

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Klinik für Neurochirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

Das neuroregenerative Potenzial des rekombinanten Granulozyten-stimulierenden Faktors nach partieller Läsion des Nervus vestibulocochlearis – eine tierexperimentelle Studie an der Ratte

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von: Sarah Alkilani
geb. am: 05.01.1993 in Tripolis

Für meine Eltern

Tag der Promotion: 17. Juni 2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

Prof. Dr. med. Alessandro Bozzato

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
ZUSAMMENFASSUNG.....	7
Abstract	8
1.1 Der Nervus vestibulocochlearis	9
1.2 Ätiologie der Schädigung des N. vestibularis	11
1.2.1 Neuritis vestibularis	11
1.2.2 Labyrinthitis mit Abszessbildung im Kleinhirnbrückenwinkel	11
1.2.3 Wallenberg-Syndrom.....	11
1.2.4 Vestibularisparoxysmie	11
1.2.5 Tumoren des Kleinhirnbrückenwinkels	12
1.2.6 Iatrogene Schädigung bei Operationen.....	13
1.3 Diagnostik der Vestibularisschädigung.....	13
1.4 Therapie der Vestibularisschädigung	13
1.5 Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)	14
1.6 Ziel der Arbeit	16
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Zusammenfassung des Studiendesigns	17
2.2 Material	17
2.2.1 Wasserstrahl-Modell.....	17
2.2.2 Versuchstiere	19
2.2.3 Materialliste für den operativen Teil	19
2.2.4 Materialliste für den histologischen und immunhistologischen Teil	20
2.3 Gruppeneinteilung	22
2.4 Anästhesie der Versuchstiere	23
2.5 Die Operation.....	23
2.6 Form der G-CSF-Applikation.....	25
2.7 Frühe akustisch evozierte Potenziale (FAEPs)	25
2.8 Euthanisierung der Tiere.....	26
2.9 Aufarbeitung der histologischen Schnitte	26

2.10	Histologie und Immunhistochemie	27
2.10.1	Kresyl-Violett(-Nissl) -Färbung	28
2.10.2	Bcl-2, Bax und G-CSF-R, Caspase-3.....	28
2.11	Histologische Auswertung	29
2.12	Immunhistochemische Auswertung	30
2.13	Statistische Analyse	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Die Wirkung des G-CSF auf die Neuronenzahl im Ncl. cochlearis:.....	32
3.2	Frühe akustisch evozierte Potenziale.....	34
4	DISKUSSION.....	46
4.1	Diskussion der Methodik.....	46
4.1.1	Warum G-CSF?	46
4.1.2	Applikationsform.....	47
4.1.3	Dosierung.....	47
4.1.4	Die vorherige G-CSF-Gabe (Pre-Dosis).....	48
4.1.5	Versuchstiere	49
4.1.6	Die Kraniektomie.....	49
4.1.7	Die Nervenläsion.....	49
4.1.8	Objektive Messung der Funktion des Nervs.....	50
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	53
4.2.1	Diskussion der elektrophysiologischen Ergebnisse.....	53
4.2.2	Diskussion der histologischen Ergebnisse	53
4.3	Kritische Begutachtung der eigenen Untersuchungen	55
4.4	Schlussfolgerung	55
4.5	Ausblick	55
5	LITERATURVERZEICHNIS	57
6	LEBENS LAUF	70
	Publikation	71

Danksagung72

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- (A.)	Arterie
- (PICA)	Arterie cerebelli inferior posterior
- (AICA)	Arterie cerebelli anterior inferior
- (AK)	Antikörper
- (BDNF)	Brain-derived neurotrophic factor
- (dB)	Dezibel
- (FAEPs)	Frühe akustisch evozierten Potenziale
- (G-CSF)	Granulocyten-Colonie-Stimulierenden- Faktor
- (G-CSF-R)	Granulocyten-Colonie-Stimulierenden- Faktor-Rezeptor
- (BERA)	Hirnstammaudiometrie
- (KG)	Körpergewicht
- (NGF)	Nerve growth factor
- (N.)	Nervus
- (Ncl.)	Nucleus
- (NaCl)	Natriumchlorid
- (μ V)	Mikrovolt
- (Bcl-2)	Anti-apoptotische Protein B-Cell Lymphoma-2
- (Bax)	Pro-apoptotischen Proteins Bcl-2 associated x Protein

ZUSAMMENFASSUNG

Verletzungen des achten Hirnnervs während Operationen am Kleinhirnbrückenwinkel sind häufig. Der Granulocyten-Colonie-Stimulierenden-Faktor (G-CSF) ist eine der Substanzen, die einen neuroprotektiven Effekt besitzen. In den letzten Jahren gewann es sehr an Bedeutung, allerdings ist seine Rolle in Bezug auf den N. vestibulocochlearis noch nicht gut erforscht.

Ziel dieser Studie ist, den neuroprotektiven und antiapoptotischen Effekt des G-CSF nach partieller Schädigung des Nervus vestibulocochlearis zu untersuchen.

Hierzu wurden insgesamt 35 Sprague-Dawley-Ratten suboccipital kraniotomiert und eine Schädigung des rechtsseitigen achten Hirnnervs mit dem Wasserstrahldissektor verursacht. Den Ratten wurden subcutan 30 µg/kg Körpergewicht (KG) G-CSF bzw. Natriumchlorid (NaCl) in den ersten sechs postoperativen Tagen injiziert, 14 davon erhielten eine zusätzliche Dosis am Tag vor der Operation (präoperativ).

Um die Schädigung und im Verlauf auch die Regeneration des Nervs beurteilen zu können, wurden früh akustisch evozierte Potenziale (FAEPs) erhoben. Die Messung wurde direkt prä- und postoperativ sowie direkt vor Euthanasierung der Tiere (Tag 7 bzw. 14) durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte eine histologische sowie immunhistologische Aufarbeitung der Nucleus (Ncl.) cochlearis mittels Paraffin-Schnitten.

Die elektrophysiologische Untersuchung zeigte einen signifikanten Anstieg der zweiten Amplitude sieben Tage nach der Operation in den behandelten Gruppen, wonach sich ein abrupter Abfall direkt postoperativ ergab. Die histologischen Ergebnisse zur Bestimmung der Zellzahl im ncl. Cochlearis nach Trauma sowie G-CSF-Gabe zeigen eine verminderte Anzahl an Neuronen in den Kontrollgruppen ($p < 0,05$).

Die immunhistologische Untersuchung der indirekten Apoptose Marker zeigte, dass das anti-apoptotische Protein B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2) unter der G-CSF-Therapie überexprimiert wurde, wohingegen eine Unterexpression des pro-apoptotischen Proteins Bcl-2 associated x Protein (Bax) festzustellen war. Es wurde auch gezeigt, dass die externe Verabreichung von G-CSF die Expression von Caspase-3 unterdrückt. Des Weiteren konnte eine Expression des G-CSF-Rezeptors (G-CSF-R) unter externer G-CSF-Applikation im Cochlea-Kern beobachtet werden ($p < 0,05$).

Insgesamt zeigte die externe G-CSF Applikation einen neuroprotektiven und anti-apoptotischen Effekt auf den geschädigten N. vestibulocochlearis. Folglich sind klinische Studien indiziert, um den neuroprotektiven Effekt des G-CSF in Vivo nachzuweisen.

Abstract

Injuries to the eighth cranial nerve during surgeries at the cerebellopontine angle (CPA) are common. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is one of the substances possessing a neuroprotective effect. In recent years, it has gained significant importance, although its role in relation to the vestibulocochlear nerve is not well studied. The aim of this study is to investigate the neuroprotective and anti-apoptotic effect of G-CSF after partial damage to the vestibulocochlear nerve. A total of 35 Male Sprague Dawley rats underwent suboccipital craniotomy and received a right-sided eighth cranial nerve injury using a water jet dissector. Rats were subcutaneously injected with 30 µg/kg body weight (BW) of G-CSF or sodium chloride (NaCl) for the first six postoperative days, with an additional dose administered to 14 of them the day before surgery (preoperatively). To assess nerve damage and subsequent regeneration, early auditory-evoked potentials were recorded directly pre- and postoperatively, as well as before euthanizing the animals (day 7 and 14). Additionally, histological and immunohistological analysis of the cochlear nucleus (Ncl.) was performed using paraffin sections. Electrophysiological examination revealed a significant increase in the second amplitude seven days after surgery in the treated groups, followed by an abrupt decrease immediately postoperatively. Histological results regarding cell count in the cochlear nucleus after trauma and G-CSF administration showed a reduced number of neurons in the control groups ($p < 0.05$). Immunohistological examination of indirect apoptotic markers indicated that the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) was overexpressed under G-CSF therapy, while an underexpression of the pro-apoptotic protein Bcl-2 associated x protein (Bax) was observed. It was also demonstrated that external administration of G-CSF suppressed the expression of Caspase-3. Furthermore, expression of the G-CSF receptor (G-CSF-R) was observed in the cochlear nucleus under external G-CSF application ($p < 0.05$). Overall, external G-CSF application exhibited a neuroprotective and anti-apoptotic effect on the injured vestibulocochlear nerve. Hence, clinical studies are warranted to demonstrate the neuroprotective effect of G-CSF in vivo.

Einleitung

1.1 Der Nervus vestibulocochlearis

Der Nervus (N.) vestibulocochlearis ist der achte Hirnnerv, welcher im Kleinhirnbrückenwinkel verläuft. Er besteht aus zwei Teilen: dem N. cochlearis und dem N. vestibularis. Die vestibulären und die cochleären Fasern entspringen ihren jeweiligen Kernen im Hirnstamm. Diese sind:

- Nuclei vestibulares superior, medius und inferior: Weitervermittlung zum Vestibularorgan,
- Nuclei vestibulares laterales: aus den Purkinje-Zellen des Kleinhirns;
- Nuclei cochleares anterior und posterior: zum Hörapparat [1].

Im Verlauf ragen die Fasern der Nerven am Unterrand der Pons kaudolateral des N. facialis aus dem Hirnstamm heraus. Umgeben von einer gemeinsamen Bindegewebshülle, ziehen sie als N. vestibulocochleares durch den Meatus acusticus internus und trennen sich im Verlauf wieder als Radix vestibularis und Radix cochlearis zum Vestibularorgan bzw. zur Cochlea. Der N. vestibulocochlearis ist hauptsächlich für das Hören und das Gleichgewicht zuständig [2]. Er besteht im Wesentlichen aus afferenten sensorischen Nervenfasern, die Informationen aus der Cochlea und dem Vestibularorgan erhalten. Die efferenten Fasern ziehen zum Thalamus, ins Kleinhirn, zu den Kernen der Augenmuskeln sowie ins Rückenmark und spielen eine Rolle beim okulären Reflex.

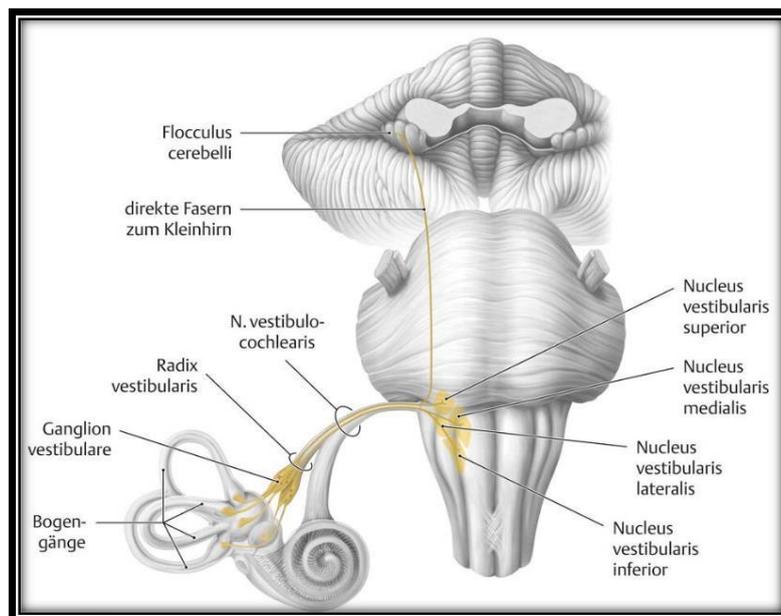


Abb. 1: Darstellung des Verlaufs des Nervus vestibulocochlearis [3].

Eine Schädigung dieses Nervs äußert sich klinisch durch Schwindel, Gleichgewichtsstörungen, eine Beeinträchtigung des Hörvermögens und sogar einen möglichen Hörverlust. Eine Funktionsstörung des N. vestibulocochlearis kann durch ein Schädel-Hirn-Trauma, eine Nervenentzündung sowie einen Tumor (z. B. Vestibularisschwannom) bedingt sein oder auch iatrogen verursacht werden, etwa bei Operationen am Kleinhirnbrückenwinkel. Dabei stellen verschiedene Krankheitsbilder eine Indikation zur Operation am Kleinhirnbrückenwinkel dar. Zu diesen Krankheitsbildern zählen unter anderem Epidermoide, Meningeome, Schwannome des N. facialis, Lipome, Metastasen sowie ossäre Hämangiome [4,5]. Postoperativ sind entsprechende Ausfälle des N. vestibulocochlearis möglich, welche für die Betroffenen eine enorme Beeinträchtigung darstellen. Zusätzlich kann durch die benachbarte Lage zum N. facialis eine Fazialisparese auftreten.

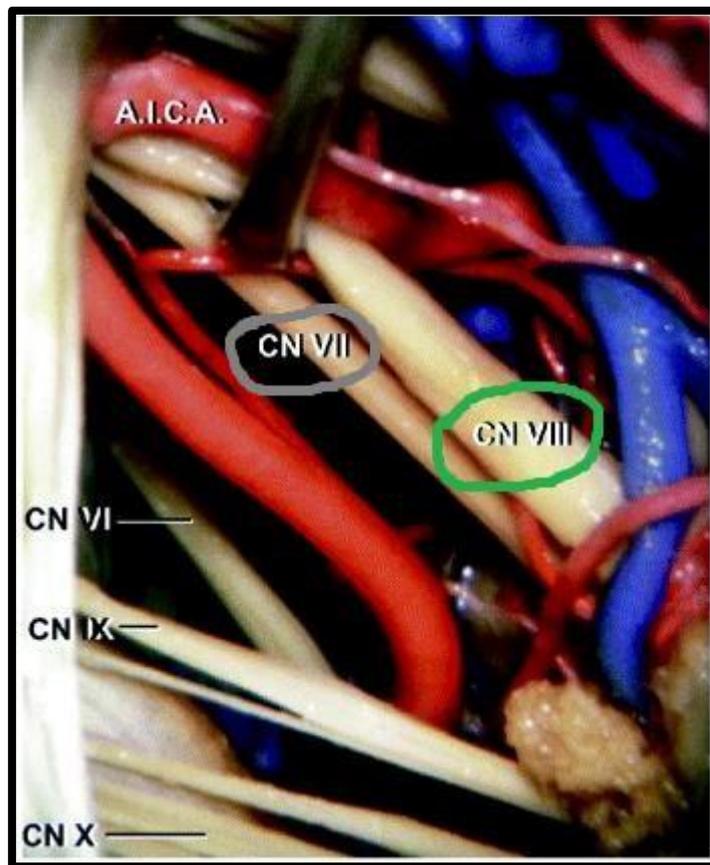


Abb. 2: Zeigt die topographische Lage von N. vestibularis (grün umkreist) und N. facialis (grau umkreist) im Kleinhirnbrückenwinkel [6]. Legende: AICA: Arteria cerebelli inferior anterior CN VI: sechster Hirnnerv (N. abducens), CN IX: neunter Hirnnerv (N. glossopharyngeus), CN X: zehnter Hirnnerv (N. vagus).

1.2 Ätiologie der Schädigung des N. vestibularis

1.2.1 Neuritis vestibularis

Bei der Neuritis vestibularis handelt es sich um eine Entzündung des Vestibularisasts des N. vestibulocochlearis. Diese äußert sich in starken Schwindelanfällen sowie Übelkeit und Erbrechen. Ursachen können Mikrozirkulationsstörungen des Vestibularorgans oder eine Virusinfektion sein [7].

1.2.2 Labyrinthitis mit Abszessbildung im Kleinhirnbrückenwinkel

Diese bezeichnet eine Entzündung des Innenohres mit resultierender Verminderung des Hörvermögens. Verantwortlich hierfür sind verschiedene Erreger. So kann eine durch Pneumo- und Meningokokken ausgelöste Meningitis zu Labyrinthitis führen, ebenso eine Lues, die beispielsweise mit einer Meningitis einhergeht oder auch Borrelien [5,8]. Zudem können Mumps und Masernviren eine Labyrinthitis verursachen [5]. In der Weiterentwicklung kann eine eitrige Labyrinthitis entstehen, welche sich zum inneren Gehörgang ausbreitet, und eine Beeinträchtigung des Hörens bewirkt; zusätzlich kann im fortgeschrittenen Stadium eine Meningitis auftreten [9].

1.2.3 Wallenberg-Syndrom

Das Wallenberg-Syndrom wurde klinisch erstmals durch den Neurologen Adolf Wallenberg 1895 beschrieben. 1901 erfolgte die Sicherung der Ätiologie durch einen Autopsie-Befund [10–12]. Hierbei verschließen sich die A. cerebelli inferior posterior (PICA) oder die A. vertebralis. Dies führt zu Infarkten in dem entsprechenden Versorgungsgebiet und somit zur Beeinträchtigung der dortigen Hirnnervenkerne. Bei Beteiligung der Regionen des Nucleus (Ncl.) vestibularis lateralis und des Ncl. vestibularis inferior kann es zu Schwindel kommen [13].

1.2.4 Vestibularisparoxysmie

Ursache dieser seltenen Erkrankung ist analog zu der Trigeminusneuralgie ein Gefäß-Nerven-Kontakt im Kleinhirnbrückenwinkel. Es handelt sich dabei um eine Kompression des vestibulären Anteils des N. vestibulocochlearis durch ein pulsierendes arteriosklerotisch verändertes Gefäß. Meist ist dies die A. cerebelli anterior inferior (AICA) (70 %), in 10 % der Fälle die A. vertebralis, selten auch die A. cerebelli inferior posterior (PICA) (5 %) oder ein venöses Gefäß (10 %) [14]. Leitsymptome sind sekundenlange Drehschwindelattacken und Hörminderungen [5].

1.2.5 Tumoren des Kleinhirnbrückenwinkels

Das Vestibularisschwannom macht zwischen 80 und 90% der Tumoren im Kleinhirnbrückenwinkel aus und ist somit die häufigste Tumorentität in diesem Bereich. Meist tritt ein Vestibularisschwannom zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auf [15–23]. Der Tumor beginnt in den Schwann-Zellen des vestibulären Anteils des N. vestibulocochlearis und kann bis zum Kleinhirnbrückenwinkel wachsen, verbunden mit einer Ausbreitung in das Innere des Gehörgangs (Meatus acusticus internus). Dies führt zur Kompression der dort verlaufenden Nerven, des N. vestibulocochlearis sowie nachfolgend auch des N. trigeminus und des N. facialis. Klinisch äußert sich dies in Gleichgewichtsstörungen, Schwindel, Tinnitus und Hörverlust (Hypoakusis in 95 % der Fälle) [24,25]. Wie erwähnt, kann es im Spätstadium auch zu einer zusätzlichen Kompression des N. facialis und des N. trigeminus mit resultierender Fazialisparese sowie Hypästhesie im Versorgungsgebiet des N. trigeminus kommen. Tritt eine Schwerhörigkeit bilateral auf (5 % der Fälle), kann dies auf das Vorliegen einer Neurofibromatose Typ II hinweisen [26]. Bildmorphologisch stellt sich das Vestibularisschwannom in der T2-Sequenz als hyperintense Raumforderung im Kleinhirnbrückenwinkel umgeben von hyperintensem Liquor dar (s. Abb. 3) [27].

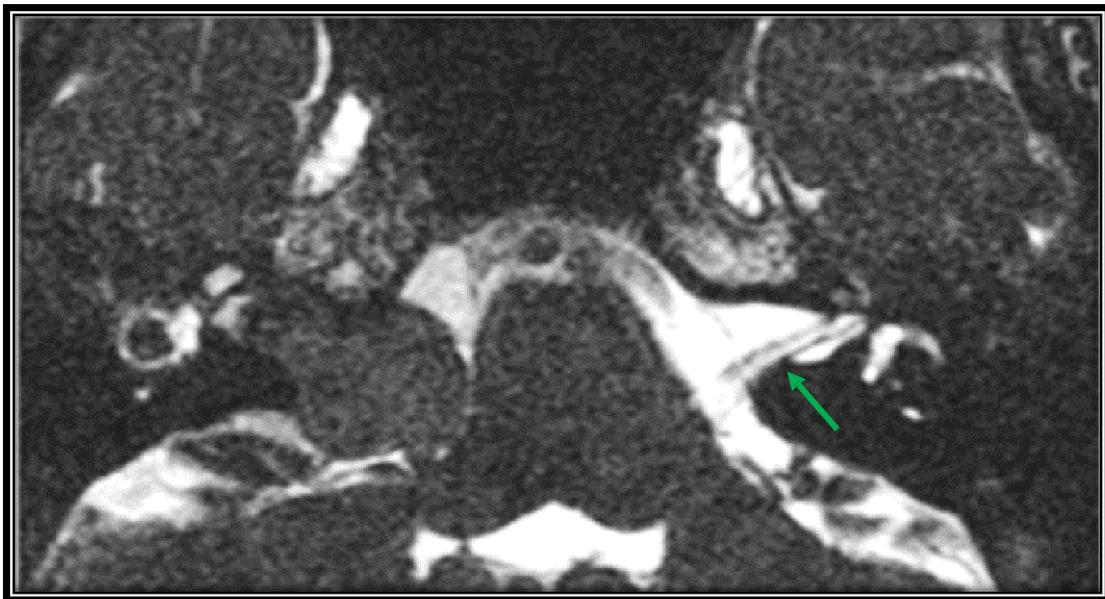


Abb. 3: Magnetresonanztomographie-Bildgebung des Kraniums in der T2-Sequenz. Das Bild zeigt eine Raumforderung (roter Stern) vom Kleinhirnbrückenwinkel, ausgehend vom N. vestibulocochlearis. Dunkelblauer Pfeil: N. vestibulocochlearis der Gegenseite (physiologisch).

Meningeome stehen mit einer Häufigkeit von 10 % an zweiter Stelle der Tumoren im Kleinhirnbrückenwinkel [2,18]. Sie sind raumfordernde Prozesse, die von der Arachnoidea

ausgehen. Das Haupterkrankungsalter liegt im 5. Lebensjahrzehnt. Die Erkrankung verläuft initial aufgrund des langsamen Wachstums meist symptomlos. Im weiteren Prozess kann es zur Beeinträchtigung der dort verlaufenden Nerven (Hirnnerven V, VII und VIII) mit den entsprechenden Funktionsausfällen kommen. In der bildgebenden Diagnostik stellt sich der Tumor mit runder und scharf begrenzter Struktur dar [28,29].

1.2.6 Iatrogene Schädigung bei Operationen

Komplikationen bei Operationen im Kleinhirnbrückenwinkel können iatrogene Schädigungen der dort verlaufenden Nerven mit entsprechender Funktionsstörung sein; zum Beispiel Hörminderung und sogar Hörverlust oder eine Fazialisparese. Eine Erhaltung des Hörvermögens nach Eingriffen im Kleinhirnbrückenwinkel ist nur in 54 bis 77 % der Fälle möglich. Dies ist von der Größe der operierten Läsion abhängig [30–32]. Allerdings bleibt das Hörvermögen selbst nach erfolgreicher gehörerhaltender Operation oft eingeschränkt [33–35].

1.3 Diagnostik der Vestibularisschädigung

Um eine Schädigung der Hörfunktion und die entsprechende Ursache festzustellen, kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz. Man unterscheidet zwischen subjektiven und objektiven Verfahren. Zu den subjektiven Verfahren gehören der Stimmgabeltest, die Sprachaudiometrie und die Tonschwellenaudiometrie. Otoakustische Emissionen und Hirnstammaudiometrie gehören hingegen zu den objektiven Hörtestverfahren. Diese Untersuchungsverfahren werden auch intraoperativ bei Operationen am Kleinhirnbrückenwinkel eingesetzt, um das Risiko einer iatrogenen Schädigung des N. vestibulocochlearis zu minimieren. Den Patienten werden über Kopfhörer repetitiv akustische Signale vermittelt. Über eine enzephalographische Ableitung mittels Elektroden an der Kopfhaut werden diese Potenziale erfasst und mithilfe einer Computeranalyse ausgewertet. Anhand dieses Untersuchungsverfahrens können Erkrankungen der Hörbahn erkannt werden. Zusätzlich werden bildgebende Verfahren wie Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) des Schädels eingesetzt, um festzustellen, ob ein raumfordernder Tumor oder eine Entzündung die Ursache für die eingeschränkte Funktion des N. vestibulocochlearis ist.

1.4 Therapie der Vestibularisschädigung

Je nach Entität gibt es verschiedene Therapiemöglichkeiten: So besteht die Therapie bei der Neuritis vestibularis aus symptomlindernden Maßnahmen mit Antiemetika sowie Antihistaminika und einer Kortikosteroid-Stoßtherapie[36]. Bei einer Labyrinthitis richtet sich die Therapie nach dem verursachenden Erreger in Form von Antibiotika bzw. Virostatika. Bei einer fortgeschrittenen Labyrinthitis mit Knocheneinschmelzung kann eine Mastoidektomie erforderlich werden. Solch ein Eingriff kann mit einem Hörverlust verbunden sein. Das

Wallenberg-Syndrom kann nach heutigem Wissensstand nur symptomatisch behandelt werden. Seit neustem ist allerdings auch eine endovaskuläre Rekanalisation möglich [37]. Eine Vestibularisparoxysmie wird konservativ mit Carbamazepin behandelt. Allerdings wird bei einem Versagen der medikamentösen Therapie die Dekompression des Nervs angestrebt [38]. Zur Behandlung von Tumoren im Kleinhirnbrückenwinkel ist die chirurgische Resektion die Therapie der Wahl. Alternativ zu der operativen Maßnahme kann die Strahlentherapie zum Einsatz kommen. Diese wird bei inoperablen oder nur teilresezierbaren Tumoren angewendet [39]. Bei einem langsamen Wachstum kann mit regelmäßigen Verlaufskontrollen zunächst abwartend vorgegangen werden. Als Standardtherapie gilt aber die Resektion. Die Mehrheit der Patienten (75 %) kann radikal operiert werden [31]. Bei einer iatrogen bedingten Schädigung der Funktion des N. vestibulocochlearis mit postoperativ verschlechterter Neurologie im Vergleich zum präoperativen Zustand existiert bis heute keine spezifische Therapieoption. Es ist daher von immenser Wichtigkeit, nach spezifischen neuroprotektiven Therapeutika zu suchen, welche das Outcome bei Operationen am Kleinhirnbrückenwinkel insbesondere nach iatrogenen Schädigung begünstigen. In jüngster Zeit rückte der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor im Bereich der Neuroprotektivität in den Fokus von potenziellen therapeutischen Anwendungen. Insbesondere die bereits seit langem etablierte Anwendung im Sektor der Onkologie einerseits als auch andererseits das Potenzial, die Blut-Hirn-Schranke zu penetrieren, lassen einen Einsatz auch als Neuroprotektivum im Bereich des Möglichen erscheinen [40].

1.5 Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)

Der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor ist ein endogener Wachstumsfaktor. Das glykosylierte Peptidhormon besteht aus 174 Aminosäuren und besitzt eine Molekulargröße von 19,6 kDa [40–43]. Die Glykosylierung des Peptids spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung und der Stimulierung der neutrophilen Granulozyten. Der G-CSF dient der Stimulierung und Proliferation unreifer Vorläuferzellen der hämatopoetischen Zellreihe, genauer der Bildung der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark [41,42,44]. Klinisch findet der G-CSF bei der Behandlung der durch Chemotherapie induzierten Neutropenie Anwendung [42,45–47]. Zu den häufigsten Nebenwirkungen des Medikaments gehören Knochen- und Muskelschmerzen, gastrointestinale Beschwerden und Haarausfall [48,49]. Interessanterweise konnte man im Verlauf der Jahre feststellen, dass sowohl der G-CSF als auch dessen Ligand im Zentralnervensystem exprimiert werden [50]. Dies führte zu der Annahme, dass der G-CSF auch bei der Proliferation der Neurone eine wichtige Rolle spielen muss. Eine Erklärung hierfür ist die Fähigkeit des G-CSF, die Blut-Hirn-Schranke zu penetrieren [51,52]. 2002 konnte erstmals die neuronale G-CSF-Wirkung studiert werden. So untersuchte die Arbeitsgruppe um Schäbitz den endogenen G-CSF-Einfluss auf den

Hippocampus am G-CSF-defizienten Mausmodell und kam dabei zu dem Ergebnis, dass G-CSF-defiziente Mäuse einen schlechteren Lernprozess, eine Verringerung der Gedächtnisleistung sowie eine schlechtere Entwicklung der Motorik gegenüber der Kontrollgruppe aufweisen. Die Forschenden beobachteten, dass die G-CSF-Defizienz die dendritische Dichte verringert, welche mit Lernen und Gedächtnis zusammenhängt [53]. Die neuroprotektive und anti-apoptotische Wirkung von G-CSF wurde bereits sowohl in tierexperimentellen als auch in klinischen Studien untersucht und nachgewiesen. In einem Parkinson-Modell bei Mäusen konnte festgestellt werden, dass der G-CSF positiv auf die Regeneration der dopaminergen Neurone wirkt [54–57]. Auch in einem Alzheimer-Modell an Ratten konnte gezeigt werden, dass die G-CSF-Applikation die Gedächtnisleistung steigert [58,58–65]. Ferner erwies sich der G-CSF in Ischämie-Modellen ebenfalls als ein potenzielles Medikament für die Behandlung von ischämischen Insulten [66–72]. In einem neonatalen Hypoxie-Ischämie-Modell an Ratten reduzierte der G-CSF das Infarktvolumen, indem er den Anstieg der Bax/Bcl-2-Ratio verhinderte und somit die Apoptose unterdrückte [73]. Zusätzlich konnte 2005 die Arbeitsgruppe Gibson et al. in einem Ischämie-Modell eine signifikante Reduktion des geschädigten Volumens unter G-CSF-Applikation 48 Stunden nach Kompression der A. cerebri media nachweisen [74]. Des Weiteren konnten in einer klinisch randomisierten Studie bei ischämischem und hämorrhagischem Schlaganfall die Effektivität und der klinische Nutzen des G-CSF bestätigt werden. Zudem wurde beobachtet, dass sich der Barthel-Index der Schlaganfallpatienten unter G-CSF verbesserte [75]. Darüber hinaus übte der G-CSF in vielen Modellen der Spinalmarkverletzungen einen günstigen Einfluss auf die Neurogenese und die motorische Leistung aus [76–78]. Er inhibierte den NF- κ B-Signalweg und wirkte somit protektiv auf den Erhalt der neuronalen Strukturen [53,79]. In klinischen Studien solcher Modelle konnte der neuroprotektive Effekt von G-CSF auf die spinalen Neurone und eine damit einhergehende Verbesserung der Motorik bestätigt werden. Demnach übte der G-CSF einen positiven Effekt auf das Überleben der Alpha-Motoneurone bei Amyotropher Lateralsklerose (ALS) aus [80]. So konnten bei 76 ALS-Patienten eine Erhöhung des G-CSF-Spiegels im Serum und eine Verbesserung der Lebensqualität unter G-CSF-Applikation beobachtet werden [81]. Ebenso wurde eine neuroprotektive Wirkung von G-CSF auf die kranialen Hirnnerven nachgewiesen. Es konnte belegt werden, dass der G-CSF auf die Regeneration des Nervus opticus einen positiven Einfluss ausübt [82]. Dies wurde in einem ischämischen Opticus-Neuropathie-Modell an Ratten geprüft. Daraus konnte geschlossen werden, dass der G-CSF zum einen neuroprotektiv auf die optischen Ganglienzellen wirkt [82]. Zum anderen ist eine möglichst frühe G-CSF-Gabe nach dem Trauma günstiger als eine spätere Gabe. Was bislang fehlt, ist die umfassende Erforschung der Wirkung von G-CSF auf den N. vestibulocochlearis. Hier setzt die vorliegende Arbeit an.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das neuroregenerative Potenzial des rekombinanten Granulozyten-stimulierenden Faktors (G-CSF) nach partieller Läsion des Nervus vestibulocochlearis im Rattenmodell zu erforschen. Insbesondere wird untersucht, welche neuroprotektiven und anti-apoptotischen Effekte G-CSF nach einer Teil-Schädigung des Nervs entfaltet. Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen, grundlegende Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob und in welchem Umfang G-CSF als therapeutischer Ansatz bei Nervenschädigungen des vestibulocochleären Systems eingesetzt werden könnte.

Die wissenschaftlichen Fragestellungen lassen sich wie folgt formulieren:

1. Welchen Nutzen zeigt die kontinuierliche Applikation von G-CSF auf die Neuroprotektion nach partieller Schädigung des N. vestibulocochlearis?
2. Welchen Einfluss übt die kontinuierliche Applikation von G-CSF auf die Apoptose-Marker Bcl-2, Bax, und Caspase-3 aus?
3. Welchen Einfluss übt die externe G-CSF-Gabe auf die Expression seines Rezeptors (G-CSF-R) im Ncl. cochlearis aus?

Die gewonnenen Forschungsergebnisse sollen eine Grundlage dafür schaffen, um die klinische Relevanz und das therapeutische Potenzial von G-CSF zu bewerten. Ziel ist es, zu klären, ob die positiven Effekte, die im Tiermodell beobachtet wurden, auf den Menschen übertragbar sind und somit klinische Studien gerechtfertigt sind.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zusammenfassung des Studiendesigns

Mit Hilfe eines Wasserstrahldissektors soll eine Teilläsion des N. vestibulocochlearis in der Ratte erreicht werden. In einem solchen Modell können anschließend neuroprotektive Substanzen und Faktoren untersucht werden. Von besonderer Bedeutung ist hier die Herbeiführung einer Teilläsion des Nervs, um so eine Regeneration und apoptotische Prozesse nachweisen zu können. Der große Vorteil des Wasserstrahls liegt in der ausschließlich partiellen Schädigung des Nervs, da im Falle eines komplett durchtrennten Nervs nicht von dessen Erholung auszugehen ist [83]. In diversen Versuchsgruppen erfolgt entsprechend des jeweiligen Gruppenmodells die Applikation von G-CSF. Zur Beurteilung des Effekts und der Erholung des Nervs wird direkt vor und nach der Schädigung eine Erhebung von früh akustisch evozierten Potenzialen vorgenommen. Zusätzlich findet post mortem eine immunhistologische Untersuchung statt. Es folgt eine detaillierte Auflistung der Arbeitsschritte sowie die Gliederung der Gruppen.

2.2 Material

2.2.1 Wasserstrahl-Modell

Mit Hilfe des Wasserstrahldissektors (Erbejet 2, Erbe) kann eine Nervenschädigung durchgeführt werden. Abhängig von der eingestellten Druckstärke wird eine komplette oder eine inkomplette Läsion des Nervs verursacht. In einer früheren Studie von Oertel et al. konnte festgestellt werden, dass eine Druckstärke von 8 bar zu einer Teilläsion des Nervs führt[84]. Eine höhere Druckstärke würde eine komplette Läsion zur Folge haben (s. Abb. 4). Grundsätzlich setzt sich dieses Gerät zusammen aus einem Regler für die Intensität des Wasserausstoßes, einer wechselbaren Wasserpumpe, einem Element zur Umleitung des Wasserstrahls nach außen und einer Fußsteuerung für die Kontrolle des Wasserflusses (s. Abb. 5). Die Befüllung der Wasserpumpe mit einer NaCl-Infusionslösung erfolgt einfach durch Drücken einer Taste. Die konkrete Schädigung des Nervs wird durch Heranführen des Handstücks auf etwa 1 cm an die geschädigten Nervenstrukturen über einen Zeitraum von einer Sekunde bewirkt, im vorliegenden Fall des N. vestibulocochlearis.

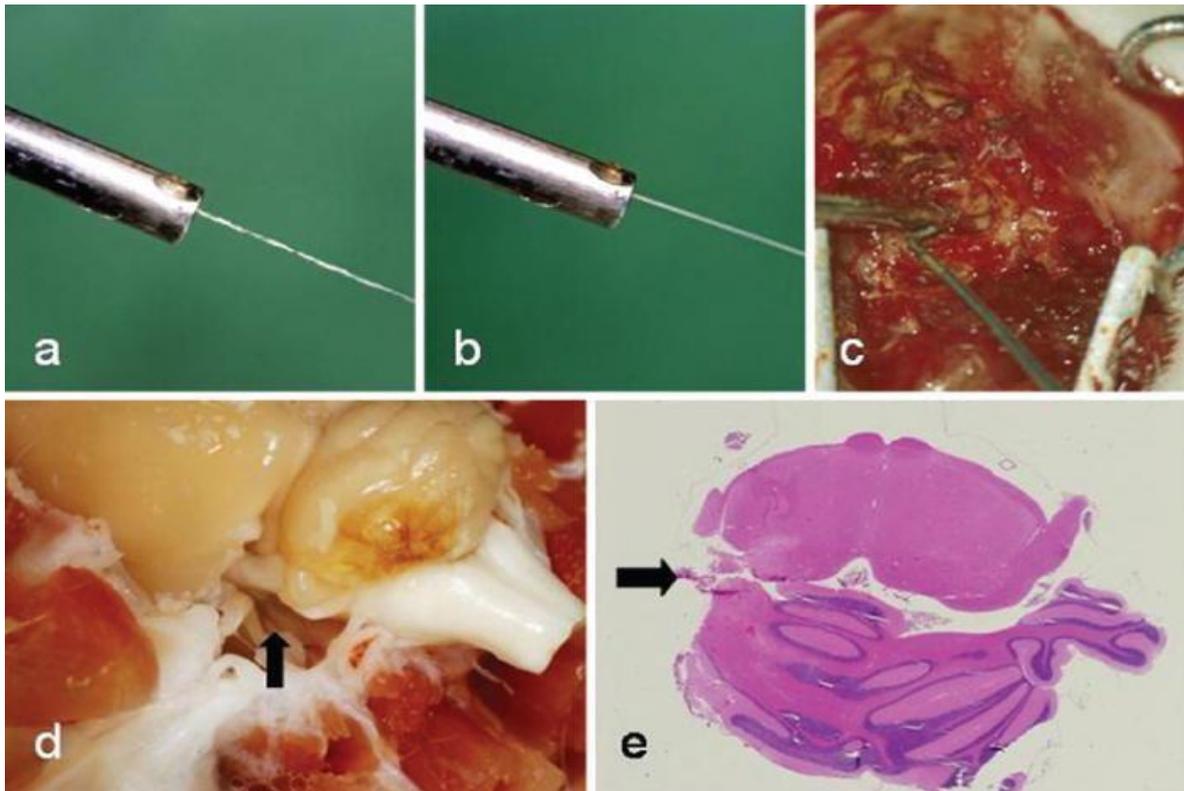


Abb. 4: a. Wasserstrahl mit einer Druckstärke von 2 bar. b. Wasserstrahl mit einer Druckstärke von 8 bar. c. Darstellung des achten Hirnnervs nach erfolgter lateraler suboccipitaler Kraniotomie. d. Komplette Läsion des N. vestibulocochlearis mit einer Druckstärke von 10 bar. e. Histopathologischer Schnitt im Bereich der Schädigung nach einer solchen mit 10 bar, durch H. E. gefärbt [84].



Abb. 5: Der in diesem Versuch verwendete Wasserstrahldissektor.

2.2.2 Versuchstiere

Die in diesem Modell eingesetzten Versuchstiere sind Sprague-Dawley-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von rund 430 g. Sie stammen aus dem Institut für experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes und wurden in Käfigen, die jeweils bis zu drei Tieren Platz boten, in passender Umgebung gehalten. Dabei hatten sie ständig und uneingeschränkt Zugang zu Nahrung und Wasser nach Belieben. Zusätzlich wurden sie vor der Versuchsdurchführung zur Akklimatisierung zwei Wochen gehalten. Danach wurden die Tiere zu Versuchszwecken aus ihren Käfigen genommen. Die Genehmigung der Tierschutzkommission unter der Versuchstierantragsnummer: C1-2.4.2.2/12-2015 lag vor.

2.2.3 Materialliste für den operativen Teil

- Skalpell (BB73, Aesculap)
- Skalpellklingen (Nr. 10, Martor)
- Präparierschere (Classic-Plus 36-5015, Codman)
- Mikro-Federschere (FD12, Codman)
- Mikro-Federschere (FD13, Codman)
- Chirurgische Pinzette (1 x 2 Zähne, Aesculap)
- Mikro-Pinzette (Malis „fein“, Codman)
- Nadelhalter (Medica)
- Mikro-Dissektor (FF303R, 4,5 mm, Aesculap)
- Wundspreizer (BV002R, Aesculap)
- Nagelschere (HF014R, Aesculap)
- Chirurgische Schere (ES106, Everhards)
- Klemme (EK61, Everhards)
- Hohlmeißelzange (schmal, leicht gebogen, Medica)
- Infusionskanüle (B. Braun)
- Nadel
- Handschuhe (Gammex PF)
- Nahtmaterial (Safil HR 26 oder HR 17, 4 x 3-0, 45 cm, Polyglykolsäure, B/Braun)
- Saugtupfer (REF 31601, Kettenbach)
- Tabotamp (Johnson & Johnson Medical)
- Kompressen (Gazin Mullkompressen, Lohmann & Rauscher)
- NaCl-Lösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9 %, B/Braun)
- Desinfektionsmittel (Softasept N, B/Braun)
- Einwegspritze (InjektR 5ml, B/Braun)

- Einweginsulinspritze (1 ml, B/Braun)
- Kanülen (BD Microlance 3)
- Formalin (Roti-Histofix 4 %, Roth)

Technische Geräte:

- Mikroskop (Superlux 300, Zeiss)
- Wärmeplatte
- Chirurgischer Mikro-Bohrer (MicroTRON, Aesculap)
- Diamantbohrkopf GD128, 2,7 mm
- Wasserstrahldissektor (Erbejet 2, Erbe)
- Anaesthetic Vaporizer (Dräger-Vapor Isoflurane 19.3, Dräger)
- AEP-Messgerät (ND-System, Inomed)
- Bipolar (Bipolator, Fischer MET GmbH, Freiburg)
- Sauerstoffflasche (Air Liquide Medical GmbH, Düsseldorf)
- Rasierapparat (Elektra 2, Aesculap)
- Waage (P-1200, Mettler)

Medikamente:

- Dexpanthenol (Bepanthen®, Bayer AG)
- Ketavet (10 ml, 100 mg/ml, Pfizer)
- Rompun
- Isofluran (HDG9623, 250 ml, Baxter)
- Tramadol (Tramal®, 100 mg, Grünenthal)
- Filgrastim (G-CSF, Neupogen®, Amgen)

2.2.4 Materialliste für den histologischen und immunhistologischen Teil

- Hämalaunlösung nach Mayer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Xylol (Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes)
- Ethanol (Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes)
- Propanol (VWR, Prolabo)
- Kresylviolett-pulver (5235, Merck)
- Natriumacetat-pulver (Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes)
- Roti-Histokitt 2 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Glasküvette (Menzel)
- Objektträgerkorb (Menzel)
- Objektträger (Menzel-Gläser)
- Pinsel
- Dampfgerar
- Mikropinzette (46-555, AF Instrumente Germany)

- Rotationsmikrotom (CUT 4062, SLEE)

Lösungsansätze

1. Tris-Puffer

1.1 Stammlösung: 0,5 M

63,5 g TrisSäure + 11,8 g Tris Base in 1 l Aqua dest. Bei 4 °C aufbewahren.

1.2 Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung + 15 g NaCl auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen

Zum Spülen 1 ml Tween 20 zugeben. Bei 4 °C aufbewahren.

2. Citrat-Puffer pH 6,0 0,01M

2.1 Stammlösung:

Citrat (Tri-Natriumcitrat-Dihydrat) 29,4 g in 900 ml Aqua dest. lösen.

pH wurde mit NaOH oder HCl auf 6,0 eingestellt, anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Die Lösung wurde dann bei 4 °C aufbewahrt.

2.2 Gebrauchslösung:

Stammlösung mit Aqua dest. 1:10 verdünnen.

Die Lösung wurde dann bei 4 °C aufbewahrt.

2.3 Gruppenaufteilung

Die Versuchstiere, 35 Sprague-Dawley-Ratten, wurden in fünf verschiedene Gruppen mit jeweils 7 Tieren pro Gruppe aufgeteilt: Kontrollgruppe, G-CSF-Posttrauma-7-Gruppe, G-CSF-Posttrauma-14-Gruppe sowie G-CSF-Prä-/Posttrauma-7-Gruppe. Es erfolgte bei allen Versuchsgruppen die Durchführung vom gleichen Traumamodell. Die dezidierte Beschreibung der einzelnen Gruppen ist in Tabelle 1 zu finden. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde G-CSF oder NaCl-Lösung (Kontrollgruppe) mit einer Dosis von 30 µg/kg KG an den postoperativen Tagen 1-7 subkutan appliziert, jeweils einmal täglich. In der Gruppe G-CSF-Prä-/Posttrauma-7 wurden zusätzlich zur postoperativen Gabe am Tag vor der Operation 30 µg/kg KG G-CSF bzw. NaCl verabreicht. Die Unterteilung der Versuchslaufzeit in 7 und 14 Tage beruht auf dem Eintreten der apoptotischen Prozesse der Neurone nach Schädigung. Die Apoptose von Nervenzellen beginnt etwa 2-3 Tage nach Schädigung und hat ihren Gipfel nach ca. 7-10 Tagen[85]. Nach zwei Wochen nimmt die Zahl der apoptotischen Zellen wieder ab. Der Zeitpunkt der Tötung der Tiere fällt also zum einen mit dem Höhepunkt der apoptotischen Aktivität der Nervenzellen zusammen und zum anderen mit der maximalen Dauer der apoptotischen Prozesse. Hierdurch soll die anti-apoptotische Wirkung von G-CSF im vorliegenden Versuch bestmöglich quantifiziert werden.

Tab. 1: Darstellung der Gruppenaufteilung der Versuchstiere

Gruppe	Natriumchlorid- bzw. G-CSF-Applikation	Zeitpunkt der FAEPs-Messungen	Euthanasierung
Kontrolle 1 n = 7	1 Woche posttrauma (kontinuierliche Applikation)	Direkt prä- und posttrauma, am ersten Tag und am Euthanasierungstag (Tag 7) nach Setzen der Läsion.	Nach 1 Woche
Kontrolle 2 n = 7	1 Woche posttrauma (kontinuierliche Applikation)	Direkt prä- und posttrauma, am ersten Tag und am Euthanasierungstag (Tag 14) nach Setzen der Läsion.	Nach 2 Wochen
G-CSF-Posttrauma-7 n = 7	1 Woche posttrauma (kontinuierliche Applikation)	Direkt prä- und posttrauma, am ersten Tag und am Euthanasierungstag	Nach 1 Woche

		(Tag 7) nach Setzen der Läsion.	
G-CSF-Prä- /Posttrauma-7 n = 7	1 Tag prä- und 1 Woche posttrauma (kontinuierliche Applikation)	Direkt prä- und posttrauma, am ersten Tag und am Euthanasierungstag (Tag 7) nach Setzen der Läsion.	Nach 1 Woche
G-CSF- Posttrauma-14 n = 7	1 Woche posttrauma (kontinuierliche Applikation)	Direkt prä- und posttrauma, am ersten Tag und am Euthanasierungstag (Tag 14) nach Setzen der Läsion.	Nach 2 Wochen

2.4 Anästhesie der Versuchstiere

Die Tiere wurden zur Narkose aus dem Käfig gehoben. Um ihnen eine schonende und schmerzlose Operation zu ermöglichen, wurde nach der initialen Inhalationsanästhesie (20 % Sauerstoff und 5 % Isofluran) eine intraperitoneale Narkose mit Rompun (10 mg/kg KG) und Ketavet (100 mg/kg KG) durchgeführt. Ketavet diente der Analgesie und die Gabe von Rompun der Sedierung der Tiere. Die Augenschleimhaut wurde mit Bepanthen-Salbe vor Austrocknung geschützt. Um eine Hypothermie zu verhindern, wurde die Körpertemperatur der Tiere während der gesamten Operation mittels einer Wärmeplatte bei 38 °C konstant gehalten.

Zusätzlich erfolgte postoperativ zur weiteren Schmerztherapie die Hinzugabe von Tramal ins Trinkwasser (50 mg/100 ml).

2.5 Die Operation

Zunächst wurden die Tiere in Bauchlage auf einer Wärmeplatte gelagert, um dann Kutis, Subkutis und die Muskeln am Hinterkopf freizulegen. Für den späteren Wundverschluss wurde ein ca. 1,5 cm großes Muskelstück entnommen und in einem Gefäß mit isotonem Kochsalz aufbewahrt. Danach fand die weitere Präparation des Zugangs statt. Dieser wurde mit einem Sperrer offengehalten und mit einem Dissektor der suboccipitale Schädelknochen freigelegt. Danach wurde mittels eines Diamantbohrers der Zugang zum Gehirn über eine Bohrloch-Trepanation suboccipital rechts geschaffen. Für eine bessere Sicht während des Bohrvorganges und um der Hitze entgegenzuwirken, wurde parallel zum Bohren mit einer isotonen Natriumchlorid-Lösung gespült. Als Nächstes erfolgte die Eröffnung der Dura, indem diese mit einer Nadel aufgeritzt und danach mit einer Mikroschere kreuzförmig erweitert wurde.

Nach dem Absaugen des nun fließenden Liquors mit einem Saugtupfer (Sugis) konnte das Cerebellum mit einem Dissektor nach medial ausgelenkt werden, sodass der achte Hirnnerv rechtsseitig sichtbar wurde. Mit dem oben dargelegten Wasserstrahldissektor wurde mit einem Druck von 8 bar die Teilläsion des Nervus vestibulocochlearis vorgenommen und hierfür das Handstück des Wasserstrahldissektors ca. 1 cm vom Nerv entfernt für eine Sekunde fixiert. Abschließend erfolgte, zur Verhinderung einer Liquorleckage, die Anfertigung einer Dura- und Kranioplastik mittels eines zuvor gewonnenen und in isotoner Natriumchlorid-Lösung aufbewahrten Muskelstücks. Die Haut der Ratte wurde nun mit einer Einzelknotennahttechnik genäht. Die dezidierten operativen Schritte sind in Abb. 6 dargestellt.

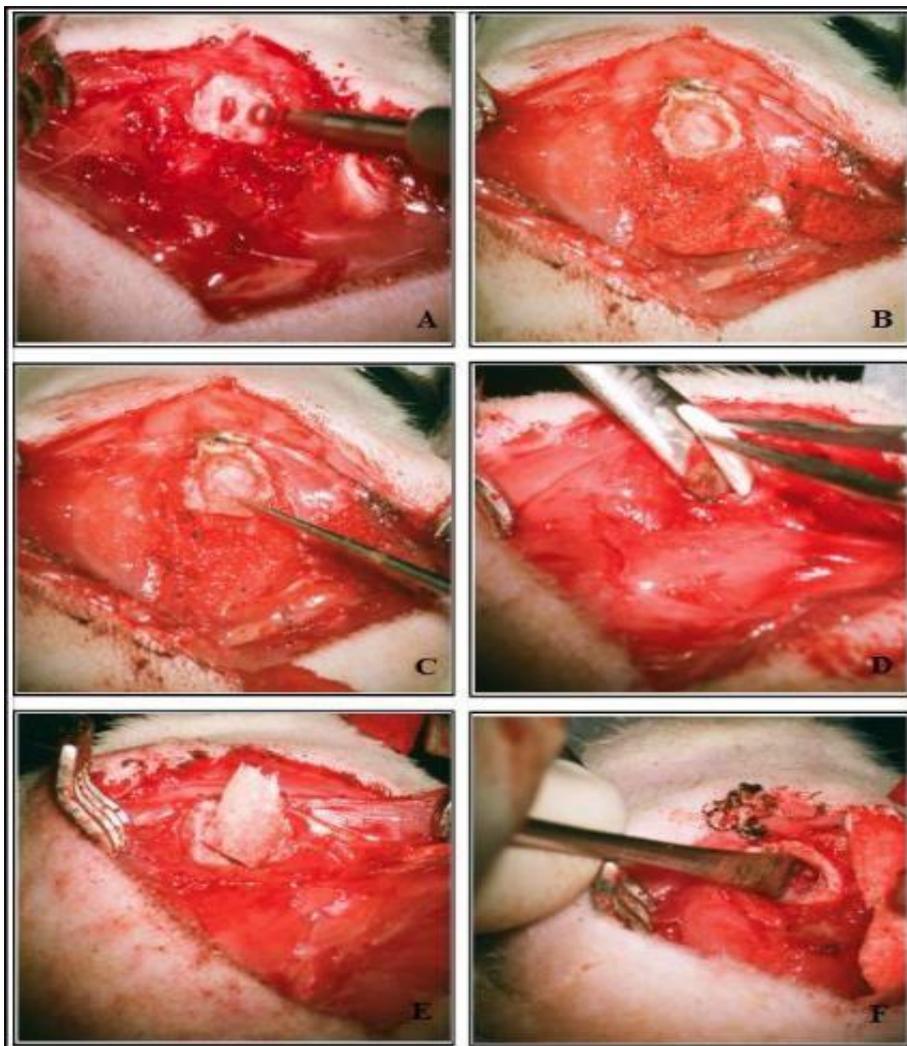


Abb. 6: Darstellung der Operationsschritte: A. Auffräsen Os occipitale rechts. B. Blick auf das Cerebellum mit intakter Dura. C. Eröffnung der Dura. D. Aufsaugen des austretenden Liquors mit Sugis. E. Mit Liquor aufgesaugte Sugis®. F. Verschiebung des Cerebellums nach medial und Darstellung des Nervus vestibulocochlearis [86].

2.6 Form der G-CSF-Applikation

Die Applikation von G-CSF erfolgte subkutan mit einer Dosierung von 30 µg/kg KG. Dafür wurden die Tiere unter einer Inhalationsnarkose mit 20 % Sauerstoff und 5 % Isofluran für kurze Zeit sediert (ca. 1 min.) und das Medikament wurde appliziert. Dies wurde einmal pro Tag während des Applikationszeitraumes durchgeführt (s. Tabelle 1).

2.7 Frühe akustisch evozierte Potenziale (FAEPs)

Um das Ausmaß der Schädigung nach erfolgter Läsion und auch die Regeneration des Nervs nach der G-CSF-Applikation beurteilen zu können, wurden frühakustisch evozierte Potenziale zu verschiedenen Zeitpunkten erhoben: direkt vor der Schädigung, direkt nach der Schädigung, am ersten Tag nach der Schädigung und direkt vor der Euthanasierung der Tiere (nach 7 und 14 Tagen entsprechend der Gruppenzuteilung). Dazu wurden den Tieren drei Elektroden subkutan gelegt, jeweils am rechten und linken Mastoid und eine Erdungselektrode am Vertex. Zusätzlich wurden an beiden Ohren Kopfhörer angesetzt. Es erfolgte die Stimulation mit einer Lautstärke von 85 Dezibel (dB). Die Amplituden der Wellen II und IV sowie deren Latenzen sowie die Interpeak-Latenzen I-II, I-IV und II-III wurden mit Hilfe des Inomed-ND-Systems (Inomed, Emmendingen, Deutschland) bestimmt.

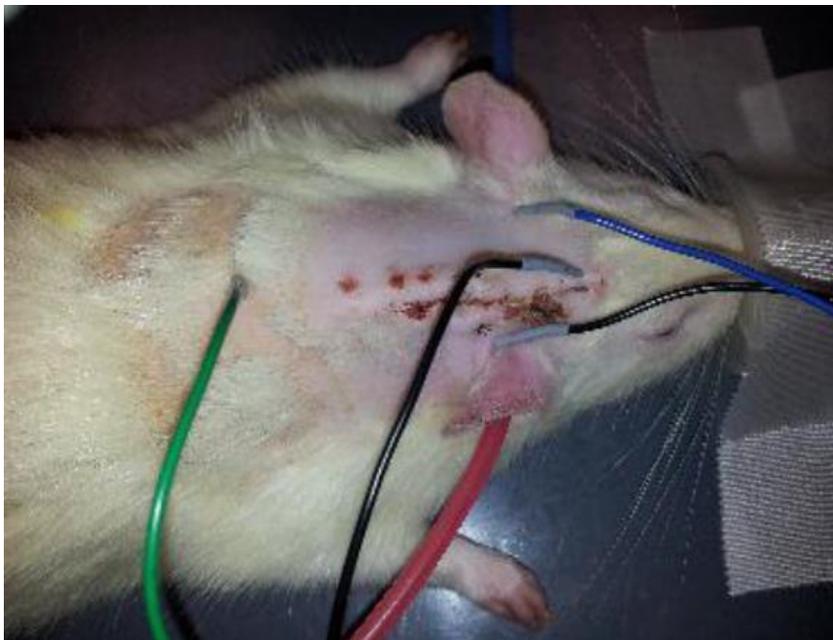


Abb. 7: Darstellung einer Ratte zur FAEP-Messung. Blaue und schwarze Elektroden bilden die Mastoidelektroden, die Vertexelektrode ist schwarz sowie die Erdungselektrode grün. Zusätzlich sind hier die Kopfhörer in rot und blau abgebildet [86].

Zur Auswertung der frühakustisch evozierten Potenziale wurde entsprechend der Literatur auf die Amplitude der Welle II Wertgelegt [87].

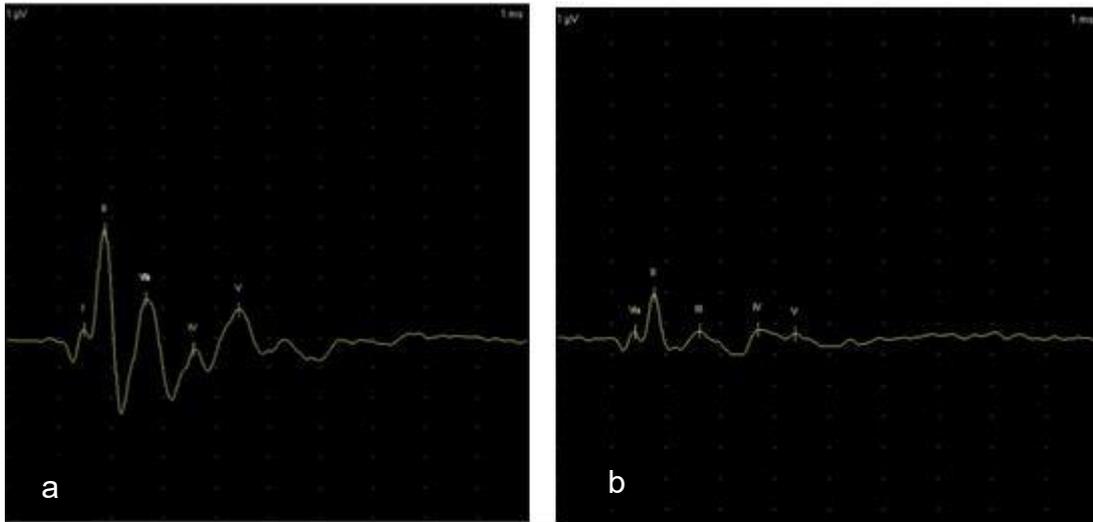


Abb. 8: Zeigt ein früh akustisch evoziertes Potenzial von der Ratte. a. vor der Schädigung, b. nach Setzen der Nervenläsion.

2.8 Euthanisierung der Tiere

Am 7. bzw. 14. Tag nach der Schädigung wurde die transkardiale Perfusion der Tiere vorgenommen. Nach der Allgemeinanästhesie fand eine mediale Laparotomie statt. Nun erfolgte die Durchtrennung des Diaphragmas und der Thorax in der Mittellinie, danach die Fixierung der beiden Thorax-Hälften mit einem Spreizer zur Seite, sodass der Zugang zum rechten Ventrikel des Herzens möglich war. Über eine Kanüle wurde die Infundierung einer NaCl-Lösung in den linken Ventrikel und zugleich die Eröffnung des rechten Herzohrs mit einem Schnitt durchgeführt, um das Ausbluten zu erreichen. Hiernach wurde mittels 3-Wege-Hahn auf 4 % Formalin umgestellt und das Gewebe fixiert. Nach dem Herzstillstand erfolgte das Abtrennen des Kopfes und mittels einer Zange im Anschluss das Abpräparieren der Schädelknochen. Somit konnte das komplette Rattenhirn dargestellt werden. Zum Schluss begann, nach Abtrennen der Hirnnerven von der Schädelbasis, das Aufbewahren des Gehirns in Formalin-Lösung.

2.9 Aufarbeitung der histologischen Schnitte

Zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung standen nach der Euthanasierung der Tiere die Freipräparation sowie die Fixierung der Gehirne an. Nach drei Wochen wurde der größte Teil des Großhirns vom Cerebellum und Hirnstamm getrennt. Die Gewebe wurde entwässert über die aufsteigende Alkoholreihe anschließend in Xylol und dann mit flüssigem Paraffin durchtränkt. (Shandon Hypercenter XD, Histocenter). Die gewonnenen Blöcke konnten nun in 5-µm-Schnitten mittels eines Mikrotoms (CUT 5062 SLEE medical,

Mainz) geteilt werden. Dabei wurde jeder zweite Schnitt verwendet und auf einen Objektträger aufgetragen. Auf Basis eines Vergleiches wurde mit einem Rattenhirn-Atlas insgesamt eine Serie von durchschnittlich 200 Schnitten pro Tier im Bereich des rechten geschädigten Ncl. cochlearis angefertigt. Durch die Orientierung am Flocculus konnte das Areal des Cochlea-Kerns aufgefunden werden (s. Abb. 9). Dabei wurden Schnitte vorgenommen, die möglichst nah am mittleren Bereich des Kerngebiets lagen. Für die Nissl-Färbung wurden die Schnitte auf einem normalen Objektträger aufgetragen. Für die Immunhistochemie wurden silanisierte Objektträger verwendet. Es wurden insgesamt drei Schnitte pro Tier für die Nissl-Färbung (ein Schnitt im mittleren Kerngebiet und jeweils einer rostral und kaudal davon) ausgewertet. Für die Immunhistochemie (Bcl-2, Bax, Caspase-3 und G-CSF-R) wurden zwei Schnitte pro Tier und pro Färbung (jeweils ein Schnitt rostral und kaudal der Mitte) evaluiert.

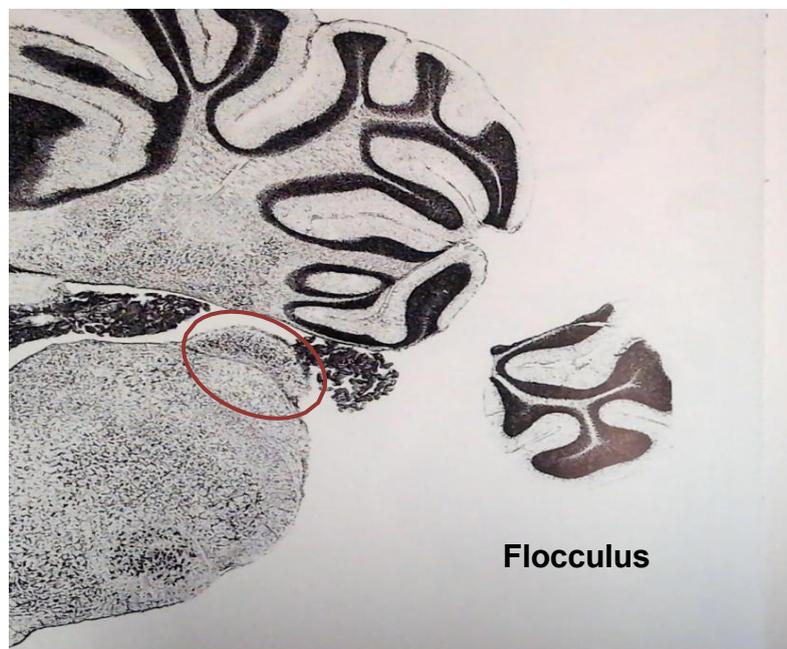


Abb. 9: Erster Serienschnitt. Zu erkennen ist hier der dorsale Bereich des Ncl. cochlearis (roter Kreis) [88].

2.10 Histologie und Immunhistochemie

Als gemeinsamer Schritt gelten hier die Entparaffinierung und Rehydrierung der Präparate. Hierzu wurden die Schnitte je fünf Minuten 3-mal in Xylol gelegt. Danach wurden diese für je fünf Minuten in einer absteigenden Ethanol-Reihe eingetaucht (2-mal 100 %, 96 % und 70 %), danach in Aqua dest.

Im Anschluss fanden die nachfolgend genannten Färbungen statt.

2.10.1 Kresyl-Violett(-Nissl) -Färbung

Zunächst wurde wie zuvor beschrieben die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte durchgeführt. Daraufhin wurden die Präparate in eine gepufferte Kresyl-Violett-Lösung für 15 min eingelegt sowie anschließend in einen Natriumacetat-Puffer eingetaucht. Im Anschluss wurden sie zweimal mit Isopropanol gespült. Nun erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer ansteigenden Alkoholreihe (76 %, 96 %, 2-mal 100 %), danach dreimaliges Einlegen in Xylol. Zum Schluss wurde das Eindecken mit Roti-Histokitt II vorgenommen (Carl Roth, Karlsruhe).

2.10.2 Bcl-2, Bax und G-CSF-R, Caspase-3

Für die Färbung mit polyklonalen Antikörpern (AK): Bcl-2 AK, Bax-AK, G-CSF-R-AK und Caspase-3-AK aus Kaninchenserum wurde die Avidin-Biotin-Technik (ABC-Methode) verwendet. Zuerst wurden die Schnitte für zehn min bei 58 °C in den Brutschrank gestellt. Danach standen die Entparaffinierung und Rehydrierung an. Im Anschluss wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. getaucht. Daraufhin erfolgte die Antigendemaskierung, indem die Schnitte in einer Küvette mit 200 ml Citrat-Puffer inkubiert und dann in einem mit 1 Liter destilliertem Wasser gefüllten Dampfgerät für 20 min gegart wurden. Nach dem Garen wurden die Schnitte für 20 min abgekühlt und anschließend für fünf min in Tris-Puffer gespült. In einem dritten Schritt wurde die endogene Peroxidase blockiert, indem die Präparate für 20 min in 1 ml 30 % H₂O₂ mit 99 ml Methanol inkubiert wurden. Nach der Blockierung wurden die Schnitte zweimal je fünf min in Tris gespült, darauffolgend abgetrocknet, mit Pap-Pen umfahren und in eine feuchte Kammer mit Aqua dest. gelegt. Sodann wurden die Präparate mit Normalserum Goat (Vector Laboratories, Biotechnology) bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Nachdem das Normalserum Goat abgelaufen war, erfolgte die Inkubation mit dem jeweils entsprechenden Rabbit-polyklonalen primären Antikörper (Santa Cruz, Biotechnology) (Verdünnung 1:100) über Nacht bei 4 °C. Am zweiten Tag wurden die Präparate zunächst zweimal je fünf min in Tris gespült und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Goat-antirabbit-Antikörper (Santa Cruz, Biotechnology) (Verdünnung 1:200) bedeckt. Nach einer weiteren Spülung der Schnitte zweimal je fünf min mit Tris wurden sie mit dem 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz (Vector Laboratories, Burlingame, US) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, hiernach nochmals mit Tris zweimal je 5 min gespült und mit dem Peroxidase-Kit für 20 min bei Raumtemperatur markiert (1,7 ml, pH 7,5). Hierauf erfolgte die Spülung mit Aqua dest. Zur Kernfärbung wurde das Hämatoxylin für zwei min verwendet. Die Schnitte wurden danach kurz in Aqua dest. gespült und in einer ansteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 2-mal 100 %) entwässert sowie 3-mal in Xylol gelegt. Schließlich wurden die Objektträger mit Histokit eingedeckt und getrocknet.

2.11 Histologische Auswertung

Zur histologischen Auswertung der Nissl-Färbung zwecks Bestimmung der Neuronenzahl im Bereich des Nucleus cochlearis wurden drei Schnitte pro Tier ausgewertet. Diese waren: ein Schnitt im mittleren Bereich im Kerngebiet des Ncl. cochlearis und der zehnte Schnitt kaudal und rostral davon. Für die Immunhistochemie wurden die weiteren kranialen und kaudalen Schnitte ausgewertet, sodass insgesamt jeweils zwei Schnitte betrachtet wurden. Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop (Olympus XC30) in 100-facher Vergrößerung bei der Auswertung der Nissl-Präparate und in 200-facher Vergrößerung für die Immunhistochemie betrachtet. Das Mikroskop war mit einer Kamera verbunden und an einen Computer angeschlossen, sodass die Auswertung mit Hilfe des Programms CellSens Dimension der Firma Olympus, Deutschland ausgeführt werden konnte. Die Auswertung am Bildschirm bewirkte eine erhöhte Auflösung des Bildes und somit eine bessere Darstellung der Neurone, die hier nochmals vergrößert betrachtet werden konnten. Eine Nervenzelle wurde als solche identifiziert, wenn sie die Merkmale, wie in Tabelle 2 genannt, aufwies[89]. Durch das Befolgen dieser Arbeitsschritte konnte das Aufzählen anderer Zellen wie Mikroglia ausgeschlossen werden[89].

Tab. 2: Auflistung der Kriterien zur Identifizierung einer Nervenzelle in den histologischen Präparaten

Kriterium	Beschreibung
1	Vorhandene Zellmembran
2	Vorhandener Zellkern
3	Vorhandene Zellkernmembran
4	Vorhandener Nukleolus

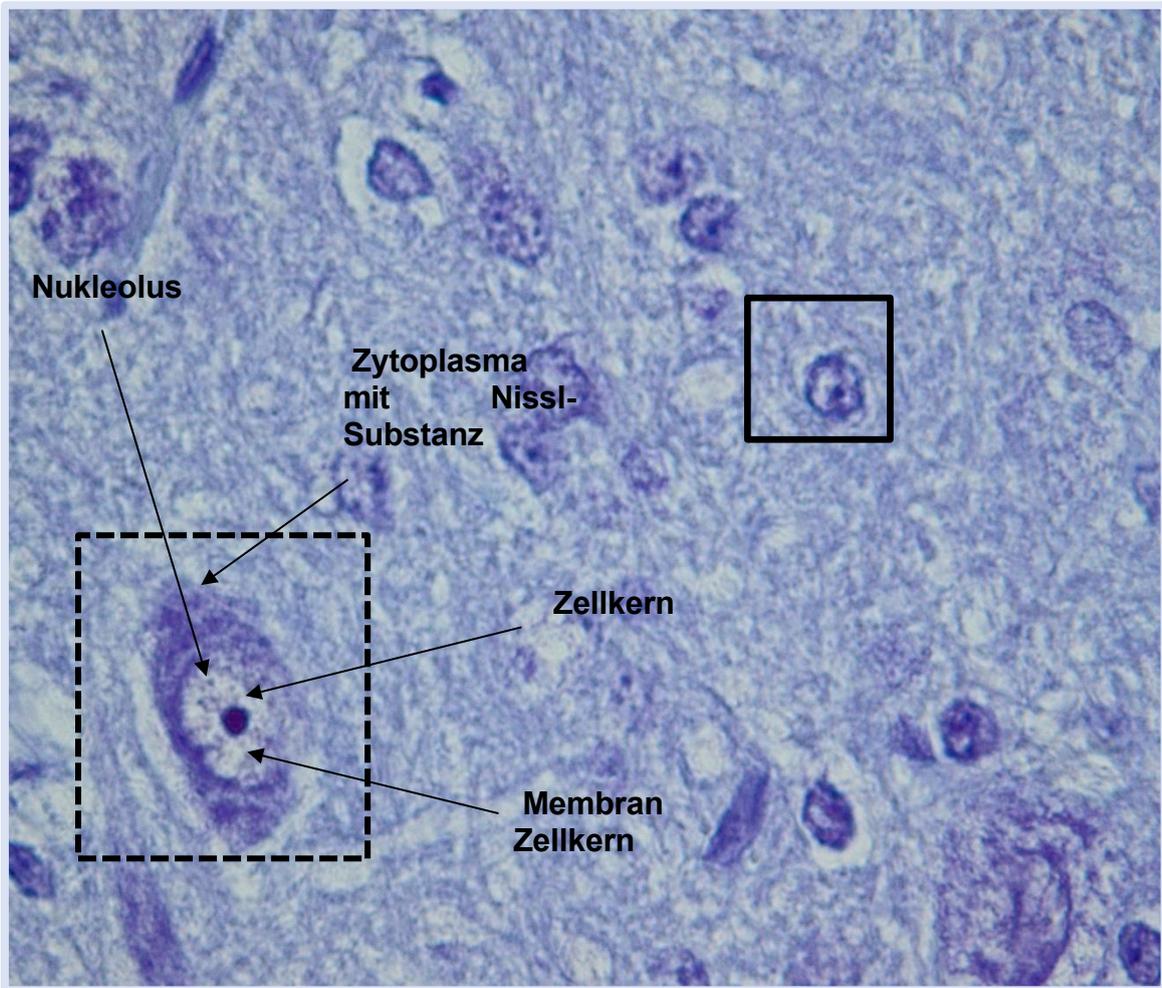


Abb. 10: Nervenzelle (gestrichelte Linie) mit den dazugehörigen Kriterien, die erfüllt werden müssen, um als solche identifiziert zu werden. Mikroglia (durchgehende Linie) sind hier im Vergleich dargestellt (100-fache Vergrößerung).

2.12 Immunhistochemische Auswertung

Zur immunhistochemischen Analyse wurden die Schnitte kaudal und kranial der kaudalen und kranialen Nissl-Schnitte ausgewertet. Eine Zelle wies eine positive Reaktion auf den Antikörper auf, wenn ihr Zytoplasma einen Farbumschlag zeigte (Abb. 11).

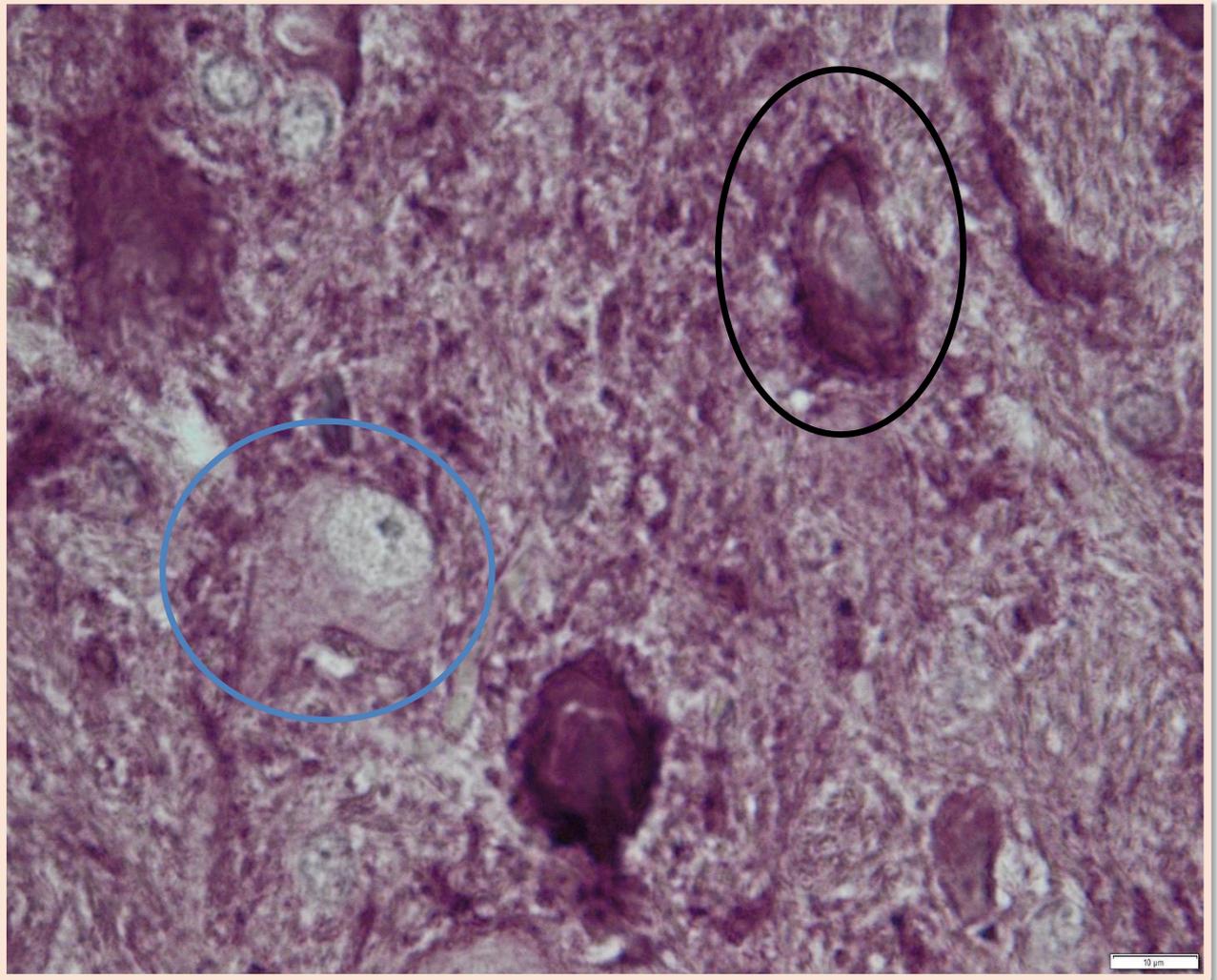


Abb. 11: Schematische Darstellung einer positiven (schwarz markiert) und einer negativen, mit dem Antikörper nicht angefärbten (blau markiert) Nervenzelle.

2.13 Statistische Analyse

Alle Daten wurden mit dem Programm SPSS Version 19 ausgewertet. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit $p < 0,05$ betrachtet.

Für die Auswertung der früh akustisch evozierten Potenziale (FAEPs) wurde der T-Test für verbundene Stichproben verwendet und der T-Test für unverbundene Stichproben für die histologische und immunhistologische Auswertung. Zur Auswertung der früh akustisch evozierten Potenziale wurde die Amplitudenwerte der Welle II zur Messung herangezogen [87,90].

3 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, um die Effekte der kontinuierlichen Applikation von G-CSF auf die Neuroprotektion des Nervus vestibulocochlearis nach partieller Schädigung zu evaluieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden Abschnitt detailliert dargestellt. Hierbei werden sowohl die Veränderungen in der Neuronenzahl im Nucleus Cochlearis als auch die Auswirkungen auf akustisch evozierte Potenziale beschrieben. Die gewonnenen Daten bieten wertvolle Einblicke in die neuroprotektiven Mechanismen von G-CSF und dessen potenziellen therapeutischen Nutzen.

Im Folgenden die Ergebnisse mit Hinblick auf die Fragestellungen separat präsentiert.

1. Fragestellung:

Welchen Nutzen zeigt die kontinuierliche Applikation von G-CSF auf die Neuroprotektion nach partieller Schädigung des N. vestibulocochlearis?

G-CSF wirkte positiv auf die Neuroprotektion des N. vestibulocochlearis nach partieller Läsion. Es wurden die Neuronenzahl im Ncl. Cochlearis sowie die Erhebung von früh akustisch evozierten Potenzialen zur Auswertung herangezogen. Es folgt eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse.

3.1 Die Wirkung des G-CSF auf die Neuronenzahl im Ncl. cochlearis:

Bei Tieren der Kontrollgruppe 1, die eine Woche nach Nervenschädigung und Applikation von isotoner Kochsalzlösung euthanasiert wurden, fanden sich 127 ± 67 intakte Neurone. Tiere mit G-CSF-Applikation nach Nerventrauma zeigten nach einer Woche 238 ± 90 intakte Neurone. Der Vergleich zwischen den zwei Gruppen zeigte ein signifikantes Ergebnis ($p=0,035$). Tiere, die sowohl vor als auch nach dem Nerventrauma G-CSF erhielten, zeigten nach einer Woche 218 ± 67 Neurone. Im Vergleich zeigten die Tiere der Kontrollgruppe 1 signifikant weniger überlebende Neurone auf ($p= 0,039$). Die Details sind Abb. 12 zu entnehmen.

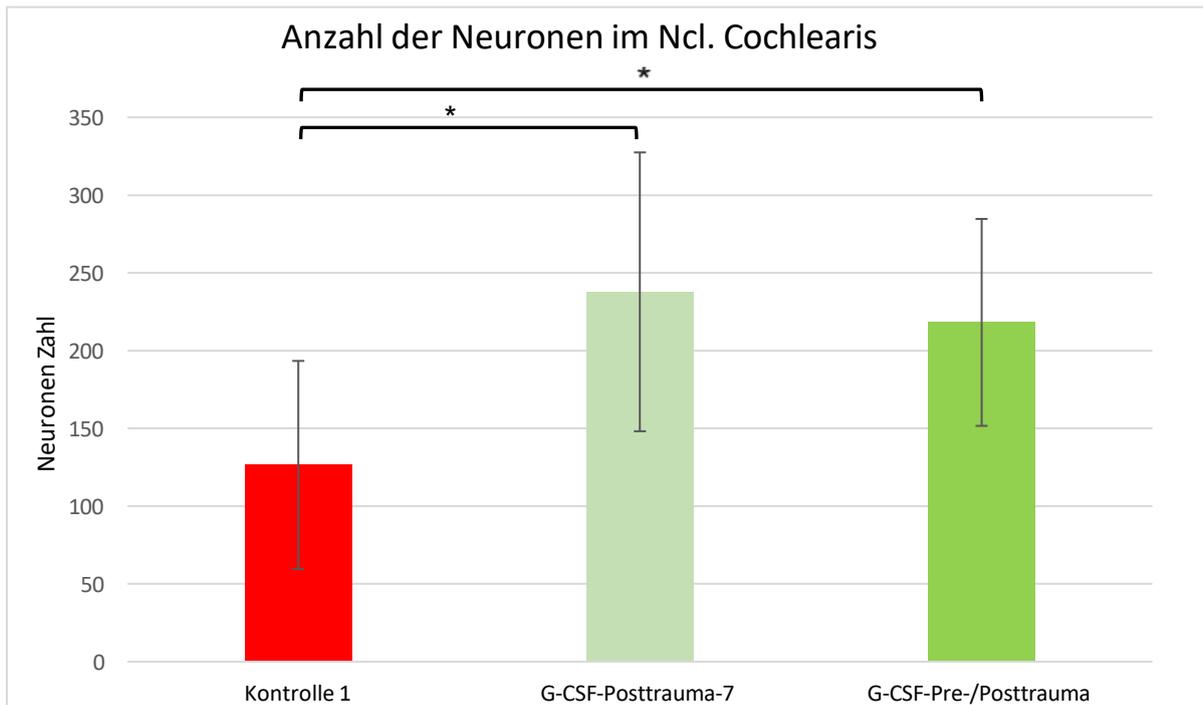


Abb. 12: Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und G-CSF-posttrauma-7-Gruppe sowie G-CSF-Pre-Posttrauma (Kontinuierliche G-CSF-Applikation für 1 Woche) in Bezug auf die Zellzahl. Auf der X-Achse sind die einzelnen Gruppen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Nervenzellen.

Bei den Tieren der Kontrolle 2 wurden 111 ± 25 Neurone gezählt. Wohingegen in der G-CSF-Gruppe nach 14 Tagen (G-CSF-Posttrauma-14) $208 \pm 48,5$ Neurone gefunden wurden. Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen ist statistisch signifikant ($p=0,002$). Abb. 13 stellt dies graphisch dar.

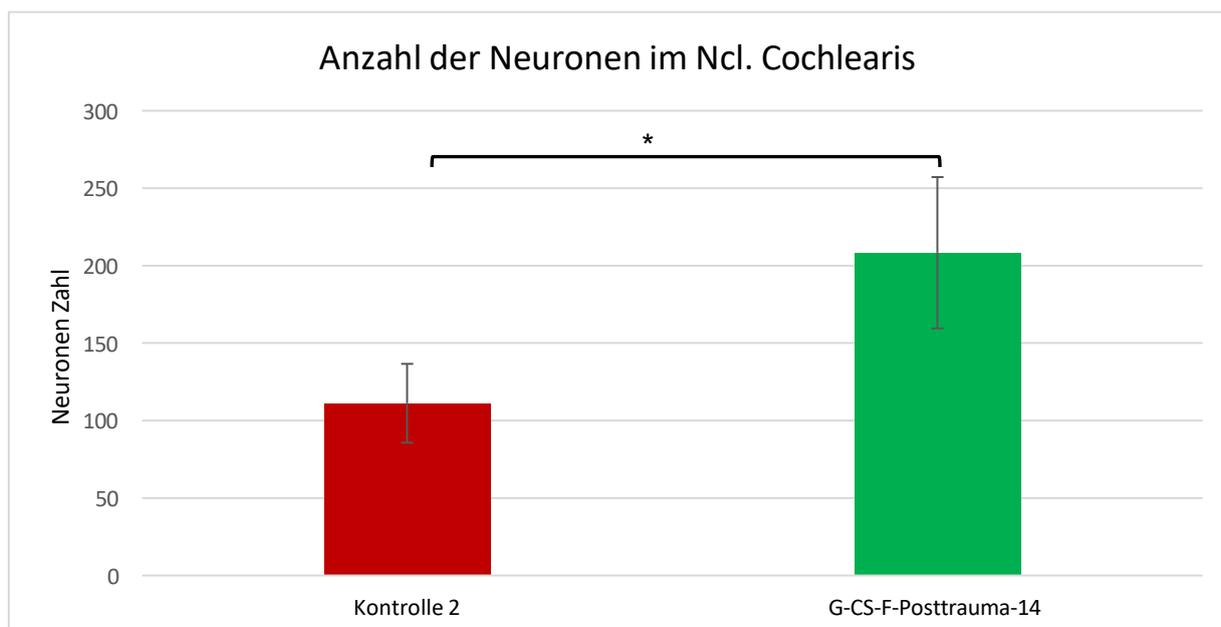


Abb. 13: Vergleich zwischen der Kontrollgruppe 2 und G-CSF-posttrauma 14-Gruppe in Bezug auf die Zellzahl. Auf der X-Achse sind die einzelnen Gruppen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Nervenzellen.

Zusätzlich erfolgte der Vergleich zwischen den einzelnen G-CSF Gruppen: G-CSF-Posttrauma-7 (238 ± 90 intakte Neurone), G-CSF-Pre-/Posttrauma (218 ± 67 intakte Neurone) und der G-CSF-posttrauma-14 ($208 \pm 48,5$ intakte Neurone). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p > 0,05$).

3.2 Frühe akustisch evozierte Potenziale

Die Amplitude der Welle II wurde als Messparameter beurteilt. Bei allen Versuchstieren konnte direkt nach Setzen der Läsion ein niedriger Amplituden-Wert, verglichen mit der Ausgangsmessung, beobachtet werden.

Der Wert der Amplitude II der FEAP in der Kontrolle 1 Gruppe betrug präoperativ $2,8 \mu\text{V} \pm 0,7$. In der G-CSF Posttrauma-7 Gruppe betrug dies $2,9 \mu\text{V} \pm 0,2$ und in der G-CSF-Prä-Posttrauma Gruppe betrug sie $3,6 \mu\text{V} \pm 0,7$. Der Unterschied zwischen Kontrolle 1, G-CSF-Posttrauma-7 Gruppe war statistisch nicht signifikant. Der Unterschied zwischen Kontrolle 1 und G-CSF prä-/Posttrauma in der präoperativen Messung war statistisch nicht signifikant ($P > 0,05$).

Postoperativ ergab sich in der Kontrolle 1 einen Amplituden Wert von $1,5 \mu\text{V} \pm 0,5$. In der G-CSF-Posttrauma-7 betrug sie $2,24 \mu\text{V} \pm 0,5$ und in der G-CSF-Prä-/Posttrauma $3,19 \mu\text{V} \pm 0,7$. Der Unterschied zwischen Kontrolle 1, G-CSF-Posttrauma-7 Gruppe und G-CSF prä-/Posttrauma in der postoperativen Messung war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

In der FAEP-Messung nach einer Woche ergab sich in der Kontrolle 1 einen Amplituden Wert von $2,6\mu V \pm 0,7$. In der G-CSF-Posttrauma-7 betrug sie $3,7\mu V \pm 0,75$ und in der G-CSF-Prä-/Posttrauma $4,6\mu V \pm 1,0$. Der Unterschied zwischen Kontrolle 1, G-CSF-Posttrauma-7 Gruppe und G-CSF prä-/Posttrauma in der präoperativen Messung war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Der Unterschied in den einzelnen Gruppen in den einzelnen Messzeitpunkten:

In der Kontrolle 1 präoperativ im Vergleich zur postoperativen Messung ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Im Vergleich Präoperativ zu einer Woche postoperativ ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$). Postoperativ im Vergleich zu einer Woche postoperativ ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

In der G-CSF-Posttrauma-7 präoperativ im Vergleich zur postoperativen Messung ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Im Vergleich Präoperativ zu einer Woche postoperativ ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Postoperativ im Vergleich zu einer Woche postoperativ ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

In der G-CSF-Prä-/Posttrauma ergab sich präoperativ im Vergleich zur postoperativen Messung keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Im Vergleich Präoperativ zu einer Woche postoperativ ergab sich einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$). Postoperativ im Vergleich zu einer Woche postoperativ ergab sich einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

Die Abbildungen 14, 15 und 16 veranschaulichen die oben beschriebenen Ergebnisse.

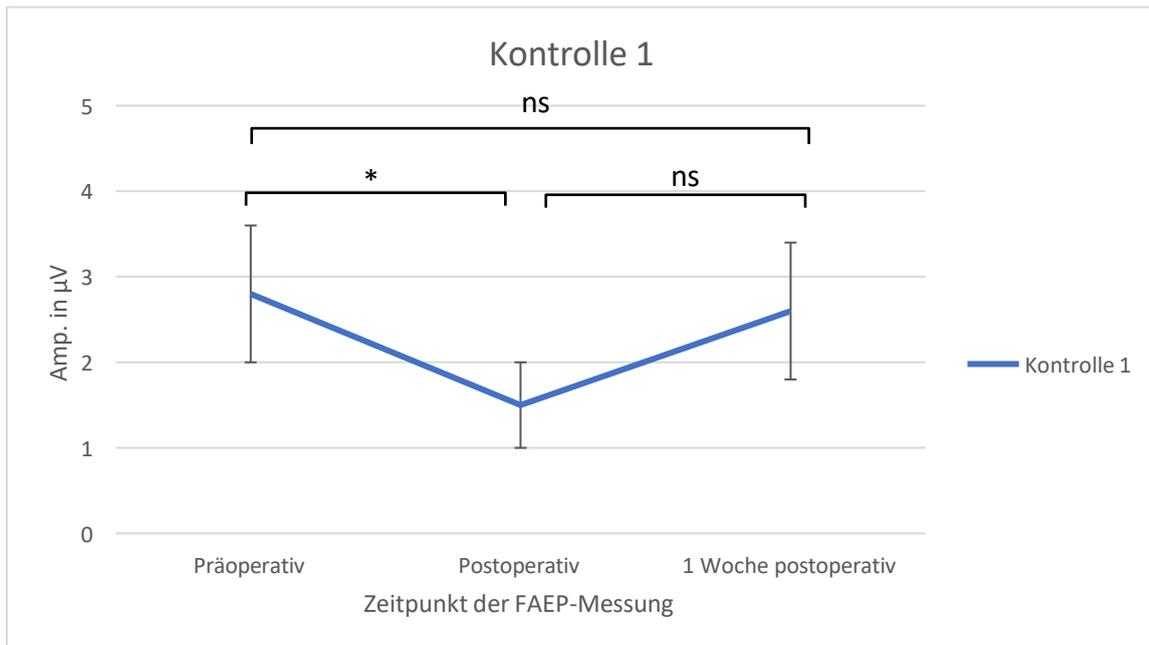


Abb. 14: FAEP der Kontrolle 1. Auf der X-Achse ist der Zeitpunkt der Messung eingetragen. Die Y-Achse zeigt den Amplitudenwert.

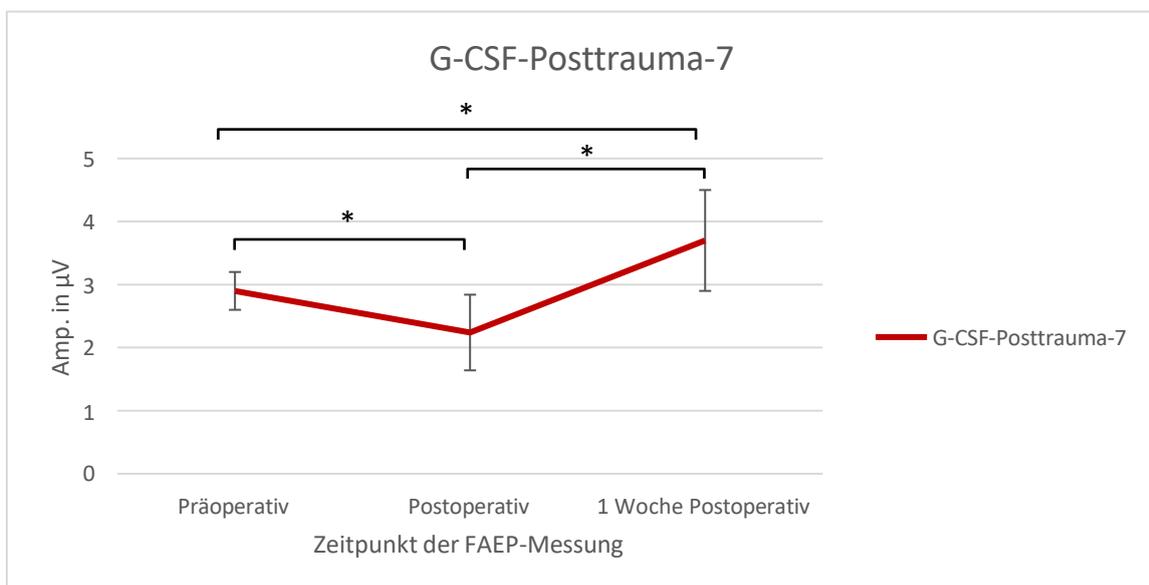


Abb. 15: FAEP der G-CSF-Posttrauma-7. Auf der X-Achse ist der Zeitpunkt der Messung eingetragen. Die Y-Achse zeigt den Amplitudenwert.

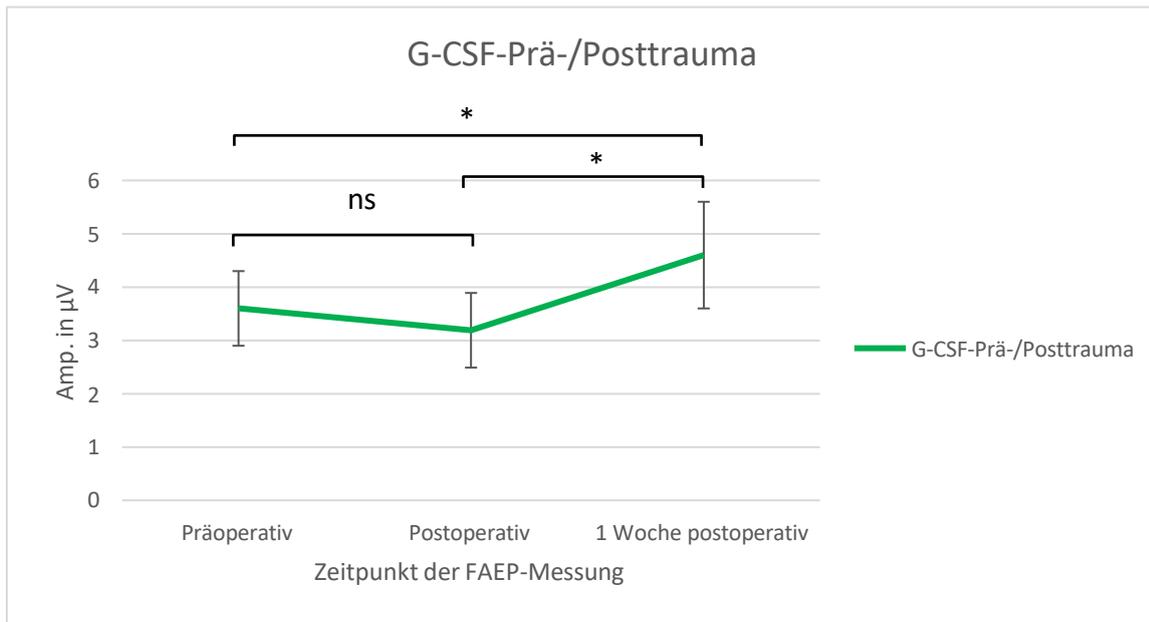


Abb. 16: FAEP G-CSF-Prä-/Posttrauma. Auf der X-Achse ist der Zeitpunkt der Messung eingetragen. Die Y-Achse zeigt den Amplitudenwert.

2. Fragestellung:

Welchen Einfluss entfaltet die kontinuierliche Applikation von G-CSF auf die Apoptose-Marker Bcl-2, Bax, und Caspase-3?

Bei allen mit G-CSF behandelten Tieren konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 festgestellt werden. Bei Tieren der Kontrollgruppe 1, die eine Woche nach Nervenschädigung und Applikation von isotoner Kochsalzlösung euthanasiert wurden, fanden sich 35 ± 23 mit Bcl-2 positiv gefärbten Neuronen. Tiere mit G-CSF-Applikation nach Nervenstrauma zeigten nach einer Woche 52 ± 18 mit Bcl-2 positiv gefärbten Neuronen. Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p=0,2$). Solche, die vor wie auch nach dem Nervenstrauma G-CSF erhielten, verfügten nach einer Woche über 102 ± 42 Bcl-2 positive Neurone. Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen ist statistisch signifikant ($p= 0,007$). Abbildung 15 stellt dies graphisch dar.

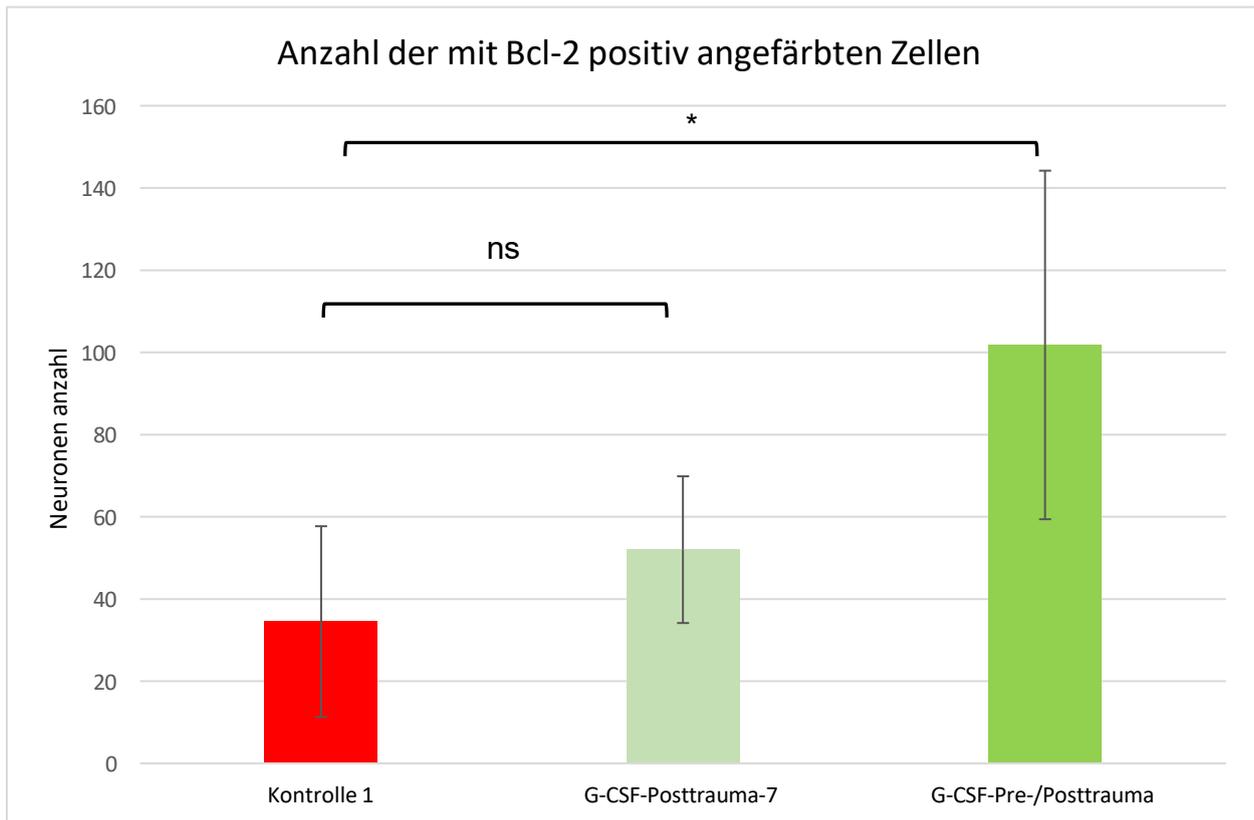


Abb. 15: Vergleich zwischen der Kontrollgruppe 1, G-CSF-posttrauma 7-Gruppe und G-CSF-Pre-/Posttrauma -Gruppe in Bezug auf der Bcl-2 positiven Zellen. Auf der X-Achse sind die einzelnen Gruppen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Nervenzellen.

Bei Tieren der Kontrollgruppe 2, die nach zwei Wochen geopfert wurden, zeigten sich 54 ± 24 mit Bcl-2 positiv angefärbte Neuronen. Tiere mit G-CSF-Applikation nach dem Nervenstrauma verfügten zwei Wochen nach der Schädigung 75 ± 21 über positive Neuronen. Die Details sind Abb. 16 zu entnehmen. Der Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,2$).

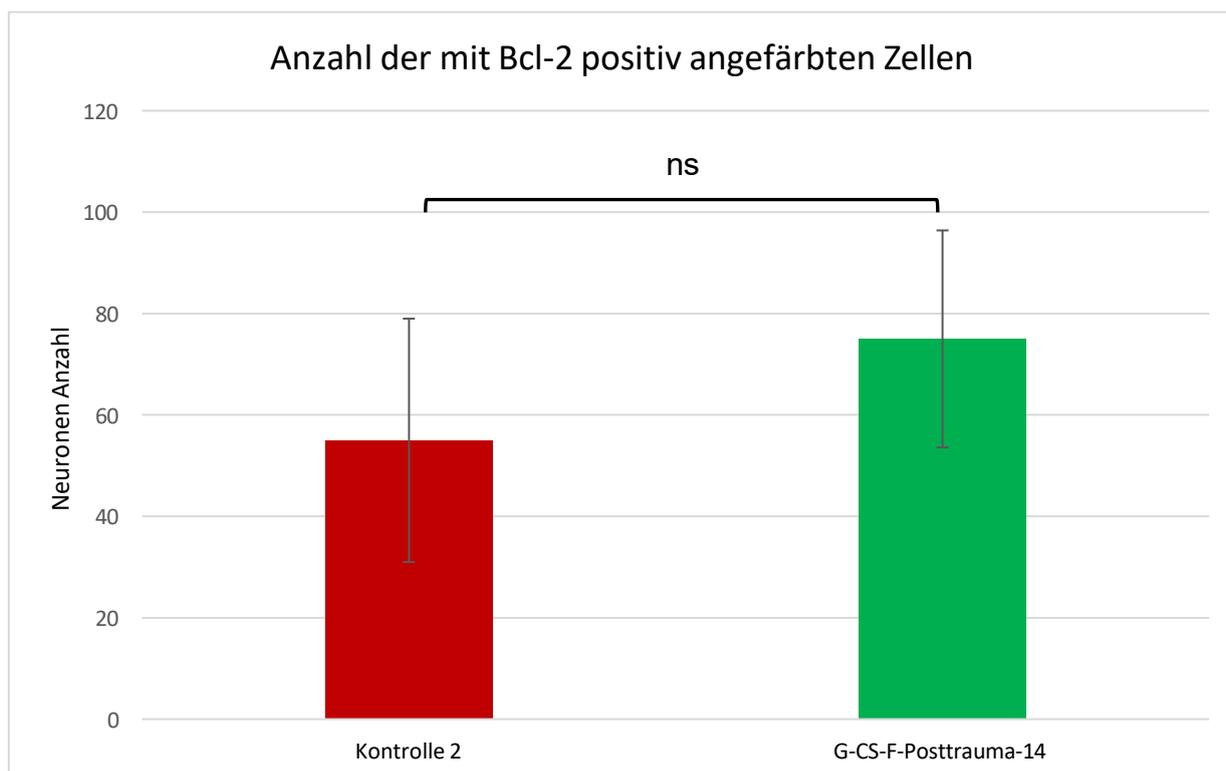


Abb. 16: Vergleich zwischen der Kontrollgruppe 2 und G-CSF-posttrauma 14-Gruppe in Bezug auf der Bcl-2 positiven Zellen. Auf der X-Achse sind die einzelnen Gruppen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Nervenzellen.

Ferner war eine Unterregulation der Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax bei den Experimentaltieren beobachtbar. Diese Ergebnisse werden in den Grafiken 17 und 18 veranschaulicht. Bei Tieren der Kontrollgruppe, die eine Woche nach Nervenschädigung und Applikation von isotoner Kochsalzlösung euthanasiert wurden, fanden sich 53 ± 23 mit Bax positiv gefärbten Neuronen. Tiere mit G-CSF-Applikation nach Nerventrauma zeigten nach einer Woche $28,5 \pm 6$ mit Bax positiv gefärbten Neurone. Das Ergebnis ist statistisch signifikant ($p= 0,03$). Solche, die vor wie auch nach dem Nerventrauma G-CSF erhielten, verfügten nach einer Woche über 34 ± 13 Bax positive Neurone (Abb. 17). Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen ist statistisch nicht signifikant ($p=0,1$).

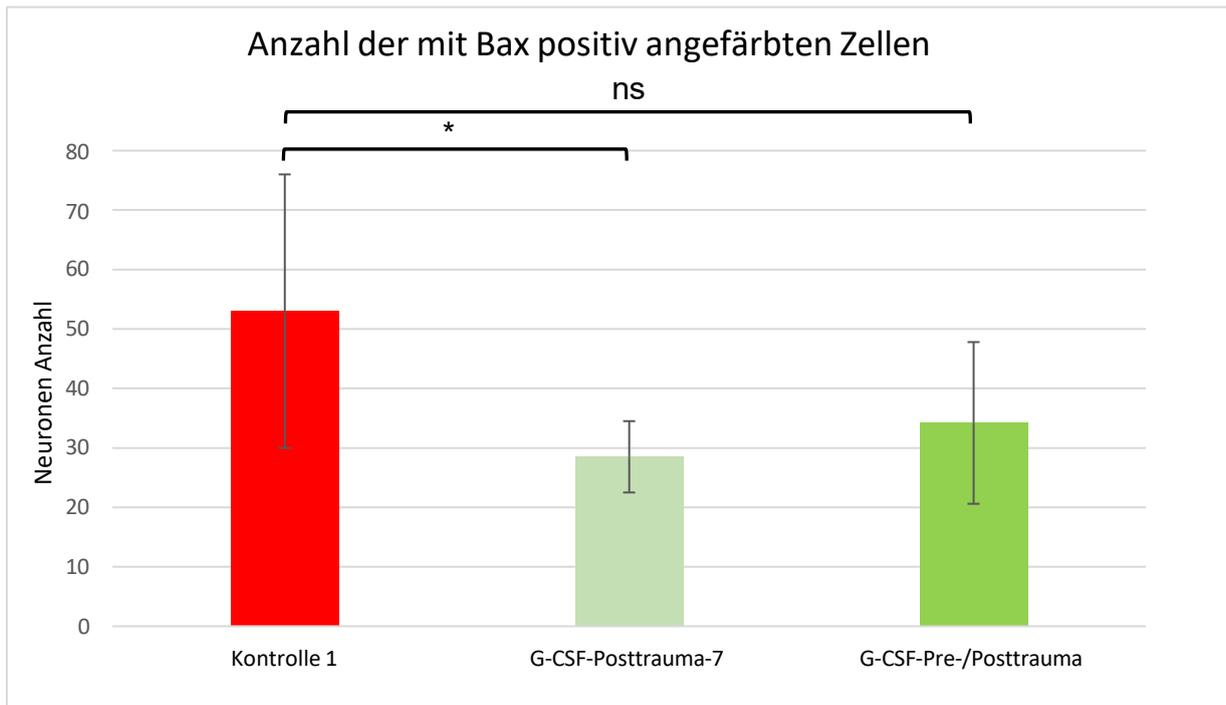


Abb. 17: Vergleich zwischen der Kontrollgruppe 1 und G-CSF-posttrauma 7-Gruppe und G-CSF-Pre-Posttrauma-Gruppe in Bezug auf der Bax positiven Zellen. Auf der X-Achse sind die einzelnen Gruppen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Nervenzellen.

Bei Tieren der Kontrollgruppe, die nach zwei Wochen geopfert wurden, zeigten sich $61,67 \pm 15$ mit Bax positiv angefärbte Neurone. Tiere mit G-CSF-Applikation nach dem Nervenstrauma verfügten zwei Wochen nach der Schädigung über 35 ± 19 positive Neuronen. Die Details sind Abb. 18 zu entnehmen. Der Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,03$).

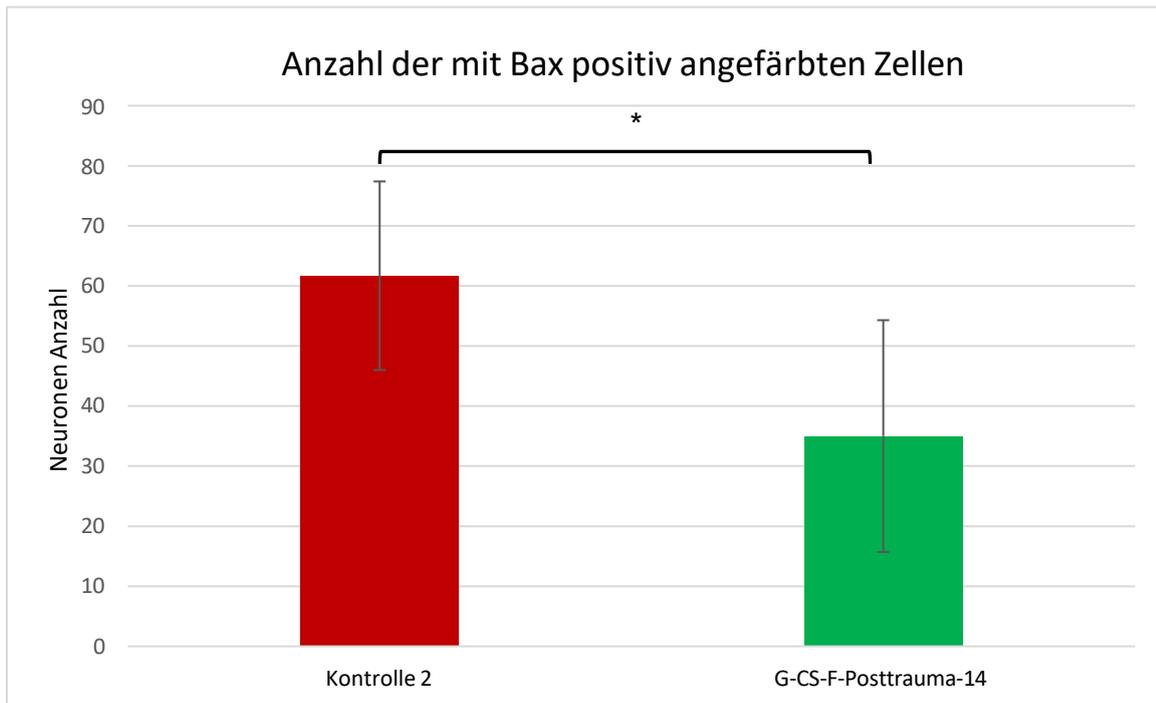


Abb. 18: Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und G-CSF-posttrauma 14-Gruppe in Bezug auf der Bax positiven Zellen. Auf der X-Achse sind die einzelnen Gruppen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Nervenzellen.

Zusätzlich konnte die externe G-CSF-Applikation die Expression von Caspase 3 unterdrücken. Die Grafiken 19 und 20 zeigen dies graphisch. Es konnten in allen G-CSF-Gruppen weniger Caspase-3-positive Zellen gezählt werden als in den Kontrollgruppen. Bei Tieren der Kontrollgruppe, die eine Woche nach Nervenschädigung und Applikation von isotoner Kochsalzlösung euthanasiert wurden, fanden sich 72 ± 38 mit Caspase 3 positiv gefärbten Neurone. Tiere mit G-CSF-Applikation nach Nervenstrauma zeigten nach einer Woche 41 ± 22 mit Caspase 3 positiv gefärbten Neurone. Der Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen lieferte allerdings kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p=0,1$). Solche, die vor wie auch nach dem Nervenstrauma G-CSF erhielten, verfügten nach einer Woche über 45 ± 22 mit Caspase 3 positive Neurone. Auch hier war der Unterschied statistisch nicht signifikant ($p=0,5$) (Abb. 19).

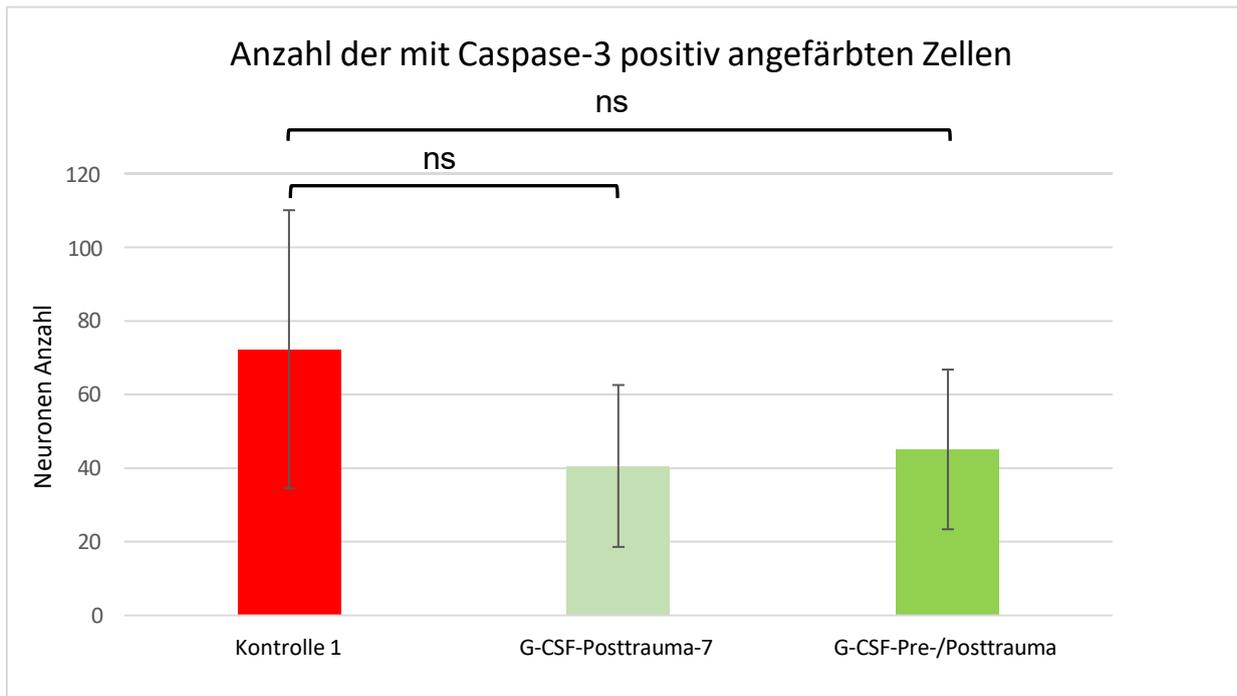


Abb. 19: Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und G-CSF-posttrauma 7-Gruppe sowie G-CSF-Pre-/Posttrauma-Gruppe in Bezug auf der Caspase 3 positiven Zellen. Auf der X-Achse sind die einzelnen Gruppen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Nervenzellen.

Bei Tieren der Kontrollgruppe 2, die nach zwei Wochen geopfert wurden, zeigten sich 65 ± 25 mit Caspase-3 positiv angefärbte Neuronen. Tiere mit G-CSF-Applikation nach dem Nervenstrauma verfügten zwei Wochen nach der Schädigung über 37 ± 14 positive Neuronen. Die Details sind Abb. 20 zu entnehmen. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p= 0,05$).

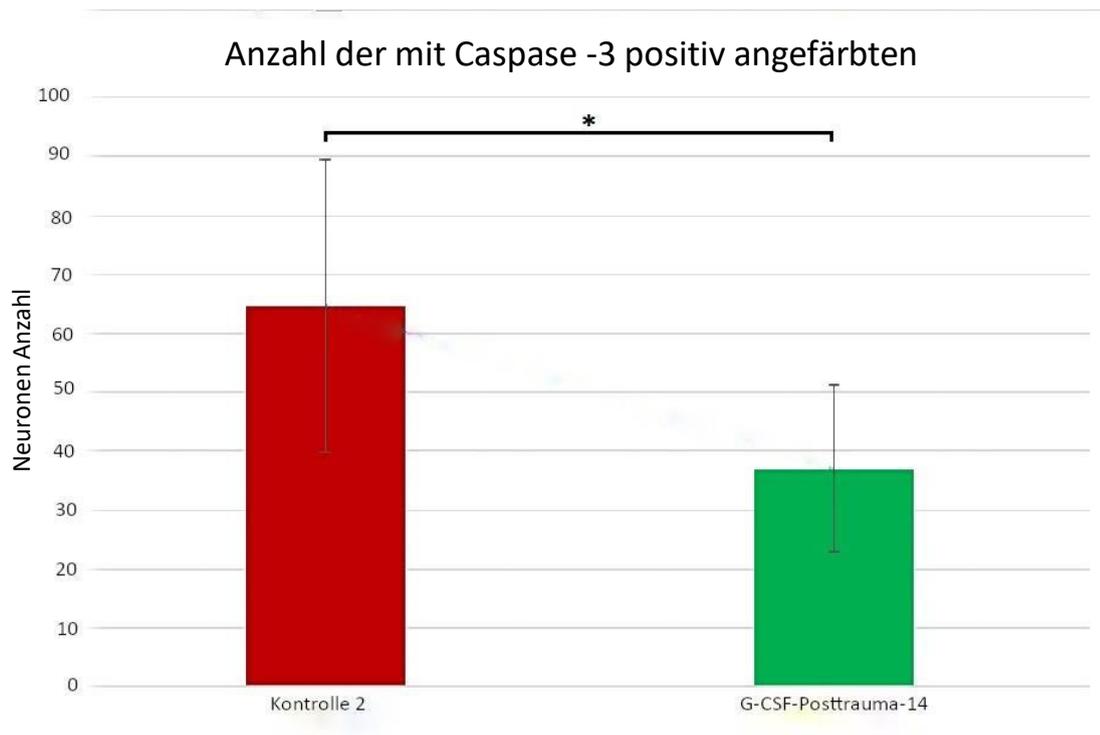


Abb. 20: Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und G-CSF-posttrauma 14-Gruppe in Bezug auf der Caspase 3 positiven Zellen. Auf der X-Achse sind die einzelnen Gruppen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Nervenzellen.

3. Fragestellung:

Welchen Einfluss übt die externe G-CSF-Gabe auf die Expression seines Rezeptors (G-CSF-R) im Ncl. cochlearis aus?

Auch auf seinen Rezeptor übte die externe G-CSF-Applikation einen positiven Effekt. Zum anderen konnte hier erstmals nachgewiesen werden, dass G-CSF-R im Ncl. cochlearis exprimiert wird. Es konnten signifikant mehr mit G-CSF-Rezeptor positiv angefärbte Zellen in den G-CSF-Gruppen beobachtet werden als in den Kontrollgruppen ($p < 0,05$). Ein Unterschied zwischen den einzelnen G-CSF-Gruppen konnte allerdings nicht festgestellt werden. Weder die präoperative G-CSF-Applikation noch die Langzeitbeobachtung binnen zwei Wochen war geeignet, einen besseren Einfluss auf die Expression des G-CSF-R auszuüben. In Abb. 21 und 22 wird die G-CSF-R-Expression im rechten Ncl. cochlearis in allen Versuchsgruppen verdeutlicht.

Bei Tieren der Kontrollgruppe, die eine Woche nach Nervenschädigung und Applikation von isotoner Kochsalzlösung euthanasiert wurden, fanden sich 53 ± 18 mit G-CSF-R positiv gefärbte Neurone. Tiere mit G-CSF-Applikation nach Nerventrauma zeigten nach einer Woche 94 ± 47 mit G-CSF-R positiv gefärbten Neurone. Der Unterschied zwischen den beiden

Ergebnissen lieferte kein signifikantes Ergebnis. Solche, die vor wie auch nach dem Nervenstrauma G-CSF erhielten, verfügten nach einer Woche über 95 ± 28 mit G-CSF-R positive Neurone. Tiere der Kontrollgruppe wiesen tendenziell weniger G-CSF-R positiv gefärbte Neurone auf 53 ± 18 (Abb. 21).

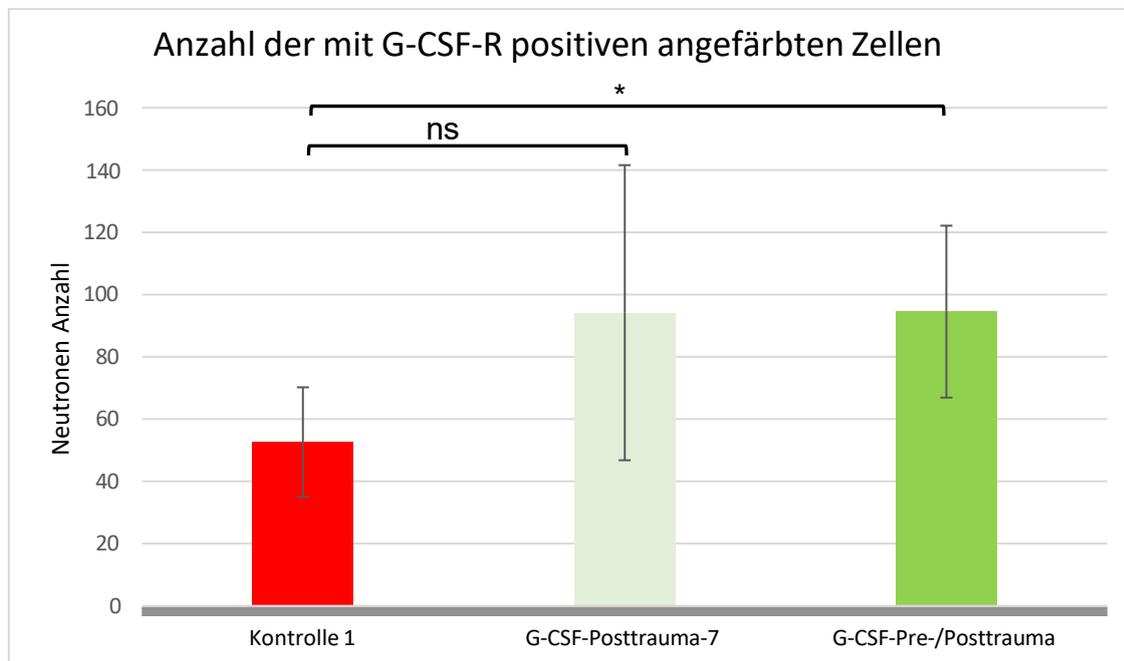


Abb. 21: Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und G-CSF-posttrauma 7-Gruppe in Bezug auf die G-CSF-R positiven Zellen. Auf der X-Achse sind die einzelnen Gruppen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Nervenzellen

Bei Tieren der Kontrollgruppe 2, die nach zwei Wochen geopfert wurden, zeigten sich 42 ± 23 mit G-CSF-R positiv angefärbte Neurone. Tiere mit G-CSF-Applikation nach dem Nervenstrauma verfügten zwei Wochen nach der Schädigung $93,83 \pm 45,31$ über positive Neuronen. Die Details sind Grafik 22 zu entnehmen. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p= 0,032$).

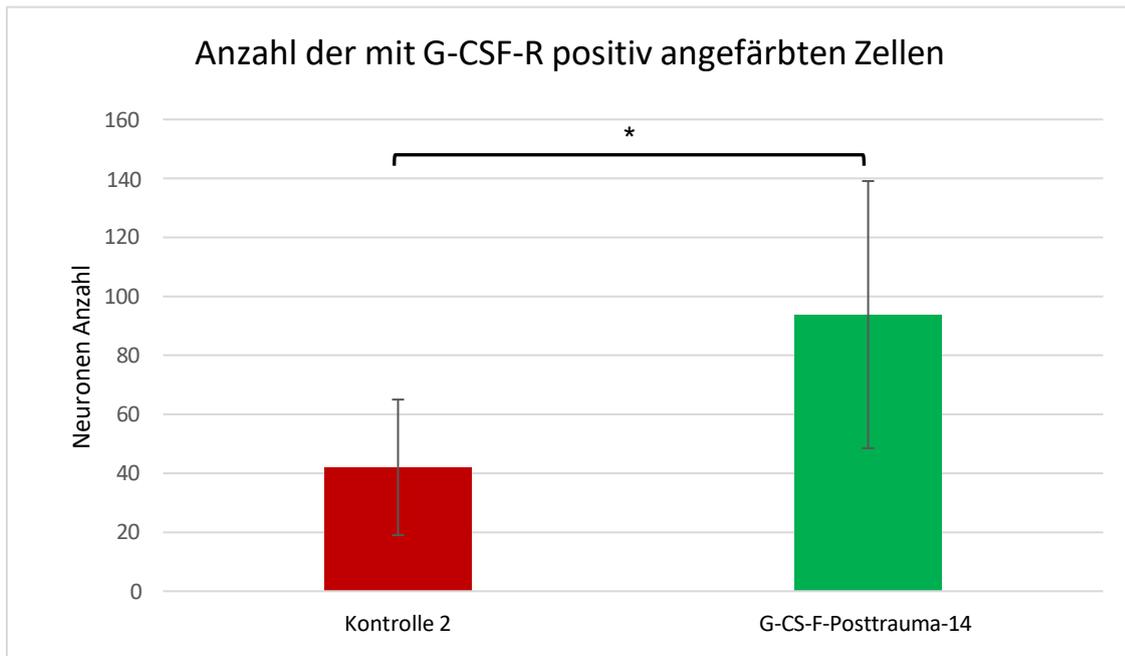


Abb. 22: Vergleich zwischen der Kontrollgruppe 2 und G-CSF- Posttrauma-14-Gruppe in Bezug auf den G-CSF-R positiven Zellen. Auf der X-Achse sind die einzelnen Gruppen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Nervenzellen.

4 DISKUSSION

Der Neuroprotektion des Nervus vestibulocochlearis nach Operationen im Kleinhirnbrückenwinkel kommt in der Medizin eine besondere Bedeutung zu. In dieser Studie wurde der neuroprotektive Effekt des G-CSF auf den N. vestibulocochlearis nach verursachtem Trauma im Rattenmodell untersucht. Im Folgenden werden die Methodik, mit der diese Arbeit angefertigt wurde, sowie die daraus resultierenden Ergebnisse diskutiert.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Warum G-CSF?

Dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor wurde als Wachstumsfaktor in zahlreichen Studien eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben. Das Peptid bindet an seinem Rezeptor und löst dort eine Unterdrückung des Zelluntergangs aus. So zeigten Studien eine neuroprotektive Wirkung nach externer G-CSF-Applikation in unterschiedlichen Modellen (u. a. Ischämie, Parkinson, ALS-Modell) [55–57,66–72,80,91]. Eine intravenöse G-CSF-Gabe belegte einen signifikanten neuroprotektiven Effekt in einem Schlaganfall-Modell in Ratten[53]. Auch in einer randomisierten kontrollierten Studie konnte diese G-CSF-Wirkung nachgewiesen werden. Hierfür wurden bei 7 Patienten mit akutem Schlaganfall 15µ/Kg Körpergewicht G-CSF subkutan täglich für 5 Tage innerhalb einer Woche appliziert. In der Follow-up-Untersuchung nach einem Jahr konnte bei den Patienten mit G-CSF-Gabe eine signifikante Besserung der neurologischen Funktion festgestellt werden. Allerdings konnte bildmorphologisch anhand einer cMRT-Bildgebung dieser Unterschied nicht festgestellt werden[92,93]. Die Wirkung von G-CSF auf den N. vestibulocochlearis bei dessen Schädigung ist jedoch bislang noch nicht umfassend untersucht worden. Der G-CSF ist gegenüber anderen Wachstumsfaktoren wie der Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und der Nerve growth factor (NGF) im Vorteil. Eine erfolgreiche neuroprotektive Therapie soll gut tolerierbar sein und keinen Einfluss auf die Physiologie des Gehirns haben. So hat der G-CSF ein geringeres Nebenwirkungsprofil, außerdem verfügt er über eine gute Penetration der Blut-Hirn-Schranke [51,94]. Die Arbeitsgruppe um Schneider et al. konnte zeigen, dass die Gehirn-Serum-Ratio vom iodierten G-CSF (^{131}I -G-CSF) nach intravenöser Gabe in 1, 4 und 24 h in Ratten in den verschiedenen Zeitpunkten signifikant hoch ist. Dies impliziert die G-CSF-Passage in der intakten Blut-Hirn-Schranke. Auch die Nebenwirkungen nach externer G-CSF-Gabe beschränken sich auf Übelkeit, Kopfschmerzen sowie Muskelschwäche, die mit nichtsteroidalen Schmerzmitteln gut behandelt werden können. Diese Nebenwirkungen treten meist auch nur vorübergehend nach der Injektion auf [57,95–97].

Insbesondere vorteilhaft ist die bereits etablierte Anwendung in der klinischen Medizin. So wurde G-CSF am 21.02.1991 bei der US Food and Drug Administration bei Neutropenie-Patienten zur Reduktion der Infektionsrate klinisch zugelassen[98]. Zusätzlich ist die indirekte Neuroprotektion des G-CSF über Ausschüttung anderer Nervenwachstumsfaktoren, wie BDNF, ein Vorteil und macht das G-CSF zu einem potenten und vielversprechenden neuroprotektiven Mittel bei Nervenschädigungen [99,100]. Bei dem Wachstumsfaktor BDNF ist die neuroprotektive Wirkung demgegenüber durch fehlende nachhaltige bzw. wiederholte Nachlieferung limitiert [101,102]. Zusätzlich weist BDNF eine reduzierte Penetration der Blut-Hirn-Schranke auf. Weiter schränken die zahlreichen Nebenwirkungen von BDNF seinen Einsatz als mögliche neuroprotektive Substanz ein. Eine mögliche Alternative wäre die Erhöhung der endogenen Konzentration von BDNF. Dies ist durch die externe G-CSF-Applikation zu erzielen [103].

4.1.2 Applikationsform

Als Applikationsform wurde hier eine subkutane Form gewählt. Dies ist in Bezug auf das neuroprotektive Potential des G-CSF aufgrund ihrer einfachen Handhabung eine der häufigsten angewandten Methoden im Tiermodell. So bleibt die Suche nach einer geeigneten Vene bei den kleinen Versuchstieren erspart [57,59,69,78,91,104]. Allerdings ist die Studienlage zur Untersuchung der geeigneten Applikationsform von G-CSF als Neuroprotektant dünn. Im Gesamten beschreibt die Literatur den Unterschied zwischen einer intravenösen bzw. subkutanen Gabe des G-CSF zur Behandlung einer chemotherapieinduzierten Neutropenie. In einer randomisierten Studie untersuchte man den Unterschied zwischen i.v. und s.c. an 120 Patienten mit chemotherapieinduzierter Neutropenie bei hämato-onkologischen Erkrankungen sowie Knochenmarktransplantation innerhalb eines Jahres. Appliziert wurde eine Filgrastim-(G-CSF) -Dosis von 5µg/kg pro Körpergewicht i.v. bzw. s.c. Die intravenöse Applikation erfolgte als Bolus. Hierbei konnte festgestellt werden, dass bei der i.v.-Applikation die Neutropenie länger anhielt als bei der sc-Applikation. Bezüglich Fieber und Hospitalisierungsdauer zeigte sich allerdings kein Unterschied. Eine mögliche Erklärung wäre in der Pharmakokinetik des G-CSF zu finden. So ist bei der i.v.-Applikation die Sättigung des G-CSF-Rezeptors schneller erreicht; somit bleibt der restliche G-CSF ungebunden. Dies führt zur Elimination des ungebundenen G-CSF über die Niere. Hingegen verfolgt die subkutane Applikation einen langsamen Release-Mechanismus. Schlussfolgernd maximiert die s.c.-Applikation den G-CSF-Effekt [105].

4.1.3 Dosierung

Standardmäßig werden in der Literatur Dosen von 10 µg bis 200 µg pro Kilogramm Körpergewicht beschrieben. So wurden in einem Rattenmodell bei perinataler Hypoxie Dosen

von 10, 30 und 50µg/kg KG einen Tag nach der Hirnschädigung appliziert [106]. In anderen Ischämie-Modellen wurde eine Dosis von 50µg/kg KG verwendet, allerdings mit verschiedenen Applikationszeitpunkten [68,107–115].

In einem Tiermodell der akuten zerebralen Ischämie wurden Ratten mit 100µg/kg KG G-CSF s.c. direkt nach der Schädigung für sieben Tage behandelt. Es konnte eine Reduktion des Infarkt Volumens sowie der nekrotischen Zellen nachgewiesen werden [116]. In einem anderen Modell der perinatalen Hypoxie wurden x Ratten mit 30µg/kg KG G-CSF i.p. einen Tag nach der Hypoxie für sechs Tage behandelt. Auch hier konnte ein positiver Effekt erzielt werden. So verbesserte die G-CSF-Applikation die kognitive Funktion [117]. Auch höhere Dosen von 200µg/kg KG wurden appliziert. So wurde in einem Hypoxie-Ischämie-Modell von neonatalen Mäusen diese Dosis s.c. fünf Mal binnen 24 Stunden innerhalb bestimmter Intervalle appliziert. Hier konnte allerdings kein positiver Effekt erzielt werden. Die G-CSF-Gabe zeigte keine Verbesserung der neurologischen Funktion und des Outcomes [118]. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass eine hohe G-CSF-Dosis zu einer Leukozytose führen kann [53,92]. Zusätzlich steigert sie Nebenwirkungen wie Übelkeit und Knochenschmerzen. So zeigte die Studie von Kang-Liu et al., dass bei einer Verwendung von 50µg/kg KG G-CSF im Vergleich zu einer Dosis von 100µg/kg KG keine Leukozytose und auch keine Nebenwirkungen auftreten. In einer früheren klinischen Studie in einem Schlaganfall-Modell konnte nachgewiesen werden, dass eine Dosis von 15µg/kg KG subkutan innerhalb 5 Tagen mit Knochenschmerzen und einer abnormalen Funktion der Leber assoziiert ist [119]. Eine niedrige Dosierung hingegen minimiert die Nebenwirkungen. Bei Parkinson-Patienten wurde eine G-CSF-Dosis von 5µg/kg KG für drei 6-Tage-Zyklen appliziert. 5 von 10 Patienten zeigten einen besseren Outcome und tolerierten die Medikation gut [120]. In einer ALS-Studie erfolgte die Applikation von 5µg/kg KG G-CSF jeden dritten Monat für 4 Tage innerhalb eines Jahres. Hier konnten auch eine gute Toleranz und weniger Nebenwirkungen erzielt werden [121]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine wiederholte G-CSF-Gabe in niedriger Dosierung sicherer ist als eine einfache Gabe in höherer Dosierung. Dadurch werden die Nebenwirkungen minimiert und ein besserer Outcome erzielt. Auch im Hinblick auf die kurze Halbwertszeit des G-CSF scheint eine wiederholte G-CSF-Gabe besser. In dieser Studie wurde daher eine Therapiedosis von 30 µg pro Kilogramm Körpergewicht verwendet.

4.1.4 Die vorherige G-CSF-Gabe (Pre-Dosis)

Eine der elementaren Hypothesen dieser Studie war, dass eine vorherige G-CSF-Applikation einen protektiven Effekt auf den N. vestibulocochlearis ausübt und eine Schädigung verhindert oder minimiert. Dies ist insofern wichtig, weil die Schädigung oft iatrogen erfolgt bei Operationen am Kleinhirnbrückenwinkel. So wäre eine präoperative Gabe von G-CSF ggf. in Kombination mit einer postoperativen Gabe von Vorteil. Diese Hypothese konnte in dieser

Studie nicht bestätigt werden. Eine präoperative Gabe des G-CSF erzielte ähnliche Ergebnisse wie eine postoperative Gabe. Die Begründung könnte an der kurzen Halbwertszeit von G-CSF liegen. Eine andere Erklärung wäre, dass der G-CSF seine Wirkung erst bei Schädigung entfalten kann.

4.1.5 Versuchstiere

In der experimentellen Forschung sind Mäuse und Ratten die meist verwendeten Tiere. Ratten haben grundsätzlich gegenüber Mäusen den Vorteil, dass sie größer sind; so lassen sich hier beispielsweise Verfahren wie die Mikrodissektion anwenden. Die Gattung der Ratten umfasst eine Reihe von Arten. Long-Evans-Ratten zum Beispiel werden meist im Rahmen der Verhaltens- und Adipositas-Forschung eingesetzt. In dieser Studie wurden Sprague-Dawley-Rassen als Versuchstiere verwendet. Die Anatomie des Hörorgans ist der des Menschen ähnlich. Sprague-Dawley-Ratten charakterisieren sich durch ihre zahme und einfache Handhabung. Außerdem erfolgte deren Entwicklung aus den Wistar-Ratten, welche sich aufgrund der ähnlichen Anatomie zum Menschen für Studien der Hörschädigung eignen [122].

4.1.6 Die Kraniektomie

Zur Darstellung des Nervus vestibulocochlearis erfolgte die Durchführung einer suboccipitalen Kraniektomie mithilfe eines Mikrobohrers. Entscheidend für den Verlauf der Operation waren die Lagerung der Tiere sowie der Umfang der Kraniektomie. Dieser musste möglichst groß gewählt werden, um den Verlauf der Operation zu erleichtern und den achten Hirnnerv darstellen zu können. Zusätzlich wurde bei den größeren Kraniektomien sowohl auf den Sinus transversus als auch den Sinus sigmoideus achtgegeben, da hier die Gefahr der Verletzung groß war und das Tamponieren mit Tabotamp unabdinglich für die Blutstillung ist. Sofern zu diesem Zeitpunkt die Nervschädigung noch nicht erfolgt ist, wird die weitere Operation aufgrund der vorangegangenen Blutung sowie entstandener Schwellungen sehr schwierig bis unmöglich. Literaturangaben hierzu sind bei der dünnen Datenlage nicht zu finden. Diese Erkenntnisse stammen aus der eigenen Erfahrung [86,123].

4.1.7 Die Nervenläsion

In dieser Studie erfolgte zum Setzen der Nervenläsion die partielle Trennung der Nervenfasern durch einen Wasserstrahldissektor. Diese Vorgehensweise charakterisiert sich durch eine gute Umsetzbarkeit sowie durch einen geringeren Zeit- und Umsetzungsaufwand, wie im Folgenden erläutert wird [123]. Laut Literatur kann eine Nervenschädigung in Tierexperimenten durch verschiedene Methoden verursacht werden. Roshal et al. beschreiben die Trennung des achten Hirnnervs in Ratten durch eine Mikroschere in mikrochirurgischer Technik [90]. Kermer et al. stellen die Schädigung des Optikus-Nervs im Rattenmodell durch

einfache Durchtrennung des Nervs dar [124,125]. Eine weitere Verfahrensweise zum Setzen einer Nervenläsion ist die Kompression des N. cochlearis. Hierbei wird eine L-förmige Compression-Recording-(CR)-Elektrode am Meatus acusticus internus platziert [126]. Die Schädigung erfolgt kontrolliert mittels Elektrophysiologie. Alternativen zum Setzen einer Nervenläsion und in der Literatur bisher beschrieben sind auch Methoden, die die versorgenden Gefäße unterbinden. Das heißt das Blutgefäß, das den Nerv versorgt, wird unterbunden bzw. koaguliert [127]. Speziell für die Schädigung am Cochlear-Nerv werden verschiedene Verfahren aufgeführt. Dazu zählen die intracochleare Injektion von Chemikalien sowie die Unterbindung der Blutzufuhr über der A. auditiva interna [128]. Durch eine ischämische Schädigung lässt sich das Ausmaß der Schädigung weniger gut steuern wie bei einer mechanischen Schädigung, weshalb in dieser Arbeit auf die Unterbindung der versorgenden Gefäße des Nervus cochlearis verzichtet wurde. Die Kompressionselektrode stellt die am besten steuerbare Methode dar, um Hirnnerven mechanisch zu schädigen. Dies ist allerdings mit großem zeitlichen und Umsetzungsaufwand verbunden. Eine gute Alternative mit besserer Umsetzungsmöglichkeit und geringerem zeitlichen Aufwand stellt die Schädigung durch den Wasserstrahldissektor dar, weshalb auf diese Verfahrensweise hier zurückgegriffen wurde, wie eingangs des Kapitels dargestellt [129,130]. In dieser Studie erfolgte die partielle Läsion des N. vestibulocochlearis mit dem Wasserstrahldissektor unter Verwendung einer Druckstärke von 8 bar. In einer Studie von Oertel et. al. zur Untersuchung des Einflusses des Wasserstrahldissektors auf den Cochlear-Nerv wurde festgestellt, dass eine Wasserdruckstärke von 8 bar zu einer Teilläsion des Nervs führt. Hingegen würde eine höhere Stärke zu einer kompletten Läsion des Nervs, eine geringere zu keiner Schädigung führen [84,131]. Eine Teilläsion des Nervs war in dieser Studie das Ziel. Dies ermöglicht die bessere Beurteilbarkeit von neuroprotektiven Substanzen, da durch eine Teilläsion eine Erholung des Nervs noch möglich ist [123,132]. Dies ist auch an der leichten Verbesserung der frühen akustisch evozierten Potenziale der Kontrollgruppe erkennbar.

4.1.8 Objektive Messung der Funktion des Nervs

Zur Messung der Funktion des achten Hirnnervs zählen die otoakustische Emission, Stapediusreflex Messung sowie die Hirnstammaudiometrie (BERA). In dieser Studie wurde die Hirnstammaudiometrie (BERA) zur Ableitung der frühen akustisch evozierten Potenziale (AEP) verwendet. Dieses Verfahren ist sensitiv bei Hirnstammläsionen und gut im Tiermodell etabliert [133]. Bei dem BERA-Verfahren werden akustische Signale (in dieser Studie in Form von Klickgeräuschen) über einen Kopfhörer abgegeben, wodurch ein Hörreiz ausgelöst wird. Das Antwortpotenzial wird dann im Hirnstamm angezeigt. Dieses Verfahren ist probandunabhängig, somit eignet es sich auch sehr gut zum Hörscreening bei Neugeborenen oder bei unkooperativen Patienten. Weitere Vorteile sind eine schnelle Durchführung sowie

die Tatsache, dass Hinweise zur geschädigten Seite geben werden [122]. Die Überprüfung der Hörfunktion der Ratten ist schwierig. Allerdings konnte dies mittels evozierten Potenzialen gemessen werden [115,134,135]. Die Durchführung der BERA in dieser Studie stellte die Arbeitsgruppe vor einige Herausforderungen, insbesondere aufgrund der fehlenden Etablierung der Methode bei Ratten, so zeigten manche Werte einen Diskrepanz und inkonklusiven Werten, allerdings durchschnittlich konnte eine Aussage in Bezug auf den Einfluss des G-CSF getroffen werden. Verschiedene Faktoren üben Einfluss auf die Resultate der BERA. Dazu zählen: Das Geschlecht sowie das Alter des Tieres, die Stresslevel (Handling, Transport, Anzahl der Tiere pro Käfig, Akklimatisierungszeit), die Umweltgeräusche, Das Model und Produktionsjahr des Messgeräts, der Elektroden Typ sowie Frequenz. Auch die Anästhesie, mit der das Tier narkotisiert wurde und die Temperatur des Tieres während der Messung spielen können die Ergebnisse der BERA beeinflussen [136].

Vor diesem Hintergrund wurde auf eine ausreichende und einheitliche Akklimatisierungszeit bei allen Versuchstieren geachtet sowie auf die gleiche Anzahl von Tieren pro Käfig. Auch erfolgte der Umgang mit den Tieren nur durch einen Untersucher; dieser sorgte für eine behutsame, homogene Behandlung, um den Stresslevel so minimal wie möglich zu halten [136–138]. Der Ratten-Typ spielt für die Ergebnisse der BERA ebenfalls eine Rolle. So zeigen Sprague-Dawley-Ratten im Vergleich zu Long-Evans-Ratten eine niedrigere Hörschwelle bei gleicher Frequenz [139]. Bezogen auf das Geschlecht, haben weibliche Ratten eine bessere Hörfähigkeit als männliche Genossen. Männliche Ratten haben längere Latenzen und kleinere Amplituden als weibliche. Deshalb soll bei Studien zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse das gleiche Geschlecht verwendet werden [140,141]. In dieser Arbeit wurden entsprechend nur männlicher Tiere verwendet. Interessanterweise macht sich dieser Unterschied erst ab einem Alter von 70 Tagen bemerkbar [142]. Bei der BERA werden Amplitude und Latenz der Antwort im Zeitbereich gemessen, wie aufgeführt. Da Latenzen sowie Amplituden sowohl von der Temperatur als auch vom verwendeten Anästhetikum abhängig sind, wurde in dieser Studie mithilfe einer Wärmeplatte sowie einer rektalen Temperatur-Messsonde auf eine konstante Temperatur bei allen Versuchstieren geachtet. Dies gestaltete sich aufgrund der Witterungsbedingungen mit extremen Hitzeperioden in dieser Zeit nicht immer einfach und könnte die Unterschiede in den einzelnen Messungen erklären [136,143–146]. Grundsätzlich herrscht bezogen auf die Amplituden der BERA eine höhere Variabilität bei den Tieren vor, was mit deren erhöhter Affektivität gegenüber Umweltgeräuschen zu erklären ist [147]. Mit steigender Reizintensität verringern sich die Latenzen, während sich die Amplituden erhöhen. Auch der Faktor Zeit spielt bei der Bewertung der Ergebnisse eine Rolle, also wann die Messungen durchgeführt wurden. So zeigten frühere Studien einen Zusammenhang zwischen der Messzeit und dem zirkadianen Rhythmus [136,148,149]. Des Weiteren wies eine Messung nach der Schädigung morgens eine bessere

Erholung des Nervs auf als Messungen bei den Tieren, die abends das Trauma erfuhren. So zeigte die Studie von Meltser et al. bei Mäusen mit einem morgens verursachten Geräuschtrauma (100 dB für 1 h) zwei Wochen nach dem Trauma eine bessere Erholung auf als bei Mäusen, welche das Trauma erst abends erfuhren; Letztere hatten zwei Wochen danach eine verlängerte ABR-Schwelle (10-20 dB). Aus diesem Grund soll die Messung zur selben Tageszeit durchgeführt werden [136,148,149]. Insgesamt sorgten verschiedene Faktoren wie Temperaturunterschiede, Umwelteinflüsse, das Einstellen der richtigen Messparameter und die richtige Messmethode beim Setzen der Markierung für die Wellen sowie das veraltete Modell des Messprogramms für einzelne Unplausibilitäten der Ergebnisse. Deswegen sollte in Folgestudien auf diese Punkte achtgegeben werden, um valide Ergebnisse zu bekommen [150]. Die typische Wellenformation besteht aus fünf bis sechs Wellen, entsprechend den akustisch stimulierten anatomischen Strukturen der Hörbahn. Da in Studien nachgewiesen wurde, dass der Wellen-IV-V-Komplex der Menschen der Welle IV von Ratte und Katze entspricht und die Welle II der Ratte der Welle III der Menschen entspricht, erfolgte für die Bewertung der BERA in dieser Studie die Beurteilung der Wellen II und IV. So resultierte die Durchtrennung des achten Hirnnervs in der Studie von Roshal et al. in einer Elimination der Wellen II und IV der BERA [87,90]. Auf die Beurteilung der Welle I wurde verzichtet, da mehrere frühere Studien nachgewiesen haben, dass Welle I auch nach Durchtrennung des Nervs weiterhin vorhanden ist. Beispielhaft konnte in der Studie von Buchwald und Huang nach Durchtrennung des Hörnervs einer Katze weiterhin die Welle I nachgewiesen werden. Maurer und Mika zeigten eine Persistenz der Welle I nach Durchtrennung des achten Hirnnervs im cerebellopontinen Winkel bei zwei Kaninchen [151]. Außerdem wandelte sich die verlängerte Latenz der Welle I 30 min nach Schädigung fast in ihre Ausgangswerte vor der Schädigung zurück [90].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

1. Fragestellung:

Welchen Nutzen zeigt die kontinuierliche Applikation von G-CSF auf die Neuroprotektion nach partieller Schädigung des N. vestibulocochlearis?

4.2.1 Diskussion der elektrophysiologischen Ergebnisse

Bei der Auswertung der FAEPs fehlt auf, dass G-CSF zu einer Steigerung der Amplitude II nach Setzen der Nervenläsion führte. Somit kann eine Erholung sowie Regeneration des Nervus cochlearis angenommen werden. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den G-CSF-Gruppen und der Kontrollgruppe. Bezüglich Amplitude IV findet sich ein Trend zugunsten der beiden G-CSF-Gruppen, verglichen mit der Kontrollgruppe. Eine genauere Auswertung war hier aufgrund von technischen Fehlern (wie bereits in Kapitel 5.1.8 erwähnt) nicht möglich.

4.2.2 Diskussion der histologischen Ergebnisse

Anhand der histologischen Ergebnisse lässt sich ein neuroprotektiver Nutzen des G-CSF auf den partiell geschädigten N. vestibulocholearis beobachten. Dies äußert sich in einer vermehrten Neuronenzahl im Ncl. cochlearis des geschädigten Nervs. In allen drei G-CSF-Gruppen im Vergleich zu den Gruppen ohne G-CSF-Applikation zeigte sich ein statistisch signifikantes Ergebnis. In Bezug auf die zusätzliche präoperative Gabe von G-CSF lässt sich kein Unterschied im Vergleich zur alleinigen postoperativen Gabe feststellen. Dies könnte an einem fehlenden Stimulus liegen, wie z. B. einem Nerven trauma, sodass die Interaktion zwischen dem G-CSF und seinem Rezeptor präoperativ nicht aktiviert werden konnte. Eine andere Erklärung für eine fehlende Aktivierung des G-CSF-R wäre das Nichtvorhandensein von ausreichendem G-CSF als Ligand, sodass in Folgestudien eine höhere G-CSF-Dosierung präoperativ versucht werden könnte. Theoretisch könnte der fehlende präoperative Effekt auch an der kurzen Halbwertszeit von G-CSF liegen, diese beträgt 4 Stunden [77,80]. Morphologisch konnte auch eine vermehrte Dichte der Mikroglia/Makrophagen in den G-CSF-Gruppen, verglichen mit den Kontrollgruppen, beobachtet werden. Dies bestätigte die Hypothese, dass einer der Wirkmechanismen des G-CSF die Induktion neuroprotektiver Faktoren wie BDNF und NT-3 ist, die u. a. von den Mikrogliazellen ausgeschüttet werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der G-CSF vermutlich sowohl direkt neuroprotektiv wirkt als auch über eine indirekte Komponente verfügt, indem er die Ausschüttung weiterer neuroprotektiver Faktoren induziert. Die exogene Gabe von BDNF und NT-3 als neuroprotektive Substanzen war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, allerdings

waren die Nebenwirkungen nicht günstig und eine signifikant klinisch beobachtbare Erholung konnte nicht beobachtet werden [152–157].

2.Fragestellung:

Welchen Einfluss entfaltet die kontinuierliche Applikation von G-CSF auf die Apoptose-Marker Bcl-2, Bax und Caspase-3?

Die Applikation von G-CSF fördert die Bcl-2-Expression und unterdrückt die Expression von Bax. Dies führt zur Annahme, dass der G-CSF die Apoptose hemmt. Diese Hypothese konnte in dieser Studie bestätigt werden. So zeigten alle G-CSF-Gruppen mehr Bcl-2-positive Zellen als die Kontrollgruppen. In Bezug auf Bax konnten weniger Bax-positive Zellen in den G-CSF-Gruppen nachgewiesen werden. Auch andere Arbeitsgruppen kamen genau zu dieser Schlussfolgerung [53,68,73,158–161]. Als weiterer Apoptose-Marker wurde in dieser Studie die Caspase-3 betrachtet. Auch hier übte die exogene G-CSF-Applikation einen positiven Einfluss aus. So wurden in allen G-CSF-Gruppen weniger Caspase-3-positive Zellen gefunden. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass eine verminderte Expression der Caspase-3 die Apoptose unterdrückt. Somit wird hier noch einmal bestätigt, dass die endogene G-CSF-Expression nicht ausreichend ist, um eine signifikant klinisch bemerkbare Erholung des achten Hirnnervs zu erzielen. Vielmehr ist eine fördernde exogene G-CSF-Gabe nötig. Die exogene G-CSF-Expression soll auch kontinuierlich erfolgen, damit gewährleistet wird, dass ausreichend Liganden am G-CSF-Rezeptor andocken können und damit eine neuroprotektive Wirkung ermöglicht wird.

3.Fragestellung:

Welchen Einfluss übt die externe G-CSF-Gabe auf die Expression seines Rezeptors (G-CSF) im Ncl. cochlearis aus?

In Bezug auf den G-CSF-Rezeptor konnte eine Expression im Ncl. cochlearis festgestellt werden, die bislang nur in anderen Regionen des zentralen Nervensystems nachgewiesen wurde [162]. In diese konnten in den G-CSF-Gruppen mehr G-CSF-R-positive Zellen festgestellt werden. Die Überexpression des G-CSF-Rezeptors in den G-CSF-Gruppen deutet darauf hin, dass die exogene G-CSF-Applikation die Expression seines Rezeptors zusätzlich verstärkt und dadurch wiederum die Wirkung des G-CSF ermöglicht wird.

4.3 Kritische Begutachtung der eigenen Untersuchungen

Die Auswertung der histologischen und immunhistologischen Schnitte wurde in dieser Studie manuell und ohne Verblindung vorgenommen; eine maschinelle Auswertung oder eine Verblindung der Auswertung durch einen anderen Untersuchenden würden validierter Ergebnisse liefern.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lassen sich der neuroprotektive und der anti-apoptotische Effekt des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors auf den partiell geschädigten achten Hirnnerv bestätigen. Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass der G-CSF einen anti-apoptotischen Effekt auf den N. vestibulocochlearis ausübt. Somit könnte der G-CSF als potenzielles künftiges Medikament nicht nur die Prognose bei Operationen im Kleinhirnbrückenwinkel verbessern, sondern auch die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise ALS, MS oder Parkinson, begünstigen. Er könnte aber auch für die Behandlung von Querschnittslähmungen eine günstige Behandlungsoption darstellen. Da der G-CSF bereits im klinischen Alltag Anwendung findet, wäre die Umsetzung hin zu einem neuroprotektiven Mittel in klinischen Studien nicht sehr aufwändig. Allerdings bedarf es intensiverer Arbeiten, bis das Medikament in diesem Rahmen standardmäßig eingesetzt werden kann. Hierzu sind Fragen bezüglich Dosis und Wirkweise sowie des Verabreichungsweges noch nicht vollständig beantwortet worden.

4.5 Ausblick

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie ist eine neuroprotektive Wirkung des G-CSF auf den N. vestibulocochlearis und seinen Kernbereich, den Ncl. cochlearis, nachweisbar.

Allerdings liefert die hier dargestellte Untersuchung über die molekulare Wirkweise des G-CSF keine genauen Informationen, sodass weitere Studien über diesen Sachverhalt nötig sind.

Folgende Fragestellungen können Anhaltspunkte für Folgestudien darstellen:

1. Ist der Stat-3-Signalweg einer der Angriffspunkte des G-CSF?
2. Wie beeinflusst der G-CSF die Expression von BDNF und NT-3?
3. Welche Rolle übt der G-CSF auf den Proliferationsmarker Iba-2 aus?

Zur Beantwortung der Fragen ist das histologische Material geeignet, das in dieser Studie verwendet wurde.

Darüber hinaus wäre eine weitere Studie nötig, welche die richtige Dosis für die Entfaltung der Wirkung von G-CSF untersucht.

Aufgrund der im Rahmen der vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnisse ist festzuhalten, dass der G-CSF in der Langzeitbeobachtung, hier zwei Wochen, gegenüber

einer Woche keinen Unterschied aufweist. Eine mögliche Erklärung liegt in der kurzen Halbwertszeit des Medikaments. Zukünftig wäre deshalb die Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung des G-CSF unter Verwendung des pegylierten G-CSF angebracht, da dieser eine längere Halbwertszeit aufweist. Alternativ könnte eine längere Behandlung mit G-CSF über zwei Wochen hinaus versucht werden. Außerdem könnte die Wirkung des G-CSF mit BDNF als Kombinationstherapie untersucht werden. Ein sehr wichtiger Aspekt für Folgestudien bestünde darin, zu analysieren, inwiefern der G-CSF die Nekrose der Zellen beeinflusst. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die fehlende klinische Erholung, da der G-CSF womöglich nur die Apoptose unterdrückt. Dann wäre eine Therapiekombination mit Substanzen, die der Nekrose entgegenwirken, sinnvoll. Zudem empfiehlt es sich, zu prüfen, in welcher Hinsicht die Mikroglia die Effizienz des G-CSF prägen. Hierzu wäre eine In-vivo-Studie angebracht, welche die isolierte Wirkung des G-CSF auf die Mikroglia betrachtet.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bordoni B, Mankowski NL, Daly DT. Neuroanatomy, Cranial Nerve 8(Vestibulocochlear) [Updated 2023 May 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537359/>.
2. Benoudiba F, Toulgoat F, Sarrazin JL (2013) The vestibulocochlear nerve (VIII). Diagnostic and Interventional Imaging 94:1043-1050.
3. Schünke/Schulte/Schumacher/Voll/Wesker, Prometheus LernAtlas der Anatomie. Kopf, Hals und Neuroanatomie, 6.Auflage, Thieme 2022 Abb. A.4.18.E.a (Pars vestibularis)
4. Swartz, J.D., Lesions of the cerebellopontine angle and internal auditory canal: diagnosis and differential diagnosis. Semin Ultrasound CT MR, 2004. 25(4): p. 332-52.
5. Berlit P (2019) Erkrankungen des N. vestibulocochlearis. Abruf unter: https://www.springermedizin.de/emedpedia/klinische-neurologie/erkrankungen-des-n-vestibulocochlearis? epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-44768-0_54.
6. Samii M., Gerganov V. (2013) Microsurgical Anatomy of the Cerebellopontine Angle by the Retrosigmoid Approach. Surgery of Cerebellopontine Lesions (9-72). Springer. Abruf unter: [10.1007/978-3-642-35422-9_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-35422-9_2).
7. Jeong SH, Kim HJ, Kim JS. Vestibular neuritis. Semin Neurol. 2013 Jul;33(3):185-94. doi: [10.1055/s-0033-1354598](https://doi.org/10.1055/s-0033-1354598). Epub 2013 Sep 21. PMID: 24057821.
8. Taxak P, Ram C (2020) Labyrinthitis and Labyrinthitis Ossificans - A case report and review of the literature. Journal of radiology case reports 14(5):1-6. <https://doi.org/10.3941/jrcr.v14i5.3706>.
9. Haid CT (1990) Labyrinthitis. In: Vestibularisprüfung und vestibuläre Erkrankungen. Springer, Berlin, Heidelberg.
10. Quast M, Liebegott G. Zur Pathogenese des Wallenberg-Syndroms [Pathogenesis of Wallenberg's syndrome]. Beitr Pathol. 1975;154(3):308-23. German. PMID: 1131156.
11. Gottschalk D, Witting C, Neu O. Das Wallenberg-Syndrom. Eine typische Komplikation der Hypertonie [Wallenberg's syndrome (author's transl)]. Dtsch Med Wochenschr. 1981 May 22;106(21):681-3. German. doi: [10.1055/s-2008-1070380](https://doi.org/10.1055/s-2008-1070380). PMID: 7238307.
12. Amarenco P, Hauw JJ, Hélin D, Duyckaerts C, Roullet E, Laplane D, Gautier JC, Lhermitte F, Buge A, Castaigne P. Les infarctus du territoire de l'artère cérébelleuse postéro-inférieure. Etude clinico-pathologique de 28 cas [Cerebellar infarction in the area of the posterior cerebellar artery. Clinicopathology of 28 cases]. Rev Neurol (Paris). 1989;145(4):277-86. French. PMID: 2660219.
13. Thapliyal K, Garg A, Singh V P (2022) Lateral medullary syndrome: Case report and review of literature. Journal of family medicine and primary care 11(11):7438-7441. https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_667_22.
14. Strupp M., Lopez-Escamez A., Kim S. (2016). Vestibular paroxysmia: Diagnostic criteria. Journal of vestibular research : equilibrium & orientation, 26(5-6), 409–415. <https://doi.org/10.3233/VES-160589>.

15. Rosahl SK, Samii M. Tumore des Kleinhirnbrückenwinkels. In: Moskopp D, Wassmann M, eds. *Klinische Neurochirurgie*. 2nd ed. Stuttgart, New York: Schattauer; 2004. p. 461-72.
16. Hassepass F, Bulla SB, Aschendorff A, Maier W. Vestibularisschwannom: Teil I: Epidemiologie und Diagnostik [Vestibular schwannoma: Part I: epidemiology and diagnostics]. *HNO*. 2012 Sep;60(9):837-44; quiz 845-6. DOI: 10.1007/s00106-012-2533-y.
17. Moffat DA, Ballagh RH. Rare tumours of the cerebellopontine angle. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1995;7:28–41.
18. Bonneville F, Sarrazin JL, Marsot-Dupuch K, Iffenecker C, Cordoliani YS, Doyon D, et al. Unusual lesions of the cerebellopontine angle: A segmental approach. *Radiographics*. 2001;21:419–38.
19. Lalwani AK. Meningiomas, epidermoids, and other nonacoustic tumors of the cerebellopontine angle. *Otolaryngol Clin North Am*. 1992;25:707–28.
20. Grey PL, Moffat DA, Hardy DG. Surgical results in unusual cerebellopontine angle tumours. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1996;21:237–43.
21. Brunori A, Scarano P, Chiappetta F. Non-acoustic neuroma tumor (NANT) of the cerebello-pontine angle: A 15-year experience. *J Neurosurg Sci*. 1997;41:159–68.
22. Kankane, V. K., Warade, A. C., & Misra, B. K. (2019). Nonvestibular Schwannoma Tumors in the Cerebellopontine Angle: A Single-Surgeon Experience. *Asian journal of neurosurgery*, 14(1), 154–161. https://doi.org/10.4103/ajns.AJNS_335_17.
23. Rosahl, S., Bohr, C., Lell, M., Hamm, K., & Iro, H. (2017). Diagnostics and therapy of vestibular schwannomas - an interdisciplinary challenge. *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery*, 16, Doc03. <https://doi.org/10.3205/cto000142>.
24. Hardy D G, Baguley D, Moffat D (1989) Surgery for acoustic neurinoma. An analysis of 100 translabyrinthine operations. *Journal of neurosurgery* 71(6):799-804. <https://doi.org/10.3171/jns.1989.71.6.0799>.
25. Selesnick S H, Jackler R K (1992) Clinical manifestations and audiologic diagnosis of acoustic neuromas. *Otolaryngologic clinics of North America* 25(3):521-551.
26. Gugel I, Grimm F, Zipfel J (2020) Age at Onset and Presenting Symptoms of Neurofibromatosis Type 2 as Prognostic Factors for Clinical Course of Vestibular Schwannomas. *Cancers* 12(9):2355. <https://doi.org/10.3390/cancers12092355>.
27. Strasilla, C., Sychra, V. Bildgebende Diagnostik des Vestibularisschwannoms. *HNO* 65, 373–380 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00106-016-0227-6>.
28. Midyett F A, Mukherji S K (2020) CPA Meningioma. In: *Skull Base Imaging*. Springer, Cham, S. 61-65.
29. Ramos-Fresnedo A, Trifiletti D, Jentoft, M (2020) Multiple meningiomas: does quantity matter? a population-based survival analysis with underlined age and sex differences. *Journal of neuro-oncology* 149(3):413-420. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03620-7>.

30. Moriyama T, Fukushima T, Asaoka K, Roche PH, Barrs DM, McElveen JT Jr (2002) Hearing preservation in acoustic neuroma surgery: importance of adhesion between the cochlear nerve and the tumor. *Journal of Neurosurgery* 97:337-340.
31. Nonaka Y, Fukushima T, Watanabe K, Friedman AH, Sampson JH, McElveen JT Jr, Cunningham CD 3rd, Zomorodi AR (2013) Contemporary surgical management of vestibular schwannomas: analysis of complications and lessons learned over the past decade. *Neurosurgery* 72:103-115.
32. Wanibuchi M, Fukushima T, McElveen JT Jr, Friedman AH (2009). Hearing Preservation in Surgery for Large Vestibular Schwannomas. *Journal of Neurosurgery* 111:845-854.
33. Arts HA, Telian SA, El-Kashlan H, Thompson BG (2006) Hearing preservation and facial nerve outcomes in vestibular schwannoma surgery: results using the middle cranial fossa approach. *Otology & Neurotology* 27:234-241.
34. You YP, Zhang JX, Lu AL, Liu N (2013) Vestibular schwannoma surgical treatment. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19:289-293.
35. Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov AO, Barker FG 2nd, Halpin C, Padera TP, Tyrrell A, Sorensen AG, Jain RK, di Tomaso E (2009) Hearing improvement after bevacizumab in patients with neurofibromatosis type 2. *New England Journal of Medicine* 361:358-367.
36. Bae C, Na H, Choi Y (2022) Current diagnosis and treatment of vestibular neuritis: a narrative review. *Journal of Yeungnam medical science* 39(2):81-88. <https://doi.org/10.12701/yujm.2021.01228>.
37. Lui F, Tadi P, Anilkumar A (2023) Wallenberg Syndrome. StatPearls Publishing. Urban P, Brüning R (2018) Vestibularisparoxysmie und paroxysmaler Tinnitus. *Nervenarzt* 89:204-206 <https://doi.org/10.1007/s00115-017-0295-1>.
38. Urban P, Brüning R (2018) Vestibularisparoxysmie und paroxysmaler Tinnitus. *Nervenarzt* 89:204-206 <https://doi.org/10.1007/s00115-017-0295-1>.
39. Apicella G, Paolini M, Krengli M (2016) Radiotherapy for vestibular schwannoma: Review of recent literature results. *Reports of practical oncology and radiotherapy: journal of Greatpoland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology* 21(4):399-406. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2016.02.002>.
40. Rahi, V., Jamwal, S. & Kumar, P. (2021) Neuroprotection through G-CSF: recent advances and future viewpoints. *Pharmacol. Rep* 73, 372–385. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00201-3>.
41. Dong F, Lerner 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* 95:1656-62.
42. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, Lilleby K, Longin K, et al. (1993). Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 81:3158-63.
43. Diederich K, Sevimli S, Dorr H, Kusters E, Hoppen M. (2009). The role of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in the healthy brain: a characterization of G-CSF-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society. for Neuroscience* 29:11572-81.

44. Demetri GD, Griffin JD. (1991). Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78:2791-808.
45. 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. *The Lancet* 2:891-895.
46. 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. *The Lancet* 339:640-644.
47. Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, Long GD, Negrin RS. (1993). Granulocyte colony-stimulating factor „mobilized“ peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 81:2031-5.
48. McCullough J, Clay M, Herr G, Smith J, Stroncek D. Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on potential normal granulocyte donors. *Transfusion*. 1999 Oct;39(10):1136-40. doi: 10.1046/j.1537-2995.1999.39101136.x. PMID: 10532609.#.
49. Khoury, H., Adkins, D., Brown, R. Adverse side-effects associated with G-CSF in patients with chronic myeloid leukemia undergoing allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25, 1197–1201 (2000). <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702423>.
50. 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. *Neurobiology of Aging* 28:1258-1269.
51. Schneider A, Kruger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C. 2005. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *The Journal of clinical investigation* 115:2083-98.
52. 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* 143:965-74.
53. Schäbitz, W-R & Kollmar, Rainer & Schwaninger, Markus & Jüttler, Eric & Bardutzky, J & Schölzke, M.N. & Sommer, Clemens & Schwab, S. (2003). Neuroprotective Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke; a journal*.
54. Meuer K., Pitzer C., Teismann P. (2006), Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 97: 675-686. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03727.x>.
55. Song, Shijie & Sava, Vasyl & Rowe, Amanda & Li, Kunyu & Cao, Chuanhai & Mori, Takashi & Sanchez-Ramos, Juan. (2010). Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) enhances recovery in mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 487. 153-7. 10.1016/j.neulet.2010.10.012.
56. Safari, M., Jafari, B., Zarbakhsh, S., Sameni, H., Vafaei, A. A., Mohammadi, N. K., & Ghahari, L. (2016). G-CSF for mobilizing transplanted bone marrow stem cells in rat model of Parkinson's disease. *Iranian journal of basic medical sciences*, 19(12), 1318–1324. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2016.7918>.
57. Tsai, S. T., Chu, S. C., Liu, S. H., Pang, C. Y., Hou, T. W., Lin, S. Z., & Chen, S. Y. (2017). Neuroprotection of Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Early Stage

Parkinson's Disease. *Cell transplantation*, 26(3), 409–416.
<https://doi.org/10.3727/096368916X694247>.

58. Prakash A, Medhi B, Chopra K. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid- β induced experimental model of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;110:46–57.
59. Tsai KJ, Tsai YC, Shen CK (2007) G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease. *Journal of Experimental Medicine* 204:1273-1280.
60. Barber, R. C., Edwards, M. I., Xiao, G., Huebinger, R. M., Diaz-Arrastia, R., Wilhelmsen, K. C., Hall, J. R., & O'Bryant, S. E. (2012). Serum granulocyte colony-stimulating factor and Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra*, 2(1), 353–360.
61. Wu, C. C., Wang, I. F., Chiang, P. M., Wang, L. C., Shen, C. J., & Tsai, K. J. (2017). G-CSF-mobilized Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Replenish Neural Lineages in Alzheimer's Disease Mice via CXCR4/SDF-1 Chemotaxis. *Molecular neurobiology*, 54(8), 6198–6212. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0122-x>.
62. Ridwan, S., Bauer, H., Frauenknecht, K., Hefti, K., von Pein, H., & Sommer, C. J. (2014). Distribution of the hematopoietic growth factor G-CSF and its receptor in the adult human brain with specific reference to Alzheimer's disease. *Journal of anatomy*, 224(4), 377–391. <https://doi.org/10.1111/joa.12154>.
63. Sanchez-Ramos, J., Cimino, C., Avila, R., Rowe, A., Chen, R., Whelan, G., Lin, X., Cao, C., & Ashok, R. (2012). Pilot study of granulocyte-colony stimulating factor for treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 31(4), 843–855. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120196>.
64. Komaki, A., Shahidi, S., Hashemi-Firouzi, N., Rafat, Z., Keymoradzadeh, A., & Golipoor, Z. (2022). Combined Effect of Co-administration of Stromal Cell-Derived Factor-1 and Granulocyte-Colony Stimulating Factor on Rat Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 16, 796230. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.796230>.
65. Jiang, H., Liu, C. X., Feng, J. B., Wang, P., Zhao, C. P., Xie, Z. H., Wang, Y., Xu, S. L., Zheng, C. Y., & Bi, J. Z. (2010). Granulocyte colony-stimulating factor attenuates chronic neuroinflammation in the brain of amyloid precursor protein transgenic mice: an Alzheimer's disease mouse model. *The Journal of international medical research*, 38(4), 1305–1312. <https://doi.org/10.1177/147323001003800412>.
66. 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 i.
67. Solaroglu I, Cahill J, Tsubokawa T, Beskonakli E, Zhang JH (2009) Granulocyte colony-stimulating factor protects the brain against experimental stroke via inhibition of apoptosis and inflammation. *Neurological Research* 31:167-172.
68. 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 Research* 1145:227-238.
69. 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. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64:763-769.

70. Sugiyama, Y., Yagita, Y., Oyama, N., Terasaki, Y., Omura-Matsuoka, E., Sasaki, T., & Kitagawa, K. (2011). Granulocyte colony-stimulating factor enhances arteriogenesis and ameliorates cerebral damage in a mouse model of ischemic stroke. *Stroke*, 42(3), 770–775.
71. Yang, Y. N., Lin, C. S., Yang, C. H., Lai, Y. H., Wu, P. L., & Yang, S. N. (2013). Neurogenesis recovery induced by granulocyte-colony stimulating factor in neonatal rat brain after perinatal hypoxia. *Pediatrics and neonatology*, 54(6), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.04.011>.
72. Fathali, N., Lekic, T., Zhang, J. H., & Tang, J. (2010). Long-term evaluation of granulocyte-colony stimulating factor on hypoxic-ischemic brain damage in infant rats. *Intensive care medicine*, 36(9), 1602–1608. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-1913-6>.
73. Li L, Klebe D, Doycheva D. G-CSF ameliorates neuronal apoptosis through GSK-3 β inhibition in neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp Neurol*.
74. Gibson CL, Bath PMW, Murphy SP. G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*.
75. Huang X, Liu Y, Bai S, Peng L, Zhang B, Lu H. Granulocyte colony stimulating factor therapy for stroke: a pairwise meta-analysis of randomized controlled trial. *PLoS ONE*. 2017;12(4):e0175774.
76. Dörthe Keiner, Jan Philipp Kühn, Alexandra Huber, Joachim Oertel Antiapoptotic Effect of Granulocyte-Colony Stimulating Factor After Peripheral Nerve Trauma.
77. Pitzer C, Klusmann 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. *Journal of Neurochemistry* 113:930-94.
78. 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. *Neuros*.
79. Khatibi N.H. (2011) Granulocyte Colony-Stimulating Factor Treatment Provides Neuroprotection in Surgically Induced Brain Injured Mice. In: Zhang J., Colohan A. (eds) *Intracerebral Hemorrhage Research. Acta Neurochirurgica Supplementum*, vol 111.
80. 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.
81. Salamone P, Fuda G, Casale F, Marrali G, Lunetta C, Caponnetto C. G-CSF (filgrastim) treatment for amyotrophic lateral sclerosis: protocol for a phase II randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel group, multicentre clinical study (STEMALS-II trial). *BMJ-Open*. 2020;10(3):e034049.
82. Wen YT, Huang TL, Huang SP, Chang CH, Tsai RK. Early applications of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) can stabilize the blood-optic-nerve barrier and ameliorate inflammation in a rat model of anterior ischemic optic neuropathy (rAION). .

83. Ding W, Li X, Pan J, Zhang P, Yin S, Zhou X, Li J, Wang L, Wang X, Dong J. Repair Method for Complete High Ulnar Nerve Injury Based on Nerve Magnified Regeneration. *Ther Clin Risk Manag.* 2020 Mar 3;16:155-168. doi: 10.2147/TCRM.S237851. PMID: 32184608; PMCID: PMC7060778.
84. Tschan C, Gaab MR, Kraus JK, Oertel J (2009) Waterjet dissection of the vestibulocochlear nerve: an experimental study. *Journal of Neurosurgery.*
85. 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. *Journal of molecular neuroscience* : MN 51:127-37.
86. Montibeller, G.MD, Schackmann, B.MD, Urbschat, S.PhD, & Oertel, J. K.MD. (2017). Effect of granulocyte colony–stimulating factor on the cochlear nuclei after creation of a partial nerve lesion: an experimental study in rats, *Journal of Neurosurgery JNS.*
87. Sekiya T, Shimamura N, Yagihashi A, Suzuki S (2002) Axonal injury in auditory nerve observed in reversible latency changes of brainstem auditory evoked potentials (BAEP) during cerebellopontine angle manipulations in rats. *Hearing Research* 173:91-99.
88. Swanson LW (1992) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain.* Elsevier, Amsterdam London New York Tokyo.
89. Tierney TS, Moore DR (1997) Naturally occurring neuron death during postnatal development of the gerbil ventral cochlear nucleus begins at the onset of hearing. *Journal of Comparative Neurology* 387:421-429.
90. Rosahl SK, Tatagiba M, Gharabaghi A, Matthies C, Samii M (2000) Acoustic evoked response following transection of the eighth nerve in the rat. *Acta Neurochirurgica (Wien)* 142:1037-1045 .
91. Meuer, K., Pitzer, C., Teismann, P.(2006), Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson’s disease. *Journal of Neurochemistry*, 97: 675-686. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03727.x>.
92. Lu, C., & Xiao, B. (2007). Neuroprotection of G-CSF in cerebral ischemia. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 12, 2869-75 .
93. Borlongan, C. V., & Hess, D. C. (2006). New hope for stroke patients: mobilization of endogenous stem cells. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l’Association medicale canadienne*, 174(7), 954–955. <https://doi.org/10.1503/cmaj.060199>.
94. 1. Möllmann, J., Härtig, W., Ritz, M. F., Arndt, C., Grunke, M., Siebert, E., & Albrecht, D. (2021). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mediates the improvement of cognitive performance after traumatic brain injury (TBI) via modulation of neuroinflammation and blood-brain barrier (BBB) integrity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 94, 161-171. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.08.026>.
95. Sprigg, N., Bath, P. M., Zhao, L., Willmot, M. R., Gray, L. J., Walker, M. F., Dennis, M. S., & Russell, N. (2006). Granulocyte-colony-stimulating factor mobilizes bone marrow stem cells in patients with subacute ischemic stroke: the Stem cell Trial of recovery EnhanceMent after Stroke (STEMS) pilot randomized, controlled trial (ISRCTN 16784092). *Stroke*, 37(12), 2979–2983. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000248763.49831.c3>.

96. Derakhshanrad, N., Saberi, H., Yekaninejad, M. S., Eskandari, G., Mardani, A., Rahdari, F., & Meybodi, K. T. (2013). Safety of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administration for postrehabilitated motor complete spinal cord injury patients: an open-label, phase I study. *Cell transplantation*, 22 Suppl 1, S139–S146. <https://doi.org/10.3727/096368913X672109>.
97. Kang, H. J., Lee, H. Y., Na, S. H., Chang, S. A. (2006). Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation*, 114(1 Suppl), I145–I151. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001107>.
98. Solaroglu, I., Cahill, J., Jadhav, V., & Zhang, J. H. (2006). A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. *Stroke*, 37(4), 1123–1128. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000208205.26253.96>.
99. Song, S., Kong, X., Acosta, S., Sava, V., Borlongan, C., & Sanchez-Ramos, J. (2016). Granulocyte-colony stimulating factor promotes brain repair following traumatic brain injury by recruitment of microglia and increasing neurotrophic factor expression. *Restorative neurology and neuroscience*, 34(3), 415–431. <https://doi.org/10.3233/RNN-150607>.
100. Su Y, Cui L, Zhao L. (2013) The effects of hematopoietic growth factors on neurite outgrowth. *PloS one* 8(10): e75562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075562>.
101. Osborne, A., Khatib, T. Z., Songra, L., Barber, A. C., Hall, K., Kong, G. Y. X., Widdowson, P. S., & Martin, K. R. (2018). Neuroprotection of retinal ganglion cells by a novel gene therapy construct that achieves sustained enhancement of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor-B signaling. *Cell death & disease*, 9(10), 1007. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1041-8>.
102. Thoenen, H., & Sendtner, M. (2002). Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nature neuroscience*, 5 Suppl, 1046–1050. <https://doi.org/10.1038/nn938>.
103. Balkowiec, A., and Katz, D. M. (2000). Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J. Neurosci.* 20, 7417–7423. doi: 10.1523/jneurosci.20-19-07417.2000.
104. Matchett, G. A., Calinisan, J. B., Matchett, G. C., Martin, R. D., & Zhang, J. H. (2007). The effect of granulocyte-colony stimulating factor in global cerebral ischemia in rats. *Brain research*, 1136(1), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.12.023>.
105. Paul M, Peck A, Leibovici L. (2014) Subcutaneous versus intravenous granulocyte colony stimulating factor for the treatment of neutropenia in hospitalized hemato-oncological patients: randomized controlled trial. *American journal of hematology* 89(3):243-248. <https://doi.org/10.1002/ajh.23622>.
106. Pastuszko, P., Schears, G. J., Kubin, J., Wilson, D. F., & Pastuszko, A. (2017). Granulocyte colony-stimulating factor significantly decreases density of hippocampal caspase 3-positive nuclei, thus ameliorating apoptosis-mediated damage, in a model of ischaemic neonatal brain injury. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 25(4), 600–605. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivx047>.
107. Kallmünzer, Bernd & Tauchi, Miyuki & Schlachetzki, Johannes & Machold, Kristin & Schmidt, Ariana & Winkler, Jürgen & Schwab, Stefan & Kollmar, Rainer. (2014).

Granulocyte Colony-Stimulating Factor Does Not Promote Neurogenesis after Experimental Intracerebral Haemorrhage. *International Journal of Stroke*. 9. 10.1111/ijis.12217.

108. Vexler, Z. S., & Yenari, M. A. (2009). Does inflammation after stroke affect the developing brain differently than adult brain? *Developmental neuroscience*, 31(5), 378–393. <https://doi.org/10.1159/000232556>.
109. Li, T., Li, K., Zhang, S., Wang, Y., Xu, Y., Cronin, S. J. F., Sun, Y., Zhang, Y., Xie, C., Rodriguez, J., Zhou, K., Hagberg, H., Mallard, C., Wang, X., Penninger, J. M., Kroemer, G., Blomgren, K., & Zhu, C. (2020). Overexpression of apoptosis inducing factor aggravates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Cell death & disease*, 11(1), 77. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2280-z>.
110. Amirzagar, N., Nafissi, S., Tafakhori, A., Modabbernia, A., Amirzargar, A., Ghaffarpour, M., Siroos, B., & Harirchian, M. H. (2015). Granulocyte colony-stimulating factor for amyotrophic lateral sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of Iranian patients. *Journal of clinical neurology (Seoul, Korea)*, 11(2), 164–171. <https://doi.org/10.3988/jcn.2015.11.2.164>.
111. Doycheva, D. M., Hadley, T., Li, L., Applegate, Zhang, J. H., & Tang, J. (2014). Anti-neutrophil antibody enhances the neuroprotective effects of G-CSF by decreasing number of neutrophils in hypoxic ischemic neonatal rat model. *Neurobiology of disease*, 69, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.024>.
112. Ziemka-Nalecz, M., Jaworska, J., & Zalewska, T. (2017). Insights Into the Neuroinflammatory Responses After Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 76(8), 644–654. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlx046>.
113. Modi, J., Menzie-Suderam, J., Xu, H., Trujillo, P., Medley, K., Marshall, M. L., Tao, R., Prentice, H., & Wu, J. Y. (2020). Mode of action of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) as a novel therapy for stroke in a mouse model. *Journal of biomedical science*, 27(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0597-7>.
114. Robertson, N. J., Martinello, K., Lingam, I., Avdic-Belltheus, A., Meehan, C., Alonso-Alconada, D., Ragab, S., Bainbridge, A., Sokolska, M., Tachrount, M., (2019). Melatonin as an adjunct to therapeutic hypothermia in a piglet model of neonatal encephalopathy: A translational study. *Neurobiology of disease*, 121, 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.10.004>.
115. Li, L., McBride, D. W., Doycheva, D., Dixon, B. J., Krafft, P. R., Zhang, J. H., & Tang, J. (2015). G-CSF attenuates neuroinflammation and stabilizes the blood-brain barrier via the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Experimental neurology*, 272, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.12.020>.
116. Zhou, D. G., Shi, Y. H., & Cui, Y. Q. (2018). Impact of G-CSF on expressions of Egr-1 and VEGF in acute ischemic cerebral injury. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(3), 2313–2318. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6486>.
117. Thornton, C., Leaw, B., Mallard, C., Nair, S., Jinnai, M., & Hagberg, H. (2017). Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 248. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00248>.
118. Schlager, G. W., Griesmaier, E., Wegleiter, K., Neubauer, V., Urbanek, M., Kiechl-Kohlendorfer, U., Felderhoff-Mueser, U., & Keller, M. (2011). Systemic G-CSF

treatment does not improve long-term outcomes after neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Experimental neurology*, 230(1), 67–74.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.11.021>.

119. Shyu, W. C., Lin, S. Z., Lee, C. C., Liu, D. D., & Li, H. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 174(7), 927–933. <https://doi.org/10.1503/cmaj.051322>.
120. Pezzoli, G., Tesei, S., Canesi, M., Sacilotto, G., Vittorio, M., Mizuno, Y., Mochizuki, H., & Antonini, A. (2010). The effect of repeated administrations of granulocyte colony stimulating factor for blood stem cells mobilization in patients with progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and multiple system atrophy. *Clinical neurology and neurosurgery*, 112(1), 65–67.
<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2009.08.023>.
121. Nefussy, B., Artamonov, I., Deutsch, V., Naparstek, E., Nagler, A., & Drory, V. E. (2010). Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor administration for treating amyotrophic lateral sclerosis: A pilot study. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 11(1-2), 187–193. <https://doi.org/10.3109/17482960902933809>.
122. Escabi C D, Trevino M, Lobarinas E (2019) The rat animal model for noise-induced hearing loss. *The Journal of the Acoustical Society of America* 146(5):3692.
<https://doi.org/10.1121/1.5132553>.
123. Oertel J, Tschan C, Keiner D (2016) Animal Models for Experimental Neurosurgery of Peripheral and Cranial Nerves. In: Janowski, M (Hrsg.) *Experimental Neurosurgery in Animal Models*. Neuromethods. Humana Press, New York, NY, vol 116.
124. Kermer P, Weishaupt J, Bähr M. (2001) Transection of the optic nerve in rats: studying neuronal death and survival in vivo. *Brain research. Brain research protocols* 7(3):255-260. [https://doi.org/10.1016/s1385-299x\(01\)00076-9](https://doi.org/10.1016/s1385-299x(01)00076-9).
125. Frank T, Schlachetzki JC, Göricke B. Both systemic and local application of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is neuroprotective after retinal ganglion cell axotomy. *BMC Neurosci*. 2009;10:49. Published 2009 May 14. doi:10.1186/1471-2.
126. Sekiya T, Shimamura N, Suzuki S (2000) An in vivo quantifiable model of cochlear neuronal degeneration induced by central process injury. *Experimental neurology* 161(2):490-502. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7280>.
127. Imai H, Saito N, Macrae I M (2016) Rat Middle Cerebral Artery (MCA) Occlusion Models Which Involve a Frontotemporal Craniectomy. In: Janowski, M (Hrsg.) *Experimental Neurosurgery in Animal Models*. Neuromethods. Humana Press, New York, NY, vol 116.
128. Ganesan P, Schmiedge J, Kothandaraman P. (2018) Ototoxicity: A Challenge in Diagnosis and Treatment. *Journal of audiology, otology* 22(2):59-68.
<https://doi.org/10.7874/jao.2017.00360>.
129. Shekarriz B, Upadhyay J, Jewett MA (2004) Nerve-sparing retroperitoneal lymphadenectomy using hydro-jet dissection: initial experience. *Journal of Endourology* 18:273-276.
130. 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. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 27:327-330.

131. 9. 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. *Journal of Neurosurgery*.
132. Lindenlaub T, Sommer C (2004) Partial Sciatic Nerve Transection. In: Luo Z.D. *Pain Research. Methods in Molecular Medicine*. Humana Press, vol 99.
133. Davis S, Aminoff M, Berg B (1985) Brain-stem auditory evoked potentials in children with brain-stem or cerebellar dysfunction. *Archives of neurology* 42(2):156-160. <https://doi.org/10.1001/archneur.1985.04060020070019>.
134. Arakaki X, Fonteh N, Harrington M. (2014) Altered brainstem auditory evoked potentials in a rat central sensitization model are similar to those in migraine. *Brain research* 1563:110-121. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.03.033>.
135. Drake M, Pakalnis A, Hietter S. (1990) Auditory evoked potentials in vertebrobasilar transient ischemic attacks. *Clinical EEG (electroencephalography)* 21(2):96-100. <https://doi.org/10.1177/155005949002100210>.
136. Domarecka E, Kalcioğlu M, Olze H. (2021) Reporting Data on Auditory Brainstem Responses (ABR) in Rats: Recommendations Based on Review of Experimental Protocols and Literature. *Brain sciences* 11(12):1596. <https://doi.org/10.3390/brainsci11121596>.
137. Yelvington D, Weiss G, Ratner A (1985) Habituation of the prolactin response in rats to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology* 10(1):95-102. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(85\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0306-4530(85)90043-5).
138. Van Driel K, Talling J (2005) Familiarity increases consistency in animal tests. *Behavioural brain research* 159(2):243-245. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.11.005>.
139. Overbeck G, Church M (1992) Effects of tone burst frequency and intensity on the auditory brainstem response (ABR) from albino and pigmented rats. *Hearing research* 59(2):129-137. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(92\)90110-9](https://doi.org/10.1016/0378-5955(92)90110-9).
140. Church M, Williams H, Holloway J (1984) Brain-stem auditory evoked potentials in the rat: effects of gender, stimulus characteristics and ethanol sedation. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 59(4):328-339. [https://doi.org/10.1016/0168-5597\(84\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0168-5597(84)90050-9).
141. Charlton P, Schatz K, Dent M. (2019) Sex differences in auditory brainstem response audiograms from vasopressin-deficient Brattleboro and wild-type Long-Evans rats. *PloS one*, 14(8): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222096>.
142. Church M, Williams H, Holloway J (1984) Postnatal development of the brainstem auditory evoked potential and far-field cochlear microphonic in non-sedated rat pups. *Brain research* 316(1):23-31. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(84\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0165-3806(84)90005-1).
143. Janssen R, Hetzler B, Dyer R. (1991) Differential impact of hypothermia and pentobarbital on brain-stem auditory evoked responses. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 80(5):412-421. [https://doi.org/10.1016/0168-5597\(91\)90090-k](https://doi.org/10.1016/0168-5597(91)90090-k).
144. Church M, Gritzke R (1987) Effects of ketamine anesthesia on the rat brain-stem auditory evoked potential as a function of dose and stimulus intensity. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 67(6):570-583. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(87\)90060-5](https://doi.org/10.1016/0013-4694(87)90060-5).

145. Shapiro S, Møller A, Shiu G (1984) Brain-stem auditory evoked potentials in rats with high-dose pentobarbital. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 58(3):266-276. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(84\)90112-3](https://doi.org/10.1016/0013-4694(84)90112-3).
146. Santarelli R, Arslan E, Plourde G. (2003) Effects of isoflurane on the auditory brainstem responses and middle latency responses of rats. *Acta otolaryngologica* 123(2):176-181. <https://doi.org/10.1080/0036554021000028108>.
147. Stone J, Calderon-Arnulphi M, Suss N. (2009) Brainstem auditory evoked potentials - a review and modified studies in healthy subjects. *Journal of clinical neurophysiology: official publication of the American Electroencephalographic Society* 26(3):167-175. <https://doi.org/10.1097/WNP.0b013e3181a76a6e>.
148. Frankland P, Ralph M (1995) Circadian modulation in the rat acoustic startle circuit. *Behavioral neuroscience* 109(1):43-48. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.109.1.43>.
149. Meltser I, Lundkvist G, Canlon B. (2014) TrkB-mediated protection against circadian sensitivity to noise trauma in the murine cochlea. *Current biology: CB* 24(6):658-663. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.047>.
150. Lundt A, Müller R, Ehninger D. (2019) Data Acquisition and Analysis In Brainstem Evoked Response Audiometry In Mice. *Journal of visualized experiments* (147). <https://doi.org/10.3791/59200>.
151. Maurer K, Mika H (1983) Early auditory evoked potentials (EAEPs) in the rabbit. Normative data and effects of lesions in the cerebello-pontine angle. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 55(5):586-593. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(83\)90170-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(83)90170-0).
152. Zajac M, Pang T, Craig J. (2010) Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. *Hippocampus* 20(5):621-636. <https://doi.org/10.1002/hipo.20658>.
153. Zuccato C, Cattaneo E (2009) Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neurology* 5(6):311-322. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.54>.
154. Mandel A L, Ozdener H, Utermohlen V (2009) Identification of pro- and mature brain-derived neurotrophic factor in human saliva. *Archives of oral biology* 54(7):689-695. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.04.005>.
155. Sariola H (2001) The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 58(8):1061-1066. <https://doi.org/10.1007/PL00000921>.
156. Huang E J, Reichardt L F (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience* 24:677-736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>.
157. Acheson A, Russell M, Thadani A. (1995) A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374(6521):450-453. <https://doi.org/10.1038/374450a0>.
158. Winkler I, Helwani F, Nowlan B (2013) B-lymphopoiesis is stopped by mobilizing doses of G-CSF and is rescued by overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl2. *Haematologica* 98(3):325-333. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.069260>.

159. Lan X, Qu H, Zhang C (2008) Granulocyte-Colony Stimulating Factor Inhibits Neuronal Apoptosis in a Rat Model of Diabetic Cerebral Ischemia. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 216:117-126.
160. Gavathiotis E, Bird G, Walensky L (2010) BH3-Triggered Structural Reorganization Drives the Activation of Proapoptotic BAX. *Molecular Cell* 40:481-492.
161. Cao X, Arai H, Zhang N (2006) Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Protects against MPTP-Induced Dopaminergic Cell Death in Mice by Altering Bcl-2/Bax Expression Levels. *Journal of Neurochemistry* 99:861-867.
162. Kirsch F, Krüger C, Schneider A (2008) The receptor for granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is expressed in radial glia during development of the nervous system. *BMC Developmental Biology* 8(32). <https://doi.org/10.1186/1471-213x-8-32>.

6 LEBENSLAUF

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Publikation

DGNC 2018: The neuroprotective potential of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) after partial lesion on the Vestibulocochlear nerve: An experimental study in a rat model

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Joachim Oertel, der meine Dissertation vergeben und begutachtet hat. Für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei unserer Laborleiterin Frau Prof. rer. nat. Steffi Urbschat für ihre stetige Unterstützung, Anregungen und Ratschläge sowie ihre Hilfsbereitschaft.

Zusätzlich möchte ich mich bei Dr.med. Fritz Teping und Dr.med. Kerim Sitoci-Ficici für Anregungen und Hilfe bedanken.

Mein Dank gilt auch meinem Betreuer Herrn Dr. med. Simon Müller für seine Unterstützung und das Heranführen an die selbstständige Arbeit.

Auch bei Herrn PD Dr.med. Christoph Sippl möchte ich für das Gegenlesen der Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den MTAs des neurochirurgischen Forschungslabors Frau Sonja Hoffmann, Frau Marion Schwarz und Frau Sigrid Welsch für die Einführung in die histologische Arbeitsweise und die nützlichen Ratschläge sehr bedanken.

Besonders erwähnen möchte ich meine Geschwister Mohammad und Abdelkader Alkilani, die mich in allen Phasen dieser Promotion begleitet und für Abwechslung gesorgt haben. Vielen Dank.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern Algelani Alkilani und Naima Musbah bedanken, die mich immer unterstützt hatten und mir stets gute Ratgeber waren.