobei B-Lymphozyten für die Immunglobulinproduktion verantwortlich sind, während T-Lymphozyten für die zellgebundene Immunantwort (zytotoxische T-Zellen) und die Regulation der Immunantwort (T-Helfer-Zellen) verantwortlich sind. Durch Hemmung der T-Helfer-Zellfunktion, beispielsweise durch das Medikament Cyclosporin A, konnte die Regenerationsfähigkeit im ZNS entscheidend verbessert werden (Ryba et al. 1992, Teichner et al. 1993).

Diesen Befunden widerspricht die Tatsache, dass Lymphozyten durch ihre Produktion von Antithrombin 3 und somit durch die Inhibition von Thrombin, auch eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen werden konnte, da Thrombin konzentrationsabhängig neurotoxisch wirkt (Schori et al. 2001, Schwartz et al. 2003). Auch die zuweilen umstrittene hochdosierte Gabe von Methylprednisolon in der Frühphase nach einer Rückenmarksläsion, wie sie in den USA flächendeckend angewandt wird, wirkt immunsupprimierend, mit dem Ziel, das zytotoxische Ödem, die Entzündung, sowie die Radikalbildung zu beeinflussen (Bracken et al. 1992, Short et al. 2000). Auch für Zyklooxygenasehemmer (COX-Hemmer) ist eine glia- und neuroprotektive Wirkung bei der Anwendung nach einer akuten Rückenmarksschädigung nachgewiesen. Auch die Reduktion des Sekundärschadens durch COX-Hemmer, unter anderem durch Radikalreduktion, konnte belegt werden (Schwab et al. 2000, Hurlbert et al. 2001).

Die Unterbindung der spezifischen Entzündungsreaktion durch Immunsuppression der Lymphozyten, sowie eine intakte, unspezifische Inflammation durch Makrophagen, stellt somit eine gute Möglichkeit dar, das regenerative Potential des Körpers nach einer traumatischen Rückenmarksverletzung zu erhöhen.

Die severe combined immunodeficiency (scid) Maus erfüllt genau diese Voraussetzungen der Immunsuppression aufgrund eines angeborenen Immundefekts und bedarf keiner immunsuppressiven medikamentösen Therapie.

Sie stellt ein Ideales Modell zur Analyse des Einflusses des Immunsystems auf die Regenerationsfähigkeit neuronaler Strukturen im Bereich des Rückenmarks nach traumatischer Läsion dar.

Die scid Maus ist aus einer spontan aufgetretenen scid-Mutation in einer pathogenfrei gehaltenen C.B-17 Mäusekolonie, einem BALB/c-Stamm, hervorgegangen und wurde von Bosma et al. (1983) erstbeschrieben. Die scid-Mutation ist auf Chromosom 16 lokalisiert (Bosma et al. 1989) und wird durch einen VDJ-Rekombinase-Defekt (Variable-, Diversity-, Joining-gene) in scid-Lymphozyten (Bosma und Carroll 1991) hervorgerufen. Diese Gene sind wichtig für die Codesequenzenbildung der variablen Regionen der Immunglobuline und der T-Zell-Rezeptoren (Bosma und Carroll 1991). Dieser Defekt führt zu einer fehlerhaften Verknüpfung von VDJ und VJ Sequenzen in der frühen Differenzierungsphase der B- und T-Lymphozyten, was eine Beeinträchtigung der Produktion von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren zur Folge hat (Bosma und Carroll 1991). Bosma et al. zeigten (1989), dass die Mäuse aufgrund einer Hypogammoglobulinämie sehr infektanfällig sind. Sie haben nachgewiesen, dass Mäuse, die eine genetische, homozygote scid-Mutation haben, einen schweren Mangel an funktionsfähigen B- und T-Lymphozyten aufweisen (Bosma et al. 1989). Die restlichen lymphoiden Blutzellen wie Monozyten, Granulozyten, Megakaryozyten, Erythrozyten und natural-killer-cells (NK-Zellen) sind durch die scid-Mutation nicht betroffen und haben eine normale Funktion (Bosma und Carroll 1991). Die scid Maus stellt somit ein ideales Modell der angeborenen Immunsuppression dar.

3 Material und Methoden

3.1 Tierexperimenteller Anteil

3.1.1 Tierzucht

25 erwachsene pathogenfreie scid Mäuse (homozygote Tiere mit severe combined immunodeficiency mit einem BALB/c Hintergrund, von M&B, RY, Dänemark) und 26 erwachsene Wildtyp-BALB/c Mäuse (aus eigener Zucht) wurden in der Tierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter Standardbedingungen gehalten ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; relative Luftfeuchtigkeit 50%; 12 Stunden zirkadianer Rhythmus). Unter pathogenfreien Bedingungen wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten und mit Standardfutter ad libitum (ssniff® M-Z Alleindiät extrudiert, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und sterilem Wasser gefüttert. Die Tiere sind beiden Geschlechtes und 90 Tage ± 14 Tage alt mit einem Gewicht von 21-26 g (durchschnittliches Gewicht 24,1 g). Es wurden keine Unterschiede bezüglich der Haltung, Fütterung und sonstigen Behandlung zwischen scid Mäusen und Wildtyp BALB/c Mäusen gemacht.

Alle Prozeduren die den experimentellen Teil des Tierversuchs betreffen wurden mit Einvernehmen und unter Aufsicht der Tierschutzbehörde der Freien Hansestadt Hamburg durchgeführt (Tierversuchsnummer 62/00).

3.1.2 Operation

Die Tiere wurden mit Ketamin/Xylazin, 0,1 ml/10 g Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) anästhesiert (Ketamin 10, Atarost GmbH & Co., Twistingen, Deutschland; Rompun 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und anschließend das Fell im Operationsgebiet mit Cutasept (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) behandelt und nachfolgend rasiert. Die Augen wurden vor Austrocknung mit Vidisic (Dr. Mann Pharma, Berlin Spandau, Deutschland) geschützt.

Auf einer sterilen Unterlage wurden die Tiere fixiert. Unter aseptischen Bedingungen wurde die Haut über dem Lendenwirbelsegmenten L3/L4 mit einem Längsschnitt über 12 mm nach kranial eröffnet. Nach Eröffnung der thorakolumbalen Faszie wurde der M. erector spinae an den Dornenfortsätzen längs eingeschnitten und nach

lateral gelöst. Die Wirbelgelenke über dem Segment L2/L3 wurden unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) freipräpariert und im Rahmen einer bilateralen Laminektomie, d.h. durch beidseitige Durchtrennung der Processus transversii, der Spinalkanal eröffnet. Mit einer Skalpellklinge (#11, Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland) wurde nun vorsichtig das Rückenmark auf der rechten Seite vom medio-dorsalen Septum nach lateral halbseitig durchtrennt. Die Hemitranssektion erfolgte in einer Bewegung und ebenfalls unter Benutzung des Operationsmikroskops. Rücksicht wurde auf die A. spinalis anterior genommen, um diese nicht zu verletzen. Der M. erector spinae wurde reponiert und über dem läsierten Gebiet mit einer Naht verschlossen (Vicryl, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) und anschließend die Haut mit demselben Nahtmaterial mit vier bis fünf Stichen genäht. Die Operationszeit betrug zwischen 6 und 15 Minuten. Postoperativ erhielten die Tiere 0,02 ml Metamizol (WDT, Garbsen, Deutschland) subkutan (s.c.) in die Nackenfalte. In Einzelkäfigen wurden die Tiere anschließend für 24 Stunden auf eine Wärmeplatte bei 37° C platziert und ihnen 0,2 ml Novalgin (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) in 75 ml Trinkwasser bis zum Tag ihrer Tötung verabreicht.

3.2 Histologie

Die Tiere wurden 1, 3, 7 und 14 Tage postoperativ getötet, wobei der Tag der Operation nicht mitgezählt wurde (Tag 0). Von den ursprünglich 51 Tieren überlebten 42 die Operation und die Tage bis zur Tötung. Fünf scid Mäuse und 4 Wildtyp BALB/c Mäuse erwachten nicht aus der Narkose oder überlebten die Tage bis zur Tötung nicht und gelangten so nicht in die Auswertung. Insgesamt 20 scid Mäuse und 22 Wildtyp BALB/c Mäuse wurden zur histologischen Analyse verwendet. Die Tiere wurden tief mit einer Überdosis Ketamin/Xylazin anästhesiert (0,15 ml/10 g Körpergewicht i.p.). Die Überdosis des Anästhetikums führte schnell zum funktionellen Herzstillstand der Maus. In Rückenlage fixiert wurde das Fell in der Medianlinie vom Abdomen bis zum Hals eröffnet und der Brustkorb mit Schere und Pinzette freipräpariert und die Jugularvenen freigelegt. Mit einem Schnitt unterhalb des Processus xiphoideus und anschließender Durchtrennung des Zwerchfells wurde der Thorax eröffnet, um sich Zugang zum Herzen zu verschaffen. Der Brustkorb wurde beidseits entlang der Medioaxillarlinie thorakotomiert und das

Sternum mit Rippenansatz hochgeklappt. Nach Eintreten des Todes der Maus und Durchtrennung der linken Jugularvene, wurde der rechte Vorhof eingeschnitten und das Gefäßsystem der Tiere durch Einbringen einer Kanüle (G18, B. Braun Melsungen AG, Melsung, Deutschland) in den linken Ventrikel transkardial mit Ringer-Lösung (Apotheke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) mit einem Druck von 90 mm Hg gespült. Die Spülung erfolgte für 30 Sekunden oder bis die Leber der Tiere blutleer erschien. Daraufhin erfolgte die Perfusion mit 4% gepuffertem Paraformaldehyd (PFA) für 10 Minuten.

Nach bilateraler Laminektomie über die gesamte Länge der Wirbelsäule wurde das gesamte Rückenmark von der Cauda equina bis zur Medulla oblongata freigelegt und vorsichtig entnommen. Die Spinalnerven wurden eng am Rückenmark abgetrennt. Das Gewebe wurde über Nacht bei Raumtemperatur weiter in 4% PFA nachfixiert und anschließend für einen weiteren Tag in 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 4° C gespült. Zur Stabilisierung wurde das Gewebe in 4% Agar (AgarNoble, DIFCO, Detroit, USA) eingebettet bevor es in einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe (50%, 70%, 90%, absolutes Isopropanol) dehydriert und in Paraplast eingelegt wurde. Abschließend wurde das Gewebe in Paraffinblöcke gegossen und das so konservierte Rückenmark in longitudinalen Schnitten, von dorsal nach ventral, mit dem Schlittenmikrotom (Microm, Heidelberg, Deutschland) als 5 µm dicke Schnitte auf beschichtete Objektträger (Histobond, Marienfeld, Deutschland) aufgezogen und entparaffiniert (Xylol mit anschließender absteigender Alkoholreihe zur Rehydratation, absoluter Alkohol, 96%, 79%, 50%, aqua dest.), bevor sie für die Färbungen verwendet wurden.

3.3 Morphologie

Um alle morphologischen Veränderungen des gesamten Rückenmarks nach Läsionierung beurteilen zu können, wurden fünf Regionen des Rückenmarks fest definiert (siehe Abb. 3.3-1). Die Läsion als Region wurde als Bereich zwischen den Wundrändern definiert. Die angrenzenden (ipsilateralen), die Läsion unmittelbar umgebenden Gebiete, wurden als kraniale und kaudale Grenzregion definiert und beschreiben die Regionen cirka 0,05 mm kranial bzw. kaudal der Läsion. Als weitere Region wurde das ipsilaterale, restliche Rückenmark betrachtet (kranial und kaudal der Läsion) und zuletzt beschreibt die kontralaterale Seite die fünfte Region. Die

kontralaterale Seite zeigte durchweg zu allen Zeitpunkten nach Läsion und unabhängig von der betrachteten Zellgattung und Färbung keine morphologische Veränderung und wurde somit als unläsioniert definiert und als intraindividuelle Kontrolle herangezogen.

Als weitere Unterteilung wurde in den fünf Regionen jeweils noch die weiße Substanz von der grauen Substanz des Rückenmarks unterschieden.

Die einzelnen Routinefärbungen und die immunhistochemischen Färbungen wurden in drei fest definierten Regionen des Rückenmarks durchgeführt (Region um den Zentralkanal, Region ventral des Zentralkanals, Region dorsal des Zentralkanals/Kortikospinaltrakt; siehe Abb. 3.3-2) und zur Auswertung verwendet.

In den Routinefärbungen wurden alle drei Regionen des Rückenmarks betrachtet, da sie u.a. als Übersichtsfärbungen fungierten, zur Auswertung kamen jedoch die Schnitte auf Höhe des Zentralkanals (Zentralkanal musste auf Höhe der Läsion sichtbar sein), ebenso wie die immunhistochemischen glialen Marker. Die immunhistochemischen Bindegewebsfärbungen gegen extrazelluläre Matrixproteine wurden ventral des Zentralkanals ausgewertet (jeweils 8-12 Schnitte ventral des Zentralkanals auf Höhe der Läsion) und die neuronalen und axonalen immunhistochemischen Marker wurden dorsal des Zentralkanals auf Höhe des Kortikospinalen Traktes (CST) gefärbt. Identifiziert wurde der CST indem in den longitudinalen, von dorsal nach ventral geschnittenen Schnitten, vom dorsal an den Meningen befestigten Lissauer'schen Trakt (Nach Sidman et al., 1971 identifiziert) weiter nach ventral geschnitten wurde, bis weiße Substanz medial und lateral mit dazwischenliegender grauer Substanz sichtbar wurde. Der mediale Trakt wurde als CST identifiziert (Bregman et. al., 2002) und die laterale weiße Substanz stellt den rubrospinalen Trakt oder wahlweise den Lissauer'schen Trakt dar (Bregman et. al., 2002).

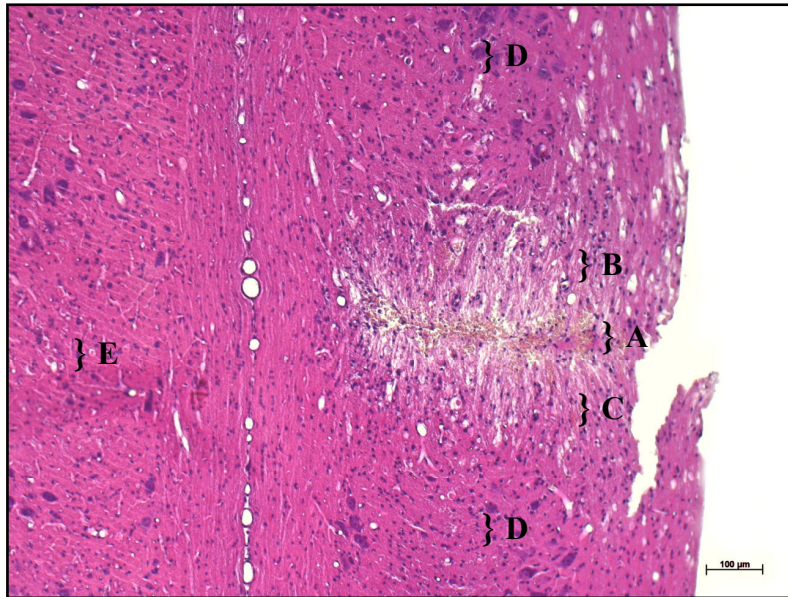


Abb. 3.3-1: Regionen des läsierten Rückenmarks. A Läsion **B** Kraniale Grenzregion **C** Kaudale Grenzregion **D** Restliches ipsilaterales Gewebe (kranialer und kaudaler Anteil) **E** Unläsionierte kontralaterale Seite; H.E.-Färbung.

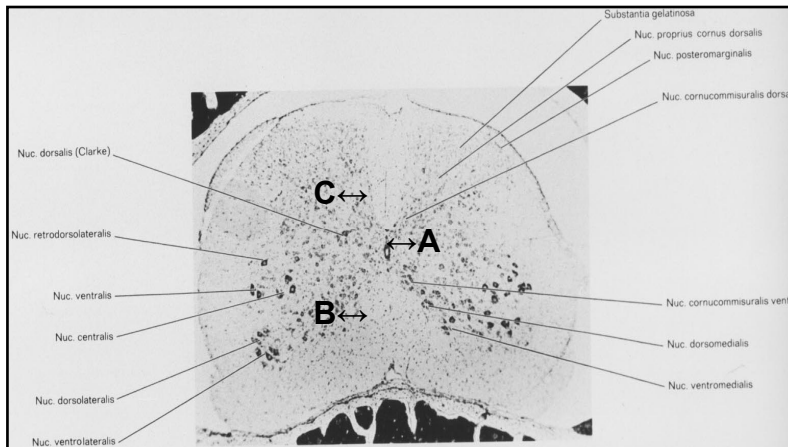


Abb. 3.3-2: Rückenmarksquerschnitt Höhe L2. A Region um den Zentralkanal **B** Region ventral des Zentralkanals **C** Region dorsal des Zentralkanals/Kortikospinaler Trakt, The Mouse Brain Atlas, Sidman et al., 1971.

3.4 Routinefärbungen

An den 5 µm dicken Paraffinschnitten, die auf beschichteten Objektträgern aufgezogen waren, wurden folgende Standardfärbungen durchgeführt:

3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach der Entparaffinierung der Schnitte und anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol, absoluter Alkohol, 96%, 70%, 50%, Aqua destillata) wurde an den Schnitten zur Orientierung und zur weiteren histologischen Analyse Routinefärbungen durchgeführt. Mit einer leicht in den Färbezeiten modifizierten Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung nach Romeis (1989) wurden die Schnitte jedes Rückenmarks in Serie durchgefärbt (Hämatoxylin und Eosin jeweils

für 1 Minute), wobei jeder 12. Schnitt eines Rückenmarks gefärbt wurde um jede Region beurteilen zu können. Anschließend wurde nach Dehydratation mit Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) der Schnitt mit einem Deckglas eingedeckelt.

3.4.2 Kresyl-Violett- Färbung nach Nissl

Zur spezifischen Darstellung des Zellkerns und des rauhen endoplasmatischen Retikulums von Neuronen und zur Orientierung im Gewebe, wurde an einigen Paraffinschnitten die Kresyl-Violett-Färbung nach Nissl vorgenommen.

Für 30 Sekunden wurden die Paraffinschnitte nach Entparaffinierung während der Kresyl-Violett-Färbung nach Nissl mit einer 0,5% Kresyl-Violett (Fluka, Buchs, Schweiz) in 0,1 M Natriumacetat-Lösung, pH 3,5, gefärbt (0,5 g Cresyl Fast Violett in 100 ml 0,1 M Natriumacetat, Einstellung pH mit Essigsäure). Nach spülen in Aqua dest. und dehydrieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe in schneller Abfolge (70%, 80%, 96%, absoluter Alkohol), folgte zur Differenzierung der Färbung 5 Minuten absoluter Alkohol und Xylol zur Fixierung. Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

3.4.3 Kombinierte Elastika van Gieson-Färbung

Zur Darstellung bindegewebiger Strukturen wurden die Paraffinschnitte nach Entparaffinierung aus dem 80% Alkohol in Resorcinfuchsin nach Weigert (bei 56° C) für 30 Minuten gefärbt. Nach der Differenzierung in 1% HCl-Alkohol folgte die Kernfärbung in Eisenhämatoxylin nach Weigert für 5 Minuten und nach Abspülen in Leitungswasser die van Gieson-Färbung für 3 Minuten mit anschließendem Spülen in 70% Alkohol und eindeckeln der Schnitte mit Eukitt nach Dehydratation.

3.4.4 Masson Goldner-Färbung

Die Masson Goldner-Färbung wurde in Serie an den Paraffinschnitten durchgeführt und ist eine Modifikation der Masson'schen Trichromfärbung. Anstelle von Anilinblau wurde zur besseren Kontrastierung Lichtgrün als Bindegewebsfarbstoff eingesetzt. Nach Entparaffinierung wurden die Paraffinschnitte aus dem 96% Alkohol entnommen und für 13 Minuten die Kernfärbung nach Weigert in Eisenhämatoxylin durchgeführt, gefolgt von kurzem Spülen und Fixieren in HCl-Alkohol und

anschließendem Wässern. Für 4 Minuten wurden die Schnitte nun in Säurefuchsin-Ponceau gefärbt und nach kurzen Spülen in 1% Essigsäure wurde in Phosphomolybdänsäure-Orange G gebeizt bis das Bindegewebe entfärbt war (15 Minuten). Nach erneutem Spülen in 1% Essigsäure folgte die Färbung in Lichtgrünlösung für 9 Minuten mit abschließendem erneutem Spülen in 1% Essigsäure und schneller Entwässerung und Eindeckeln mit Eukitt.

3.5 Immunhistochemische Färbungen

Ebenfalls an den 5 µm dicken Paraffinschnitten, auf beschichteten Objektträgern aufgezogen, wurden folgende immunhistochemischen Färbungen durchgeführt:

Primäre Antikörper gegen extrazelluläre Matrix Proteine		
Goat-anti-collagen IV	Verdünnung: 1:200	Southern Biotech, Birmingham, USA, Cat. no. 1340-01
Rabbit-anti-Laminin	Verdünnung: 1:200	Sigma, St. Louis, USA, Prod. no. L9393
Primäre Antikörper gegen Makroglia		
Rabbit-anti-cow-GFAP	Verdünnung: 1:1000	Dako, Hamburg, Deutschland, Code no. Z0334
Mouse-anti-CNPase	Verdünnung: 1:200	Sigma, St. Louis, USA, Prod. no. C5922
Primäre Antikörper gegen axonale und neuronale Strukturen		
Rabbit-anti-neurofilament	Verdünnung: 1:1500	Sigma, St. Louis, USA, Prod. no. N4142
Rabbit-anti-PGP 9.5	Verdünnung: 1:400	Dako, Hamburg, Deutschland, Code no. Z5116

Mindestens vier Paraffinschnitte wurden pro Antikörper, Region und postoperativen Tag gefärbt. Um die Vergleichbarkeit zwischen scid Mäusen und Wildtyp BALB/c Mäusen zu gewährleisten, wurden die Paraffinschnitte der einzelnen Tiere stets gleich behandelt und in einem Färbeprozess mit denselben Materialien verblindet gefärbt und ausgewertet.

3.5.1 Antikörper gegen extrazelluläre Matrix-Proteine

3.5.1.1 Anti-Kollagen Typ IV- und anti-Laminin-Färbungen

Nach der Entparaffinierung der Schnitte und anschließender Rehydrierung in einer

absteigenden Alkoholreihe (Xylol, absoluter Alkohol, 96%, 70%, 50%, Aqua dest.) wurden die Schnitte durch Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle (3 x 2 Minuten bei 500 Watt) vorbehandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Schnitte in 0,1% H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 20 Minuten inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren, gefolgt von Spülen in TrisPuffer (TBS) für 3 x 5 Minuten.

Es folgt eine 30 minütige Inkubation mit 2% Kaninchenserum Normal (Dako, Glostrup, Dänemark, Code no. X0902) in Dako Antibody Diluent (Dako, Glostrup, Dänemark, Code no. S3022) für den Goat-anti-collagen IV Antikörper und 2% Schweineserum Normal (Dako, Glostrup, Dänemark, Code no. X0901) ebenfalls in Dako Antibody Diluent für den Antikörper gegen Laminin bei Raumtemperatur.

Als primäre Antikörper wurden der polyklonale Goat-anti-Collagen IV purified (UNLB) Antibody und der polyklonale Rabbit-anti-Laminin-Antibody eingesetzt und ohne vorheriges Spülen über Nacht bei 4° C in einer Verdünnung von 1:100 für Goat-anti-Collagen IV und 1:200 für Rabbit-anti-Laminin in Dako Antibody Diluent inkubiert.

Am nächsten Tag folgte nach Spülen in TBS (3 x 5 Minuten) die Inkubation mit Rabbit-anti-Goat-sekundär-Antikörper (biotinyliert, Dako, Glostrup, Dänemark, Code no. E0466) für anti-Collagen IV bzw. Swine-anti-Rabbit-sekundär-Antikörper (biotinyliert, Dako, Glostrup, Dänemark, Code no. E0353) für anti-Laminin für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Verdünnung von 1:200 in Dako Antibody Diluent.

Nach anschließendem Spülen in TBS (3 x 5 Minuten) wurde ein Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex Detektionssystem (Elite Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) in TBS für 40 Minuten bei Raumtemperatur eingesetzt mit anschließendem Spülen in TBS (3 x 5 Minuten). Entwickelt wurde die gebundene Peroxidase mit 0,05% DAB, 3`3`- Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (Sigma, St. Louis, USA, Code no. D5637-5G) in TBS mit 0,01% H₂O₂ für 13 Minuten für Collagen IV und 8 Minuten für Laminin. Nach Spülen in Aqua dest. für 5 Minuten folgte eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, absoluter Alkohol, Xylol) und Eindeckeln mit Eukitt. Das Ergebnis zeigte eine starke spezifische, bräunliche Färbung ohne Anfärbung des unspezifische Hintergrundes. Die Spezifität der Färbung wurde mit jeweils mit einer Negativkontrolle (keine Inkubation mit einem primären Antikörper) kontrolliert. Bei diesen Kontrollen wurde keine Anfärbung von spezifischen und unspezifischen Strukturen im Gewebe

gefunden. Die gleichen Reaktionsschritte wurden für die anderen Antikörper benutzt, nur variierten Vorbehandlung und teilweise wurden bei der Entwicklung Verstärkungsmethoden wie im Folgenden beschrieben eingesetzt.

3.5.2 Antikörper gegen Makroglia

3.5.2.1 Anti-GFAP-Färbung

Anti-GFAP (Anti-Glial-Fibrillary Acidic Protein) ist ein aus Mäusen stammender monoklonaler Antikörper gegen das astrozytenspezifische Intermediärfilament GFAP, ein Filament des Zytoskeletts. Vorbehandelt wurden die Schnitte ebenfalls mit der Mikrowelle (2 x 2 Minuten in Citratpuffer pH 6,0). Der primäre Antikörper wurde 1:1000 verdünnt. Als sekundärer Antikörper wurde Swine-anti-Rabbit-sekundär-Antikörper verwendet. Anstelle der normalen Entwicklung mit DAB wurde zur Verstärkung der Entwicklung die Glucose-Oxidase-Verstärkung für 12 Minuten verwendet. Anschließend erfolgten die Dehydrierung und das Eindeckeln mit Eukitt. Die Glukose-Oxidase zeigte als Ergebnis eine starke, schwarze, spezifische Färbung, wohingegen der unspezifische Hintergrund nur schwach bis nicht gefärbt erschien.

3.5.2.2 Anti-CNPase-Färbung

Zur Markierung der Oligodendrozyten diente Anti-CNPase als primärer monoklonaler Antikörper. Anti-CNPase (Anti-2',3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase, monoklonal) ist ein fast ausschließlich in Myelin-produzierenden Zellen vorkommendes Enzym und dient somit spezifisch zur Anfärbung von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen im ZNS und PNS (Nishizawa et al. 1985, Kornack und Rakic 1999, Gross 2000). Mikrowellen-Vorbehandlung (3 x 2 Minuten in Citratpuffer pH 6,0) und eine Verdünnung des primären Antikörpers von 1:200 und als sekundärer Antikörper Rabbit-anti-Mouse (biotinylated, Dako, Glostrup, Dänemark, Code no. E0464) zeigten das spezifischste Ergebnis und die homogenste Anfärbung. Auch hier diente die Glucose-Oxidase als Verstärkung der Entwicklung (15 Minuten). Anschließend wurde nach Dehydratation mit Eukitt eingedeckelt.

3.5.3 Antikörper gegen neuronale und axonale Strukturen

3.5.3.1 Anti-Neurofilament- und anti-PGP 9.5-Färbung

Anti-Neurofilament 200 ist ein aus Kaninchen gewonnener, polyklonaler Antikörper gegen Neurofilament, ein Intermediärfilament aus dem Zytoplasma neuronaler Zellen, welches sich bis in die Dendriten und das Axon fortsetzen kann. Es eignet sich somit zur Darstellung axonaler Strukturen. Die Vorbehandlung erfolgte mit 0,06% Protease (Protease 24, Sigma, St. Louis, USA, Prod. no. P8038) bei 37° C in TBS für 7 Minuten. Eine Verdünnung von 1:1500 für den primären Antikörper und Swine-anti-Rabbit-Sekundär-Antikörper, sowie die Verstärkung der Entwicklung mit Glukose-Oxidase (25 Minuten), zeigten gute Resultate.

Anti-PGP 9.5 (Protein gene product 9.5) ist ein polyklonaler, aus Kaninchen gewonnener Antikörper. Anti-PGP 9.5 markiert als panneuronaler Marker neuronale Zellen und diente in den letzten Jahren als genereller Marker für Neurone und Zellen neuronalen und neuroendokrinen Ursprungs, sowie für deren Axone und Dendriten. Die entparaffinierten Schnitte wurden ebenfalls mit 0,06% Protease bei 37° C in TBS für 7 Minuten vorbehandelt. Bei einer Verdünnung des primären Antikörpers von 1:400, sowie Swine-anti-Rabbit-Sekundär-Antikörper zeigten sich nach Entwicklung mit Glucose-Oxidase für 20 Minuten gute Ergebnisse. Beide Färbungen wurden nach der Entwicklung nach Dehydratation mit Eukitt eingedeckelt.

3.6 Methodische Voruntersuchungen

Für die Ermittlung der besten Färbeergebnisse für unsere Untersuchungen wurden eine Reihe von Voruntersuchungen notwendig. Alle sechs Antikörper wurden mit verschiedenen Methoden ausgetestet, wobei jeweils alle drei bereits beschriebenen Vorbehandlungsmethoden (Vorbehandlung mit der Mikrowelle, Trypsinvorbehandlung, Proteasevorbehandlung) verwendet wurden. So zeigte sich für die Antikörper gegen extrazelluläre Matrix-Proteine wie Anti-Collagen IV und Anti-Laminin, dass nur die Mikrowellen-Vorbehandlung in Citratpuffer (pH 6,0) für 4 bis 6 Minuten eine spezifische Immunreaktion (spezifische Anfärbung versus Hintergrund) zeigte. Trypsin-Vorbehandlung zeigte aufgrund der Enzymdenaturierung des Gewebes ein eher diffuses Färbesbild mit viel Hintergrund. Gleiches galt für die

Vorbehandlung mit Protease. Die glialen Marker Anti-GFAP und Anti-CNPase zeigten ebenfalls mit Mikrowellen-Vorbehandlung das beste Ergebnis. Für die axonalen und neuronalen Marker Anti-Neurofilament 200 und Anti-PGP 9.5, waren nur durch die Protease-Vorbehandlung spezifische Anfärbung zu erreichen.

Ebenfalls methodisch wurde die Entwicklung der gebundenen Peroxidase untersucht. Neben der reinen DAB-Entwicklung wurden drei Verstärkungsmethoden ausgetestet. Zur Auswahl standen Glucose-Oxidase, Ammonium-Nickel und Osmium-Verstärkung. Es zeigte sich, dass für Anti-Collagen IV und Anti-Laminin die Entwicklung mit DAB und die Verstärkung mit Ammonium-Nickel gleich gute Ergebnisse lieferte, aufgrund des besseren Kontrasts wurde aber der DAB-Entwicklung der Vorzug gegeben. Anti-GFAP und Anti-CNPase zeigten hervorragende Ergebnisse mit der Verstärkung durch Glucose-Oxidase, so dass sich Astrozyten und Oligodendrozyten schwarz gefärbt gegen weißen Hintergrund scharf kontrastiert abzeichneten.

Auch Anti-Neurofilament und Anti-PGP 9.5 zeigten mit DAB-Entwicklung gute Ergebnisse, einen besseren Kontrast, aufgrund der schwarzen und nicht braunen Entwicklung, zeigte jedoch die Glucose-Oxidase, so dass diese zur Auswertung verwendet wurde.

Auch die Verdünnung der primären Antikörper (1:50 bis 1:1500) und das Medium in dem die Verdünnung vorgenommen wurde, wurden methodisch voruntersucht. Dako Antibody Diluent wurde mit einer Antikörper-Verdünnung in TBS, TBS und 0,1% Triton X-100 (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland) und TBS mit 0,3% Tween 20 (Sigma, St. Louis, USA, Prod. no. P1379) verglichen. Da sich jedoch kaum Unterschiede bezüglich des unspezifischen Hintergrundes zwischen den einzelnen Medien zeigte, wurde Dako Antibody Diluent, aufgrund der leichten hintergrundunterdrückenden Wirkung und der einfachen Handhabung, der Vorzug gegeben.

Bei einer Schnittdicke von 5 µm der Paraffinschnitte mit dem Schlittenmikrotom, zeigte sich beim Aufziehen auf die beschichteten Objektträger leichte Faltenbildung, woraufhin jeweils ein Paraffinblock pro postoperativem Tag auf 8 µm in Serie geschnitten wurden. Jedoch brachte auch diese Maßnahme nicht den gewünschten Effekt und auch die Einbettung in 4% Agar (AgarNoble, Difco, Detroit, USA) konnte dieses Phänomen nicht vollständig beseitigen.

3.7 Verwendete Lösungen und Materialien

→ **PFA (4% Paraformaldehyd, gepuffert in 0,2 M PB Phosphatpuffer)**

40 g Paraformaldehyd (Merk, Darmstadt, Deutschland)

ad 400 ml Aqua dest.

Erwärmung auf 80°C

Ad 1 N NaOH (Merk, Darmstadt, Deutschland) bis Lösung von milchiger zu klarer Lösung umschlägt, nach Abkühlung wurden 500 ml 0,2 M phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) hinzugefügt.

→ **0,2 M PB Phosphatpuffer (pH 7,2-7,4)**

65,84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merk, Darmstadt, Deutschland)

5,52 g $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

→ **Glucose**

10 mg Glucose (Merk, Darmstadt, Deutschland)

ad 100 ml Aqua dest.

→ **Glucose-Oxidase-Verstärkung**

90 ml 0,1 M PB-Puffer pH 7,4

DAB 45 mg

Ammoniumchlorid 36 mg

1,8 ml Nickelsulfat 0,05 M

1,8 ml Glucose 10%

Glucoseoxidase 300 µl

→ **Glucose-Oxidase**

1,2 mg Glucose-Oxidase (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

ad 1 ml Aqua dest.

→ **0,1 M PB-Puffer (pH 7,4)**

4,03 g KH_2PO_4 (Merk, Darmstadt, Deutschland)

17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merk, Darmstadt, Deutschland)

ad 1000 ml Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes mit $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

→ **DAB (3`3` - Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)**

(SIGMA, St. Louis, USA, Code no. D5637-5G)

2,25 g DAB

ad 100 ml TrisPuffer (TB)

Lösung eingefroren und gelagert bei -20°C

→ **TrisPuffer (TB, 0,05 M TrisPuffer, pH 7,6)**

3,02 g Trizma Base (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

4,5 g NaCl (J.T.Baker, Deventer, Holland)

ad 500 ml Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes mit HCl

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie

Die drei Regionen des Rückenmarks, in denen die verschiedenen Färbungen durchgeführt wurden, stellten sich in der H.E.-Färbung und in der Masson Goldner-Färbung unterschiedlich dar. In den Routinefärbungen wurden alle Regionen des Rückenmarks betrachtet, da sie u.a. als Übersichtsfärbungen fungierten, zur Auswertung kamen jedoch die Schnitte auf Höhe des Zentralkanals (Zentralkanal musste auf Höhe der Läsion sichtbar sein), ebenso wie die immunhistochemischen glialen Marker. Die immunhistochemischen Bindegewebsfärbungen gegen extrazelluläre Matrixproteine wurden ventral des Zentralkanals ausgewertet (16-24 Schnitte ventral den Zentralkanals auf Höhe der Läsion), die neuronalen und axonalen immunhistochemischen Marker dorsal des Zentralkanals (16-24 Schnitte dorsal den Zentralkanals auf Höhe der Läsion) auf Höhe des Kortikospinalen Traktes (CST) gefärbt (siehe auch Material und Methoden).

4.1.1 Morphologie des unverletzten Rückenmarks bei der Wildtyp BALB/c Maus

Die Region um den Zentralkanal zeigte in der H.E.-Färbung und in der Masson Goldner-Färbungen von lateral nach medial betrachtet folgende Befunde.

Lateral, dem Rückenmark aufliegend, stellten sich die Meningen in der Masson Goldner-Färbung dar. Das Kollagen der Meningen war stark grün gefärbt und somit leicht vom Rückenmark abzugrenzen. Deutlich erkannte man rotbräunlich gefärbt die in den Meningen eingebettet liegenden Zellkerne der Fibroblasten. Weiter medial folgte das Gewebe des Rückenmarks mit der außen liegenden weißen Substanz. Deutlich erkannte man in der H.E.-Färbung die rötlich gefärbten Faserbündel von Axonen, die sich gut gegeneinander abgrenzen ließen, mit meist longitudinalem Verlauf. Zwischen den Axonbündeln, die in geringer Anzahl auch wellig und spiralförmig erschienen, ließen sich die blau-schwarz gefärbte Zellkerne der Astrozyten und Oligodendrozyten erkennen. Vereinzelt waren auch quer angeschnittene, kleine Gefäße zu erkennen. In der Masson Goldner-Färbung sah man das grün gefärbte kollagene Bindegewebe der Gefäßwände und die

braunrötlich gefärbten Endothelzellen mit schwärzlichem Kern. Die außen liegende weiße Substanz nahm zirka ein Drittel der Breite einer Rückenmarkshälfte ein. Weiter nach innen (medialwärts) folgte die graue Substanz des Rückenmarks. In der H.E.-Färbung zeigten sich lateral in der grauen Substanz stark dunkelblau gefärbte, große Neurone mit ihren Dendriten (Ncl. retrodorsalis). Folgte man der grauen Substanz weiter medialwärts, nahm die Größe der Neurone auf etwa die Hälfte ab und auch die Dendriten der einzelnen Neurone waren nicht mehr gut zu erkennen. Zwischen den Neuronen erkannte man die blau-schwarz gefärbten Zellkerne von Astrozyten und Oligodendrozyten. In der grauen Substanz ließen sich ebenfalls kleine Gefäße (Kapillaren) darstellen. Teilweise waren auch wenige größere Gefäße angeschnitten, die sich gleichartig darstellten. Die graue Substanz endete in der Medianebene mit Erreichen des Zentralkanals, welcher sich in der H.E.-Färbung als Kanal parallel angeordneter, blau-schwärzlich angefärbter, kubischer Ependymzellen darstellte. Das Lumen des Kanals war frei.

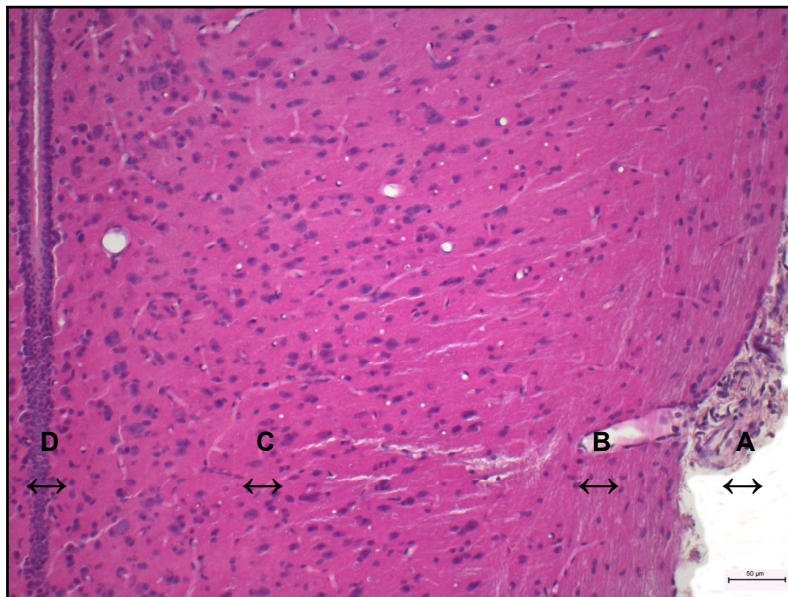


Abb. 4.1.1-1: Morphologie des unverletzten Rückenmarks beim BALB/c Wildtyp. Region Zentralkanal. Der geschichtete Aufbau des Rückenmarks in der longitudinalen Schnittführung ist gut zu erkennen. Gezeigt ist eine Rückenmarkshälfte inklusive umhüllender Meningen. **A** Umhüllende Meningen **B** Weiße Substanz **C** Kernhaltige graue Substanz **D** Zentralkanal. H.E.-Färbung.

Die Region ventral des Zentralkanals, in der die immunhistochemischen Färbungen der extrazellulären Matrixproteine vorgenommen wurden, stellte sich morphologisch von lateral nach medial betrachtet in ähnlicher Weise dar. Zunächst wurden auch hier lateral das grün gefärbte Kollagen und die rotbräunlichen Fibroblasten der Meningen in der Masson Goldner-Färbung gut darstellbar. Die sich anschließende weiße Substanz zeigte in der H.E.-Färbung ebenfalls rötlich gefärbte, teils voneinander differenzierbare Bündel von Axonen und die blau-schwarz gefärbte

Zellkerne der Astrozyten und Oligodendrozyten. Kleinere Gefäße ließen sich in der weißen Substanz darstellen.

In der grauen Substanz waren auch in dieser Region lateral zunächst große dunkelblau gefärbte Neurone mit ihren Dendriten sichtbar (Ncl. ventralis und Ncl. centralis). Weiter medialwärts nahm die Größe der Neurone ebenfalls ab. Auch hier ließen sich kleinere Gefäße und die Zellkerne von Astrozyten und Oligodendrozyten in der grauen Substanz darstellen.

Die graue Substanz in der Region ventral des Zentralkanals reichte allerdings nicht bis zur Mitte des Schnittes, sondern wurde in der Medianebene erneut von weißer Substanz abgelöst. Diese stellten sich gleich der lateralen weißen Substanz dar. Mittig kamen in dieser Region große, quer angeschnittene Gefäße zur Anfärbung.

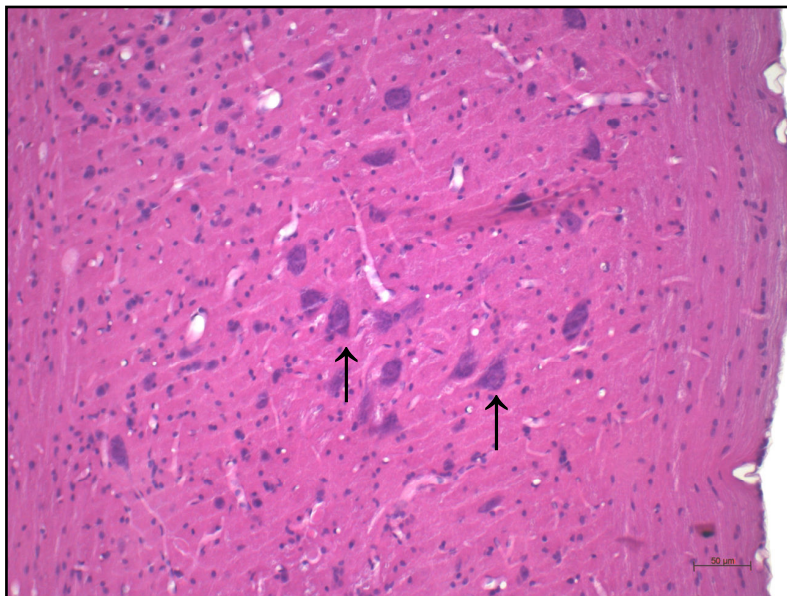


Abb. 4.1.1-2: Morphologie des unverletzten Rückenmarks beim BALB/c Wildtyp. Region ventral des Zentralkanals. Der geschichtete Aufbau des Rückenmarks in der longitudinalen Schnittführung ist gut zu erkennen. Gezeigt ist eine Rückenmarkshälfte inklusive umhüllender Meningen. Deutlich zeigen sich die Motoneurone (↑) der grauen Substanz. H.E.-Färbung.

Die Region dorsal des Zentralkanals, auf Höhe des CST, zeigte morphologisch, von lateral nach medial, zunächst einen ähnlichen Aufbau. Auch hier lagerten die Meningen dem Rückenmark auf und das darin enthaltene Kollagen stellte sich in der Masson Goldner-Färbungen wie in den anderen Regionen dar. Die weiße Substanz des Rückenmarks bildete sich in der H.E.-Färbung ebenfalls als rötliche Faserzüge von Axonen ab. Auch ließen sich hier Kapillaren in den Trakten der weißen Substanz darstellen.

Die sich anschließende graue Substanz zeigte lateral zunächst ebenfalls große, blau gefärbte Neurone mit schwärzlichem Zellkern. Auch hier ließen sich die Dendriten gut darstellen. Weiter medial nahm die Größe der Neurone ebenfalls ab. In der

gesamten grauen Substanz ließen sich auch in dieser Region die Zellkerne von Astrozyten und Oligodendrozyten darstellen. Gefäße in der grauen Substanz stellten sich in der H.E.-Färbung und der Masson Goldner-Färbung in gleicher Weise dar. In der Medianebene wurde die graue Substanz auch in dieser Region von Trakten weißer Substanz abgelöst. Diese Axone stellen sich gleich der lateralen weißen Substanz als rötlich gefärbte Faserzüge mit dazwischen liegenden, blau gefärbten, Zellkernen der Astrozyten und Oligodendrozyten dar. Die mediale weiße Substanz stellte den CST dar. In der Mitte des Schnittes, an dem sich die weiße Substanz beider Seiten traf, waren viele große, quer angeschnittene, Gefäße zu sehen.

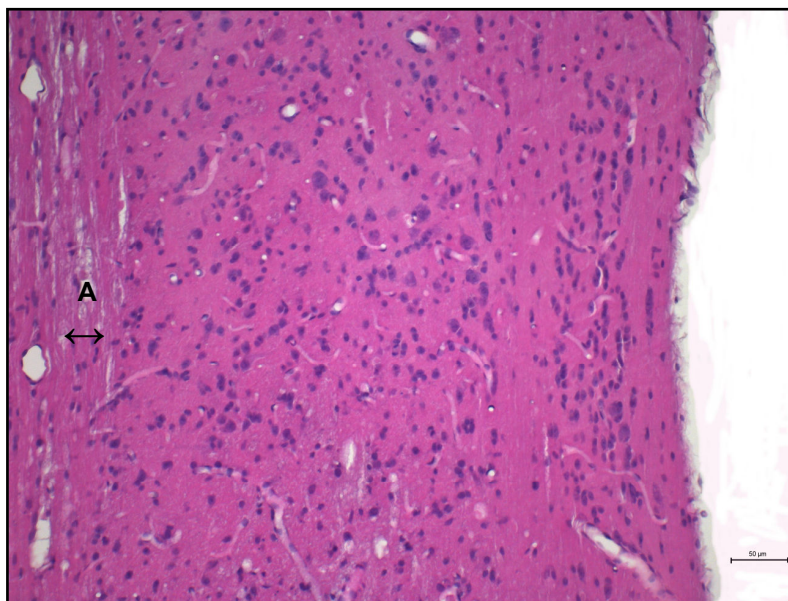


Abb. 4.1.1-3: Morphologie des unverletzten Rückenmarks beim BALB/c Wildtyp. Region dorsal des Zentralkanals, Kortikospinaler Trakt (CST). Der geschichtete Aufbau des Rückenmarks in der longitudinalen Schnittführung ist gut zu erkennen. **A** Der CST ist medial erneut als Schicht weißer Substanz zu erkennen. H.E.-Färbung.

4.1.2 Morphologie des unverletzten Rückenmarks bei der scid Maus

Das Rückenmark der scid Mäuse zeigte in der H.E.-Färbung und in der Masson Goldner-Färbung im Vergleich zu den Wildtyp BALB/c Mäusen denselben Aufbau mit derselben Zellmorphologie. Insgesamt zeigten sich keine anatomischen Unterschiede zwischen Wildtyp BALB/c und scid Maus. Der Schichtaufbau von weißer und grauer Substanz und die Zytoarchitektonik des Rückenmarks unterschieden sich bei den scid Mäusen nicht im Vergleich zum Wildtyp BALB/c. So zeigten die Trakte und Nervenstränge der weißen Substanz der scid Mäuse denselben Aufbau und Verlauf wie beim Wildtyp.

Die graue Substanz und die darin enthaltenen multipolaren Nervenzellen sowie die Makrogliazellen des Rückenmarks, unterschieden sich ebenfalls nicht zwischen Wildtyp und scid Mutante.

In allen Regionen des Rückenmarks fanden sich keine strukturellen Anomalien, morphologische Auffälligkeiten wie Zellatypien, Apoptosen, Nekrosen oder Zeichen einer Entzündung bei den scid Mäusen.

4.2 Allgemeine zelluläre und inflammatorische Reaktion auf die Läsion bei der Wildtyp BALB/c Maus

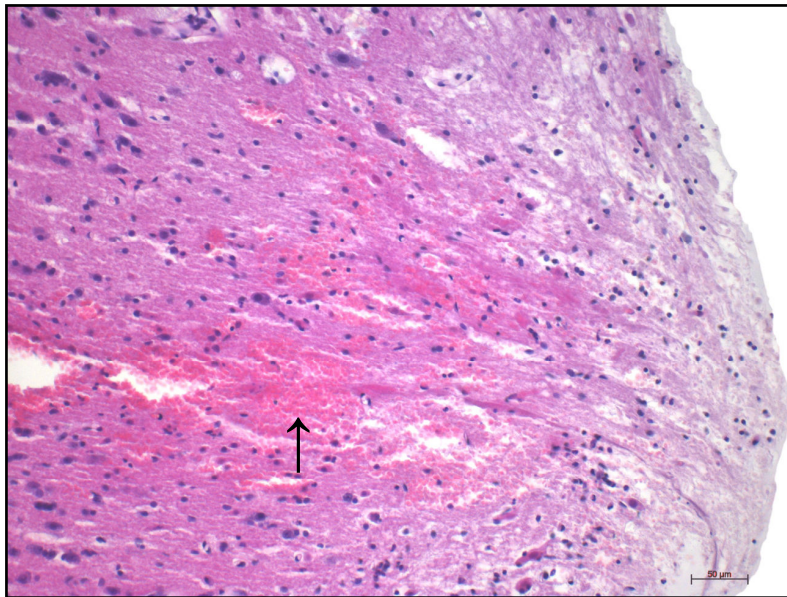
Die H.E.-Färbung und die Masson Goldner-Färbung wurden herangezogen, um die allgemeine zelluläre Reaktion des Rückenmarks im zeitlichen Ablauf nach der Läsion zu beurteilen. Beurteilt wurden die Infiltration von Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen), Fibroblasten, neuronale und axonale Strukturen und die Gewebsschwellung (Ödem).

Beurteilt wurden jeweils die fest definierten Regionen zu allen Zeitpunkten nach Läsion auf Höhe des Zentralkanals.

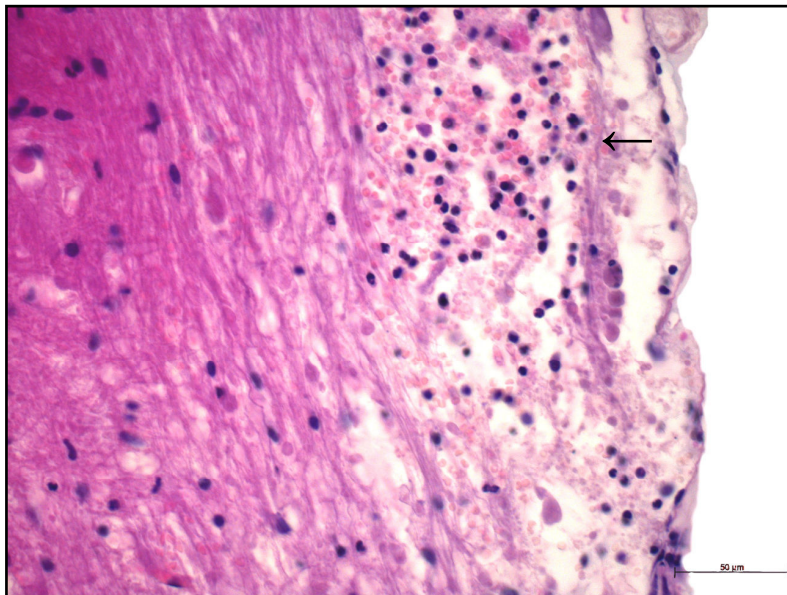
4.2.1 Erster postoperativer Tag BALB/c Maus

Die Läsion selbst stellte sich als aufgehellte Zone (weniger Eosin-Anfärbung), mit unterschiedlich großen Einblutungen (Ansammlung von Erythrozyten) und Zellfragmenten als Ausdruck der Gewebszerstörung dar. Ein sich bildendes interstitielles Ödem in der Umgebung und eine Ansammlung von Flüssigkeit im Läsionsspalt zeigten sich. Ein Untergang von Nervenzellen und Makroglia war zu beobachten. Eine Reaktion der Fibrozyten war nicht zu beobachten.

Die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Läsion erfolgte hauptsächlich von lateral, aus der Umgebung der Meningen. Die Einwanderung von Lymphozyten in die Läsion blieb deutlich hinter der Anzahl von Granulozyten zurück.



A



B

Abb. 4.2.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A In der Läsion erkennt man das locker zerstörte Gewebe und die massive Einblutung (↑). **B** Die kraniale Grenzregion zeigt die Infiltration von neutrophilen Granulozyten (←). Die Inflammation erfolgte am ersten postoperativen Tag überwiegend aus der Umgebung der Meningen. H.E.-Färbung.

In der kranialen Grenzregion standen ebenfalls die Flüssigkeitsansammlung und Aufquellung des Gewebes als Ausdruck des sich bildenden Ödems und die Einblutung im Vordergrund. In der lateralen weißen Substanz waren Einblutungen als regelmäßiges Muster zu beobachten. Die Nervenbündel und Faserzüge zeigten sich schwächer gefärbt (weniger eosinophil) als auf der unläsionierten Gegenseite und einzelne Bündel von Axonen waren gut gegeneinander abgrenzbar. Vereinzelt wurden auch kleine Zysten in den Trakten der lateralen weißen Substanz sichtbar. Diese Veränderungen waren Ausdruck der ödematösen Schwellung und der beginnenden Traktdegeneration der Axone der weißen Substanz. Einzelne Axone

erschieden dagegen eosinophiler gefärbt und zeigten einen vergrößerten Querschnitt als Ausdruck einer Axondystrophie.

Die graue Substanz in der kranialen Grenzregion bot nur wenige Veränderungen im Vergleich zur kontralateralen Seite. Bis auf dezente Einblutungen und ebenfalls sehr dezente granulotzytäre Infiltration und selten einer neuronalen Reaktion in Form einer eosinophilen, ischämischen Neurodegeneration, waren kaum Auffälligkeiten in dieser Region zu beobachten.

Insgesamt fiel auf, dass die inflammatorische Reaktion, in Form einer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, bei den BALB/c Mäusen in der kranialen Grenzregion im Vergleich zur Läsion sehr gering ausfiel.

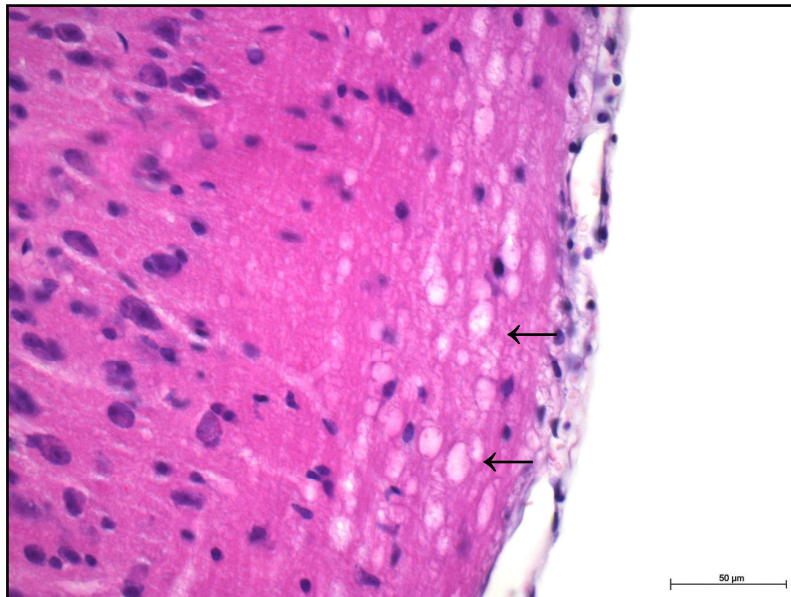
Die kaudale Grenzregion bot ein vergleichbares Bild wie die kraniale Grenzregion. Ebenfalls fielen dezente Einblutungen und eine axonale Schwellung mit Zystenbildung im außen gelegenen lateralen Trakt der weißen Substanz auf.

Das Kerngebiet der grauen Substanz zeigte kaum pathologische Veränderungen im Vergleich zur kontralateralen Seite, bis auf wenige Neurone, die ebenfalls eine eosinophile, ischämische Neurodegeneration zeigten. Das Bild glich stark der kranialen Grenzregion, auch bezüglich der Färbintensität und der geringen Inflammation.

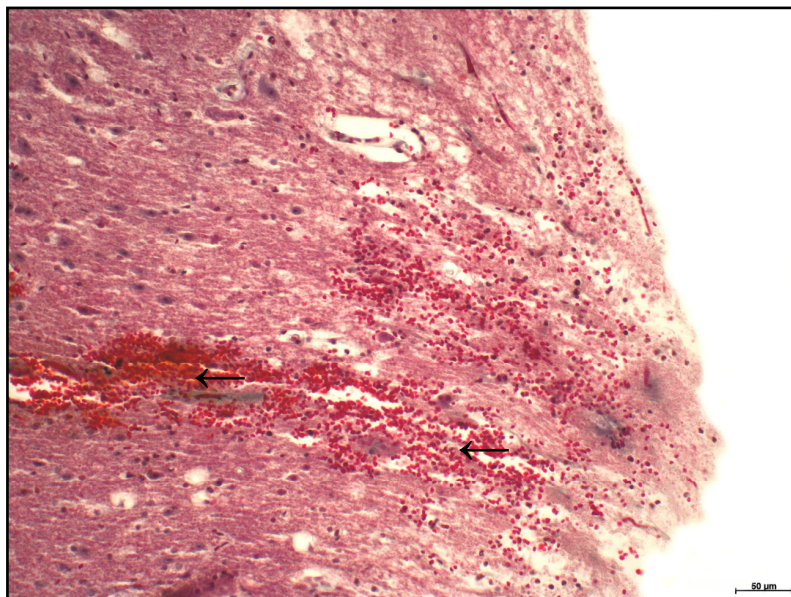
Der ipsilaterale Rest des Rückenmarks, also der Teil des Rückenmarks von der kranialen und kaudalen Grenzregion bis jeweils zum Ende des Schnittes, machte die Auswirkung der Läsion auf das gesamte Rückenmark sichtbar. Kranial der kranialen Grenzregion bot der laterale Trakt der weißen Substanz weiterhin für eine gewisse Distanz (in direkter Nähe zur Läsion) das Bild der ödematösen Schwellung der Faserzüge und Axone, teils mit Zysten durchsetzt, welche aber mit zunehmender Entfernung zur Läsion nachließ.

Die graue Substanz zeigte sich ohne pathologische Auffälligkeiten zur unläsionierten Gegenseite. Eine neuronale Reaktion auf die Läsion oder die Inflammation von Entzündungszellen wurde nicht beobachtet. Kaudal der kaudalen Grenzregion dagegen führten die axonale Schwellung und die Zystenbildung im Bereich des lateralen Traktes der weißen Substanz bis weit kaudal, teilweise bis zum Ende des Schnittes. Die graue Substanz unterschied sich hier ebenfalls nicht von der Gegenseite und erschien somit ohne pathologische Veränderung zu sein. Auch der

kaudale Teil des restlichen ipsilateralen Rückenmarks erschien frei von Entzündungszellen.



A



B

Abb. 4.2.1-2: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A In der kaudalen Grenzregion sind ipsilateral in der weißen Substanz zystische Veränderungen (←) als Ausdruck der Traktdegeneration zu erkennen. H.E.-Färbung. **B** Deutlich ist das locker zerstörte Gewebe des Rückenmarks und die massive Einblutung (←) in das Gewebe entlang der Schnittführung zu erkennen. Masson Goldner-Färbung.

Die kontralaterale Seite zeigte keinerlei morphologische Veränderung am ersten postoperativen Tag nach Setzen der Läsion.

4.2.2 Dritter postoperativer Tag BALB/c Wildtyp

Die Läsion wirkte am dritten postoperativen Tag insgesamt aufgeräumter und besser organisiert als am ersten postoperativen Tag. Die Wundränder zeigten sich besser adaptiert. Auch am dritten postoperativen Tag waren noch Reste der Einblutung in

die Läsion zu sehen. Die Erythrozyten zeigten sich aber in der H.E.-Färbung schwächer gefärbt und imponierten nicht mehr als runde Zellen, sondern eher in Form von Fragmentozyten. In der Läsion zeigten sich nun kleine Zysten, im Unterschied zum 1. postoperativen Tag, und insgesamt erschien das Gewebe stärker ödematös geschwollen als am ersten postoperativen Tag nach Läsion. Neutrophile Granulozyten zeigten sich am dritten postoperativen Tag weniger als am ersten postoperativen Tag nach Setzen der Läsion. Nur wenige Granulozyten waren in der Läsion auszumachen und diese schienen eher perivaskulär gelegen und nicht mehr frei in der Läsion verstreut zu liegen. Dafür nahm die Anzahl der Lymphozyten, im Vergleich zum ersten postoperativen Tag, zu, wobei es sich nur um vereinzelt, oder in kleinen Gruppen liegende Lymphozyten handelte.

Neu im Vergleich zum ersten postoperativen Tag war das Auftreten von Schaumzellen. Diese Monozyten imponierten als große, stark rot gefärbte Zellen mit randständigem, dunklen Kern und schaumig vakuolisiertem Zytoplasma. Besonders medial, also in der Nähe des Zentralkanals, zeigten sich diese Schaumzellen in der Läsion. Zusätzlich war eine leichte, fibrozytäre Reaktion zu beobachten. Schlanke Fibrozyten mit ihren spindelförmigen Zellleibern und ihrem langovalen Kern waren zu erkennen. Besonders meningeal zeigten sich leichte Ansammlungen von grün (Masson Goldner-Färbung) gefärbtem kollagenem Bindegewebe, die entlang der Schnittführung teilweise bis zum Zentralkanal reichten.

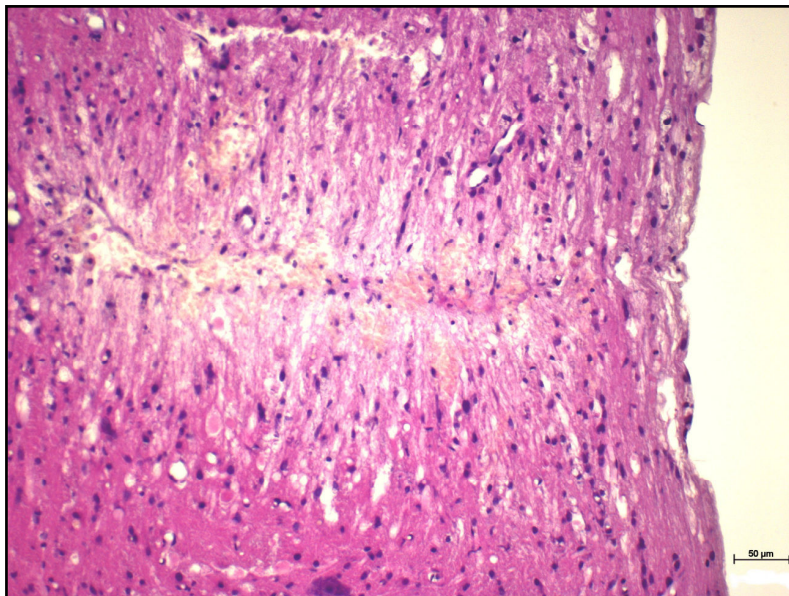
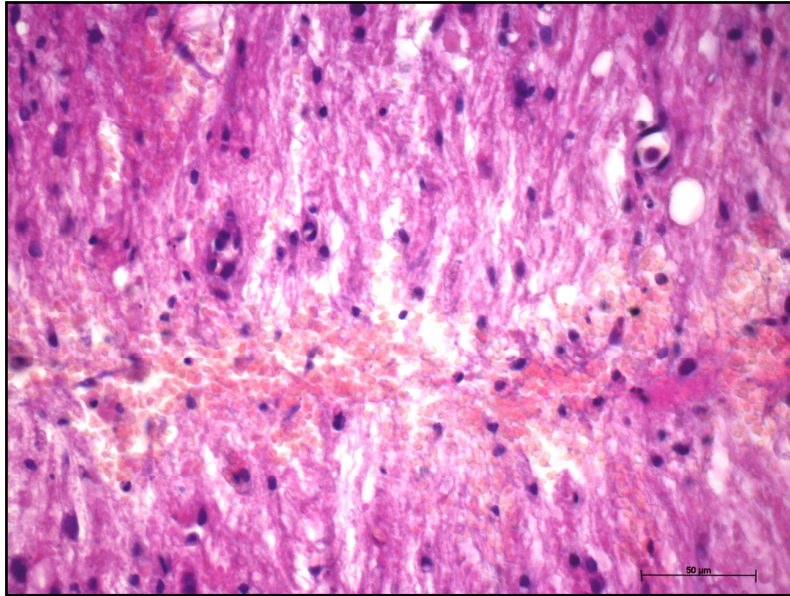
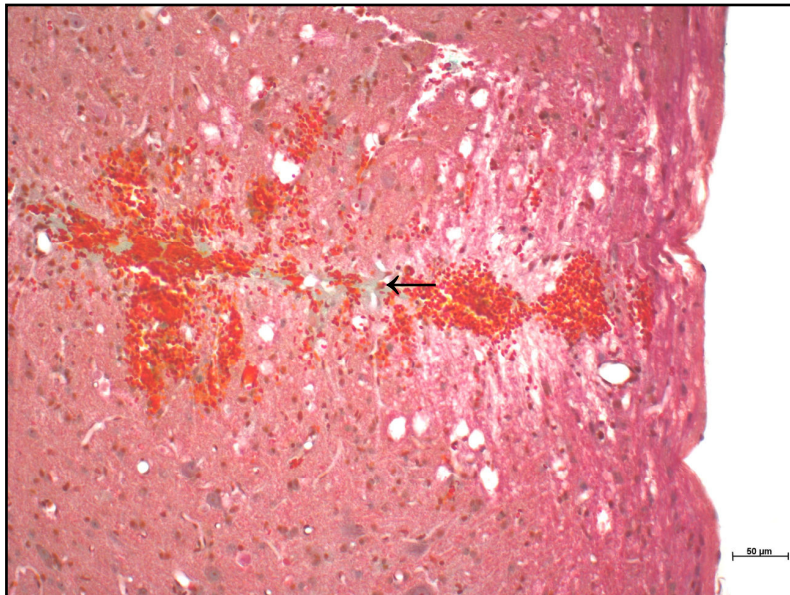


Abb. 4.2.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Die Läsion und die gut adaptierten Wundränder, sowie das interstitielle Ödem sind deutlich zu erkennen. H.E.-Färbung.

A



B



C

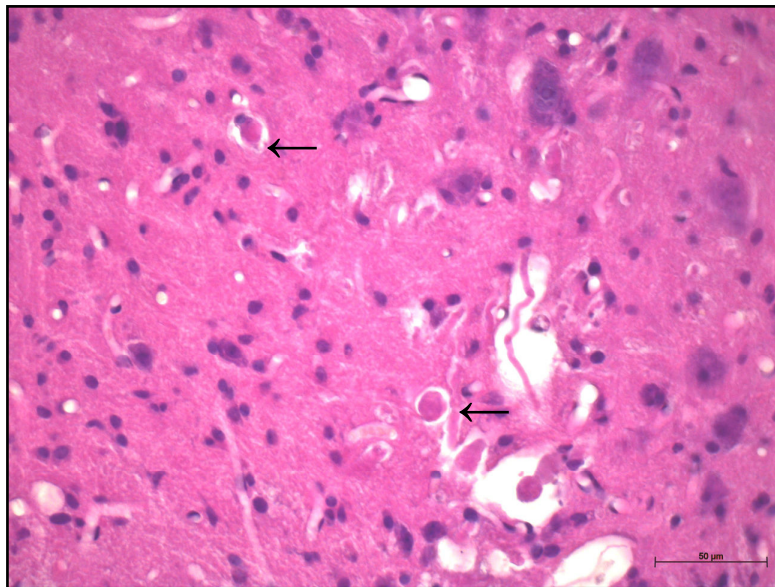
Abb. 4.2.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. B Stärkere Vergrößerung der Läsion. Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten als Zellen einer akuten Entzündungsreaktion zeigen sich. H.E.-Färbung. **C** Einblutung entlang der Schnittführung. Bindegewebe beginnt sich entlang der Läsion zu formieren (←). Masson Goldner-Färbung.

Auch in der kranialen Grenzregion zeigten sich noch die Residuen der Einblutung. Die ödematöse Schwellung des Gewebes war deutlich zu erkennen, wodurch besonders der laterale Trakt der weißen Substanz aufgelockert erschien. Man konnte einzelne, spiralförmige Axonbündel gut gegeneinander abgrenzen. Die Trakte der lateralen weißen Substanz boten ebenfalls ein ödematös verändertes, mit Zysten durchsetztes Bild. Auch hier waren die Traktveränderungen aber segmental begrenzt und reichten nicht weit über die kraniale Grenzregion hinaus.

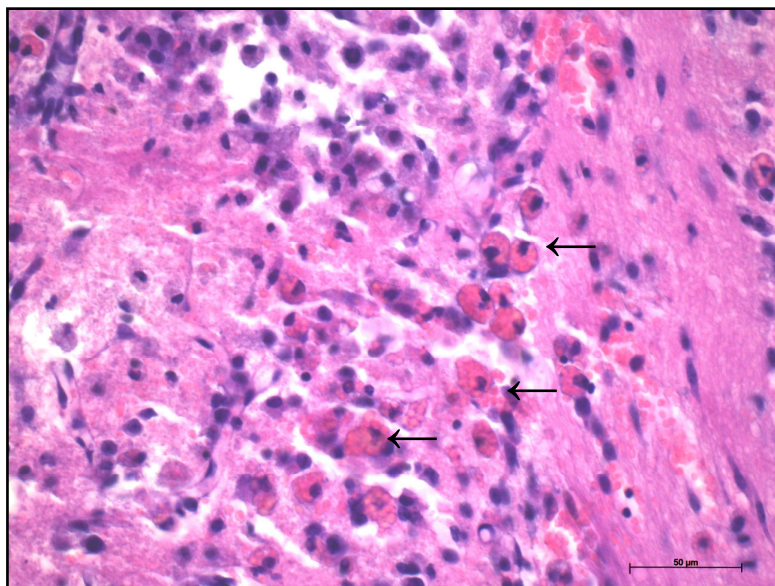
In der grauen Substanz zeigte sich ein verändertes Bild zum ersten postoperativen Tag nach Läsion. Viele Neurone schienen untergegangen zu sein oder zeigten das Bild einer schweren peripheren Chromatolyse (Tigrolyse). Die überlebenden

Neurone wiesen sich in der H.E.-Färbung weniger stark gefärbt aus als auf der unläsionierten Gegenseite. Die Neurone zeigten eine deutliche Zellschwellung in Form eines Zellödems. Im Vergleich zum ersten postoperativen Tag nach Läsion, präsentierten sich am dritten postoperativen Tag viele kleine Gefäße in der kranialen Grenzregion.

Die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in diese Region erwies sich auch am dritten postoperativen Tag nach Läsion als dezent. Vereinzelt waren Granulozyten und Lymphozyten zu beobachten. Teilweise wurden auch vereinzelt Monozyten in Form von Schaumzellen beobachtet. Die Fibrozyten in der kranialen Grenzregion zeigten sich vermehrt im Vergleich zum ersten postoperativen Tag nach Läsion.



A



B

Abb. 4.2.2-2: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Ischämisch, eosinophile Neurodegeneration in der kranialen Grenzregion (←). H.E.-Färbung. **B** Infiltration der Läsion mit Schaumzellen (←). Deutlich sind die großen Phagozyten mit ihrem roten Zytoplasma und dem kleinen, randständigen Kern zu erkennen. H.E.-Färbung.

Auch in der kaudalen Grenzregion zeigten sich noch die Residuen der Einblutung. Die Trakte der lateralen weißen Substanz boten ebenfalls ein ödematös verändertes, mit Zysten durchsetztes Bild und reichten weit über die kaudale Grenzregion hinaus. Die graue Substanz zeigte ebenfalls den Untergang von Neuronen und ischämische Veränderungen sowie eine Tigrolyse. Ebenfalls waren vermehrt das Einsprossen kleiner Gefäße zu beobachten. Auch die Fibrozyten in der kaudalen Grenzregion zeigten sich vermehrt und auch Schaumzellen wurden in dieser Region vereinzelt gesichtet.

Die Region des restlichen ipsilateralen Rückenmarks zeigte kranial kaum pathologische Veränderungen. Die Region kranial der kranialen Grenzregion zeigte in unmittelbarer Nähe zur Läsion noch eine zystische Veränderung des lateralen Traktes der weißen Substanz.

Die graue Substanz zeigte, mit Ausnahme eines Tieres, keine pathologischen Veränderungen. Eines von fünf Tieren zeigte eine ähnliche, wie zuvor in den Grenzregionen beschriebene Zystenbildung des medial, nahe dem Zentralkanal, gelegenen Gewebes, von Läsionshöhe aufsteigend bis weit kranial. Fraglich lag hier eine intraoperative Verletzung der A. spinalis anterior vor.

Kaudal der kaudalen Grenzregion zeigte sich eine Aufhellung des lateralen Traktes in der H.E.-Färbung (weniger Eosin) der weißen Substanz. Dieser laterale Trakt war zystisch verändert und zeigte diese Veränderung auch weit kaudal noch, die graue Substanz zeigte keine pathologischen Veränderungen.

Die kontralaterale Seite zeigte auch am dritten Tag nach Läsion keinerlei morphologische Veränderungen.

4.2.3 Siebter postoperativer Tag BALB/c Wildtyp

Die Läsion imponierte am siebten postoperativen Tag kompakter und insgesamt bindegewebiger durchsetzt als an den Vortagen. Eine beginnende Narbenbildung (Ansammlung von kollagenem Bindegewebe und Fibrozyten/Fibroblasten) war in der Läsion sichtbar und das Ödem und die Ansammlung von Flüssigkeit im Läsionsspalt schienen rückläufig. Die Wundränder der Läsion waren insgesamt gut adaptiert und von bindegewebigen Faserzügen, die hauptsächlich in Richtung der Schnittführung zu verlaufen schienen, durchbaut. Die Anzahl und die Form der Fibrozyten änderten

sich am siebten postoperativen Tag. Vermehrt wurden Fibroblasten identifiziert. Viele kollagen-produzierende Fibroblasten waren mit ihren verdickten, zigarrenförmigen Zelleibern zu erkennen. Besonders meningeal befanden sich vermehrt Fibroblasten. Diese schienen von den Meningen ausgehend, in die Läsion einzuwandern. Vermehrt war in der Masson Goldner-Färbung stark grün gefärbtes Kollagen in der Läsion, besonders an den Meningen gelegen, zu beobachten. Der am ersten und dritten postoperativen Tag nach Läsion, bis auf Erythrozyten und Zellen der Inflammation, noch fast zellfreie Läsionsspalt war somit durch Fibroblasten und das von ihnen produzierte kollagene Bindegewebe ausgefüllt.

Neutrophile Granulozyten waren in der Läsion bei keinem Tier mehr auszumachen. Wenige Lymphozyten säumten die Läsion, allerdings deutlich weniger als am dritten postoperativen Tag. Bei einem von fünf Tieren waren noch Schaumzellen zentralkanalnah zu sehen. Kleinere Gefäße wurden, im Vergleich zum dritten postoperativen Tag, am siebten postoperativen Tag, auch in der Läsion sichtbar. Nur vereinzelt waren auch wieder Zysten in der Läsion zu beobachten.

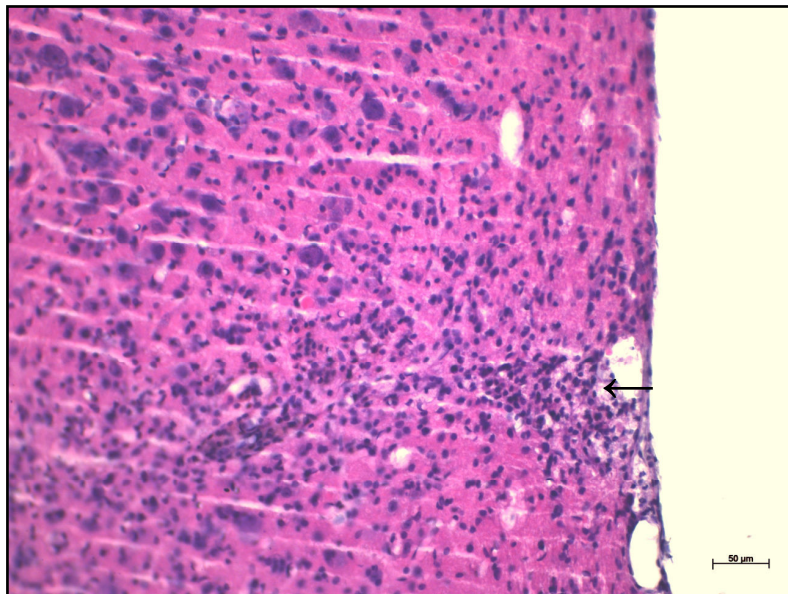
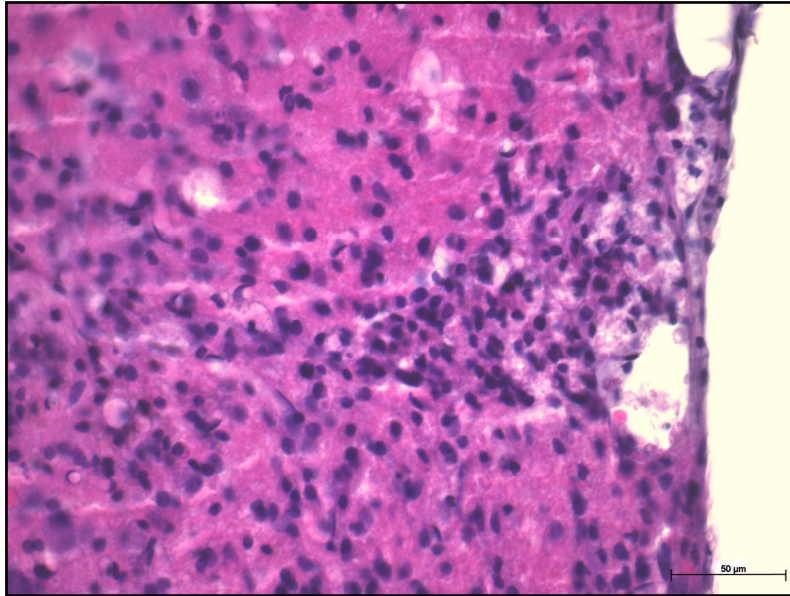
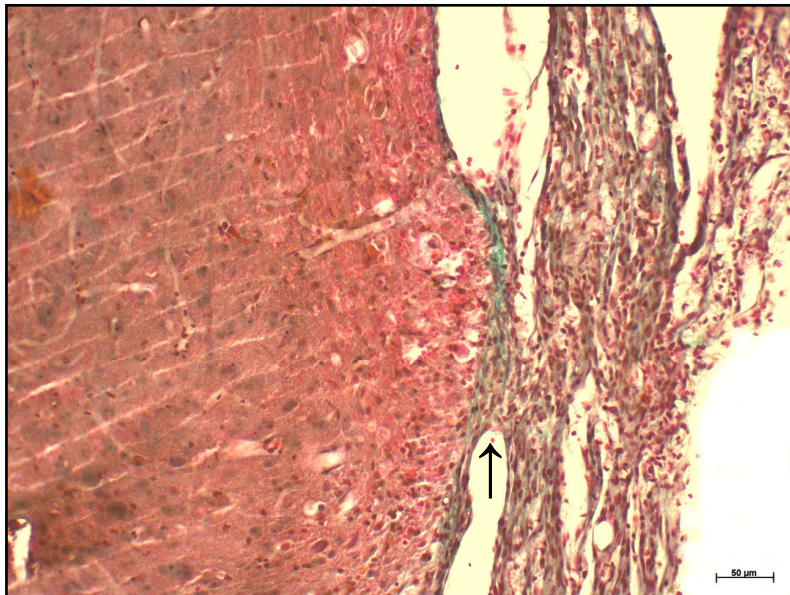


Abb. 4.2.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Die Läsion und die beginnende bindegewebige Organisation und Vernarbung sind gut erkennbar (←).
A H.E.-Färbung.



B



C

Abb. 4.2.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. B In der Läsion sind viele Fibrozyten und Fibroblasten zu identifizieren. H.E.-Färbung **C** Besonders meningeal ist neu gebildetes kollagenes Bindegewebe in der Läsion zu erkennen. Es finden Verwachsungen mit umliegendem Gewebe statt (↑). Masson Goldner-Färbung.

Die kraniale Grenzregion zeigte eine stark vermehrte Anzahl von Fibrozyten mit ihren spindelförmigen Zelleibern. Auch Fibroblasten waren in geringerer Zahl zu beobachten. In den Trakten der lateralen weißen Substanz waren, nur direkt der Läsion anschließend, ebenfalls Zysten sichtbar.

Auch die graue Substanz der kranialen Grenzregion zeigte diese zystischen Veränderungen vereinzelt. Die Neurone in dieser Region erschienen am siebten Tag nach Läsion ohne Veränderungen zur unläsionierten Gegenseite.

Neutrophile Granulozyten und auch Lymphozyten waren in der kranialen Grenzregion nicht zu beobachten. Kleine Gefäße zeigten sich dagegen auch in dieser Region am siebten postoperativen Tag.

Die kaudale Grenzregion zeigte ebenfalls, besonders meningeal, eine stark vermehrte Anzahl von Fibrozyten und Fibroblasten. Die weiße Substanz lateral war wie schon am dritten postoperativen Tag zystisch aufgetrieben und verändert.

In der grauen Substanz waren die Neurone, auch in der kaudalen Grenzregion, ohne pathologische Veränderungen zur Gegenseite. Kleinere, aber im Vergleich zum dritten postoperativen Tag, auch größere Gefäße, waren zu sehen und Anzeichen einer akuten Inflammation zeigten sich in dieser Region ebenfalls nicht.

Das restliche ipsilaterale Gewebe zeigte kranial in der lateralen weißen Substanz vereinzelt noch Zysten, die von der Läsion an kranialwärts, für eine gewisse Distanz aufstiegen. Weiter kranialwärts waren diese Zysten in der weißen Substanz nicht mehr zu beobachten.

Die graue Substanz enthielt kranial der Läsion ipsilateral viele kleine Gefäße, die auf der gesamten Länge, bis zum Ende der Schnitte zu sehen waren. Ebenfalls zu beobachten waren quer angeschnittene, geschwollene, degenerative Axone in der grauen Substanz. Diese zeigten sich als kleine, runde Vakuolen mit einem stark eosinophil rot gefärbten Gewebe im Inneren. Viele solcher degenerativen Axone waren zu beobachten.

Kaudal zeigten sich diese axonalen Veränderungen nicht, dafür aber dieselben zystischen Veränderungen im lateralen Traktgebiet der weißen Substanz wie am dritten postoperativen Tag nach Läsion, die teilweise weit nach kaudal reichten.

Die graue Substanz zeigte kaudal der Läsion, auch bezüglich der Neurone, keine pathologischen Veränderungen im Vergleich zur unläsionierten Gegenseite.

Die kontralaterale Seite bot auch am siebten postoperativen Tag nach Läsion keine morphologischen Veränderungen. Nur bei einem der fünf Tiere zeigte sich auch kontralateral, in der grauen Substanz, eine axonale Degeneration mit zystischen Kavernen und dem darin enthaltenen, stark eosinophilen Gewebe.

4.2.4 Vierzehnter postoperativer Tag BALB/c Wildtyp

Die Läsion bei den BALB/c Mäusen am vierzehnten postoperativen Tag erschien insgesamt feiner und dezenter als an jedem anderen untersuchten postoperativen Tag zuvor. Gut erkannte man die feste, bindegewebige Narbe entlang der ehemaligen Schnittführung. Die ehemaligen Wundränder erschienen fest verwachsen und waren gut adaptiert. Das Ödem im Interstitium und die Ansammlung

von freier Flüssigkeit in der Läsion waren fast vollständig zurückgegangen. Die bindegewebige Narbe, welche in der Masson Goldner-Färbung gut zu beurteilen war, zeigte eine hohe und etwa ausgewogene Anzahl von Fibrozyten und Fibroblasten. Die Meningen zeigen am vierzehnten postoperativen Tag die bisher stärkste Reaktion in Form einer Erhöhung der Anzahl von Fibroblasten und Fibrozyten und von produziertem Kollagen. Die abgehenden Spinalnerven, und somit Teile des peripheren Nervensystems (PNS), waren bei mehreren Tieren, auf Höhe der Läsion, mit den Meningen teilweise fest verwachsen. Neutrophile Granulozyten waren in der Läsion nicht mehr auszumachen. Vereinzelt wurden in wenigen Tieren Lymphozyten, in geringer Menge, in der Läsion beobachtet. Bei zwei von fünf Tieren wurden erneut Schaumzellen in der Läsion beobachtet. Diese zeigten sich entlang der bindegewebigen Narbe zentralkanalnah als auch lateral in der Nähe der Meningen. Die Anzahl kleiner Gefäße veränderte sich nicht im Vergleich zum siebten postoperativen Tag.

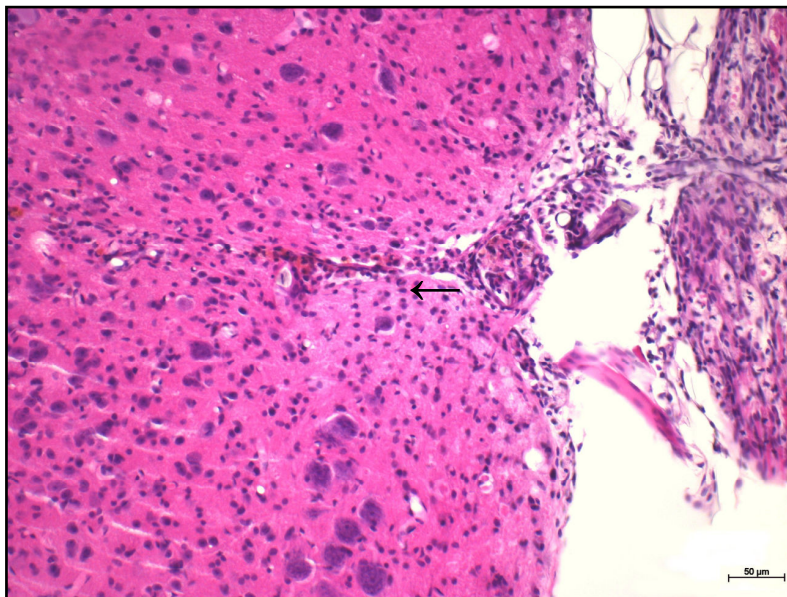
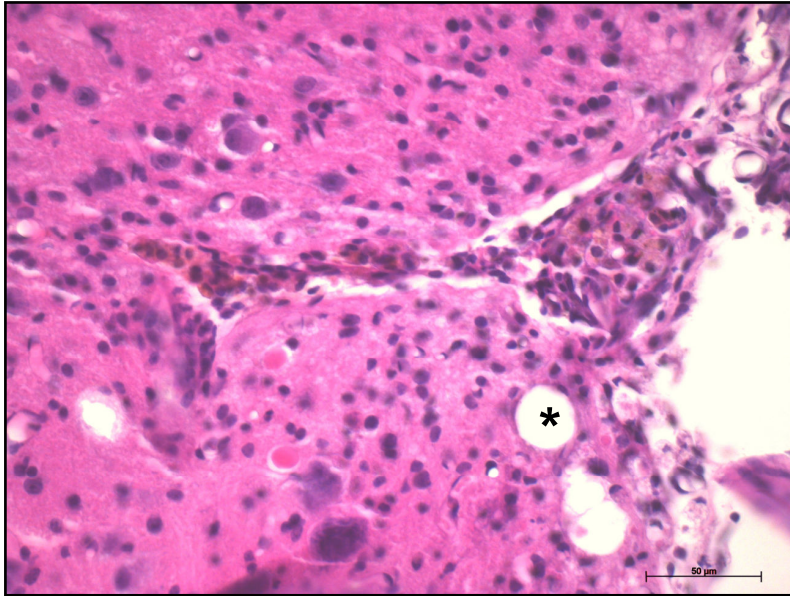
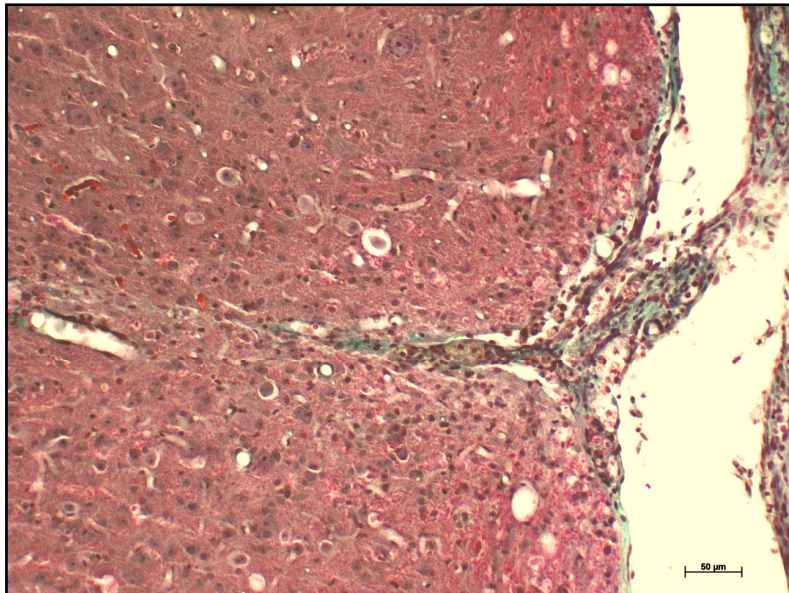


Abb. 4.2.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Die Läsion und die verfestigte bindegewebige Narbe sind deutlich abgrenzbar (←). H.E.-Färbung.



B



C

Abb. 4.2.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. B In der Läsion sind viele Fibrozyten zu identifizieren, die sich in der bindegewebigen Narbe befinden. Blutgefäß in Nähe der Läsion (*). H.E.-Färbung **C** Gut ist die bindegewebige Narbe zu erkennen, die sich wie ein Keil in der Läsion befindet. Masson Goldner-Färbung.

Die kraniale Grenzregion enthielt am vierzehnten postoperativen Tag sehr viele Fibrozyten und auch Fibroblasten. Die Meningen reagierten ebenfalls stark mit Verwachsungen mit der Umgebung und enthielten ebenfalls eine erhöhte Zahl an Fibrozyten und Fibroblasten.

Besonders in der lateralen weißen Substanz fielen feinste, eosinophil gefärbte Granula auf. Viele kleine Zysten zeigten sich auch hier im lateralen Traktgebiet in der Nähe zur Läsion. Eine axonale Degeneration in der weißen sowie in der grauen Substanz war zu beobachten.

Die graue Substanz zeigte unterschiedlich in ihrer Färbeintensität gefärbte Neurone (Chromatolyse), von denen einige degenerativ geschrumpft zu sein (Zellsklerose) erschienen.

Wenige Schaumzellen fanden sich bei einem der fünf Tiere auch in der kranialen Grenzregion. Ansonsten erschien diese Region ohne Zeichen einer weiteren Entzündung. Kleine Kapillaren und auch größere Gefäße waren anzutreffen.

Die kaudale Grenzregion stellt sich ähnlich der kranialen Grenzregion dar. Eine starke meningeal-fibroblastäre Reaktion war festzustellen. Viele Fibrozyten und Fibroblasten und das von ihnen produzierte Kollagen ließen sich darstellen. Die laterale weiße Substanz beinhaltete ebenfalls viele größere Zysten.

Die graue Substanz zeigte ebenfalls Zysten, Axondegeneration und eine Chromatolyse. Auch hier waren viele kleine und teilweise auch größere Gefäße zu sehen. Die kaudale Grenzregion erschien am vierzehnten postoperativen Tag frei von Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen.

Das restliche ipsilaterale Rückenmarksgewebe stellte sich kranial ebenfalls mit axonaler Degeneration dar. In der weißen sowie der grauen Substanz zeigte sich das Bild der axonalen Degeneration mit Zystenbildung und eosinophilem Inhalt. Ansonsten erschienen weiße und graue Substanz kranial ohne Veränderungen zur Gegenseite. Kaudal zeigte sich ipsilateral wieder die zystische Veränderung der lateralen weißen Substanz.

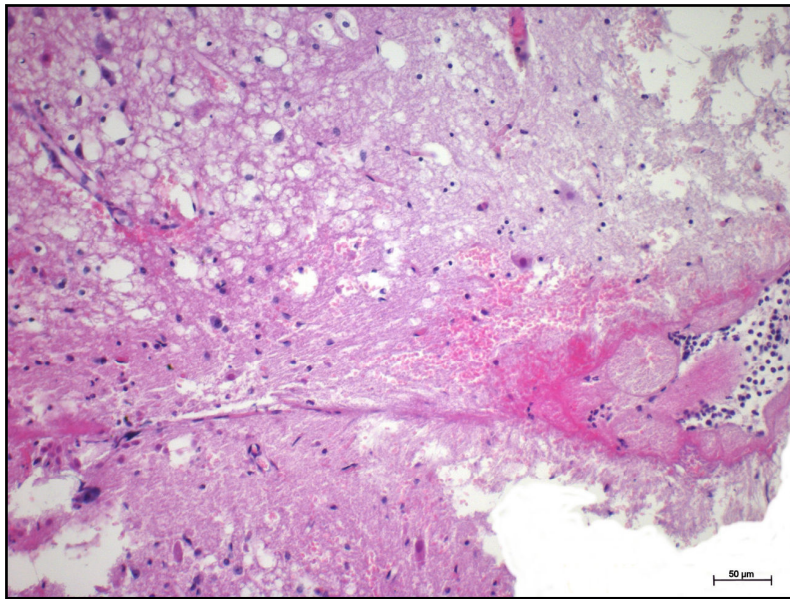
Die kontralaterale Seite zeigte am vierzehnten Tag nach der Läsion keine pathologisch-morphologischen Veränderungen.

4.3 Allgemeine zelluläre und inflammatorische Reaktion auf die Läsion bei der scid Maus

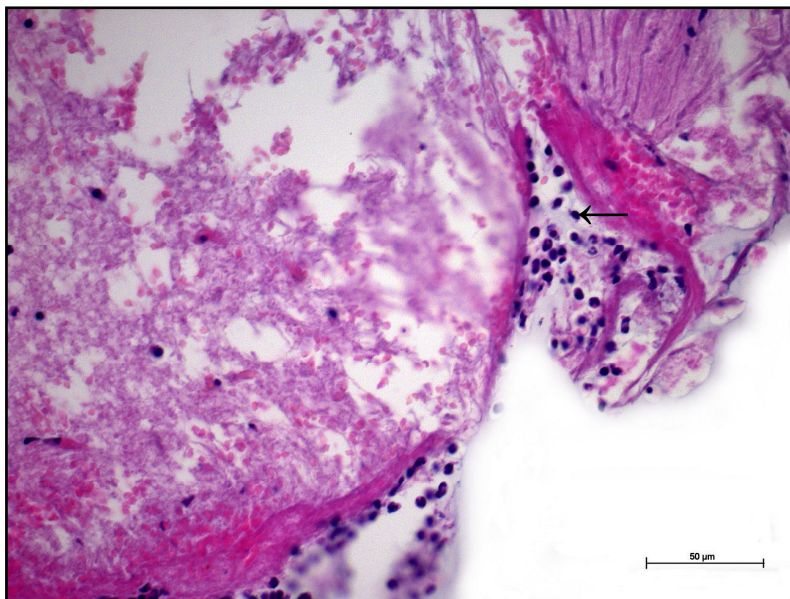
4.3.1 Erster postoperativer Tag scid Maus

Auch hier stellte sich die Läsion als aufgehellte Zone (weniger Eosin-Anfärbung) mit Einblutungen und Zellfragmenten als Ausdruck der Gewebszerstörung dar. Ein sich bildendes, interstitielles Ödem in der Umgebung und eine Ansammlung von freier Flüssigkeit im Läsionsspalt zeigten sich auch bei der scid Maus. Ein Untergang von

Nervenzellen und Makroglia war ebenfalls zu beobachten. Eine fibrozytäre Reaktion zeigte sich auch bei der scid Maus am ersten postoperativen Tag nicht. Die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Läsion erfolgte auch in der scid Maus hauptsächlich von lateral, aus der Umgebung der Meningen. Vereinzelt wurden auch Zellen mit rundem, chromatinreichem Kern und sehr schmalem, stark basophilem Zytoplasma beobachtet. Diese Zellen imponierten in der H.E.-Färbung wie Lymphozyten.



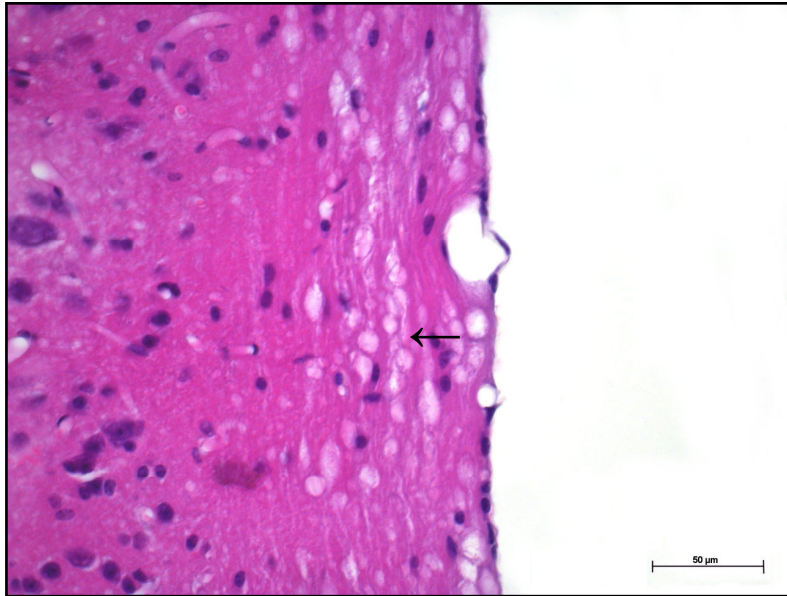
A



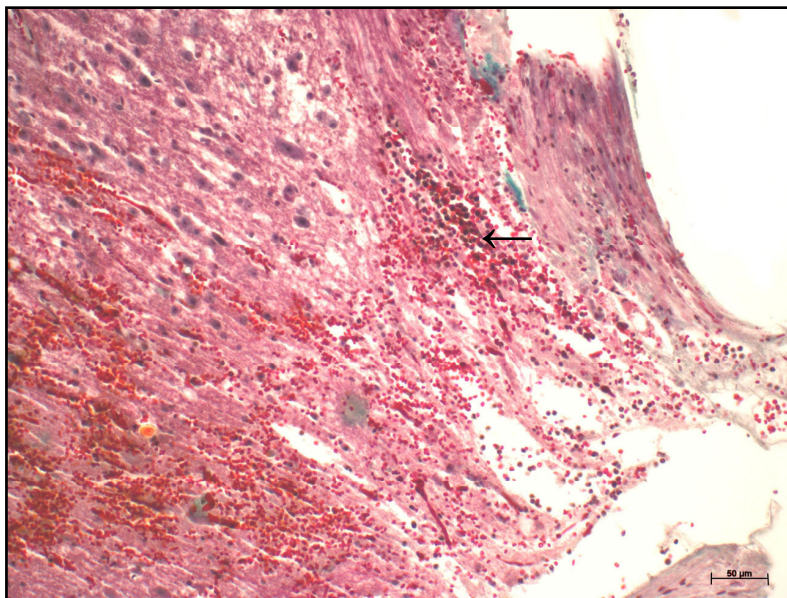
B

Abb. 4.3.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, scid Maus. A In der Läsion sind locker zerstörtes Gewebe und die ödematöse Schwellung zu sehen. H.E.-Färbung. **B** Die kraniale Grenzregion zeigt die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und lymphozytenähnlichen Zellen (←). Die Inflammation erfolgte am ersten postoperativen Tag auch bei der scid Maus überwiegend aus der Umgebung der Meningen. H.E.-Färbung.

Die angrenzenden Regionen kranial und kaudal zeigten bezüglich der Reaktion auf die Läsion ebenfalls keine Unterschiede. Hier standen ebenfalls die ödematöse Schwellung und die Einblutung im Vordergrund. Auch hier zeigte die laterale weiße Substanz eine axonale Schwellung mit Zystenbildung.



A



B

Abb. 4.3.1-2: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, scid Maus. A In der kaudalen Grenzregion ist ipsilateral in der weißen Substanz wie beim Wildtyp die vakuolöse Traktdegeneration zu erkennen (←). H.E.-Färbung. **B** Deutlich ist auch bei der scid Mutante das locker zerstörte Gewebe des Rückenmarks und die massive Einblutung (←) in das Gewebe entlang der Schnittführung zu erkennen. Masson Goldner-Färbung.

Das Kerngebiet der grauen Substanz zeigte kaum pathologische Veränderungen im Vergleich zur kontralateralen Seite, bis auf wenige Neurone, die ebenfalls eine eosinophile, ischämische Neurodegeneration zeigten. Die Infiltration von neutrophilen Granulozyten war äußerst spärlich in diesen Regionen.

Das restliche ipsilaterale Rückenmark zeigte sich ohne Unterschiede zwischen scid Maus und BALB/c Wildtyp. Die laterale weiße Substanz bot kranial ebenfalls für eine gewisse Distanz (in direkter Nähe zur Läsion), das Bild der ödematösen Schwellung der Faserzüge und Axone, teils mit Zysten durchsetzt, welche aber mit zunehmender Entfernung zur Läsion nachließen.

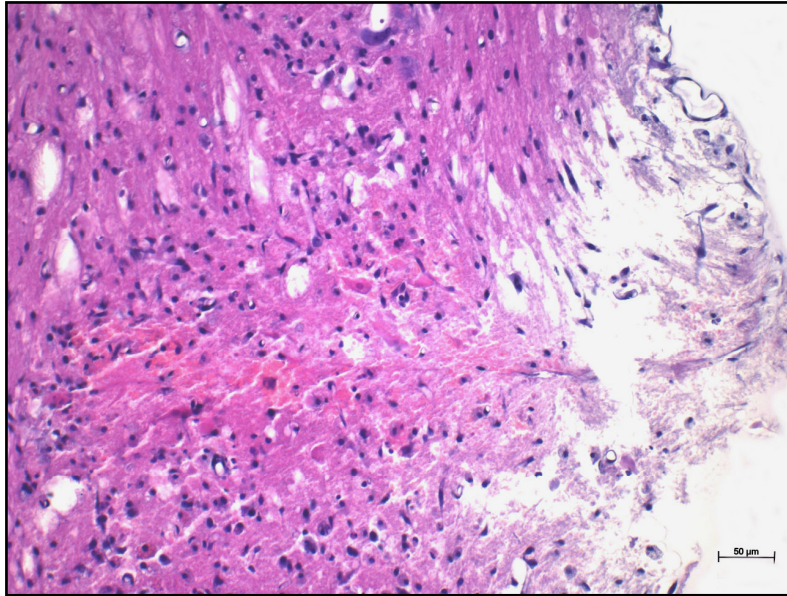
Kaudal war diese Schwellung mit Zystenbildung weit nach kaudal zu beobachten. Auch bei der scid Maus erschien das restliche ipsilaterale Gewebe frei von Zellen einer akuten Entzündung. Es wurden keine neutrophilen Granulozyten oder Lymphozyten beobachtet.

Die kontralaterale Seite zeigte auch bei der scid Maus keinerlei morphologische Veränderung am ersten postoperativen Tag nach Setzen der Läsion.

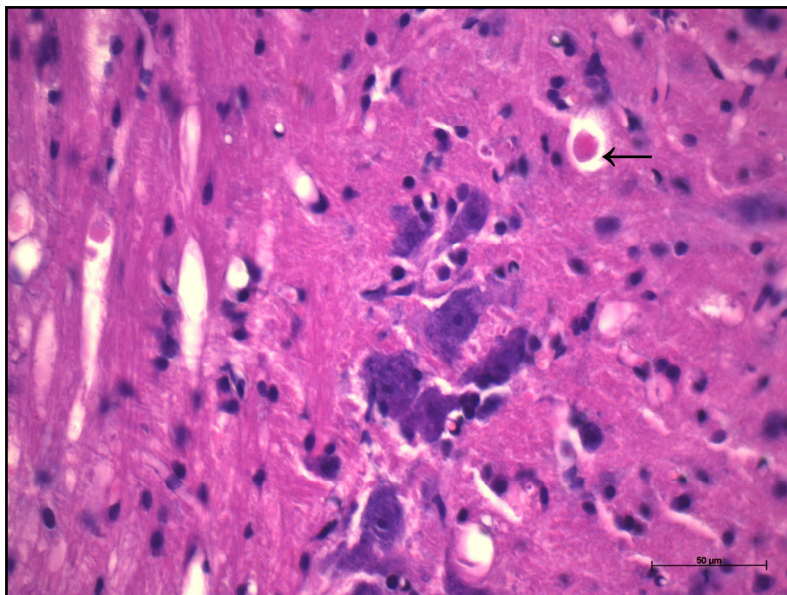
4.3.2 Dritter postoperativer Tag scid Maus

Die Läsion bei der scid Maus, am dritten postoperativen Tag, stellte sich gleich der Läsion bei der Wildtyp BALB/c Maus dar.

Insgesamt erschien die Läsion auch hier geordneter und organisierter als am ersten postoperativen Tag. Die Residuen der Einblutung in Form von Erythrozyten und Fragmentozyten konnten beobachtet werden. Die Inflammation gestaltete sich ähnlich der des Wildtyps. Auch hier wurden nur wenige neutrophile Granulozyten, hauptsächlich perivaskulär gelegen, beobachtet und Schaumzellen traten ebenfalls hauptsächlich medial, in Zentralkanalnähe, auf. Auch am dritten postoperativen Tag zeigten sich ganz vereinzelt noch lymphozyten-ähnliche Zellen in der Läsion. Monozyten waren sichtbar und infiltrierten die Läsion von meningeal. Zusätzlich war ebenfalls eine leichte, fibrozytäre Reaktion zu beobachten, die besonders meningeal eine leichte Ansammlungen von grün gefärbtem Bindegewebe zeigte, das entlang der Schnitfführung nach medial gelangte.

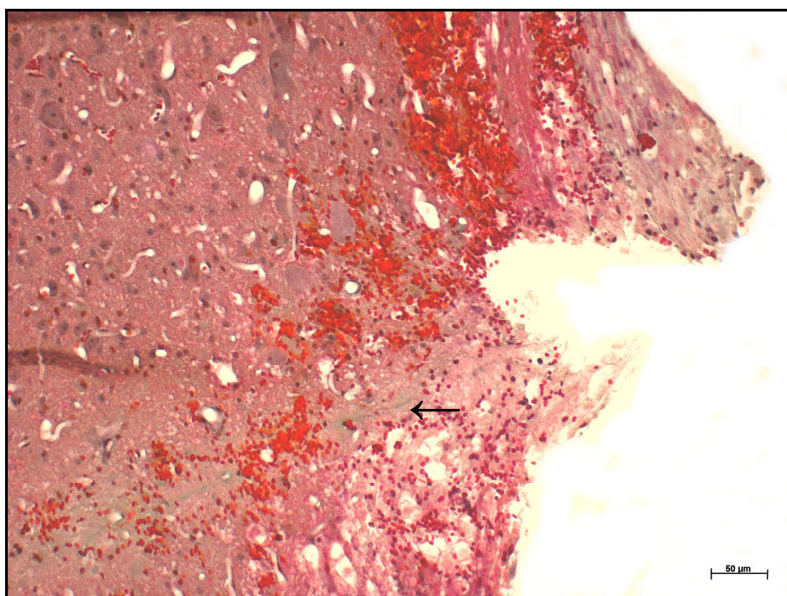


A



B

Abb. 4.3.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, scid Maus. A Läsion. Residuen der Einblutung sind in Form von Fragmentozyten in der Läsion zu identifizieren. H.E.-Färbung. **B** Graue Substanz der kranialen Grenzregion. Auch bei der scid Maus erkennt man am dritten postoperativen Tag eine eosinophile, ischämische Neurodegeneration (←). H.E.-Färbung.



C

Abb. 4.3.2-2: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, scid Maus. C Einblutung und Ödembildung entlang der Schnittführung. Beginnende bindegewebige Narbenbildung (←). Masson Goldner-Färbung.

Die kraniale und die kaudale Grenzregion unterschieden sich nicht von dem Wildtyp. Der laterale Trakt der weißen Substanz zeigte, wie bei dem Wildtyp, eine zystische Veränderung und Spiralisierung einzelner Bündel von Axonen. Die graue Substanz bot dieselben Veränderungen mit neuronalem Zelluntergang, ischämischer Zellveränderung und Tigrolyse. Spindelförmige Fibroblasten zeigten sich in beiden Regionen vermehrt in Nähe der Meningen. Zellen einer akuten Entzündung zeigten sich in diesen Regionen nicht.

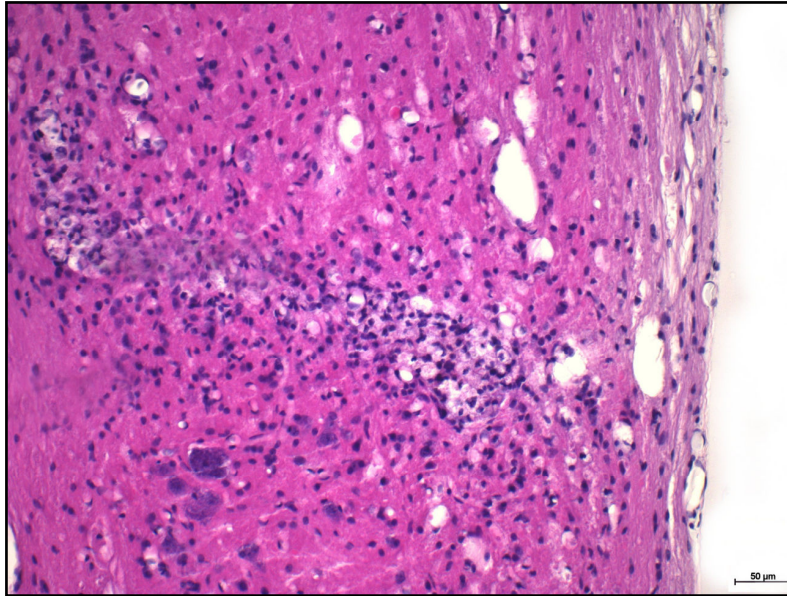
Das restliche ipsilaterale Gewebe unterschied sich bei der scid Maus ebenfalls nicht vom Wildtyp. Auffällig waren auch hier die kaudale Traktdegeneration der lateralen weißen Substanz mit Zystenbildung und die Intaktheit der grauen Substanz.

Die kontralaterale Seite zeigte auch bei der scid Maus am dritten postoperativen Tag nach Läsion keine morphologischen Veränderungen.

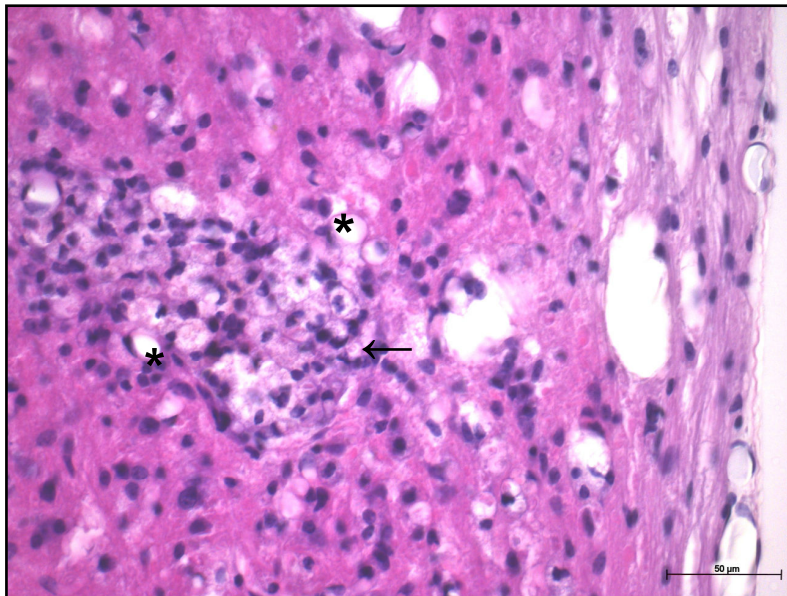
4.3.3 Siebter postoperativer Tag scid Maus

Auch bei der scid Maus erschien die Läsion am siebten postoperativen Tag zellreich und beginnend narbig organisiert. Viele Fibrozyten und Fibroblasten waren in der Läsion, auch hier vorwiegend in Nähe der Meningen, zu sehen. Ebenfalls zeigten sich in der Masson Goldner-Färbung starke, grün gefärbte, bindegewebige Faserzüge entlang der Schnittführung, mit den darin eingebetteten Fibrozyten und Fibroblasten. Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten waren auch in der scid Maus nicht auszumachen. Dafür zeigten zwei von vier Tieren eine Infiltration der Läsion mit Schaumzellen, ebenfalls meist in Nähe des Zentralkanals.

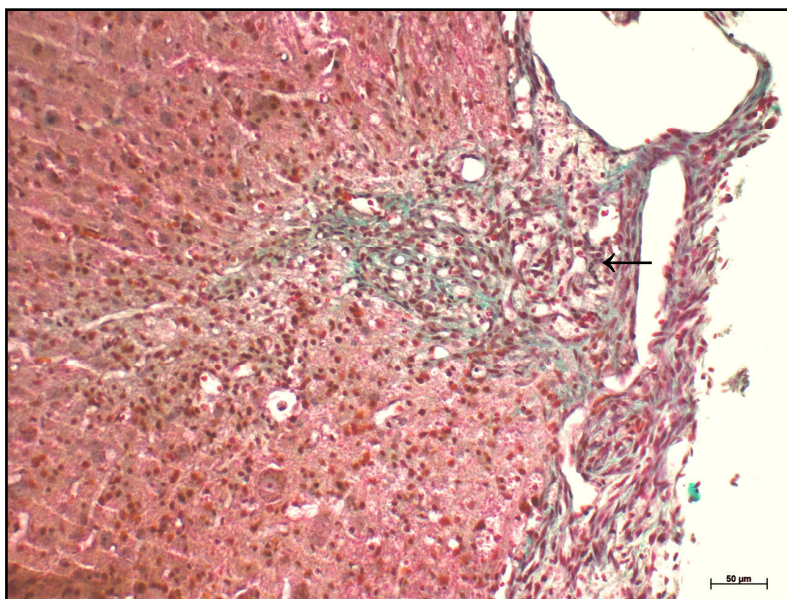
Viele kleinere Gefäße waren auch bei der scid Mutante in der Läsion zu beobachten und vereinzelt zeigten sich auch Zysten in der Läsion.



A



B



C

Abb. 4.3.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, scid Maus. A Läsion und bindegewebige Organisation und Vernarbung. H.E.-Färbung **B** In der Läsion sind viele Fibrozyten und Fibroblasten zu identifizieren (←). Viele kleine Gefäße (*) sind in und um die Läsion zu identifizieren. H.E.-Färbung.

Abb. 4.3.3-2: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, scid Maus. C Besonders meningeal erkennt man neu gebildetes kollagenes Bindegewebe (←) in der Läsion mit Verwachsungen mit umliegendem Gewebe. Masson Goldner-Färbung.

Die kraniale und die kaudale Grenzregion zeigten bei den scid Mäusen ebenfalls das Bild einer stark vermehrten Anzahl von Fibrozyten und Fibroblasten, die hauptsächlich meningeal anzutreffen waren, aber entlang der Schnittführung nach medial einwuchsen. Die weiße Substanz zeigte lateral dieselben Zysten von der Läsion absteigend wie der BALB/c Wildtyp. Auch hier war die graue Substanz frei von pathologischen Veränderungen, zeigte aber ebenfalls eine vermehrte Angiogenese mit kleinen Blutgefäßen. Zellen einer akuten Entzündung zeigten sich in diesen Regionen nicht.

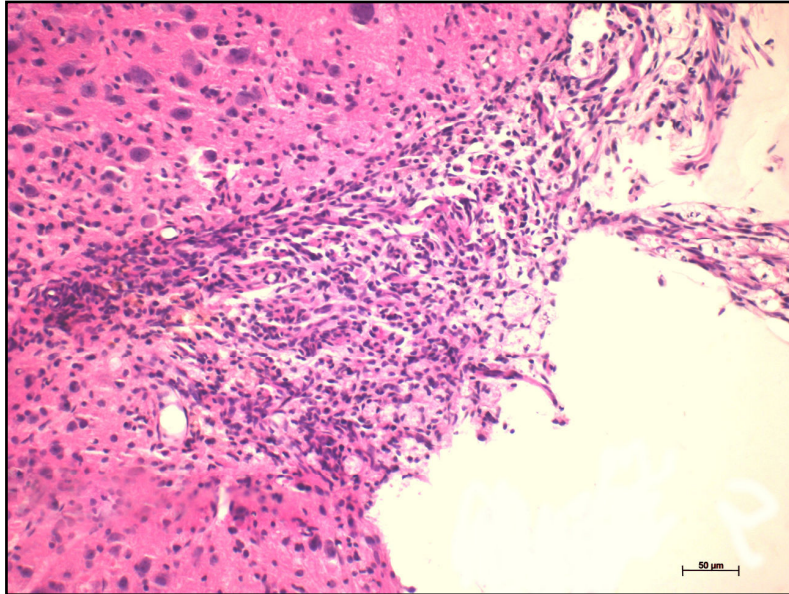
Das restliche ipsilaterale Rückenmarksgewebe war kranial der Läsion in der lateralen weißen Substanz frei von Veränderungen zur unläsionierten Gegenseite. Die graue Substanz zeigte ebenfalls axonale Degeneration in Form von kleinen Zysten mit zentralem rot gefärbtem Gewebe. Eines der vier Tiere zeigte eine zystische Degeneration des medial gelegenen axonalen Gewebes, in Nähe des Zentralkanals kranialwärts aufsteigend. Auch hier lag fraglich eine intraoperative Verletzung der A. spinalis anterior vor. Kaudal der Läsion zeigten sich kaum pathologische Veränderungen im Vergleich zur Gegenseite. Die laterale weiße Substanz zeigte die zuvor beobachtete, kaudale, zystische Veränderung nicht mehr. Die Trakte der weißen Substanz erschienen unverändert zur Gegenseite. Auch die graue Substanz bot keine lichtmikroskopisch auffälligen Veränderungen.

Die kontralaterale Seite zeigte am siebten postoperativen Tag bei einem der vier Tiere ebenfalls kranial der Läsion eine axonale Degeneration. Auch hier waren die typischen Zysten in der grauen Substanz zu sehen. Die restlichen Tiere zeigten keine pathologischen Veränderungen.

4.3.4 Vierzehnter postoperativer Tag scid Maus

Die Läsion der scid Maus stellte sich am vierzehnten postoperativen Tag nach Setzen der Läsion gleich der des Wildtyps dar. Auch hier war eine starke fibroblastäre Reaktion mit Bildung einer festen Narbe festzustellen. Ein Ödem wurde ebenfalls nicht mehr beobachtet, wodurch auch hier die Läsion sehr dezent und geschlossen wirkte. Die Meningen zeigten auch bei der scid Maus eine starke Reaktion mit Verwachsungen mit ihrer Umgebung und vielen Fibrozyten und Fibroblasten. Die Läsion selbst bot, wie schon bei dem Wildtyp beschrieben, wenige

Zysten und ebenfalls einige kleinere Gefäße. Schaumzellen zeigten sich bei einem von fünf Tieren und da besonders zentral, perivaskulär gelegen. Andere Zellen einer akuten Entzündung zeigten sich sonst nicht.



A

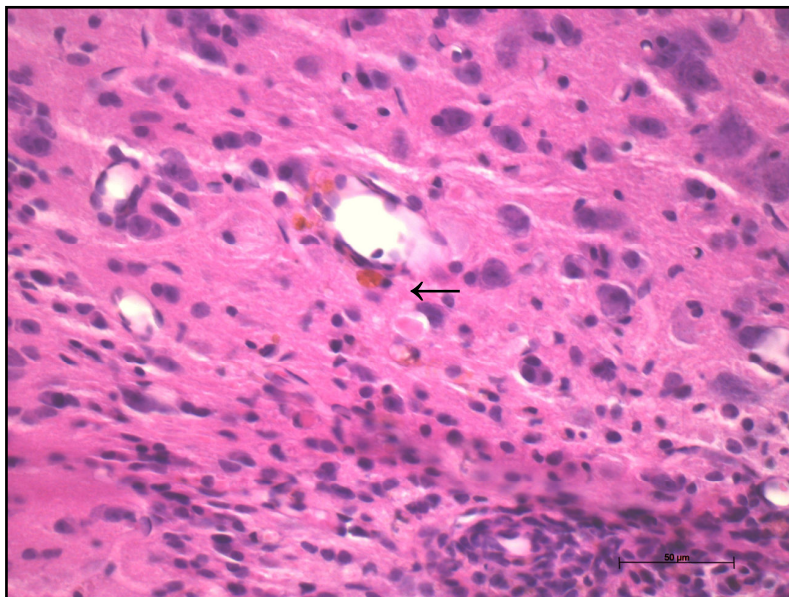


Abb. 4.3.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, scid Maus. A Läsion und die verfestigte bindegewebige Narbe. H.E.-Färbung **B** In der kranialen Grenzregion finden sich bei der scid Maus auch am vierzehnten postoperativen Tag noch perivaskulär gelegene Schaumzellen (←). H.E.-Färbung.

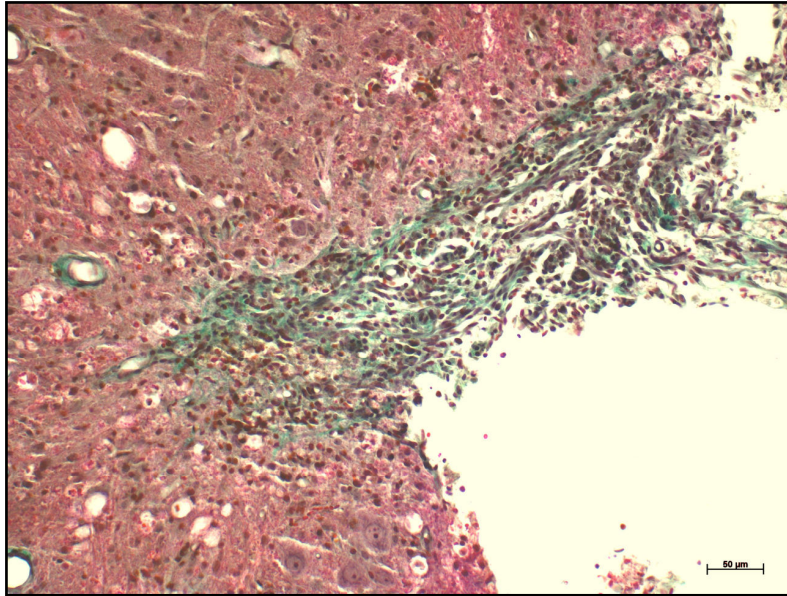


Abb. 4.3.4-2: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, scid Maus. Gut ist die bindegewebige Narbe zu erkennen, die sich wie ein Keil in der Läsion befindet. Masson Goldner-Färbung.

In der kranialen und kaudalen Grenzregion standen ebenfalls die starke meningeal-fibroblastäre Reaktion und die Zystenbildung in der lateralen weißen Substanz im Vordergrund. Auch bei der scid Maus zeigten sich in der grauen Substanz inhomogen gefärbte Neurone (Chromatolyse) und neuronale Zellsklerose. Vereinzelt wurden auch hier Schaumzellen beobachtet.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte sich kranial in der weißen Substanz ohne pathologische Veränderungen zur Gegenseite. In der grauen Substanz waren neuronale Schwellungen und Axondegeneration sichtbar. Kaudal war die Degeneration mit Zystenbildung der lateralen weißen Substanz vordergründig.

Die kontralaterale Seite als Region erschien auch in der scid Maus und am vierzehnten postoperativen Tag ohne morphologische Auffälligkeiten.

4.4 Extrazelluläres Matrixprotein Laminin

4.4.1 Morphologie der anti-Laminin-Färbung am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus

Die immunhistochemische anti-Laminin-Färbung zeigte eine spezifische Färbung der Basallamina der Gefäßwände und der Meningen. Betrachtete man die unläsionierte, kontralaterale Seite der Tiere, zeigte sich von lateral nach medial betrachtet, zuerst

eine selektive Darstellung der meningealen Basalmembran. Diese imponierten durch ihre spezifische Anfärbung und ließen sich so gut vom restlichen Gewebe differenzieren. Die weiße und graue Substanz stellten sich nicht gefärbt dar und waren somit schlecht differenzierbar. Selektiv färbten sich nur die Gefäßwände in beiden Substanzen an. Die Gefäße erschienen gleichmäßig verteilt, homogen schwach gefärbt und besaßen unterschiedlich große Lumina. Es zeigten sich keine Unterschiede im Färbeverhalten der Gefäßwände bezüglich der Regionen des Rückenmarks. In der Medianebene traf man auf die zentralen Gefäße, die ebenfalls schwach positiv gefärbt erschienen.

4.4.2 Morphologie der anti-Laminin-Färbung am Rückenmark der unverletzten scid Maus

Morphologisch betrachtet zeigte die scid Maus keine Unterschiede in der Darstellung der Gefäße und Meningen in der immunhistochemischen anti-Laminin-Färbung. Gefäße und Meningen stellten sich genau wie beim Wildtyp dar und zeigten sich auch gleichmäßig in weißer und grauer Substanz verteilt, mit unterschiedlich großen Lumina. Bezüglich Färbeverhalten und selektiver Darstellbarkeit ergaben sich keine Unterschiede.

4.4.3 Anti-Laminin-Färbung in der BALB/c Maus nach Läsion

4.4.3.1 Erster postoperativer Tag BALB/c Maus

Am ersten postoperativen Tag nach Setzen der Läsion zeigte sich eine deutlich stärkere Anfärbbarkeit der Gefäßwände in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion, beruhend auf einer Hochregulation der Lamininexpression. Viele Laminin-positive Gefäße unterschiedlicher Größe, ließen sich in der Läsion und den beiden angrenzenden Gebieten darstellen. Die restlichen Regionen des Rückenmarks (ipsilateraler, kranialer und kaudaler Rest und kontralaterale Seite) zeigten keine Veränderung im Färbeverhalten und somit in der Expression von Laminin. Sie zeigten sich gleichmäßig homogen gefärbt, ohne Veränderungen im Vergleich zur unläsionierten Gegenseite.



Abb. 4.4.3.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. Das zerstörte Gewebe des Rückenmarks und die selektive Anfärbung der Gefäßwände in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion sind zu erkennen. Deutlich sichtbar ist eine Hochregulation der Lamininexpression der Gefäßwände (←). Immunhistochemische anti-Laminin-Färbung.

4.4.3.2 Dritter postoperativer Tag BALB/c Maus

Am dritten postoperativen Tag zeigte sich ein ähnliches Bild, ebenfalls mit einer noch bestehenden Hochregulation des Laminins in der Läsion und den beiden Grenzregionen. Auch hier ließen sich die Gefäße aufgrund ihrer stärkeren Färbung gut von der Umgebung abgrenzen. Die Färbintensität und die Anzahl der Gefäße unterschieden sich nicht merklich zum ersten postoperativen Tag. Einzelne Gefäße zeigten eine Zunahme des Gefäßdurchmessers. Die restlichen Regionen des Rückenmarks erschienen auch am dritten postoperativen Tag unverändert homogen gefärbt.

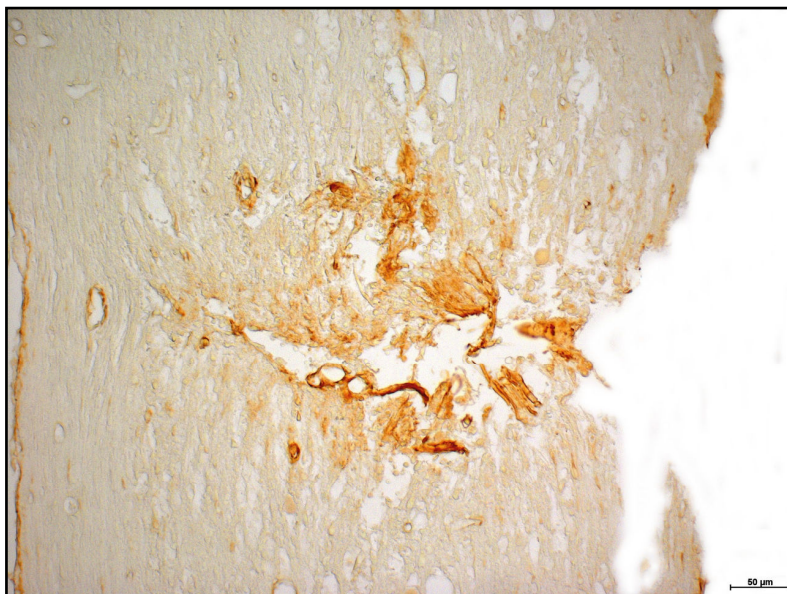


Abb. 4.4.3.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. Die Läsion des Rückenmarks und die selektiv gefärbten Gefäßwände in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion sind zu erkennen. Deutlich sichtbar ist eine Hochregulation der Lamininexpression der Gefäßwände auch am dritten postoperativen Tag. Immunhistochemische anti-Laminin-Färbung.

4.4.3.3 Siebter postoperativer Tag BALB/c Maus

Am siebten postoperativen Tag zeigte sich dagegen eine deutliche Abnahme der Farbeintensität der Gefäßwände in der Läsion. Die Grenzregionen zeigten kaum noch Laminin-positiv gefärbte Gefäße. Größere Gefäße waren als solche gar nicht mehr zu identifizieren. Vielmehr zeigten sich punktförmige, Laminin-positive Granula entlang der sich bildenden Narbe, die nicht mehr an Gefäße assoziiert zu sein schienen, sondern frei im Interstitium lagen. Auch hier waren in den restlichen Rückenmarksregionen keine Veränderungen zu beobachten.

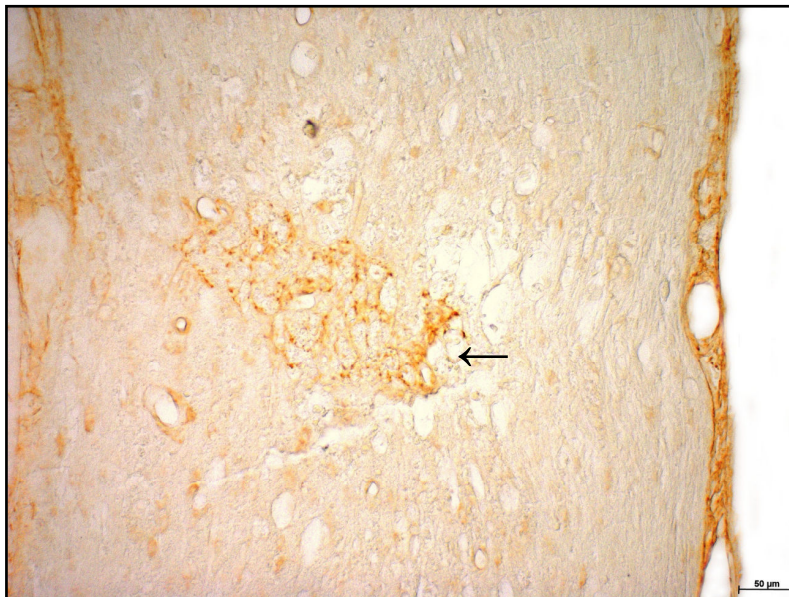


Abb. 4.4.3.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. In der Läsion sind am siebten postoperativen Tag weniger selektiv gefärbte Gefäßwände als an den Vortagen zu erkennen. Vielmehr ist anti-Laminin-positive Granula in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion zu identifizieren, die frei im Interstitium liegt und nicht mehr an Gefäßwände assoziiert ist(←). Immunhistochemische anti-Laminin-Färbung.

4.4.3.4 Vierzehnter postoperativer Tag BALB/c Maus

Der vierzehnte postoperative Tag zeigte ebenfalls wenig Laminin-positive Granula entlang der Narbe. Auch hier erschienen diese punktförmigen Ablagerungen nicht an Gefäße assoziiert zu sein. Gefäße waren in der Läsion und den Grenzregionen kaum zu identifizieren. Insgesamt erwies sich die Läsion am vierzehnten postoperativen Tag jedoch stärker Laminin-positiv als am siebten postoperativen Tag. Die restlichen Regionen des Rückenmarks erwiesen sich auch am vierzehnten postoperativen Tag unverändert.

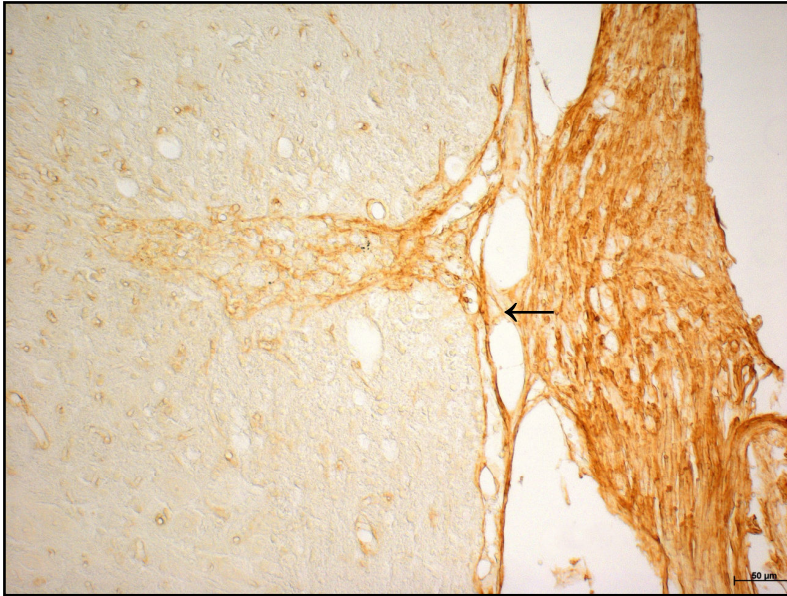


Abb. 4.4.3.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. Die Läsion zeigt am vierzehnten postoperativen Tag keine Hochregulation der Lamininexpression in den Gefäßwänden mehr. Anti-Laminin-positive Granula sind frei im Interstitium der Narbe verteilt. Deutlich sind hier die Verwachsungen der Läsionsnarbe und der Meningen mit dem umliegenden Gewebe zu erkennen(←). Immunhistochemische anti-Laminin-Färbung.

4.4.4 Anti-Laminin Färbung in der scid Maus nach Läsion

4.4.4.1 Erster postoperativer Tag scid Maus

Am ersten postoperativen Tag nach Läsion zeigte die scid Maus dieselbe Reaktion wie der Wildtyp. Es zeigte sich ebenfalls eine deutliche Hochregulation des Laminins in der Läsion selbst, sowie in den beiden Grenzregionen. Auch hier waren somit stark gefärbte, unterschiedlich große Gefäße zu sehen. Die anderen Regionen waren ebenfalls ohne Veränderungen zur Gegenseite und zeigten eine homogene Anfärbung der Gefäßwände und der meningealen Basalmembran.

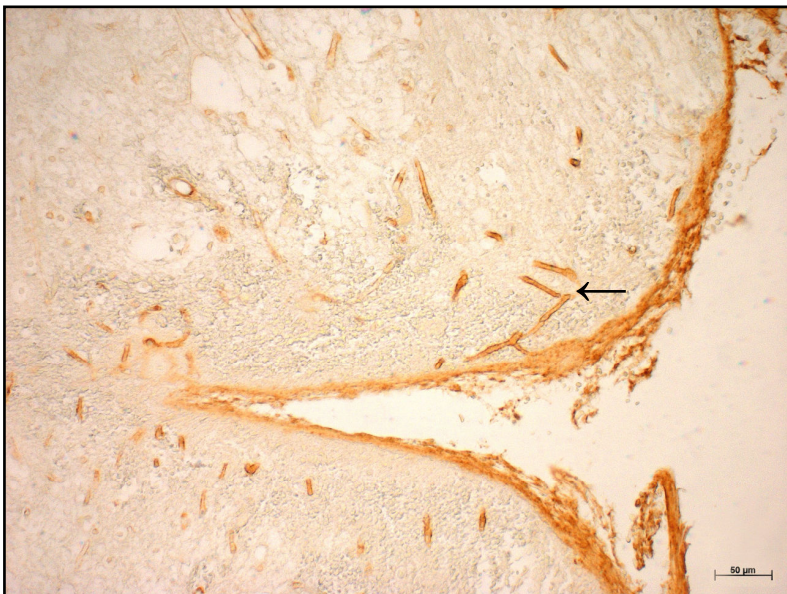


Abb. 4.4.4.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, scid Maus. Zerstörtes Gewebe des Rückenmarks und die selektive Anfärbung der Gefäßwände und der Meningen in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion sind zu erkennen. Auch bei der scid Maus ist eine Hochregulation der Lamininexpression der Gefäßwände deutlich auszumachen(←). Immunhistochemische anti-Laminin-Färbung.

4.4.4.2 Dritter postoperativer Tag scid Maus

Der dritte postoperative Tag bot dasselbe Bild bei der scid Maus wie beim Wildtyp. Auch hier war eine bestehende Hochregulation des Laminins in der Läsion und den beiden Grenzregionen auffällig. Gut waren größere, stark gefärbte Gefäße, in der Läsion und den Grenzregionen sichtbar, wohingegen sich die restlichen Rückenmarksregionen unverändert darstellten.

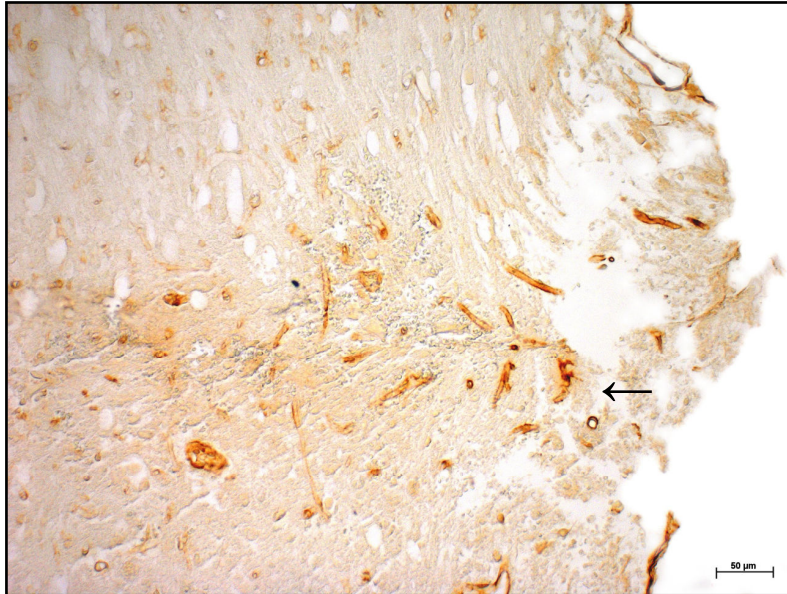


Abb. 4.4.4.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, scid Maus. Die Läsion des Rückenmarks und die selektiv gefärbten Gefäßwände in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion sind zu erkennen. Deutlich sichtbar ist eine Hochregulation der Lamininexpression der Gefäßwände auch am dritten postoperativen Tag (←). Immunhistochemische anti-Laminin-Färbung.

4.4.4.3 Siebter postoperativer Tag scid Maus

Am siebten postoperativen Tag nach Läsion war ebenfalls bei der scid Maus eine deutliche Abnahme der Expression von Laminin zu beobachten. Die beiden Grenzregionen zeigten kaum noch Laminin-positiv gefärbte Gefäße. Vielmehr zeigten sich hier ebenfalls punktförmige, Laminin-positive Granula entlang der sich bildenden Narbe, die nicht mehr an Gefäße assoziiert zu sein schienen, sondern frei im Interstitium lagen. Die restlichen Regionen des Rückenmarks zeigten keine Auffälligkeiten.

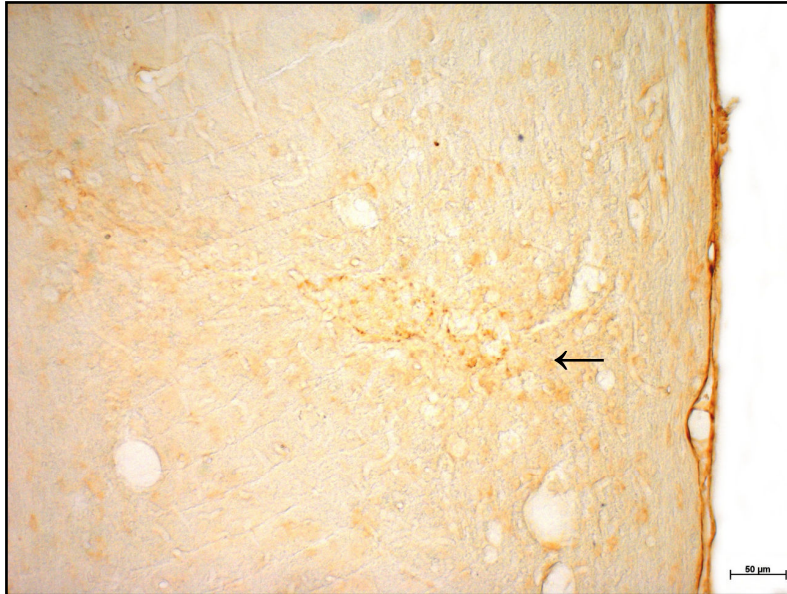


Abb. 4.4.4.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, scid Maus. In der Läsion sind am siebten postoperativen Tag weniger selektiv gefärbte Gefäßwände als an den Vortagen zu erkennen. Vielmehr ist anti-Laminin-positive Granula in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion zu identifizieren, die frei im Interstitium liegt und nicht mehr an Gefäßwände assoziiert ist (←). Immunhistochemische anti-Laminin-Färbung.

4.4.4.4 Vierzehnter postoperativer Tag scid Maus

Vierzehn Tage postoperativ bot sich ebenfalls ein, dem Wildtyp gleiches, Bild. Es zeigte ebenfalls wenig Laminin-positive Granula entlang der Narbe und die Grenzregionen zeigten sich auch hier ohne verstärkte Anfärbung. Auch die restlichen Regionen des Rückenmarks waren am vierzehnten postoperativen Tag frei von pathologischen Veränderungen.

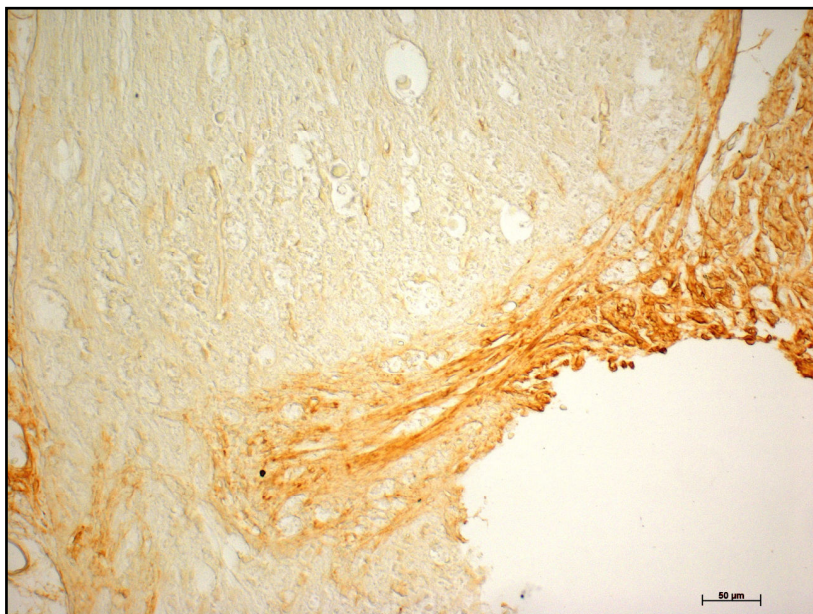


Abb. 4.4.4.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, scid Maus. Die Läsion zeigt am vierzehnten postoperativen Tag keine Hochregulation der Lamininexpression in den Gefäßwänden mehr. Anti-Laminin-positive Granula sind frei im Interstitium der Narbe verteilt. Deutlich sind hier die Verwachsungen der Läsionsnarbe und der Meningen mit dem umliegenden Gewebe zu erkennen. Immunhistochemische anti-Laminin-Färbung.

Insgesamt zeigte die scid Maus keine morphologischen oder quantitativen Unterschiede bezüglich der Lamininexpression und der Darstellung der Gefäßwände und Meningen im Vergleich zum Wildtyp, im zeitlichen Ablauf nach Läsionierung.

4.5 Extrazelluläres Matrixprotein Kollagen Typ IV

4.5.1 Morphologie der anti-Kollagen Typ IV-Färbung am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus

Von lateral nach medial betrachtet färbten sich auf der kontralateralen, unläsionierten Seite der Wildtyp BALB/c Maus zunächst spezifisch das Kollagen Typ IV der Meningen an. Diese erschienen aufgrund ihrer starken spezifischen Anfärbung gut abgrenzbar zum restlichen Gewebe. In der weißen und grauen Substanz waren selektiv die Kollagennetze der Gefäßwände angefärbt. Die Gefäße erschienen gleichmäßig verteilt, besaßen unterschiedlich große Lumina und waren insgesamt schwach homogen gefärbt. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Anfärbbarkeit der Gefäßwände bezüglich der Regionen des Rückenmarks. In der Medianebene traf man auf die ebenfalls schwach homogen gefärbten zentralen Gefäße des Rückenmarks.

4.5.2 Morphologie der anti-Kollagen Typ IV-Färbung am Rückenmark der unverletzten scid Maus

In der anti-Kollagen Typ IV-Färbung zeigten sich bei der scid Maus ebenfalls keine morphologischen oder quantitativen Unterschiede. Die Gefäße ließen sich in gleicher Art und Weise darstellen und zeigten keine Unterschiede bezüglich Anzahl, Größe und Verteilung. Auch die Meningen stellten sich in gleicher Weise wie beim Wildtyp dar.

4.5.3 Anti-Kollagen Typ IV-Färbung in der BALB/c Maus

4.5.3.1 Erster postoperativer Tag BALB/c Maus

Auch am ersten postoperativen Tag nach Läsion zeigte sich eine selektive Anfärbung von Gefäßwänden und der kollagenen Fasern der Meningen. Besonders in der Läsion zeigten sich anti-Kollagen Typ IV gefärbte Gefäße, die deutlich stärker gefärbt erschienen als in den anderen Regionen des Rückenmarks, beruhend auf

einer Hochregulation der Expression von Kollagen Typ IV. Die Gefäße erschienen unterschiedlich groß. Auch in den Grenzregionen waren stark Kollagen Typ IV-positive Gefäße sichtbar. In sämtlichen anderen Regionen des Rückenmarks erschienen die Gefäße homogen und weniger stark gefärbt, gleich der unläsionierten, kontralateralen Seite.



Abb. 4.5.3.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. Das zerstörte Gewebe des Rückenmarks und die selektive Anfärbung des Kollagens Typ IV der Gefäßwände in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion sind sichtbar. Deutlich erkennt man eine Hochregulation der Expression von Kollagen Typ IV in den Gefäßwänden (←). Immunhistochemische anti-Kollagen Typ IV-Färbung.

4.5.3.2 Dritter postoperativer Tag BALB/c Maus

Im Vergleich zum ersten postoperativen Tag zeigte sich am dritten postoperativen Tag in der Läsion keine weitere Hochregulation der Expression von Kollagen Typ IV. Eher stagnierte die Färbeintensität, bzw. war sogar leicht rückgängig. Weniger, dafür aber größere Gefäße, zeigten sich positiv gefärbt. Die restlichen Regionen des Rückenmarks erschienen ohne pathologische Veränderungen.

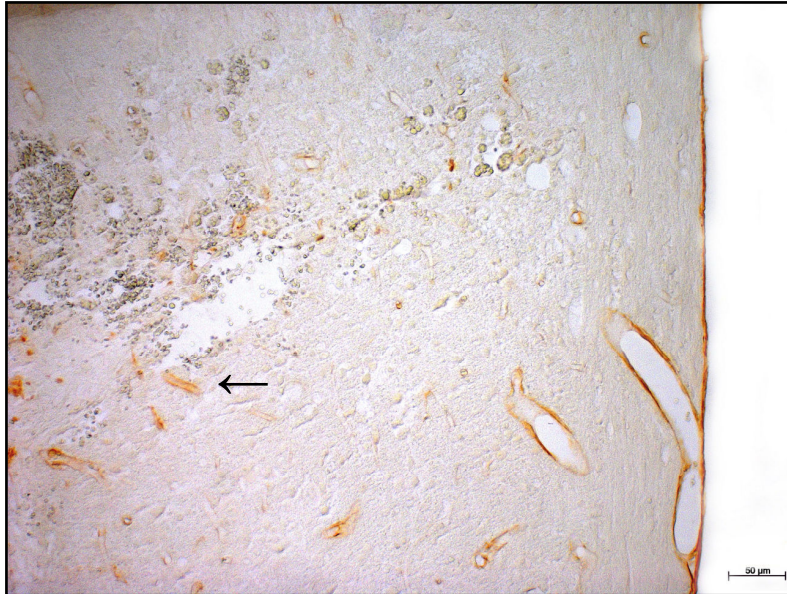


Abb. 4.5.3.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. Die Läsion des Rückenmarks und die selektiv anti-Kollagen Typ IV gefärbten Gefäßwände in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion sind sichtbar (←). Deutlich erkennt man eine Hochregulation der Kollagen IV-Expression der Gefäßwände auch am dritten postoperativen Tag. Immunhistochemische anti-Kollagen Typ IV-Färbung.

4.5.3.3 Siebter postoperativer Tag BALB/c Maus

Am siebten postoperativen Tag zeigten sich kaum noch größere Gefäße selektiv anti-Kollagen IV gefärbt. Vielmehr zeigten sich, wie beim Laminin, auch hier schwach gefärbte Kollagen Typ IV-positive Granula in der Läsion. Diese Granula waren nicht gefäßgebunden, sondern lagen frei im Interstitium. Die beiden Grenzregionen zeigten keine verstärkt angefärbten Gefäßwände mehr. Auch die restlichen Regionen des Rückenmarks erschienen ohne Auffälligkeiten.

4.5.3.4 Vierzehnter postoperativer Tag BALB/c Maus

Am vierzehnten postoperativen Tag waren ebenfalls viele Kollagen Typ IV-positive Granula im Interstitium der Narbe zu identifizieren. Die Gefäßwände größerer Gefäße zeigten sich auch hier nicht mehr selektiv mit anti-Kollagen Typ IV gefärbt. Dafür waren viele kleine Gefäße zu sehen. Die beiden Grenzregionen und die Regionen des restlichen Rückenmarks zeigen am vierzehnten postoperativen Tag keine Veränderungen im Färbeverhalten im Vergleich zur unläsionierten, kontralateralen Seite.

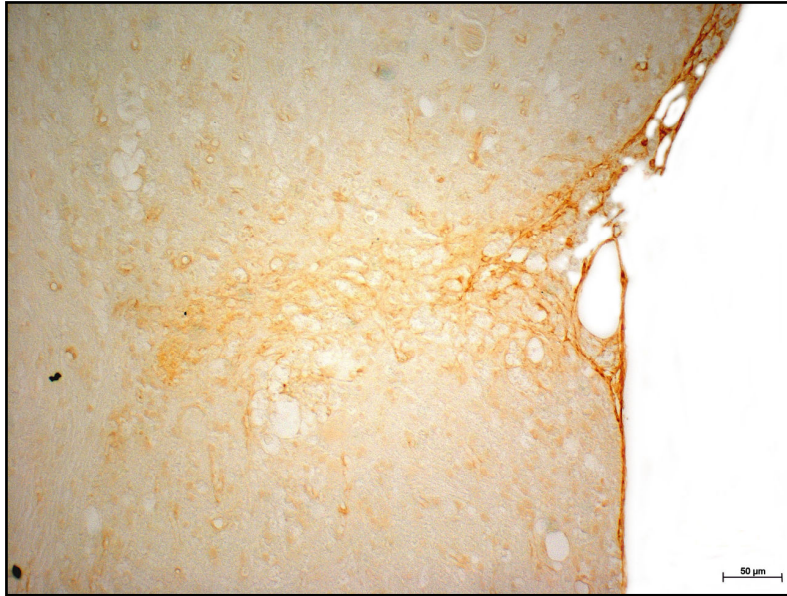


Abb. 4.5.3.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. Die Läsion zeigt am vierzehnten postoperativen Tag keine Hochregulation der Expression von Kollagen Typ IV in den Gefäßwänden mehr. Anti-Kollagen Typ IV-positive Granula ist frei im Interstitium der Narbe verteilt. Immunhistochemische anti-Kollagen Typ IV-Färbung.

4.5.4 Anti-Kollagen Typ IV-Färbung in der scid Maus

4.5.4.1 Erster postoperativer Tag scid Maus

Am ersten postoperativen Tag zeigten sich auch bei der scid Maus, besonders in der Läsion und den kranialen und kaudalen Grenzregion, selektiv anti-Kollagen Typ VI-gefärbte Gefäßwände unterschiedlich großer Gefäße, die deutlich stärker gefärbt erschienen als der homogen gefärbte Rest der Gefäße der restlichen Rückenmarksregionen.

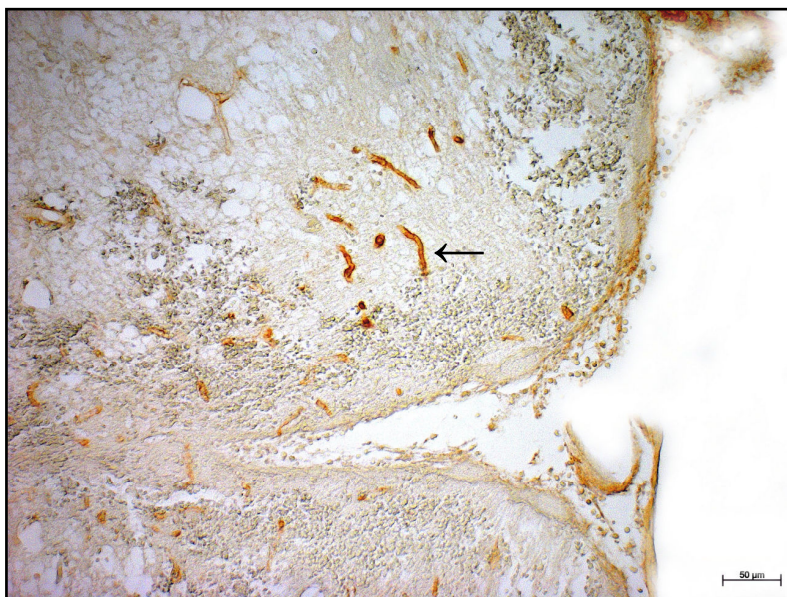


Abb. 4.5.4.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, scid Maus. Die Läsion und das zerstörte Gewebe des Rückenmarks sind sichtbar. Die selektive anti-Kollagen Typ IV-Anfärbung der Gefäßwände in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion ist deutlich zu sehen und man erkennt eine Hochregulation der Expression von Kollagen Typ IV in den Gefäßwänden (←). Immunhistochemische anti-Kollagen Typ IV-Färbung.

4.5.4.2 Dritter postoperativer Tag scid Maus

Am dritten postoperativen nach Läsion war ebenfalls keine weitere Hochregulation der Expression von Kollagen Typ IV in der Läsion oder den beiden Grenzregionen zu beobachten. Auch bei der scid Maus zeigten sich am dritten postoperativen Tag besonders die größeren Gefäße stärker selektiv anti-Kollagen Typ IV gefärbt. Die restlichen Regionen des Rückenmarks zeigten keine Veränderung im Färbeverhalten.

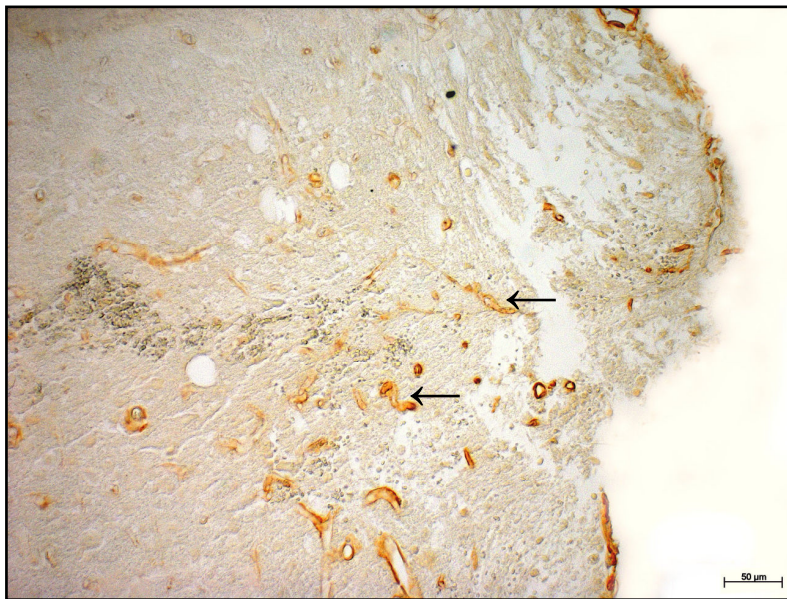


Abb. 4.5.4.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, scid Maus. Die Läsion des Rückenmarks und die selektiv anti-Kollagen Typ IV gefärbten Gefäßwände in der Läsion und der kranialen und kaudalen Grenzregion sind zu sehen (←). Deutlich erkennt man eine Hochregulation der Kollagen Typ IV-Expression der Gefäßwände auch am dritten postoperativen Tag. Immunhistochemische anti-Kollagen Typ IV-Färbung.

4.5.4.3 Siebter postoperativer Tag scid Maus

Am siebten postoperativen Tag nach der Läsionierung des Rückenmarks waren weniger große Gefäße gefärbt, sondern auch hier fielen Kollagen Typ IV-positive Granula in der sich bildenden Narbe auf. Die beiden Grenzregionen zeigten keine verstärkte Anfärbbarkeit von Kollagen Typ IV in den Gefäßwänden mehr. Auch am siebten postoperativen Tag erschienen die restlichen Regionen des Rückenmarks ohne Auffälligkeiten.

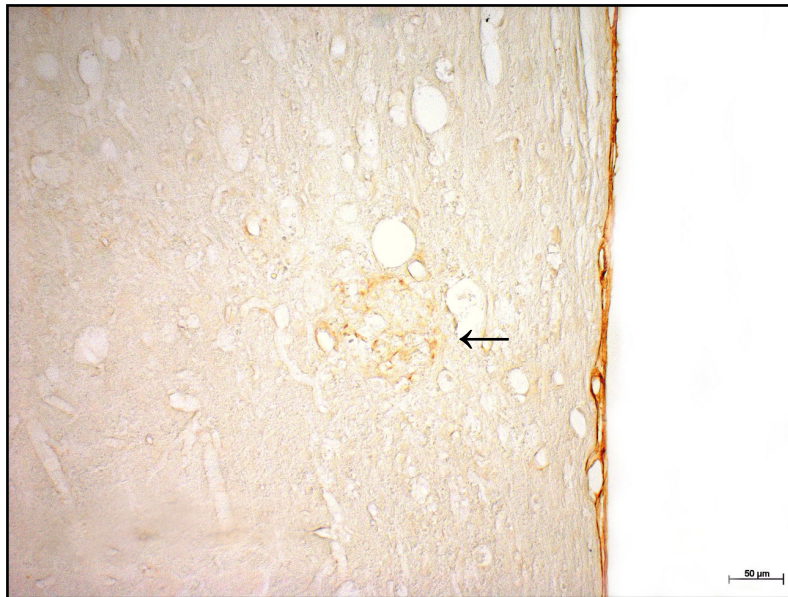


Abb. 4.5.4.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, scid Maus. In der Läsion sind am siebten postoperativen Tag auch bei der scid Maus kaum noch selektiv anti-Kollagen Typ IV gefärbte Gefäße zu erkennen. Kollagen Typ IV positive Granula liegen vielmehr frei im Interstitium der sich bildenden Narbe (←) und waren nicht mehr an Gefäßwände assoziiert.
Immunohistochemische anti-Kollagen Typ IV-Färbung.

4.5.4.4 Vierzehnter postoperativer Tag scid Maus

Vierzehn Tage postoperativ waren diese anti-Kollagen Typ IV-positive Granula ebenfalls noch zu beobachten. Sie lagen frei im Interstitium der sich mittlerweile verfestigten Narbe. Größere Gefäße waren nicht mehr abgrenzbar, dafür waren auch in der scid Maus viele kleinere Gefäße in der Läsion zu beobachten. Die beiden Grenzregionen zeigten kein verändertes Färbeverhalten als die restlichen Regionen des Rückenmarks. Es erschienen schwach homogen gefärbte Gefäße.

Insgesamt zeigte die scid Maus keine morphologischen oder quantitativen Unterschiede bezüglich der Kollagenexpression und der Darstellung der Gefäßwände und der kollagenen Fasern der Meningen im Vergleich zum Wildtyp, im zeitlichen Ablauf nach Läsionierung.

4.6 Makroglia

4.6.1 Morphologie der Astrozyten am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus in der anti-GFAP-Färbung

In der anti-GFAP-Färbung ließen sich Astrozyten spezifisch darstellen. Sie waren sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz darstellbar. Die Astrozyten der weißen Substanz zeigten zahlreiche, schlanke und wenig verzweigte Fortsätze (fibrilläre Astrozyten), die der grauen Substanz erschienen weiter verzweigt und

dicker (protoplasmatische Astrozyten). Insgesamt erschienen die Astrozyten gleichmäßig verteilt und homogen angefärbt. Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des Färbeverhaltes in den unterschiedlichen Regionen des Rückenmarks.

4.6.2 Morphologie der Astrozyten am Rückenmark der unverletzten scid Maus in der anti-GFAP-Färbung

Die Astrozyten stellten sich bei der scid Maus gleich den Astrozyten der BALB/c Maus dar. Ebenfalls waren sie in der weißen und grauen Substanz zu identifizieren und zeigten sich morphologisch identisch. Auch quantitativ war kein Unterschied zwischen scid Maus und Mutante zu erkennen. Auch hier waren die Astrozyten homogen gefärbt und regionale Unterschiede nicht auszumachen.

4.6.3 Anti-GFAP-Färbung in der BALB/c Maus

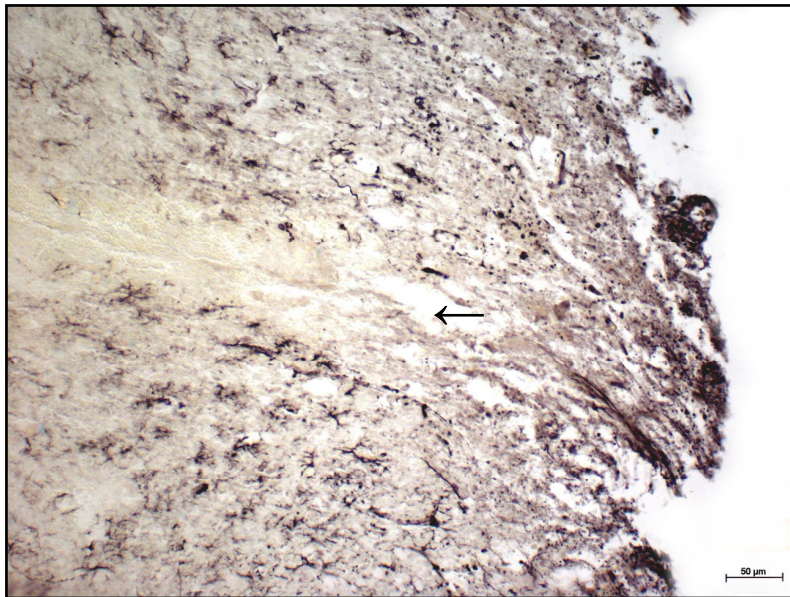
4.6.3.1 Erster postoperativer Tag

In der Läsion waren kaum GFAP-positive Astrozyten zu identifizieren. Es zeigten sich locker zerstörtes Gewebe mit teilweise stark GFAP-positiven Zelltrümmern und Granula im Läsionsspalt.

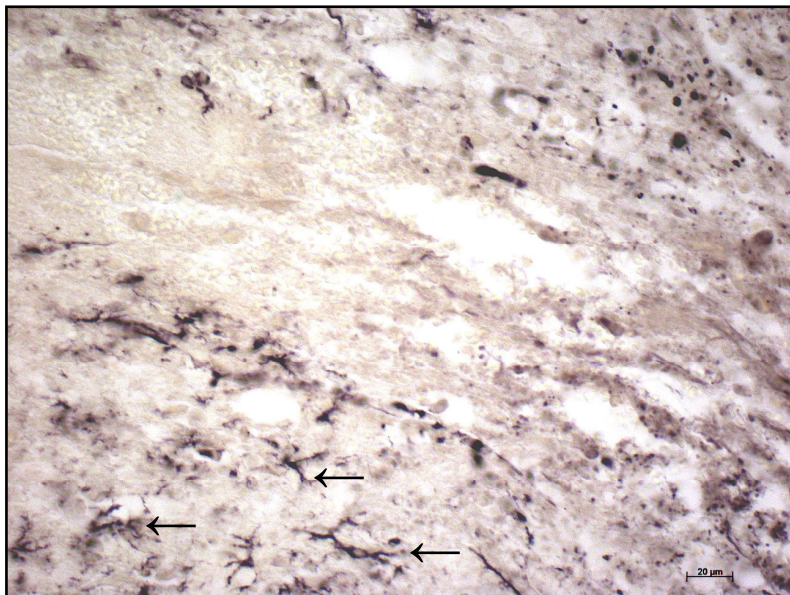
In der kranialen und kaudalen Grenzregion waren ruhende Astrozyten zu identifizieren. Diese zeigten sich mit relativ kleinem Zellkörper und vielen verzweigten Fortsätzen. Vereinzelt waren aktivierte Astrozyten (reaktive Astrozyten), auch Gemistozyten genannt, auszumachen. Diese imponierten durch einen vergrößerten Zellkörper mit mehr Zytoplasma, längeren Fortsätzen und durch die vermehrte Expression von GFAP und die daraus resultierende stärkere Anfärbbarkeit in der immunhistochemischen Färbung. Besonders lateral in der weißen Substanz und im lateralen Bereich der grauen Substanz waren Gemistozyten zu beobachten.

Das restliche ipsilaterale Rückenmarksgewebe zeigte ruhende Astrozyten sowohl kranial als auch kaudal der Läsion.

Auf der kontralateralen Seite waren ebenfalls ausschließlich ruhende Astrozyten zu sehen.



A



B

Abb. 4.6.3.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. **A** Die Läsion und den annähernd zellfreien Läsionsspalt (←) sind zu erkennen. Astrozyten säumen die Läsion in der kranialen und kaudalen Grenzregion. **B** Sichtbar sind der Läsionsspalt und die kaudale Grenzregion. Die Astrozyten in der kaudalen Grenzregion zeigen sich am ersten postoperativen Tag als ruhende Astrozyten(←). **B** Anti-GFAP-Färbung.

4.6.3.2 Dritter postoperativer Tag

In der Läsion waren stark GFAP-positive Granula und vereinzelt stark reaktive Gemistozyten auszumachen.

In der kranialen und kaudalen Grenzregion fanden sich in der weißen und grauen Substanz viele, stark GFAP-positive Gemistozyten entlang des Schnitttrandes. Die Läsion wirkte wie ummauert von reaktiven Astrozyten. Die Zellzahl der Astrozyten erschien im Vergleich zum ersten postoperativen Tag erhöht (Astrogliose).

Im restlichen ipsilateralen Rückenmarksgewebe nahm kranial die Größe der Zelleiber der Astrozyten, sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz, schnell ab. Die Astrozyten erschienen weniger reaktiv, auch die Färbeintensität nahm mit zunehmender Entfernung zur Läsion ab. Im Vergleich zum ersten postoperativen Tag waren die Astrozyten des gesamten Rückenmarks am dritten postoperativen Tag jedoch stärker GFAP-positiv und stärker somit gefärbt.

Im kaudalen Anteil des restlichen ipsilateralen Rückenmarksgewebes waren ebenfalls überwiegend ruhende Astrozyten zu finden, aber auch hier waren sie im Vergleich zum ersten postoperativen Tag stärker gefärbt. In der weißen Substanz waren auch Gemistozyten zu sehen. Diese waren in der weißen Substanz bis weit kaudal zu beobachten.

Auch die kontralaterale Seite zeigte eine verstärkte Anfärbbarkeit der Astrozyten. Auch wenn die kontralateralen Astrozyten morphologisch wie ruhende Astrozyten aussahen, waren sie insgesamt stärker gefärbt als am ersten Tag nach Läsionierung.

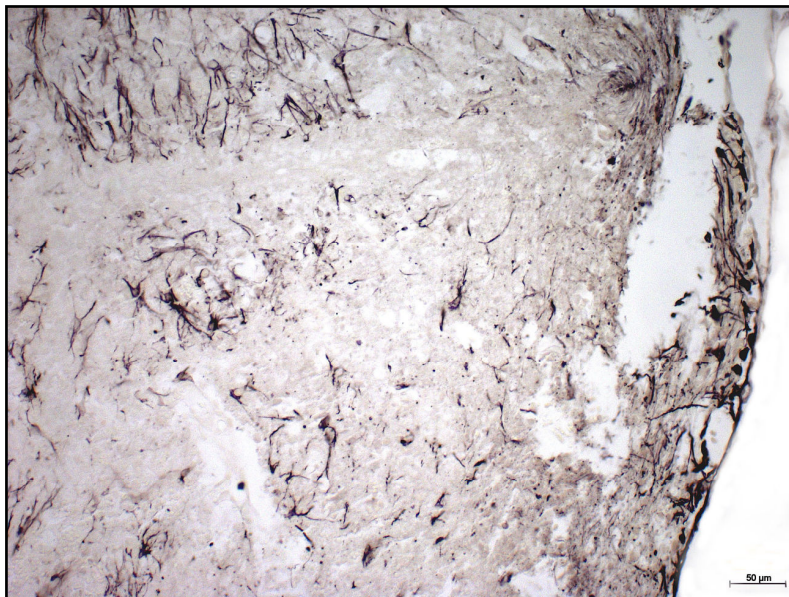


Abb. 4.6.3.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Die Läsion und die umliegende Reaktion der Astrozyten in der kranialen und kaudalen Grenzregion sind zu erkennen. Anti-GFAP-Färbung.

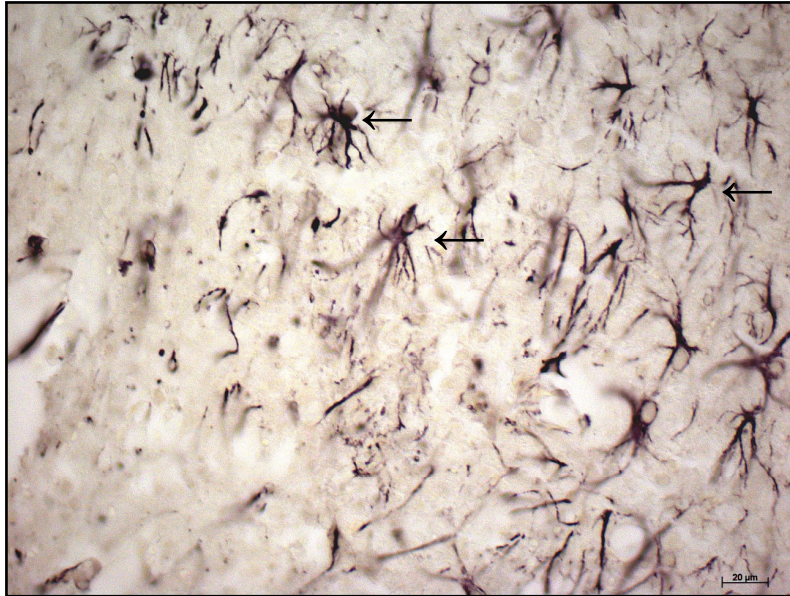


Abb. 4.6.3.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. B Sichtbar ist die kraniale Grenzregion. Die Astrozyten in der Grenzregion zeigen am dritten postoperativen Tag eine Aktivierung. Sie zeigen sich als reaktive Astrozyten (Gemistozyten) (←) mit vergrößertem Zelleib und verlängerten Ausläufern und vermehrter Expression von GFAP. Anti-GFAP-Färbung.

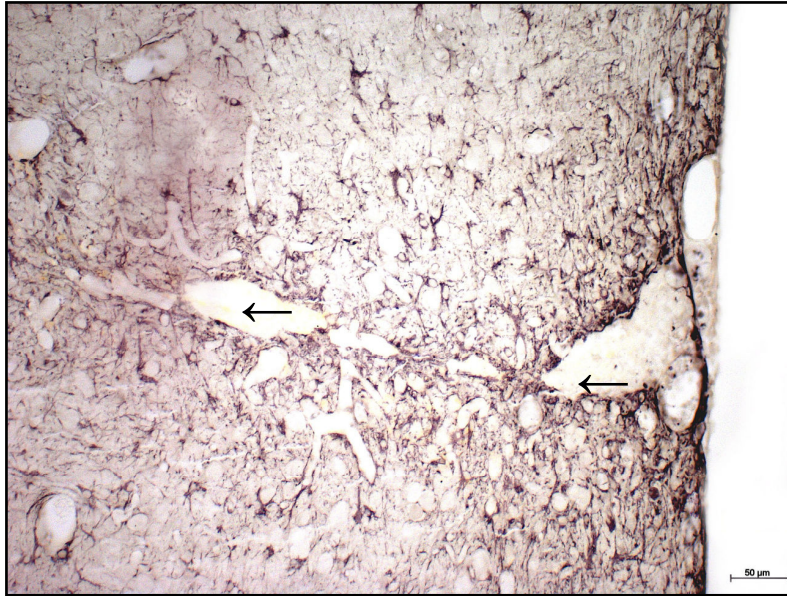
4.6.3.3 Siebter postoperativer Tag

Die Läsion erschien am siebten postoperativen Tag nach Läsionierung kleiner und dezenter. In der Läsion waren keine Astrozyten und auch keine GFAP-positive Granula mehr zu identifizieren.

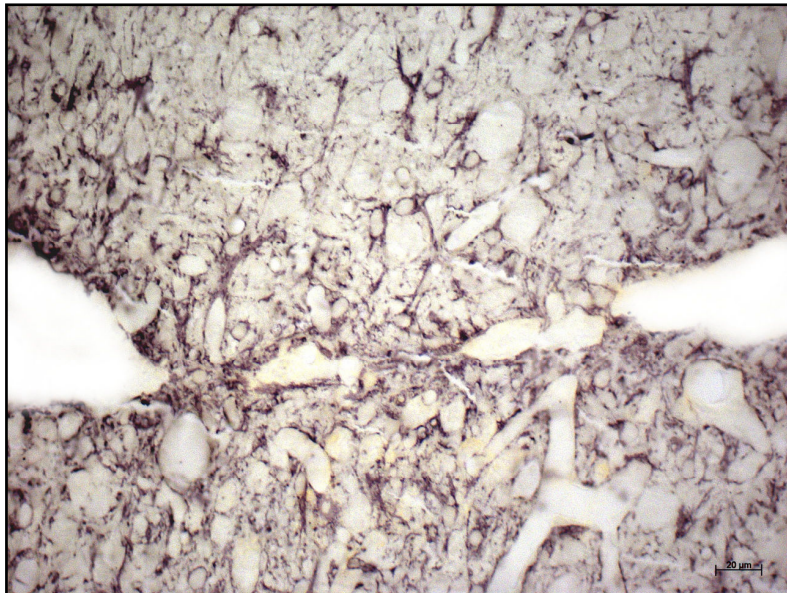
In der kranialen und kaudalen Grenzregion zeigte sich eine deutlich erhöhte Anzahl von schwach GFAP-positiven Astrozyten, die die Läsion fest ummauerten. Die Immunreaktivität der Astrozyten am siebten postoperativen Tag war deutlich geringer als am dritten postoperativen Tag und ähnelte eher wieder dem Bild am ersten postoperativen Tag. Einzelne Gemistozyten waren zu identifizieren, die sich auch nur schwach GFAP-positiv zeigten und besonders um Blutgefäße angeordnet erschienen.

Das restliche ipsilaterale Rückenmark zeigte ruhende Astrozyten sowohl kranial als auch kaudal der Läsion. Insgesamt waren die Astrozyten hier von ihrer Immunreaktivität gleich den Astrozyten der beiden Grenzregionen.

Die kontralaterale Seite bot ebenfalls das Bild ruhender Astrozyten ohne pathologische Veränderungen.



A



B

Abb. 4.6.3.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Zu erkennen ist die Läsion (←) und die umliegende Reaktion der Astrozyten in den Grenzregionen. Es findet eine Vermehrung der Astrozyten statt (Astrogliose). **B** Sichtbar sind die Läsion und die kraniale und kaudale Grenzregion. Die Astrozyten in der Grenzregion zeigen am siebten postoperativen Tag eine Vermehrung. Es zeigen sich sowohl ruhende als auch reaktive Astrozyten (Gemistozysten). Anti-GFAP-Färbung.

4.6.3.4 Vierzehnter postoperativer Tag

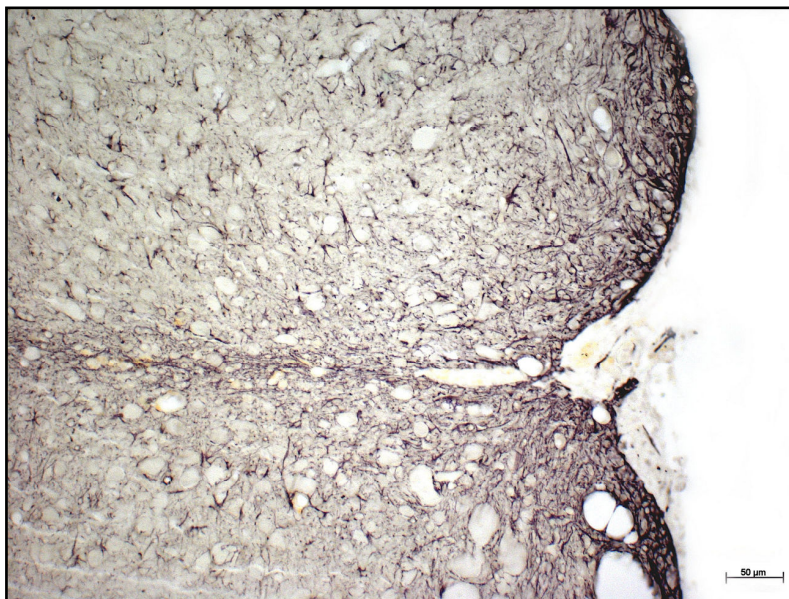
Im Vergleich zum siebten postoperativen Tag nach Läsion fiel auf, dass GFAP-positive Astrozyten am vierzehnten postoperativen Tag auch in der Läsion anzutreffen waren. Inseln stark GFAP-positiver Astrozyten waren in der bindegewebigen Narbe zu erkennen.

In beiden Grenzregionen war die Anzahl der Astrozyten nochmals gestiegen. Auch erschienen diese Astrozyten wieder stärker GFAP zu exprimieren als am siebten postoperativen Tag nach Läsion. Morphologisch erschienen sie jedoch als ruhende

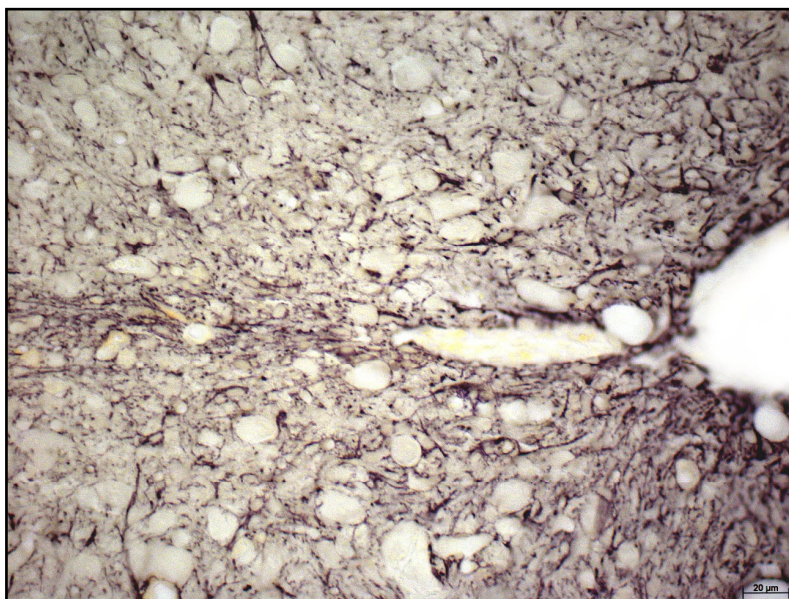
Astrozyten. In der kaudalen Grenzregion waren diese Astrozyten besonders in der lateralen weißen Substanz vorhanden und vereinzelt ließen sich hier auch Gemistozyten identifizieren.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte sich kranial der Läsion ruhende Astrozyten. Kaudal waren besonders in der lateralen weißen Substanz noch Gemistozyten zu identifizieren, die teilweise bis weit kaudal reichten.

Die kontralaterale Seite zeigte ruhende Astrozyten.



A



B

Abb. 4.6.3.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Zu erkennen ist die Läsion und die umliegende Reaktion der Astrozyten in den Grenzregionen. Deutlich erkennt man die stattgefundenen Astrogliose. **B** Sichtbar sind die Läsion und die kraniale und kaudale Grenzregion. Die Astrozyten ummauern die Läsion und beginnen den Gewebsdefekt auszufüllen. Anti-GFAP-Färbung.

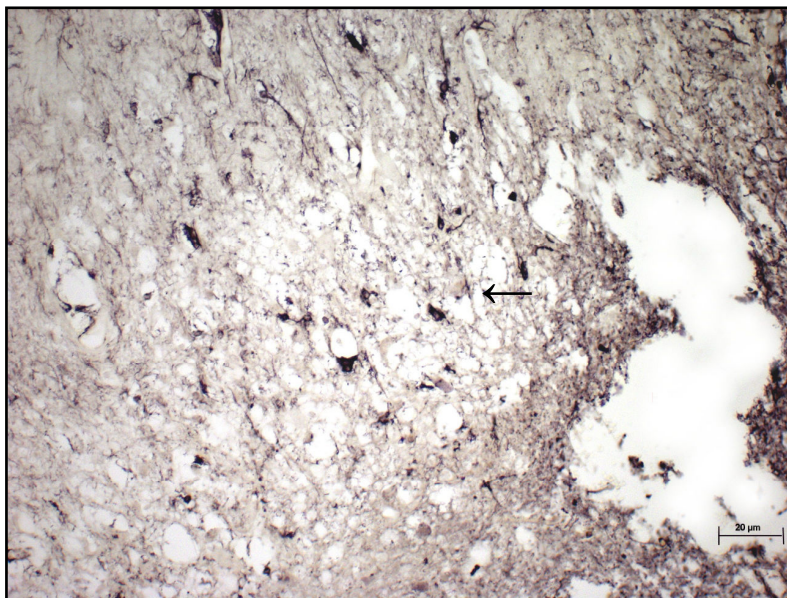
4.6.4 Anti-GFAP Färbung in der scid Maus

4.6.4.1 Erster postoperativer Tag

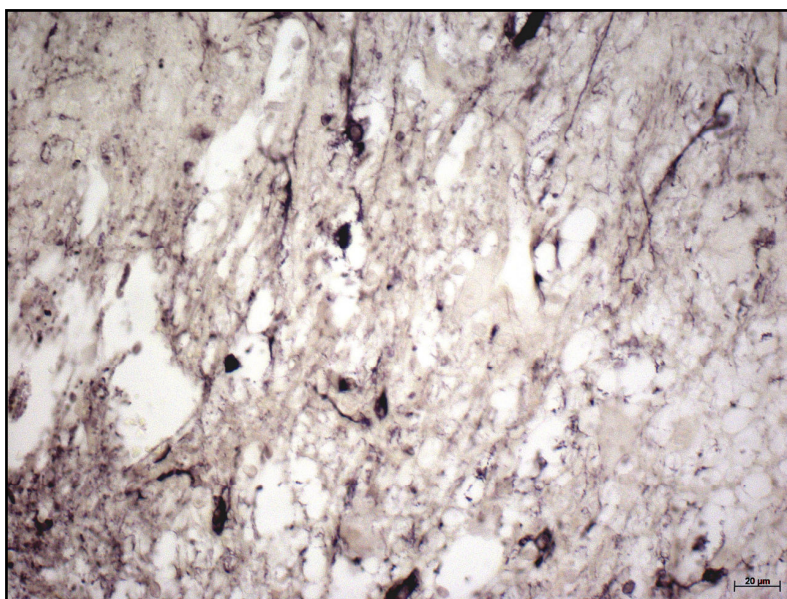
Gleich der BALB/c Maus reagierte die Läsion der scid Maus am ersten postoperativen Tag nach Läsion. Der Läsionsspalt erschien frei von Astrozyten. Es ließen sich jedoch stark GFAP-positive Granula darstellen.

In der kranialen und der kaudalen Grenzregion war eine lokale Aktivierung von Astrozyten zu beobachten. Gemistozyten ließen sich identifizieren.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks und die unläsionierte, kontralaterale Seite zeigten ruhende Astrozyten.



A



B

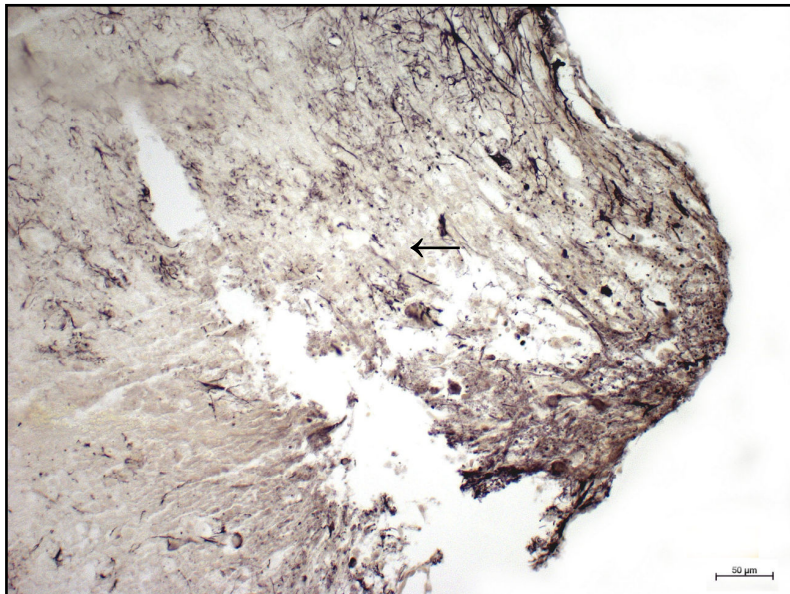
Abb. 4.6.4.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, scid Maus. A In der Läsion (←) erkennt man auch bei der scid Maus keine Astrozyten. Astrozyten säumen die Läsion in der kranialen und kaudalen Grenzregion **B** Sichtbar ist der Läsionsspalt. Man erkennt dass keine Astrozyten in der Läsion anzutreffen sind. Anti-GFAP-positive Zelltrümmer liegen in dem zerstörten Gewebe. Anti-GFAP-Färbung.

4.6.4.2 Dritter postoperativer Tag

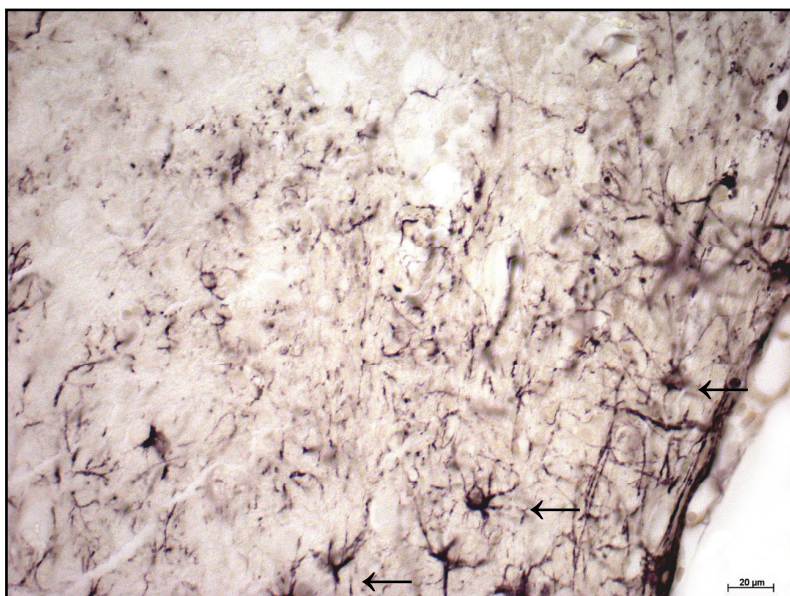
Auch hier war die Läsion selbst frei von Astrozyten. Ebenfalls waren GFAP-positive Granula zu erkennen.

Die beiden Grenzregionen zeigten wie die BALB/c Maus eine starke Reaktion der Astrozyten. Viele Gemistozyten waren zu sehen und insgesamt waren die Astrozyten in Umgebung der Läsion stark GFAP-positiv in ihrer Immunreaktivität.

Auch das restliche ipsilaterale und das kontralaterale Gewebe erschienen verstärkt GFAP-positiv im Vergleich zum ersten Tag nach Läsion, wenngleich in diesen Regionen ebenfalls überwiegen ruhende Astrozyten anzutreffen waren.



A



B

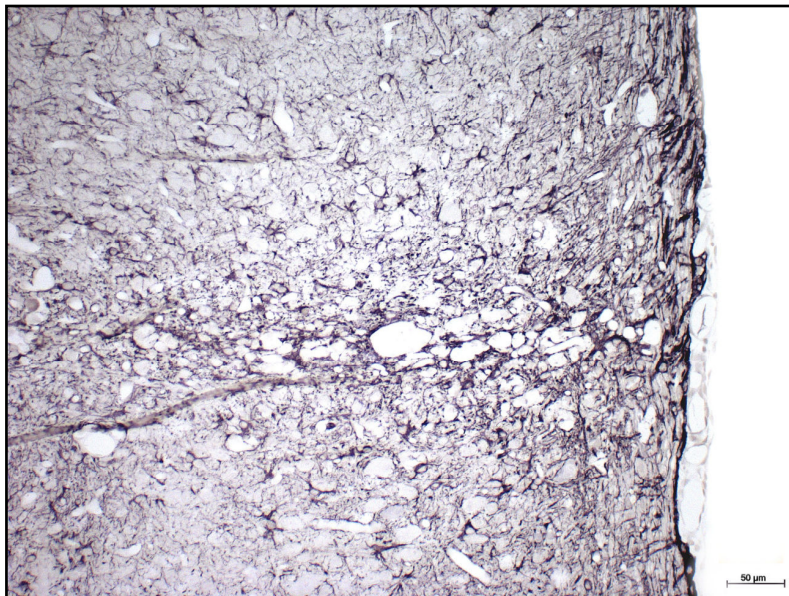
Abb. 4.6.4.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, scid Maus. A Zu erkennen ist die Läsion (←) und die umliegende Reaktion der Astrozyten in den Grenzregionen. **B** Sichtbar ist die kaudale Grenzregion. Die Astrozyten in der Grenzregion zeigen am dritten postoperativen Tag eine Aktivierung. Sie zeigen sich als reaktive Astrozyten (Gemistozyten) (←) mit vergrößertem Zellleib und verlängerten Ausläufern und vermehrter Expression von GFAP. Anti-GFAP-Färbung.

4.6.4.3 Siebter postoperativer Tag

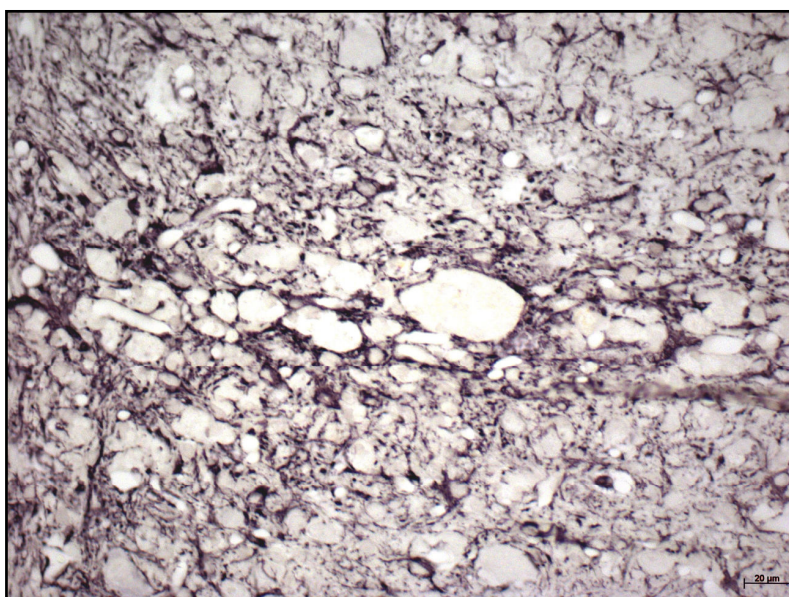
Der Läsionsspalt erschien am siebten postoperativen Tag nach Läsion bei der scid Maus ebenfalls fest verschlossen. Astrozyten wurden in der sich bildenden Narbe nicht beobachtet.

Die astrozytäre Reaktion blieb lokal begrenzt auf die beiden Grenzregionen und es zeigte sich eine vermehrte Anzahl von schwach GFAP-positiven Astrozyten und Gemistozysten, die die Läsion umschlossen.

Das restliche ipsilaterale Gewebe und die unläsionierte kontralaterale Seite zeigten ruhende Astrozyten.



A



B

Abb. 4.6.4.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, scid Maus. A Zu erkennen ist die Läsion und die umliegende Reaktion der Astrozyten in den Grenzregionen. Es findet eine Vermehrung der Astrozyten statt (Astrogliose). **B** Sichtbar sind die Läsion und die kraniale und kaudale Grenzregion. Die Astrozyten in der Grenzregion zeigen am siebten postoperativen Tag eine Vermehrung. Es zeigen sich sowohl ruhende als auch reaktive Astrozyten (Gemistozysten). Anti-GFAP-Färbung.

4.6.4.4 Vierzehnter postoperativer Tag

Die Läsion erschien am vierzehnten postoperativen Tag gut bindegewebig organisiert und auch in der scid Maus zeigten sich Inseln stark GFAP-positiver Astrozyten und Gemistozyten in der Narbe.

Auch in den Grenzregionen zeigten sich stärker GFAP-positive Astrozyten, die die Läsion fest umschlossen und gegen das restliche Gewebe zu isolieren schienen. Insgesamt war die Astroglieose fortgeschritten, was sich in einer weiteren Erhöhung der Zellzahl der Astrozyten äußerte.

Die ipsilaterale weiße Substanz zeigte kaudal der Läsion eine verstärkte Expression von GFAP, teilweise bis weit kaudal reichend.

Das restliche ipsilaterale Gewebe und die kontralaterale Seite zeigten ruhende Astrozyten.

Zwischen Wildtyp BALB/c Maus und scid Maus zeigten sich zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der astrozytären Reaktion auf die Läsion bezüglich der Morphologie, der Anzahl und der zeitlichen Abfolge der Reaktion der Astrozyten.

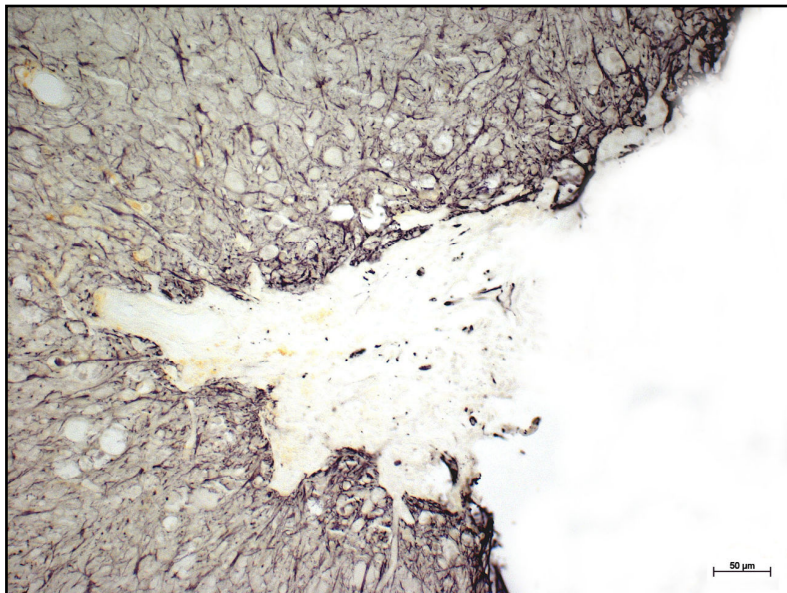


Abb. 4.6.4.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, scid Maus. A Zu erkennen ist die Läsion und die umliegende Reaktion der Astrozyten in den Grenzregionen. Deutlich erkennt man die stattgefundenene Astroglieose. Anti-GFAP-Färbung.

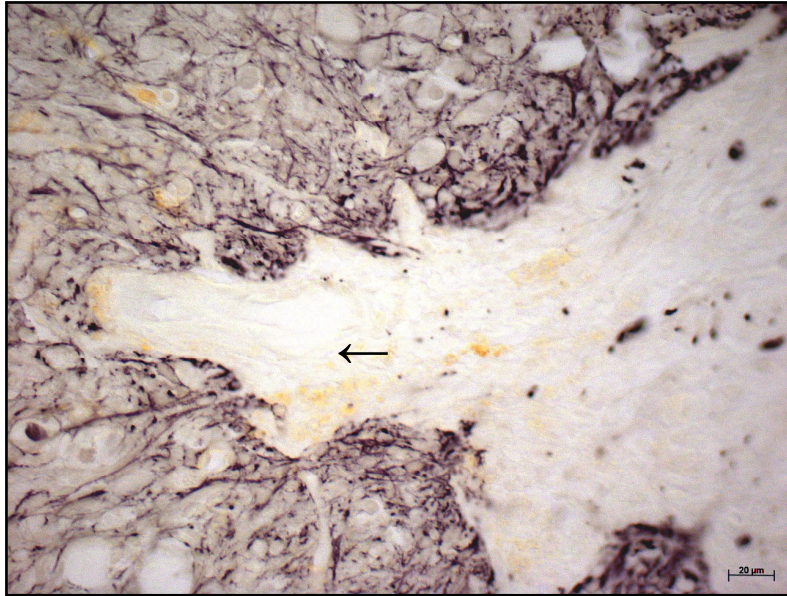


Abb. 4.6.4.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, scid Maus. B Sichtbar sind die Läsion und die kraniale und kaudale Grenzregion. Ein bindegewebiger Keil (←) trennt die ehemaligen Wundränder. Astrozyten ummauern die Läsion. Anti-GFAP-Färbung.

4.6.5 Morphologie der Oligodendrozyten am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus in der anti-CNPase-Färbung

In der anti-CNPase-Färbung ließen sich Oligodendrozyten in der weißen und in der grauen Substanz spezifisch darstellen. Auch das von ihnen produzierte Myelin war spezifisch angefärbt und brachte so indirekt axonale Strukturen zur Darstellung, wodurch sich weiße und graue Substanz gut voneinander differenzieren ließen. Axone selbst zeigten keine spezifische Anfärbbarkeit. In der lateralen weißen Substanz erkannte man gut das spezifisch gefärbte, umhüllende Myelin der Axone mit ihrem longitudinalen Verlauf. In der grauen Substanz waren Axone und Oligodendrozyten spezifisch gefärbt und dazwischen liegend erkannte man regelmäßig CNPase-positive Substanz. Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des Färbeverhaltes der Oligodendrozyten und der Axone in den unterschiedlichen Regionen des Rückenmarks.

4.6.6 Morphologie der Oligodendrozyten am Rückenmark der unverletzten scid Maus in der anti-CNPase-Färbung

In der anti-CNPase-Färbung bei der scid Maus ließen sich Oligodendrozyten und das von ihnen produzierte Myelin ebenfalls spezifisch in der weißen und in der grauen Substanz darstellen. Die weiße Substanz zeigte Oligodendrozyten und die longitudinal angefärbten myelinhaltigen Axon-Scheiden. In der grauen Substanz

waren bei der scid Maus ebenfalls Oligodendrozyten, die Myelin-Scheide der Axone und CNPase positive Substanz gefärbt. Unterschiede in der Immunreaktion der Oligodendrozyten und Axone in den verschiedenen Regionen des Rückenmarks zeigten sich auch bei der scid Maus nicht.

Zwischen scid Mäusen und dem BALB/c Wildtyp zeigten die Oligodendrozyten und das Myelin der Axone keine morphologischen oder quantitativen Unterschiede.

4.6.7 Anti-CNPase-Färbung in der BALB/c Maus

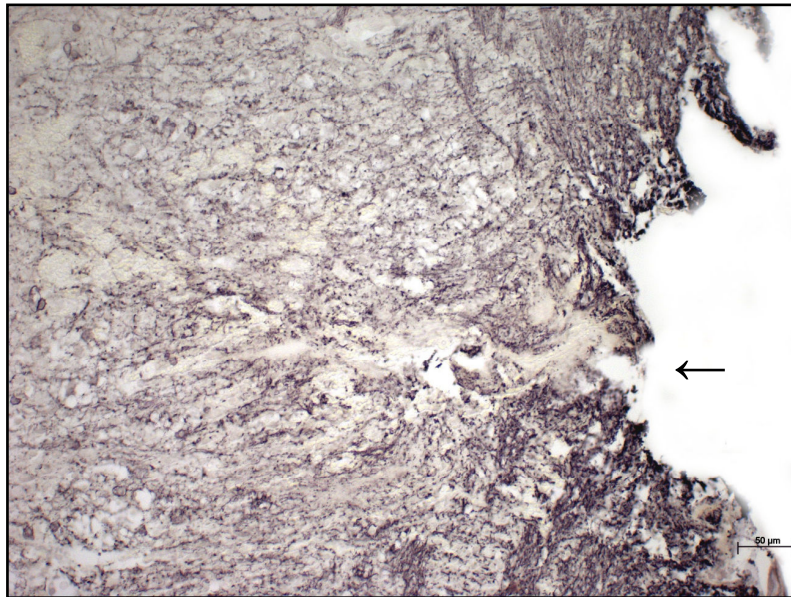
4.6.7.1 Erster postoperativer Tag

Die Läsion war in der anti-CNPase Färbung gut zu erkennen. In der Läsion zeigte sich eine Unterbrechung der myelinisierten Axone in der lateralen weißen Substanz und in der grauen Substanz. Das Myelin der durchtrennten Axone zeigten an ihren Schnittenden eine starke CNPase-positive Anfärbung und machten so die zerstörten Axone der Trakte indirekt sichtbar. Oligodendrozyten waren in der Läsion nicht zu identifizieren.

In den beiden Grenzregionen kranial und kaudal der Läsion zeigten sich in der lateralen weißen Substanz stark mit CNPase-positiver Substanz ummantelte Axone. Deutlich waren auch hier die durchtrennten Enden der Axone zu erkennen, da sich das Myelin hier ebenfalls stärker CNPase-positiv anfärbte. Viele der bereits vorbeschriebenen Zysten (siehe auch H.E.-Färbung) waren in beiden Grenzregionen in der weißen und teilweise in der grauen Substanz zu erkennen. Diese waren von CNPase-positivem Myelin umgeben, enthielten aber keine CNPase-positive Substanz im Inneren, so dass es sich bei diesen Zysten um dystrophe, geschwollene Axone (Axondystrophie, Axonswelling) und um eine Demyelinisierung der Zugrunde gehenden Axone handelt. Die Oligodendrozyten zeigten in beiden Grenzregionen weder in der weißen noch in der grauen Substanz eine Reaktion auf die Läsion am ersten postoperativen Tag.

Das restliche ipsilaterale Rückenmark erschien kranial der Läsion ohne pathologische Auffälligkeiten. Kaudal der Läsion zeigten sich ebenfalls stark CNPase-positive Zysten in der lateralen weißen Substanz, die teilweise bis weit kaudal reichten.

Die kontralaterale Seite erschien am ersten postoperativen Tag ohne pathologisch-morphologische Veränderungen.



A

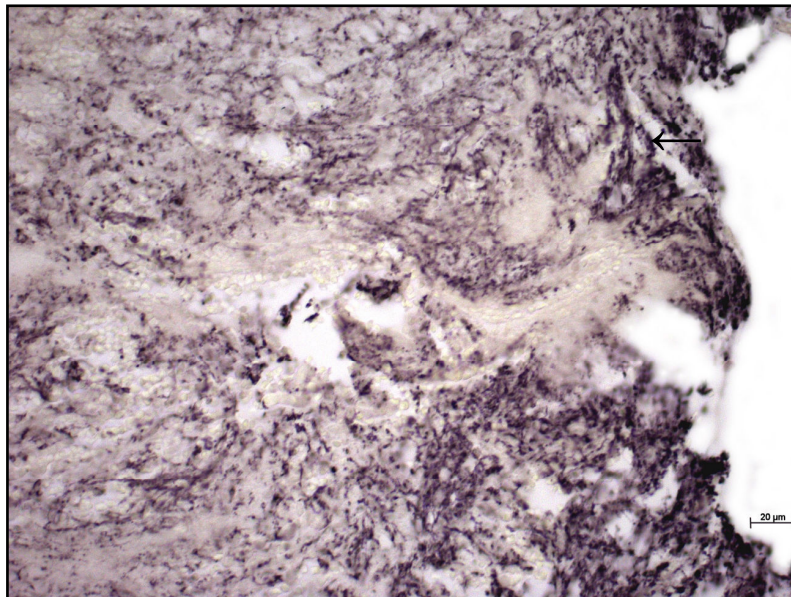


Abb. 4.6.7.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Zu erkennen ist die Läsion mit dem Läsionsspalt (←) und die kraniale und kaudale Grenzregion. **B** Sichtbar sind der Läsionsspalt und die beiden Grenzregionen. Das Myelin der durchtrennten Axone zeigt an ihren Enden eine starke anti-CNPase-positive Anfärbung (←). Die Oligodendrozyten zeigen in der anti-CNPase-Färbung keine Reaktion auf die Läsion am ersten postoperativen Tag. Anti-CNPase-Färbung.

4.6.7.2 Dritter postoperativer Tag

Am dritten postoperativen Tag war in der weißen und der grauen Substanz ebenfalls noch das Myelin der freien Schnittenden der durchtrennten Axone zu erkennen. Insgesamt erschien die Läsion aber weniger scharf begrenzt als am ersten postoperativen Tag. Das Myelin der freien Schnittenden der Axone zeigte sich

weniger stark CNPase-positiv gefärbt als am ersten postoperativen Tag. Oligodendrozyten zeigten sich nicht in der Läsion.

In den beiden Grenzregionen zeigten sich Zysten in der lateralen weißen und in der grauen Substanz, die ebenfalls von CNPase-positivem Myelin umgeben waren und keine Anfärbung im Inneren zeigten. Auch am dritten postoperativen Tag zeigten die Oligodendrozyten keine morphologischen Veränderung auf die Läsion.

In dem restlichen ipsilateralen Rückenmarksgewebe waren kranial in der weißen und grauen Substanz keine Veränderungen in der Expression von CNPase in den Oligodendrozyten zu beobachten. Kaudal zeigten sich die myelin-ummantelten Zysten in der lateralen weißen Substanz, die teilweise bis weit kaudal reichten.

Die kontralaterale Seite des Rückenmarks blieb auch am dritten postoperativen Tag ohne morphologische und immunreaktive Veränderungen.

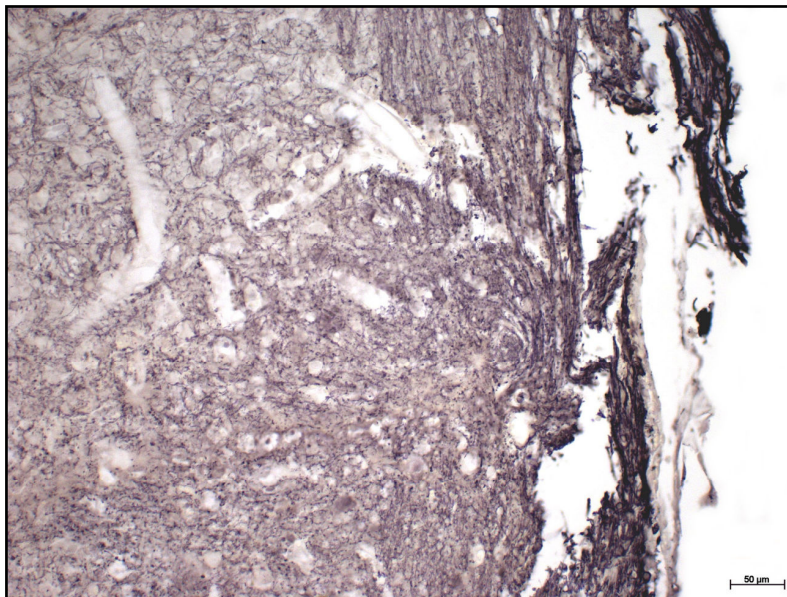


Abb. 4.6.7.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Zu erkennen ist die Läsion und die kraniale und kaudale Grenzregion. Anti-CNPase-Färbung.

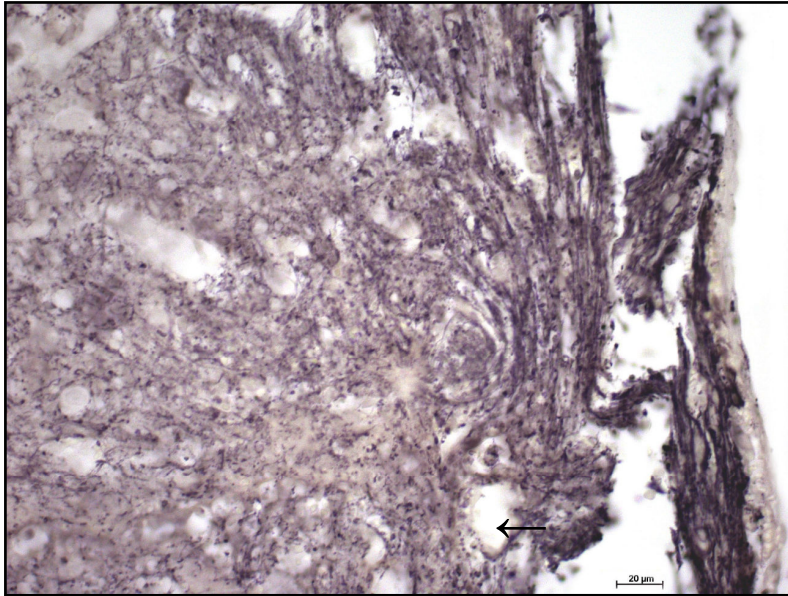


Abb. 4.6.7.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. B Das Myelin der Axone zeigt sich am dritten postoperativen Tag weniger stark anti-CNPase-positiv gefärbt an den durchtrennten Axonenden als Zeichen des Untergangs von Oligodendrozyten und der einhergehenden Demyelinisierung. Die Zysten (←) in der weißen Substanz zeigen sich von anti-CNPase-positivem Myelin umgeben (Axondystrophie/Demyelinisierung). Anti-CNPase-Färbung.

4.6.7.3 Siebter postoperativer Tag

Am siebten postoperativen Tag war die Läsion als solche kaum noch zu erkennen. Es fand fast keine Immunreaktivität mehr in der Läsion statt. Insgesamt war deutlich weniger CNPase-positiv Substanz auszumachen als am ersten und dritten postoperativen Tag als Zeichen der Apoptose von Oligodendrozyten und der damit einhergehenden Demyelinisierung von Axonen. Die laterale weiße Substanz zeigte weiterhin indirekt unterbrochene axonale Strukturen, die jedoch geordneter verliefen als noch am dritten postoperativen Tag und meist einen longitudinalen Verlauf aufwiesen.

Die Läsion selbst erschien frei von Oligodendrozyten und zeigte vereinzelt CNPase-positiv Substanz in der beginnenden bindegewebigen Narbe.

In den Grenzregionen zeigte sich ebenfalls eine deutlich geringere Immunreaktivität auf die Läsion als noch am dritten postoperativen Tag. Einzelne Axon zeigten indirekt eine Schwellung und imponierten mit vergrößertem Durchmesser und waren zystisch verändert. Die Zahl und Morphologie und Zellanzahl der Oligodendrozyten änderte sich in den Grenzregionen in der weißen und grauen Substanz auch am siebten postoperativen Tag nach Läsion nicht. Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte kranial, in Nähe zur Läsion, kleine Zysten in der lateralen weißen Substanz. Kaudal der Läsion waren diese Zysten im lateralen Trakt teilweise bis weit kaudal zu beobachten.

Die kontralaterale Seite wies auch am siebten postoperativen Tag keine morphologischen Veränderungen auf.

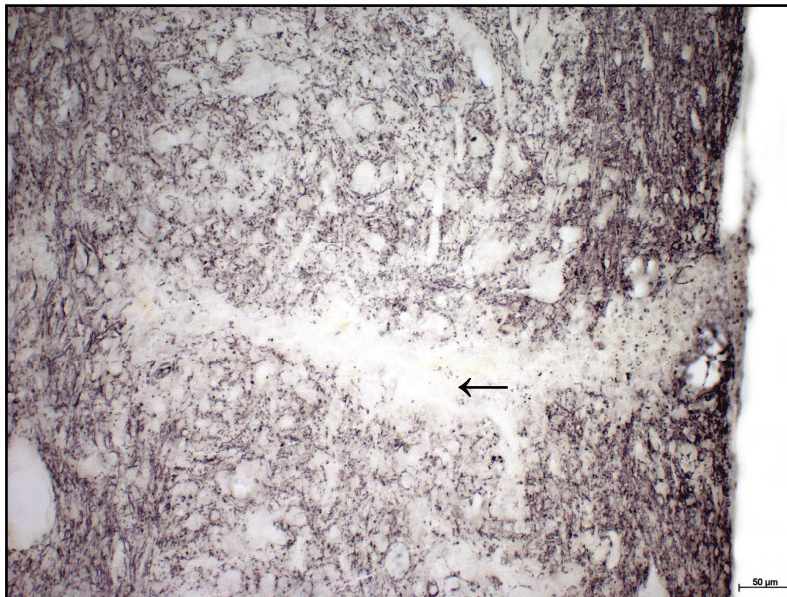
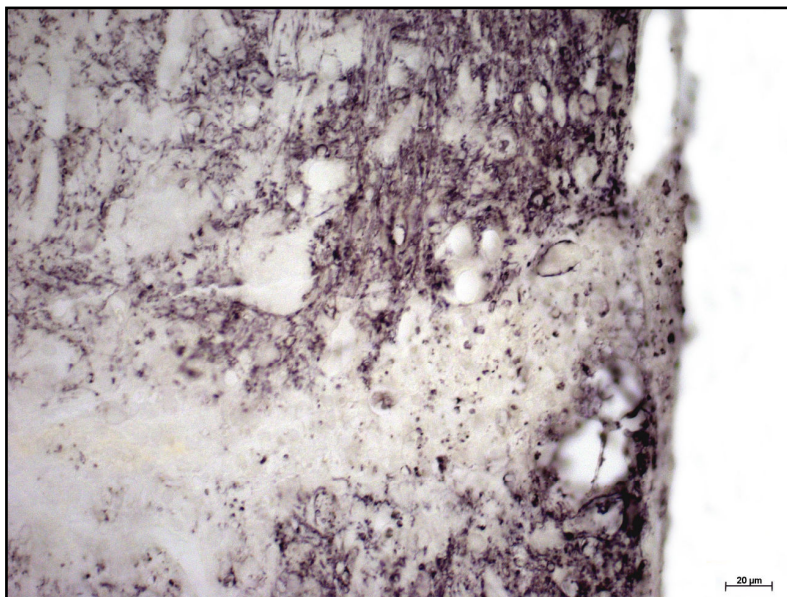


Abb. 4.6.7.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. **A** Zu erkennen ist die Läsion und die kraniale und kaudale Grenzregion. Der Läsionsspalt (←) erscheint

frei von Oligodendrozyten und anderer anti-CNPase-positiver Substanz. **B** Das Myelin der Axone zeigt sich am siebten postoperativen Tag homogen anti-CNPase-positiv gefärbt. Deutlich sind die durchtrennten Enden der Axone in beiden Grenzregionen zu erkennen. Die beginnende Narbe trennt die freien Enden der Axone. Im Läsionsspalt erkennt man wenig anti-CNPase- positive Granula. Die Zysten in der weißen Substanz zeigen sich von anti-CNPase positivem Myelin umgeben (Axondystrophie und Apoptose von Oligodendrozyten). **B** Anti-CNPase-Färbung.



4.6.7.4 Vierzehnter postoperativer Tag

Die Läsion zeigte sich am vierzehnten postoperativen Tag verfestigt. Die Trakte der lateralen weißen Substanz blieben, von der starken bindegewebigen Narbe getrennt, unterbrochen. Die Distanz zwischen den durchtrennten Enden der Axone nahm durch das zunehmende Bindegewebe zu. Die Läsion erschien frei von CNPase-

positiver Substanz und somit auch von Oligodendrozyten, bedingt durch ihren Zelluntergang in der Läsion.

In den Grenzregionen zeigte sich kranial das Myelin der durchtrennten Axone an ihrem Schnittende abgerundet. Die Anzahl der Oligodendrozyten und ihre Morphologie zeigten sich auch am vierzehnten postoperativen Tag unverändert.

Es zeigte sich eine scharfe Grenze zwischen Axonen, grauer Substanz und bindegewebiger Narbe. Am Übergang der abgerundeten Axone zur Narbe waren feine, stark CNPase-positive Granula zu sehen. Viele myelin-ummantelte Zysten waren in der weißen und grauen Substanz kranial der Läsion auszumachen. Auch fielen viele größere Blutgefäße in der grauen Substanz auf, die in Umgebung der Narbe anzutreffen waren.

Kaudal der Läsion zeigten sich in der lateralen weißen Substanz ebenfalls feine CNPase-positive Granula. Die Axone waren als solche nur noch schlecht zu differenzieren und große Zysten zeigten sich in Läsionsnähe. Auch in der grauen Substanz waren diese Zysten kaudal der Läsion zu beobachten.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte sich kranial ohne Veränderungen zu den postoperativen Vortagen. Kaudal zeigte die laterale weiße Substanz bis weit kaudal der Läsion CNPase-positive granulöse Einschlüsse und Zysten.

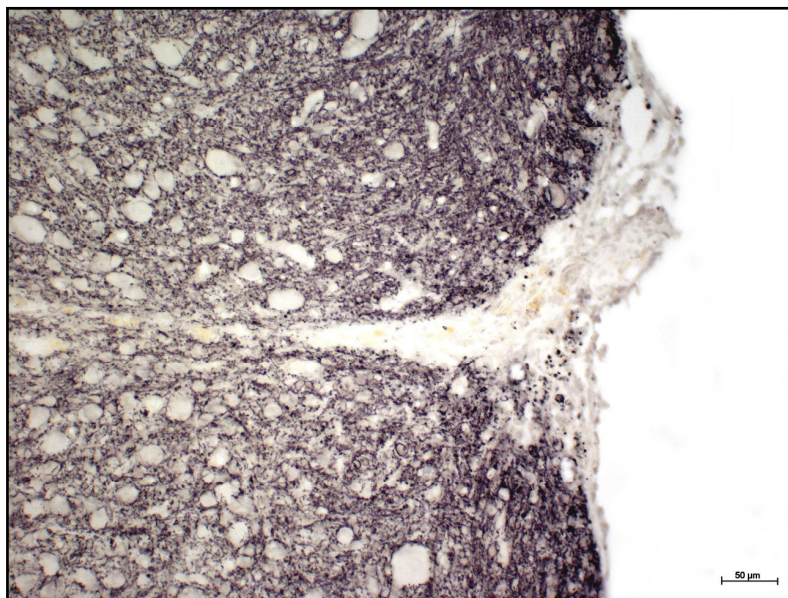


Abb. 4.6.7.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Zu erkennen ist die Läsion und die kraniale und kaudale Grenzregion. Anti-CNPase-Färbung.

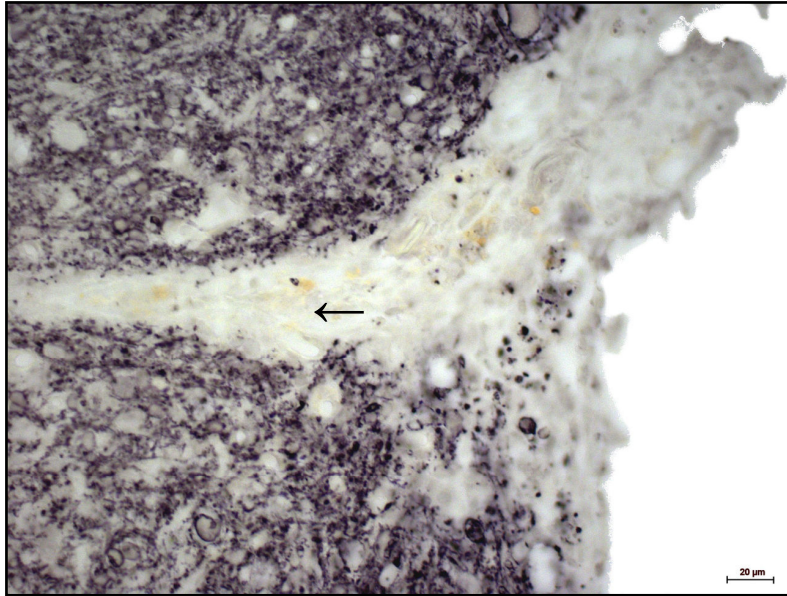


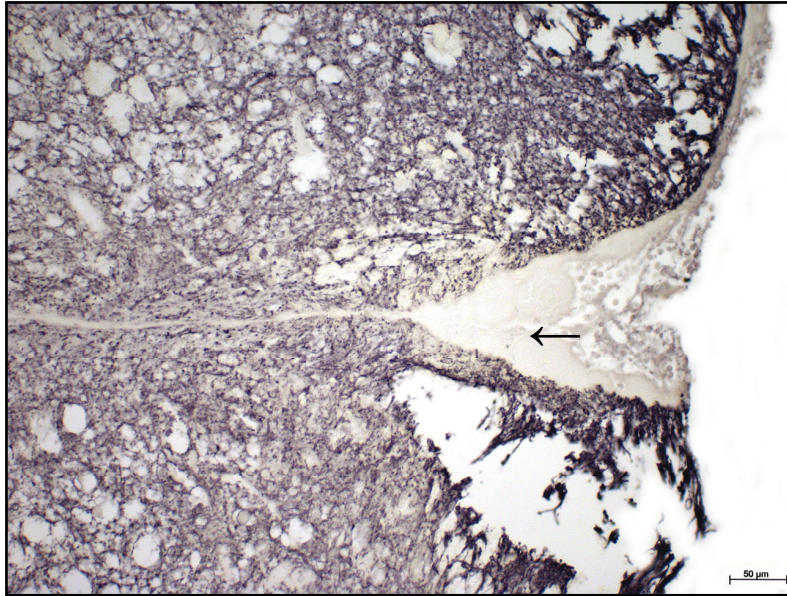
Abb. 4.6.7.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. B Das Myelin der Axone zeigt sich am vierzehnten postoperativen Tag homogen anti-CNPase-positiv gefärbt. Deutlich sind die durchtrennten Enden der Axone in beiden Grenzregionen zu erkennen. Die bindegewebige Narbe (←) trennt die freien Enden der Axone deutlich. Im Läsionsspalt erkennt man wenig anti-CNPase positive Granula. Auch am vierzehnten postoperativen Tag zeigen die Oligodendrozyten in den Grenzregionen keine Reaktion auf die Läsion. Anti-CNPase-Färbung.

4.6.8 Anti-CNPase Färbung in der scid Maus

4.6.8.1 Erster postoperativer Tag

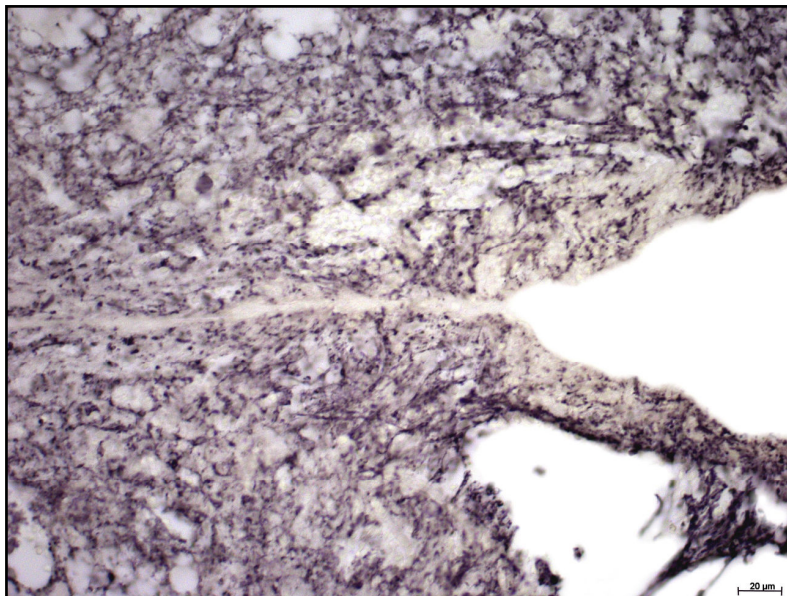
Auch bei der scid Maus standen am ersten postoperativen Tag die Unterbrechung und Zerstörung der Trakte der weißen Substanz mit verstärkter Immunreaktivität des Myelins der freien Axonenden im Vordergrund. Eine oligodendrozytäre Reaktion in den Grenzregionen war auch bei der scid Maus weder in der weißen, noch in der grauen Substanz auszumachen. Zystische Veränderungen im Bereich der Läsion und der Grenzregionen waren wie bei der BALB/c Maus beschrieben vorhanden. Die restlichen Regionen des Rückenmarks erschienen frei von Veränderungen.

Es zeigten sich keine Unterschiede in der Reaktion auf eine Läsion zwischen der scid Mutante und dem Wildtyp.



A

Abb. 4.6.8.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, scid Maus. A Zu erkennen ist die Läsion mit dem Läsionsspalt (←) und die kraniale und kaudale Grenzregion. **B** Sichtbar sind der Läsionsspalt und die beiden Grenzregionen. Die durchtrennten Axone zeigen an ihren Enden eine starke anti-CNPase-positive Anfärbung des umhüllenden Myelins. Die Oligodendrozyten zeigen in den Grenzregionen in der anti-CNPase-Färbung auch bei der scid-Mutante keine Reaktion auf die Läsion am ersten postoperativen Tag. **B** Anti-CNPase-Färbung.

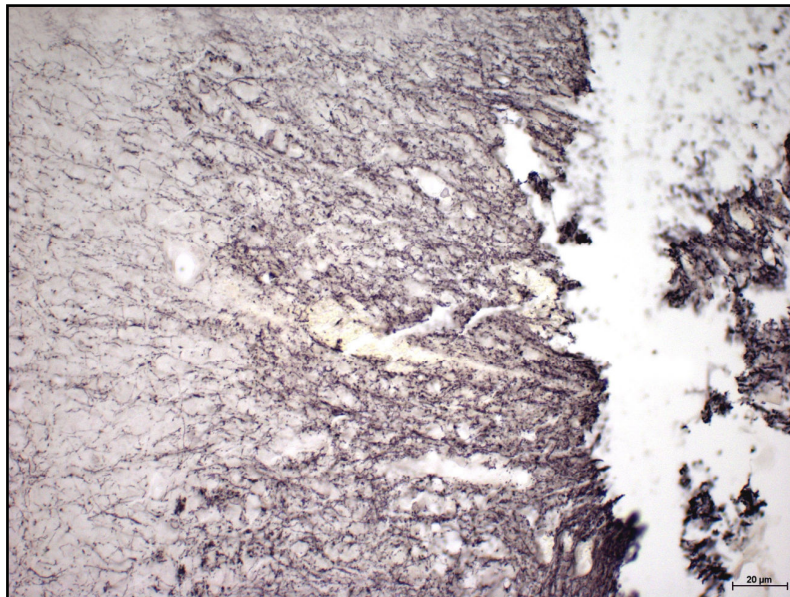


B

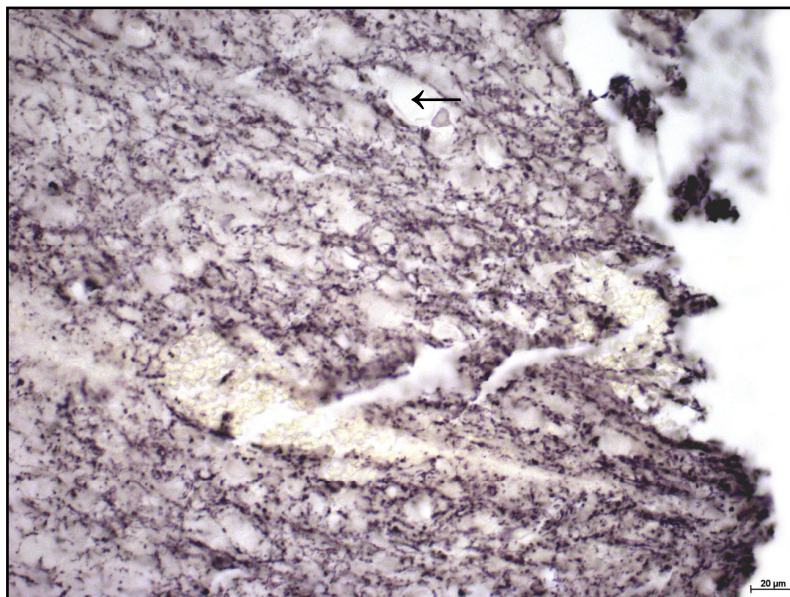
4.6.8.2 Dritter postoperativer Tag

Am dritten postoperativen Tag war bei der scid Maus ebenfalls eine leichte Abschwächung der Immunreaktivität der anti-CNPase-Färbung zu erkennen. Wie beim Wildtyp zeigten sich in der scid Maus weiterhin die Unterbrechung der Trakte der weißen Substanz und die verstörte graue Substanz mit einer Abnahme der Anzahl von Oligodendrozyten in der Läsion. Zystische Veränderungen besonders der weißen Substanz waren in den Grenzregionen sichtbar. Die restlichen Regionen des Rückenmarks erschienen frei von Veränderungen.

Es zeigten sich keine Unterschiede in der Reaktion auf eine Läsion zwischen der scid Mutante und dem Wildtyp.



A



B

Abb. 4.6.8.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, scid Maus.

A Zu erkennen ist die Läsion und die kraniale und kaudale Grenzregion.

B Das Myelin der Axone zeigt sich am dritten postoperativen Tag weniger stark anti-CNPase-positiv gefärbt an den durchtrennten Axonenden. Die Zysten (←) in der weißen Substanz zeigen sich von anti-CNPase-positivem Myelin umgeben (Axondystrophie und Apoptose von Oligodendrozyten). Auch am dritten postoperativen Tag zeigen die Oligodendrozyten der Grenzregionen keine Reaktion auf die Läsion. Anti-CNPase-Färbung.

4.6.8.3 Siebter postoperativer Tag

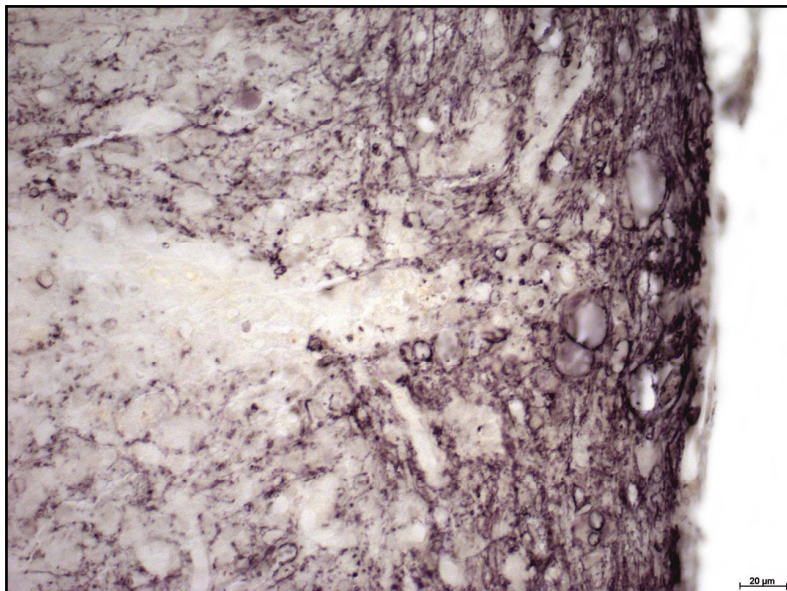
Der siebte postoperative Tag zeigte bei der scid Maus ebenfalls eine deutliche Abschwächung der anti-CNPase Anfärbung. Die Läsion war als solche kaum noch auszumachen. Die Trakte der lateralen weißen Substanz wurden durch die beginnende bindegewebige Narbe getrennt. Die Axone wirkten indirekt geschwollen und waren zystisch verändert.

Die Grenzregionen zeigten ebenfalls geschwollene und zystisch veränderte Axone kranial und kaudal in der weißen Substanz. Auch in der grauen Substanz zeigten sich myelin-ummantelte Zysten. In weißer und grauer Substanz waren viele kleinere Gefäße auszumachen. Ipsilateral zeigte sich am restlichen Rückenmarksgewebe eine zystische Veränderung der weißen Substanz die bis weit kaudal reichte.

Die kontralaterale Seite zeigte sich weiterhin unverändert.



Abb. 4.6.8.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, scid Maus. A Zu erkennen ist die Läsion und die kraniale und kaudale Grenzregion. Der Läsionsspalt (←) erscheint frei von Oligodendrozyten und anderer anti-CNPase-positiver Substanz. **B** Das Myelin der Axone zeigt sich am siebten postoperativen Tag homogen anti-CNPase positiv gefärbt. Deutlich sind die durchtrennten Enden der Axone in beiden Grenzregionen zu erkennen. Die beginnende Narbe trennt die freien Enden der Axone. Im Läsionsspalt sind wenig anti-CNPase-positive Granula, aber keine Oligodendrozyten zu erkennen. Die Zysten in der weißen Substanz zeigen sich auch bei der scid Maus deutlich von anti-CNPase-positivem Myelin umgeben (Axondystrophie und Apoptose von Oligodendrozyten). Auch am siebten postoperativen Tag zeigen die Oligodendrozyten in den Grenzregionen keine Reaktion auf die Läsion. Anti-CNPase-Färbung.



B

4.6.8.4 Vierzehnter postoperativer Tag

Die Läsion stellte sich auch in der scid Maus gleich dem Wildtyp dar. Die Schnittenden der Axone waren von der bindegewebigen Narbe weit auseinander gedrängt. Die Läsion selbst erschien frei von CNPase-positiven Substanzen und somit auch von Oligodendrozyten. In den Grenzregionen waren ebenfalls CNPase-positive Granula zu sehen, die in Nähe zu den abgerundet erscheinenden Schnittenden der Axone der weißen Substanz zu finden waren. Die graue Substanz zeigte sich ohne Veränderungen in der Anzahl und Immunreaktivität der Oligodendrozyten. Kaudal der Läsion zeigte sich ipsilateral eine weit kaudal reichende zystische, axonale Traktveränderung in der weißen Substanz.

Die kontralaterale Seite zeigte sich weiterhin unverändert und zwischen scid Maus und Wildtyp BALB/c zeigten sich auch am vierzehnten postoperativen Tag keine morphologischen oder immunreaktiven Unterschiede bezüglich des Myelins der Axone oder der Oligodendrozyten selbst.

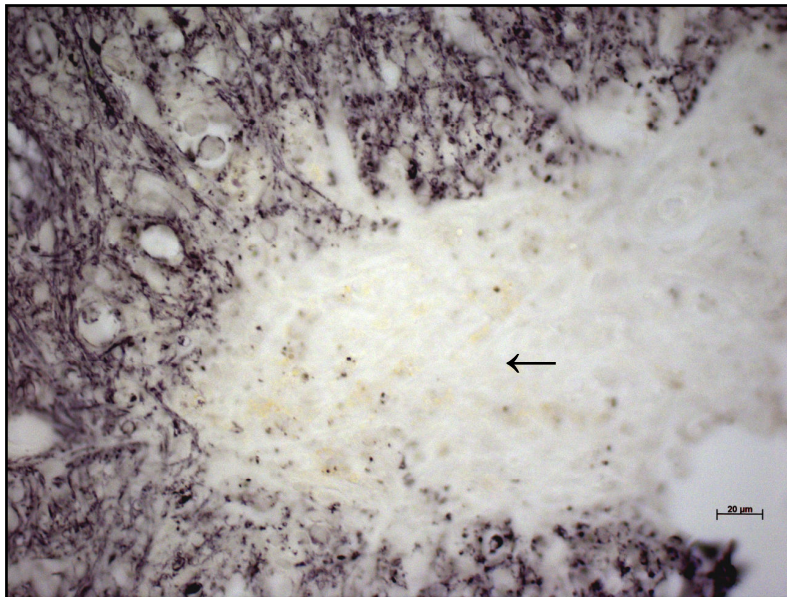


Abb. 4.6.8.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, scid Maus. Zu erkennen ist die Läsion und die kraniale und kaudale Grenzregion. Deutlich sind die durchtrennten Enden der Axone in beiden Grenzregionen zu erkennen. Die bindegewebige Narbe (←) trennt die freien Enden der Axone deutlich. Im Läsionsspalt sind wenig anti-CNPase-positive Granula zu erkennen. Es zeigen sich keine Oligodendrozyten mehr im Bereich der Läsion. Auch am vierzehnten postoperativen Tag zeigen die Oligodendrozyten in den Grenzregionen keine Reaktion auf die Läsion. Anti-CNPase-Färbung.

4.7 Neuronale Strukturen

4.7.1 Morphologie der Axone am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus in der anti-Neurofilament 200-Färbung

Der Antikörper gegen Neurofilament 200 markiert das Intermediärfilament Neurofilament, das hauptsächlich in Zellen neuronalen Ursprungs exprimiert wird.

Neurone und besonders die dazugehörigen axonalen Strukturen kommen so zur Darstellung.

So stellten sich, bei Betrachtung des Rückenmarks auf Höhe des CST, von lateral nach medial betrachtet zuerst stark anti-Neurofilament 200 gefärbte Axone in der lateralen weißen Substanz dar. Sie hatten meist einen longitudinalen Verlauf und erschienen teils geradlinig im Verlauf, teils spiralförmig. Nicht alle Axone der weißen Substanz waren gleich stark gefärbt. Einzelne Axone ragten, deutlich stärker gefärbt, aus der homogen gefärbten Menge von axonalen Fasern heraus. In der grauen Substanz zeigten Neurone homogene, starke, spezifische Anfärbung. In der Medianebene, in der weißen Substanz des CST, waren ebenfalls einzelne Axone stärker gefärbt als der homogene Rest. Es zeigte sich kein Unterschied in der Immunreaktivität der Axone und Neurone bezüglich der unterschiedlichen Regionen des Rückenmarks.

4.7.2 Morphologie der Axone am Rückenmark der unverletzten scid Maus in der anti-Neurofilament 200 Färbung

Die scid Maus zeigte, auf Höhe des CST, ebenfalls zuerst einzelne, stärker gefärbte Axone, teils gerade, teil spiralförmig, in der weißen Substanz. Auch hier färbten sich in der grauen Substanz spezifisch Neurone unterschiedlicher Größe an. Der medial gelegene CST zeigte auch das Bild unterschiedlich stark gefärbter axonaler Strukturen, bei denen einzelne Axone in der Immunreaktivität hervorstachen. Ein Unterschied bezüglich der unterschiedlichen Regionen des Rückenmarks zeigte sich bei der Immunreaktivität der Neurone und Axone nicht.

Zwischen scid Maus und BALB/c Wildtyp ließen sich keine morphologischen oder quantitativen Unterschiede erkennen. Neurone und Axone erschienen gleichartig gefärbt und in gleicher Anzahl vorhanden und in gleicher Weise im Rückenmarksgewebe verteilt.

4.7.3 Anti-Neurofilament-200 Färbung in der BALB/c Maus

4.7.3.1 Erster postoperativer Tag

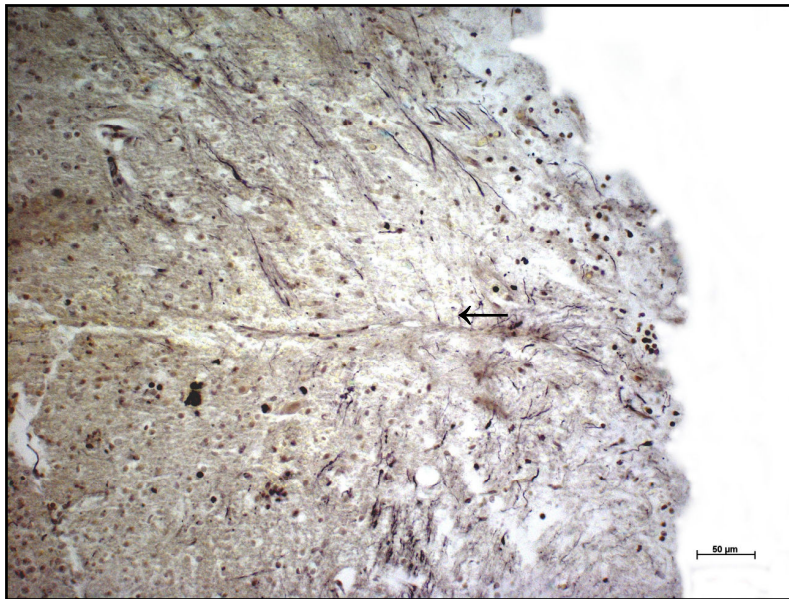
Am ersten postoperativen Tag nach Läsionierung zeigten sich die in der lateralen weißen Substanz gelegenen Trakte und Axone durchtrennt und zerstört. Viele Axone waren durch die Schnittführung nach lateral herausgerissen. In der Läsion waren

keine durchgehenden Axone mehr zu identifizieren. Einzelne, stark Neurofilament 200 positive Zelltrümmer, zeigten sich in der Läsion angefärbt. In der grauen Substanz waren keine immunreaktiven Neurone auszumachen. Der medial gelegene CST zeigte ebenfalls zerstörte Axone die ebenfalls nach lateral abwichen. Die Schnittenden der zerstörten Axone zeigten sich besonders stark anti-Neurofilament 200-positiv angefärbt.

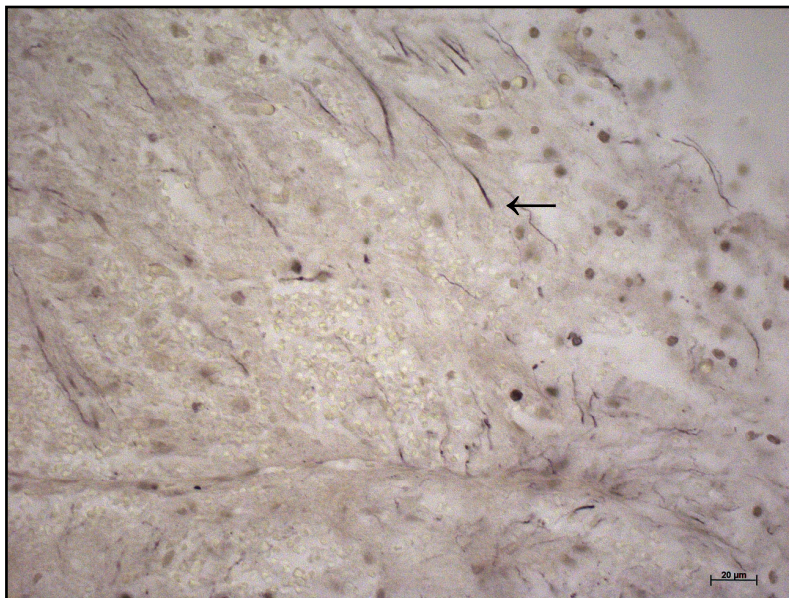
In den Grenzregionen zeigten sich, kranial und kaudal der Läsion, die frei endenden durchtrennten Axone. An ihren freien Schnittenden zeigten sie ebenfalls eine verstärkte Immunreaktion. Einzelne Axone zeigten stark Neurofilament 200-positive kurze, tropfenförmige Strukturen. Die graue Substanz zeigte homogen gefärbte Neurone, ohne pathologische Veränderungen zur unläsionierten Gegenseite. Die mediale weiße Substanz auf Höhe des CST zeigte sich ebenfalls ohne Veränderungen zur unläsionierten Gegenseite.

Das restliche ipsilaterale Rückenmarksgewebe bot kranial der Läsion keine morphologischen Unterschiede zur Gegenseite. Weiße und graue Substanz erschienen unauffällig. Auch der mediale CST zeigte sich ohne Veränderungen zur Gegenseite. Die kaudal der Läsion in der lateralen weißen Substanz bestehenden Zysten zeigten sich nicht immunreaktiv. Weder ihr Inhalt noch die Hülle zeigten sich anti-Neurofilament 200-positiv gefärbt.

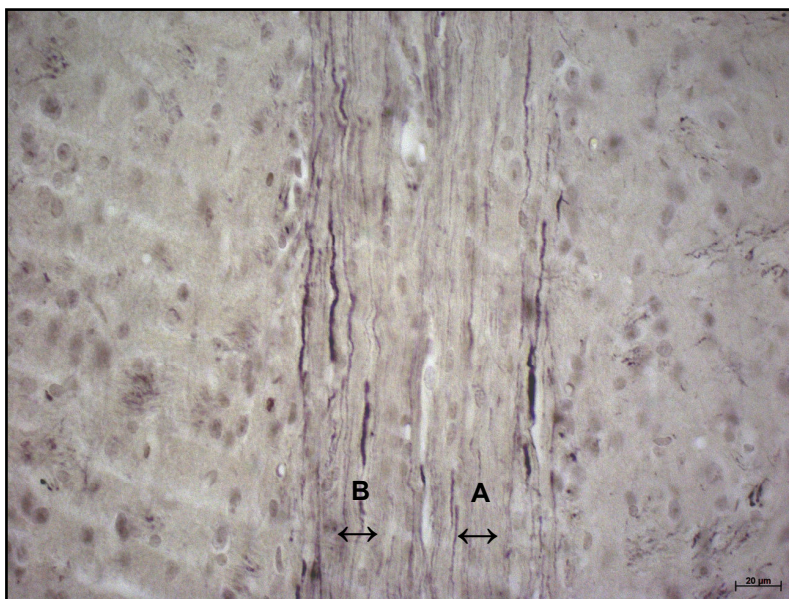
Die kontralaterale Seite zeigte sich am ersten postoperativen Tag nach Läsion ohne morphologische Veränderungen.



A



B



C

Abb. 4.7.3.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. **A** Zu erkennen ist die Läsion mit dem Läsionsspalt (←) und die kraniale und kaudale Grenzregion. **B** Sichtbar sind der Läsionsspalt und die kraniale Grenzregionen. Die durchtrennten Axone (←) zeigen an ihren Enden eine starke anti-Neurofilament 200-positive Färbung. **C** Zu sehen ist der CST. Auf ipsilateraler (**A**) und kontralateraler (**B**) Seite erkennt man jeweils mehrere spiralförmige, stärker angefärbte Axone. Anti-Neurofilament 200-Färbung.

4.7.3.2 Dritter postoperativer Tag

Am dritten postoperativen Tag zeigte sich die Läsion frei von Neurofilament 200-positiven Axonen und Neuronen. Der Läsionsspalt war gut zu erkennen. Einzelne Zelltrümmer zeigten sich in der Läsion stark Neurofilament 200-positiv gefärbt.

Die Grenzregionen zeigten kranial und kaudal der Läsion in der lateralen weißen Substanz teils spiralförmige Axone mit tropfenförmig aufgetriebenen Enden. Die freien Enden färbten sich stark Neurofilament 200-positiv an.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte kranial in der lateralen weißen und der grauen Substanz keine morphologischen Unterschiede zur Gegenseite. Der medial gelegene CST bot weit kranial der Läsion, auf Höhe des zerviko-thorakalen Übergangs, eine starke Spiralisierung einzelner Axone, welche sich stark anti-Neurofilament 200-positiv darstellten und deutlich von der Gegenseite unterschieden. Kaudal der Läsion zeigten sich die beschriebenen Zysten in der lateralen weißen Substanz. Graue Substanz und CST zeigten keine morphologischen Veränderungen.

Die kontralaterale Seite zeigte sich unverändert und ohne morphologische Auffälligkeiten.

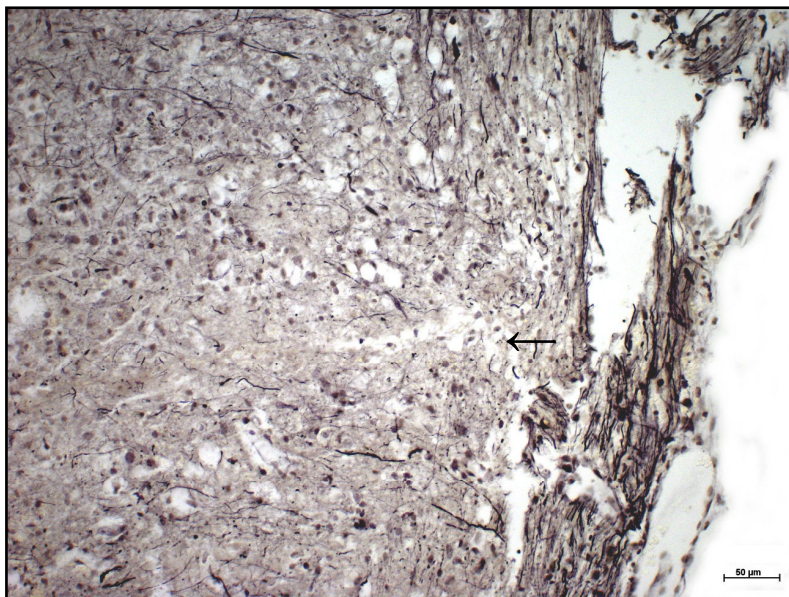
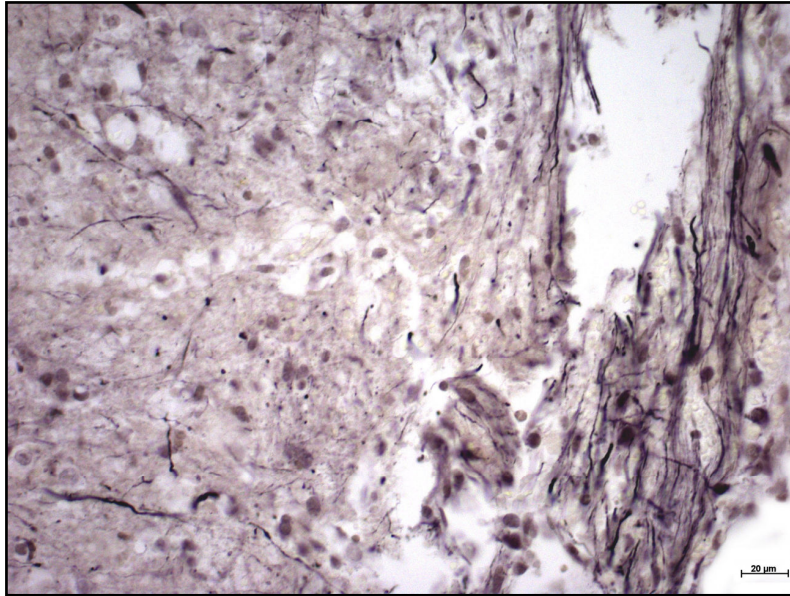
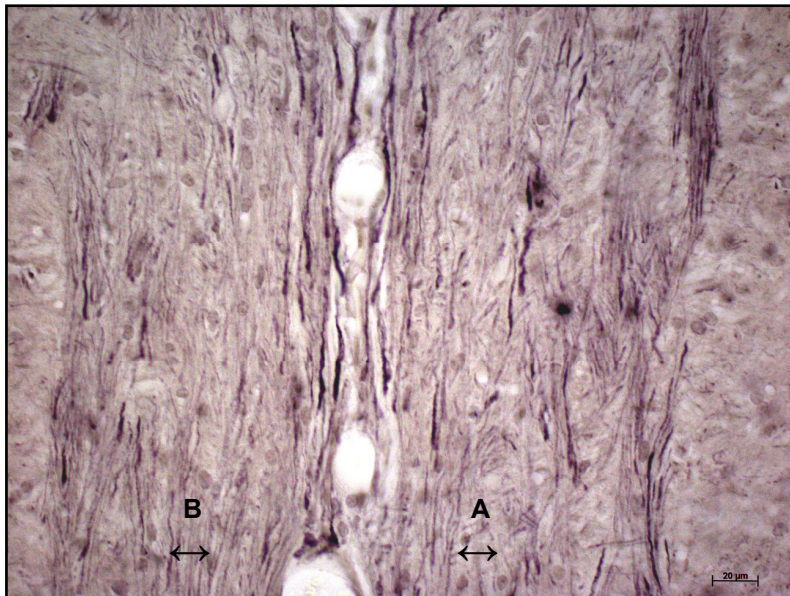


Abb. 4.7.3.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Zu erkennen ist die Läsion mit dem Läsionsspalt (←) und die kraniale und kaudale Grenzregion. Anti-Neurofilament 200-Färbung.



B



C

Abb. 4.7.3.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. B Sichtbar sind der Läsionsspalt und die kraniale Grenzregionen. Die durchtrennten Axone zeigen an ihren Enden eine starke anti-Neurofilament 200-positive Anfärbung (←). **C** Zu sehen ist der CST. Auf ipsilateraler (**A**) und kontralateraler (**B**) Seite erkennt man jeweils mehrere spiralförmige stärker angefärbte Axone. Anti-Neurofilament 200-Färbung.

4.7.3.3 Siebter postoperativer Tag

Am siebten postoperativen Tag nach Läsion zeigte sich eine generelle Hochregulation des Neurofilaments in Axonen. Vereinzelt waren auch stark anti-Neurofilament-positive Neurone in der grauen Substanz sichtbar. In der Läsion selbst waren in dem, bis zu diesem Zeitpunkt zellfreien, Läsionsspalt angefärbte Neurone zu erkennen.

In der kranialen Grenzregion zeigten sich die frei endenden Axone nicht mehr so stark positiv gefärbt wie noch am dritten postoperativen Tag. Die tropfenförmigen Auftreibungen der freien Enden der Axone zeigten sich weiterhin stark Neurofilament

positiv gefärbt, wobei jedoch die Spitze von Neurofilament 200 ausgespart erschien (Growth cones). Die graue Substanz erschien ohne wesentliche Veränderungen, vereinzelt waren stärker Neurofilament 200-positive, große Neurone sichtbar. Kaudal der Läsion waren stärker gefärbte, spiralförmige Axonbündel in der lateralen weißen Substanz sichtbar. Die graue Substanz zeigte kaudal keine Auffälligkeiten.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte kranial in der weißen Substanz keine Veränderungen zur Gegenseite. In der grauen Substanz waren vereinzelt größere Neurone stärker Neurofilament 200-positiv gefärbt. Der mediale CST zeigte eine deutlich geringere Anfärbbarkeit als die der Gegenseite. Deutlich weniger stark Neurofilament 200-positive Axone ließen sich weit kranial der Läsion darstellen.

Kaudal der Läsion waren bis auf einzelne Zysten in der lateralen weißen Substanz keine Veränderungen zu beobachten.

Die kontralaterale Seite zeigte sich ohne morphologische Auffälligkeiten zu den anderen postoperativen Tagen.

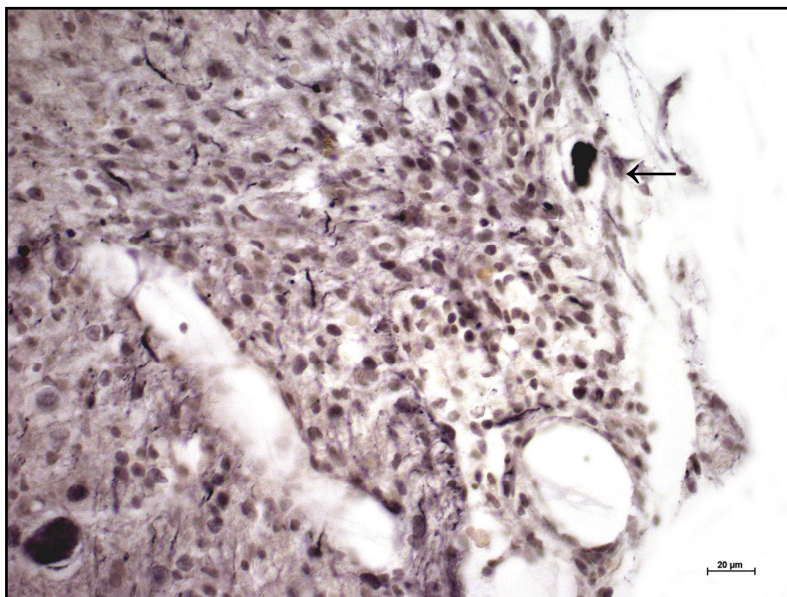


Abb. 4.7.3.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Zu erkennen ist die Läsion mit dem Läsionsspalt und die kraniale Grenzregion. Die durchtrennten Axone zeigen an ihren Enden eine starke anti-Neurofilament 200-positive Anfärbung. Growth cones (←) sind vereinzelt als tropfenförmige Auftreibungen der Axonenden stark anti-Neurofilament 200-positiv gefärbt, wobei die distale Spitze des Cones von der Färbung ausgespart bleibt.

A

Anti-Neurofilament 200-Färbung.

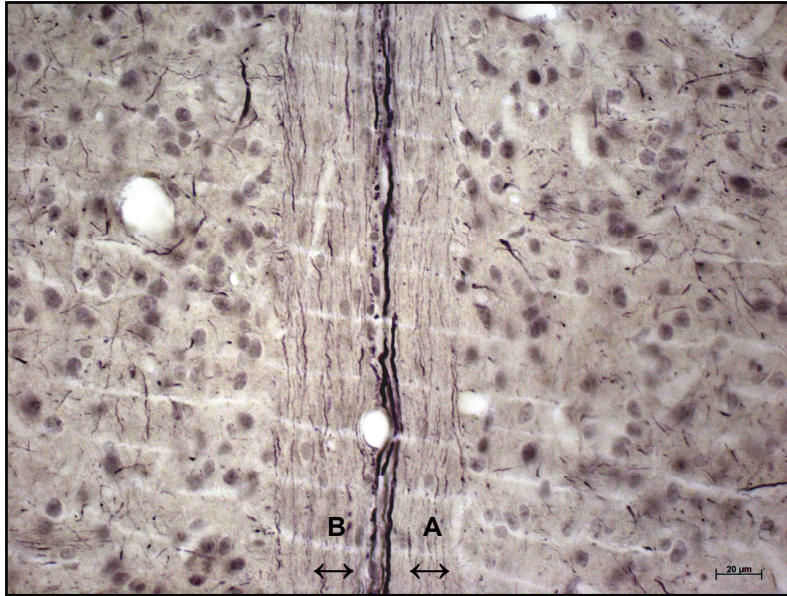


Abb. 4.7.3.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. B Zu sehen ist der CST. Auf ipsilateraler (A) und kontralateraler (B) Seite erkennt man jeweils mehrere spiralförmige stärker angefärbte Axone. Anti-Neurofilament 200-Färbung.

4.7.3.4 Vierzehnter postoperativer Tag

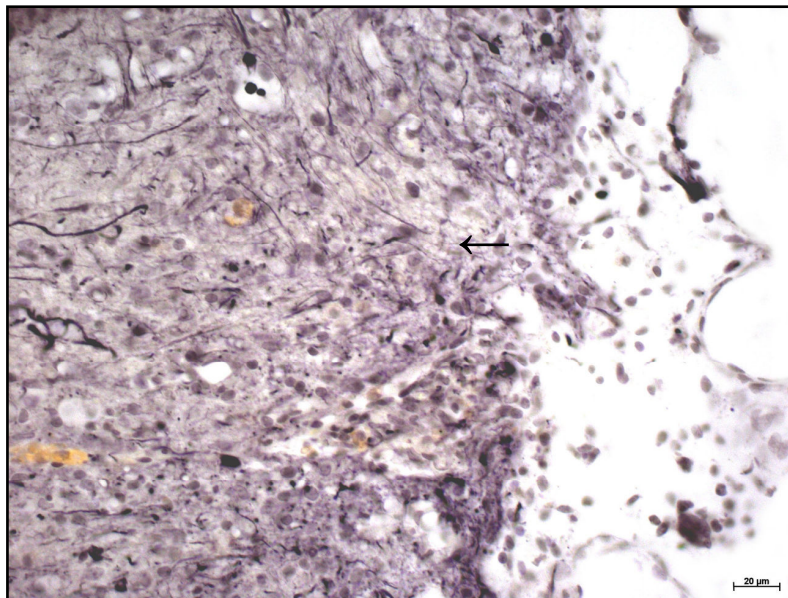
Generell zeigten sich nur wenige Veränderungen zwischen dem siebten postoperativen Tag und dem vierzehnten postoperativen Tag. Die Läsion erschien ebenfalls mit Neurofilament 200-positiven Zellen ausgefüllt. Axone waren in der Läsion nicht zu identifizieren.

Die kraniale Grenzregion zeigte in der lateralen weißen Substanz noch vereinzelt stark Neurofilament-200 positive Bündel von Axonen. Vereinzelt waren growth cones zu sehen. Die graue Substanz erschien ohne Veränderungen zu den Vortagen und zu der Gegenseite. Kaudal der Läsion waren viel Neurofilament 200-positiv Substanz und vereinzelt auch kurze, stärker Neurofilament 200-positiv Axone zu beobachten. Die graue Substanz erschien ebenfalls ohne Veränderungen zu den Vortagen und zu der Gegenseite.

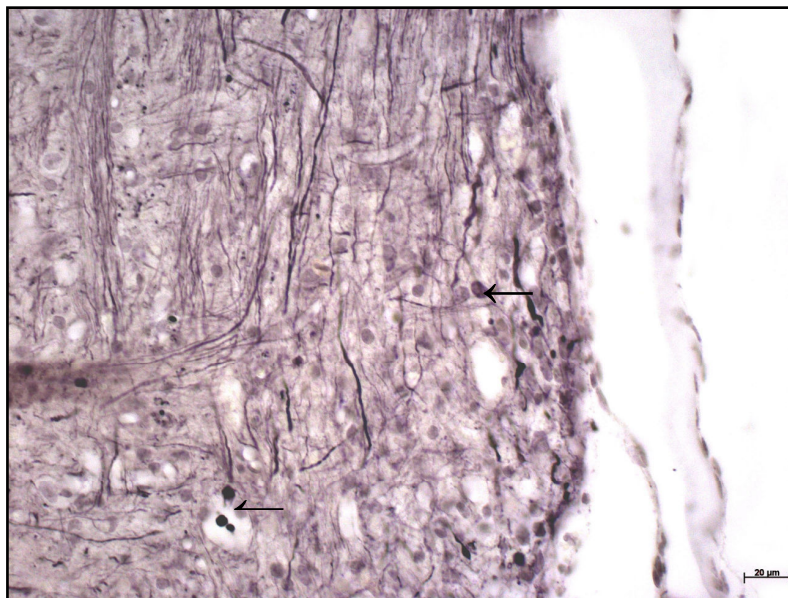
Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte kranial mehr der Neurofilament 200-positiv Neurone angefärbt als am siebten postoperativen Tag. Auch am vierzehnten postoperativen Tag bot der CST ipsilateral eine deutlich geringere Anfärbung. Der Trakt erschien insgesamt aufgehellt, enthielt jedoch einzelne, stärker Neurofilament 200-positiv Bündel von Axonen als die Gegenseite. Zudem waren vereinzelt zystische Strukturen zwischen den einzelnen Axonen zu

identifizieren, als Ausdruck der axonalen Schwellung (axonal swelling). Kaudal war das restliche ipsilaterale Gewebe ohne besondere Auffälligkeiten.

Die kontralaterale Seite zeigte sich auch am vierzehnten postoperativen Tag ohne morphologische Auffälligkeiten zu den anderen postoperativen Tagen.



A



B

Abb. 4.7.3.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Zu erkennen ist die Läsion mit dem Läsionsspalt (←) und die kraniale und kaudale Grenzregion. **B** Sichtbar ist die kraniale Grenzregion. Die durchtrennten Axone zeigen an ihren Enden eine starke anti-Neurofilament 200-positive Anfärbung. Vereinzelt sind Growth cones (←) zu identifizieren. **B** Anti-Neurofilament 200-Färbung.

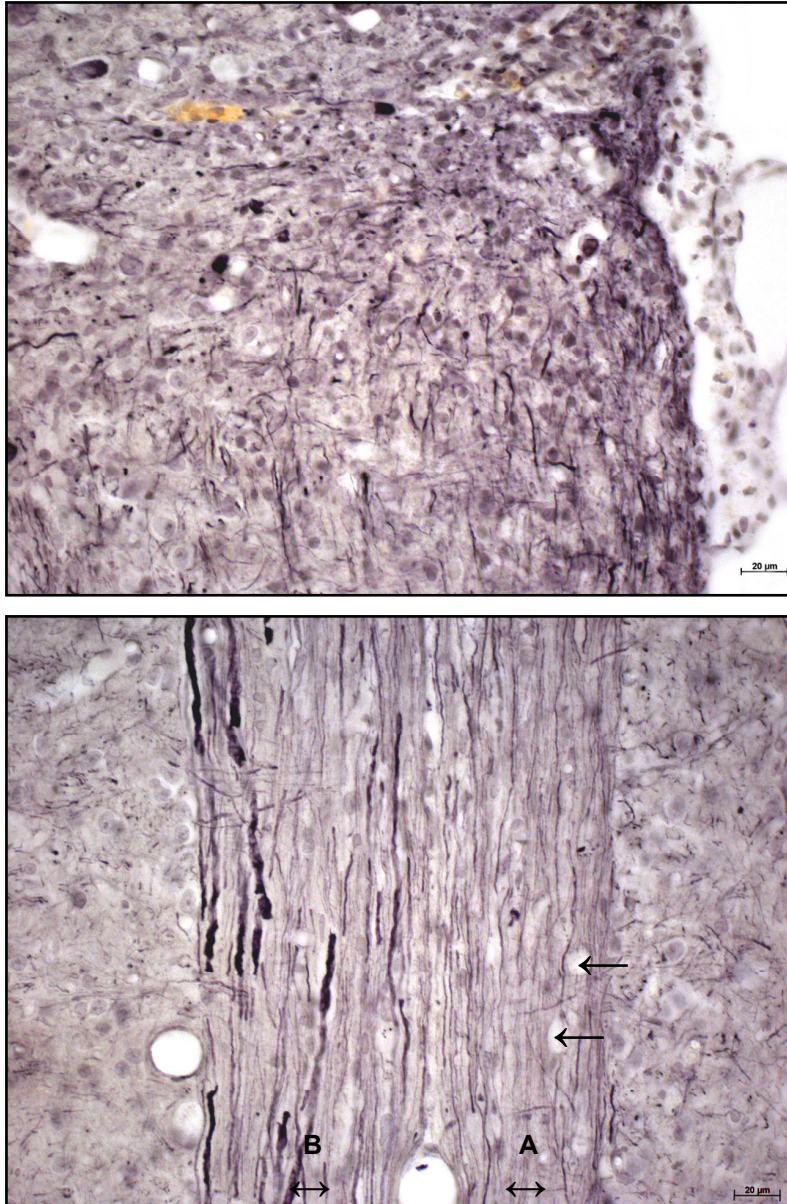


Abb. 4.7.3.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. C Die kaudale Grenzregion zeigt viel anti-Neurofilament 200 positive Granula. Vereinzelt sind kurze, stark gefärbte Axone zu identifizieren. Anti-Neurofilament 200-Färbung **D** Zu sehen ist der CST. Auf ipsilateraler (**A**) Seite fällt auf, dass im Vergleich zu den Vortagen bei allen Tieren nur noch wenige stark anti-Neurofilament 200-positiv gefärbte Axone zu sehen sind. Zystische Veränderungen zeigen sich im ipsilateralen CST kranial der Läsion (\leftarrow). Auf kontralateraler (**B**) Seite bleibt die Anzahl und Färbeintensität der spiralförmigen stärker angefärbten Axone gleich. Anti-Neurofilament 200-Färbung. **D** Färbung.

4.7.4 Anti-Neurofilament 200 Färbung in der scid Maus

4.7.4.1 Erster postoperativer Tag

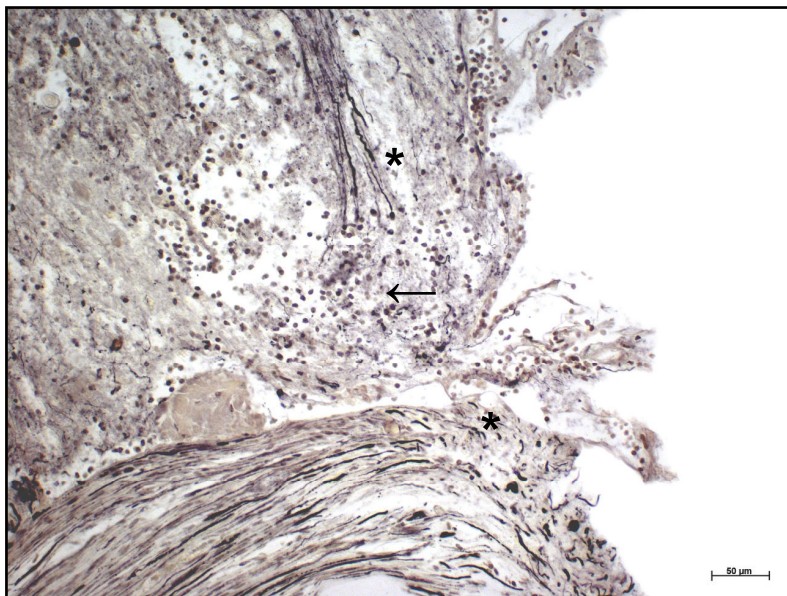
Auch bei der scid Maus zeigten sich am ersten postoperativen Tag die zerstörten Trakte in der lateralen weißen Substanz. In der Läsion waren keine Axone oder Neurone angefärbt. Neurofilament 200-positive Zelltrümmer zeigten sich auch hier im Läsionsspalt.

Die Grenzregionen zeigten kranial und kaudal stärker gefärbte frei endende axonale Fasern und in der grauen Substanz waren homogen gefärbte Neurone, ohne

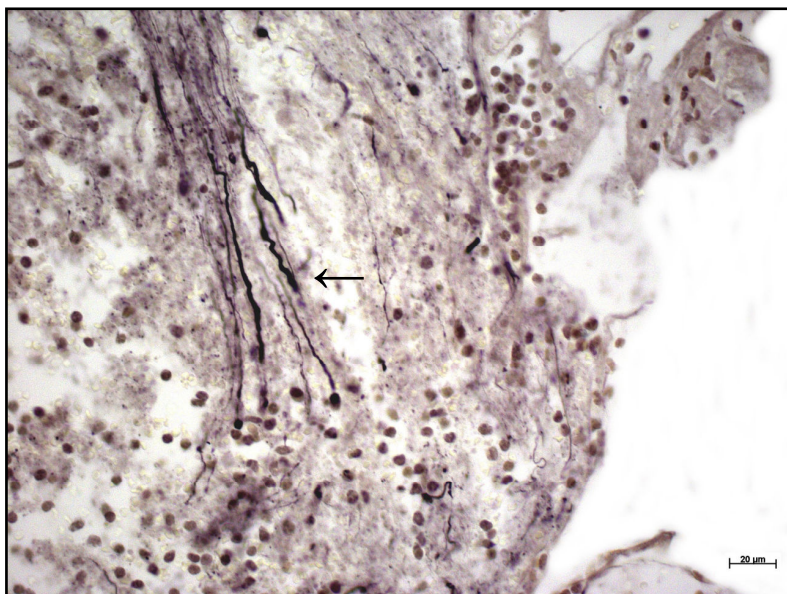
pathologische Veränderungen zur unläsionierten Gegenseite zu sehen. Der mediale CST zeigte ebenfalls keine pathologischen Veränderungen.

Das restliche ipsilaterale Rückenmarksgewebe, einschließlich des medialen CST, bot kranial der Läsion auch bei der scid Maus keine morphologischen Unterschiede zur Gegenseite. Die kaudal der Läsion in der lateralen weißen Substanz bestehenden Zysten zeigten sich auch hier nicht immunreaktiv.

Die kontralaterale Seite zeigte sich am ersten postoperativen Tag nach Läsion ohne morphologische Veränderungen.



A



B

Abb. 4.7.4.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, scid Maus. A Zu erkennen ist die Läsion mit dem Läsionsspalt (←) und die zur Seite ausgelenkten Axone (*) der kranialen und kaudalen Grenzregionen. **B** Sichtbar sind der Läsionsspalt und die kraniale Grenzregionen. Die durchtrennten Axone (←) zeigen an ihren Enden eine starke anti-Neurofilament 200-positive Anfärbung. Anti-Neurofilament 200-Färbung.

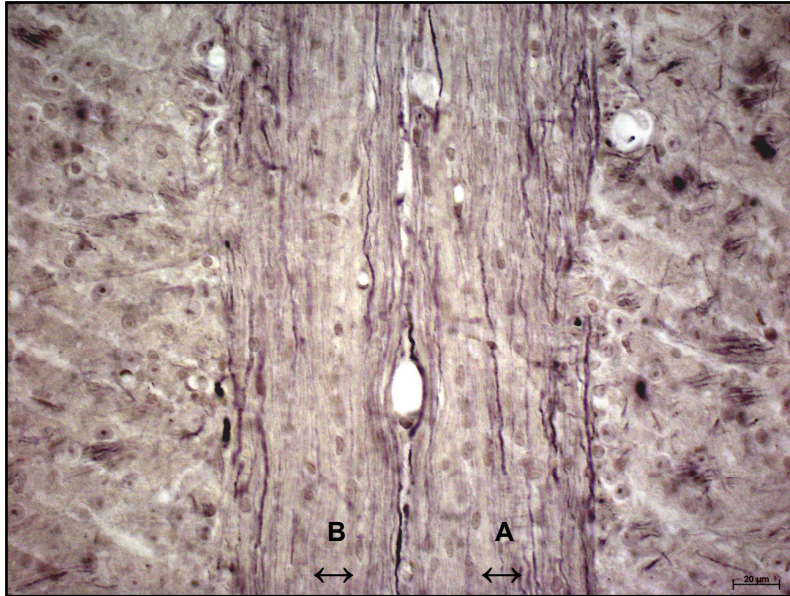


Abb. 4.7.4.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, scid Maus. C Zu sehen ist der CST. Auf ipsilateraler (**A**) und kontralateraler (**B**) Seite erkennt man jeweils mehrere spiralförmige stärker angefarbte Axone. Anti-Neurofilament 200-Färbung.

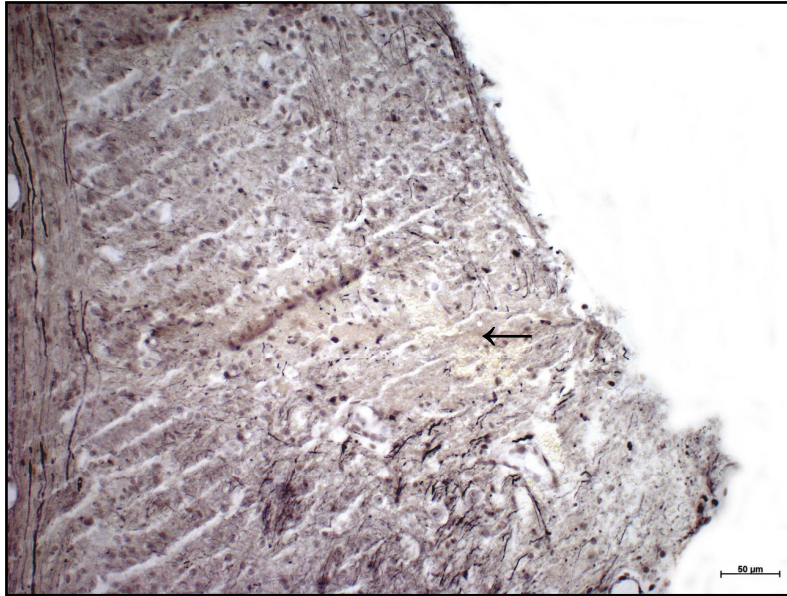
4.7.4.2 Dritter postoperativer Tag

Auch am dritten postoperativen Tag zeigte sich die Läsion bei der scid Maus frei von Neurofilament 200-positiven Axonen und Neuronen.

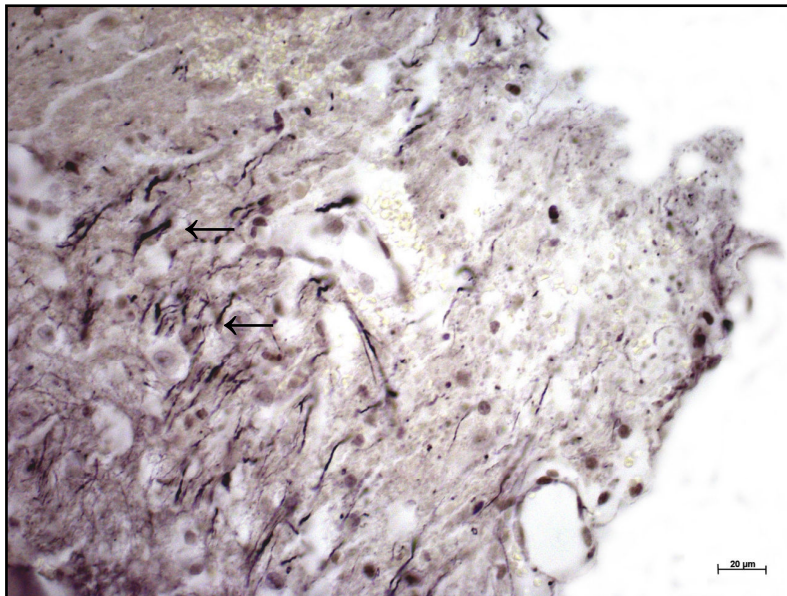
Die Grenzregionen zeigten kranial und kaudal der Läsion in der lateralen weißen Substanz ebenfalls spiralförmige Axone mit tropfenförmig aufgetriebenen Enden, die sich stark Neurofilament 200-positiv anfärbten.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte kranial ebenfalls stärker angefarbte, spiralförmige Axone im CST. Laterale weiße und graue Substanz erschienen unauffällig. Kaudal der Läsion zeigten sich die beschriebenen Zysten in der lateralen weißen Substanz.

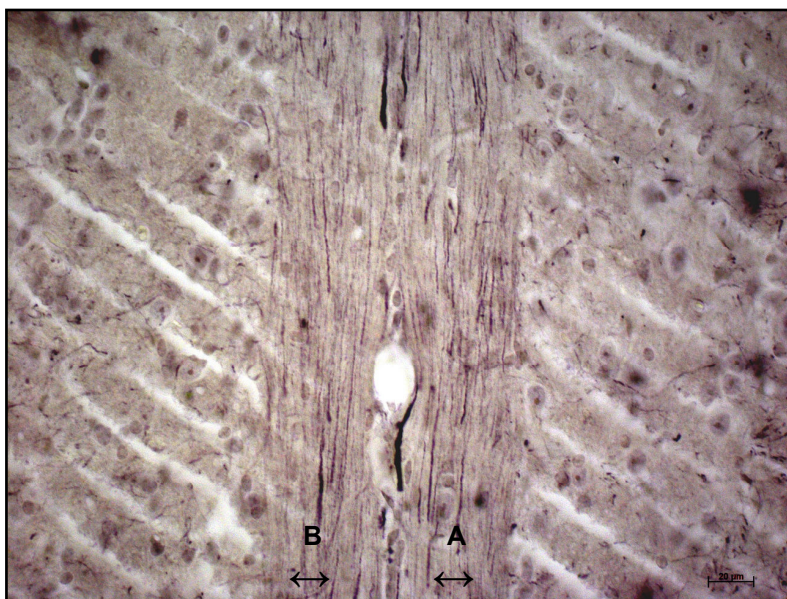
Die kontralaterale Seite zeigte sich unverändert und ohne morphologische Auffälligkeiten.



A



B



C

Abb. 4.7.4.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, scid Maus. A Zu erkennen ist die Läsion mit dem Läsionsspalt (\longleftrightarrow) und die kraniale und kaudale Grenzregion. **B** Sichtbar sind der Läsionsspalt und die kraniale Grenzregionen. Die durchtrennten Axone zeigen an ihren Enden eine starke anti-Neurofilament 200-positive Anfärbung (\leftarrow). **C** Zu sehen ist der CST. Auf ipsilateraler (**A**) und kontralateraler (**B**) Seite erkennt man jeweils mehrere spiralförmige stärker angefärbte Axone. Anti-Neurofilament 200-Färbung.

4.7.4.3 Siebter postoperativer Tag

Am siebten postoperativen Tag nach Läsion zeigte auch die scid Maus eine generelle Hochregulation des Neurofilaments und auch hier waren einzelne stark anti-Neurofilament-positive Neurone in der grauen Substanz sichtbar, die sich auch in der Läsion zeigten.

Die frei endenden Axone in der kranialen Grenzregion zeigten sich nicht mehr so stark positiv gefärbt wie noch am dritten postoperativen Tag. Growth cones waren auch hier zu identifizieren. Ein Unterschied in Anzahl und Form zu den Wildtyp BALB/c Mäusen zeigte sich nicht. Die graue Substanz erschien ohne wesentliche Veränderungen, vereinzelt waren auch hier stärker Neurofilament 200-positive, große Neurone sichtbar. Kaudal der Läsion waren stärker gefärbte, spiralförmige Axonbündel in der lateralen weißen Substanz sichtbar, die graue Substanz zeigte kaudal keine Auffälligkeiten.

Der mediale CST zeigte im restlichen ipsilateralen Gewebe kranial der Läsion ebenfalls eine deutlich geringere Anfärbbarkeit als auf der Gegenseite. Zahlenmäßig deutlich weniger stark Neurofilament 200-positive Axone ließen sich weit kranial der Läsion darstellen. Vereinzelt waren zystische Veränderungen im CST zu beobachten, als Ausdruck der axonalen Schwellung (axonal swelling).

Kaudal der Läsion waren bis auf einzelne Zysten in der lateralen weißen Substanz keine Veränderungen zu beobachten.

Die kontralaterale Seite zeigte sich auch am siebten postoperativen Tag ohne morphologische Auffälligkeiten zu den anderen postoperativen Tagen.

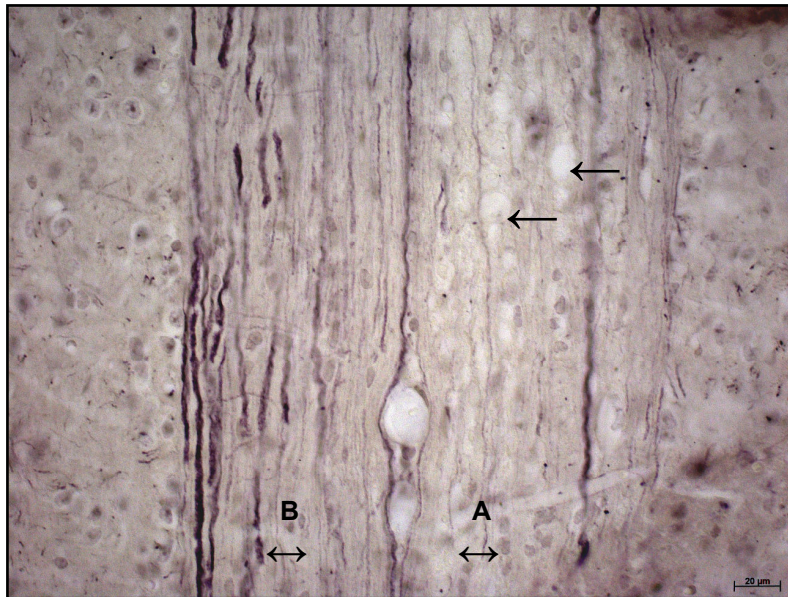
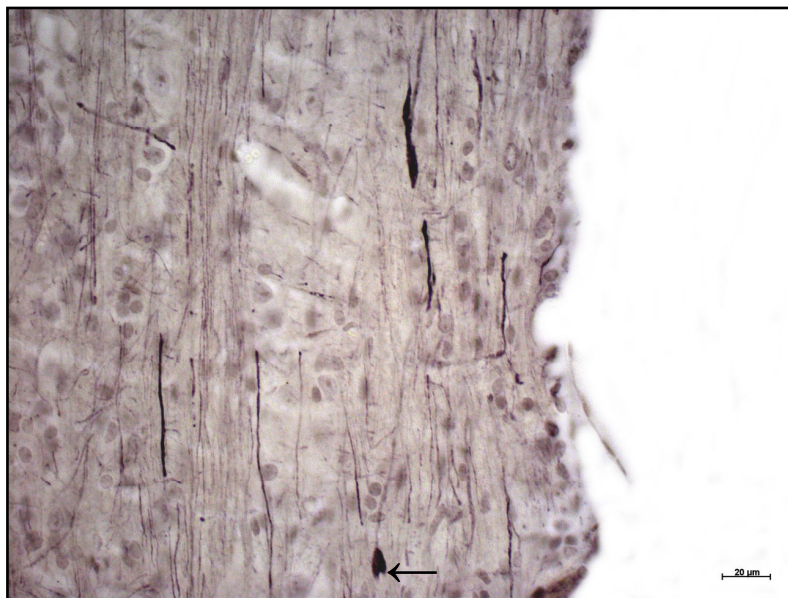


Abb. 4.7.4.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, scid Maus. A Zu sehen ist der CST. Auf ipsilateraler (A) und kontralateraler (B) Seite erkennt man jeweils mehrere spiralförmige stärker angefärbte Axone, wobei auf der ipsilateralen Seite am siebten postoperativen Tag bereits weniger Axone zur Darstellung kommen. Vereinzelt zeigen sich zystische Traktveränderungen (←) durch axonale Schwellung. **B** In der kranialen Grenzregion sind Growth cones (←) vereinzelt als tropfenförmige Auftreibungen der Axonenden stark anti-Neurofilament 200-positiv gefärbt, wobei die distale Spitze des Cones von der Färbung ausgespart bleibt. Anti-Neurofilament 200-Färbung.



4.7.4.4 Vierzehnter postoperativer Tag

Die Läsion erschien am vierzehnten postoperativen Tag ebenfalls mit Neurofilament 200-positiven Zellen ausgefüllt. Axone waren in der Läsion auch bei der scid Maus nicht zu identifizieren.

In der kranialen Grenzregion waren in der lateralen weißen Substanz vereinzelt growth cones zu sehen. Kaudal der Läsion war ebenfalls viel positiv gefärbte Substanz und vereinzelt auch kurze, stärker Neurofilament 200-positive Axone zu

beobachten. Die graue Substanz erschien ebenfalls ohne Veränderungen zu den Vortagen und zu der Gegenseite.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte kranial bei der scid Maus ebenfalls mehr der Neurofilament 200-positiven Neurone als am siebten postoperativen Tag und auch am vierzehnten postoperativen Tag bot der CST medial eine deutlich geringere Anfärbung, wobei einzelne Axone stärker Neurofilament 200-positiv erschienen als auf der Gegenseite. Kaudal war das restliche ipsilaterale Gewebe ohne besondere Auffälligkeiten.

Die kontralaterale Seite zeigte sich auch am vierzehnten postoperativen Tag ohne morphologische Auffälligkeiten zu den anderen postoperativen Tagen.

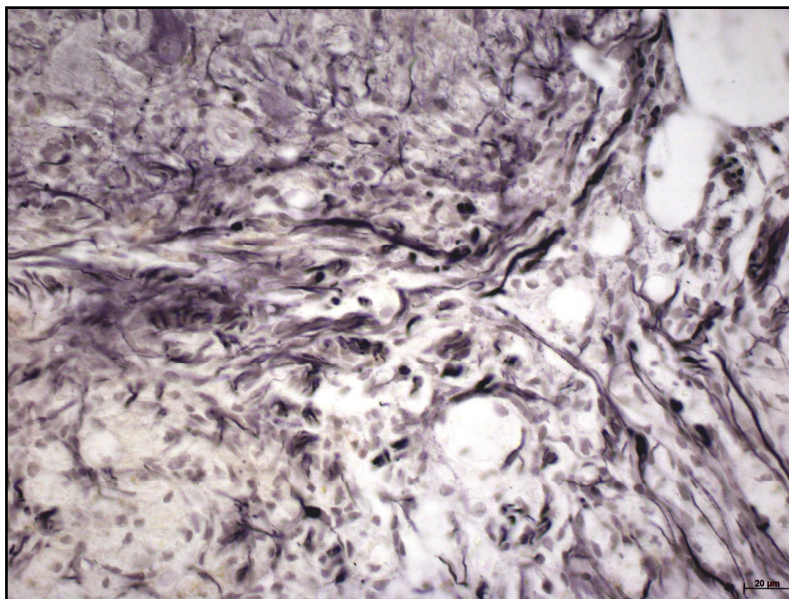


Abb. 4.7.4.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, scid Maus. A Läsion mit dem Läsionsspalt und kranialer und kaudaler Grenzregion. Anti-Neurofilament 200-Färbung.

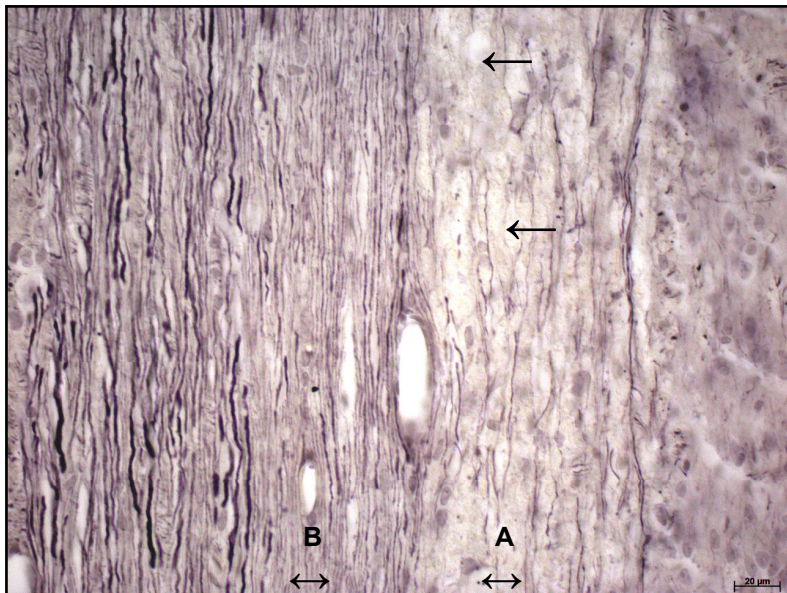
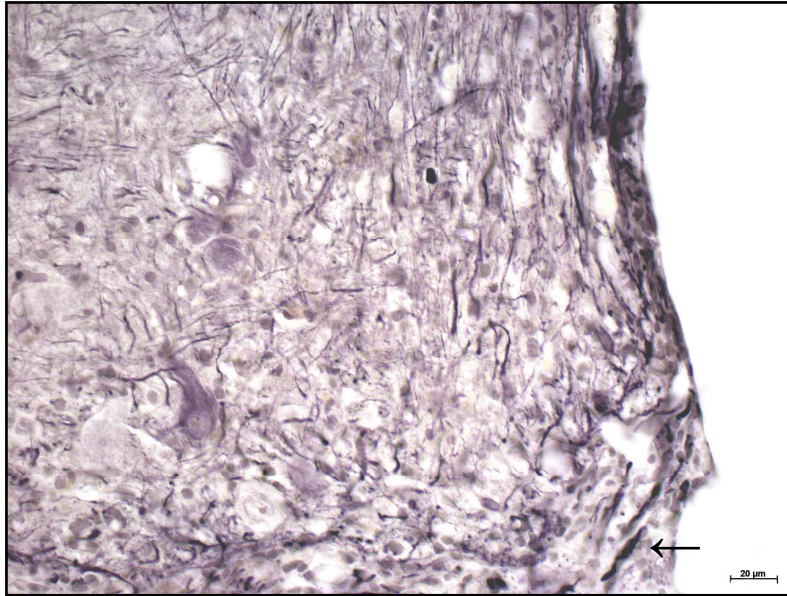


Abb. 4.7.4.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, scid Maus. B Sichtbar ist die kraniale Grenzregion. Die durchtrennten Axone zeigen an ihren Enden eine starke anti-Neurofilament 200 positive Färbung (←) **C** Zu sehen ist der CST. Auf ipsilateraler (**A**) Seite erkennt man keine stark gefärbten Axone mehr. Es zeigt sich eine zunehmende zystische Traktveränderung im ipsilateralen CST kranial der Läsion (←). Auf kontralateraler (**B**) Seite bleibt die Anzahl und Färbeintensität der spiralförmigen, stärker angefärbten Axone gleich. Anti-Neurofilament 200-Färbung.

4.7.5 Morphologie der Neurone und Axone am Rückenmark der unverletzten BALB/c Maus in der anti-PGP 9.5-Färbung

Der Antikörper gegen das Proteine Gene Product 9.5 (PGP 9.5) ist ein polyklonaler panneuronaler Marker und richtet sich gegen ein Isoenzym der Carboxyl-Hydrolase für Ubiquitin und wird als Marker für neuronale und neuroendokrine Zellen verwendet. Es ist in allen Neuronen und dessen axonalen Strukturen vorzufinden.

So stellten sich, bei Betrachtung des Rückenmarks auf Höhe des CST, von lateral nach medial betrachtet zuerst stark anti-PGP 9.5 gefärbte Axone in der lateralen weißen Substanz dar. Sie hatten meist einen longitudinalen Verlauf und erschienen

teils geradlinig im Verlauf, teils spiralförmig. Nicht alle Axone der weißen Substanz waren gleich stark gefärbt. Einzelne Axone ragten, deutlich stärker gefärbt, aus der homogen gefärbten Menge von axonalen Fasern heraus. In der grauen Substanz zeigten Neurone homogene, starke, spezifische Anfärbung, mit Aussparung der Kerne. In der Medianebene, in der weißen Substanz des CST, waren ebenfalls einzelne Axone stärker gefärbt als der homogene Rest. Es zeigte sich kein Unterschied in der Immunreaktivität der Axone und Neurone bezüglich der unterschiedlichen Regionen des Rückenmarks.

4.7.6 Morphologie der Neurone und Axone am Rückenmark der unverletzten scid Maus in der anti-PGP 9.5-Färbung

Die scid Maus zeigte, auf Höhe des CST, ebenfalls zuerst einzelne, stärker gefärbte Axone, teils gerade, teil spiralförmig, in der weißen Substanz. Auch hier färbten sich in der grauen Substanz spezifisch Neurone unterschiedlicher Größe an. Der medial gelegene CST zeigte auch das Bild unterschiedlich stark gefärbter axonaler Strukturen, bei denen einzelne Axone in der Immunreaktivität hervorstachen. Ein Unterschied bezüglich der unterschiedlichen Regionen des Rückenmarks zeigte sich bei der Immunreaktivität der Neurone und Axone nicht.

Zwischen scid Maus und BALB/c Wildtyp ließen sich keine morphologischen oder quantitativen Unterschiede erkennen. Neurone und Axone erschienen gleichartig gefärbt und in gleicher Anzahl vorhanden und gleicher Weise im Rückenmarksgewebe vorkommend.

4.7.7 Anti-PGP 9.5-Färbung in der BALB/c Maus

4.7.7.1 Erster postoperativer Tag

Am ersten postoperativen Tag nach Läsionierung zeigten sich in der lateralen weißen Substanz zerstörte Trakte und durchtrennte axonale Strukturen. Viele Axone waren durch die Schnittführung nach lateral herausgerissen. In der Läsion waren keine durchgehenden Axone mehr zu identifizieren. Einzelne, stark anti-PGP 9.5-positive Zelltrümmer, zeigten sich angefärbt. In der grauen Substanz waren keine immunreaktiven Neurone auszumachen. Der medial gelegene CST zeigte ebenfalls zerstörte Axone die ebenfalls nach lateral abwichen.

In den Grenzregionen zeigten sich, kranial und kaudal der Läsion, die frei endenden durchtrennten Axone. An ihren freien Schnittenden zeigten sie eine verstärkte Immunreaktion. Die graue Substanz zeigte homogen gefärbte Neurone, ohne pathologische Veränderungen zur unläsionierten Gegenseite. Die mediale weiße Substanz auf Höhe des CST zeigte sich ebenfalls ohne Veränderungen zur unläsionierten Gegenseite.

Das restliche ipsilaterale Rückenmarksgewebe bot kranial der Läsion keine morphologischen Unterschiede zur Gegenseite. Weiße und graue Substanz erschienen unauffällig.

Die kontralaterale Seite zeigte sich am ersten postoperativen Tag nach Läsion ohne morphologische Veränderungen.

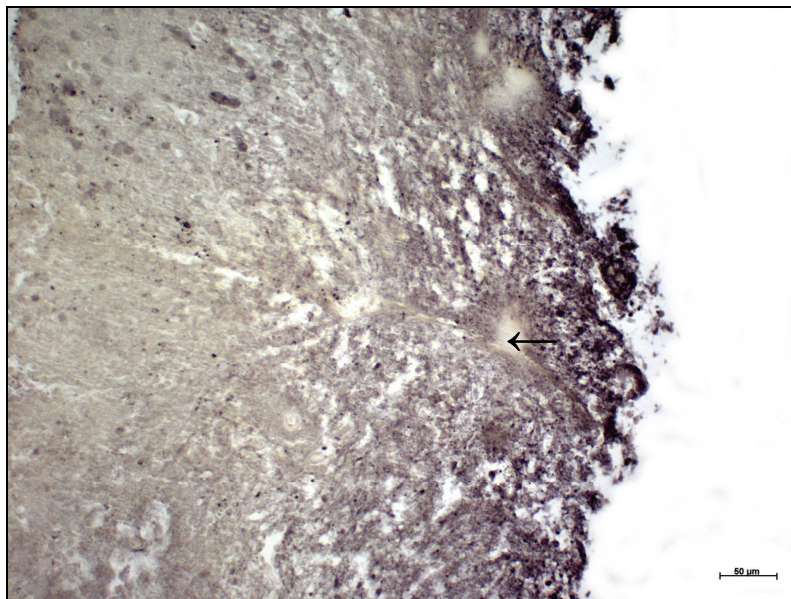


Abb. 4.7.7.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. A Läsion mit dem Läsionsspalt (←) und kranialer und kaudaler Grenzregion. Es zeigt sich die Gewebszerstörung mit interstitiellem Ödem. Deutlich sichtbar die nach lateral ausgelenkten Axonbündel im Bereich der Läsion. Anti-PGP 9.5-Färbung.

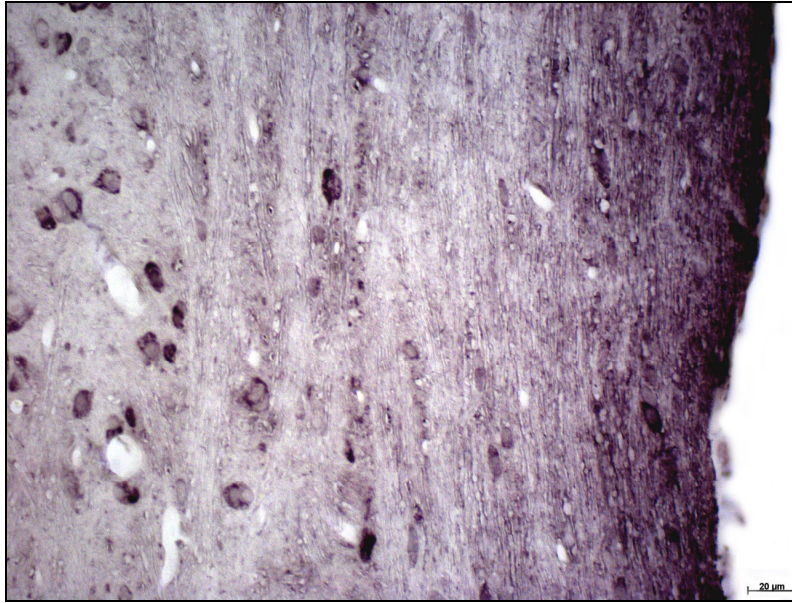


Abb. 4.7.7.1-1: Läsion des Rückenmarks, erster postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. B

Kerngebiet im Bereich der grauen Substanz in der ipsilateralen Rückenmarkshälfte, weit kranial der Läsion. Deutlich sichtbar stark gefärbte große Neurone. Schnitthöhe im Bereich des CST. Anti-PGP 9.5-Färbung.

B

4.7.7.2 Dritter postoperativer Tag

Am dritten postoperativen Tag zeigte sich die Läsion fast frei von anti-PGP 9.5-positiven Axonen und Neuronen. Einzelne Zelltrümmer zeigten sich in der Läsion stark PGP 9.5-positiv angefärbt.

Die Grenzregionen zeigten kranial und kaudal der Läsion in der lateralen weißen Substanz teils spiralförmige Axone mit tropfenförmig aufgetriebenen Enden. Die freien Enden färbten sich teils stark positiv an.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte kranial in der lateralen weißen und der grauen Substanz keine morphologischen Unterschiede zur Gegenseite. Der medial gelegene CST zeigte ebenfalls keine morphologischen Veränderungen.

Auch die kontralaterale Seite zeigte sich unverändert und ohne morphologische Auffälligkeiten.

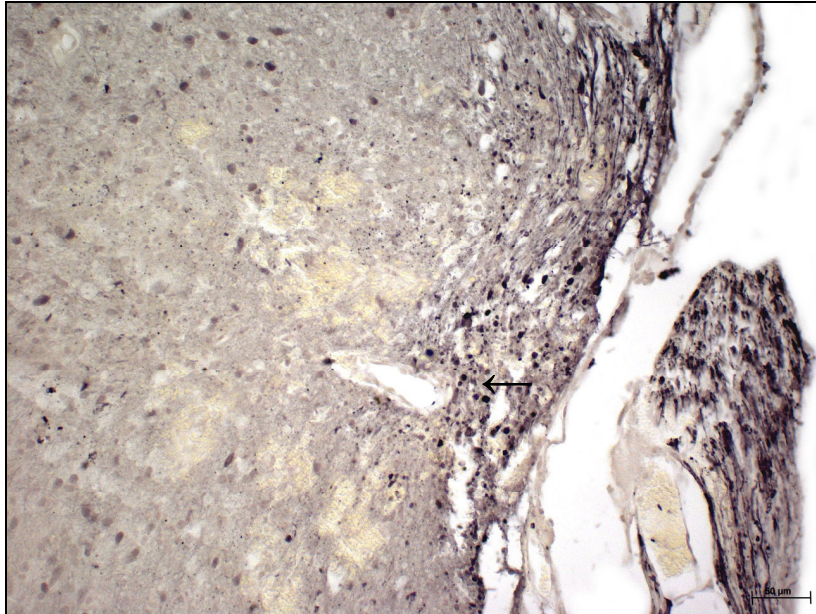


Abb. 4.7.7.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. Läsion mit dem Läsionsspalt und kranialer und kaudaler Grenzregion. Wenig stark anti-PGP 9.5 angefärbte Granula (←) im Läsionsspalt. Anti-PGP 9.5-Färbung.

4.7.7.3 Siebter postoperativer Tag

Am siebten postoperativen Tag nach Läsion zeigte sich die das Rückenmark morphologisch relativ unverändert zum dritten postoperativen Tag. In der Läsion waren wenig anti-PGP 9.5 gefärbte Granula zu sehen. Der Läsionsspalt selbst erschien organisierter als Ausdruck der beginnenden Narbenbildung.

In der kranialen und kaudalen Grenzregion zeigten sich die frei endenden Axone nicht mehr so stark positiv gefärbt wie noch am dritten postoperativen Tag. Die graue Substanz erschien ohne wesentliche Veränderungen zum dritten postoperativen Tag und zur Gegenseite, vereinzelt waren stärker anti PGP 9.5-positive, große Neurone sichtbar.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks, sowie der CST zeigten keine Veränderungen zur Gegenseite oder zum dritten postoperativen Tag.

Auch die kontralaterale Seite zeigte sich ohne morphologische Auffälligkeiten zu den anderen postoperativen Tagen.

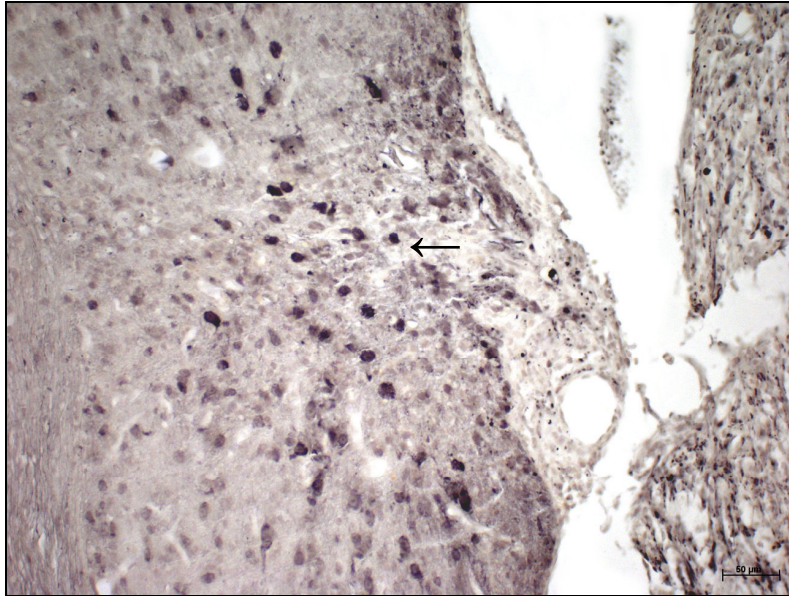


Abb. 4.7.7.3-1: Läsion des Rückenmarks, siebter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. Läsion mit dem Läsionsspalt und kranialer und kaudaler Grenzregion. Wenig stark anti-PGP 9.5 angefärbte Granula (←) im Läsionsspalt. Anti-PGP 9.5-Färbung.

4.7.7.4 Vierzehnter postoperativer Tag

Generell zeigten sich nur wenige Veränderungen zwischen dem siebten postoperativen Tag und dem vierzehnten postoperativen Tag. Die Läsion erschien ebenfalls mit anti-PGP 9.5-positiver Granula ausgefüllt. Axone waren in der Läsion nicht zu identifizieren.

Die kraniale und kaudale Grenzregion zeigten in der lateralen weißen Substanz noch vereinzelt anti-PGP 9.5-positiv gefärbte Bündel von Axonen. Die graue Substanz erschien weiterhin ohne Veränderungen zu den Vortagen und zu der Gegenseite.

Das restliche ipsilaterale Gewebe des Rückenmarks zeigte weit kranial der Läsion im Bereich der lateralen weißen Substanz bündelförmig zusammengezogene Axone als sogenannte „retraction bulbs“ im Rahmen der Degeneration der deafferierten Axonstümpfe. Die graue Substanz zeigte wie an den Vortagen homogen stark gefärbte Neurone.

Die kontralaterale Seite zeigte sich auch am vierzehnten postoperativen Tag ohne morphologische Auffälligkeiten zu den anderen postoperativen Tagen.

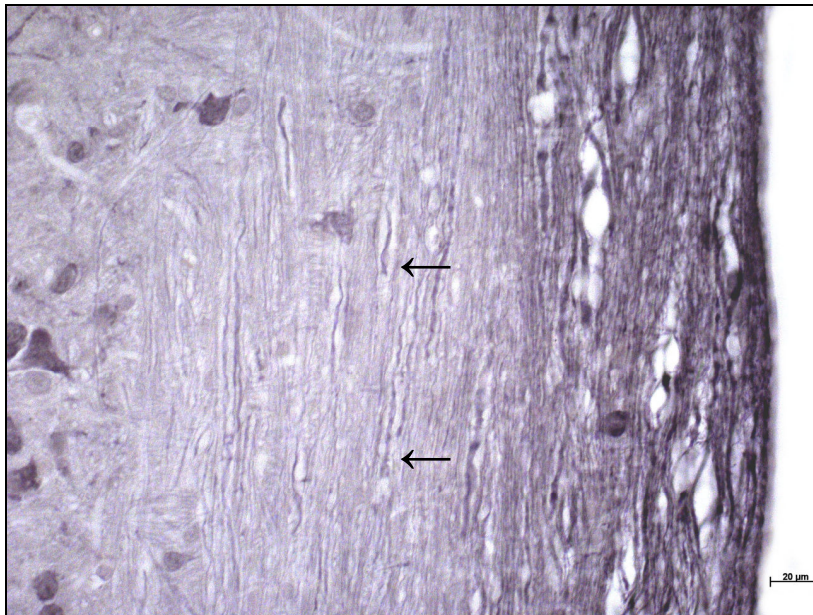


Abb. 4.7.7.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, BALB/c Wildtyp. Ipsilaterales Rückenmark, weit kranial der Läsion. In der lateralen weißen Substanz erkennt man „retraction bulbs“ (←) als Zeichen der Degeneration deafferierter kranialer Axone. Anti-PGP 9.5-Färbung.

4.7.8 Anti-PGP 9.5 Färbung in der scid Maus

4.7.8.1 Erster postoperativer Tag

Es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede in Anzahl, Form und Lokalisation der anti-PGP 9.5 gefärbten Neurone und Axone im Vergleich zu der BALB/c Wildtyp Maus nach Läsionierung im Bezug auf alle untersuchten Regionen des Rückenmarks.

4.7.8.2 Dritter postoperativer Tag

Auch am dritten postoperativen Tag zeigten sich keine morphologischen Unterschiede in Anzahl, Form und Lokalisation der anti-PGP 9.5 gefärbten Neurone und Axone im Vergleich zu der BALB/c Wildtyp Maus nach Läsionierung im Bezug auf alle untersuchten Regionen des Rückenmarks.

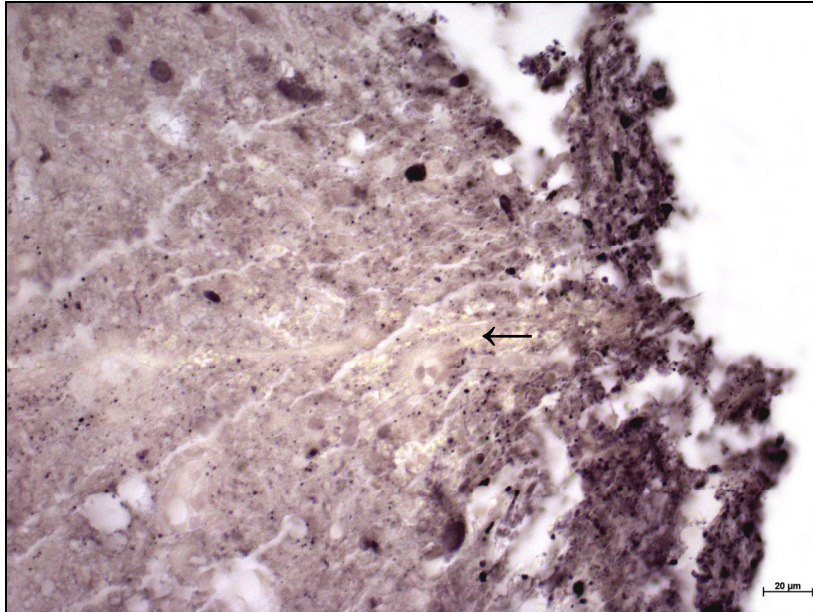


Abb. 4.7.8.2-1: Läsion des Rückenmarks, dritter postoperativer Tag, scid Maus. Läsion mit dem Läsionsspalt (←) und kranialer und kaudaler Grenzregion. Sichtbar sind anti-PGP 9.5 angefärbte Granula im Läsionsspalt. Anti-PGP 9.5-Färbung.

4.7.8.3 Siebter postoperativer Tag

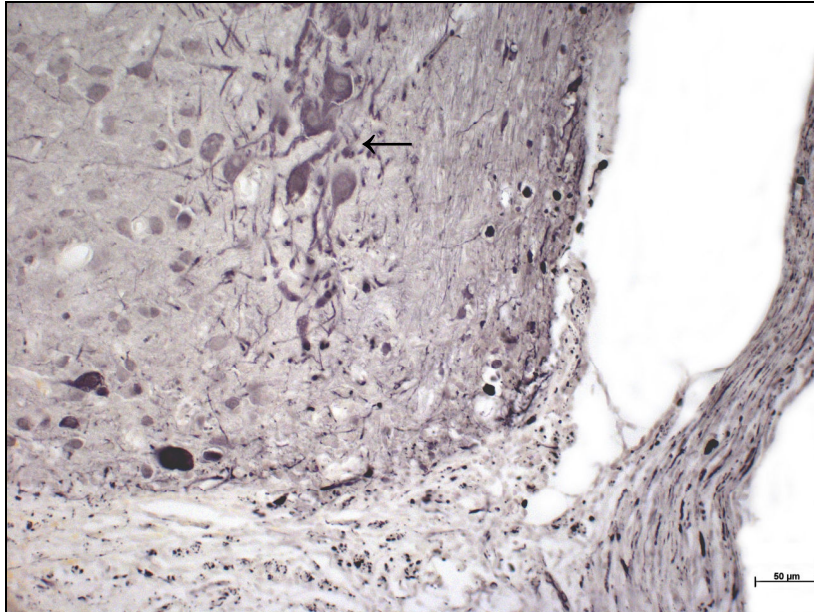
Auch am siebten postoperativen Tag zeigten sich keine morphologischen Unterschiede in Anzahl, Form und Lokalisation der anti-PGP 9.5 gefärbten Neurone und Axone im Vergleich zu der BALB/c Wildtyp Maus nach Läsionierung im Bezug auf alle untersuchten Regionen des Rückenmarks.

4.7.8.4 Vierzehnter postoperativer Tag

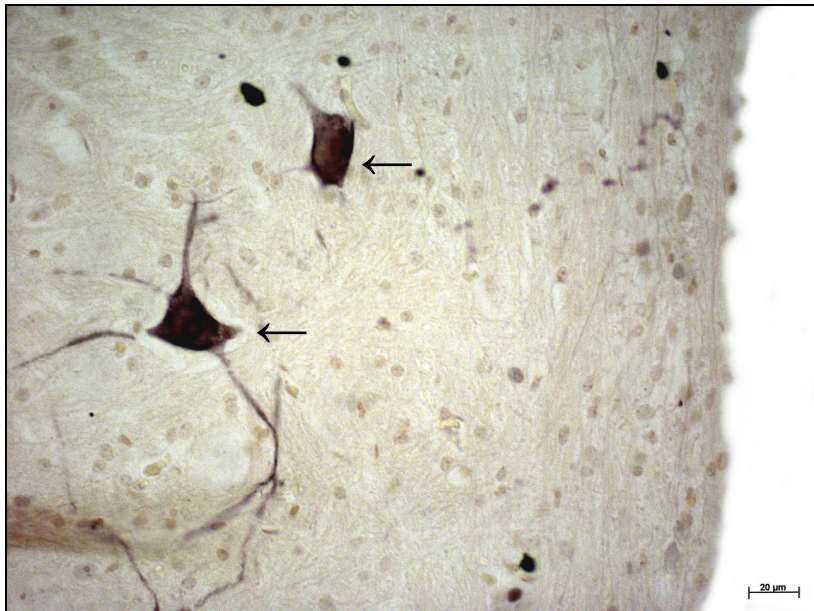
Die Läsion und die Grenzregionen stellten sich am vierzehnten postoperativen Tag nach Setzen der Läsion bei der scid Maus gleich der Wildtyp-Kontrolle dar.

Das restliche ipsilaterale Gewebe zeigte bei der scid Maus jedoch im Unterschied zu der BALB/c Wildtyp Maus in der grauen Substanz kranial der Läsion eine deutliche Hochregulation der Expression von PGP 9.5 in den großen Motoneuronen. Dies zeigte sich nur im Bereich der ipsilateralen grauen Substanz direkt angrenzend an die kraniale Grenzregion. CST und kaudales ipsilaterales Gewebe zeigten sich ohne Veränderungen zu den Vortagen.

Auch die kontralaterale Seite zeigte sich am vierzehnten postoperativen Tag ohne morphologische Auffälligkeiten zu den anderen postoperativen Tagen.



A



B

Abb. 4.7.8.4-1: Läsion des Rückenmarks, vierzehnter postoperativer Tag, scid Maus. A Läsion mit dem Läsionsspalt und kranialer Grenzregion und nach kranial anschließendes ipsilaterales Gewebe. In der grauen Substanz sind stark anti-PGP 9.5 angefärbte Motoneurone als Zeichen einer Hochregulation der Expression von PGP 9.5 sichtbar (←).

B Stärkere Vergrößerung der deutlich angefärbten Motoneurone mit ihren dendritischen Ausläufern (←). Anti-PGP 9.5-Färbung.

5 Diskussion

5.1 Kontrolltier BALB/c Wildtyp Maus

5.1.1 Allgemeine Reaktion auf Verletzung des Rückenmarks

Der allgemeine zeitliche Ablauf nach einer akuten Schädigung des Rückenmarks im Sinne einer Hemitranssektion zeigt auf zellulärer Ebene einen bekannten und bereits vorbeschriebenen Ablauf (Tator et al. 1995, Zhang et al. 1996, Jakeman et al. 2000, Ma et al. 2001, Sroga et al. 2003). Wie schon Tator et al. (1995) beschrieben, kommt es bei unseren Versuchen auch durch die Axonzerreißung und Axonquetschung zu einer nachfolgenden Einblutung (Tag 1,3) mit Ödembildung (bis Tag 7) und lokaler Ischämie der ortsständigen Zellen. Folge ist der Untergang von Neuronen und Gliazellen (ab Tag 1). Deafferierte Axonstümpfe retrahieren, bilden sogenannte „retraction bulbs“, während dessen die distalen Axonenden im Sinne der Wallerschen Degeneration zugrunde gehen. Zentral in der Verletzung bildet sich die Syrinx, eine Pseudozyste, um die sich die beginnende Narbe aus reaktiven Astrozyten, Fibroblasten und aktivierter Mikroglia, sowie extrazellulären Anteilen wie Laminin und Kollagen bildet (Fawcett et al. 1999, Grimpe et al. 2002, Stichel et al. 1998). Die Hautanteile der Narbe setzen sich aus einem zentral gelegenen bindegewebigen Anteil zusammen und einem darum gelegenen Anteil aus aktivierten Astrozyten und der von ihnen gebildeten Astrogliosenarbe (Shearer und Fawcett 2001, Klapka et al. 2002). Auch wir können in unseren Untersuchungen die allgemeine Reaktion des ZNS auf eine traumatische Verletzung und deren zeitlichen Ablauf darstellen und bestätigen. Bei der BALB/c Maus zeigen sich in unseren Untersuchungen keine wesentlichen Unterschiede zu den oben beschriebenen Befunden im zeitlichen Ablauf nach Läsion des ZNS bezüglich der von uns untersuchten Zellarten.

5.1.2 Makroglia

Reaktive Astrozyten zeigen sich bei der BALB/c Maus bereits ab dem dritten Tag nach Hemitranssektion in der Umgebung der Läsion und ab Tag sieben zeigt sich die beginnende Astrogliosenarbe um die Syrinx und die sich bildende bindegewebige Narbe (siehe Abb. 4.6.3.3-1). Das Zentrum der Läsion selbst wird im Verlauf durch

die bindegewebige Narbe ausgefüllt und bleibt frei von anti-GFAP-positiven Astrozyten (s.a. Klapka et al. 2002).

Einen vom zeitlichen Ablauf der Astrogliose identischen Befund beschrieben auch Manhong et al. (2004) in einem Rückenmarkskontusions-Modell bei der C57Black/6 Maus und der 129X1/SvJ Maus und ließen sich in unseren Untersuchungen an der BALB/c Maus bestätigen.

Astrozyten sind Zellen mit umstrittener Funktion in Bezug auf regenerative Prozesse im ZNS (Reiner et al. 1989, Hatten et al. 1991, Eddleston und Mucke 1993, Ridet et al. 1997). In den meisten Modellen einer ZNS-Läsion (Kontusion/Transsektion) bei Ratten und Mäusen wird Astrozyten die strukturelle Wiederherstellung des verletzten Gewebes durch Astrogliose zugesprochen. Axonale Regeneration ist eng mit der Dichte von reaktiven Astrozyten und der Dichte der Astrogliosenarbe zusammenhängend (Inman und Steward, 2003).

Regionen mit einer dichten Astrogliosenarbe zeigten sich bisher in fast allen Untersuchungen als Hindernis für erfolgreiche axonale Regeneration nach Verletzung (Davies et al. 1999, Lemons et al. 1999, Plant et al. 2001, Jones et al. 2002, Tang et al. 2003). Astrozyten exprimieren zudem auch Moleküle, die inhibitorisch auf axonales Wachstum wirken können, wie beispielsweise das Tenascin (Faissner 1997, Fawcett 1997, Becker et al. 2000), CD44 (Mansour et al. 1990), Brevican und Neurocan (Fawcett und Asher 1999). Wie auch schon Manhong et al. (2004) für die C57/Black/6 Maus beschrieben, zeigt die BALB/c Maus kein Wiederauswachsen (sprouting) von Axonen in oder gar über die Astrogliosenarbe, auch nicht vierzehn Tage nach Setzen der Läsion.

Die Oligodendrozyten zeigen bei der BALB/c Maus ab dem dritten Tag nach Läsionierung im Bereich der Läsion einen Zelluntergang. Der Läsionsspalt erscheint am siebten und vierzehnten postoperativen Tag fast frei von anti-CNPase positiven Zellen und Granula. Die apoptotischen Zellen und die Myelinreste werden von aktivierten Makrophagen phagozytiert. Die Oligodendrozyten in den Grenzgebieten, sowie in dem restlichen ipsilaterale Gewebe und im Bereich des kontralateralen Rückenmarks zeigen sich zu allen Zeiten postoperativ unbeeinträchtigt. Auch Shuman et al. (1997) zeigten, dass bei Ratten nach Verletzung des Rückenmarks

viele Oligodendrozyten im Bereich der Läsion zugrunde gehen mit einem Maximum der Apoptose um den achten Tag post Trauma. Dieses führt zu einer Demyelinisierung umliegender Axone und deren Untergang. Als Ursache für die Apoptose der Oligodendrozyten wird die Mikrogliaaktivierung diskutiert (Stoll et al. 2002). Die Demyelinisierung ist auch bei der BALB/c Maus zu identifizieren. Schon am dritten postoperativen Tag sind von CNPase-positivem Material umgebene Zysten in den degenerierenden Trakten der weißen Substanz in der Nähe der Läsion, als Ausdruck der Demyelinisierung, zu erkennen. Auch den Oligodendrozyten wird eine eher inhibitorische Funktion bezüglich der axonalen Wiederaussprossung zugesprochen. Das von ihnen produzierte Myelin und die darin enthaltenen myelin-assoziierten Inhibitoren und in der sich bildenden Narbe verankerte Proteine wie das NOGO-A, MAG, CSPG, Tenascin, Ephrine und Semaphorine (siehe Einleitung) wirken inhibitorisch auf axonale Regeneration.

5.1.3 Extrazelluläre Matrixproteine

Das Laminin als Protein der extrazellulären Matrix verhält sich bei der BALB/c Maus in unseren Untersuchungen wie von Manhong et al. (2004) für die C57Black/6 und die 129X1/SvJ Maus beschrieben. Auch hier sieht man Laminin nur in der Basallamina von Meningen und Gefäßen bis Tag drei nach Läsionierung. Ab dem siebten Tag nach Läsion kommt frei im Interstitium liegendes, nicht mehr gefäßgebundenes Laminin vor. Auch bei unseren Untersuchungen zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Immunreaktivität dieser freien interstitiell liegenden laminin-positiven Granula am vierzehnten postoperativen Tag. Wie schon Frisen et al. (1995) zeigten, besteht eine enge Korrelation zwischen laminin-positiver Matrix, der Astrogliosenarbe und regenerierenden Axonen. Sie zeigten, dass regenerierende Axone in der Astrogliosenarbe mit einer dünnen Schicht aus laminin-positivem Gewebe umgeben sind, welches fraglich von Astrozyten gebildet wird. Es wird vermutet, das Laminin somit eine Rolle bei der Regeneration und Guidance von regenerierenden Axonen hat. Die BALB/c Maus zeigt, wie die von Manhong et al. (2004) für die C57Black/6 und die 129X1/SvJ Maus beschrieben, dieselbe und zeitäquivalente Reaktion bezüglich der Laminindeposition auf eine Läsion des Rückenmarks.

Die fibröse Narbe im Läsionszentrum besteht zu einem großen Teil aus Kollagen des Typs IV, ebenfalls ein extrazelluläres Matrixprotein. Dieses Kollagen ist ein Bestandteil von Basalmembranen wie sie auch in Blutgefäßen vorkommen (Stichel et al. 1999, Shearer und Fawcett 2001). Kollagen Typ IV Immunreaktivität zeigt sich bei der BALB/c Maus ähnlich dem Laminin gefäßgebunden und im Bereich der Meningen. Ab dem siebten postoperativen Tag nach Läsion liegt das Kollagen jedoch nicht mehr nur gefäßgebunden vor. Es zeigen sich anti-Kollagen Typ IV positive Granula direkt im Läsionsspalt, welche auch am vierzehnten postoperativen Tag noch sichtbar sind. Kollagen Typ IV ist der Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix und wird von verschiedenen Zellen des ZNS wie Fibroblasten (Berry et al. 1983), Astrozyten (Liesi und Kauppila 2000) und Endothelzellen (Schwab et al. 2001) produziert. Es wurde in früheren Untersuchungen festgestellt, dass Kollagen Typ IV-haltige Narben im ZNS Wachstumsbarrieren für Axone nach Verletzungen darstellen (Stichel und Müller 1998). Diese Befunde bestätigen sich in unseren Untersuchungen. Zu keinem Zeitpunkt gelingt es aussprossenden Axonen (growth cones) die bindegewebige Narbe zu durchdringen.

5.1.4 Neurone und Axone

Die direkt durch die Läsion betroffenen Neurone in der grauen Substanz und direkt zerstörte axonale Strukturen der Trakte zeigen bei der BALB/c Maus schon am ersten postoperativen Tag einen Zelluntergang. Dieser offenbart sich am dritten und siebten postoperativen Tag, nach Abklingen des interstitiellen Ödems und beginnender Resorption des traumatischen Hämatoms, in seinem vollen Umfang. In den Grenzregionen, besonders kranial, ist ab dem dritten postoperativen Tag eine ischämische, eosinophile Degeneration betroffener Neurone zu sehen. Bereits ab dem ersten postoperativen Tag zeigt sich die beginnende Traktdegeneration der lateralen weißen Substanz auf Höhe des Zentralkanals und des CST nach kranial und kaudal. Die Trakte zeigen sich teils zystisch aufgetrieben durch den direkten Zelluntergang von Neuronen und Oligodendrozyten und die Retraktion der rostralen Axone, sowie der beginnenden Wallerschen Degeneration der kaudalen Axonstümpfe. Die sich bildenden Zysten in den Trakten zeigen sich anti-CNPase-positiv gefärbt als Hinweis auf demyelinisierende Prozesse der zugrunde gehenden Axone und den sie umgebenden Oligodendrozyten. Der Kortikospinaltrakt (CST) zeigt ab dem siebten postoperativen Tag ebenfalls stark degenerative Prozesse im

ipsilateralen, kranialen Anteil. Auch hier sind zystische Veränderungen als Hinweis auf die Traktdegeneration und das axonale Swelling ersichtlich mit einem Maximum um den vierzehnten Tag nach Trauma.

5.1.5 Reaktion des Immunsystems auf Verletzung des Rückenmarks

In der Inflammation als Immunantwort auf die Läsion zeigt die BALB/c Wildtyp Maus ein ebenfalls bereits beschriebenes Muster. Neutrophile Granulozyten zeigen sich bereits nach 24 Stunden nach Trauma in ihrer größten Anzahl im Bereich der Läsion und den Grenzregionen. Carlson et al. (1998) beschrieben ebenfalls das inflammatorische Maximum durch neutrophile Granulozyten in der Ratte nach traumatischer Rückenmarksverletzung 24 Stunden post Trauma, so dass unsere Befunde mit denen von Carlson et al. (1998) erhobenen Befunden übereinstimmen. Bereits am dritten Tag nach Läsion ist die Anzahl an neutrophilen Granulozyten bei der BALB/c Maus deutlich reduziert. Die Lymphozyteninfiltration erreicht bei der BALB/c Maus am dritten postoperativen Tag ihren zahlenmäßigen Höhepunkt, bleibt jedoch hinter der Anzahl der Granulozyten zurück. Popovich et al. (1998) beschrieben einen äquivalenten Befund. Sie zeigten, dass die T-Lymphozyten-Infiltration zwischen Tag drei und Tag sieben bei der Ratte nach traumatischer Rückenmarksverletzung am stärksten ist. Auch Schaumzellen als Zeichen aktiver Makrophagen zeigen sich bei der BALB/c Maus in unseren Untersuchungen am dritten postoperativen Tag in ihrer größten Anzahl. Carlson et al. (1998) beschrieben die größte Anzahl von phagozytierenden Makrophagen um 48 Stunden post Trauma. Eine direkte Korrelation dieser Befund ist nicht möglich, da wir den zweiten postoperativen Tag (48 Stunden) nicht untersucht haben. Bereits am siebten postoperativen Tag sind in unseren Untersuchungen bei der BALB/c Maus keine Granulozyten in der Läsion und den Grenzregionen mehr auszumachen. Die Anzahl an Lymphozyten ist am siebten postoperativen Tag deutlich gesunken. Schaumzellen sind vereinzelt noch identifizierbar. Am vierzehnten Tag werden in der Läsion und den Grenzregionen nur noch vereinzelt Lymphozyten identifiziert und nur noch bei zwei Tieren können Schaumzellen in der Läsion beobachtet werden. Die übrigen Regionen des Rückenmarks bleiben von einer Infiltration von Entzündungszellen zu jedem Zeitpunkt nach Läsion weitgehend unbehelligt.

5.2 scid Maus

5.2.1 Allgemeine Reaktion auf Verletzung des Rückenmarks

Die allgemeine Reaktion der scid Maus auf die Hemitranssektion des Rückenmarks ist gleich dem der Wildtyp Kontrolltiere. Es kommt zu derselben Reaktion auf die Axonverreissung und Axonquetschung mit Einblutung (Tag 1,3), Ödembildung (bis Tag 7) und lokaler Ischämie der ortsständigen Zellen (ab Tag 1). Folge ist ebenfalls der Untergang von Neuronen und Gliazellen. Auch in der sich bildenden Narbe gibt es im zeitlichen Ablauf und der Zellmorphologie im Bezug auf die untersuchten Marker keine Unterschiede. Die bindegewebige Narbe und die Fibroblastenproliferation sind gleichwertig. Auch die im Verlauf sich zeigende reaktiver Astrogliose zeigt keinen Unterschied zwischen Wildtyp BALB/c Maus und scid Maus. Im Bezug auf die Proteine der extrazellulären Matrix (Laminin und Kollagen), und der Makroglia (Astrozyten und Oligodendrozyten) gibt es keine Unterschiede in der Reaktion, Form und Anzahl der Zellen auf eine Verletzung des Rückenmarks zwischen BALB/c Wildtyp Maus und scid Maus.

5.2.2 Reaktion des Immunsystems auf Verletzung des Rückenmarks

Die Inflammation in der scid Maus gestaltet sich jedoch entsprechend anders. Die primäre Antwort auf die Läsion besteht auch in der scid Maus in einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Zeitlich und in ihrer Anzahl zeigen sie sich gleich dem Wildtyp BALB/c bereits nach 24 Stunden. Im Unterschied zu der Wildtyp BALB/c Maus sind am ersten postoperativen Tag in der Läsion und den Grenzregionen aber bereits lymphozyten-ähnliche Zellen sichtbar. Unsere Vermutung ist, dass es sich hierbei um unreife Lymphozyten-Vorläuferzellen und NK-Zellen (natural-killer-cells) handelt. Die Zellanzahl erscheint höher als die, am ersten postoperativen Tag, vereinzelt vorkommenden Lymphozyten bei der BALB/c Maus, was auf eine funktionierende Chemotaxis bezüglich lymphoider Zellen schließen lässt. Da sich diese Zellen im Unterschied zur BALB/c Wildtyp Maus bereits am ersten postoperativen Tag zeigen, besteht der Verdacht, dass der chemotaktische Feedbackmechanismus bei der scid Maus bezüglich der spezifischen Neuroinflammation sogar erhöht ist. Am dritten postoperativen Tag ist die Anzahl der lymphozyten-ähnlichen Zellen bereits reduziert. Hier zeigen sich gleich der

Wildtyp Maus Monozyten/Schaumzellen in der Läsion. Auch bei der scid Maus sind am siebten postoperativen Tag noch bei zwei Tieren Schaumzellen in der Läsion zu identifizieren. Granulozyten und lymphozyten-ähnliche Zellen sind am siebten postoperativen Tag bei der scid Maus nicht mehr auszumachen. Am vierzehnten Tag nach Läsion sind bei einem Tier noch Schaumzellen in der Läsion identifiziert ohne dass sich andere Zellen der akuten Inflammation zeigten.

5.2.3 Reaktion zentraler Neurone und Axone auf Verletzung des Rückenmarks

Die zentralen Neurone bei der scid Maus zeigen mit ihren Axonen dasselbe Reaktionsmuster auf die Läsion wie bei der Wildtyp Maus. Auch hier kommt es initial zu einer Neurodegeneration und dem Zelltod der Neurone in der Läsion. Am dritten Tag zeigen sich beim Wildtyp und bei der scid Maus eine eosinophile, ischämische Degeneration umliegender Neurone in den Grenzregionen. Die Traktdegeneration im distalen und proximalen Bereich der Läsion zeigt sich identisch zwischen Wildtyp und scid Maus im postoperativen Verlauf. In der anti-PGP 9.5-Färbung fällt jedoch ein gravierender Unterschied auf. Am vierzehnten postoperativen Tag zeigen sich deutlich mehr stark anti-PGP 9.5 gefärbte große Neurone (Motoneurone) im Bereich der grauen Substanz im ipsilateralen, kranialen Rückenmark bei der scid Maus im Vergleich zur Wildtyp BALB/c Maus am gleichen postoperativen Tag. Das Protein-Genprodukt (PGP 9.5) ist ein zytosolisches Protein mit 24,8 kDa und gehört zur C-terminalen Hydrolase-Untergruppe des Ubiquitins. Es wird in starkem Ausmaß in Neuronen und neuroendokrinen Zellen von Wirbeltieren exprimiert, wo es 1-5 % der Gesamtpopulation löslicher Proteine ausmacht. PGP 9.5 entfernt Ubiquitin von anderen Proteinen und schützt sie vor dem Abbau durch Proteasen (Rode et al. 1985, Piccinini et al. 1996, Leong et al. 1999). Li et al. (1997) entdeckten, dass die Höhe der Expression von PGP 9.5 in Neuronen und ihren Axonen nach Verletzungen des Rückenmarks bei Ratten abhängig von der Stärke des Traumas ist. Sie mutmaßten, dass die Höhe der PGP 9.5 Expression die Regenerationsfähigkeit von Axonen anzeigt und somit ihre Fähigkeit den retrograden axonalen Transport wiederaufzunehmen und abnormale Proteine über den, bislang nicht ganz verstandenen, ubiquitin-vermittelten, proteolytischen Stoffwechselweg abzubauen.

In wieweit diese Hochregulation von PGP 9.5 bei der scid Maus auf veränderte oder gar verbesserte Regenerationsfähigkeit zurückzuführen ist, bleibt unklar und müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Es zeigt sich auch bei der scid Maus kein Wiederauswachsen (sprouting) von Axonen in die Läsion zu keinem Zeitpunkt nach Setzen des Traumas. Auch ist die Anzahl oder Morphologie der „growth cones“ als Zeichen wiederaussprossender Axone nicht verändert im Vergleich zum Wildtyp. Das spezifische Immunsystem führt in unseren Untersuchungen somit nicht zu einer spezifischen Reaktion oder Modifikation bezüglich der Regenerationsfähigkeit zentraler Neurone im Rückenmark von Mäusen. Zusammenfassend kann nach der vorliegenden Untersuchung festgestellt werden, dass die Regenerationsfähigkeit nach traumatischer Rückenmarkstranssektion weitgehend unbeeinflusst von der spezifischen Immunantwort durch B- und T-Lymphozyten erscheint, wenn man scid Mäuse mit ihrem immunkompetenten Wildtyp BALB/c vergleicht.

6 Zusammenfassung

Pathophysiologisch kommt es im Rahmen eines akuten Rückenmarkstraumas zu einer lokalen Schädigung des Rückenmarks durch Zerstörung der axonalen Leitungsbahnen zwischen Gehirn und Peripherie mit nachfolgender Einblutung, Ischämie und Ödembildung. Folge ist der Untergang von Neuronen und deren Axonen, sowie von Gliazellen mit folgender lebenslanger Funktionseinschränkung bis hin zum vollständigen Funktionsverlust von peripherer Sensorik und Motorik oder ein Kombinationausfall dieser Qualitäten.

Grundsätzlich sind die Axone von adulten Neuronen im Zentralnervensystem in der Lage, nach Verletzung wiederauszusprossen und den entstandenen Defekt zu überbrücken, allerdings nur inkomplett. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch die mit einer Verletzung des Rückenmarks, durch die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke, einhergehende, allgemeine und spezifische Entzündungsreaktion eine wichtige, meist aber inhibitorische Rolle bezüglich axonaler Regeneration spielt.

Um die genaue Auswirkung der spezifischen Immunantwort auf die axonale Regenerationsfähigkeit nach traumatischer Rückenmarksverletzung zu untersuchen, haben wir ein Mäusemodell eingesetzt, indem wir immundefiziente scid (severe combined immunodeficiency) Mäuse mit deren immunkompetenten Wildtyp, BALB/c Mäusen, in einem Hemiläsions-Modell des Rückenmarks untersucht haben. Es zeigte sich, dass trotz fehlender spezifischer Immunantwort in der scid Maus, keine histologischen Unterschiede bezüglich der axonalen Regenerationsfähigkeit des ZNS bis zum untersuchten vierzehnten postoperativen Tag zu identifizieren waren. Einzig ein immunhistochemischer Marker gegen das Protein-Genprodukt 9.5 (PGP 9.5) zeigte im Rückenmarksgewebe der scid Maus eine deutlich erhöhte Expression von PGP 9.5 am vierzehnten postoperativen Tag an. Die Höhe der PGP 9.5-Expression steht in engem Zusammenhang mit der axonalen Fähigkeit des retrograden axonalen Transports und dem Abbau abnormaler Proteine über den ubiquitin-vermittelten, proteolytischen Stoffwechselweg. Dies sehen wir als indirekten Hinweis auf eine dem Wildtyp überlegene Regenerationsfähigkeit des ZNS. Diese Feststellung bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um den genauen Hintergrund der bei den scid Mäusen erhöhten PGP 9.5-Expression und dessen Bedeutung bezüglich regenerativer Prozesse im ZNS zu verstehen.

7 Literaturverzeichnis

Andersson P-B, Perry V H, Gordon S (1992) The CNS acute inflammatory response to excitotoxic neuronal cell death. *Immunol. Lett.* 30: 177-182

Becker T, Anliker B, Becker CG, Taylor J, Schachner M, Meyer RL, Bartsch U (2000) Tenascin-R inhibits regrowth of optic fibers in vitro and persists in the optic nerve of mice after injury. *Glia* 29: 330-346

Berry M, Maxwell WL, Logan A, Mathewson A, McConnell P, Ashhurst DE, Thomas GH (1983) Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochir. Suppl.* 32: 31-53

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-530

Bosma GC, Davisson MT, Ruetsch NR, Sweet HO, Shultz LD, Bosma MJ (1989) The mouse mutation severe combined immunodeficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics* 29: 54-57

Bosma MJ, Carroll AM (1991) The scid mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 323-350

Bosma MJ (1992) B and T cell leakiness in the scid mouse mutant. *Immunodeficiency Rev.* 3(4): 261-276

Bracken M B, Shepard M J, Collins W F Jr, Holford T R, Baskin D S, Eisenberg H M, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J C, Marshall L F, Perot P L Jr, Piemeier J, Sonntag V K H, Wagner F C, Wilderger J L, Winn H R, Young W (1992) Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. *J. Neurosurg.* 76: 23-31

Bregman BS, Coumans JV, Dai HN, Kuhn PL, Lynskey J, McAtee M, Sandhu F (2002) Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 137: 257-273

Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L (1998) Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.* 151: 77-88

Caroni P, Schwab ME (1988) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J. Cell. Biol.* 106: 1281–1288

Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403: 434–439

Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J (1997) Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 390: 680–683.

Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J (1999) Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 19: 5810-5822

David S (2002) Recruiting the immune response to promote long distance axon regeneration after spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 137: 407–414

David S, Aguayo AJ (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system „bridges“ after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214: 931–933

David S, Bouchard C, Tsatas O, Giftochristos N (1990) Macrophages can modify the nonpermissive nature of the adult mammalian central nervous system. *Neuron* 5: 463–469

DeVivo MJ (1997) Causes and costs of spinal cord injury in the United States. *Spinal Cord* 35: 809–813

De Winter F, Holtmaat AJ, Verhaagen J (2002) Neuropilin and class 3 semaphorins in nervous system regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515: 115-139

Eddlestone M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes- implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15-36

Fawcett JW (1997) Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell. Tissue Res.* 290: 371-377

Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 49: 377–391

Faissner A (1997) The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell. Tissue Res.* 290: 331-341.

Fawcett JW, Shearer MC, Adcock KH (2002) In vitro models of glial boundaries. *Glial Interfaces in the Nervous System* (Aldskogius H, Fraher J, eds, IOS Press): 131-138

Filbin MT (1995) Myelin-associated glycoprotein: a role in myelination and in the inhibition of axonal regeneration? *Curr. Op. Neurobiol.* 5: 588-595

Fitch MT, Silver J (1997) Activated macrophages and the blood-barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Exp. Neurol.* 148: 587-603

Frisen J, Haegerstrand A, Risling M, Fried K, Johansson CB, Hammarberg H, Elde R, Hokfelt T, Cullheim S (1995) Spinal axons in central nervous system scar tissue are closely related to laminin-immunoreactive astrocytes. *Neuroscience* 65: 293-304

GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403: 439–444

Gras G, Chretien F, Vallat-Decouvelaere AV et al (2003) Regulated expression of sodium-dependent glutamate transporters and synthetase: a neuroprotective role for activated microglia and macrophages in HIV infection? *Brain Pathol.* 13: 211–222

Grimpe B, Silver J (2002) The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog. Brain Res.* 137: 333–49

Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA (1991) Astroglia in CNS injury. *Glia* 4: 233-243

Heumann R, Lindholm D, Brandlow C E, Meyer M, Radeke M J, Misko T P, Shooter E, Thoenen H (1987) Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rats sciatic nerve during development, degeneration and regeneration: role of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 8735-8737

Hickey W F, Hsu B L, Kimura H (1990) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 28: 254-260

Huber AB, Schwab ME (2000) Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol. Chem.* 381: 407-419

Hurlbert RJ (2001) The role of steroids in acute spinal cord injury. *Spine* 26: 39–46

Inman DM, Steward O (2003) Ascending sensory, but not other long-tract axons, regenerate into the connective tissue matrix that forms at the site of spinal cord injury in mice. *J. Comp. Neurol.* 462: 431-449

Jakeman, LB, Guan Z, Wei P, Ponnappan R, Dzwonczyk R, Popovich PG, Stokes BT (2000) Traumatic spinal cord injury produced by controlled contusion in mouse. *J. Neurotrauma* 17: 299-319

Jones LL, Yamaguchi Y, Stallcup WB, Tuszynski MH (2002) NG2 is a major chondroitin sulfat proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci.* 22: 2792-2803

Kelly T A (1988) The role of the immune system in central nervous system regeneration (theoretical considerations). *Med. Hypothesis* 26: 13-15

Lawson L, Perry V H, Gordon S (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48: 405-415

Lemons ML, Howland DR, Anderson DK (1999) Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation. *Exp. Neurol.* 160: 51-65

Leong ASY, Cooper K, Leong FJWA (1999) *Manual of diagnostic antibodies for immunohistology*. London: Oxford University Press: 291-296

Li GL, Farooque M, Holtz A, Olsson Y (1997) Expression of the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase PGP 9.5 in axons following spinal cord compression trauma. An immunohistochemical study in the rat. *APMIS* 105: 384-390

Li GL, Farooque M (1996) Expression of ubiquitin-like immunoreactivity in axons after compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol.* 91: 155-160

Liesi P, Kauppila T (2002) Induction of type IV Kollagen and other basement-membrane-associated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar. *Exp. Neurol.* 173: 31-45

Lotan M, Schwartz M (1994) Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *Faseb. J.* 8: 1026-1033

MaM, Wei T, Boring L, Charo IF, Ransohoff RM, Jakeman LB (2002) Monocyte recruitment and myelin removal are delayed following spinal cord injury in mice with CCR2 chemokine receptor deletion. *J. Neurosci. Res.* 68: 671-702

Manhong Ma , Ping Wei , Tao Wei , Richard M Ransohoff , Lyn B Jakeman (2004) Enhanced axonal growth into a spinal cord contusion injury site in a strain of mouse (129X1/SvJ) with a diminished inflammatory response. *J. Comp. Neurol.* 5: 469-486

Mansour H, Asher R, Dahl D, Labkovsky B, Perides G, Bignami A (1990) Permissive and non-permissive reactive astrocytes: immunofluorescence study with antibodies to the glial hyaluronate-binding protein. *J. Neurosci. Res.* 25: 300-311

McDonald JW (1999) Repairing the damaged spinal cord. *Sci. Am.* 281: 64–73

McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276: 66–71

Merrill J E, Jonakait G M (1995) Interactions of the nervous and immune system in development, normal brain homeostasis, and disease. *Faseb. J.* 9: 611-618

Miranda JD, White LA, Marcillo AE, Willson CA, Jagid J, Whittemore SR (1999) Induction of eph B3 after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 156: 218-222

Palladini G, Grossi M, Maleci A, Lauro G M, Guidetti B (1987) Immunocomplexes in rat and rabbit spinal cord after injury. *Exp. Neurol.* 95: 639-651

Perry V H, Brown M C, Gordon S (1987) The macrophage response to central and peripheral nerve injury. *J. Exp. Med.* 165: 1218-1223

Piccinini M, Merighi A, Bruno R, Cascio P, Curto M, Mioletti S, et al. (1996) Affinity purification and characterization of protein gene product 9.5 (PGP9.5) from retina. *Biochem. J.* 318: 711-716

Plant GW, Bates ML, Bunge MB (2001) Inhibitory proteoglycan immunoreactivity is higher at the caudal than the rostral Schwann cell graft-transected spinal cord interface. *Mol. Cell. Neurosci.* 17: 471-487

Popovich PG, Wei P, Stokes BT (1997) Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J. Comp. Neurol.* 377: 443-464

Prinjha R, Moore SE, Vinson M et al (2000) Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 403: 383–384

Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E et al (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat. Med.* 4: 814–821.

Reiner PJ, Eng LF, Jakeman L (1989) Reaktive astrocyte and axonal outgrowth in the injured CNS: is gliosis really an impediment to regeneration? *Neur. Reg. and Transpl.*: 183-209

Ridet JL, Malhortra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20: 570-577

Rode J, Dhillon AP, Doran JF, Jackson P, Thompson RJ (1985) PGP9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. *Histopathology* 9:147-58

Ryba M, Grieb P, Bidzinski J, Pastuszko M, Dziewicki C, Iwaska K (1991) Cyclosporine A for the prevention of neurological deficit following subarachnoidal hemorrhage. *Stroke* 22: 531-531

Schori H, Yoles E, Schwartz M (2001) T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 119: 199–204

Schwab et al (2004) Akute Rückenmarksverletzung: Experimentelle Strategien als Basis zukünftiger Behandlung. *Dtsch Arztebl* 101: 1422–1434

Schwab JM, Brechtel K, Nguyen TD, Schluesener HJ (2000) Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. *J. Neuroimmunol.* 111: 122–130

Schwab ME, Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol. Rev.* 76: 319–370

Schwab ME (2002) Repairing the injured spinal cord. *Science* 295: 1029–1031

Schwab ME, Caroni P (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J. Neurosci.* 8: 2381–2393

Schwab JM, Beschoner R, Nguyen TD, Meyermann R, Schluesener HJ (2001) Differential cellular accumulation of connective tissue growth factor defines a subset of reactive astrocytes, invading fibroblasts, and endothelial cells following central nervous system injury in rats and humans. *J. Neurotrauma* 18: 377–388

Schwartz M, Shaked I, Fisher J, Mizrahi T, Schori H (2003) Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity. *Trends Neurosci* 26: 297–302

Schwartz M, Moalem G, Leibowitz-Amit R, Cohen IR (1999) Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci.* 22: 295–299

Shearer MC, Fawcett JW (2001) The astrocyte/meningeal cell interface: a barrier to successful nerve regeneration? *Cell. Tissue Res.* 305: 267–273

Short DJ, El Masry WS, Jones PW (2000) High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury – a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord* 38: 273–286

Short D (2000) Use of steroids for acute spinal cord injury must be reassessed. *BMJ* 321: 1224–1226

Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS (1997) Apoptosis of Microglia and Oligodendrocytes after Spinal Cord Contusion in Rats. *J. Neurosci. Res.* 50: 798–808

Sroga JM, Jones TB, Kigerl KA, McGaughy VM, Popovich PG (2003) Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J. Comp. Neurol.* 462: 223–240

Stichel CC, Muller HW (1998) The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell. Tissue Res.* 294: 1–9

Stichel CC, Hermanns S, Luhmann HJ, Lausberg F, Niermann H, D'Urso D, Servos G, Hartwig HG, Müller HW (1999) Inhibition of Collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons. *Eur. J. Neurosci.* 11: 632-646

Stichel CC, Müller HW (1994) Relationship between injury-induced astrogliosis, laminin expression and axonal sprouting in the adult rat brain. *J. Neurocytol.* 23: 615-630

Stichel CC, Müller HW (1998) Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Prog. Neurobiol.* 56: 119-148

Stichel CC, Niermann H, D'Urso D, Lausberg F, Hermanns S, Müller HW (1999) Basal membrane-depleted scar in lesioned CNS: characteristics and relationships with regenerating axons. *Neuroscience* 93: 321-333

Stoll G, Jander S, Myers RR (2002) Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 7: 13-27

Tang X, Davies JE, Davies SJ (2002) Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2 and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J. Neurosci. Res.* 71: 427-444

Tator CH (1995) Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol.* 5: 407–413

Tator CH (1998) Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. *Neurosurgery* 42: 696–707

Teichner A, Morselli E, Buttarelli F R, Caronti B, Pontieri F E, Venturini G, Palladini G (1993) Treatment with Cyclosporine a promotes axonal regeneration in rats submitted to transverse section of spinal cord. J. Hirnforsch. 34: 343-349

Zhang Z, Krebs CJ, Guth L (1996) Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. Exp. Neurol.143: 141-152

8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Lorke für die Überlassung des Themas und die freundliche und kompetente Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit, die Hilfestellung bei der mikroskopischen Auswertung und für die Bereitschaft mir immer jede Art von Frage geduldig zu beantworten.

Herrn Prof. Dr. U. Schumacher danke ich sehr für das in mich gesetzte Vertrauen, seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die Erlaubnis, die Einrichtungen des Institutes zu nutzen.

Frau Maike Ziesenitz, Frau Susanne Feldhaus, Frau Renate Gehrcke und Herrn Klaus Siebert danke ich für die hervorragende Einführung in die Laborarbeiten und die Unterstützung bei der Ausarbeitung und Durchführung der Routine- und der immunhistochemischen Färbungen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, Cornelia und Sigmar Rundt, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Meiner Schwester Niraja und meinem Bruder Manuel danke ich, da sie mich stets unterstützt haben und immer für mich da sind.

9 Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Daniel Rundt
 Geburtsdaten: 18.08.1978 in Münster/Westfalen
 Mutter: Cornelia Rundt, geb. 16.04.1953
 Vater: Sigmar Rundt, geb. 28.05.1950
 Schwester: Niraja Rundt, geb. 12.07.1981
 Bruder: Manuel Rundt, geb. 01.03.1976

■ Ausbildung

1985-1991 Waldorfschule Benefeld, Bomlitz, Niedersachsen
 1991-1998 Gymnasium Walsrode, Walsrode, Niedersachsen
 1995-1996 Little Chute High School, Wisconsin, USA, als Mitglied des parlamentarischen Patenschaftsprogramms (PPP) des deutschen Bundestages
 1998-1999 Zivildienst Seehospital Sahlenburg der Nordheim-Stiftung, Cuxhaven, Zentrum für Orthopädie/Wirbelsäulenchirurgie

■ Studium der Medizin

2000-2006 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
 04.2002 Physikum
 08.2003 1. Staatsexamen
 04.2005 2. Staatsexamen
 10.2006 3. Staatsexamen
 11.2006 Approbation

■ Praktisches Jahr

2005-2006 Praktisches Jahr
 Chirurgie AK St. Georg, Hamburg (Prof. Dr. Eggers)
 Innere Medizin AK Altona, Hamburg (Dr. Braumann)
 Unfallchirurgie AK St. Georg, Hamburg (Prof. Dr. Eggers)

■ Aktuelle Tätigkeit

2007-2008 Assistenzarzt in der Abteilung für Allgemein-, Unfall-, und Wiederherstellungschirurgie des Evangelischen Amalie-Sieveking-Krankenhauses, Hamburg, unter der Leitung von Herrn Dr. med. T.E. Langwieler
 Seit 03/2008 Assistenzarzt in der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des Berufsgenossenschaftlichen Unfallkrankenhauses Hamburg, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Jürgens

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.