

Aus der Klinik für Neurochirurgie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

**Die Anti-apoptotische Wirkung von Granulozyten-Kolonie stimulierendem
Faktor (G-CSF) nach inkompletter traumatischer Nervenschädigung des
N. ischiadicus der Ratte**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von: Jan Philipp Kühn
geb. am: 21.06.1990 in Homburg/Saar

1. Inhaltsverzeichnis

2. Abbildungsverzeichnis	1
3. Abkürzungsverzeichnis	3
4. Zusammenfassung	6
5. Einleitung	10
5.1. Periphere Nervenläsion	10
5.2. Apoptose	13
5.3. Die Bcl-2 Familie	15
5.4. G-CSF	17
6. Zielsetzung der Arbeit	20
7. Material und Methoden	21
7.1. Tierexperimenteller Teil	21
7.1.1. Verabreichung von G-CSF und Glukose 5%	22
7.1.2. Wasserstrahldissektor	22
7.1.3. Operation	23
7.1.4. Messung des neurologischen Defizits	26
7.1.5. Messung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit	28
7.1.6. Fixierung des Gewebes	30
7.2. Immunhistochemischer Teil	32
7.2.1. Fluoreszenz-Doppelfärbung	33
7.2.2. Histologische Auswertung	34
7.2.3. Kriterien für α -Motoneurone	34
7.2.4. Mikroskopie	35
7.3. Statistik	35
8. Ergebnisse	36
8.1. Tierexperimenteller Teil	36
8.1.1. Ermittlung der neurologischen Regeneration mittels des SFI	36
8.1.2. Ermittlung der neurologischen Regeneration mittels der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (mNLG)	38
8.2. Immunhistochemischer Teil	40
8.2.2. Quantitative Analyse für ChAT	40
8.2.2. Quantitative Analyse für Bcl-2	44
8.2.3. Quantitative Analyse für Bax	47
8.2.4. Quantitative Analyse für G-CSFR	50
8.2.5. Fluoreszenz-Doppelfärbung	54
9. Diskussion	57

10. Ausblick.....	63
11. Literaturangaben.....	64
12. Anhang.....	74
13. Publikationen	80
14. Danksagung.....	82
15. Lebenslauf	83

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 5-1 Querschnittsanatomie des peripheren Nervs	11
Abbildung 5-2 Direkte Aktivierung von Bax und Bak	15
Abbildung 5-3 Struktureller Aufbau des G-CSFR.	18
Abbildung 7-1 sterile Einmal-Doppelkolbenpumpe und Applikator, Bajonett mit Absaugung.....	23
Abbildung 7-2 Erbejet 2	23
Abbildung 7-3 freigelegter Nervus ischiadicus..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 7-4 computergesteuertes Fahrgestell	25
Abbildung 7-5 Läsion am Nervus ischiadicus mittels Wasserstrahl.....	26
Abbildung 7-6 Ratte während der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit.....	28
Abbildung 7-7 Nerven-Monitoring-System.....	29
Abbildung 7-8 Messwerte bei der motorischen Neurografie	20
Abbildung 7-9 Übersicht der Querschnitte des Rückenmarks	31
Abbildung 7-10 Schematische Darstellung der ABC-Methode ⁷	32
Abbildung 7-11 Fluoreszenz-Doppelfärbung	33
Abbildung 7-12 Beispielszellen für die Auswert-Kriterien für Motoneurone.....	34
Abbildung 8-1 Score des SFI am 3. Tag für G5% und G-CSF	37
Abbildung 8-2 Score des SFI am 14. Tag für G5% und G-CSF	37
Abbildung 8-3 Score der mNLG am 4. Tag für G5% und G-CSF	38
Abbildung 8-4 Score der mNLG am 7. Tag für G5% und G-CSF	39
Abbildung 8-5 Score der mNLG am 14. Tag für G5% und G-CSF	39
Abbildung 8-6 Gesamtergebnis Antikörperfärbung gegen ChAT.....	41
Abbildung 8-7 Antikörperfärbung gegen ChAT Gruppe 1 Tag.....	42
Abbildung 8-8 Antikörperfärbung gegen ChAT Gruppe 4 Tage.....	43
Abbildung 8-9 Antikörperfärbung gegen ChAT 7 Tage.....	43
Abbildung 8-10 Antikörperfärbung gegen ChAT 14 Tage.....	44
Abbildung 8-11 Gesamtergebnis Antikörperfärbung gegen Bcl-2.....	45
Abbildung 8-12 Antikörperfärbung gegen Bcl-2 Gruppe 1 Tag.....	46
Abbildung 8-13 Antikörperfärbung gegen Bcl-2 Gruppe 4 Tage.....	46
Abbildung 8-14 Antikörperfärbung gegen Bcl-2 Gruppe 7 Tage.....	47
Abbildung 8-15 Antikörperfärbung gegen Bcl-2 Gruppe 14 Tage.....	47
Abbildung 8-16 Gesamtergebnis Antikörperfärbung gegen Bax.....	48

Abbildung 8-17 Antikörperfärbung gegen Bax Gruppe 1 Tag.....	49
Abbildung 8-18 Antikörperfärbung gegen Bax Gruppe 4 Tage.....	49
Abbildung 8-19 Antikörperfärbung gegen Bax Gruppe 7 Tage.....	50
Abbildung 8-20 Antikörperfärbung gegen Bax Gruppe 14 Tage.....	50
Abbildung 8-21 Gesamtergebnis Antikörperfärbung gegen G-CSFR.....	51
Abbildung 8-22 Antikörperfärbung gegen G-CSFR Gruppe 1 Tag	52
Abbildung 8-23 Antikörperfärbung gegen G-CSFR Gruppe 4 Tage	52
Abbildung 8-24 Antikörperfärbung gegen G-CSFR Gruppe 7 Tage	53
Abbildung 8-25 Antikörperfärbung gegen G-CSFR Gruppe 14 Tage	53
Abbildung 8-26 Doppelfärbung ChAT und Bcl-2.....	54
Abbildung 8-27 Doppelfärbung ChAT und Bax.....	55
Abbildung 8-28 Doppelfärbung ChAT und G-CSFR	56
Abbildung 12-1 Ablauf der immunchemischen Färbemethode	74

3. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AK	Antikörper
Akt-Kinase	Proteinkinase
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Apaf-1	Apoptose Protease-aktivierender Faktor 1 (apoptotic protease activating factor-1)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Bad	pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (Bcl-2 associated agonist of cell death)
Bak	pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (Bcl-2 homologous antagonist/killer)
Bax	pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (Bcl-2 associated X protein)
Bcl-2	anti-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (B-cell lymphoma-2)
Bcl-w	anti-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (Bcl-2-like protein 2)
Bcl-xL	anti-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (B-cell lymphoma-extra large)
BH	Bcl-2 homologe Domäne
BH3 only proteine	Proteine der Bcl-2 Familie die nur eine (die 3.) homologe Domäne mit Bcl-2 haben
Bid	pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (BH3 interacting-domain death agonist)
Bik	pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (Bcl-2-interacting killer)
Bim	pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (Bcl-2-like protein 11)

BMF	Protein, welches die Apoptose aktiviert (Bcl-2-modifying factor)
bzw.	beziehungsweise
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
cm	Zentimeter
DISC	Multiproteinkomplex im Apoptose weg (death inducing signaling complex)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	extrazellulär aktivierte Kinase
FADD	Adapterprotein im Signalweg der Apoptose (Fas associated death domain containing protein)
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
G-CSFR	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor Rezeptor
HRK	Protein, das die Apoptose begünstigt (Activator of apoptosis harakiri)
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
JAK	Januskinasen
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
L	Liter
M	Morbus
Mcl-1	anti-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (myeloid cell leukemia protein)
Mg	Milligramm
Min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mNLG	motorische Nervenleitgeschwindigkeit
n	Anzahl
N.	Nervus
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerval growth factor)

Noxa	pro-apoptisches Protein der Bcl-2-Familie (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein)
ns	nicht signifikant
ON	über Nacht (over night)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pim-1	Serin/Threonin-Kinase
Puma	pro-apoptisches Protein der Bcl-2-Familie (p53 upregulated modulator of apoptosis)
RT	Raumtemperatur
SFI	Index zur Evaluation der funktionellen Erholung des Nervus ischiadicus (sciatic functional index)
STAT	an Zellwachstum und Proliferation beteiligte Transkriptionsfaktoren (Signal transducer and activator of transcription)
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand)
z.B.	zum Beispiel

4. Zusammenfassung

Der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF) hat, wie in vorausgehenden Studien gezeigt, anti-apoptotische, antiinflammatorische, neuroprotektive und neuroregenerative Eigenschaften. In der vorliegenden Studie wurde analysiert, inwiefern sich die Gabe von G-CSF auf die Regenerationsfähigkeit des Nervus ischiadicus der Ratte nach inkompletter Schädigung auswirkt. Ein besonderes Augenmerk lag auf der möglichen anti-apoptotischen Wirkung von G-CSF auf den Erhalt der dem N. ischiadicus zugehörigen α -Motoneuronen.

Nach mikrochirurgischer Präparation des rechten N. ischiadicus von erwachsenen, männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurde eine Läsion mit einem Wasserstrahldissektor in einer Stärke von 80 bar gesetzt.

Insgesamt wurden 48 Tiere in zwei verschiedenen Gruppen untersucht. Eine Gruppe erhielt intravenös G-CSF. Die andere, als Kontrollgruppe fungierende Gruppe, erhielt 5%ige Glukoselösung (G5%). Jede dieser zwei Gruppen wurde in vier Untergruppen mit jeweils sechs Tieren eingeteilt. Der Beobachtungszeitraum der Tiere umfasste bis zu 14 Tage. G-CSF respektive G5% wurden je nach Untergruppe direkt postoperativ oder am ersten, zweiten oder dritten postoperativen Tag appliziert. An diesen Tagen erfolgte auch die Evaluation des neurologischen Defizits mittels Lauftests und der Ableitung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (mNLG). Nach Abschluss der klinischen Untersuchung und Tötung der Tiere erfolgte die histologische Aufarbeitung der Rückenmarkssegmente L4 bis L6. Zum Nachweis möglicher anti-apoptotischer Aktivität wurde die Expression der Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT), des Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor Rezeptors (G-CSFR), und von Bcl-2, einem anti-apoptotischen Protein, sowie von Bax, einem pro-apoptotischen Protein, mittels immunhistochemischer Färbung untersucht. Verglichen mit der Kontrollgruppe ergab sich in Bezug auf die Lauftests und Ableitung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit für die Behandlung mit G-CSF ein positiver Trend, jedoch keine Signifikanz hinsichtlich einer überlegenen funktionellen Regeneration innerhalb der ersten 14 Tage.

Immunhistochemisch zeigte sich, dass es nach gesetzter Nervenläsion auf der rechten Seite bei der Kontrollgruppe histologisch zu einer signifikant reduzierten Anzahl an α -Motoneuronen des Rückenmarkes verglichen mit der unbehandelten

linken Seite kam. Bei der Gruppe mit G-CSF Behandlung gab es hingegen keinen Unterschied zwischen der Anzahl der α -Motoneurone auf beiden Seiten. Auch die Antikörperfärbung gegen G-CSFR verhielt sich dementsprechend: Während bei der Kontrollgruppe auf der rechten Seite des Rückenmarks eine signifikant geringere Anzahl an α -Motoneuronen mit G-CSF-Rezeptor-Expression als auf der nicht geschädigten Seite vorlag, war bei den Tieren mit G-CSF Gabe die Anzahl der α -Motoneurone mit G-CSF-Rezeptor-Expression auf beiden Seiten gleich. Der Nachweis des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 zeigte, dass bei der Kontrollgruppe im Vergleich zur ungeschädigten linken Seite auf der rechten Seite des Rückenmarks die Bcl-2-positiven Zellen reduziert vorlagen. Demgegenüber war bei der G-CSF Gruppe die Anzahl der Bcl-2-positiven Zellen auf beiden Seiten gleich. Passend dazu verhielt sich die Antikörperfärbung gegen das pro-apoptische Protein Bax. Hier waren bei der Kontrollgruppe die positiv gefärbten Zellen auf der geschädigten rechten Seite des Rückenmarks häufiger zu sehen als auf der intakten linken Seite. In der Gruppe mit G-CSF-Behandlung zeigte sich dagegen, dass auf beiden Seiten des Rückenmarkes die Bcl-2-positiven Zellen in gleicher Anzahl vorlagen. Zudem konnte mittels Fluoreszenz-Doppelfärbungen gezeigt werden, dass in α -Motoneuronen, die durch den spezifischen Marker ChAT identifiziert wurden, gleichzeitig auch G-CSFR, Bcl-2 und Bax nachweisbar waren. Somit konnte für die durchgeführten Analysen verifiziert werden, dass in den verschiedenen Antikörperfärbungen jeweils spezifisch α -Motoneurone gefärbt und ausgewertet wurden.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Gabe von G-CSF eine protektive Wirkung hinsichtlich der durch eine traumatische Läsion induzierten Apoptose von α -Motoneuronen zu haben scheint. Dies könnte sich trotz fehlender Signifikanz in den ersten 14 Tagen positiv auf die Langzeitregeneration des geschädigten Nervs hinsichtlich der Funktion auswirken.

Title: *The anti-apoptotic effect of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) after incomplete traumatic sciatic nerve lesion of the rat.*

Abstract:

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) has been shown to have anti-apoptotic, antiinflammatory, neuroprotective and neuroregenerative properties. The present study investigated the potential regenerative effect of G-CSF after incomplete traumatic sciatic nerve lesion in a rat model and its possible influence on the α -motor neurons in the spinal cord.

After performing a microsurgical preparation of rats' right sciatic nerves, a lesion was created using a water-jet dissector with a pressure of 80 bar.

In total, 48 animals were assigned to two groups. Animals of one group underwent treatment with intravenous G-CSF. The other group serving as control group was treated with glucose 5%-solution. Every group was divided into four subgroups of six animals. G-CSF or glucose 5%-solution, respectively, was applied directly postoperative and, depending on the subgroup, at day one, three and five after surgery. Neurological deficits were evaluated by using walking tests and electrophysiological examinations. At the end of the observation period the animals were sacrificed for histological evaluation of the lumbar spinal cord's segments L4 to L6. Immunohistochemical staining for detection of choline-acetyltransferase (ChAT), granulocyte-colony stimulating factor-receptor (G-CSFR), as well as Bcl-2, an anti-apoptotic protein, and Bax, a pro-apoptotic protein was performed.

The walking tests and motoric nerve impulse tests showed a positive trend towards a faster improvement in rats that have been treated with G-CSF compared to the control group. Nevertheless, statistic evaluation failed to show significance.

ChAT staining revealed a significantly reduced number of α -motoneurons on the injured right side of the spinal cord compared with the contralateral left side. In animals that received G-CSF, no differences between the numbers of α -motoneurons on both sides were detected. Antibody staining against G-CSFR obtained the same result. In the control group, the numbers of α -motoneurons and positivity for G-CSFR were significantly lower on the lesioned side of the spinal cord whereas the numbers of α -motoneurons with positivity for G-CSFR was not decreased significantly compared to the contralateral side in animals of the G-CSF-group. Additionally, the number of Bcl-2-positive cells and signs of anti-apoptosis were reduced on the

damaged side compared with the contralateral side. In animals that received G-CSF, the number of Bcl-2-positive cells were equal on both sides. Accordingly, the antibody staining against the pro-apoptotic protein Bax displayed more positive stained cells on the damaged side than on the intact side of the spinal cord in the control group. In the G-CSF-group, no differences in the number of Bax-positive cells between the two sides were detected. Fluorescent double staining of α -motoneurons revealed a positive simultaneous expression of G-CSF-R, Bcl-2 and Bax.

Thus, the application of G-CSF after peripheral nerve trauma revealed strong anti-apoptotic effects on spinal cords α -motoneurons of the sciatic nerves' section. Although no functional benefit could be shown in the first two weeks, there might be long-term beneficial effects regarding peripheral nerve regeneration after a traumatic lesion.

5. Einleitung

5.1. Periphere Nervenläsion

Eine periphere Nervenverletzung ist definiert als „Unterbrechung/Sistieren der Funktionsfähigkeit eines Nervs durch oder in Folge äußerer Noxen, nämlich Schnitt, Stich, Dehnung, Prellung/Druck inklusive der iatrogenen, physikalischen (Elektrotrauma, Kälte, Strahlung usw.) und chemischen Läsionen (Injektion usw.)“⁷.

Mit einer Inzidenz von 1,6%¹³⁹, einer Prävalenz von 2,8%⁹⁸ sowie einer perioperativen Prävalenz von 0,03%¹⁵³ sind Nervenverletzungen vergleichsweise selten. Neben Verkehrsunfällen, welche die Hauptursache von Nervenläsionen darstellen^{37,70,98,152}, machen iatrogene Nervenläsionen mit etwa 17%- 26% einen sehr großen Anteil aller Nervenläsionen aus^{71,147}. Am häufigsten sind die oberen Extremitäten betroffen^{37,70,98,113,147,152}, bei den unteren Extremitäten kommt es am häufigsten zu einer Schädigung des N. ischiadicus^{37,113,152} und des N. peroneus⁹⁸. Vor allem jüngere Patienten mit einem Durchschnittsalter von 32-35 Jahren sind von Nervenläsionen betroffen^{37,70,98,152}. Das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt 2,4:1³⁷. Nervenverletzungen gehen meist mit hohen Behandlungskosten einher^{72,115}. Periphere Nerven sind in der Regel gemischte Nerven, enthalten folglich motorische, sensible und vegetative Fasern. Bei einer Schädigung kann es somit zu schlaffen Lähmungen, Beeinträchtigungen der Oberflächen- und Tiefensensibilität, vegetativen Störungen, regionalen Reflexausfällen und Schmerzen bzw. schmerzhaften Parästhesien kommen⁴². Somit haben Nervenläsionen meist schwerwiegende Konsequenzen für den Betroffenen und führen oft zu Behinderungen. Im Allgemeinen sind die Erholungschancen bisher schlecht.

Nervenläsionen lassen sich nach Einteilung von Sir Henry Seddon, einem britischen Chirurgen und Neurowissenschaftler, je nach Schweregrad in Neurapraxie, Axonotmesis und Neurotmesis einteilen¹²⁵. Während bei der Neurapraxie die Kontinuität leitender Strukturen des Nervs erhalten bleibt, liegt bei der Axonotmesis eine lokale Zerstörung der Axone und Markscheiden bei erhaltenen Hüllstrukturen vor. Sind sowohl die Nervenfasern als auch die Hüllstrukturen teilweise oder vollständig durchtrennt spricht man von einer Neurotmesis^{27,42,125}.

Die Läsion eines Axons hat meist nicht nur eine lokale Degeneration des Nervs mit Untergang der Nervenfasern zur Folge¹⁵. Es kann auch zu Veränderungen des Zellkörpers der α -Motoneurone, der Schwannzell-Hülle, der Myelinscheide und letztendlich der Zielorgane kommen^{7,134}.

α -Motoneurone sind Nervenzellen des zentralen Nervensystems, die im Hirnstamm und im Vorderhorn des Rückenmarks lokalisiert sind. Über die motorische Endplatte innervieren sie die Skelettmuskulatur⁸. Den Hauptanteil eines peripheren Nervs macht Bindegewebe aus. So besteht beispielsweise der N. ischiadicus auf Hüfthöhe zu 85% aus Bindegewebe^{7,94}. Diese bindegewebige Hüllstruktur ist bei allen Nerven nach dem gleichen Schema aufgebaut (Abb. 5-1).

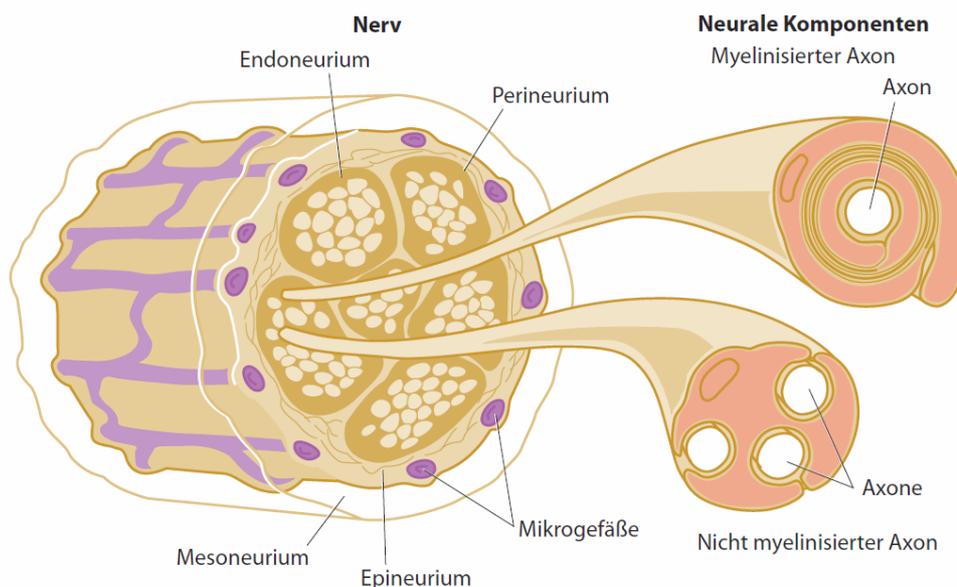


Abbildung 5-1 Querschnittsanatomie des peripheren Nervs (Berger und Hierner, 2002)¹⁴

Das Epineurium, die äußere Hüllstruktur, setzt sich aus Bindegewebe mit kollagenen und elastischen Fasern zusammen. Durch Verteilung des Drucks schützt es den Nerv vor zu hohen fokalen Druckbelastungen und gewährt durch eine gewisse Undulation Mobilität in Richtung Längsachse^{7,49,94,142}.

Dem Epineurium haftet außen das Mesoneurium an, eine kapillarisierte äußere Gleitschicht^{7,94}. Sie dient als Verschiebeschicht und gewährleistet, dass bei physiologischen Bewegungen der Nerv zwischen den einzelnen Gewebeschichten hin und her gleiten kann⁷.

Alle Faszikel werden vom Perineurium umgeben, welches aus perineuralen Fibroblasten besteht. Zwischen den Fibroblasten sind Kollagenfasern angeordnet⁷. Verletzungen des Perineuriums können zum Verlust des Axons führen. Da sie Bindegewebsreaktionen initiieren sowie erhalten können, spielen Axone bei

traumatischen Nervenläsionen eine große Rolle^{7,78,94}. Des Weiteren sind die perineuralen Fibroblasten Bestandteil der Blut-Nerven-Schranke^{7,94}.

Unterhalb des Perineuriums liegt das Endoneurium. Es umschließt jedes myelinisierte Axon resp. Gruppen von unmyelinisierten Axonen^{7,94}. Die einzelnen Nervenfaszikel bilden Plexus, d.h. sie tauschen Fasern mit anderen Faszikeln aus. Der Faseraustausch nimmt von proximal nach distal ab⁷. Eine Nervenrekonstruktion nach Läsion stellt aufgrund dieser interfazikulären Plexus nicht wieder die exakte originäre Anatomie her und dies umso weniger je proximaler die Nervenverletzung ist^{7,94}.

Eine axonale Degeneration von motorischen Nerven lässt sich nicht von einer Neuronopathie, also einem Untergang bzw. Verlust von Vorderhornzellen, unterscheiden⁶. Eine komplette axonale Schädigung kann von einer inkompletten Schädigung abgegrenzt werden. Während bei der kompletten axonalen Schädigung alle zum Nerv gehörigen Fasern degenerieren und komplette motorische und sensorische Störungen vorliegen, geht eine inkomplette Nervenläsion mit unvollständigen Ausfällen einher, da nur ein Teil der Nervenfasern degeneriert¹⁵. Nach einer Verletzung ist Nervengewebe prinzipiell fähig zur Regeneration. Bei inkompletten Nervenläsionen kommt es innerhalb von kurzer Zeit zur Aussprossung von intakten Axonen in denervierte Muskelfasern und so zu einer Reinnervation¹⁵.

Die Wachstumsgeschwindigkeit liegt je nach Entfernung zum Rückenmark bei etwa 1 bis 3 mm pro Tag^{7,15,94}.

Die Regeneration wird durch bestimmte Fähigkeiten des Nervs positiv beeinflusst: Der Neurotropismus beschreibt die Fähigkeit die Richtung des axonalen Wachstums zu beeinflussen, die Neurotrophie die Fähigkeit die Ausreifung zu steuern. Die Fähigkeit das umgebende Gewebe in seiner Regenerationsrichtung zu beeinflussen wird als Kontaktführung bezeichnet. Die Gewebsspezifität beschreibt die bevorzugte Reinnervation von Motoneuronen zueinander statt von sensorischen Neuronen²⁷.

Demgegenüber gibt es auch Faktoren, die der Reinnervation entgegenwirken. Dies sind beispielsweise metabolische Störungen⁶⁵, eine große Distanz zwischen proximalem und distalem Stumpf⁴⁴, das Alter der Läsion¹⁴⁹, sowie die Art der Läsion^{11,85}.

Ist nach einer Nervenläsion der Muskel denerviert beginnt er zu atrophieren. Da die betroffenen Muskelfasern noch intakt sind, ist dieser Verlust an Muskelmasse

prinzipiell reversibel. Bleiben Muskelfasern jedoch über einen längeren Zeitraum nicht innerviert, kommt es zu einer irreversiblen Umwandlung in Fett- und Bindegewebe⁷.

Bei hochgradigen Verletzungen kann eine Regeneration erst nach einer Operation oder einer Nervenreplantation erfolgen. Hier kann eine mikrochirurgische Versorgung auch nach mehr als einem Jahr erfolgreich sein^{4,7,114}. Für eine bestmögliche Erholung der motorischen Funktion sollte die Nervenrekonstruktion jedoch nicht mehr als 6 Monate nach dem Verletzungszeitpunkt liegen^{7,113}.

Trotz der Fähigkeit von Nervengewebe bei Verletzungen zu regenerieren, kommt es oft nur zu einer Heilung mit funktionellem Defekt. Dies hat für den betroffenen Patienten häufig eine permanente Behinderung mit verringerter Lebensqualität zur Folge. Um dem entgegen zu wirken besteht somit ein dringender Bedarf die Nervenregeneration zu verbessern^{7,11,27,32}.

5.2. Apoptose

Als Apoptose bezeichnet man den programmierten, durch die Zelle selbst induzierten Zelltod^{2,31,53,55,68,84}. Das Wort Apoptose kommt aus dem Griechischen und beschreibt den Fall welcher Blätter von herbstlichen Bäumen^{55,68}. Der Apoptose steht die Nekrose (gr. Nekros = Leichnam), einem passiven Absterben der Zelle, gegenüber. Sie tritt auf, wenn die Zelle so stark geschädigt wurde, dass keine Apoptoseeinleitung mehr möglich ist⁵⁵. Bei der Nekrose schwillt die Zelle an bis die Plasmamembran undicht wird, platzt und Zellinhalt in den Interzellularraum austritt. Dies löst eine Entzündungsreaktion aus. Demgegenüber verläuft die Apoptose ohne Entzündungsreaktion. Nach Schrumpfung der Zelle verlässt sie ihren Zellverband und zerfällt nach Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen in Membranvesikel, die anschließend von Makrophagen phagozytiert werden^{2,31,31,84}. Ausgelöst wird die Apoptose durch verschiedene Stimuli wie z.B. DNA-Schäden, Ausschüttung von Zytokinen oder dem Funktionsverlust von Mitochondrien. Der Apoptose wird im Organismus eine große Rolle zugeschrieben. Sie ist wichtig für die Embryonalentwicklung, die Entwicklung der Immuntoleranz, die Homöostase der Zellzahl und die Entfernung von geschädigten oder infizierten Zellen. Eine fehlregulierte Apoptose kann zur Entstehung verschiedener Krankheiten beitragen. Beispielsweise zeichnen sich neurodegenerative Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington und die amyotrophe Lateralsklerose durch

einen Verlust bestimmter Neurone aus, der durch exzessive Apoptose ausgelöst wird. Bei Hirn- oder Herzinfarkten, die primär durch Ischämie und Nekrose geprägt sind, wird das betroffene Organ zusätzlich durch verstärkte Apoptose geschädigt. Demgegenüber kann eine gehemmte Apoptose zur Tumorentstehung beitragen^{1,2,84,108}.

Eine zentrale Aufgabe bei der Apoptose haben die sogenannten Caspasen (Cysteiny-Aspartyl-Proteasen). Dies sind Proteasen, die einen Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum enthalten und ihre Zielproteine spezifisch hinter einem Aspartatrest spalten. In gesunden Zellen liegen Caspasen als inaktive Vorstufen, als sogenannte Procaspasen vor, die durch Proteolyse aktiviert werden. Man unterscheidet zwei Gruppen: Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen. Die Gruppe der Initiatorcaspasen sind an der Auslösung der Apoptose beteiligt und stehen somit am Anfang der Signalkaskaden. Zu den Initiatorcaspasen gehören die Caspasen-2, -8, -9 und -10. Effektorcaspasen, zu welchen die Caspasen-3, -6 und -7 gehören, werden durch Spaltung von Initiatorcaspasen aktiviert. Durch die proteolytische Spaltung ihrer Substrate führen sie den Zelltod herbei^{2,31,84,135}.

Die Apoptose besteht aus einem extrinsischen (rezeptorabhängig) und einem intrinsischen (mitochondrienabhängig) Weg^{84,112}. Beim extrinsischen Weg erhält die Zelle über sogenannte Todesrezeptoren die Aktivierungssignale für die Apoptose. Zu diesen Rezeptoren zählen der TNF1-, TRAIL- und der Fas-Rezeptor. Nach Bindung ihrer Liganden aktivieren die Todesrezeptoren mit ihrer zytosolischen Domäne das Adapterprotein FADD (Fas associated death domain containing protein), an welches Procaspase 8 Moleküle binden. Der entstandene Multiproteinkomplex wird als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet. Die Procaspasen in diesem Komplex können sich nun gegenseitig spalten, sodass aktive Caspase-8 frei wird, die wiederum Effektorcaspasen aktiviert, was die Apoptose initiiert^{2,31,84,135}.

Der intrinsische Apoptoseweg wird über die Mitochondrien vermittelt. Er wird durch DNA-Schädigungen, oxidativen Stress, reaktive Sauerstoffspezies oder virale Infektionen ausgelöst. Hierbei kommt es zu einem Anstieg der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran, was zur Freisetzung von pro-apoptischen Proteinen, wie beispielsweise Cytochrom C, führt. Cytochrom C bildet im Zytoplasma zusammen mit dem Gerüstprotein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) einen Komplex, der Apoptosom genannt wird. An diesen bindet die Procaspase-9

und wird zu Caspase-9 aktiviert. Diese kann wiederum weitere Effektorcaspasen spalten und es kommt zur Proteolyse der Zelle und somit zur Apoptose^{2,22,31,84,135,150}.

5.3. Die Bcl-2 Familie

Der programmierte Zelltod ist durch eine Vielzahl von genau regulierten Signalwegen, den sogenannten Pathways, bestimmt. Mitglieder der Bcl-2 Familie sind an dieser Regulation beteiligt⁴⁰. Die Proteine der Bcl-2 Familie können in drei Unterklassen, in pro-apoptotische Proteine, anti-apoptotisch Proteine und Regulatoren (BH3-only proteins) eingeteilt werden^{40,136}. Charakteristisch für die Gruppe der Bcl-2 Familie ist, dass alle Mitglieder eine oder mehrere übereinstimmende Regionen, die sog. „Bcl-2 homologe Regionen (BH)“ aufweisen^{1,108,154}. Vier dieser Regionen sind zurzeit bekannt (BH1-4). Die zur Gruppe der anti-apoptotisch wirksamen Proteinen zählenden Mediatoren Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 weisen jeweils alle diese vier BH Domänen auf^{40,108,154}. Bax und Bak, welche zu den pro-apoptotischen Vertretern zählen, haben nur drei dieser Regionen. Die BH3-only Subgruppe wie Bid und Bad fungieren als Regulatoren der anderen Bcl-2 Familienmitglieder. Sie aktivieren beispielsweise Bax und Bak⁴⁰ und fördern so die Apoptose¹³⁶ (Abb.5-2). Zu ihnen gehören auch Bid, Bim, Bad, Bik, Noxa, Puma, BMF und HRK²².

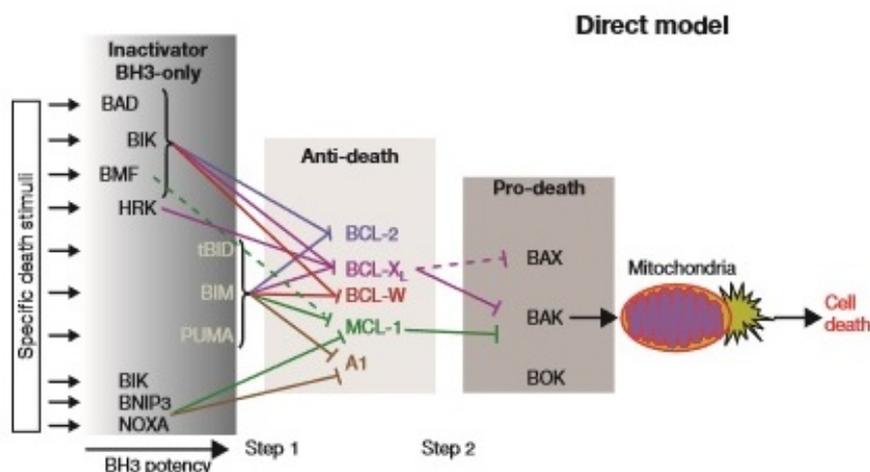


Abbildung 5-2 Direkte Aktivierung von Bax und Bak (Galonek und Hardwick, 2006)⁴⁰

Das Verhältnis zwischen Bcl-2 und Bax bestimmt nach einem apoptotischen Stimulus über das Überleben oder den Tod der Zelle. Ist die Konzentration von Bcl-2 in der Zelle erhöht, wird die Apoptose verhindert. Liegt Bax in erhöhter Konzentration vor, kommt es zur Apoptose¹⁰⁴.

Bcl-2 ist ein 25 kDa großes integrales Membranprotein in Mitochondrien⁵⁴. Es besteht aus acht α -Helices und trägt eine hydrophobe Furche auf der Oberfläche¹⁰⁸. Bcl-2 weist alle vier BH Regionen auf^{1,108}. Vor allem die BH1 und BH2 Domänen sind für die Funktion von Bcl-2 wichtig, da es über diese Domänen mit Bax interagieren und dadurch die Apoptose verhindern kann¹⁵⁷. Auch können Aktivator-BH3-Proteine gebunden werden. Diese Bindung verhindert die Interaktion der Aktivator-BH3-Proteine mit den pro-apoptotischen Proteinen und somit deren Aktivierung^{22,24,67,76}. Bei mitochondrialer Dysfunktion wird Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt, was einen wichtigen Schritt in der Apoptose darstellt. Bcl-2 inhibiert diese Freisetzung^{80,108}. Ein weiterer Mechanismus der anti-apoptotischen Wirkung ist die Interaktion und Blockierung von Caspasen¹²⁴. Bcl-2 kann neuronale Zellen vor dem Zelltod, der durch Mangel an Wachstumsfaktoren, Glukoseentzug, Membranperoxidationen und in manchen Fällen durch freie Radikale einsetzen würde, schützen¹⁶⁰. Bcl-2 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und der Regulation neuronalen Überlebens³. Bei Abwesenheit des nervalen Wachstumsfaktors NGF kann Bcl-2 Neurone vor der Apoptose schützen⁴¹.

Das pro-apoptotische Protein Bax besteht aus neun α -Helices, von denen die sieben amphiphilen α -Helices um zwei hydrophobe α -Helices angeordnet sind^{108,136}. Es weist eine Aminosäuren-Homologie zu Bcl-2 auf und besitzt die BH-Domänen 1 bis 3. Die Funktion von Bax als Effektor-Protein für die Apoptose kann durch die Heterodimerisierung mit Bcl-2 neutralisiert werden¹⁰⁴. Eine Überexpression von Bax forciert die Apoptose und wirkt der Hemmung der Apoptose durch Bcl-2 entgegen¹⁰⁴. BH3-only-Proteine aktivieren Bax entweder direkt oder durch die Interaktion mit Bcl-2, wodurch Bax aus den Heterodimeren gelöst, und somit aktiv wird^{24,154,161}. Ohne einen apoptotischen Stimulus liegt Bax als inaktives Monomer im Zytosol vor. Infolge eines zytotoxischen Stresssignals kommt es zu einer Homo-Oligomerisierung von Bax, wodurch es an die äußere Mitochondrienmembran bindet^{21,67,80,136,154}.

Hier induziert Bax die Durchlässigkeit für Cytochrom c, was über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose einleitet^{22,40,80}.

5.4. G-CSF

Der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (engl. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, G-CSF) ist ein 19,6 kDa großes, aus 207 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren^{57,110,111,122,123}. Zusammen mit den Interleukinen und dem Tumornekrosefaktor (TNF- α) zählt er zu den Zytokinen¹¹⁶. Die Auswirkungen von G-CSF auf das hämatopoetische System werden seit Jahrzehnten erforscht. So stimuliert das Protein unter anderem die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben von hämatopoetischen Progenitorzellen im Knochenmark^{29,33,130} sowie deren Ausschüttung ins periphere Blut^{16,129,129,143}. Vorläuferzellen der Granulopoese, Erythropoese als auch der Thrombopoese sind davon betroffen¹²⁹.

Da besonders die Granulopoese stark stimuliert wird, liegt der Haupteinsatz von G-CSF bei der Behandlung der Neutropenie^{29,111,122,123,129,130,143,156}.

Große Bedeutung kommt G-CSF auch bei der Stammzelltransplantation zu. Hier wird den Patienten G-CSF verabreicht. Dies führt zu einer schnelleren Mobilisation von hämatopoetischen Vorläuferzellen in das periphere Blut. Die Vorläuferzellen werden mittels Leukaphrese gesammelt. Nach einer Hochdosischemotherapie können den Patienten so die zuvor gewonnen eigenen Blutstammzellen (autologe Stammzellspende) oder die Stammzellen eines geeigneten Spenders (allogene Stammzellspende) zugeführt werden^{13,23,46,121,129}. Dadurch sind die Dauer der Neutropenie^{93,96,130,143} und die thrombozytopenische Phase¹²⁹ verkürzt.

Der Faktor zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit bei geringer Toxizität und wenige unerwünschte Arzneimittelwirkungen (Knochenschmerzen, asymptomatische Erhöhung der alkalischen Phosphatase und Gamma-Glutamyltransferase im Blutserum) aus^{34,91,111,122,123,126,156}.

Seit einigen Jahren steht die Auswirkung von G-CSF in Bezug auf Zell- und Gewebeschutz im peripheren und zentralen Nervengewebe im Fokus der Forschung.

G-CSF bindet hochaffin an seinen Rezeptor, den G-CSFR. Dieser gehört zu der Zytokin-Rezeptor-Familie und stellt ein Transmembranprotein dar. Seine extrazelluläre Komponente setzt sich aus einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne, einer Zytokin-Rezeptor-Homologie-Domäne und drei Fibronectin-Typ III-Domänen zusammen^{35,38,39,59,81,131} (Abb. 5-3). Der zyttoplasmatische Anteil des G-CSFR setzt sich aus drei Aminosäuresequenzen (Box 1-3) zusammen. Diese bedingen die Signaltransduktion^{39,131,155}. Den Aminosäure-Resten 682 bis 715 wird eine anti-apoptotische Domäne zugesprochen⁵⁹.

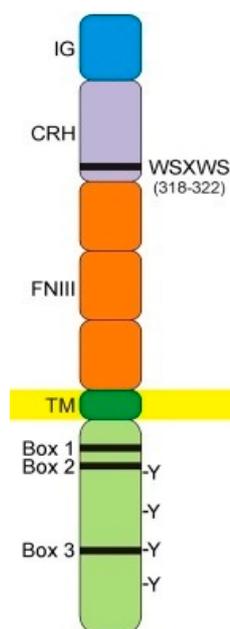


Abbildung 5-3: Struktureller Aufbau des G-CSFR. Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen des G-CSF-Rezeptors. (Wilson, 2014; modifiziert)¹⁵⁵

Rezeptoren für G-CSF existieren nicht nur auf hämatologischen Zellen sondern auch auf Neuronen und Gliazellen des ZNS, von denen G-CSF auch exprimiert wird^{57,110,111,122,116,156}. Im ZNS wird unter anderem auch ein autokriner Aktivierungsmechanismus vermutet^{117,122}. Wird Nervengewebe durch beispielsweise Hypoxie oder Ischämie geschädigt, kommt es im betroffenen Areal zu einer verstärkten Expression von G-CSF und seinem Rezeptor^{110,122,156}. Auch hat G-CSF trotz seines hohen Molekulargewichts die Fähigkeit die intakte Bluthirnschranke zu passieren, welches eine periphere Gabe ermöglicht^{91,111,117,122,159}. Die Wirkung von G-CSF im Gehirn zeigt Parallelen zur Wirkung im hämatopoetischen System: Inhibition des programmierten Zelltods und Stimulation der Differenzierung von neuronalen Progenitorzellen¹²².

In tierexperimentellen Modellen konnte bereits ein positiver Effekt von G-CSF auf neurologische Krankheitsbilder gezeigt werden.

Nach ischämischem Hirninfarkt zeigt G-CSF eine neuroprotektive Wirkung. Es vermindert die Destruktion von Nervengewebe^{91,116,122,156} und trägt somit dazu bei, die Mortalität und Hirnschwellung im Rahmen des Untergangs von Nervenzellen zu vermindern¹¹⁶. In Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Amyotropher Lateralsklerose (ALS) konnte in tierexperimentellen Studien an Mäusen ebenfalls eine neuroprotektive Wirkung von G-CSF nachgewiesen werden. So schützte G-CSF dopaminerge Zellen der Pars compacta der Substantia nigra vor dem Zelluntergang⁹¹. Auch fördert G-CSF das Überleben von α -Motoneuronen, was der Muskelatrophie im ALS-Modell entgegenwirkt¹¹¹. Des Weiteren wurde in einem Modell zu M. Alzheimer ein positiver Einfluss von G-CSF gezeigt. Hier wurde nachhaltig die Lern- und Erinnerungsfunktion von Mäusen verbessert¹⁴³. Nach Rückenmarkischämie oder Rückenmarksverletzungen konnten die neurologischen Defekte durch die Gabe von G-CSF vermindert werden^{25,110}.

Der Haupteffekt bezüglich Neuroprotektion von G-CSF liegt in der Hemmung von Entzündungen und Apoptose²⁵.

G-CSF hemmt die nach Gewebsschädigung entstandenen Entzündungsreaktionen durch Suppression von Zytokinen, wie den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)^{25,45,51,133}, Gamma-Interferon (IFN- γ)⁵¹ und Interleukinen^{25,43,51}.

Durch Aktivierung seines Rezeptors löst G-CSF eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die hemmend auf die Apoptose von Nervenzellen wirkt^{25,57,110,122}. Zu diesen anti-apoptotischen Signalwegen gehören der Januskinase (JAK)/STAT-Weg, der PI3K/Akt-Weg und der extrazellulär regulierte Kinase (ERK)-Weg^{5,25,35,50,57,116,117,122,123,156}. Diese Signalkaskaden verstärken die Bildung von anti-apoptotischen Mediatoren wie Bcl-xL, Bcl-2 und Pim-1 und vermindern die Expression von pro-apoptotischen Mediatoren wie Caspase-3, Poly (ADP-Ribose)-Polymerase(PARP), Bax, Bad, p38 MAPK und JNK^{10,25,50,57,116,117,122,156}.

Durch diese Mechanismen wird neuronales Gewebe durch G-CSF vor dem Zelluntergang geschützt.

6. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob und in welchem Maße G-CSF auf die Apoptose von Nervenzellen - in diesem Falle auf die α -Motoneurone im Rückenmark - nach Läsion des N. ischiadicus der Ratte Einfluss nimmt, und so möglicherweise einen positiven Effekt auf die Regeneration des Nerven nach einer inkompletten traumatischen Schädigung hat.

Zur Untersuchung der Funktionsverbesserung des N. ischiadicus im zeitlichen Verlauf wurden ähnlich wie im klinischen Alltag Funktionstests (Lauftest mit Bestimmung des Sciatic Functional Index) durchgeführt und die motorische Nervenleitgeschwindigkeit bestimmt.

Zur Untersuchung der Regeneration auf histologischer Ebene wurden zum Nachweis der anti-apoptischen bzw. apoptotischen Aktivität immunhistochemische Färbungen an Rückenmarkschnitten durchgeführt. Dafür kamen Antikörper gegen Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) als Marker für α -Motoneurone, Bcl-2, ein anti-apoptotisches Protein, Bax, ein pro-apoptotisches Protein und G-CSFR, dem Rezeptor für G-CSF zum Einsatz. Um zu zeigen, dass α -Motoneurone die Gene Bcl-2, Bax und G-CSFR auf Proteinebene exprimieren wurden im Rahmen einer Kollokalisationsstudie Fluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt.

7. Material und Methoden

7.1. Tierexperimenteller Teil

Die Genehmigung zur Durchführung der Tierexperimente lag in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durch die zuständigen Behörden des Saarlandes vor (Genehmigungsnummer 28/2013). Die Haltung von zwei bis drei Tieren pro Käfig erfolgte in einer keimarmen Umgebung bei einem 12:12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Ein freier Zugang zu Wasser und Nahrung war jeder Zeit gegeben.

Im Rahmen der Studie wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 380g untersucht. Für die Versuche wurden die Tiere in verschiedene Gruppen aufgeteilt.

Zunächst wurden die Tiere in zwei große Gruppen unterteilt. Eine der Gruppen erhielt G-CSF. Die als Kontrollgruppe fungierende Gruppe erhielt G 5%. Jede dieser zwei Gruppen umfasste vier weitere Untergruppen mit jeweils sechs Tieren, sodass eine Gesamtzahl von 48 Tieren vorlag (Tab.1). Die Tötung der Tiere und histologische Aufarbeitung des zuvor isolierten Rückenmarks (s.u.) erfolgte je nach Untergruppe nach einem Tag, nach vier Tagen, nach einer Woche und nach zwei Wochen.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Gruppen		Beschreibung
G-CSF	1 Tag	Tötung am 1. Post-OP-Tag. Verabreichung von G-CSF am OP-Tag
	4 Tage	Tötung am 4. Post-OP-Tag. Verabreichung von G-CSF am OP-Tag sowie an den Tagen 1 und 3
	7 Tage	Tötung am 7. Post-OP-Tag. Verabreichung von G-CSF am OP-Tag sowie an den Tagen 1,3 und 5
	14 Tage	Tötung am 14. Post-OP-Tag. Verabreichung von G-CSF am OP-Tag sowie an den Tagen 1,3 und 5
Glucose 5%	1 Tag	Tötung am Post-OP-Tag. Verabreichung von Glucose am OP-Tag
	4 Tage	Tötung am 4. Post-OP-Tag. Verabreichung von Glucose am OP-Tag sowie an den Tagen 1 und 3
	7 Tage	Tötung am 7. Post-OP-Tag. Verabreichung von Glucose am OP-Tag, sowie an den Tagen 1,3 und 5
	14 Tage	Tötung am 14. Post-OP-Tag. Verabreichung von Glucose am OP-Tag, sowie an den Tagen 1,3 und 5

7.1.1. Verabreichung von G-CSF und Glukose 5%

Entsprechend dem Studiendesign wurde je nach Gruppenzugehörigkeit rekombinant hergestellter G-CSF und Glucose 5% (Kontrollgruppe) am OP-Tag und an den Tagen 1, 3, und 5 nach der Operation intravenös in die Schwanzvene appliziert.

Die verwendete G-CSF-Dosis (Neupogen®, Amgen) betrug pro Tag 60 µg/kg Körpergewicht. Um sicherzustellen, dass bei der nur geringen Menge an G-CSF pro Injektion keine Rückstände von G-CSF in der Kanüle zurückblieben, wurde G-CSF unmittelbar vor der Injektion mit Glucose 5% 1:4 verdünnt und der periphere Katheter zusätzlich gespült. Die Kontrollgruppe erhielt nur Glucose 5%. Beide Substanzen wurden bei 4 °C gelagert. Zur Verabreichung von G-CSF und Glucose 5% wurde eine Einwegspritze (1 ml, Braun), angeschlossen an einen peripheren Venenkatheter (22G, Becton Dickinson), verwendet. Die Applikation von G-CSF- bzw. G5% geschah in Narkose.

7.1.2. Wasserstrahldissektor

Die inkomplette Nervenläsion des N. ischiadicus wurde mit dem Wasserstrahldissektor Erbjot 2 von Erbe Elektromedizin (Tübingen, Germany) erzeugt. Die Druckerzeugung des Wasserstrahldissectors erfolgt mittels sterilen Einmal-Doppelkolbenpumpen, mit denen ein Druckbereich von 1 – 80 bar (100 – 8000 kPa) erreicht werden kann. An das Gerät wird ein Applikator in Stiffform mit einer Metalldüse von 120µm Durchmesser angeschlossen. Als Trennmedium dient 0,9%ige Kochsalzlösung mit einem möglichen Volumenfluss von 1-55ml/min, die in üblichen Infusionsbehältern an das System angeschlossen wird. Der jeweilige Druck des Wasserstrahls kann manuell am Gerät adjustiert und der Wasserstrahl durch Betätigen eines Fußpedals ausgelöst werden.

Die Wasserstrahldissektion bietet eine chirurgische Technik, mit der unter Erhaltung von selbst kleinen Gefäßen Parenchym präzise präpariert werden kann, ohne dass das umliegende Gewebe durch Hitzeeinwirkung beschädigt wird^{99–103}. Das System ist in Deutschland und den Vereinigten Staaten von Amerika für den chirurgischen Gebrauch zugelassen.

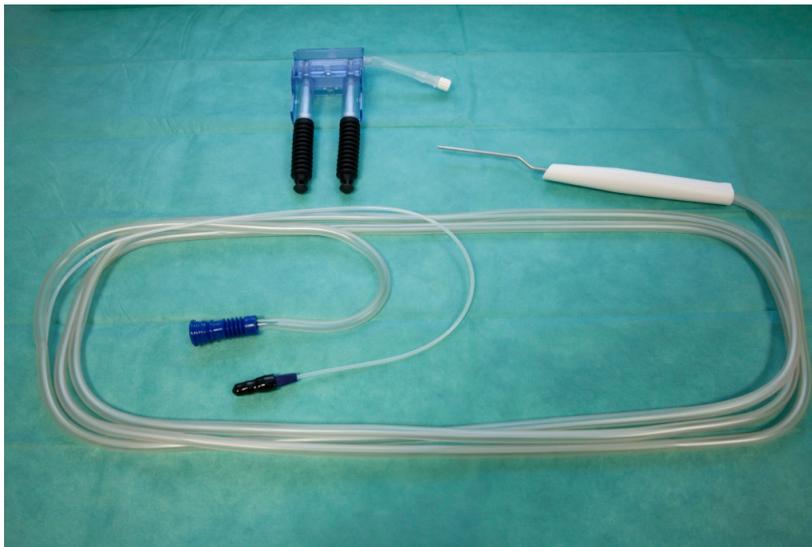


Abbildung 7-1 sterile Einmal-Doppelkolbenpumpe und Applikator, Bajonett mit Absaugung



Abbildung 7-2 Erbejet 2

7.1.3. Operation

7.1.3.1. Vorbereitung und Narkoseeinleitung

Jede Ratte wurde aus ihrem Käfig genommen und in ein zylindrisches Glasgefäß mit 24 cm Durchmesser und 13 cm Wandhöhe gesetzt. Zur Narkoseeinleitung wurde ein Plastiktrichter mit einem Durchmesser von 18 cm über das Tier gestülpt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Trichter komplett über dem Tier lag und keine Luft zwischen Glasgefäß und Trichter nach außen gelangen konnte. Durch die Öffnung des Plastiktrichters konnte nun ein Sauerstoff-Narkosegasgemisch (Forene®; Isofluran) mit einem Fluss von 2,5L O₂/min und einem Isoflurananteil von 3% geleitet werden. Nach 2 bis 3 min war eine ausreichende Narkostiefe erreicht, sodass nach Wiegen des Tieres mit einer Haushaltswaage eine intraperitoneale Injektion (i.p.) von Rompun® (Xylazinhydrochlorid) in einer Dosis von 5mg/kg und von Ketavet® (Ketaminhydrochlorid) in einer Dosis von 80mg/kg möglich war, um die Narkose aufrechtzuerhalten beziehungsweise weiterzuführen. Eine auf die Augen aufgetragene Salbe (Bepanthen, Bayer AG) schützte die Cornea vor dem Austrocknen.

Anschließend wurde das Tier im Bereich des rechten Oberschenkels mittels einer elektrischen Haarschneidemaschine (Aesculap Elektra II, Braun) rasiert. Um eine suffiziente Analgesie zu erreichen wurde den Tieren vor Beginn der Operation 30-50mg/kg Tramadol (Tramal®, 100mg, Grünenthal) subkutan appliziert.

7.1.3.2. Operativer Zugang

Nach Narkose, Analgesie sowie Rasur und Desinfektion (Softasept®, B/Braun) des Hautareals wurde die Haut mit einem Skalpell (Aesculap BB73; Skalpellklinge: MartorR Nr. 10) parallel zum rechten Femur mit einem posterior-lateralen Schnitt inzidiert und die Muskelfaszie des Musculus gluteus mit einer Präparierschere (Codman Classic-Plus 36-5015) eröffnet. Der N. ischiadicus konnte nun vorsichtig aufgesucht werden. Unter einem OP-Mikroskop (OMPI MD, Zeiss) erfolgte bei 8-facher Vergrößerung die Präparation des Nervs in seinem Verlauf mit Hilfe von Mikroschere und Mikropinzette mit Mobilisation aus dem umgebenden Muskel. Die Präparation umfasste den Austritt des Nervs aus dem Foramen obturatum bis zur Aufteilung in seine Äste (Abb. 7-3).

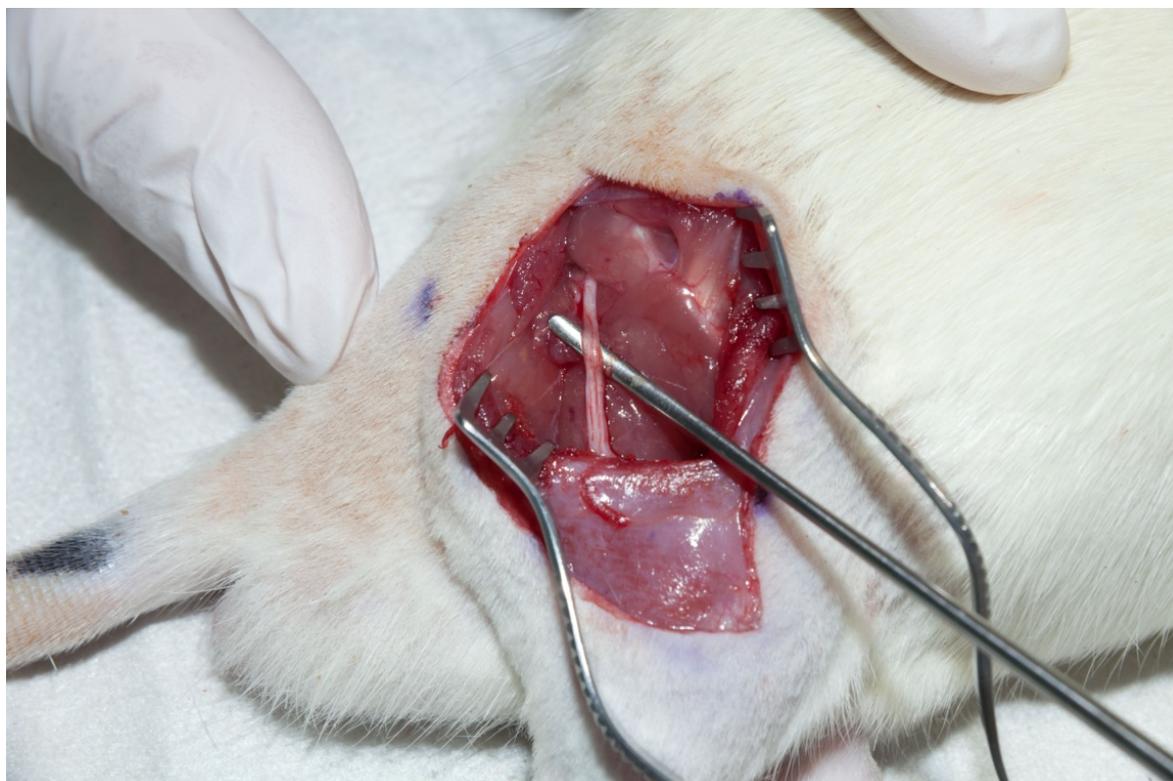


Abbildung 7-3 freigelegter rechter Nervus ischiadicus

7.1.3.3. Läsion

Die Platzierung des Wasserstrahlapplikators erfolgte im 90° Winkel und mit einem Abstand von 10 mm über dem rechten N. ischiadicus. Um vergleichbare Ergebnisse zu erreichen wurde ein computergesteuertes Fahrgestell (Software Servomanager 6.4.1, Parker Automation; Erbe Elektromedizin Germany) verwendet, mit dem es möglich war den freipräparierten Nerven mit einer Geschwindigkeit von 1 cm/Sek unter dem Wasserstrahl hindurchfahren zu lassen (Abb.7-4).



Abbildung 7-4 computergesteuertes Fahrgestell

Nach Darstellung des Nerven wurde die Ratte auf das computergesteuerte Fahrgestell gelegt und die Läsion mit Hilfe des Wasserstrahl-dissektors bei einem Druck von 80 bar gesetzt.

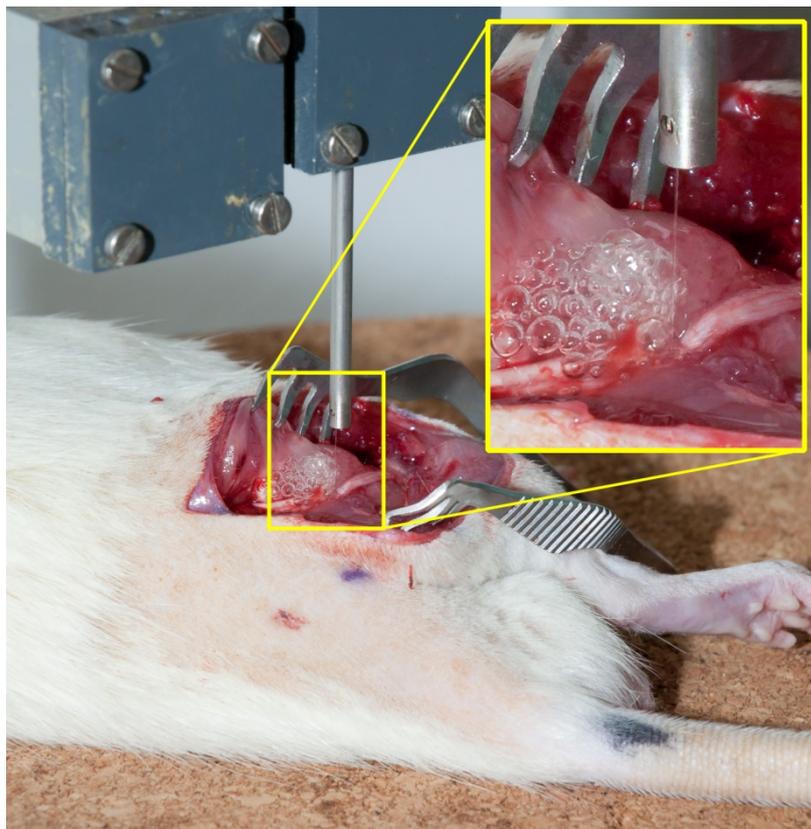


Abbildung 7-5 Läsion am Nervus ischiadicus mittels Wasserstrahl

7.1.3.4. Wundschluss

Nach Schädigung des Nervs erfolgte der Verschluss der Muskelfaszie sowie der Subcutis mit resorbierbaren Einzelknopfnähten und der Haut mit einer Intrakutannaht. Zum Nähen fanden Nadelhalter (Medica) und selbstauflösendes Nahtmaterial (Safil® HR 17 oder HR 26, 4 x 3-0, 45 cm, Polyglykolsäure, B/Braun) Verwendung.

7.1.4. Messung des neurologischen Defizits

Allen Ratten wurde direkt nach der Operation sowie abhängig von der Gruppe auch an den weiteren Tagen G-CSF respektive G5% appliziert. An diesen Tagen erfolgten auch die Lauftests und die elektrophysiologischen Untersuchungen.

Zur Durchführung der Lauftests diente ein zu diesem Zweck angefertigter hölzerner, nach oben offener, 110 cm langer, 14 cm breiter und 8 cm hoher Laufkanal, der in einer ebenfalls aus Holz bestehenden dunklen Box endet. Damit sich die Versuchstiere an die Vorrichtung gewöhnten, wurde jedes Tier vor der Messung an den Anfang des Laufkanals gesetzt. Ihrem Instinkt folgend liefen die Tiere nun an

dessen Ende in die abgedunkelte Box. Nach diesen Übungsläufen wurde ein 59,4 cm langer und 12 cm breiter Papierstreifen in den Laufkanal gelegt und beide Hinterfüße der Versuchstiere vorsichtig auf ein schwarzes Stempelkissen gedrückt, um sie danach ein weiteres Mal durch den nun mit Papier ausgelegten Laufkanal laufen zu lassen. Die hiermit gewonnenen Fußabdrücke der Hinterläufe lieferten die Maße für die Berechnung des Sciatic Functional Index (SFI; Abb. 7-6). Um den funktionellen Effekt einer peripheren Nervenläsion im Tiermodell quantifizieren zu können entwickelten Medinaceli *et al.* diesen Index. Dieser errechnet sich als der relative Unterschied von verletztem zu gesundem Hinterlauf und liefert eine genaue, zuverlässige und leicht zu wiederholende Methode um die Funktion des Nervus ischiadicus der Ratte zu evaluieren²⁸. Carlton und Goldberg sowie Bain *et al.* modifizierten den Index weiter mit dem Ziel einen SFI zu errechnen, der unabhängig von der Funktion der peronealen bzw. tibialen Muskulatur ist^{9,120}. Der SFI fand bereits in einigen tierexperimentellen Studien zu Nervenläsionen seine Anwendung^{6,19,128}. Auch in der vorliegenden Studie wurde der SFI zur Evaluation der funktionellen Beeinträchtigung bei Nervenschädigung nach Carlton und Goldberg verwendet^{28,30}.

Formel nach Carlton und Goldberg:

$$\text{SFI} = [(NPL-EPL)/EPL + (ETS-NTS)/NTS + (EIT-NIT)/NIT] \times 73$$

Die Länge der Fußabdrücke (PL, print length) wurde als Distanz in Zentimetern (cm) vom Ende der Ferse bis zur Spitze des dritten Zehs bemessen. Da gesunde Ratten auf ihren Zehen und vorderen Fußballen laufen, ist bei diesen die Länge der Fußabdrücke kurz. Tiere mit einer neuromuskulären Schädigung platzieren den kompletten Fuß auf den Boden beziehungsweise schleifen diesen sogar über den Untergrund, sodass ein längerer Fußabdruck mit reduzierter Zehenspreizung entsteht. Die Spreizung der Zehen (TS, toe spread) konnte bestimmt werden, indem der Abstand der ersten zur fünften Zehe bemessen wurde. Die Maße des Zwischenzehenabstandes (IT, intermediate toe spread) ergab sich aus der Distanz von der zweiten zur vierten Zehe. Diese Messungen erfolgten an der operierten (E für experimental) und an der nicht operierten (N für normal) Seite.

7.1.5. Messung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit

Um den funktionellen Effekt einer peripheren Nervenläsion weiter quantifizieren zu können kam die Elektroneurografie zum Einsatz. Diese beschreibt die Ableitung der motorischen oder sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) und eignet sich so zur elektrophysiologischen Diagnostik peripherer Nervenläsionen⁸⁸. Da bei der Schädigung peripherer Nerven die sensible NLG, im Gegensatz zur motorischen, so stark reduziert sein kann, dass kein sensibles Aktionspotential mehr ableitbar ist⁸⁸, wurde in dieser Studie auf die Ableitung der motorischen NLG (mNLG) zurückgegriffen.

Die Messungen der Nervenleitgeschwindigkeit wurden präoperativ, postoperativ sowie je nach Gruppe an weiteren Tagen durchgeführt. Hierbei diente die präoperative Messung als Referenzwert. Mittels der Messungen an den weiteren Tagen konnte die Verbesserung im Laufe des Beobachtungszeitraums dargestellt werden. Die Messung direkt nach der OP diente des Weiteren zur Erfolgskontrolle der gesetzten Läsion. Nur wenn die Nervenleitgeschwindigkeit rapide abnahm, konnte von einer adäquaten Schädigung des Nervs ausgegangen werden.

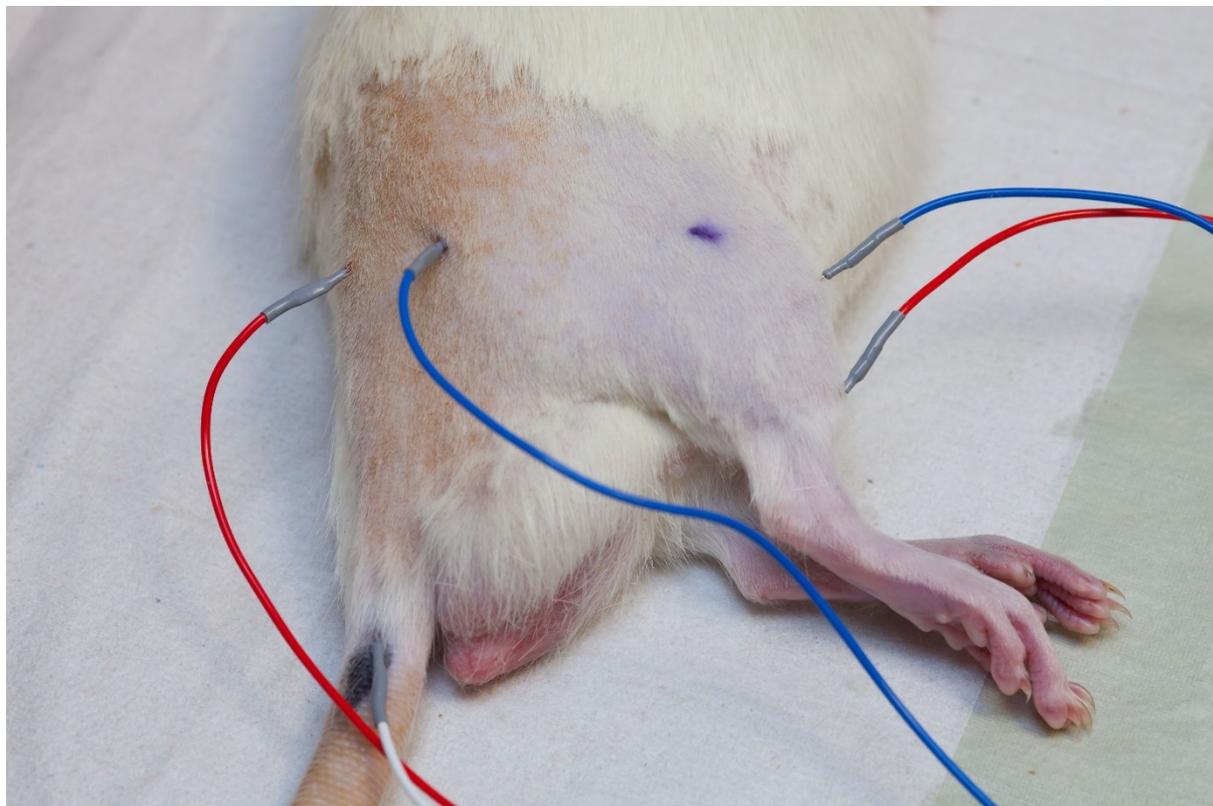


Abbildung 7-6 Ratte während der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit

Um die Nervenleitgeschwindigkeit zu bestimmen kam ein Nerven-Monitoring-System (EMS Biomedical®, Surpass) zum Einsatz (Abb. 7-7).



Abbildung 7-7 Nerven-Monitoring-System

Die Durchführung der Messung erfolgte mittels 4 Elektroden (Neuroline Subdermal, Ambu®). Die Aufzeichnungselektrode wurde unter der Haut über dem Musculus tibialis anterior platziert, die Referenzelektrode ca. 1 bis 1,5 cm distal über der Sehne des Musculus tibialis anterior. Zur Stimulation wurde die Kathode zum einen proximal der Läsion auf Höhe des Foramen obturatorius und zum anderen distal der Läsion in der Fossa poplitea platziert. Die Anode wurde in der paraspinale Muskulatur und die Erdungselektrode in der Schwanzwurzel positioniert.

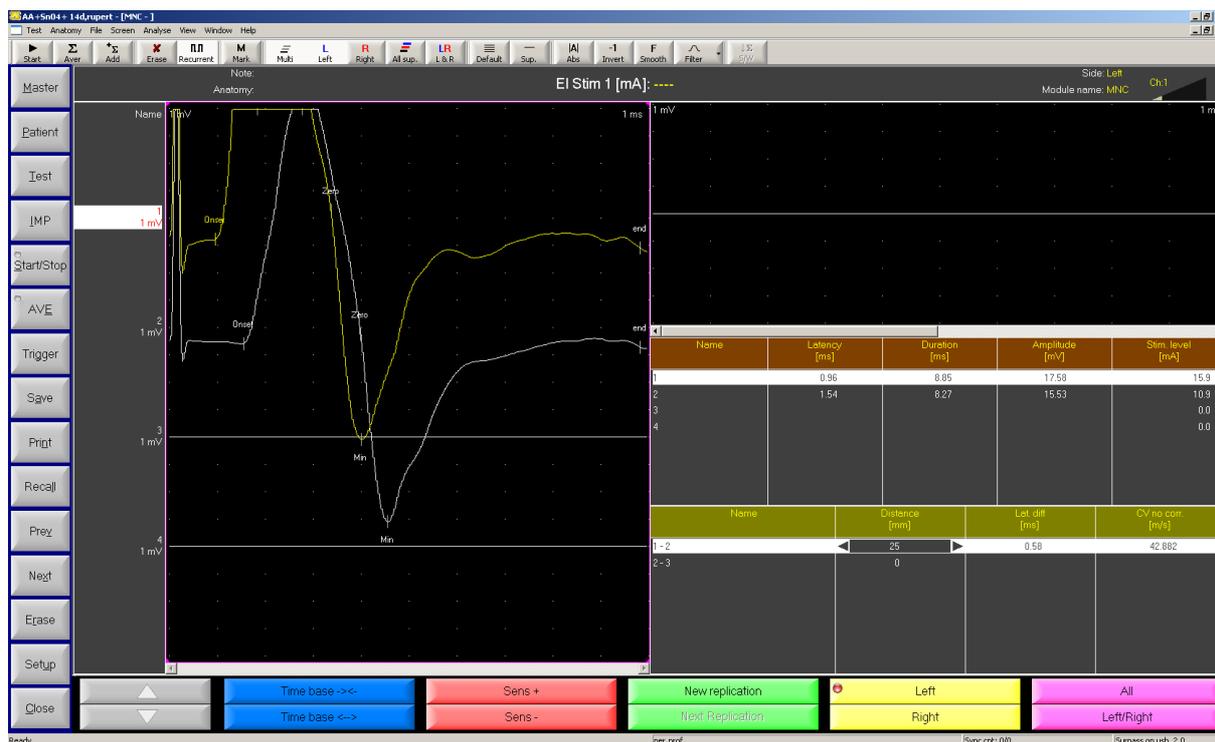


Abbildung 7-8 Messwerte bei der motorischen Neurografie

7.1.6. Fixierung des Gewebes

Am jeweiligen Finaltag wurde den Tieren nach einer Überdosierung des Narkosemittels in einer letal endeten Operation das Rückenmark in seiner kompletten Länge entnommen und es wurden die Rückenmarkssegmente L4 bis L6 präpariert (Abb. 7-9).

Da nach der Entnahme des Rückenmarks unmittelbar Zersetzungsprozesse einsetzen, musste das Gewebe umgehend fixiert werden, um Strukturveränderungen entgegen zu wirken. Hierzu wurde das Gewebe in 4% Formalinlösung (Fischer) gelegt. Um Gewebsschnitte herstellen zu können wurde eine Einbettung in Paraffin notwendig (Einbettungsautomat: Sakura Tissue-Tek VIP5 Jr; Paraffin: Sigma-Aldrich Paraffin wax mp53-57 Grad Celcius). Anschließend konnten mit Hilfe des Rotationsmikrotom CUT 5062 (Slee Medical, Mainz) die Gewebsschnitte hergestellt werden.

Ab der Höhe L4 des Rückenmarks (Abb. 7-9) wurden die Schnitte mit einer Schnittdicke von 5 μm aufgenommen. Dies deckt sich mit der Literatur, in der Schnittdicken von 1 μm bis μm 10 beschrieben sind^{10,50,89,91,110,111,116,122}. Insgesamt

wurden Schnitte von 10 Regionen ab Höhe L 4 aufgenommen, wobei jede Region 100 µm umfasste. Pro Region wurden 10 Schnitte aufgenommen, weitere 10 Schnitte wurden verworfen, bevor die nächste Region begann.

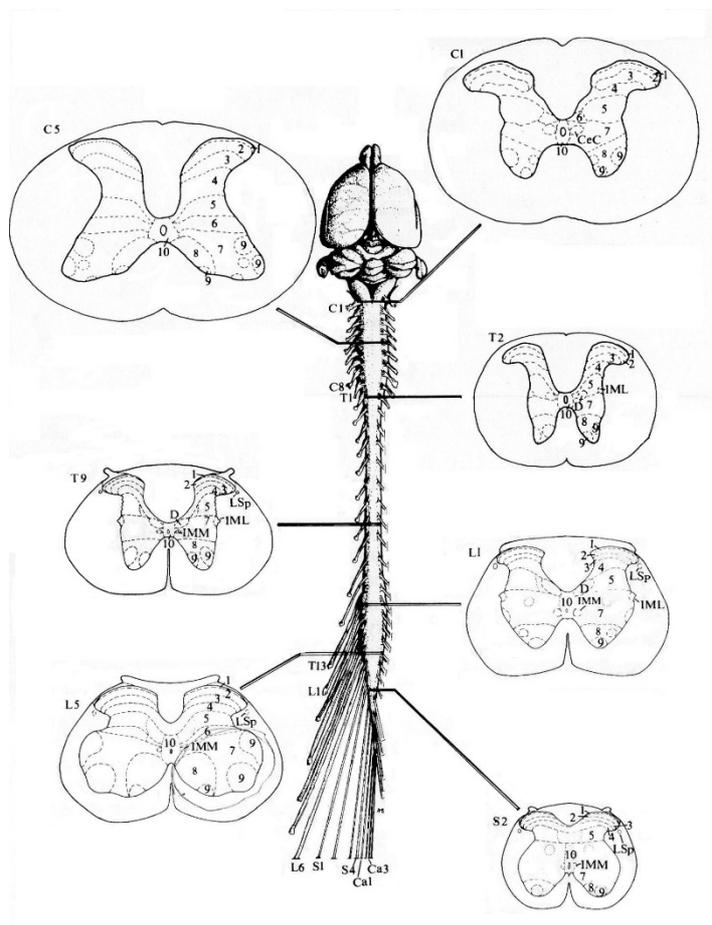


Abbildung 7-9 Übersicht der Querschnitte des Rückenmarks in verschiedenen Abschnitten. Die verwendeten Schnitte stammen aus der Höhe L4 bis L6. (Paxinos, 1986)¹⁰⁶

7.2. Immunhistochemischer Teil

Der immunhistochemische Teil dieser Arbeit entstand in Kooperation mit der AG Huber/Kins/Urbschat⁵⁸ (Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes/ Technischen Universität Kaiserslautern Fachbereich Biologie, Abteilung Humanbiologie und Humangenetik).

Die immunhistochemische Färbung ist eine Methode zur Darstellung von Proteinen oder anderen Strukturen mit Hilfe von markierten Antikörpern. Zur Markierung der Antikörper gegen Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT), Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor Rezeptor (G-CSFR), sowie Bcl-2 und Bax wurde in dieser Studie die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)^{20,57,109}, die die starke Affinität von Avidin zu Biotin nutzt, angewandt. Hierbei ist der primäre Antikörper unmarkiert und der sekundäre Antikörper biotinyliert. An diesen sekundären Antikörper bindet anschließend ein enzymmarkierter Avidin-Biotin-Komplex^{47,56,62} (Abb. 7-8). Der genaue Ablauf der Einzelfärbungen, sowie die jeweils verwendeten Antikörper sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

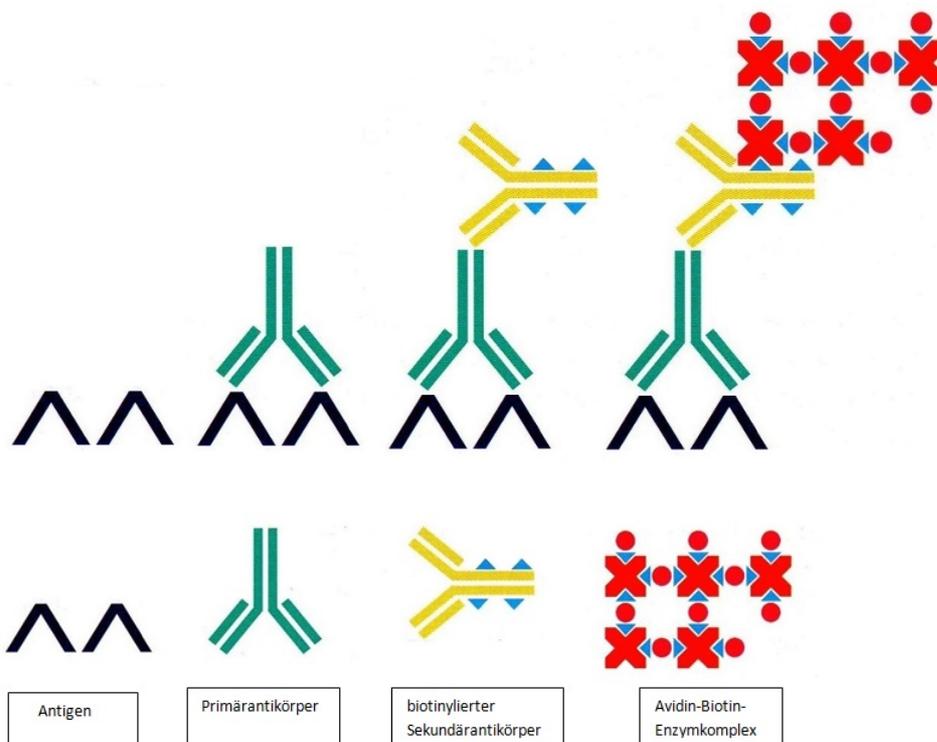


Abbildung 7-10 Schematische Darstellung der ABC-Methode (Boenisch, 2003)¹⁷

7.2.1. Fluoreszenz-Doppelfärbung

Um zu zeigen, dass α -Motoneurone, die durch den spezifischen Marker ChAT identifiziert wurden, Bcl-2, Bax und G-CSFR exprimieren, wurden Fluoreszenzdoppelfärbungen durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, die Kollokationen von Proteinen auch im selben Kompartiment einer Zelle nachzuweisen. Genutzt wird hierzu die Affinität von Antikörpern zu bestimmten Epitopen. Während der Primärantikörper spezifisch an das Epitop bindet, bindet der Sekundärantikörper wiederum spezifisch an den Primärantikörper. Die Sekundärantikörper sind bei dieser Methode mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Diese lassen sich jeweils mit unterschiedlichen Wellenlängen des Lichtes anregen und so mikroskopisch unterschiedlich darstellen. Auch der genaue Ablauf der Doppelfärbung, sowie die verwendeten Antikörper sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

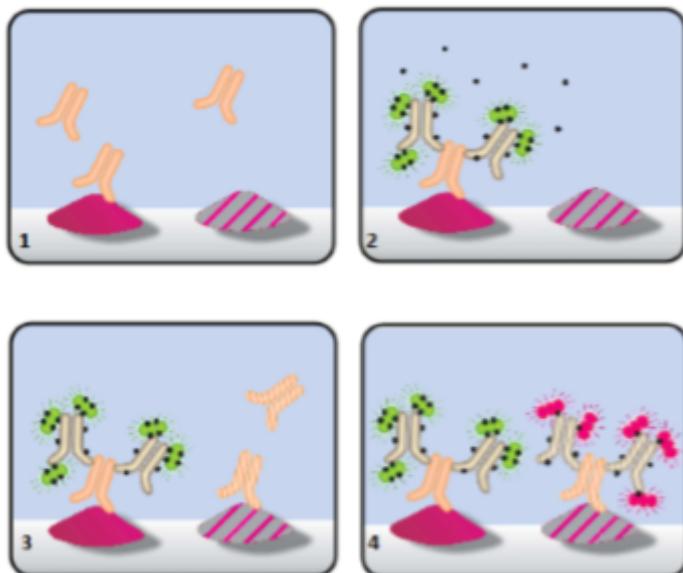


Abbildung 7-11 Fluoreszenz-Doppelfärbung: 1: Aufbringen des ersten spezifischen Primärantikörpers auf das Gewebe 2: Aufbringen des ersten Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpers und Bindung an den Primärantikörper. 3: Aufbringen des zweiten Primärantikörpers. 4: Aufbringen des zweiten Sekundärantikörpers mit Fluoreszenzfarbstoff und spezifischer Bindung an den zweiten Sekundärantikörper. (Vector Laboratories, 2005; modifiziert)¹⁴⁸

7.2.2. Histologische Auswertung

Im histologischen Teil dieser Arbeit wurde die Anzahl der α -Motoneurone im Rückenmark untersucht. Es wurden bei jedem Tier für jeden der vier Antikörper die α -Motoneurone, aus allen 10 der im Material- und Methodenteil beschriebenen Schnitte, für jede Seite gezählt. Daraus wurde die Summe gebildet und die Anzahl der α -Motoneurone der rechten geschädigten Seite mit der Anzahl der α -Motoneurone auf der linken Seite pro Tier verglichen.

7.2.3. Kriterien für α -Motoneurone

Die α -Motoneurone mussten in allen vier Antikörperfärbungen jedes der folgenden Kriterien erfüllen, um in die histologische Auswertung einzugehen (Abb. 7-12)

- 1) Eine unversehrte Zellmembran musste sichtbar sein
- 2) Eine intakte Kernmembran musste zu erkennen sein
- 3) Es musste ein einzelner dunkler Nukleolus zu sehen sein
- 4) Das Zytoplasma musste klar erkennbar sein
- 5) Das Zytoplasma musste violett angefärbt sein

Durch diese Kriterien konnte sichergestellt werden, dass eine Nervenzelle komplett auf dem histologischen Schnitt zu sehen ist und nicht doppelt gezählt wird^{140,141}.

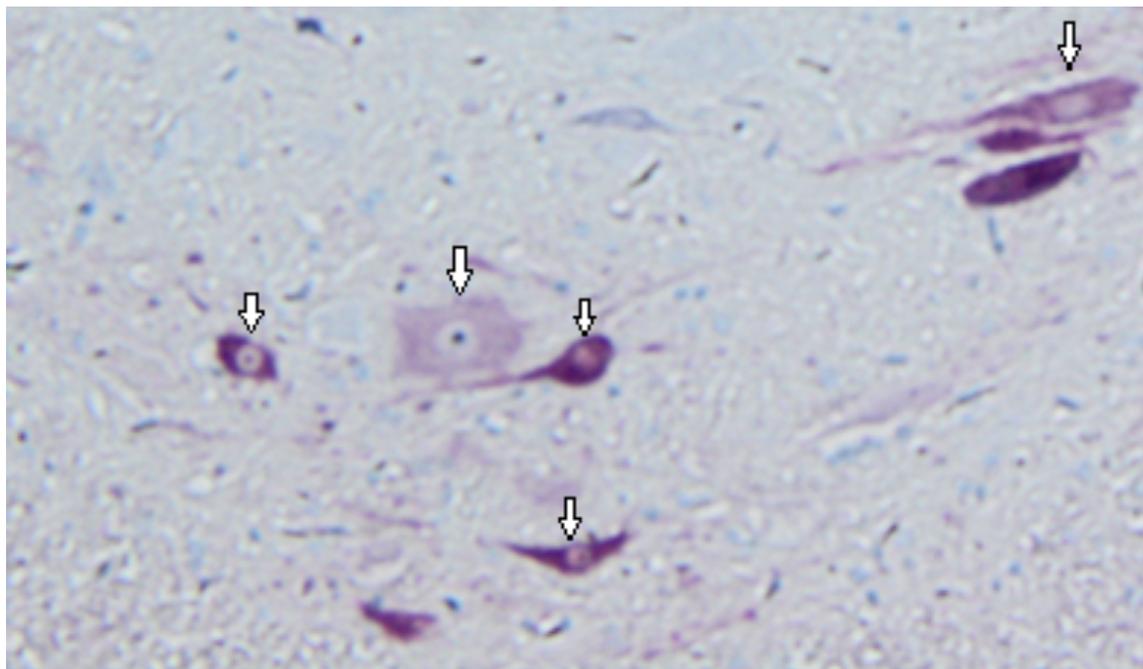


Abbildung 7-12 Beispielzellen für die Auswert-Kriterien für Motoneurone. α -Motoneuron mit Pfeilmarkierung. ChAT Färbung, 20fache Vergrößerung

7.2.4. Mikroskopie

Die immunhistochemischen Färbungen konnten lichtmikroskopisch mit dem Mikroskop Olympus BX43 (Olympus Deutschland GmbH) ausgewertet werden. Hierzu wurden mit Hilfe der Mikroskopkamera Olympus XC30 (Olympus Soft Imaging Solutions) und dem Programm CellSens Dimension (Olympus) Bilder der Schnittpräparate erstellt. Für die Aufnahmen kamen ein 4faches Objektiv (UPlanFLN 4x/0,13 NA, Olympus) und ein 10faches Objektiv (UPlanFLN 10x/0,30 NA, Olympus) zum Einsatz.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kam ein 100faches Objektiv (UPlanFLN 100x/1,3 NA Oil Ph3, Olympus, Hamburg) zur Anwendung. Soweit nicht anders angegeben, wurde bei allen lichtmikroskopischen Aufnahmen eine automatische Belichtungszeit eingehalten und keine Kontrastverstärkung vorgenommen. Die verwendeten Filter (Fraen Corporation Srl, Trivolzio, Italien) sowie die jeweils eingehaltenen Belichtungszeiten sind in Tab.2 aufgeführt.

Tabelle 2: Fluoreszenzfilter und Belichtungszeiten

Filter	Extinktionswellenlänge	Belichtungszeit
UV	365 nm	600 ms
Blue	480 nm	400 ms
Green	535 nm	1-2s

7.3. Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die Daten wurden mittels des unabhängigen t-Tests auf Signifikanz getestet, die Signifikanzniveaus mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) festgelegt. Daten, die keine Signifikanz aufwiesen, wurden mit n.s. angezeigt. Zuvor wurden die Daten auf Ausreißer (Werte, die mehr als das Vierfache von der Standardabweichung des Mittelwertes abweichen) und auf Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests untersucht.

Mit Hilfe von Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) war es möglich die Daten graphisch darzustellen.

8. Ergebnisse

Das folgende Kapitel enthält die Ergebnisse dieser Studie, welche sich aus den Untersuchungen der Elektrophysiologie, den Lauftests und der Histologie zusammensetzen.

Zunächst werden die Ergebnisse der Elektrophysiologie und der Lauftests dargestellt. Im Anschluss wird auf die histologischen Ergebnisse eingegangen.

8.1. Tierexperimenteller Teil

8.1.1 Ermittlung der neurologischen Regeneration mittels des SFI

Bei allen untersuchten Tieren wurde präoperativ der SFI bestimmt. Hierbei lagen alle erhobenen Werte innerhalb des Referenzbereichs, was eine regelrechte Funktion der Zehenspreizung und somit eine normale neurologische Funktion der Hinterläufe widerspiegelt. Alle Tiere waren somit nachweislich vor Beginn der Studie diesbezüglich funktionell gesund.

Für die Auswertung wurde der jeweils ermittelte SFI in einen dreistufigen Score eingeteilt (Tab. 3)

Tabelle 3 Einteilung des SFI in Scores

SFI	Score	Bedeutung
0 bis -25	1	leichte Funktionseinschränkung
-26 bis -74	2	mittlere Funktionseinschränkung
-75 bis -100	3	schwere Funktionseinschränkung

Unabhängig von der Einteilung fanden sich am 1. postoperativen Tag bei 100% der Tiere motorische Defizite. Im Verlauf des Beobachtungszeitraums von zwei Wochen nach der Operation zeigte eine Vielzahl der Tiere eine Erholung der motorischen Ausfälle.

Die Messwerte am 3. postoperativen Tag zeigten bei 5 von 18 Ratten eine starke Einschränkung der motorischen Funktion, wenn sie mit G-CSF behandelt wurden. In der Gruppe die G5% erhielt waren dies 6 von 18 Tieren. Verglichen mit der Kontrollgruppe, ergab sich so für die Behandlung mit G-CSF ein positiver Trend, jedoch keine Signifikanz hinsichtlich der funktionellen Regeneration (Abbildung 8-1).

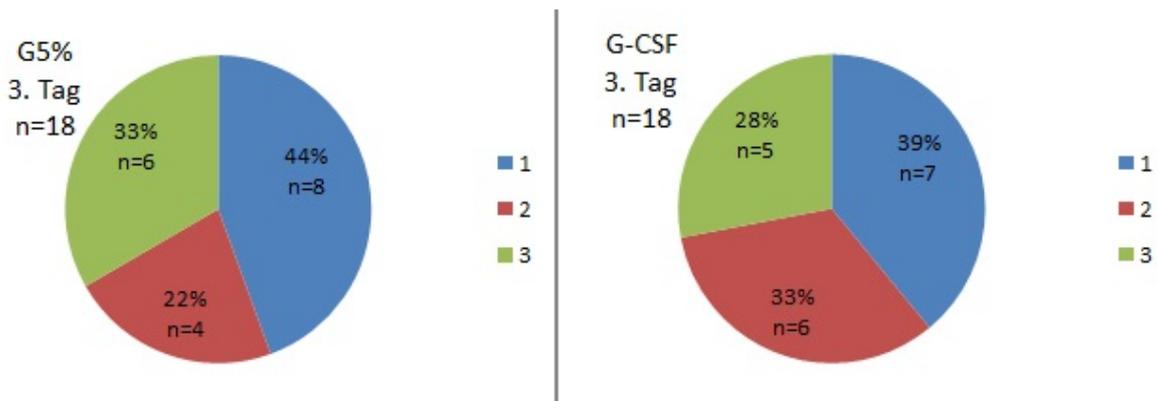


Abbildung 8-1 Score des SFI am 3. Tag für G5% und G-CSF

Zwei Wochen postoperativ wies keine der Ratten, die postoperativ mit G-CSF behandelt wurden ein starkes motorisches Defizit mehr auf. Daraus lässt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der noch 1 von 6 Tieren einen starken neurologischen Schaden aufwies, ein positiver Trend einer besseren Regeneration unter G-CSF-Therapie ableiten (Abbildung 8-2).

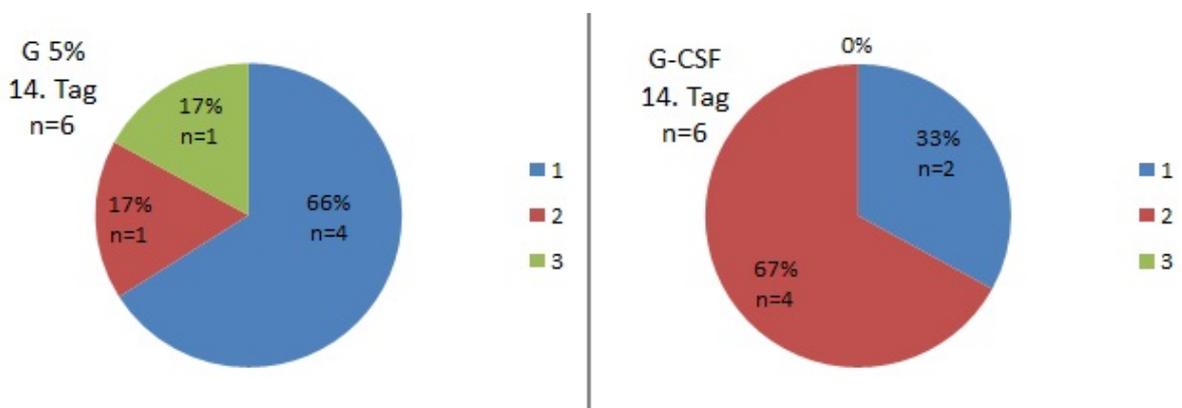


Abbildung 8-2 Score des SFI am 14. Tag für G5% und G-CSF

8.1.2. Ermittlung der neurologischen Regeneration mittels der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (mNLG)

Bei allen untersuchten Tieren wurde präoperativ auch die mNLG bestimmt. Hierbei lagen alle erhobenen Werte innerhalb des Referenzbereichs, was eine regelrechte Funktion der neuromuskulären Funktion der Hinterläufe widerspiegelt. Alle Tiere waren somit vor Beginn der Studie diesbezüglich funktionell gesund.

Die jeweils gemessene mNLG wurde in Bezug zum Ausgangswert in Prozent angegeben und der ermittelte Wert in einen Dreistufenscore eingeteilt.

Tabelle 4 Einteilung mNLG in Scores

mNLG	Score	Bedeutung
100% bis 75%	1	leichte Funktionseinschränkung
74% bis 25%	2	mittlere Funktionseinschränkung
24% bis 0%	3	schwere Funktionseinschränkung

In den ersten Tagen nach der Nervenschädigung - hier beispielsweise der 4. postoperative Tag dargestellt - zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich einer besseren Regeneration der Nervenleitgeschwindigkeit bei den Tieren, die postoperativ mit G-CSF behandelt wurden gegenüber den Tieren ohne G-CSF-Behandlung (Abb.8-3).

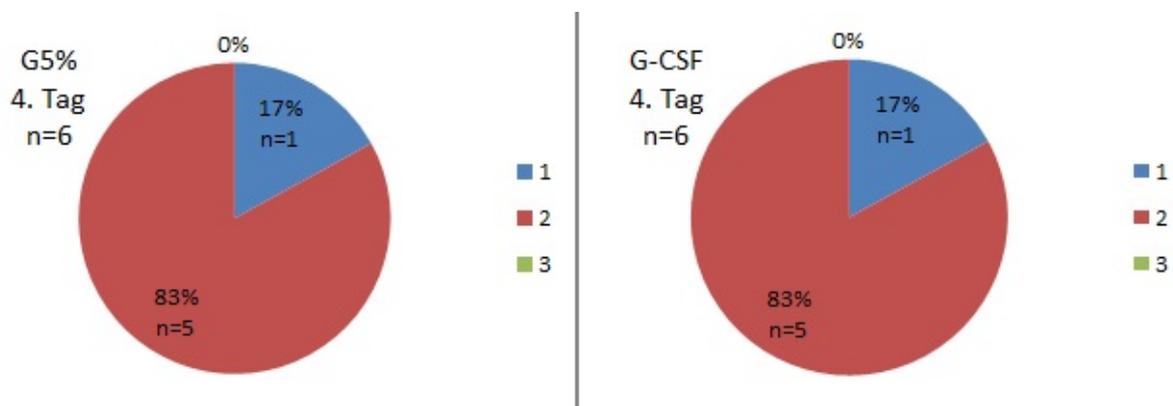


Abbildung 8-3 Score der mNLG am 4. Tag für G5% und G-CSF

In der Kontrollgruppe zeigten am 7. postoperativen Tag 2 von 6 Tieren eine fast vollständige Regeneration der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit und 4 von 6 Tieren noch ein mittleres Defizit. Demgegenüber wiesen in der Gruppe mit G-CSF Behandlung 3 von 6 Tieren eine fast vollständige Regeneration und 3 von 6 Tieren ein mittleres Defizit auf (Abb. 8-4). Somit konnte kein signifikanter Unterschied, aber ein positiver Trend hinsichtlich einer besseren Regeneration der Nervenleitgeschwindigkeit bei Tieren, die mit G-CSF postoperativ behandelt wurden, festgestellt werden.

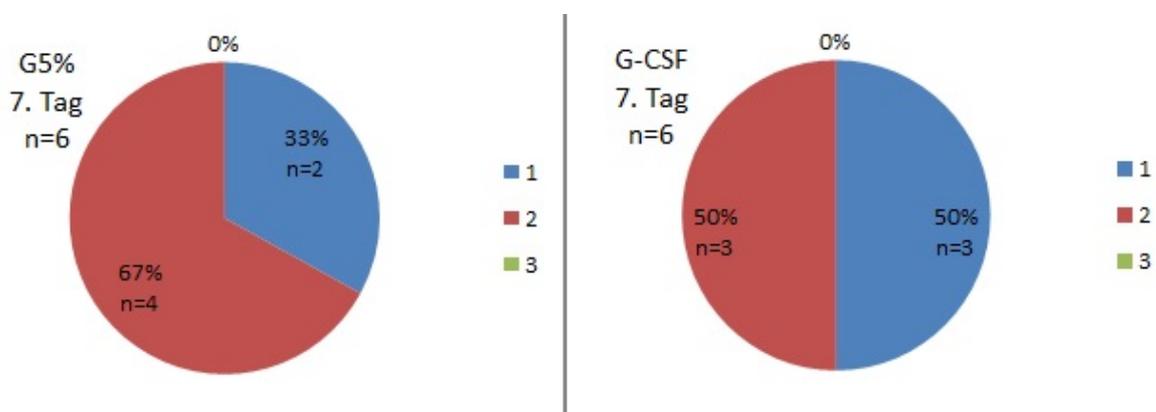


Abbildung 8-4 Score der mNLG am 7. Tag für G5% und G-CSF

Das gleiche Ergebnis lieferte die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit am 14. Tag nach der Nervenschädigung (Abb.8-5).

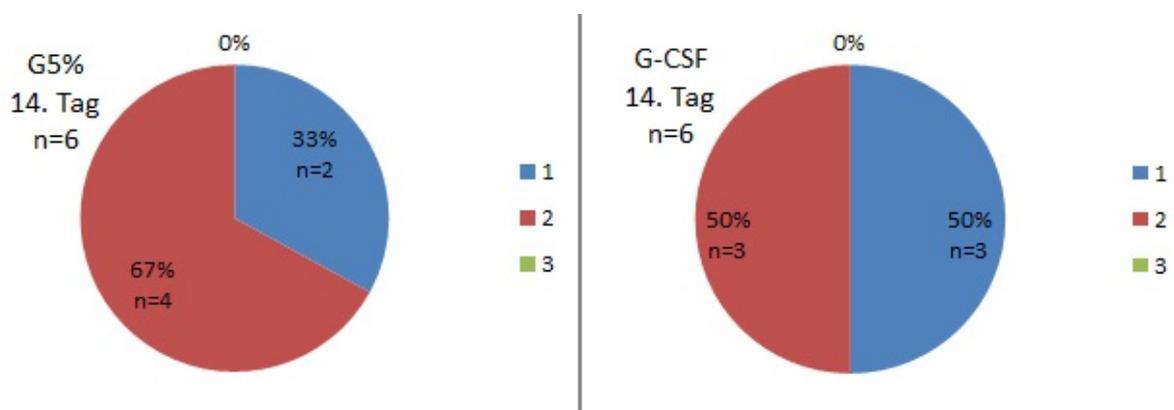


Abbildung 8-5 Score der mNLG am 14. Tag für G5% und G-CSF

8.2. Immunhistochemischer Teil

Die immunhistochemische Auswertung entstand in Kooperation mit der AG Huber/Kins/Urbschat⁵⁸ (Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes/ Technischen Universität Kaiserslautern Fachbereich Biologie, Abteilung Humanbiologie und Humangenetik).

Aufgrund seiner anti-apoptotischen Wirkung trägt G-CSF möglicherweise dazu bei, das Absterben der α -Motoneurone im Rückenmark zu inhibieren. Um diesen Effekt zu überprüfen wurden vier verschiedene Antikörperfärbungen durchgeführt.

Mittels ChAT wurden spezifisch die α -Motoneurone im Rückenmark angefärbt, um so die Anzahl an α -Motoneurone im Rückenmark auf der ungeschädigten und der geschädigten Seite auszählen und vergleichen zu können. Mit Hilfe der Apoptosemarker Bcl-2 (anti-apoptotisch) und Bax (pro-apoptotisch) wurde der Einfluss von G-CSF auf die apoptotischen Prozesse der α -Motoneurone untersucht. Um zu prüfen, ob der G-CSFR bei Verlust von α -Motoneuronen reduziert vorliegt oder durch beispielsweise einen autokrinen Schutzmechanismus auf der geschädigten Seite hochreguliert wird, wurde eine Antikörperfärbung gegen den G-CSFR durchgeführt.

Zur Vereinfachung sind die in den Ergebnissen beschriebenen Seiten des Rückenmarks der verschiedenen Gruppen wie folgt abgekürzt:

Abkürzungen der Gruppen in den Ergebnissen

geschädigte (rechte) Seite der Kontrollgruppe	–G-CSF/re
unversehrte (linke) Seite der Kontrollgruppe	–G-CSF/li
geschädigte (rechte) Seite der Gruppe mit G-CSF-Behandlung	+G-CSF/re
unversehrte (linke) Seite der Gruppe mit G-CSF-Behandlung	+G-CSF/li

8.2.2. Quantitative Analyse für ChAT

Die quantitative und statistische Auswertung von –G-CSF/li und –G-CSF/re zeigte, dass bei –G-CSF/li mehr α -Motoneurone gezählt worden sind als bei –G-CSF/re. Der Mittelwert der vorhandenen α -Motoneurone für den gesamten untersuchten Bereich des Rückenmarks aller Tiere der Kontrollgruppe lag für –G-CSF/li bei 40 ± 1 α -Motoneurone und für –G-CSF/re bei 31 ± 1 α -Motoneurone. Demnach war die

mittlere Anzahl an α -Motoneuronen bei $-G$ -CSF/li deutlich höher verglichen mit $-G$ -CSF/re ($p = 0,00002$).

Bei Betrachtung der quantitativen und statistischen Auswertung von $+G$ -CSF/li und $+G$ -CSF/re waren kaum Unterschiede zwischen der Anzahl der α -Motoneurone erkennbar. Bei $+G$ -CSF/li fanden sich im Mittel 29 ± 1 α -Motoneurone, bei $+G$ -CSF/re 30 ± 1 α -Motoneurone, was keinen signifikanten Unterschied ergab ($p = 0,7987$) (Abb. 8-6).

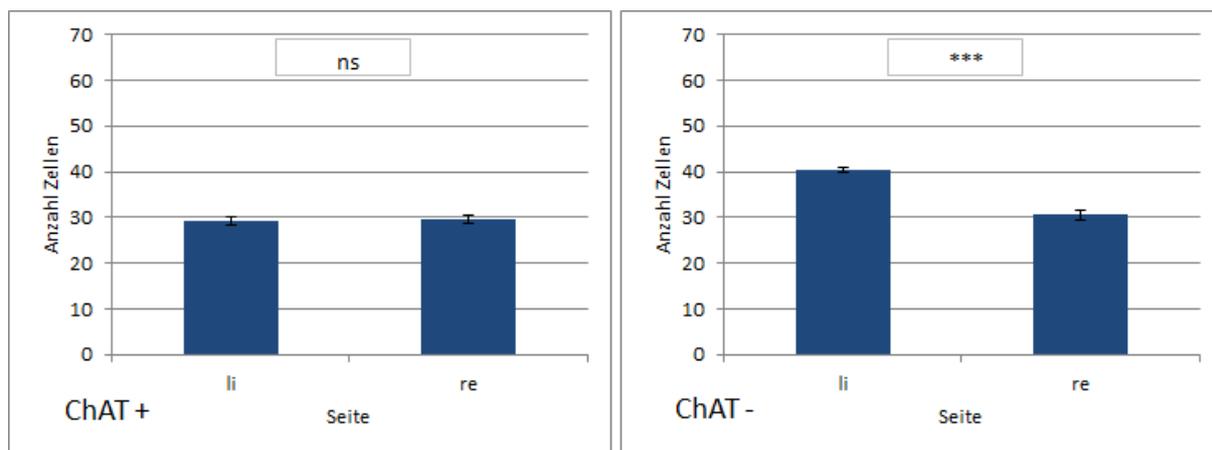


Abbildung 8-6 Gesamtergebnis Antikörperfärbung gegen ChAT

Darstellung der Mittelwerte aller Tiergruppen für die Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneurone je Tier für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G -CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$)

Auch die Ergebnisse für die verschiedenen Einzelgruppen innerhalb einer Gruppe zeigten, dass die Mittelwerte an α -Motoneuronen von $-G$ -CSF/li jeweils signifikant über der Anzahl von $-G$ -CSF/re lagen, die mittlere Anzahl der α -Motoneurone zwischen $+G$ -CSF/li und $+G$ -CSF/re jedoch nicht.

Tabelle 5 Einzelergebnisse der Antikörperfärbung gegen ChAT

ChAT	- GCSF			+ GCSF		
	li	re	p	li	re	p
1 Tag	40 ± 2	30 ± 1	0,0004 ***	32 ± 2	31 ± 2	0,7526 ns
4 Tage	41 ± 3	32 ± 2	0,0450 *	29 ± 2	27 ± 1	0,3542 ns
7 Tage	42 ± 2	32 ± 1	0,0023 **	27 ± 1	30 ± 1	0,0774 ns
14 Tage	40 ± 2	27 ± 1	0,0015 **	29 ± 1	30 ± 2	0,5975 ns
Mittelwert	40 ± 1	31 ± 1	0,00002 ***	29 ± 1	30 ± 1	0,7987 ns

Aufgeführt sind jeweils alle Tiergruppen mit den Mittelwerten der gezählten α -Motoneurone auf der linken bzw. rechten Seite bei Tieren der Kontrollgruppe ohne G-CSF-Behandlung (-) und bei Tieren mit einer Behandlung von G-CSF (+) unter Angabe der statistischen Auswertung (p). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

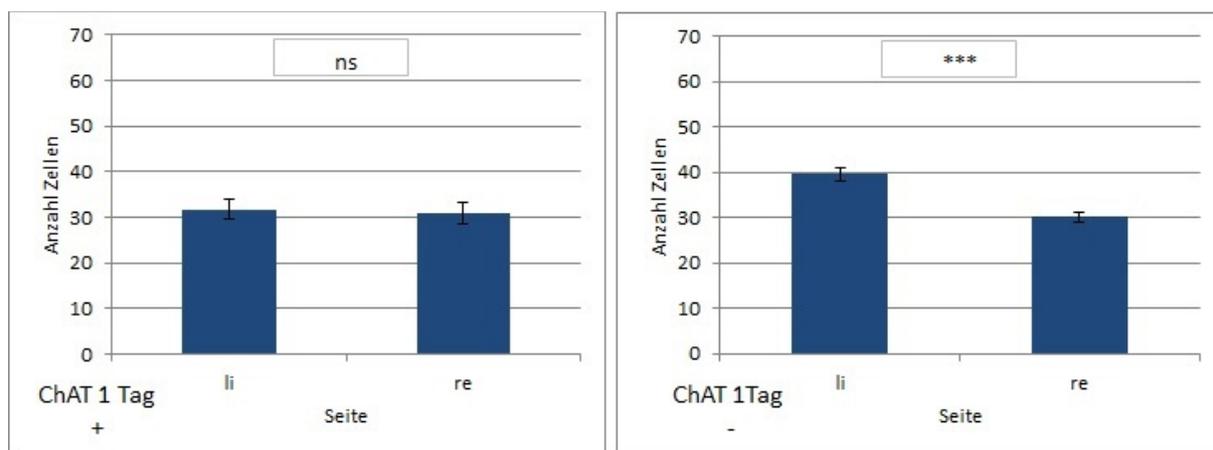


Abbildung 8-7 Antikörperfärbung gegen ChAT Gruppe 1 Tag

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „1 Tag“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

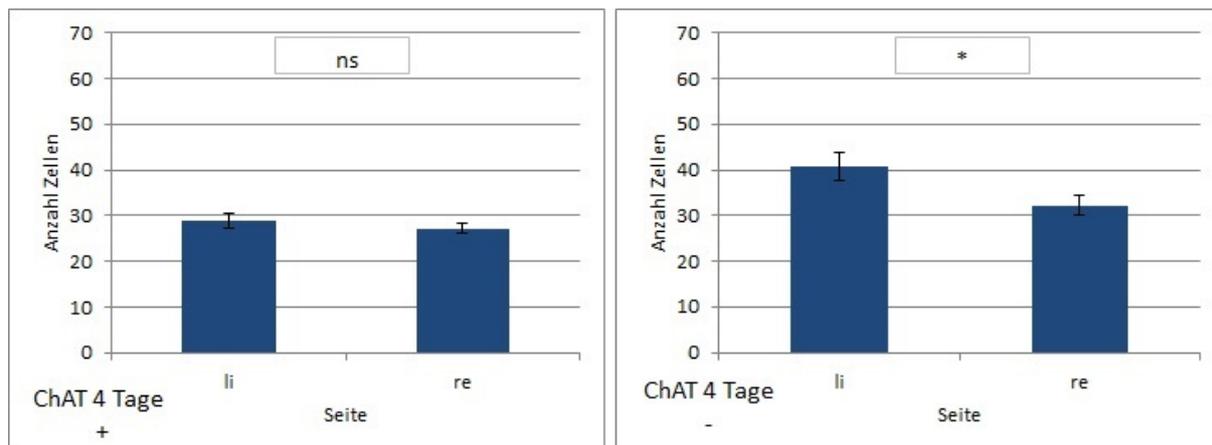


Abbildung 8-8 Antikörperfärbung gegen ChAT Gruppe 4 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „4 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (+) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (-). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

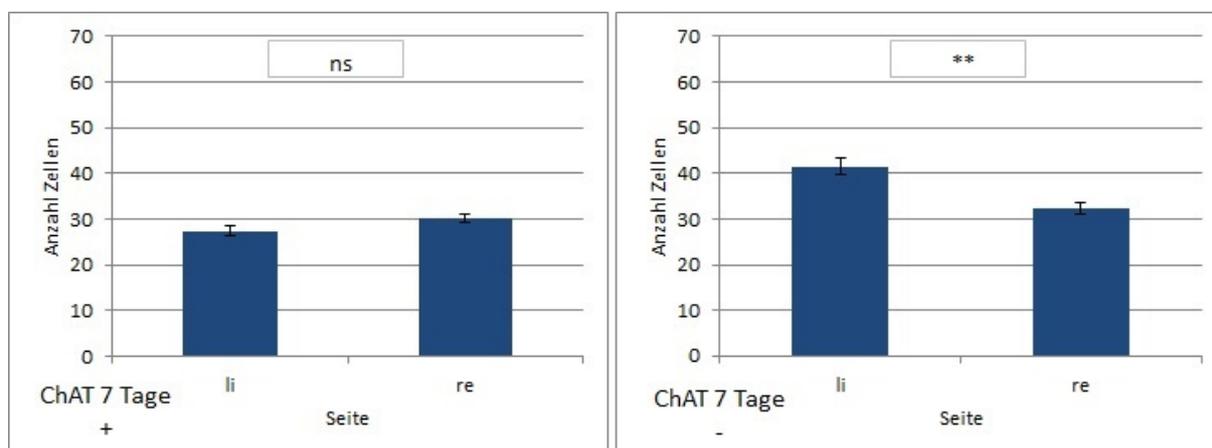


Abbildung 8-9 Antikörperfärbung gegen ChAT 7 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „7 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (+) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (-). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

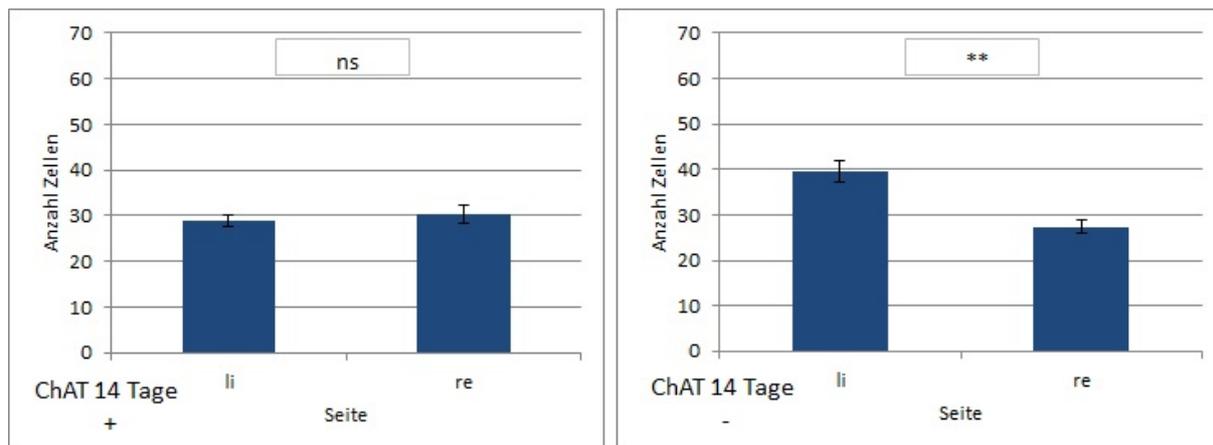


Abbildung 8-10 Antikörperfärbung gegen ChAT 14 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „14 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (+) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (-). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

8.2.2. Quantitative Analyse für Bcl-2

Die quantitative und statistische Auswertung der Bcl-2-positiven α -Motoneurone von -G-CSF/li im Vergleich zu -G-CSF/re zeigte, dass bei -G-CSF/li mehr Bcl-2-positive α -Motoneurone vorhanden waren als bei -G-CSF/re. Der Mittelwert aller Tiergruppen lag für -G-CSF/li bei 52 ± 3 α -Motoneurone und für -G-CSF/re bei 44 ± 2 α -Motoneuronen. Demzufolge ergab sich eine signifikant höhere Anzahl an Bcl-2-positiven Zellen bei -G-CSF/li ($p = 0,0498$).

Bei der Gruppe mit G-CSF-Behandlung zeigte sich kein Unterschied zwischen der Anzahl der Bcl-2-positiven α -Motoneurone bei +G-CSF/li und +G-CSF/re. Bei +G-CSF/li fand sich ein Mittelwert von 36 ± 2 α -Motoneuronen, bei +G-CSF/re 40 ± 2 α -Motoneuronen, was statistisch keinen signifikanten Unterschied ergab ($p = 0,1580$).

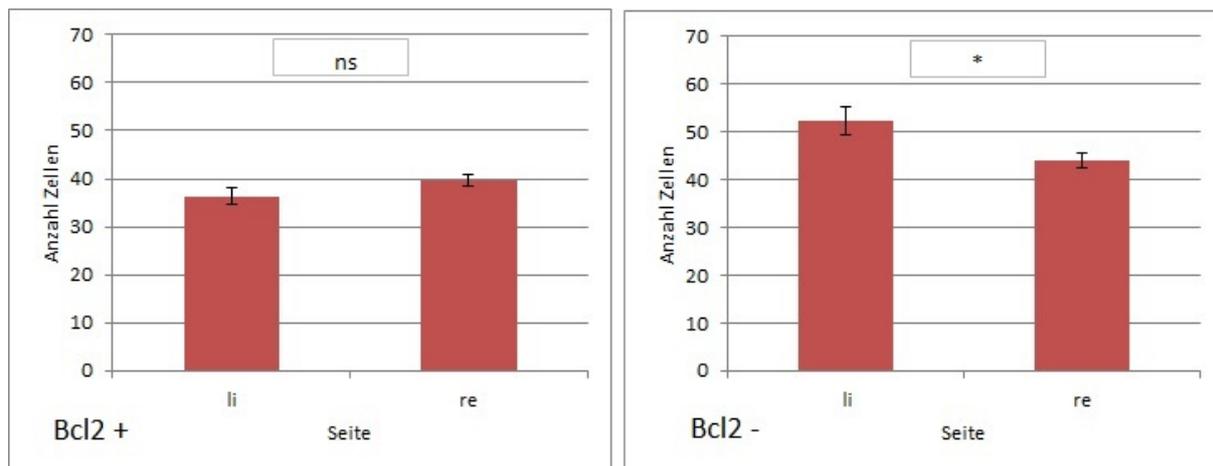


Abbildung 8-11 Gesamtergebnis Antikörperfärbung gegen Bcl-2

Darstellung der Mittelwerte aller Tiergruppen für die Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen je Tier für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (D) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (B). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

Auch die Ergebnisse für die verschiedenen Einzelgruppen innerhalb der Gruppe zeigten, dass die Mittelwerte an Bcl-2-positiven α -Motoneuronen von –G-CSF/li jeweils signifikant über der Anzahl von –G-CSF/re lagen, die mittlere Anzahl der Bcl-2-positiven α -Motoneurone zwischen +G-CSF/li und +G-CSF/re jedoch nicht. Ausgenommen hierbei ist die Gruppe „1 Tag“ der Kontrollgruppe (-), bei der kein Unterschied vorlag ($p = 0,7778$).

Tabelle 6 Einzelergebnisse der Antikörperfärbung gegen Bcl-2

Bcl2	- GCSF			+ GCSF		
	li	re	p	li	re	p
1 Tag	45 ± 6	47 ± 1	0,0778 ns	37 ± 2	41 ± 2	0,2643 ns
4 Tage	58 ± 5	44 ± 3	0,0472 *	32 ± 3	36 ± 3	0,2579 ns
7 Tage	56 ± 2	46 ± 2	0,0072 **	39 ± 2	42 ± 3	0,3253 ns
14 Tage	50 ± 2	40 ± 3	0,0184 *	39 ± 3	40 ± 2	0,7127 ns
Mittelwert	52 ± 3	44 ± 2	0,0498 *	39 ± 2	40 ± 2	0,1580 ns

Aufgeführt sind jeweils alle Tiergruppen mit den Mittelwerten der gezählten Bcl-2-positiven α -Motoneuronen auf der linken bzw. rechten Seite bei Tieren der Kontrollgruppe ohne G-CSF-Behandlung (-) und bei Tieren mit einer Behandlung von G--CSF (+) unter Angabe der statistischen Auswertung (p). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns ($p > 0,05$).

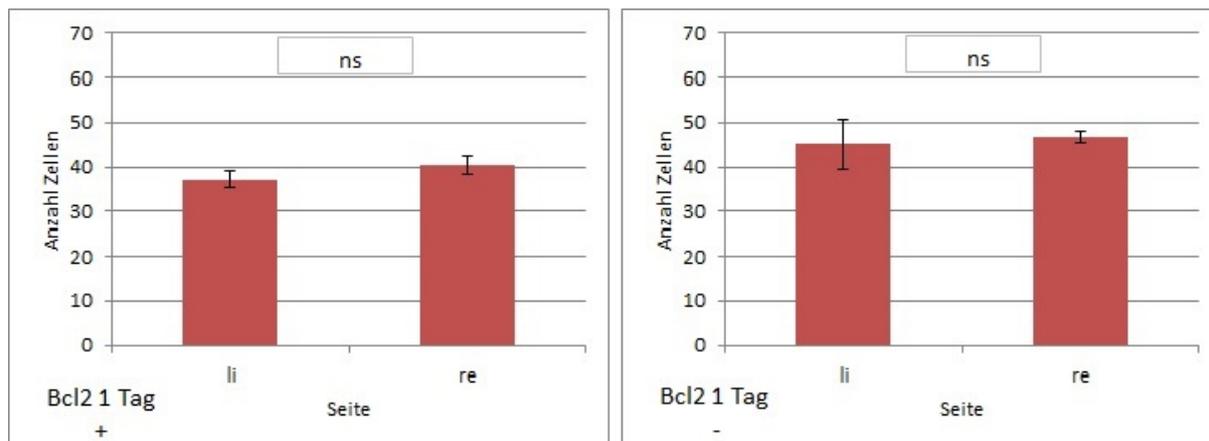


Abbildung 8-12 Antikörperfärbung gegen Bcl-2 Gruppe 1 Tag

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „1 Tag“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

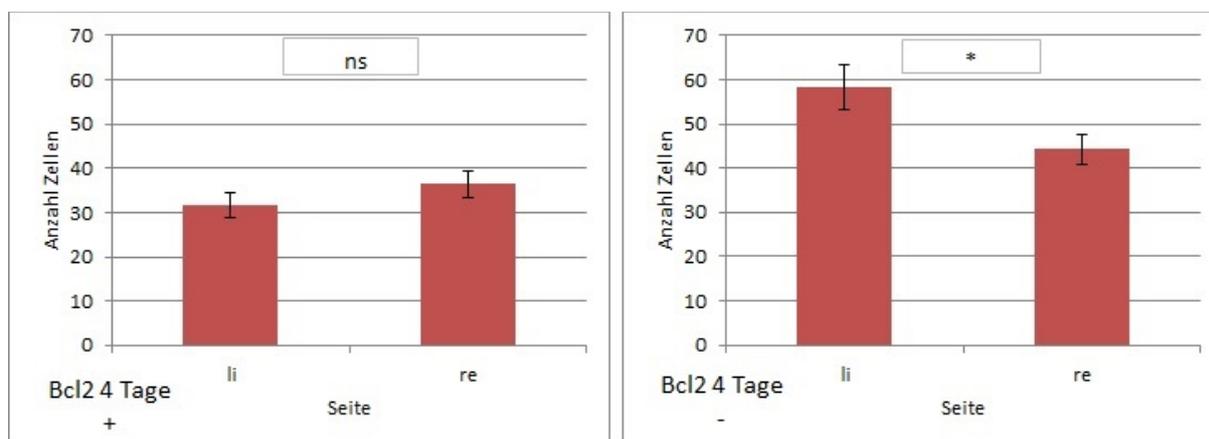


Abbildung 8-13 Antikörperfärbung gegen Bcl-2 Gruppe 4 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „4 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

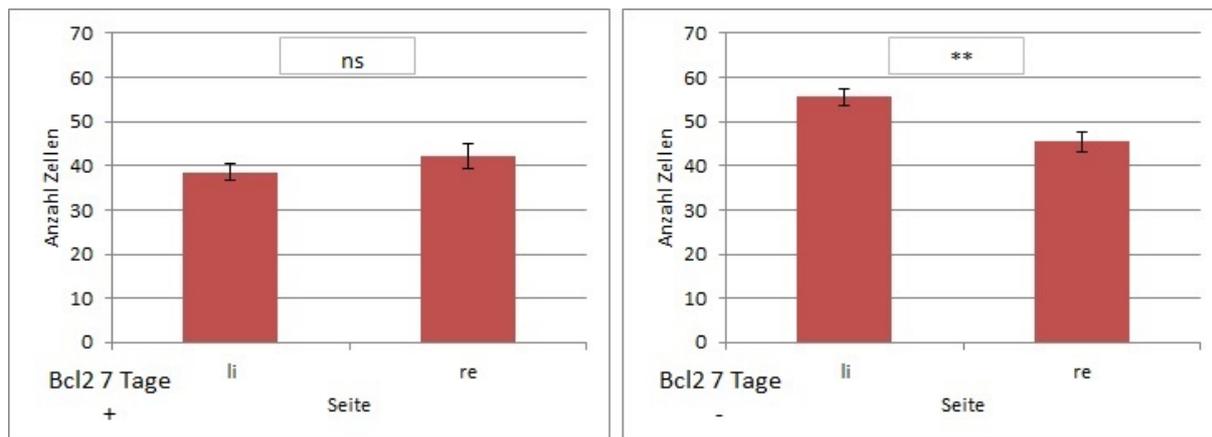


Abbildung 8-14 Antikörperfärbung gegen Bcl-2 Gruppe 7 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „7 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

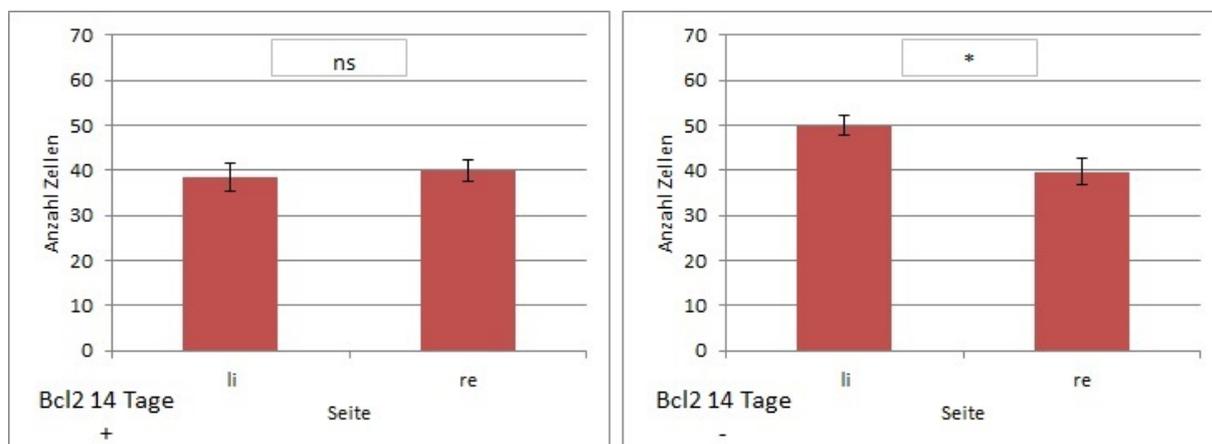


Abbildung 8-15 Antikörperfärbung gegen Bcl-2 Gruppe 14 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „14 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

8.2.3. Quantitative Analyse für Bax

Die quantitative und statistische Auswertung der Bax-positiven α -Motoneurone von –G-CSF/li im Vergleich zu –G-CSF/re zeigte, dass bei –G-CSF/li mehr Bax-positive α -Motoneurone vorhanden waren als bei –G-CSF/re. Der Mittelwert der positiven α -Motoneurone aller Tiergruppen lag für –G-CSF/li bei 43 ± 2 α -Motoneuronen und für –G-CSF/re bei 53 ± 2 α -Motoneuronen. Daraus ergab sich eine deutlich geringere Anzahl an Bax-positiven Zellen bei –G-CSF/li als bei –G-CSF/re ($p = 0,0175$).

Bei der Gruppe mit G-CSF-Behandlung zeigte sich kein Unterschied zwischen der Anzahl der Bax-positiven α -Motoneurone bei +G-CSF/li und +G-CSF/re. Bei +G-CSF/li fanden sich im Mittel 40 ± 4 α -Motoneurone, bei +G-CSF/re 40 ± 3 α -Motoneurone, was in etwa der gleichen Anzahl entsprach ($p = 0,9082$).

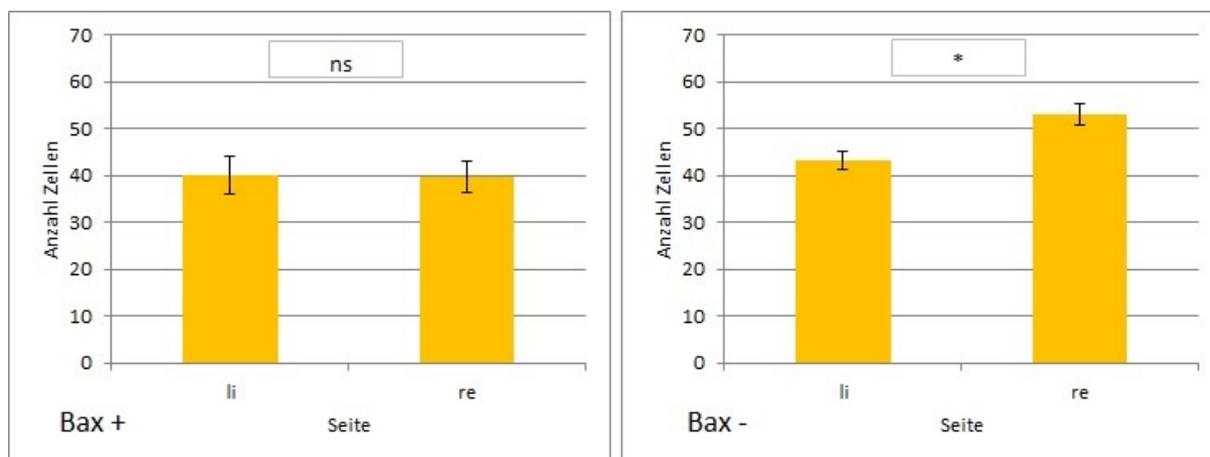


Abbildung 8-16 Gesamtergebnis Antikörperfärbung gegen Bax

Auch die Ergebnisse für die verschiedenen Einzelgruppen innerhalb der Gruppe zeigten, dass die Mittelwerte an Bax-positiven α -Motoneuronen von –G-CSF/li jeweils signifikant über der Anzahl von –G-CSF/re lagen, die mittlere Anzahl der Bax-positiven α -Motoneurone zwischen +G-CSF/li und +G-CSF/re jedoch nicht.

Tabelle 7 Einzelergebnisse der Antikörperfärbung gegen Bax

Bax	- GCSF			+ GCSF		
	li	re	p	li	re	p
1 Tag	38 ± 2	47 ± 2	0,0079 **	32 ± 2	34 ± 2	0,6280 ns
4 Tage	44 ± 3	53 ± 2	0,0085 **	36 ± 1	37 ± 1	0,6834 ns
7 Tage	48 ± 3	58 ± 3	0,0270 *	42 ± 1	39 ± 3	0,2763 ns
14 Tage	43 ± 3	54 ± 4	0,0466 *	51 ± 3	49 ± 5	0,7801 ns
Mittelwert	43 ± 2	53 ± 2	0,0175 *	40 ± 4	40 ± 3	0,9082 ns

Aufgeführt sind jeweils alle Tiergruppen mit den Mittelwerten der gezählten Bax-positiven α -Motoneuronen auf der linken bzw. rechten Seite bei Tieren der Kontrollgruppe ohne G-CSF-Behandlung (-) und bei Tieren mit einer Behandlung von G-CSF (+) unter Angabe der statistischen Auswertung (p). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

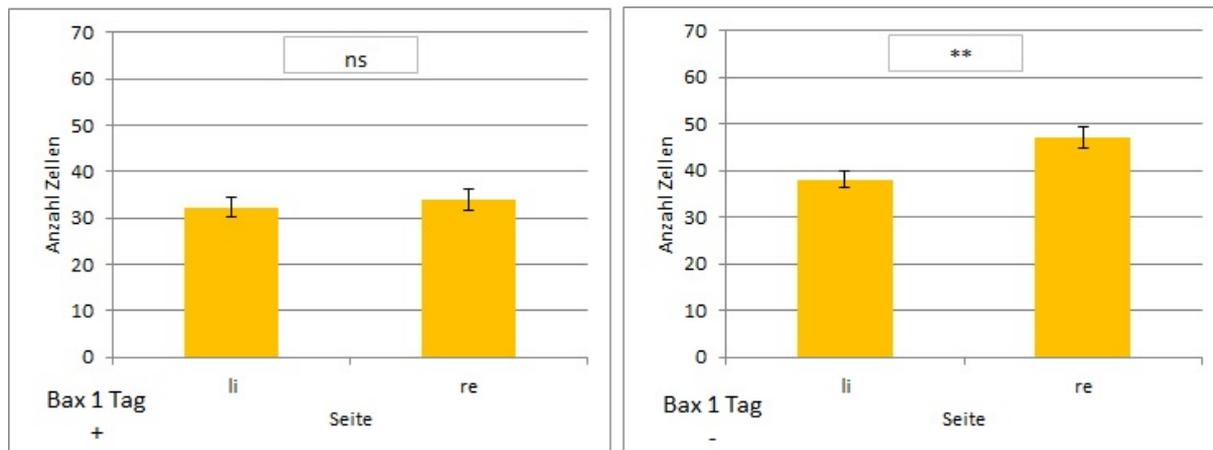


Abbildung 8-17 Antikörperfärbung gegen Bax Gruppe 1 Tag

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten Bax-positiven α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „1 Tag“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

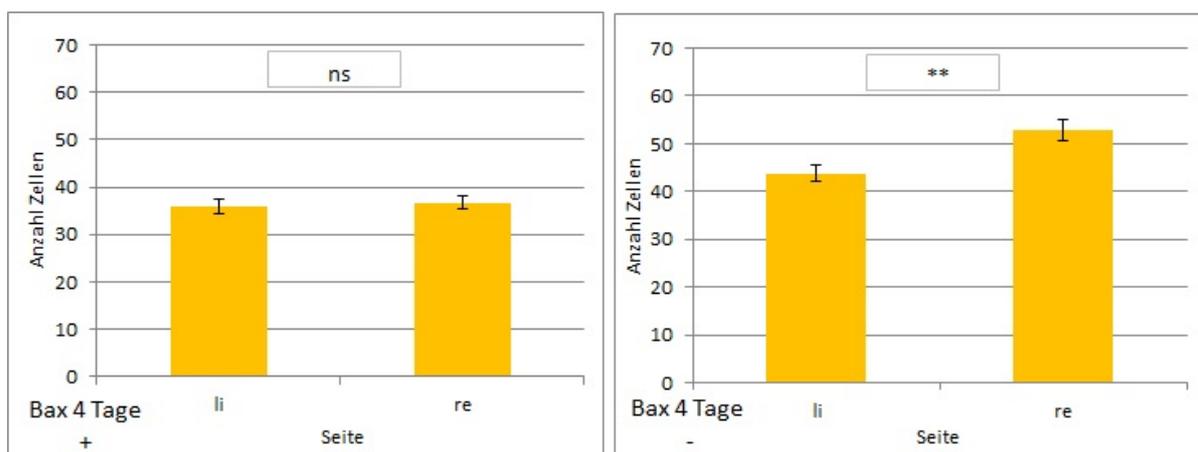


Abbildung 8-18 Antikörperfärbung gegen Bax Gruppe 4 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten Bax-positiven α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „4 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

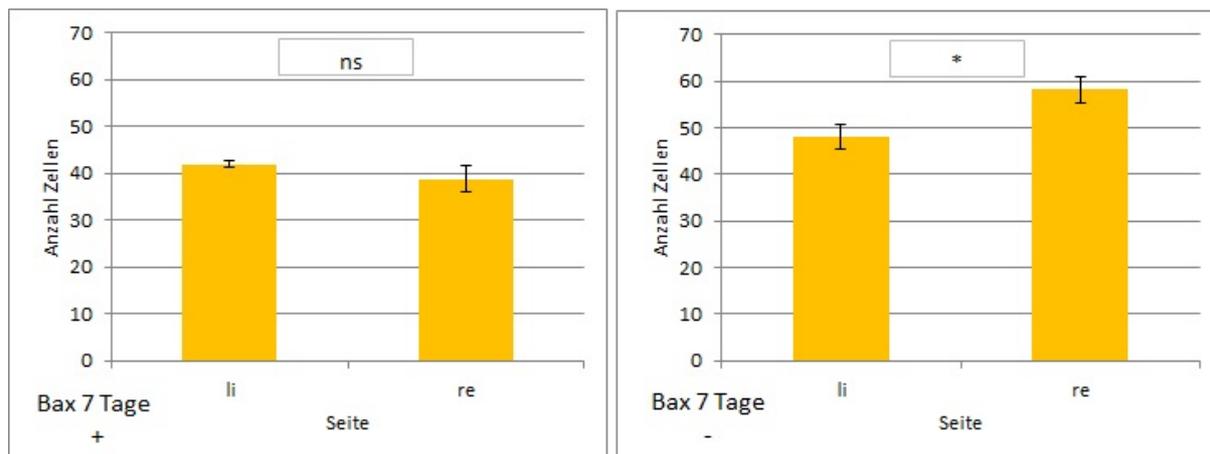


Abbildung 8-19 Antikörperfärbung gegen Bax Gruppe 7 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten Bax-positiven α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „7 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

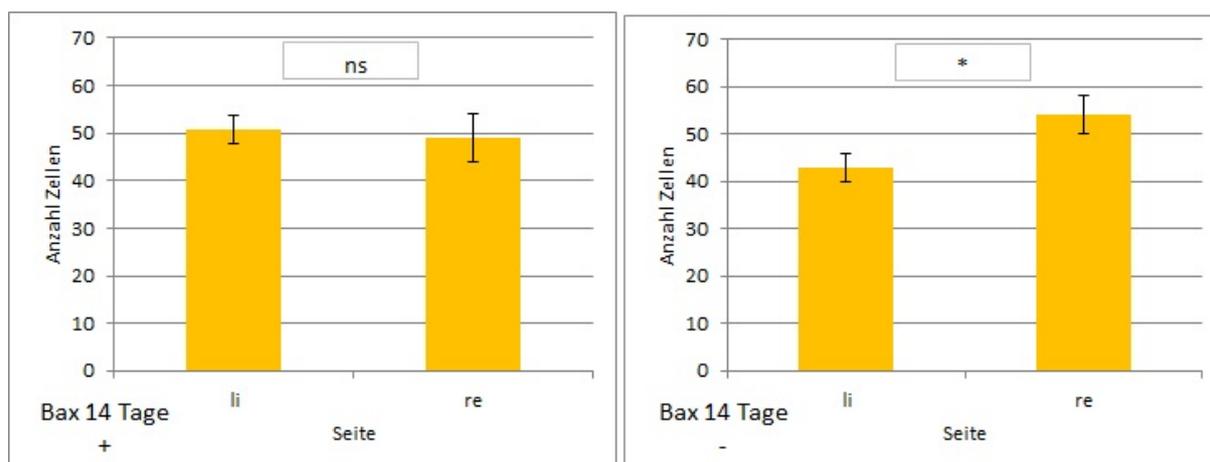


Abbildung 8-20 Antikörperfärbung gegen Bax Gruppe 14 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten Bax-positiven α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „14 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

8.2.4. Quantitative Analyse für G-CSFR

Die quantitative und statistische Auswertung der G-CSFR-positiven α -Motoneurone von -G-CSF/li im Vergleich zu -G-CSF/re zeigte, dass bei -G-CSF/li mehr G-CSFR-positiv α -Motoneurone vorhanden waren als bei -G-CSF/re.

Der Mittelwert der G-CSFR-positiven α -Motoneuronen aller Tiergruppen lag für -G-CSF/li bei 46 ± 2 α -Motoneuronen und für -G-CSF/re bei 32 ± 1 α -Motoneuronen. Daraus ergab sich eine deutlich höhere mittlere Anzahl an G-CSFR-positiven α -Motoneuronen bei -G-CSF/li als bei -G-CSF/re ($p = 0,0019$).

Bei der Gruppe mit G-CSF-Behandlung zeigte sich kein Unterschied zwischen der Anzahl der G-CSFR-positiven α -Motoneurone bei +G-CSF/li und +G-CSF/re.

Bei +G-CSF/li fanden sich im Mittelwert 43 ± 3 G-CSFR-positive α -Motoneurone, bei +G-CSF/re 44 ± 2 G-CSFR-positive α -Motoneurone, was ungefähr der gleichen Anzahl entspricht ($p = 0,8398$).

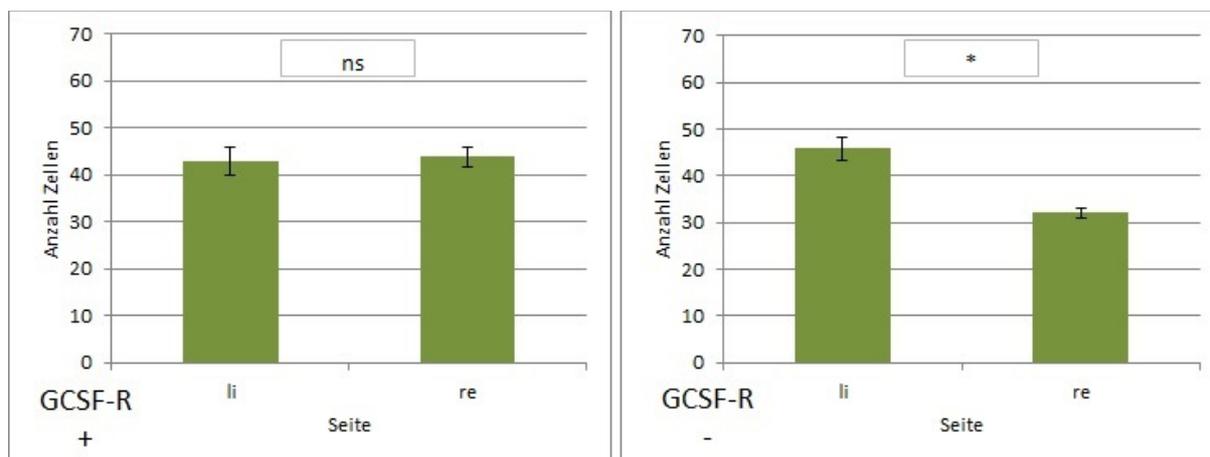


Abbildung 8-21 Gesamtergebnis Antikörperfärbung gegen G-CSFR

Auch die Ergebnisse für die verschiedenen Einzelgruppen innerhalb der Gruppe zeigten, dass die Mittelwerte an G-CSFR-positiven α -Motoneuronen von –G-CSF/li jeweils signifikant über der Anzahl von –G-CSF/re lag, die mittlere Anzahl der G-CSFR-positiven α -Motoneuronen zwischen +G-CSF/li und +G-CSF/re jedoch nicht.

Tabelle 8 Einzelergebnisse der Antikörperfärbung gegen G-CSFR

GCSF-R	- GCSF			+ GCSF		
	li	re	p	li	re	p
1 Tag	40 ± 4	29 ± 1	0,0175 *	42 ± 1	41 ± 1	0,4950 ns
4 Tage	48 ± 4	33 ± 2	0,0068 **	36 ± 2	41 ± 2	0,0908 ns
7 Tage	51 ± 3	32 ± 1	0,0002 ***	44 ± 2	44 ± 2	0,9548 ns
14 Tage	46 ± 3	34 ± 1	0,0207 *	51 ± 2	50 ± 3	0,8889 ns
Mittelwert	46 ± 2	32 ± 1	0,0019 *	43 ± 3	44 ± 2	0,8398 ns

Aufgeführt wurden jeweils alle Tiergruppen mit den Mittelwerten der gezählten G-CSFR-positiven α -Motoneurone auf der linken bzw. rechten Seite bei Tieren der Kontrollgruppe ohne G-CSF-Behandlung (-) und bei Tieren mit einer Behandlung von G-CSF (+) unter Angabe der statistischen Auswertung (p). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

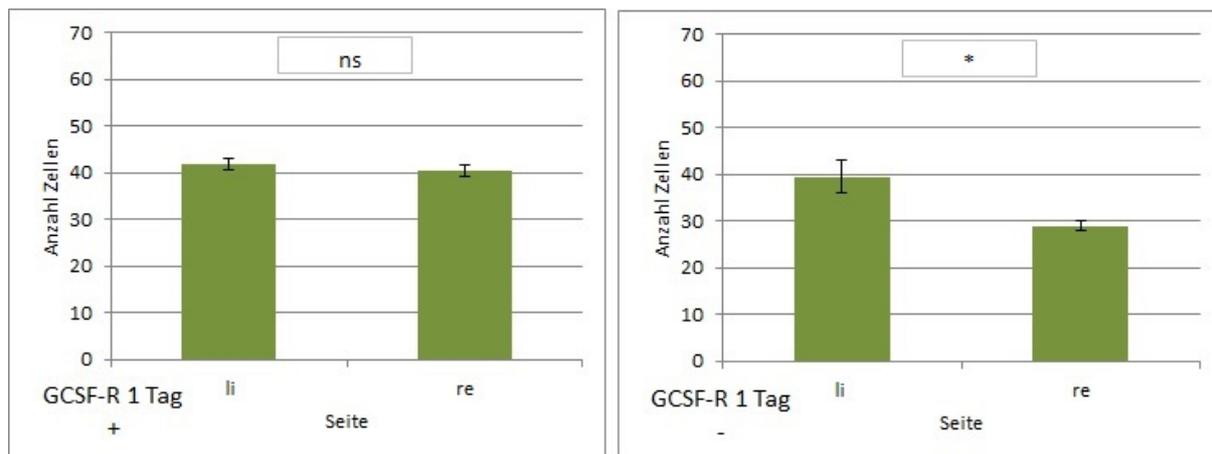


Abbildung 8-22 Antikörperfärbung gegen G-CSFR Gruppe 1 Tag

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „1 Tag“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

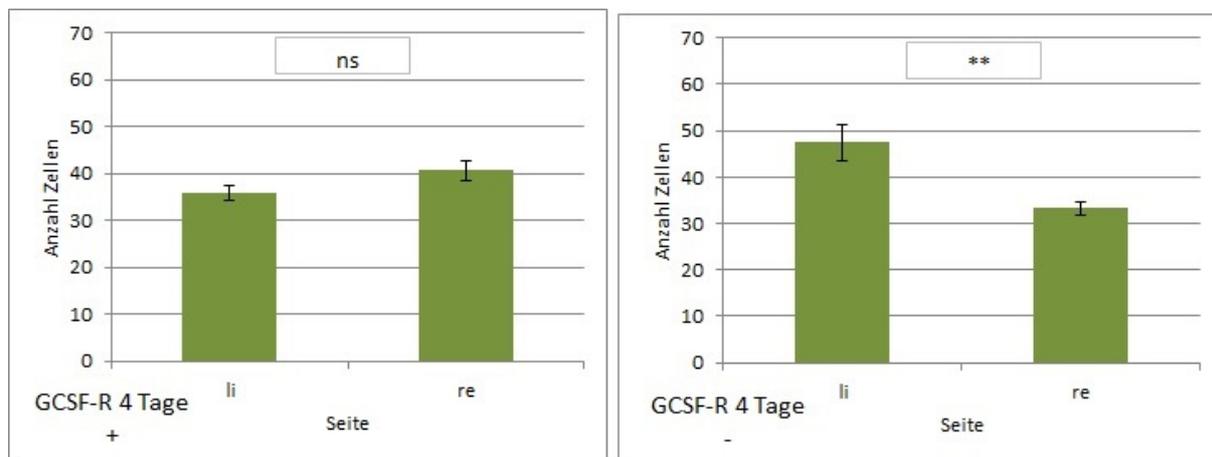


Abbildung 8-23 Antikörperfärbung gegen G-CSFR Gruppe 4 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „4 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

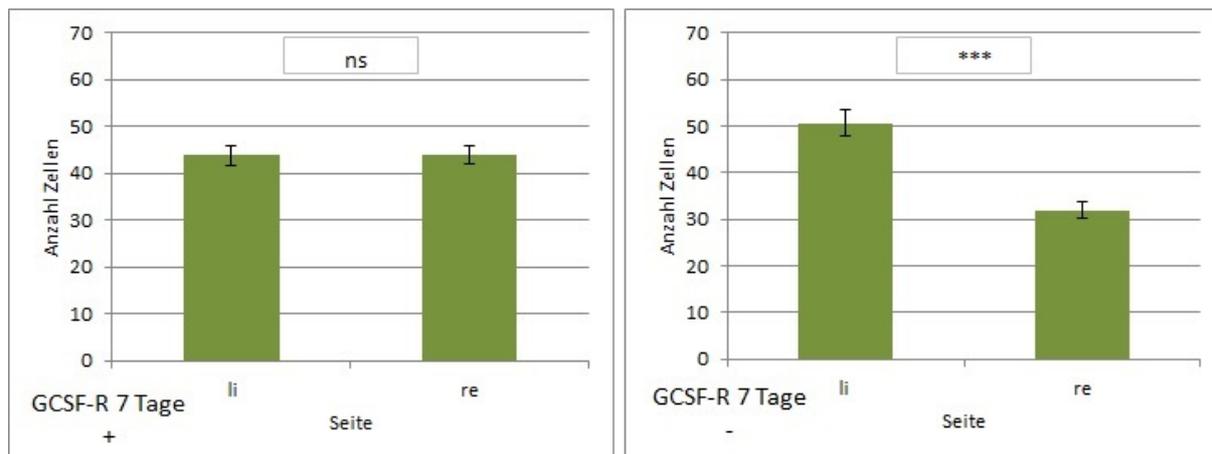


Abbildung 8-24 Antikörperfärbung gegen G-CSFR Gruppe 7 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „7 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

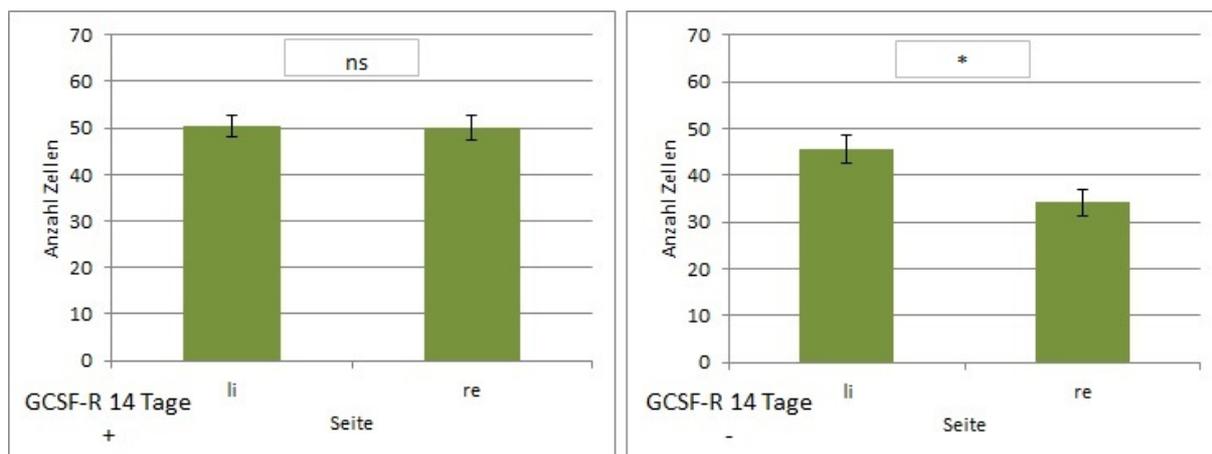


Abbildung 8-25 Antikörperfärbung gegen G-CSFR Gruppe 14 Tage

Darstellung der mittleren Gesamtzahl an gefärbten α -Motoneuronen eines Tieres der Tiergruppe „14 Tage“ für die jeweils linke und rechte (geschädigte) Seite des Rückenmarks bei Tieren der Kontrollgruppe (-) und Tieren mit G-CSF-Behandlung (+). Signifikanzniveaus: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$); ns=nicht signifikant ($p > 0,05$).

8.2.5. Fluoreszenz-Doppelfärbung

8.2.5.1. Doppelfärbung gegen die Proteine ChAT und Bcl-2 (Abb. 8-26)

In der Antikörperfärbung gegen ChAT (Abb. 8-26 A) ließ sich ein positives α -Motoneuron trotz recht hohen Hintergrundsignals deutlich erkennen. Das ChAT-Signal war im kompletten Zellsoma mit Aussparung des Nucleus zu identifizieren. Um den Nucleus erschien das ChAT-Signal verstärkt. Die Antikörperfärbung gegen Bcl-2 (Abb. 8-26 B) zeigte das gleiche Verteilungsmuster des Signals. Auch hier war das α -Motoneuron trotz relativ starker Hintergrundfärbung klar erkennbar. Ebenfalls lag das Bcl-2-Signal im gesamten Soma vor, wobei der Nucleus ausgespart war und um ihn herum eine verstärkte Färbung vorlag. Durch das Übereinanderlegen der Bilder beider Färbungen (Abb.8-26 C) zeigte sich die Kolokalisation der Proteine ChAT und Bcl-2 im α -Motoneuron. Des Weiteren war zu erkennen, dass das Expressionsmuster beider Proteine gleich verteilt vorlag. Sowohl die stärkere Intensität um den Nucleus, als auch eine schwächere Intensität fernab des Nucleus war in beiden Färbungen gleich sichtbar. Mit einer DAPI-Färbung (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde der Nucleus in blau sichtbar dargestellt.

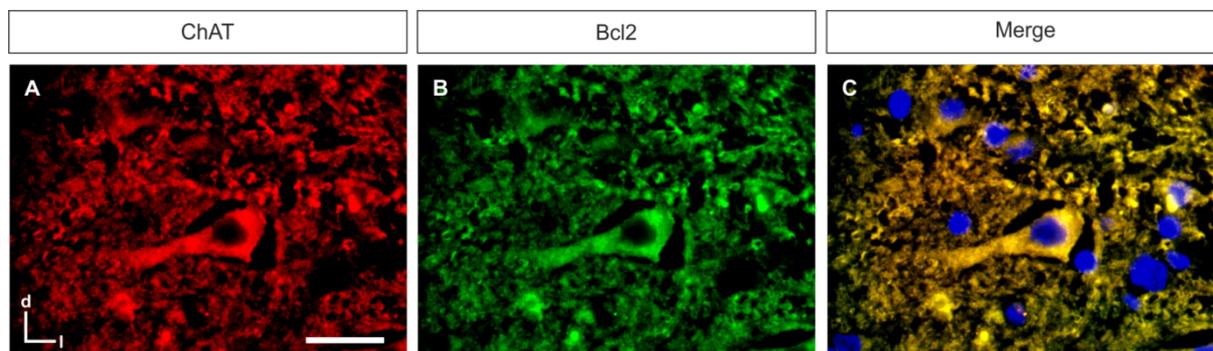


Abbildung 8-26 Doppelfärbung ChAT und Bcl-2. A: Antikörperfärbung gegen ChAT. B: Antikörperfärbung gegen Bcl-2. C: Überlagerung der Antikörperfärbung gegen ChAT und Bcl-2 sowie Kernsignal mit DAPI. Der Messbalken entspricht einer Länge von 25 μ m und gilt für A-C.

8.2.5.2. Doppelfärbung gegen die Proteine ChAT und Bax (Abb.8-27)

Die Antikörperfärbung gegen ChAT (Abb. 8-27 A) zeigte hier zwei positive α -Motoneurone. Durch die starke Intensität der Färbung ließen sich die α -Motoneurone trotz Hintergrundfärbung klar vom Hintergrund abgrenzen. Das ChAT-Signal war im gesamten Zellsoma verteilt, es traten jedoch innerhalb des Zellsomas Signale unterschiedlicher Intensitäten auf. Einzig der Nucleus zeigte innerhalb der Zelle kein

ChAT-Signal. Vergleich man beide Zellen bezüglich ihrer Intensität der Färbung war keine Unterscheidung in stark und schwach-positiv gefärbte α -Motoneurone möglich. Die Antikörperfärbung gegen Bax (Abb. 8-27 B) verhielt sich vergleichbar. Auch hier setzten sich die α -Motoneurone aufgrund eines stärkeren Signals deutlich von dem Hintergrund ab. Mit Ausnahme vom Nucleus lag das Bax-Signal mit unterschiedlich starken Intensitäten an einigen Stellen im gesamten Zellsoma vor. Auch hier war eine Unterscheidung zwischen stark und schwach positiv gefärbten α -Motoneuronen nicht möglich. Das Übereinanderlegen der Bilder der beiden Färbungen (Abb. 8-27 C) zeigte, dass in α -Motoneuronen die Proteine ChAT und Bax kolokalisiert waren. Mittels DAPI-Färbung wurde der Nucleus blau angefärbt. Erkennbar war, dass das Expressionsmuster der beiden Proteine das gleiche Verteilungsmuster im Zellsoma zeigte. Sowohl die Bereiche einer stärkeren als auch einer schwächeren Intensität innerhalb des Zellsoma war in beiden Färbungen an gleicher Stelle lokalisiert. Die Unterscheidung zwischen stark und schwach positiv gefärbten Zellen war auch hier nicht möglich.

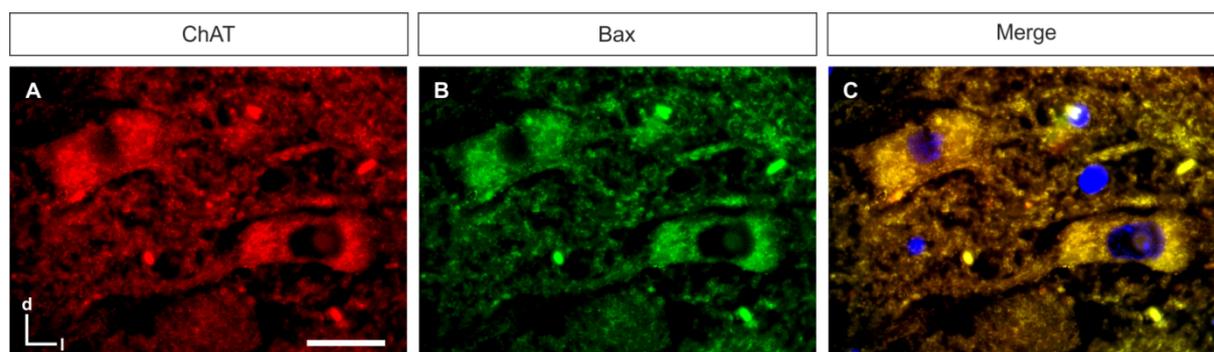


Abbildung 8-27 Doppelfärbung ChAT und Bax. A: Antikörperfärbung gegen ChAT. B: Antikörperfärbung gegen Bax. C: Überlagerung der Antikörperfärbung gegen ChAT und Bax sowie Kernsignal mit DAPI. Der Messbalken entspricht einer Länge von 25 μ m und gilt für A-C.

8.2.5.3. Doppelfärbung gegen die Proteine ChAT und G-CSFR (Abb.8-28)

In der Antikörperfärbung gegen ChAT (Abb.8-28 A) ließen sich zwei positive α -Motoneurone, trotz einer relativ starken Hintergrundfärbung, erkennen. Das ChAT-Signal lag über das gesamte Zellsoma verteilt, an manchen Stellen seitlich des Nucleus verstärkt, vor. Nur der Nucleus zeigte innerhalb der Zelle kein ChAT-Signal. Des Weiteren war im Vergleich der beiden Zellen zueinander zu sehen, dass eine Unterscheidung in stark und schwach positiv gefärbte α -Motoneurone möglich war. Die Antikörperfärbung gegen G-CSFR (Abb.8-28 B) zeigte ein ähnliches Bild. Die α -

Motoneurone waren aufgrund eines stärkeren Signals deutlich von der Hintergrundfärbung abzugrenzen. Das G-CSFR-Signal lag ebenfalls im gesamten Soma mit Ausnahme des Nucleus vor und wies an verschiedenen Stellen seitlich des Nucleus eine stärkere Intensität als an anderen Stellen auf. Hier war eine Unterscheidung zwischen stark und schwach positiv gefärbten α -Motoneuronen möglich. Durch das Übereinanderlegen der Bilder der beiden Färbungen (Abb.8-28 C) war erkennbar, dass in α -Motoneuronen die Proteine ChAT und G-CSFR kolokalisiert waren. Mit der DAPI Färbung wurde der Nucleus in blau sichtbar gemacht. Zu erkennen war ebenfalls, dass das Expressionsmuster der beiden Proteine gleich verteilt vorlag. Sowohl die Bereiche einer stärkeren als auch einer schwächeren Intensität innerhalb des Zellsomas waren in beiden Färbungen gleich lokalisiert. Die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen stark und schwach positiv gefärbten Zellen blieb ebenfalls erhalten.

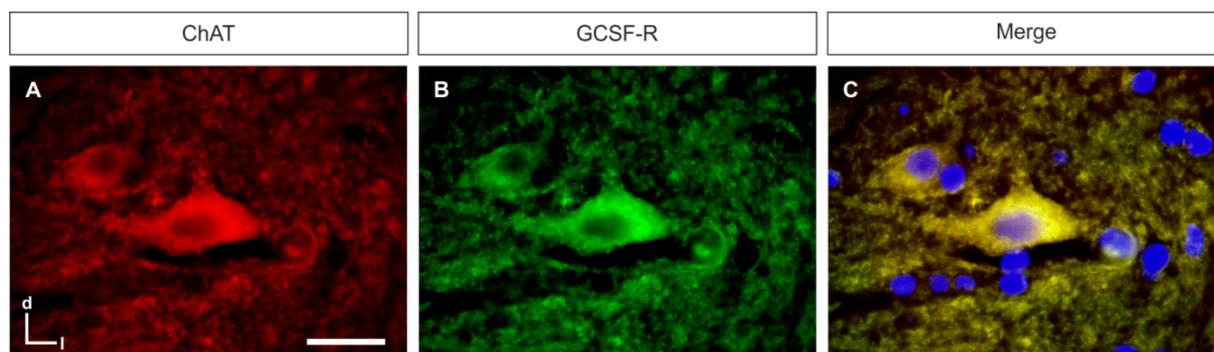


Abbildung 8-28 Doppelfärbung ChAT und G-CSFR. A: Antikörperfärbung gegen ChAT. B: Antikörperfärbung gegen G-CSFR. C: Überlagerung der Antikörperfärbung gegen ChAT und G-CSFR sowie Kernsignal mit DAPI. Der Messbalken entspricht einer Länge von 25 μ m und gilt für A-C.

9. Diskussion

Traumatische und iatrogene Verletzungen von peripheren Nerven resultieren oft in schweren neurologischen Defiziten. Zur Wiederherstellung der Funktion der auf diese Weise traumatisierten Nerven stehen neben biomechanischen Prozeduren wie verschiedenen Transplantationsmethoden^{12,90} oder neurophysiologischen Herangehensweisen^{60,64} zunehmend auch systemisch wirkende Substanzen wie beispielsweise Wachstumsfaktoren im Interesse der Forschung^{5,32,48}.

In den letzten Jahren wurde in einer Vielzahl von Studien ein direkter protektiver Effekt von G-CSF auf Neurone nach erfolgter Hirnschämie nachgewiesen. Neben seinen anti-apoptischen und neuroprotektiven Eigenschaften förderte G-CSF nach zerebraler Ischämie die Gefäßneubildung im Gehirn und steigerte die sensomotorischen und kognitiven Funktionen in tierexperimentellen Studien sowie bei Menschen nach Erleiden eines Schlaganfalls^{118,122}. Hierbei senkte G-CSF die Mortalität durch eine Verminderung der Hirnschwellung und damit einem reduzierten Risiko einer Einklemmung¹¹⁶. Im M. Parkinson Tiermodell zeigte G-CSF eine neuroprotektive Wirkung auf die dopaminergen Neurone der Substantia nigra sowie im M. Alzheimer Modell eine Verbesserung der Lern- und Erinnerungsfunktion von Mäusen^{91,143}.

G-CSF und sein Rezeptor werden neben den Kortex Arealen II und V, dem Hippocampus, der subventrikulären Zone, den Purkinje Zellen, dem Zerebellum und dem Hirnstamm auch in α -Motoneuronen der Vorderhörner exprimiert^{52,111,122}.

Henriques *et al.* zeigten 2010 einen direkten Einfluss von G-CSF auf das Überleben von α -Motoneuronen sowie die vermehrte Expression des Rezeptors für G-CSF im Rückenmark nach Axotomie des N. ischiadicus bei Mäusen⁵². Auch förderte G-CSF das Überleben von α -Motoneuronen im Tiermodell zur amyotrophen Lateralsklerose (ALS), was der Muskelatrophie entgegenwirkte¹¹¹.

Zusammenfassend weisen die bisherigen Daten darauf hin, dass sich G-CSF zur Behandlung verschiedener neurologischer Krankheitsbilder eignen könnte. Ein wichtiger Aspekt ist, dass G-CSF seit vielen Jahren zur Behandlung von Neutropenien eingesetzt wird und sich aufgrund seines sichereren Gebrauchs und seiner gut bekannten pharmakokinetischen Eigenschaften daher auch für die Behandlung neurologischer Erkrankungen eignen könnte¹¹⁰. Die Fähigkeit die intakte Bluthirnschranke zu passieren ermöglicht eine periphere Gabe^{91,111,117,122,159}.

Squadrit *et al.* zeigten in einem Tiermodell, dass es nach der Gabe von G-CSF zu weniger Reperfusionsschäden im Splanchnicusgebiet bei Ratten kommt und dass bei intravenös verabreichtem G-CSF die Dosierung von 10 µg/kg der von 5 µg/kg überwiegt¹³³. Die Arbeitsgruppe von Schäbitz *et al.* konnte bei einer intravenösen Applikation von G-CSF mit einer Dosierung von 60 µg/kg Körpergewicht eine neuroprotektive Wirkung und verminderte Destruktion von Nervengewebe bei ischämischen Hirninsult bei Ratten nachweisen¹¹⁶. In der vorliegenden Dissertation wurde die gleiche Applikationsform sowie Dosierung wie bei Schäbitz *et al.* von G-CSF (Neupogen®, Amgen) angewandt. Weitere Applikationsformen stellen die subkutane^{10,43,89} sowie die intraperitoneale⁹⁵ Verabreichung dar. Weitaus seltener verwendete Applikationsformen sind die Verabreichung über eine subkutan implantierte Pumpe¹¹¹ oder über einen intrathekalen Katheter²⁵.

Die Nervenläsion wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Wasserstrahldissektor gesetzt. Diese Methode kam bereits in mehreren tierexperimentellen Studien zur Schädigung von peripheren Nerven zum Einsatz^{63,127,146}. In der Literatur sind verschiedene Methoden zur direkten inkompletten Schädigung eines peripheren Nervens beschrieben. Eine Möglichkeit ist die direkte mechanische Kompression mittels einer Zange bzw. Klemme über eine definierte Zeitspanne^{86,92,158} oder auch die Schädigung durch eine forcierte Elongation des Nervs¹⁵¹. Das Ausmaß der Nervenschädigung dürfte hier schwerer zu kontrollieren sein als bei der Wasserstrahldissektion mit einem standardisierten Wasserdruck, weshalb auf diese Methode zurückgegriffen wurde. In einer Studie von Kaduk *et al.* wurde gezeigt, dass bei einer Wasserdruckstärke von 80 bar der N. ischiadicus der Ratte irreparabel geschädigt ist⁶³. Demgegenüber zeigte eine Studie von Tschan *et al.*, dass bei einer Wasserdruckstärke von 80 bar und einem Beobachtungszeitraum von 12 Wochen eine komplette funktionelle Regeneration zu verzeichnen ist¹⁴⁶.

Trotz der überzeugenden Ergebnisse hinsichtlich der neuroprotektiven und anti-apoptotischen Wirkung von G-CSF nach traumatischer Nervenläsion bestehen hinsichtlich der Methodik und beim Vergleich der Ergebnisse mit anderen zu diesem Thema publizierten Studien noch offene Fragen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

In dem recht kurzen Beobachtungszeitraum von maximal 14 Tagen zeigten die mit dem Sciatic Functional Index erhobenen Daten bezüglich der funktionellen Regeneration der Muskeln der unteren Extremität der Versuchstiere keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der G-CSF- und der Kontrollgruppe, jedoch einen positiven Trend für die Tiere mit G-CSF Behandlung. Tschan *et al.* führten 2010 eine Studie zur Nervenregeneration bei gleichem Schädigungsprinzip wie in dieser Studie, jedoch ohne Applikation eines Wachstumsfaktors durch. Hier zeigten sich bei einer Läsion mit 80 bar erst nach 12 Wochen signifikante Zeichen einer verbesserten Nervenregeneration¹⁴⁶. Hieraus könnte sich schließen lassen, dass auch nach dem in dieser Dissertation gewählten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen eine signifikante klinische Besserung eintreten kann. Da in der vorliegenden Arbeit histologisch eine geringere Apoptoserate und somit ein erhöhtes Überleben der α -Motoneurone bei G-CSF Behandlung nachgewiesen wurde, tritt möglicherweise, bei entsprechend längerem Beobachtungszeitraum, eine frühere klinische funktionelle Verbesserung unter G-CSF Gabe ein als ohne diese.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit zeigten Pan *et al.* 2009 im Mausmodell eine Besserung des durch Abklemmen des Nervens mittels einer Gefäßklemme für 20 min hervorgerufenen Nervenschadens unter G-CSF bereits nach 7 Tagen¹⁰⁵. Dies kann einerseits auf das andere Studiendesign, andererseits auf einen unterschiedlichen Schweregrad der Nervenläsion zurückzuführen sein.

Auch die Ergebnisse der Messung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit decken sich mit den Ergebnissen der klinisch sichtbaren motorischen Schädigung. Es zeigte sich in den im Beobachtungszeitraum von maximal 14 Tagen erhobenen Daten keine statistische Signifikanz, jedoch ein positiver Trend für die Gruppe mit G-CSF Behandlung.

Nicht zu vernachlässigen ist, dass es sich um ein biologisches Modell handelt, in welches viele Faktoren mit einfließen. Somit ist auch eine Reihe von Fehlerquellen denkbar. Beispielsweise zeigten die Ratten individuelle Laufgeschwindigkeiten, was einen Einfluss auf die Länge des Fußabdrucks und so den ermittelten SFI hat. Trotz verwendeter Wärmeplatte ist es schwer die Körpertemperatur im Bereich der Ableitung immer konstant zu halten, was die Ergebnisse der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit beeinflusst.

Im immunhistochemischen Teil dieser Arbeit wurden die Anzahl sowie die Apoptoserate der α -Motoneurone in den Rückenmarksegmenten L4 bis L6 untersucht. Diese Segmente repräsentieren den N. ischiadicus, der mittels des Wasserstrahls auf der rechten Seite der Tiere inkomplett geschädigt wurde. Ziel war es zu prüfen, ob die Gabe von G-CSF den Zelluntergang der α -Motoneurone nach der Schädigung verhindert. Des Weiteren wurde die Auswirkung von G-CSF auf die Expression des entsprechenden Rezeptors sowie auf die Apoptose untersucht.

Durch die immunhistochemische Detektion der ChAT-Expression als Marker für α -Motoneurone konnte gezeigt werden, dass sich G-CSF nach traumatischer peripherer Nervenläsion positiv auf die Anzahl der α -Motoneurone im Rückenmark auswirkt. Während bei der Kontrollgruppe auf der Rückenmarksseite des verletzten Nervs durchschnittlich 23% weniger α -Motoneurone vorhanden waren als auf der unverletzten Seite, fanden sich bei der Gruppe mit G-CSF-Behandlung auf der Seite der Schädigung im Schnitt nur 3% weniger α -Motoneurone als auf der unverletzten Seite. Somit konnte ein protektiver Effekt von G-CSF auf die α -Motoneurone im Rückenmark nach einer inkompletten traumatischen Nervenläsion nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit Ergebnissen anderer tierexperimenteller Studien. In einem ALS-Modell von Pitzer *et al.* wurde eine erhöhte Überlebensrate von α -Motoneuronen nach G-CSF-Behandlung gezeigt¹¹¹. Bei kultivierten α -Motoneuronen konnte G-CSF die Apoptose, welche durch Staurosporin induziert wurde, stark reduzieren¹¹¹. Da es bei der amyotrophen Lateralsklerose zu einem progressiven Verlust von α -Motoneuronen kommt, ist diese Studie für die Forschung an peripheren Nervenverletzungen besonders interessant. Nishio *et al.* konnten in einem Mausmodell zeigen, dass G-CSF einen therapeutischen Effekt auf eine mittels Kompression erzeugte Rückenmarksverletzungen hat. Hierbei lag eine signifikant erhöhte Anzahl an überlebenden Neuronen im verletzten Rückenmark vor⁹⁷. Des Weiteren wurde bei experimenteller Axotomie des N. ischiadicus sowohl das gesteigerte Überleben als auch das erhöhte Volumen von α -Motoneuronen nach G-CSF-Gabe nachgewiesen⁵².

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen gegen G-CSFR konnten die Ergebnisse der ChAT Färbung inhaltlich bestätigen. In der Kontrollgruppe zeigten sich durchschnittlich 30% weniger G-CSFR exprimierende α -Motoneurone auf der lädierten verglichen mit der unverletzten Seite. Durch eine Behandlung mit G-CSF

konnte der Verlust an Nervenzellen gesenkt werden. Der Unterschied von lädierter zu unverletzter Seite lag im Durchschnitt nur bei 2%. Die Frage, ob sich die Gabe von G-CSF positiv auf die G-CSFR-Expression von α -Motoneuronen auswirkt, ist somit zu bejahen. In einer Studie von Tanka *et al.* wurde gezeigt, dass bei ALS die Expression von G-CSFR in α -Motoneuronen verringert ist. Eine Herabregulierung des Rezeptors für G-CSF könnte somit bei der Krankheitsentstehung von ALS eine Rolle spielen. Ist die Konzentration von G-CSF im Rückenmark von ALS-Patienten erhöht, führt dies zu einer Neuroprotektion¹³⁸. Henriques *et al.* vermuteten, dass α -Motoneurone als Antwort auf eine Verletzung die Expression von G-CSFR hochregulieren. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich diese Hochregulierung durch die Gabe von G-CSF positiv beeinflussen lässt⁵².

Mittels der immunhistochemischen Färbungen gegen Bcl-2 konnte gezeigt werden, dass G-CSF die Expression des BCL-2-Gens auf Proteinebene steigert. In der Gruppe ohne G-CSF-Behandlung waren auf der geschädigten Seite im Schnitt 15% weniger BCL-2-exprimierende α -Motoneurone nachweisbar als auf der unverletzten Seite. Durch die Gabe von G-CSF waren auf der verletzten Seite nur noch durchschnittlich 4% weniger BCL-2-exprimierende α -Motoneurone vorhanden verglichen mit der Gegenseite. Somit ist die Frage, ob G-CSF die Anzahl der Bcl-2 positiven Nervenzellen positiv beeinflusst ebenfalls zu bejahen.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Resultate anderer Projekte. Die Applikation von G-CSF zeigte im Ischämie-Modell bei Ratten eine erhöhte BCL2- und verminderte Cytochrom-c-Expression im Zytosol der α -Motoneurone^{79,132,156}. Eine Überexpression von BCL-2 schützt Neurone vor Zelluntergang und Ischämien^{87,160}. Auch wurde in Studien gezeigt, dass Bcl-2 bei Abwesenheit von neuronalen Wachstumsfaktoren Nervenzellen vor der Apoptose schützt⁴¹.

In der vorliegenden Studie waren bei der Kontrollgruppe auf der verletzten Rückenmarksseite durchschnittlich 20% mehr Bax-positive α -Motoneurone als auf der intakten Seite zu erkennen. Die Gabe von G-CSF führte hingegen dazu, dass sich kein Unterschied in der Anzahl der BAX-exprimierenden α -Motoneurone auf beiden Seiten mehr zeigte. Die Frage, ob G-CSF die Anzahl der Bax positiven Nervenzellen herunterreguliert, ist damit ebenfalls zu bejahen. Somit ist anzunehmen, dass G-CSF die Transkription und Expression des pro-apoptotischen BAX in Neuronen herabsetzt und somit deren Apoptose vermindert. Bax induziert die Apoptose, indem es an die äußere Mitochondrienmembran bindet und die

Durchlässigkeit für Cytochrom c steigert, was zur Aktivierung von Caspasen führt^{22,40,80}. Bei zerebraler Ischämie kommt es in den Nervenzellen des Großhirns von Ratten zu einem Anstieg von Bax⁸². Die Resultate dieser Studie untermauern die Ergebnisse vorheriger Studien. So zeigten einige Studien bereits einen anti-apoptotischen sowie neuroprotektiven Effekt von G-CSF, gemessen durch eine verminderte BAX-Expression in den geschädigten Nervenzellen^{75,132,156}. Die Arbeitsgruppe Insenmann *et al.* zeigte eine inhibierende Wirkung von G-CSF auf die Apoptose von retinalen Ganglienzellen, indem die Expression von BAX und BCL-2 antagonistisch reguliert wird in Form einer verminderten BAX- und gesteigerten BCL-2-Expression⁶¹.

Durch Fluoreszenzfärbungen lassen sich mittels spezifischen Färbungen bestimmte Proteine und somit Strukturen in Zellen genau identifizieren und lokalisieren. Durch den hohen Kontrast der Fluoreszenzstoffe zum restlichen Gewebe ist es auch möglich, kleinste Strukturen darzustellen⁷⁷. Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung ist eine anschauliche Methode um die simultane Expression zweier Proteine nachweisen und differenzieren zu können, selbst wenn eines der Antigene nur schwach exprimiert wird¹⁰⁷. Die Möglichkeit der Durchführung von Kollokalisations- bzw. Koexpressionsstudien mittels Immunfluoreszenz-Färbungen wurde in dieser Dissertation genutzt um zu zeigen, dass es sich bei den angefärbten Zellen in den immunhistochemischen Färbungen gegen Bcl-2, Bax und G-CSFR um α -Motoneurone handelt und dass die untersuchten Gene gleichzeitig in α -Motoneuronen exprimiert werden. Auch Pitzer *et al.* machten sich diese Methode zunutze um in ihrem ALS Modell die Koexpression von ChAT und G-CSFR nachzuweisen¹¹¹.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden experimentellen Studie damit gezeigt werden, dass G-CSF zu einer verbesserten Neuroprotektion und einen verbesserten Erhalt von α -Motoneuronen nach Läsion des zugehörigen peripheren Nervs führt.

10. Ausblick

Die Ergebnisse der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit sowie der Lauftests zeigten über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit G-CSF behandelten Gruppe. Somit zeigte die Gabe von G-CSF klinisch keine funktionelle Besserung. Da jedoch schon am ersten Tag nach der Nervenverletzung histologisch eine geringere Apoptose und somit ein erhöhtes Überleben der α -Motoneurone nachgewiesen wurde, tritt möglicherweise eine klinische funktionelle Verbesserung erst nach einem längeren Beobachtungszeitraum ein. Hier könnten sich Folgeexperimente mit gleichem Versuchsaufbau und gegebenenfalls sensitiveren neurologischen Untersuchungen und mit einem längeren Beobachtungszeitraum anschließen, um möglicherweise auch eine klinische Bestätigung der in dieser Arbeit nachgewiesenen immunhistologischen Ergebnisse zu erhalten.

Da Nervenverletzungen häufig nicht direkt nach dem Ereignis der Läsion erkannt und entsprechend behandelt werden, wären Versuche mit einer verzögerten Gabe von G-CSF nach dem Setzen der Nervenläsion interessant. Hierbei könnte untersucht werden, inwieweit auch eine spätere Behandlung mit G-CSF eine Auswirkung auf die Apoptose zeigt.

11. Literaturangaben

1. Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2011) *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Auflage. Wiley, Weinheim
3. Allsopp TE, Wyatt S, Paterson HF, Davies AM (1993) The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73:295-307
4. Alon M, Rochkind S (2002) Pre-, intra-, and postoperative electrophysiologic analysis of the recovery of old injuries of the peripheral nerve and brachial plexus after microsurgical management. *J Reconstr Microsurg*. 18:77-82
5. Alrashdan MS, Sung MA, Kwon K, Shung HJ, Kim SJ, Lee JH (2011) Effects of combining electrical stimulation with BDNF gene transfer on the regeneration of crushed rat sciatic nerve. *Acta Neurochir*. 153:2021-2029
6. Amara B, deMedinaceli, Lane GB, Merle M (2000) Functional assessment of misdirected axon growth after nerve repair in the rat. *J Reconstr Microsurg* 16:563-567
7. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften: S 3 Leitlinie: Versorgung peripherer Nervenverletzungen, abgerufen am 14.08.2018 (https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/005-010l_S3_Versorgung_peripherer_Nervenverletzungen_2013-06-abgelaufen.pdf)
8. Aumüller G, Aust G, Doll A et al. (2010) *Anatomie*, 2. Auflage. Thieme, Stuttgart, Heidelberg, New York
9. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA (1988) Functional evaluation of complete sciatic peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 83:129-138
10. Baldo MP, Davel AP, Damas-Souza DM, Nicoletti-Carvalho JE, Bordin S, Carvalho HF, Rodrigues SL, Rossoni LV, Mill JG (2011) The antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor reduces infarct size and prevents heart failure development in rats. *Cell Physiol and Biochem* 28:33-40
11. Baptista AF, Gomes JR de S, Oliveira JT, Santos SMG, Vannier-Santos MA, Martinez AMB (2007) A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse-Adaptation of the sciatic static index. *J Neurosci Methods* 161:259-264
12. Belkas JS, Munro CA, Shoichet MS, Johnston M, Midha R (2005) Long-term in vivo biomechanical properties and biocompatibility of poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) nerve conduits. *Biomaterials* 26:1741-1749
13. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, Lilleby K, Longin K, Rowley S, Clarke E, Clift R, Hansen J, Shields T (1993) Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 81:3158-3163
14. Berger A, Hierner R (Hrsg.) (2002) *Plastische Chirurgie*, Band I, Springer, Luxemburg
15. Bischoff C, Dengler R, Hopf HC (2014) *EMG NLG: Elektromyografie - Nervenleitungsuntersuchungen*, 3. Auflage. Thieme, Stuttgart, Heidelberg, New York
16. Bodine DM, Seidel NE, Gale MS, Nienhuis AW, Orlic D (1994) Efficient retrovirus transduction of mouse pluripotent hematopoietic stem cells

- mobilized into the peripheral blood by treatment with granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor. *Blood* 84:1482-1491
17. Boenisch T (2003) „Handbuch Immunhistochemische. Färbemethoden“, 3. Auflage. DakoCytomation Corp., Carpinteria, CA, USA
 18. Broadwater MA, Liu W, Crews FT, Spear LP (2014) Persistent loss of hippocampal neurogenesis and increased cell death following adolescent, but not adult, chronic ethanol exposure. *Dev neurosci* 36:297-305
 19. Brown CJ, Evans PJ, Mackinnon SE, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, Hare G (1991) Inter- and intraobserver reliability of walking-track analysis used to assess sciatic nerve function in rats. *Microsurgery* 12:76-79
 20. Cao XQ, Arai H, Ren YR, Oizumi H, Zhang N, Seike S, Furuya T, Yasuda T, Mizuno Y, Mochizuki H (2006) Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor protects against MPTP-induced dopaminergic cell death in mice by altering Bcl-2/Bax expression levels. *J Neurochem* 99:861-867
 21. Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM, Juin P (2004) The first α helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins bid and PUMA. *Mol Cell* 16:807-818
 22. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, Letai A (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell* 9:351-365
 23. Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, Long GD, Negrin RS, Raimondi CM, Horning SJ, Brown SL, Miller L, Blume KG (1993) Granulocyte colony-stimulating factor “mobilized” peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 81:2031-2035
 24. Cheng EHY, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X L sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8:705-711
 25. Chen WF, Jean YH, Sung CS, Wu GJ, Huang SY, Ho JT, Su TM, Wen ZH (2008) Intrathecally injected granulocyte colony-stimulating factor produced neuroprotective effects in spinal cord ischemia via the mitogen-activated protein kinase and Akt pathways. *Neuroscience* 153:31-43
 26. Coban J, Dogan-Ekici I, Aydin AF, Betul-Kalaz E, Dogru-Abbasoglu S, Uysal M (2014) Blueberry treatment decreased D-galactose-induced oxidative stress and brain damage in rats. *Metabolic brain disease. Metab Brain Dis* 30:793-802
 27. Dagum AB (1998) Peripheral nerve regeneration, repair, and grafting. *J Hand Ther* 11:111-117
 28. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ (1982) An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 77:634-643
 29. Demetri GD, Griffin JD (1991) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78:2791-2808
 30. De Souza AS, De Silva CA, Del Bel EA (2004) Methodological evaluation to analyze functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurotrauma* 21:627-635
 31. Deutzmann R, Netzker R, Rassow, Hauser K (2012) *Duale Reihe Biochemie*. 3. Auflage. Springer, Luxemburg
 32. Devesa P, Gelabert M, González-Mosquera T, Gallego R, Relova JL, Devesa J, Arce VM (2012) Growth hormone treatment enhances the functional recovery of sciatic nerves after transection and repair. *Muscle Nerve* 45:385-392

33. Diederich K, Sevimli S, Dörr H, Kösters E, Hoppen M, Lewejohann L, Klocke R, Minnerup J, Knecht S, Nikol S, Sachser N, Schneider A, Gorji A, Sommer C, Schäbitz WR (2009) The role of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in the healthy brain: a characterization of G-CSF-deficient mice. *J Neurosci* 29:11572-11581
34. Divani AA, Hussain MS, Magal E, Heary RF, Qureshi AI (2007) The use of stem cells' hematopoietic stimulating factors therapy following spinal cord injury. *Ann Biomed Eng* 35:1647-1656
35. Dong F, Larner AC (2000) Activation of Akt kinase by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): evidence for the role of a tyrosine kinase activity distinct from the Janus kinases. *Blood* 95:1656-1662
36. Durdu S, Deniz GC, Balci D, Zaim C, Dogan A, Can A, Akcali KC, Akar AR (2012) Apoptotic vascular smooth muscle cell depletion via BCL2 family of proteins in human ascending aortic aneurysm and dissection. *Cardiovasc Ther* 30:308-316
37. Eser F, Aktekin LA, Bodur H, Atan C (2009) Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. *Neurol India* 57:434-437
38. Frank T, Schlachetzki JCM, Göricke B, Meuer K, Rohde G, Dietz GPH, Bähr M, Schneider A, Weishaupt JH (2009) Both systemic and local application of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is neuroprotective after retinal ganglion cell axotomy. *BMC Neurosci* 10:49
39. Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Pan CX, Seto Y, Nagata S (1991) Functional domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO J* 10:2855-2865
40. Galonek HL, Hardwick JM (2006) Upgrading the BCL-2 network. *Nat Cell Biol* 8:1317-1319
41. Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC (1992) Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 258:302-304
42. Gehlen W, Delank H-W (2010) *Neurologie*. 12. Auflage. Thieme, Heiderlberg, Stuttgart, New York
43. Gibson CL, Jones NC, Prior MJ, Bath PM, Murphy SP (2005) G-CSF suppresses edema formation and reduces interleukin-1 β expression after cerebral ischemia in mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:763-769
44. Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG (2003) Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 8:236-250
45. Görgen I, Hartung T, Leist M, Niehörster M, Tiegs G, Uhlig S, Weitzel F, Wendel A (1992) Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 149:918-924
46. Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, Houghton S, Layton JE, Boyd AW, McGrath KM, Maher D (1995) Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 86:4437-4445
47. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S (1979) The use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoenzymatic Techniques. *J Histochem and Cytochem* 27:1131-1139
48. Haastert-Talini K, Schmitte R, Korte N, Klode D, Ratzka A, Grothe C (2011) Electrical stimulation accelerates axonal and functional peripheral nerve regeneration across long gaps. *J Neurotrauma* 28:661-674

49. Haninec P (1986) Undulating course of nerve fibres and bands of Fontana in peripheral nerves of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 174:407-411
50. Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I (2005) G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat med* 11:305-311
51. Hartung T (1998) Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol* 5:221-225
52. Henriques A, Pitzer C, Dupuis L, Schneider A (2010) G-CSF protects motoneurons against axotomy-induced apoptotic death in neonatal mice. *BMC Neurosci* 11:25
53. Hickman CP, Roberts LS, Larson A, l'Anson H, Eisenhour DJ (2008) *Zoologie*. 13. Auflage. Pearson Studium, München
54. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-336
55. Horn F (2009) *Biochemie des Menschen*. 4. Auflage. Thieme, Stuttgart, Heidelberg, New York
56. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) Procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577-580
57. Huang HY, Lin SZ, Kuo JS, Chen WF, Wang MJ (2007) G-CSF protects dopaminergic neurons from 6-OHDA-induced toxicity via the ERK pathway. *Neurobiol Aging* 28:1258-1269
58. Huber A (2016) Antiapoptotische Wirkung von GCSF bei inkompletter Nervenläsion des Nervus ischiadicus der Ratte. Masterarbeit im Fachbereich Biologie Abteilung Humanbiologie und Humangenetik der Technischen Universität Kaiserslautern
59. Hunter MG, Avalos BR (1998) Phosphatidylinositol 3'-kinase and SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) are recruited by distinct positive and negative growth-regulatory domains in the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Immunol* 160:4979-4987
60. Imaizumi K, Benito A, Kiryu-Seo S, Gonzales V, Inohara N, Lieberman AP, Kiyama H, Nunez G (2004) Critical role for DP5/Harakiri, a Bcl-2 homology domain 3-only Bcl-2 family member, in axotomy-induced neuronal cell death. *J Neurosci* 24:3721-3725
61. Isenmann S, Wahl C, Krajewski S, Reed JC, Bähr M (1997) Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. *Eur J Neurosci* 9:1763-1772
62. Joppien S, Maier SL, Wendling D (2011) *Experimentelle Doktorarbeit*. 1. Auflage. Elsevier, München
63. Kaduk WM, Stengel B, Pöhl A, Nizze H, Gundlach KK (1999) Hydro-jet cutting: a method for selective surgical dissection of nerve tissue. An experimental study on the sciatic nerve of rats. *J Craniomaxillofac Surg* 27:327-330
64. Kemp SW, Webb AA, Dhaliwal S, Syed S, Walsh SK, Midha R (2011) Dose and duration of nerve growth factor (NGF) administration determine the extent of behavioral recovery following peripheral nerve injury in the rat. *Exp Neurol* 229:460-470
65. Kennedy JM, Zochodne DW (2005) Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst* 10:144-157

66. Kim BK, Ko IG, Kim SE, Kim CJ, Yoon JS, Baik HH, Jin BK, Lee CY, Back SB, Shin MS (2013) Impact of Several Types of Stresses on Short-term Memory and Apoptosis in the Hippocampus of Rats. *Int Neurorol J* 17:114-120
67. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH (2006) Hierarchical regulation of mito-chondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8:1348-1358
68. Knippers R (2006) *Molekulare Genetik*. 9. Auflage. Thieme, Stuttgart, Heidelberg, New York
69. Komine-Kobayashi M, Zhang N, Liu M, Tanaka R, Hara H, Osaka A, Mochizuki H, Mizuno Y, Urabe T (2006) Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J Cerebral Blood Flow Metab* 26:402-413
70. Kouyoumdjian JA (2006) Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle Nerve* 34:785-788
71. Kretschmer T, Antoniadis G, Braun V, Rath SA, Richter HP (2001) Evaluation of iatrogenic lesions in 722 surgically treated cases of peripheral nerve trauma. *J Neurosurg* 94:905-912
72. Lad SP, Nathan JK, Schubert RD, Boakye M (2010) Trends in median, ulnar, radial and brachiolexus nerve injuries in the United States. *Neurosurgery* 66:953-960:
73. Lanciego JL, Goede PH, Witter MP, Wouterlood FG (1997) Use of peroxidase substrate Vector VIP for multiple staining in light microscopy. *J Neurosci Methods* 74:1-7
74. Lang G (2013) *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2. Auflage. Springer, Luxemburg
75. Lan X, Qu H, Yao W, Zhang C (2008) Granulocyte-colony stimulating factor inhibits neuronal apoptosis in a rat model of diabetic cerebral ischemia. *Tohoku J Exp Med* 216:117-126
76. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2:183-192
77. Lichtscheidl IK (2012) *Lichtmikroskopie - Theorie und Anwendung* <http://www.univie.ac.at/mikroskopie/> (Zugriff 26.02.2017)
78. Lietz M, Dreesmann L, Hoss M, Oberhoffner S, Schlosshauer B (2006) Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types. *Biomaterials* 27:1425-1436
79. Li L, Klebe D, Doycheva D, McBride DW, Krafft PR, Flores J, Zhou C, Zhang JH, Tang J (2015) G-CSF ameliorates neuronal apoptosis through GSK-3beta inhibition in neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp Neurol* 263:141-149
80. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, et al. (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6:1389-1399
81. Liu F, Wu HY, Wesselschmidt R, Kornaga T, Link DC (1996) Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* 5:491-501
82. Liu G, Wang T, Wang T, Song J, Zhou Z (2013) Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. *Biomed Rep* 1:861-867
83. Li Y, Han F, Shi Y (2013) Increased neuronal apoptosis in medial prefrontal cortex is accompanied with changes of Bcl-2 and Bax in a rat model of post-traumatic stress disorder. *J Mol Neurosci* 51:127-137

84. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2014) Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage. Springer, Luxemburg
85. Lundborg G (2005) Nerve Injury and Repair: Regeneration, Reconstruction, and Cortical Remodeling. 2. Edition. Churchill Livingstone, London
86. Ma CH, Omura T, Cobos EJ, Latremoliere A, Ghasemlou N, Brenner GJ, van Veen E, Barrett L, Sawada T, Gao F, Coppola G, Gertler F, Costigan M, Geschwind D, Woolf CJ (2011) Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. *J Clin Invest* 121:4332-4347
87. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C, Huarte J (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13:1017-1030
88. Masuhr KF, Masuhr F, Neumann M (2013) Duale Reihe Neurologie. 7. Auflage. Thieme, Stuttgart, Heidelberg, New York
89. Matchett GA, Calinisan JB, Matchett GC, Martin RD, Zhang JH (2007) The effect of granulocyte-colony stimulating factor in global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1136:200-207
90. McGrath AM, Kingham PJ, Novikov LN, Wiberg M, Novikova LN (2012) Fibrin conduit supplemented with human mesenchymal stem cells and immunosuppressive treatment enhances regeneration after peripheral nerve injury. *Neurosci Lett* 516:171-176
91. Meuer K, Pitzer C, Teismann P, Krüger C, Göricke B, Laage R, Lingor P, Peters K, Schlachetzki JC, Kobayashi K, Dietz GP, Weber D, Ferger B, Schäbitz WR, Bach A, Schulz JB, Bähr M, Schneider A, Weishaupt JH (2006) Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 97:675-686
92. Morrison BM, Tsingalia A, Vidensky S, Lee Y, Jin L, Faraha MH, Lengacher S, Magistretti PJ, Pellerin L, Rothstein JD (2015) Deficiency in monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in mice delays regeneration of peripheral nerves following sciatic nerve crush. *Exp Neurol* 263:325-338
93. Morstyn G, Campbell L, Lieschke G, Layton JE, Maher D, O'Connor M, Green M, Sheridan W, Vincent M, Alton K, Souza L, McGrath K, Richard M, Fox (1989) Treatment of chemotherapy-induced neutropenia by subcutaneously administered granulocyte colony-stimulating factor with optimization of dose and duration of therapy. *J Clin Oncol* 7:1554-1562
94. Moskopp D, Wassmann (2014) Neurochirurgie - Handbuch für die Weiterbildung und interdisziplinäres Nachschlagewerk. 2. Auflage. Schattauer, Stuttgart
95. Naito T, Goto K, Morioka S, Matsuba Y, Akema T, Sugiura T, Ohira Y, Beppu M, Yoshioka T (2009) Administration of granulocyte colony-stimulating factor facilitates the regenerative process of injured mice skeletal muscle via the activation of Akt/GSK3 α signals. *Eur J Appl Physiol* 105:643-651
96. Neidhart J, Mangalik A, Kohler W, Stidley C, Saiki J, Duncan P, Souza L, Downing M (1989) Granulocyte colony-stimulating factor stimulates recovery of granulocytes in patients receiving dose-intensive chemotherapy without bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 7:1685-1692
97. Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okada S, Okawa A, Moriya H, Yamazaki M (2007) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:724-731

98. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R (1998) Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* 45:116-122
99. Oertel J, Gaab MR, Knapp A, Essig H, Warzok R, Piek J (2003) Water jet dissection in neurosurgery: experimental results in the porcine cadaveric brain. *Neurosurgery* 52:153-159
100. Oertel J, Gaab MR, Piek J (2003) Waterjet resection of brain metastases - first clinical results with 10 patients. *Eur J Surg Oncol* 29:407-414
101. Oertel J, Gaab MR, Pillich DT, Schroeder HW, Warzok R, Piek J (2004) Comparison of waterjet dissection and ultrasonic aspiration: an in vivo study in the rabbit brain. *J Neurosurg* 100:498-504
102. Oertel J, Gaab MR, Runge U, Schroeder HW, Piek J (2005) Waterjet dissection versus ultrasonic aspiration in epilepsy surgery. *Neurosurgery* 56:142-146
103. Oertel J, Gaab MR, Warzok R, Piek J (2003) Waterjet dissection in the brain: review of the experimental and clinical data with special reference to meningioma surgery. *Neurosurg Rev* 26:168-174:
104. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619
105. Pan HC, Wu HT, Cheng FC, Chen CH, Sheu ML, Chen CJ (2009) Potentiation of angiogenesis and regeneration by G-CSF after sciatic nerve crush injury. *Biochem Biophys Res Commu* 382:177-182
106. Paxinos G (1986) The rat nervous system. Volume 2. Academic Press Inc, Cambridge, MA, USA
107. Peters JH, Baumgarten H (1990) Molekulare Antikörper: Herstellung und Charakterisierung. 2. Auflage. Springer, Luxemburg
108. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1644:83-94
109. Pillai K, Pourgholami MH, Chua TC, Morris DL (2013) Does the expression of BCL2 have prognostic significance in malignant peritoneal mesothelioma? *Am J Cancer Res* 3:312-322
110. Pitzer C, Klussmann S, Krüger C, Letellier E, Plaas C, Dittgen T, Kirsch F, Stieltjes B, Weber D, Laage R, Martin-Villalba A, Schneider A (2010) The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury. *J Neurochem* 113:930-942
111. Pitzer C, Krüger C, Plaas C, Kirsch F, Dittgen T, Müller R, Laage R, Kastner S, Suess S, Spoelgen R, Henriques A, Ehrenreich H, Schäbitz WR, Bach A, Schneider A (2008) Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131:3335-3347
112. Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J (2007) Cell Biology: Das Original Mit Übersetzungshilfen. Spektrum, Akad. Verlag, Elsevier, Oxford
113. Robinson LR (2000) Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve* 23:863-873
114. Rochkind S, Alon M (2000) Microsurgical management of old injuries of the peripheral nerve and brachial plexus. *J Reconstr Microsurg* 16:541-546
115. Rosberg HE, Carlsson KS, Hojgard S et al. (2005) Injury to the human median and ulnar nerves in the forearm - analysis of costs for treatment and rehabilitation of 69 patients in southern Sweden. *J Hand Surg Br* 35-39
116. Schäbitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Schölzke MN, Sommer C, Schwab S (2003) Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke* 34:745-751

117. Schäbitz WR, Krüger C, Pitzer C, Weber D, Laage R, Gassler N, Aronowski J, Mier W, Kirsch F, Dittgen T, Bach A, Sommer C, Schneider A (2008) A neuroprotective function for the hematopoietic protein granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *J Cereb Blood Flow Metab* 28:29-43
118. Schäbitz WR, Schneider A (2007) New targets for established proteins: exploring G-CSF for the treatment of stroke. *Trends Pharmacol Sci* 28:157-161
119. Schäbitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S (2000) Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke* 31:2212-2217
120. Schiaveto de Souza A, da Silva CA, Del Bel EA (2004) Methodological evaluation to analyze functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurotrauma* 21:627-635
121. Schmitz N, Linch D C, Dreger P, Goldstone A H, Boogaerts M A, Ferrant A, Demuynck H M S, Link H, Zander A, Barge A, Borkett K (1996) Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 347:353-357
122. Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schäbitz WR (2005) The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest* 115:2083-2098
123. Schneider A, Kuhn HG, Schäbitz WR (2005) A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle* 4:1753-1757
124. Schulz JB, Bremen D, Reed JC, Lommatzsch J, Takayama S, Wüllner, Löschmann PA, Klockgether T, Weller M (1997) Cooperative interception of neuronal apoptosis by BCL-2 and BAG-1 expression: prevention of caspase activation and reduced production of reactive oxygen species. *J Neurochem* 69:2075-2086
125. Seddon H.J. (1942) A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J.* 2: 237-239
126. Sehara Y, Hayashi T, Deguchi K, Zhang H, Tsuchiya A, Yamashita T, Lukic V, Nagai M, Kamiya T, Abe K (2007) Potentiation of neurogenesis and angiogenesis by G-CSF after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1151:142-149
127. Shekarriz B, Upadhyay J, Jewett MA (2004) Nerve-sparing retroperitoneal lymphadenectomy using hydro-jet dissection: initial experience. *J Endourol* 18:273-276
128. Shenaq JM, Shenaq SM, Spira M (1989) Reliability of sciatic function index in assessing nerve regeneration across a 1cm gap. *Microsurgery* 10:214-219
129. Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, McGrath KM, Morstyn G, Fox RM (1992) Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet* 339:640-644
130. Sheridan WP, Morstyn G, Wolf M, Dodds A, Lusk J, Maher D, Layton JE, Green MD, Souza L, Fox RM (1989) Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 2:891-895
131. Solaroglu I, Cahill J, Jadhav V, Zhang JH (2006) A novel neuroprotectant granulocyte colony stimulating factor. *Stroke* 37:1123-1128

132. Solaroglu I, Tsubokawa T, Cahill J, Zhang JH (2006) Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience* 143:965-974
133. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Ioculano M, Ammedolia L, Arlotta M, Saitta A, Caputi AP (1997) The effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor on vascular dysfunction and splanchnic ischaemia-reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 120:333-339
134. 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
135. Strasser A. (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5:189-200
136. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103:645-654
137. Takada SH, dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, Takase LF, Cruz-Rizzolo RJ, Kihara AH, Xavier GF, Watanabe IS, Nogueira MI (2015) Neonatal anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience* 284:247-259
138. Tanaka M, Kikuchi H, Ishizu T, Minohara M, Osoegawa M, Motomura K, Tateishi T, Ohyagi Y, Kira J (2006) Intrathecal upregulation of granulocyte colony stimulating factor and its neuroprotective actions on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:816-825
139. Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T (2008) The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil* 87:381-385
140. Tierney TS, Moore DR (1997) Naturally occurring neuron death during postnatal development of the gerbil ventral cochlear nucleus begins at the onset of hearing. *J Comp Neurol* 387:421-429
141. Tierney TS, Russell FA, Moore DR (1997) Susceptibility of developing cochlear nucleus neurons to deafferentation-induced death abruptly ends just before the onset of hearing. *J Com Neurol* 378:295-306
142. Tillett RL, Afoke A, Hall SM, Brown RA, Phillips JB (2004) Investigating mechanical behaviour at a core-sheath interface in peripheral nerve. *J Peripher Nerv Syst* 9:255-262
143. Tsai KJ, Tsai YC, Shen CK (2007) G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease. *J Exp Med* 204:1273-1280
144. Tsai RK, Chang CH, Sheu MM, Huang ZL (2010) Anti-apoptotic effects of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on retinal ganglion cells after optic nerve crush are PI3K/AKT-dependent. *Exp Eye Res* 90:537-545
145. Tsai RK, Chang CH, Wang HZ (2008) Neuroprotective effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in neurodegeneration after optic nerve crush in rats. *Exp Eye Res* 87:242-250
146. Tschan CA, Keiner D, Müller HD, Schwabe K, Gaab MR, Krauss JK, Sommer C, Oertel J (2010) Waterjet dissection of peripheral nerves: an experimental study of the sciatic nerve of rats. *Neurosurgery* 67:368-376
147. Uzun N, Tanriverdi T, Savrun FK, Kiziltan ME, Sahin R, Hanimoglu H, Hanci M (2006) Traumatic peripheral nerve injuries: demographic and electrophysiological findings of 802 patients from a developing country. *J Clin Neuromuscul Dis* 7:97-103
148. Vector Laboratories (2005) A Guide to Multiple Antigen Labeling, abgerufen am 14.08.2018 (<https://vectorlabs.com/media/docs/brochures/MLB.pdf>)

149. Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X (2000) Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 5:191-208
150. Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15:2922-2933
151. Wang Y, Ma M, Tang Q, Zhu L, Koleini M, Zou D (2015) The effects of different tensile Parameters for the neurodynamic mobilization technique on tricipital muscle wet weight and MuRf-1 expression in rabbits with sciatic nerve injury. *J Neuroeng Rehabil* 12:38
152. Wee AS, Truitt NR, Smith LD (2006) Type and frequency of peripheral nerve injuries encountered in a clinical neurophysiology laboratory. *J Miss State Med Assoc* 47:67-71
153. Welch MB, Brummett CM, Welch TD, Tremper KK, Shanks AM, Guglani P, Mashour GA (2009) Perioperative peripheral nerve injuries: a retrospective study of 380,680 cases during a 10-year period at a single institution. *Anesthesiology* 111:490-497
154. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. 2011 Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* 1813:521-531
155. Wilson DB (2014) Validation is a dish oft served cold. *Blood* 123:3688-3690
156. Yata K, Matchett GA, Tsubokawa T, Tang J, Kanamaru K, Zhang JH (2007) Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res* 1145:227-238
157. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369:321-323
158. Yuan W, Feng X (2016) Immune cell distribution and immunoglobulin levels change following sciatic nerve injury in a rat model. *Iran J Basic Med Sci* 19:794-799
159. Zhao LR, Navalitloha Y, Singhal S, Mehta J, Kessler J A, Piao CS, Guo WP, Groothuis DR (2007) Hematopoietic growth factors pass through the brain-blood barrier in intact rats. *Exp Neurol* 204:569-573
157. Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, Bredesen DE. (1993) bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4533-4537
161. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15:1481-1486

12. Anhang

12.1 Ablauf der immunhistochemischen Färbungen

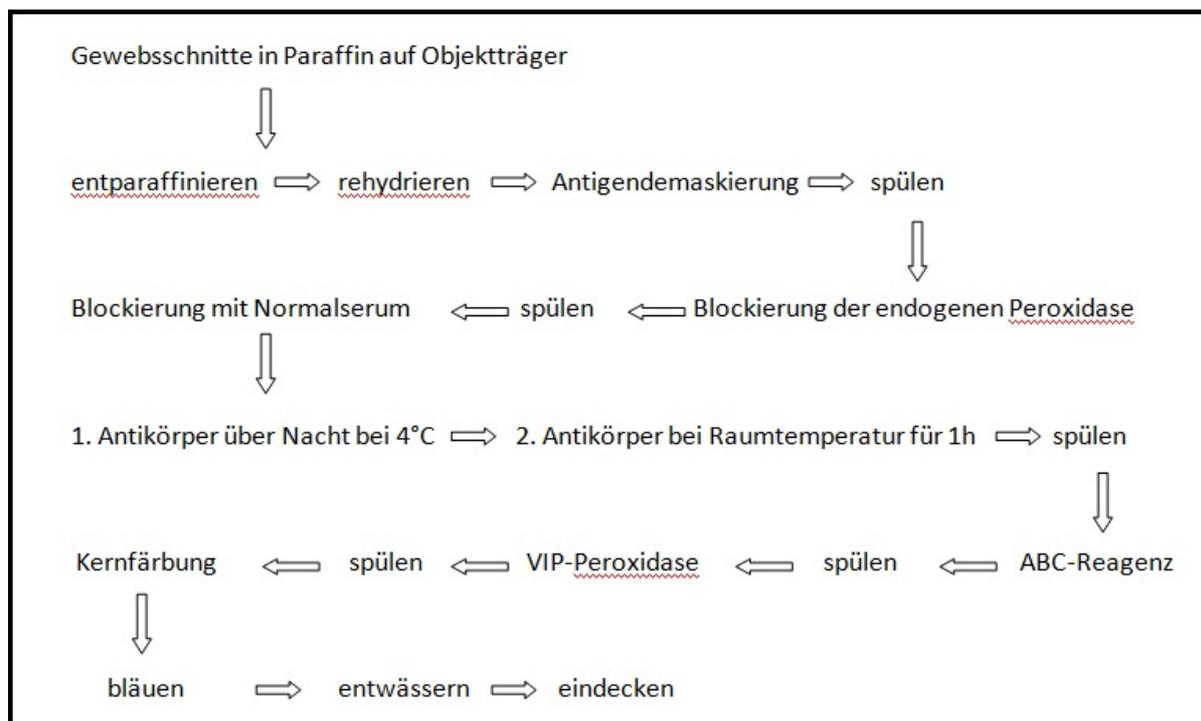


Abbildung 12-1 Ablauf der immunchemischen Färbemethode

Zunächst wurden die Rückenmarkschnitte entparaffiniert und rehydriert (Abb 7-11). Hierzu war es erforderlich diese zunächst senkrecht für 30 min bei 60 °C in einen Wärmeschrank zu stellen. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in Xylol und dann für jeweils 3 min in eine absteigende Ethanolreihe mit 100% Ethanol, 96% Ethanol und 70% Ethanol gelegt und danach mit destilliertem Wasser abgespült.

Durch die Fixierung in Formalin und die Einbettung in Paraffin kann es zu Konformationsänderungen des Epitops kommen, sodass eine Bindung des spezifischen Antikörpers nicht mehr effizient erfolgen kann⁶². Um die ursprüngliche Konformation wiederherzustellen (Antigendemaskierung), wurden die Schnitte für 20 min in eine Küvette mit 200 ml Citratpuffer, der sich in einem zuvor aufgeheizten Dampfgerar befand, gegeben. Im Anschluss mussten die Schnitte, sich weiterhin im Citratpuffer befindend, für 20 min abkühlen^{20,91,109,110,116,119,144,145}. Um Rückstände vorheriger Schritte zu entfernen erfolgte ein zweimaliges Spülen für je 5 min in Tris-Puffer.

Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation der Schnitte für 20 min in 99 ml Methanol, welchem 1 ml 0.3%iges H₂O₂ zugefügt war, was der Blockierung der endogenen Peroxidase diente. Diese Blockierung ist erforderlich, da in Zellen, vor allem in Hämproteinen, natürlicherweise endogene Peroxidasen vorkommen. Diese wären in der Lage den Farbstoff, der am Ende der Färbung hinzugefügt wird, umzusetzen, was falsch positive Ergebnisse bzw. eine starke Hintergrundfärbung verursachen könnte. Somit war gewährleistet, dass der Farbstoff nur durch extern zugefügte Peroxidase umgesetzt wurde^{26,36,69,109,109,144,145}.

Danach wurden die Schnitte erneut zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gespült, vorsichtig abgetrocknet und mit einem Pap-Pen umfahren. Der um die Rückenmarkschnitte entstandene Kreis diente als Flüssigkeitsbarriere, so dass für die Antikörperfärbung nur eine geringe Menge der jeweils zum Einsatz kommenden Substanzen benötigt wurde.

Ein Austrocknen und somit eine Veränderung der Epitope ließ sich vermeiden, indem die Objektträger in eine mit Aqua dest. gefüllte feuchte Kammer gelegt wurden. Da auch spezifische Antikörper zum Teil andere Proteine der Präparate unspezifisch binden, wurden diese unspezifischen Bindungsstellen gesättigt⁶². Hierzu folgte eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Normalserum (10 µl + 200 µl Tris + 1 Tropfen Avidin für 4 Schnitte). Das Normalserum stammt jeweils von der gleichen Tierspezies wie der Sekundärantikörper. Da in der vorliegenden Studie Antikörper aus Ziege und Kaninchen zum Einsatz kamen, wurde sowohl goat-Normalserum^{20,26,83,116,137} also auch rabbit-Normalserum verwendet. Durch diesen Schritt können ein falsch positives Ergebnis oder eine starke Hintergrundfärbung verhindert werden.

Nach der Inkubationszeit musste das Normalserum ablaufen und der jeweilige Primärantikörper (1 µl AK + 200 µl Tris + 1 Tropfen Biotin für 4 Schnitte), der das nachzuweisende Antigen spezifisch bindet, aufgetragen werden. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert^{20,33,75,83,116,144,145}.

Tabelle 9: Primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller	Verdünnung	Inkubation
anti-Choline Acetyltransferase AB144P polyclonal IgG	goat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:200 1:500 (Fluoreszenz)	ON bei 4 °C
anti-Bcl-2 (N-19): sc-492 polyclonal IgG	rabbit	Santa Cruz ^{10,26,36} Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	1:200 1:500 (Fluoreszenz)	ON bei 4 °C
anti-Bax (N-20): sc-493 polyclonal IgG	rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	1:200 1:500 (Fluoreszenz)	ON bei 4 °C
anti-G-CSFR (M-20): sc-694 polyclonal IgG	rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	1:200 1:500 (Fluoreszenz)	ON bei 4 °C

Die verwendeten Primärantikörper sind polyklonal, was bedeutet, dass sie verschiedene Klonalitäten haben und sich somit gegen verschiedene Epitope des gleichen Antigens richten (Tab. 9).

Um alle Primärantikörper, die nicht an ein Antigen gebunden haben zu entfernen, wurden die Schnitte am Tag darauf zunächst zweimal für je 5 min in Tris-Puffer gespült. Nun erfolgte die Inkubation des jeweiligen sekundären Antikörpers (1 µl AK + 200 µl^{18,66,91} Tris + 10 µl Normalserum für 4 Schnitte) für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Inkubation
rabbit-anti-goat (IgG) highly cross-adsorbed	ABC-Kit goat IgG Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA	1:200	60 min bei RT
goat-anti-rabbit (IgG) highly cross-adsorbed	ABC-Kit rabbit IgG Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA	1:200	60 min bei RT
Fluorescein (FITC) conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, Fc Fragment Specific	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.; dianova, Hamburg	1:100	60 min bei RT
Rhodamine (TRITC)- conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG, Fc Fragment Specific	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.; dianova, Hamburg	1:100	60 min bei RT

Um überschüssige bzw. ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen wurde im Anschluss zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gespült (Tab. 10).

Es folgte eine Inkubation mit dem 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz für 20 min bei Raumtemperatur (100 µl Tris + 1 µl Reagenz A + 1 µl Reagenz B für 2 Schnitte).

Der ABC-Komplex ist ein löslicher Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase^{56,74}. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß isoliertes tetrameres Glykoprotein, dessen vier Untereinheiten eine extrem hohe Affinität zu dem wasserlöslichen Vitamin Biotin zeigen. Der Komplex ist so konfiguriert, dass freie Bindungsstellen des Avidins den biotinylierten Sekundärantikörper binden⁵⁶.

Um ABC-Komplexe, die nicht an einen Sekundärantikörper gebunden haben, abzuwaschen wurden die Schnitte zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gespült.

Nun erfolgte die Markierung mit VIP Enzym-Substrat für 20 min bei Raumtemperatur (1,7 ml Tris + je 1 Tropfen von Reagenz 1-4), was als violetter Farbumschlag im Zytoplasma der Neurone erkennbar ist, welcher histologisch ausgewertet werden kann⁷³.

Anschließend wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gespült, bevor eine Kernfärbung mit Hämatoxilin (Roth) für 2 min folgte. Die Schnitte wurden nach der Kernfärbung für 5-10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und anschließend noch einmal kurz in Aqua dest. gespült.

Nach der Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils für je 1 min in 70%, 96% und zweimal in 100% Ethanol und im Anschluss zweimal für je 2 min in Xylol (Fischar) entwässert. Danach wurden sie eingedeckt. Hierzu kam ein Tropfen Histokit (Roth) pro Schnitt zum Einsatz und die Schnitte wurden mit einem Deckglas befestigt und eine Nacht an der Luft getrocknet.

Das Mitführen einer Negativkontrolle bei jedem Färbedurchgang war obligat, um die Färbung zu validieren.

12.2. Ablauf der Immunfluoreszenz Färbung

Bis zum Aufbringen des Primärantikörpers erfolgte die Färbung wie bei den zuvor beschriebenen Einzelfärbungen. Je Schnitt wurden 50 µl des ersten Primärantikörpers in einer 1:500-Verdünnung (1 µl AK + 500 µl Tris für 4 Schnitte) aufgetragen. Die Schnitte wurden auch hier über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Um alle Primärantikörper, die nicht an ein Antigen gebunden haben zu entfernen, wurden die Schnitte am Tag darauf zunächst drei Mal für je 10 min in Tris-Puffer gespült. Nun erfolgte die Inkubation des ersten Sekundärantikörpers in einer 1:100-Verdünnung (1 µl AK + 100 µl Tris + 10 µl Normalserum für 4 Schnitte) für 1 Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur. Ab diesem Zeitpunkt mussten auch alle weiteren Schritte abgedunkelt durchgeführt werden. Um überflüssige Sekundärantikörper zu entfernen wurde im Anschluss einmal für 10 min mit Tris-Puffer gespült. Nach Abtrocknen der Objektträger folgte eine Inkubation mit dem zweiten Normalserum bei Raumtemperatur (10 µl + 200 µl Tris) für 40 min. Darauffolgend wurde das Normalserum entfernt und je Schnitt 50 µl des zweiten Primärantikörper in einer 1:500-Verdünnung (1 µl AK + 500 µl Tris für 4 Schnitte), aufgetragen. Die Inkubation der Schnitte fand auch hier über Nacht bei 4 C in der feuchten Kammer statt. Am dritten Tag der Färbung wurden die Schnitte

zunächst drei Mal für je 10 min in Tris-Puffer gespült und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem zweiten Sekundärantikörper in einer 1:100-Verdünnung inkubiert (1 μ l AK + 100 μ l Tris + 10 μ l Normalserum). Nach Spülung mit Aqua dest. erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils für je 1 min in 70%, 96% und zweimal in 100% Ethanol. Abschließend fand eine Lufttrocknung von einer halben Stunde statt und anschließend die Eindeckung mit DAPI Mounting Medium (Vectashield) zur Färbung der Kerne.

12.3. Verdünnung und Zusammensetzung der Lösungen

Tris-Puffer:

Die Stammlösung wurde 0,5 molar angesetzt. Es wurden 63,5 g Tris-Säure und 11,8 g Tris-Base in einem Liter destilliertem Wasser gelöst. Zur Herstellung der Gebrauchslösung (0,05 molar) wurden 100 ml Stammlösung mit 15 g NaCl gemischt und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Zur späteren Verdünnung der Antikörper wurde ein Becherglas dieser Lösung abgefüllt und beiseitegestellt. Der restliche Teil der Lösung wurde mit 1 ml Tween20 versetzt und als Spül-Puffer verwendet (im Kapitel 3.2.1 als Tris-Puffer bezeichnet).

Citrat-Puffer:

Für die 0,1 molare Stammlösung wurden 29,4 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 900 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Anschließend wurde die Stammlösung auf 1 Liter aufgefüllt und die 0,01 molare Gebrauchslösung mit 1:10 destilliertem Wasser verdünnt.

13. Publikationen

1.

Mündlicher Vortrag von Dr. med Dörthe Keiner beim 2017 AANS Annual Scientific Meeting, Los Angeles Convention Center, Los Angeles, 22.-26.04.2017

Titel "Anti-Apoptotic effect of G-CSF on spinal alpha-motoneurons after traumatic nerve lesion"

AANS/CNS Section of Disorders of the Spine and peripheral nerves - periperal nerve section, 26.04.2017

2.

Mündlicher Vortrag von Dr. med Dörthe Keiner bei der 68. DGNC Jahrestagung 2017, Magdeburg, 13.-15.05.2017

Titel "G - CSF seems to have an anti - apoptotic effect on spinal alpha motoneurons after traumatic nerve lesion"

3.

Keiner D, Kuehn JP, Huber A, Oertel J (2018) "Anti-Apoptotic impact of granulocyte-colony stimulating factor after peripheral nerve trauma"

submitted in World Neurosurg

Förderung

Das Projekt wurde durch die Universität des Saarlandes Forschung und Technologietransfer im Rahmen der Anschubfinanzierung von Forschungsprojekten im HH-Jahr 2014 gefördert (Fonds T6031800-05)

Weitere Publikationen:

Bochen F, Balensiefer B, Körner S, Bittenbring JT, Neumann F, Koch A, Bumm K, Marx A, Wemmert S, Zuschlag D, Kühn JP, Schick B, Linxweiler M (2018) Vitamin D

deficiency in head and neck cancer patients – prevalence, prognostic value and impact on immune function.

Oncotarget, ahead of print; doi: 10.1080/2162402X.2018.1476817

Linxweiler M, Kühn JP, Wagner M, Schick B (2018) Reduction of postoperative pain after tonsillectomy by a local mucosal flap – a prospective, randomized, controlled clinical trial on 100 patients.

Acta Otolaryngol, ahead of print

Linxweiler M, Kühn JP, Wagner M, Al Kadah B, Schick B (2018) Influence of a local mucosal flap on the postoperative rehabilitation in tonsillectomy patients.

Laryngorhinootol 97, doi: 10.1055/s-0038-1639911

14. Danksagung

Mein großer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Joachim Oertel für die Überlassung dieses Themas sowie die wissenschaftliche Unterstützung und fachliche Beratung dieser Arbeit.

Der größte Dank gebührt Frau Dr. med. Dörthe Keiner, der Betreuerin meiner Promotion. Danke für die kontinuierliche und engagierte Begleitung meiner Doktorarbeit, die sich durch eine gute Zusammenarbeit, große Hilfsbereitschaft, unzählige Anregungen mit stets konstruktiver Kritik ausdrückte, was maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Leiterin des Neurochirurgischen Forschungslabors, Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat, für die schnelle Vermittlung, die motivierende und umfangreiche Unterstützung in allen Bereichen dieser Doktorarbeit bedanken.

Den Mitarbeiterinnen des Neurochirurgischen Forschungslabors, Frau Sonja Hoffmann, Frau Sigrid Welsch und Frau Marion Schwarz danke ich für die zielführende Zusammenarbeit bei den immunhistochemischen Experimenten.

Ein weiterer Dank geht an Alexandra Huber für die positive Kooperation im histologischen Teil dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich in meinen Bestrebungen jederzeit wohlwollend unterstützt und mir das humanmedizinische Studium sowie diese Dissertation ermöglichte.

15. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.