

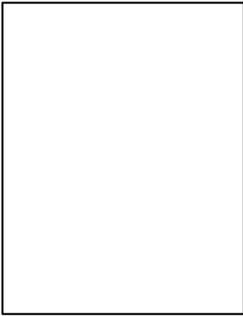
Aus der Klinik für Neurochirurgie
(Direktor: Prof. Dr. M. Synowitz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen zur Erythropoietin- und Erythropoietin-Rezeptor-Expression
nach experimenteller spinaler Kontusion in der Ratte**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Stephan Görden
aus Düsseldorf

Kiel (2017)



(Stephan Görden)

1. Berichterstatter: Fr. PD Dr.med. Friederike Knerlich-Lukoschus
2. Berichterstatter: Hr. PD Dr.med. Axel Fudickar

Tag der mündlichen Prüfung:

9. Juli 2018

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 31.03.2018

gez.:

Prof. Dr. med. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
1. Einleitung	9
1.1 Einführung zur traumatischen Rückenmarksläsion	9
1.1.1 Ätiologie & Epidemiologie von traumatischen Rückenmarksverletzungen	10
1.1.2 Die Problematik des Sekundärschadens nach Rückenmarksläsionen	10
1.1.3 Therapieoptionen	15
1.2 Einführung zur neuroprotektiven Funktion des Erythropoietins	16
1.2.1 Das Hormon Erythropoietin und sein Rezeptor	17
1.2.2 Erythropoietin als neuroprotektive Substanz bei der traumatischen Rückenmarksläsion	18
1.3 Experimentelle spinale Läsionsmodelle	20
2. Fragestellung und Zielsetzung	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Studiendesign	24
3.2 Immunhistochemie und Densitometrie	26
3.2.1 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Färbung und Spezifitätsprüfung der Primärantikörper	26
3.2.2 Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen	29
3.2.3 Auswertung und Densitometrie	29
3.2.4 Statistische Auswertung	31
3.3 Materialien	31
4. Ergebnisse	35
4.1 Hinterstränge	35
4.1.1 Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin)	35
4.1.2 Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin-Rezeptor)	40

4.1.3	Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Erythropoietin)	44
4.1.3	Immunfluoreszenz Doppelfärbungen (Erythropoietin-Rezeptor)	47
4.2	Ventrolaterale weiße Substanz	50
4.2.1	Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin)	50
4.2.2	Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin-Rezeptor)	54
4.2.3	Immunfluoreszenz Doppelfärbungen (Erythropoietin)	58
4.2.4	Immunfluoreszenz Doppelfärbungen (Erythropoietin-Rezeptor)	62
4.	Vorderhörner	64
4.3.1	Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin)	64
4.3.2	Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin-Rezeptor)	65
4.3.3	Immunfluoreszenz Doppelfärbungen (Erythropoietin)	67
4.3.4	Immunfluoreszenz Doppelfärbungen (Erythropoietin-Rezeptor)	67
5.	Diskussion	69
6.	Zusammenfassung	75
7.	Literaturverzeichnis	77
	Danksagung	83
	Veröffentlichung	84

Abkürzungen

AMPA	„ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor“
BBB-Score	Score nach Basso, Beattie und Bresnahan
Bcl-2	“B cell lymphoma 2”; apoptotisches Regulator-Protein
BLBP	„brain lipid binding protein“
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CCL2	CC-Chemokin-Ligand 2
CCL3	CC-Chemokin-Ligand 3
CCR1	CC-Chemokin-Rezeptor 1
CCR2	CC-Chemokin-Rezeptor 2
CD11	„Cluster of Differentiation“
CNPase	2',3'-zyklische-Nukleotid-3'-Phosphdiesterase
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAB-Färbung	3,3' Diaminobenzidin-Färbung
DPO	„day post operation“ = Überlebenszeitpunkt
ED1/CD68	Cluster of Differentiation 68
Epo	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietinrezeptor
EZR	Extrazellularraum
GFAP	saures Gliafaserprotein
gr	Gramm
HIF	„hypoxia-inducible-factor“
IL-1	Interleukin 1
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-10	Interleukin 10
IR	Immunreaktivität
IZR	Intrazellularraum
kDa	Kilo-Dalton
kdyn	kilodyne; Kraftereinheit
JAK	Januskinase
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
MAG	„myelin associated glycoprotein“

mg	Milligramm
MP	Methylprednisolon
NDMA	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NeuN	„Neuron specific nuclear protein“
NF- κ B	spezifischer Transkriptionsfaktor
Nf-200	Neurofilament Molekulargewicht 200 kDa
NoGo	Protein mit wachstumshemmender Wirkung auf zentrale Nervenzellen
NSCISC	National Spinal Cord Injury Statistical Centre
NSPC	neurale Progenitor-Stammzellen
PNS	peripheres Nervensystem
μ g	Mikrogramm
QL	Querschnittslähmung
RM	Rückenmark
rHu-Epo	rekombinantes humanes Erythropoietin
SDF-1	stromal cell derived factor 1 receptor
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
Th	Thorakales Rückenmarksegment
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
vWF	Von-Willebrand-Faktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, angiogenetischer Botenstoff
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
3CB2	Zellmarker für radiale Glia

Abbildungsverzeichnis

- 1 Die Neuropathologie der traumatischen Rückenmarksläsion
- 2 Struktur und Signaltransduktion des Zytokin Erythropoietins und seines Rezeptors
- 3 Validierung des Läsionsmodells
- 4 Studiendesign
- 5 Auswertungsalgorithmus zur Untersuchung der zeit- und läsionsabhängigen Expressionsmuster des Epo und seines Rezeptors
- 6 Densitometrie und Varianzanalyse der zeit- und läsionsabhängigen Epo-Immunreaktivität der Hinterstränge auf der spinalen Achse
- 7 Läsionsabhängige Epo-Immunreaktivität der Hinterstränge im zeitlichen Verlauf (Th5)
- 8 Regressionsanalyse der Immunreaktivitäten in den Hintersträngen mit Schmerz-assoziiertem Verhalten im Spätverlauf (Tag 42)
- 9 Densitometrie und Varianzanalyse der zeit- und läsionsabhängigen EpoR-Immunreaktivität der Hinterstränge auf der spinalen Achse
- 10 Läsionsabhängige EpoR-Immunreaktivität der Hinterstränge im zeitlichen Verlauf (Th5)
- 11 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Zellmarker), Hinterstränge, Erythropoietin
- 12 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Chemokine), Hinterstränge, Epo und EpoR
- 13 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Zellmarker), Hinterstränge, Erythropoietin-Rezeptor
- 14 Densitometrie und Varianzanalyse der zeit- und läsionsabhängigen Epo-Immunreaktivität der ventrolateralen weißen Substanz auf der spinalen Achse
- 15 Läsionsabhängige Epo-Immunreaktivität der ventrolateralen weißen Substanz im zeitlichen Verlauf (Th5)
- 16 Densitometrie und Varianzanalyse der zeit- und läsionsabhängigen EpoR-Immunreaktivität der ventrolateralen weißen Substanz auf der spinalen Achse

- 17 Läsionsabhängige EpoR-Immunreaktivität der ventrolateralen weißen Substanz im zeitlichen Verlauf (Th5)
- 18 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Zellmarker), Ventrolaterale Weiße Substanz, Erythropoietin
- 19 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Chemokine), Ventrolaterale Weiße Substanz, Epo und EpoR
- 20 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Zellmarker), ventrolaterale weiße Substanz, Erythropoietin-Rezeptor
- 21 Densitometrie der zeit- und läsionsabhängigen Epo/-R-Immunreaktivität der lumbalen Vorderhörner
- 22 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Zellmarker, Chemokine), Vorderhörner (Lumbal), Epo und EpoR

Tabellenverzeichnis

- 1 Tabellarische Auflistung der verwendeten Antikörper
- 2 Auflistung der verwendeten Materialien und der jeweiligen Bezugsquellen beziehungsweise Methoden
- 3 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Hinterstränge)
- 4 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (ventrolaterale weiße Substanz)
- 5 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen Vorderhorn (graue Substanz)

1. Einleitung

1.1 Einführung zur traumatischen Rückenmarksläsion

Traumatische Rückenmarksschädigungen spielen in der Medizin seit frühester Zeit eine bedeutsame Rolle. Das erste Mal schriftlich beschrieben wurden Verletzungen des Rückenmarks 2500-1900 vor Christus im alten ägyptischen Reich. In diesem als „Edwin Smith Papyrus“ bekannten Manuskript wurden sechs Patienten mit einer Verletzung der Wirbelsäule und hiervon drei Patienten mit einem Querschnittssyndrom von einem unbekanntem Autor vorgestellt, der wohl auf den Schlachtfeldern und Baustellen der damaligen Zeit als Chirurg für die Versorgung der Verletzten zuständig war. Dieser Gelehrte beschrieb die Klinik und teilweise infauste Prognose der Patienten (Hughes, 1988).

Verletzungen der Rückenmarksstränge stellen bis heute eine klinische Herausforderung dar. Die Schwierigkeit, gezielte Therapiestrategien zu entwickeln, ist bedingt durch die Komplexität der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen: Durch die primäre Verletzung werden unwiederbringlich neurale Strukturen auf dem initialen Läsionsniveau zerstört. Durch die Induktion unterschiedlicher Prozesse, die im Folgenden näher erläutert werden, kommt es zu einem progredienten Niedergang angrenzender Strukturen und damit zunehmender Ausbreitung des Schadens in primär nicht betroffenes, intaktes Gewebe. Diese so genannte „sekundäre Schadenskaskade“ führt zu klinischen Komplikationen, die das Vegetativum, die Motorik und Sensorik betreffen und somit den Langzeitverlauf nach Rückenmarksverletzungen erheblich negativ beeinflussen (Gupta et al., 2010).

Patienten mit schweren spinalen Verletzungen sind lebenslang auf professionelle Hilfe angewiesen und können häufig nicht wieder voll in das gesellschaftliche Leben integriert werden. Entsprechend hoch sind auch die resultierenden Kosten. Das spinale Trauma stellt somit unverändert ein großes sozioökonomisches Problem dar (WHO, 2013, Krueger et al., 2013).

1.1.1 Ätiologie & Epidemiologie von traumatischen Rückenmarksverletzungen

Läsionen des Rückenmarks sind traumatischen oder nicht traumatischen Ursprungs. Die Läsionen traumatischen Ursprungs haben in Europa eine Prävalenz von 280 pro 1 Millionen Einwohner. In den Vereinigten Staaten von Amerika liegt sie deutlich höher bei 906 pro 1 Millionen Einwohner (Lee et al., 2014, Singh et al., 2014). Die Inzidenz der traumatischen Rückenmarksläsion liegt in Europa bei 16 pro 1 Millionen Einwohner, in den USA bei 38,4 pro 1 Millionen Einwohner (Lee et al., 2014, Singh et al., 2014, NSCISC, 2016).

Weltweit ist die Inzidenz heterogen verteilt. Dies lässt sich durch die Ätiologie der traumatischen Querschnittslähmung erklären: Laut WHO sind weltweit die 4 Hauptursachen für die traumatische Querschnittslähmung 1. Verkehrsunfälle, 2. Stürze, 3. Gewalt inklusive Selbstverletzung, 4. Sport/Freizeit (WHO, 2013). Je nach Entwicklungsstand des jeweiligen Landes, politischer Lage und gesellschaftlichen Verhältnissen variiert die Bedeutung der einzelnen Faktoren deutlich. Als Beispiel seien der hohe Anteil an Schussverletzungen (Gewalt) im Bundesstaat Mississippi, USA oder Afghanistan genannt (WHO, 2013, Singh et al., 2014).

Die sozioökonomische Bedeutung der traumatischen Rückenmarksläsion ist relevant. Die direkten Lebenszeitkosten eines 25-Jährigen Mannes mit einer Lähmung der unteren Extremität (Paraplegie) liegen in den USA bei 2.312.846 Dollar (NSCISC, 2016).

1.1.2 Die Problematik des Sekundärschadens nach Rückenmarksläsionen

Bei der traumatischen Rückenmarksverletzung ist das physische Trauma für die primäre Schädigung des Gewebes verantwortlich. Durch diese primäre Läsion kommt es zu einer komplexen zellulären-, molekularen- und metabolischen Reaktion, die eine Ausbreitung des primären Schadens in angrenzende Rückenmarksabschnitte bewirkt. Diese Problematik wird als „Sekundärschaden“ subsummiert. Durch diese Veränderungen kommt es zu einem Fortschreiten neuronalen Zellverlustes und zur Ausbildung zystischer Höhlen im Rückenmark mit dem klinischen Resultat der typischen und schwer therapierbaren Spätkomplikationen. Dabei haben im Zeitverlauf nach der Läsion unterschiedliche

Mechanismen ihre Schwerpunkte und entsprechend unterschiedliche Zelltypen ihre Funktionen.

Bereits 1911 beobachtete der amerikanische Arzt Allen in Philadelphia, dass sich bei Hunden nach experimentellem spinalen Trauma die neurologische Funktion durch Entfernung der post-traumatischen Einblutungen besserte (Allen, 1911). Allen vermutete, dass dafür eine Noxe im nekrotischen Rückenmarksgewebe verantwortlich sein müsse, die eine post-traumatische Schädigung des Rückenmarks bewirke. Hiermit begründete er die Grundidee der sekundären Schadenskaskade nach spinalem Trauma (Allen, 1914).

Mittlerweile konnte durch intensive Forschungsaktivität auf diesem Gebiet herausgearbeitet werden, dass diese sekundäre Schadenskaskade auf hochkomplexen Mechanismen basiert, was dazu führt, dass sich die primäre Läsion über den frühen Schadensverlauf hinaus bis in die Spätphasen nach dem Trauma in das angrenzende, primäre nicht verletzte Rückenmarksgewebe ausbreitet. So ließen sich circa fünf Minuten nach spinalem Trauma bereits im angrenzenden Rückenmarksgewebe petechiale Einblutungen in die graue Substanz und ein Ödem der weißen Substanz nachweisen. Beides nahm über die ersten 6 Tage zu (Ducker et al., 1971, Nemecek, 1978). Bezüglich der Blutzirkulation zeigte sich, dass der Blutfluss im Rückenmarksgewebe nach einem spinalen Trauma signifikant reduziert war (Hall u. Wolf, 1986, Senter u. Venes, 1978) und die Mikrovaskularisation eine insuffiziente Versorgung des Gewebes mit arteriellem Blut aufwies (Fried u. Goodkin, 1971, Wallace et al., 1986, Wallace u. Tator, 1986). Zudem ist die physiologische Blut-Rückenmarks-Schranke in ihrer Struktur beschädigt, was die Ausbildung eines vasogenen Ödems bedingt (Sharma, 2005).

Die durch diese Veränderungen hervorgerufene posttraumatische Ischämie des Rückenmarks korreliert mit einem axonalen Funktionsverlust (Fehlings et al., 1989).

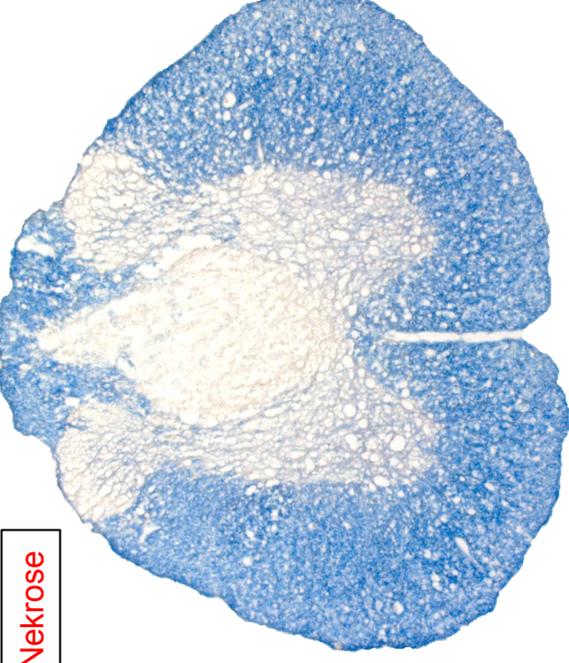
Die Neuropathologie der traumatischen Rückenmarksläsion

Histologische Veränderungen

petechiale Blutungen
reduzierte Gewebsperfusion

⇔

Waller'sche axonale Degeneration



Nekrose

Zellhomöostatische Veränderungen

mechanisch induzierte
Depolarisation



exzitotoxischer
Glutamat-Exzess



Ca²⁺-Influx

1. Mitochondriopathie
2. Aktivierung der NO-Synthase
3. Aktivierung der Phospholipase A₂
4. Aktivierung von Calpain-Proteasen



Abbau von Neurofilamenten

Inhibition der spinalen Plastizität

Glianarbe

inhibitorische, oligozytär-assoziierte
humorale Faktoren (No-Go, MAG)



Inflammatorische Reaktion

zelluläre Beteiligung
humorale Entzündungsmediatoren
Chemokine



Apoptose



Nekrose

Abbildung 1: Schema zu den neuropathologischen Veränderungen auf ein Trauma des Rückenmarks mit Schwerpunkt auf inflammatorische-, zellhomöostatische-, histologische- und regenerative Veränderungen des Gewebes. Die Endpunkte der pathophysiologischen Prozesse (Apoptose, Nekrose, Abbau von Neurofilamenten) sind rot markiert. Das Foto zeigt einen thorakalen Rückenmarksschnitt in transversaler Schnittführung mit dem Läsionskegel; EC-Färbung, 5fach vergrößert.

Auch auf zellulärer Ebene bewirkt ein spinales Trauma einschneidende Veränderungen der Homöostase. Der physische Reiz der Verletzung induziert unter anderem eine mechanische Depolarisation, was zu einer exzessiven Sekretion des exzitatorisch wirksamen Neurotransmitters Glutamat in den synaptischen Spalt führt. Glutamat ist in hohen Konzentrationen toxisch für die umliegenden Neurone und Oligodendrozyten (Xu et al., 2005, Hall u. Springer, 2004). Gleichzeitig ist Glutamat aber auch der Ligand zweier Ionenkanäle (NDMA, AMPA) und führt zu einem Einstrom von Kalzium-Ionen in den Intrazellularraum (Moriya et al., 1994, LoPachin et al., 1999). Der erhöhte Kalziumspiegel führt zu erheblichen Veränderungen der neuronalen Zellhomöostase und bewirkt diverse biochemische Veränderungen; siehe auch Abbildung 1: (Sullivan et al., 2007, Hall u. Springer, 2004, Diaz-Ruiz et al., 2002, Murphy et al., 1994, Lopez-Vales et al., 2011, Toborek et al., 1999, Banik et al., 1997).

Daraus resultiert unter anderem die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und reaktiven Stickstoff-Spezies, die über eine Lipidperoxidation zu einer Destabilisierung neuronaler Lipiddoppelmembranen führen (Taoka et al., 1995, Hall u. Braugher, 1989).

Neben diesen Mechanismen, die im wesentlichen zum nekrotischen Zelltod führen, ließen sich im geschädigten Rückenmark auch Hinweise auf apoptotischen Zelltod nachweisen (Yu et al., 2004, Yu et al., 2009, Oyinbo, 2011).

Einen erheblichen Anteil an den sekundären Schadensmechanismen hat die postkontusionelle Inflammation. Im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es zur Aktivierung und Invasion von Entzündungszellen mit Ausschüttung von Mediatoren wie z. B. Zytokinen ($\text{TNF}\alpha$, IL-1) und Chemokinen, die auf die Mikroumgebung Einfluss nehmen. Diese posttraumatische Inflammation wird von unterschiedlichen zellulären Komponenten und Mediatoren phasenabhängig aufrechterhalten. So sind bereits in den ersten Stunden nach dem initialen Trauma pro-inflammatorische Zytokine und Entzündungszellen in der Läsion und im Läsionsrand nachweisbar (Donnelly u. Popovich, 2008, Knerlich-Lukoschus et al., 2010). Diese Reaktionen und Veränderungen lassen sich dann bis in den chronischen Verlauf weit über das Läsionsniveau hinaus spinal und supraspinal detektieren (Knerlich-Lukoschus et al., 2011a, Knerlich-Lukoschus et al., 2010, Fleming et al., 2006).

Die inflammatorische Antwort auf das Rückenmarkstrauma ist komplex und partizipiert an Mechanismen, welche die Regeneration unterstützen, aber auch

hemmen können: So sind inflammatorische Zellen wie die Makrophagen einerseits unerlässlich für die Beseitigung nekrotischer Zellbestandteile, andererseits ist eine Beteiligung an neurodegenerativen Prozessen beschrieben (Fleming et al., 2006). Die induzierten Botenstoffe wie z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-10, sind ein wesentlicher Bestandteil der Immunantwort und können sich teilweise antagonisieren (Ren u. Young, 2013).

Wichtige Mediatoren dieser inflammatorischen Prozesse sind die Chemokine. Hierbei handelt es sich um chemotaktische Zytokine: Diese Gruppe von kleinen (8-14 kDa) Peptiden, spielt nicht nur eine essentielle Rolle für die Aktivierung, Proliferation und Migration von Immunzellen, sondern ist auch für die Kommunikation zwischen diversen anderen Zelltypen essentiell (Tran u. Miller, 2003). Für einige Chemokine und ihre Rezeptoren konnten distinkte zeitliche- und läsions-abhängige Expressionsmuster in bestimmten anatomischen Regionen (Hinterhorn, Hinterstränge, ventro-laterale weiße Substanz) nach einer Verletzung des Rückenmarks der Ratte nachgewiesen werden (Knerlich-Lukoschus et al., 2010, Knerlich-Lukoschus et al., 2011b). Darüber hinaus scheinen sie im chronischen Verlauf in unterschiedliche Prozesse nach einem spinalen Trauma involviert zu sein (Knerlich-Lukoschus, 2015).

Interessanterweise sind die Chemokine auch in den Stammzellnischen des adulten Rückenmarks nachweisbar (Knerlich-Lukoschus et al., 2010, Knerlich-Lukoschus et al., 2015). Das ist insbesondere relevant vor dem Hintergrund neuer regenerations-basierter Therapiestrategien von Rückenmarksverletzungen. Neben dem Einbringen von funktionalen Vorläuferzellen und Stammzellen mittels unterschiedlicher Transplantationsstrategien würde die Aktivierung bzw. das Modulieren von endogenen adulten neuronalen Stamm- und Progenitorzellen (NSPC) und deren Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationseigenschaften im verletzten Rückenmark selbst einen weniger invasiven und ethisch unbedenklichen therapeutischen Ansatz darstellen (Barnabe-Heider u. Frisen, 2008). Das biologische Verhalten und die Differenzierungs-„Richtung“ von endogenen NSPC wird dabei nicht nur durch deren intrinsische genetische Programme, sondern zu einem erheblichen Teil von den jeweiligen Bedingungen ihrer Mikroumgebung bestimmt (Martino u. Pluchino, 2007). Bedingt durch die Induktion einer starken, prolongierten post-traumatischen Entzündungsreaktion mit Expression unterschiedlicher Chemokine und das Vorhandensein von Chemokin-Rezeptoren auf den NSPC selbst

kann postuliert werden, dass diese Moleküle die Bedingungen der Nischen potentieller NSPC im adulten Rückenmark erheblich regulieren (Knerlich-Lukoschus, 2015).

Um neue Therapiestrategien zu entwickeln, ist besonders interessant, wie Chemokine als inflammatorische Mediatoren der Stammzellnischen mit neuroprotektiven Substanzen (z.B. Erythropoietin) interagieren.

1.1.3 Therapieoptionen

In den aktuellen Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie können aufgrund der in den vorangegangenen Abschnitten dargelegten Komplexität des spinalen Traumas für Patienten mit einer solchen Verletzung keine kausalen Therapieoptionen empfohlen werden. Es stehen lediglich Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung, um den sekundären pathophysiologischen Verlauf zu beeinflussen (Curt et al., 2012).

Bei dem Medikament Methylprednisolon (MP) handelt es sich um einen wichtigen pharmakologischen Therapieansatz, dessen Bedeutung allerdings kontrovers bewertet wird (Hall u. Springer, 2004). MP gehört zu der Gruppe der antiinflammatorischen Kortikosteroide. Durch rechtzeitige Applikation nach einem spinalen Trauma (innerhalb von 8 Stunden) erhoffen sich Befürworter eine Abschwächung der sekundären Schadenskaskade mit einem geringeren neurologischen Defizit (Bracken et al., 1997, Bracken, 2012). Demgegenüber stehen die typischen Nebenwirkungen der Kortison-Therapie bei Patienten mit traumatischer Rückenmarksläsion wie zum Beispiel Pneumonie, Harnwegsinfekt, Hyperglykämie, Steroid-induzierte Myopathie mit erheblichen Auswirkungen auf Morbidität und Mortalität (Fehlings et al., 2014). Eine einvernehmliche Bewertung der Effektivität einer MP-Therapie ist zur Zeit nicht möglich. In den aktuellen Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie wird keine generelle Empfehlung zur MP Anwendung ausgesprochen (Curt et al., 2012).

Gegenstand der experimentellen Forschung sind weiter effektive Interventionsmöglichkeiten bezüglich der sekundären Schadenskaskaden, die theoretisch zahlreiche mögliche Angriffspunkte bieten. Im Fokus stehen neuroprotektive und neuroregenerative Ansätze (Witiw u. Fehlings, 2015).

Bei neuroregenerativen Therapien, insbesondere der embryonalen Stammzelltransplantation, müssen strenge ethische Gesichtspunkte berücksichtigt

werden (Ruff et al., 2012). Entsprechend wären Therapieformen, die am primären regenerativen Eigenpotential des Rückenmarks ansetzen, besonders reizvoll. Hierbei müssten zum einen die restriktiven Verhältnisse im Mikromilieu der endogenen Stammzellen überwunden werden (Weiss et al., 1996), zum anderen könnten diese Zellen, die nachweislich im Ependym des Zentralkanals und in der weißen Substanz des Rückenmarks vorhanden sind, durch gezielte Applikation neuroprotektiver Substanzen unterstützt werden (Horner et al., 2000).

Ein solches neuroprotektives Agens wäre z.B. das Erythropoietin, für das (wie im Folgenden erläutert) sowohl unter tierexperimentellen als auch für die klinische Anwendbarkeit erfolgsversprechende Ergebnisse hinsichtlich seines neuroregenerativen Potentials verzeichnet werden konnten (Grasso et al., 2007, Huang et al., 2009).

1.2 Einführung zur neuroprotektiven Funktion des Erythropoietins

Das Erythropoietin (Epo) ist im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit ein viel versprechendes neuroprotektives Zytokin (Siren et al., 2001, Ehrenreich et al., 2009). Die Wirkung dieses körpereigenen Hormons ist seit den Anfängen des 20. Jahrhunderts bekannt. Jeder Mediziner lernt in seiner Ausbildung Epo als hämatopoietisches Hormon kennen. Mittlerweile wird es in seiner rekombinanten Form klinisch zur Therapie der renalen Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz eingesetzt (Willis et al., 2009).

In den 90er-Jahren wurde erstmals gezeigt, dass das Polypeptid Epo in der embryonalen Entwicklung des zentralen Nervensystems eine Rolle spielt und eine Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen ermöglicht (Knabe et al., 2004, Juul et al., 1999). Insbesondere in der Entwicklung des Rückenmarks scheint es als Regulator apoptotischer und proliferativer Prozesse eine zentrale Rolle zu spielen (Knabe et al., 2005).

1.2.1 Das Hormon Erythropoietin und sein Rezeptor

Epo ist der primäre Regulator der Erythropoese und fördert das Überleben, die Proliferation und Differenzierung der erythroiden Vorläuferzellen (Kasper, 2003). Epo ist ein 34 kDa großes Glykoprotein und wird auf dem Chromosomenabschnitt 7q11-7q22 kodiert. Der entsprechende Rezeptor hat ein Molekulargewicht von 66 kDa und wird auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19 kodiert (Kasper, 2003). Die genetische Codierung für Epo ist stabil, sodass es zu einer interspezifischen Aminosäuren-Abweichung von nicht mehr als 20% zwischen Mensch und Ratte kommt (Wen et al., 1993). Bei dem Rezeptor handelt es sich um einen Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptor, der intrazellulär den JAK-STAT-Signalweg nutzt, um nachgeschaltete Moleküle zu phosphorylieren (Bazan, 1990).

Struktur & Signaltransduktion des Zytokin Erythropoietin & seines Rezeptors

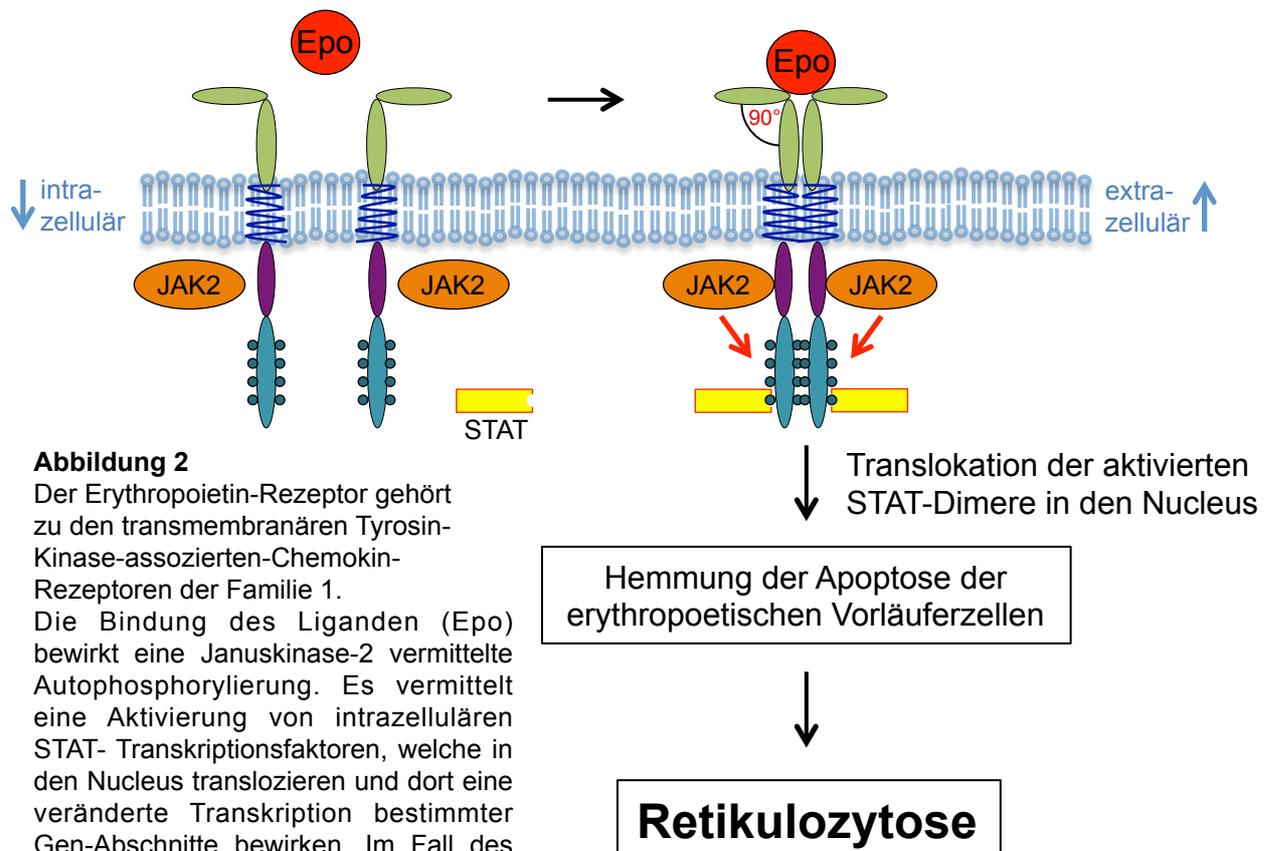


Abbildung 2

Der Erythropoietin-Rezeptor gehört zu den transmembranären Tyrosinkinase-assoziierten-Chemokin-Rezeptoren der Familie 1. Die Bindung des Liganden (Epo) bewirkt eine Januskinase-2 vermittelte Autophosphorylierung. Es vermittelt eine Aktivierung von intrazellulären STAT-Transkriptionsfaktoren, welche in den Nucleus translozieren und dort eine veränderte Transkription bestimmter Gen-Abschnitte bewirken. Im Fall des Erythropoietin bewirkt es eine Inhibition der Apoptose der Vorläuferzellen der Erythropoese. Es werden vermehrt Retikulozyten im Knochenmark gebildet und ins Blut freigesetzt.

*Epo= Erythropoietin; JAK-2= Januskinase 2
STAT=Signaltransduktoren & Aktivatoren der Transkription*

Im adulten Organismus sind die interstitiellen Zellen des peritubulären Kapillarbetts der Niere die primäre Produktionsstätte des Epo (Eckardt et al., 1989, Jacobson et al., 1957). Während der Embryonalentwicklung ist die Leber der hauptsächliche Syntheseort des Epo. Die Produktion nimmt zu Gunsten der Niere im Laufe der Schwangerschaft ab und bleibt lebenslang zu einem geringen Anteil von 10-15% erhalten (Schuster et al., 1992, Zanjani et al., 1977). Eine heterotope Epo- und EpoR Expression konnte in ZNS, Plazenta, Hoden, Lunge und Milz nachgewiesen werden (Kasper, 2003). Hypoxie löst eine vermehrte Epo-Expression über den HIF-Signalweg aus (Schuster et al., 1989, Kasper, 2003). Daraufhin bindet das sezernierte Epo an die transmembranären Rezeptoren der Vorläuferzellen der Erythropoese und wirkt anti-apoptotisch auf diese Zellpopulation und ermöglicht somit eine Retikulozytose im Blut (Koury u. Bondurant, 1992).

1.2.2 Erythropoietin als neuroprotektive Substanz bei der traumatischen Rückenmarksläsion

Nachdem die heterotope Epo-Expression im menschlichen Körper bekannt geworden war, folgten Untersuchungen zur Bedeutung von Epo für andere Organsysteme, z. B. für das Gehirn (Knabe et al., 2004) und Rückenmark (Knabe et al., 2005).

Als mögliche neuroprotektive Substanz wurde Epo entsprechend dieser Befunde nach neuro-ischämischen und neuro-traumatischen Prozessen getestet (Cerri et al., 2012, Ehrenreich et al., 2009, Knabe et al., 2004, Fumagalli et al., 2008, Huang et al., 2009). Hierbei scheint es in anti-apoptotische Signalkaskaden involviert zu sein, d.h. es interferierte v.a. mit den Caspase-3 Aktivierungen und führte zu einer Abnahme der apoptotischen Zellzahlen nach experimentellen Rückenmarksläsionen (Arishima et al., 2006). Unter experimentellen Bedingungen kam es nach Applikation von Epo nach einem spinalen Trauma zu einer verbesserten motorischen Erholung (Carelli et al., 2011).

Die Nachweise der neuroprotektiven Wirkungen von Epo im ZNS sind vielfältig und werden durch anti-apoptotische, anti-inflammatorische, pro-angiogenetische und anti-oxidative Effekte vermittelt (Sargin et al., 2010, Siren et al., 2009). Durch die Inhibition apoptotischer Prozesse wirkt das Epo nach einer spinalen Läsion neuroprotektiv auf die Neurone des Vorderhorns (Siren et al., 2001, Ning et al., 2011). Seine anti-apoptotische Wirkung erzielt der Erythropoietin-Rezeptor-

Komplex durch Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Bittorf et al., 2001). Epo supprimiert im ZNS die Sekretion inflammatorischer Entzündungsmediatoren (Villa et al., 2003). Zu den weiteren neuroprotektiven Effekten von Epo zählt auch der positive Einfluss auf die Blutzirkulation im ZNS. Epo wirkt angiogenetisch durch Inhibition der Apoptose in Endothelzellen und stärkt die Tight-Junctions der Blutgefäße des ZNS (Chong et al., 2002, Martinez-Estrada et al., 2003). Der bei der sekundären Schadenskaskade maßgeblich erhöhte Kalzium-Einfluss und die nachfolgende exzessive Ausschüttung von Glutamat sowie die resultierende Lipidperoxidation nehmen unter Applikation von Epo ab (Kawakami et al., 2001, Kaptanoglu et al., 2004, van der Kooij et al., 2008).

Entsprechend seiner Funktionen in der Entwicklung des ZNS als wichtiger Regulator für die Reifung und Migration der Neurone von periventrikulär in die späteren Cortex-Schichten (Juul et al., 1999, Mizuno et al., 1994) ist es nicht verwunderlich, dass Epo in Traumamodellen des ZNS einen positiven Einfluss auf die Neurogenese und die Oligodendrogenese hat (Zhang et al., 2012, Kaneko et al., 2013).

Erste experimentelle, therapeutische Studien bezüglich Rückenmarksverletzungen zeigten in der Ratte durch die Gabe von Epo (1.000 Units/kg KG) nach traumatischer spinaler Kontusion, positive Effekte auf die Erholung der lokomotorischen Funktion (Cerri et al., 2012, Fumagalli et al., 2008, Hong et al., 2011).

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse aus den bisherigen experimentellen Arbeiten zur Epo-Applikation nach ZNS-Verletzungen sind die genauen Expressionsmuster und der zeitliche Ablauf der Epo und insbesondere des Epo-Rezeptors (EpoR) nach einer spinalen Läsion nicht ausreichend erforscht. Die Expression von Epo und seinem Rezeptor wurden bisher in einem Rückenmarkskompressionsmodell der Ratte über einen Zeitraum von zwei Wochen untersucht (Grasso et al., 2005). Dort ließ sich eine Zunahme von Epo und EpoR in Neuronen und Gliazellen innerhalb der ersten acht Tage nachweisen. Die Frage nach möglichen zellulären Expressionsmustern oder eine Koexpression mit inflammatorischen Botenstoffen wurde dabei nicht bearbeitet. Zudem wurden weitere Einflüsse wie die Stärke der Rückenmarksverletzung nicht berücksichtigt.

Diese Faktoren sind jedoch die Voraussetzung, um potentiell Epo-Derivate effektiv als innovatives Therapeutikum einsetzen zu können. Die dezidierte Erforschung der

zeitlichen und zellulären Epo/Epo-Rezeptor-Expressionsprofile ist dabei zum jetzigen Zeitpunkt nur unter den standardisierten Bedingungen im Tiermodell möglich.

1.3 Experimentelle spinale Läsionsmodelle

Um unter standardisierten Bedingungen Aspekte des Rückenmarkstraumas zu untersuchen, wurden unterschiedliche Tiermodelle etabliert, bei denen das RM komplett oder teil-durchtrennt, komprimiert oder kontusioniert wird. Prinzipiell kann man spinale Traumen in vier Typen einteilen: 1. Mazeration (komplette Zerstörung der Rückenmarksstruktur), 2. Lazeration (scharfe Schnittverletzungen, Schusswunden), 3. Kontusion (stumpfes Trauma, zentrale Hämatomyelie und resultierende Syringomyelie) und 4. solide Verletzung des RM ohne zentrale Nekrose (Bennett et al., 2000). Der Großteil der Verletzungen von Patienten entspricht der Kontusion und damit inkompletten Verletzung des RM, ein Aspekt, der in der Wahl der entsprechenden Tiermodelle und der speziellen Fragestellung berücksichtigt werden muss. Bei den inkompletten Verletzungen werden im Rückenmark noch Informationen partiell oder inadäquat über erhaltene Gewebebrücken weitergeleitet. Es kann zu Fehlfunktionen kommen, die zum Beispiel zu Spastik oder zentrale Schmerzen führen.

Entsprechend wurde in dem Neurochirurgischen Forschungslabor der Neurochirurgischen Klinik im UKSH, Campus Kiel, ein spinales Rückenmarkstrauma-Modell etabliert, bei dem durch einen Stempel („PSI-(Precision Systems and Instrumentation)Infinite Horizon Impactor“) Kontusionen genau definierter Stärken auf das RM Computer gestützt appliziert werden können (Rabchevsky et al., 2003). Dieses Modell ermöglicht durch eine elektromechanisch und Software basierte Manipulation, hoch standardisierte Kontusionsverletzungen unterschiedlichen Schweregrads am Rückenmark einer Ratte oder Maus nach vorangegangener Laminektomie zum Beispiel auf der Höhe Th 9 durchzuführen. Dabei wird durch einen über dem frei präparierten Rückenmark positionierten Kupferstempel mittels Aktivierung des entsprechenden Computerprogramms die jeweilige Läsion appliziert. Durch interaktive Messungen kann hierbei eine hohe Standardisierbarkeit und Wiederholbarkeit des Experiments bei vorher festgelegter Kraft erreicht werden. Zur Validierung des Traumamodells wurden Verhaltenstests etabliert, bei denen die Motorik, die Berührungs- und Wärmeempfindlichkeitsschwellen für die einzelnen

Tiere standardisiert erhoben werden konnten (Knerlich-Lukoschus et al., 2008). Bezüglich der Motorik erfolgte die Testung nach den standardisierten Protokollen nach Basso, Beattie, Bresnahan (Basso et al., 1995). Diese Skala reicht von 0 (= keine Bewegung der Hinterläufe) bis 21 (= normale Bewegungsabläufe). Die Beweglichkeit und die Koordination der Hinterläufe nehmen mit steigendem BBB-Score zu. Bei einem Score zwischen 0 und 7 Punkten besteht eine isolierte Bewegung der Hauptgelenke der Hinterläufe (Hüft-, Knie-, Sprunggelenk). Bei fortgeschrittener Rehabilitation (8-13 Punkte) findet eine koordinierte Bewegung der Hinterläufe statt (Aufsetzen der Fußsohlen, „Stepping“). In der Endphase der lokomotorischen Rehabilitation (14-21 Punkte) ist der Rumpf stabil und die Pfoten können während des Laufens angehoben werden.

Die diesem Modell zugrundeliegenden Testergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst: Die BBB-Scores der Kontroll-Tiere im gesamten zeitlichen Verlauf beispielsweise zeigen eine physiologische Beweglichkeit. Die Tiere mit leichter Läsion (=100) zeigen über den gesamten Verlauf signifikant höhere BBB-Scores als die Tiere der anderen beiden Läsionskohorten. Zwischen den Tieren mit mittlerer und starker Läsion zeigt sich an Tag 2 und 7 ein signifikanter Unterschied, der dann im zeitlichen Verlauf abnimmt (Knerlich-Lukoschus et al., 2008).

Dieses Modell war die Grundlage für die weiterführenden Untersuchungen dieser Arbeit zur sekundären Schadenskaskade nach spinalen Läsionen mit Fokus auf die posttraumatische Inflammation und Regeneration (Knerlich-Lukoschus, 2015, Knerlich-Lukoschus u. Held-Feindt, 2015). Basierend auf diesen Arbeiten ergaben sich die im Folgenden dargelegten Fragestellungen, die in der vorgelegten Arbeit weiter untersucht werden sollten.

2. Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war, die Involvierung von Epo und seinem Rezeptor EpoR in die sekundären Schadenskaskaden nach standardisierten Rückenmarksläsionen darzustellen. Dies ist die Basis für gezieltere experimentelle Therapieansätze mit Epo-Derivaten nach Schädigungen des Rückenmarks. Dazu sollten detailliert die Expressionsmuster dieses neuroprotektiven Effektor/Rezeptor-Paares entlang der gesamten spinalen Achse in einem klinisch relevanten Rückenmarkstrauma-Modell der Ratte analysiert werden. Es wurden im Einzelnen folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welche anatomischen Verteilungsmuster von Epo und seinem Rezeptor ergeben sich über einen post-traumatischen Zeitverlauf von 6 Wochen nach standardisiert applizierten spinalen Kontusionen unterschiedlicher Stärke?
2. Lässt sich eine zeit- und läsionsstärkeabhängige Induktion von Epo bzw. Epo-Rezeptor nachweisen?
3. Welche Zelltypen zeigen dabei Epo/Epo-Rezeptor-Immunreaktivitäten?
4. Besteht eine Assoziation zwischen den Expressionsmustern von Epo/Epo-Rezeptor und dem Expressionsmuster relevanter pro-inflammatorischer Chemokine, die nach einer spinalen Kontusion in dem Rattenmodell induziert werden?

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die in der vorgelegten Arbeit verwendeten Rückenmarksgewebe wurden zuvor in einem hochstandardisierten Rückenmarkskontusionsmodell bei der Ratte gewonnen (Details unter 1.3 experimentelle spinale Läsionsmodelle). Dabei wurden folgende Behandlungsgruppen untersucht: Kontrollgruppe (n=6), in welcher die Tiere eine Laminektomie ohne Applikation einer Läsion erhielten, und drei Rückenmarksläsionsgruppen unterschiedlicher Kontusionsstärken, bei denen auf der Höhe T 9 (nach Laminektomie auf der entsprechenden Höhe) Kontusionen der Rückenmarksstränge mit 100- (n=8), 150- (n=9) und 200 kdyn (n=10) Stärken appliziert wurden (Abbildung 4).

Im zeitlichen postoperativen Verlauf wurde die Lokomotorik der Ratten mittels BBB-Test überprüft. Darüber hinaus erfolgten Verhaltenstests bezüglich der potentiellen posttraumatischen Entwicklung durch Evaluation von Verhaltensweisen, die mit neuropathischen Schmerzen assoziiert sind (mechanische Sensibilität und Thermo-rezeption; Details auch unter Knerlich-Lukoschus, 2008).

Neben den verschiedenen Gruppen bezüglich der Läsionsstärke wurden die Tiere auch in unterschiedliche Überlebenszeitgruppen eingeteilt. Dabei wurden Ratten 7, 15 und 42 Tage nach den entsprechenden Operationen und Kontusionen getötet und das Gewebe wurde für die histologische Untersuchung aufgearbeitet. Für die in der vorgelegten Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Ratten mit Paraformaldehyd kardial perfundiert. Von den komplett präparierten Rückenmürkern wurden 10µm dicke Serienschnitte von allen Rückenmarksabschnitten im Kryostaten angefertigt. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei – 80 Grad Celsius gelagert.

Das Studiendesign ist in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

Studiendesign

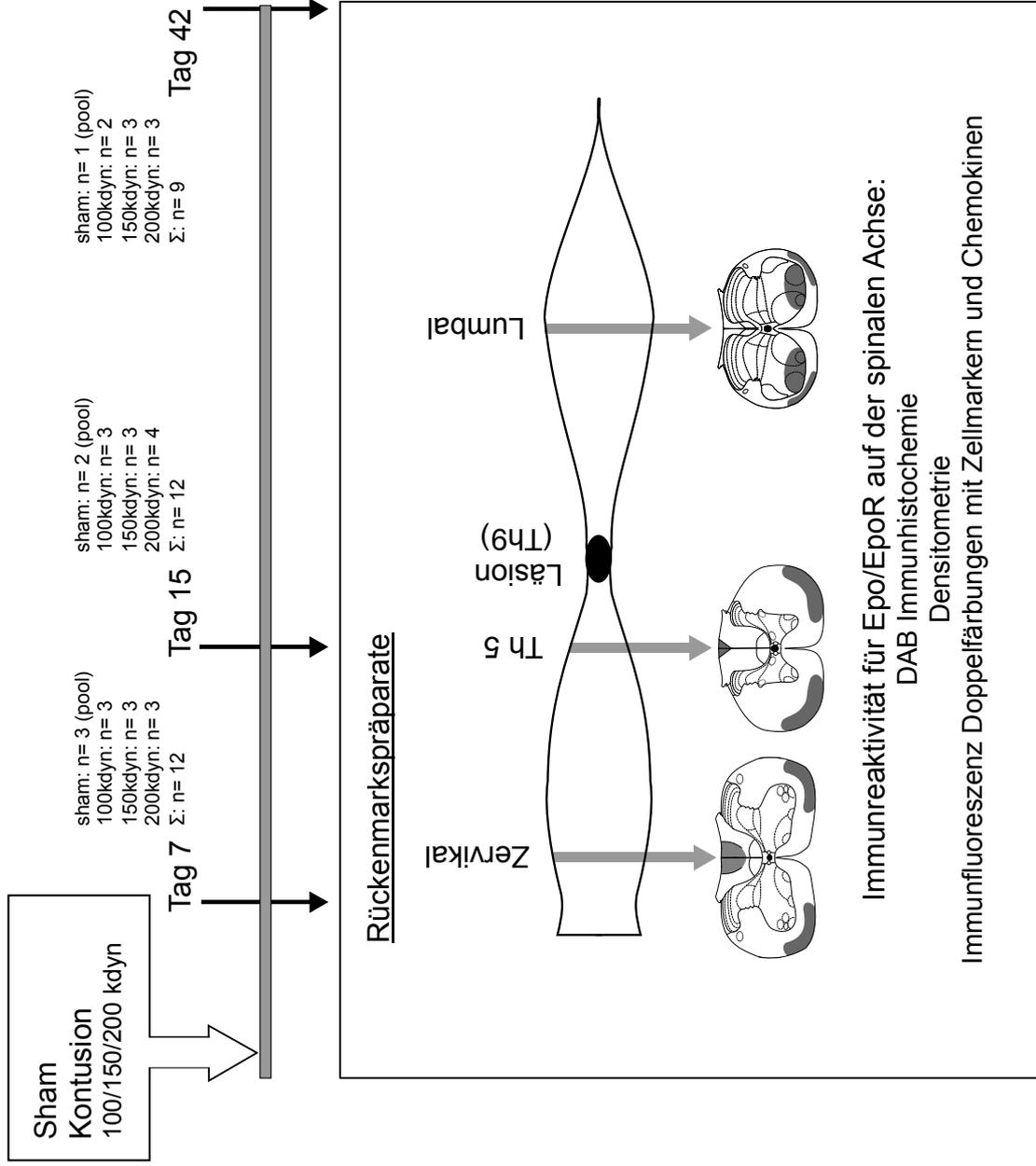


Abbildung 4

Studiendesign

Die Kohorten dieser Studie teilen sich auf in Negativkontrolle (sham), welche aus allen Überlebenszeitpunkten rekrutiert und als eine Kontrollgruppe zusammengefasst wurden und die Läsionsgruppe mit der applizierten Stärke von 100-, 150- und 200 kdyn. Zu den Untersuchungszeitpunkten (Tag 7, -15, und -42) wurde auf der gesamten spinalen Achse von zervikal bis lumbal die im grauen Kasten aufgeführte Methodik durchgeführt.

Die Immunreaktivität für Epo und den Rezeptor wurde mittels DAB-Färbung dargestellt. Die Immunreaktivitäten wurden per Densitometrie quantifiziert. Zusätzlich wurden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen genutzt, um Kolorisationen mit Zellmarkern und ausgewählten Chemokinen zu visualisieren. Auf der spinalen Achse von zervikal bis lumbal reichend wurden Gewebeschnitte entnommen. In den so aufbereiteten histologischen Präparaten wurden die markierten Regionen ausgewertet.

Zervikal: Hinterstränge, ventrolaterale weiße Substanz

Th5: Hinterstränge, ventrolaterale weiße Substanz

Lumbal: zusätzlich Vorderhörner

3.2 Immunhistochemie und Densitometrie

Um die bereits dargestellte Fragestellung zu bearbeiten, wurden zwei Färbemethoden genutzt.

1. Die zeit- und läsionsabhängigen Lokisationsmuster des Epo und seines Rezeptors wurden mit kommerziellen Antikörpern durch die DAB-Färbung (3,3'-Diaminobenzidin) dargestellt unter Anwendung des Protokolls der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode).
2. Die Epo/EpoR-Immunreaktivität einzelner Zelltypen wurde durch Doppelfärbungen mit gängigen Zellmarkern in der Immunfluoreszenzfärbung visualisiert. Eine mögliche Kofärbung mit den pro-inflammatorischen Chemokinen wurde ebenfalls durch Doppelimmunfluoreszenz untersucht.

3.2.1 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Färbung und Spezifitätsprüfung der Primärantikörper

Informationen zu den in der Arbeit verwendeten Primärantikörpern sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. In der Tabelle 2 finden sich für die immunhistochemische Färbung verwendete Materialien aufgelistet. Nach Post-Fixierung der kryokonservierten Schnitte (Schnittdicke 10µm) in PFA(4%)/PBS für 30 Minuten wurden die Phospholipide der Zellmembranen in TritonX-100 (3%)+H₂O₂ (1%)/PBS gelöst. Danach wurden die Schnitte für 60 Minuten mit 10%ig verdünnten Ziegen- (Epo) bzw. Kaninchen-Serum (EpoR) inkubiert, was zu einer Abnahme von unspezifischen Bindungen führt. Nach diesen vorbereitenden Schritten wurde das Gewebe mit den primären Antikörpern über Nacht bei +4°C inkubiert, die in Serum (2%)/PBS/0,3% Triton X-100 gelöst waren. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Gewebeschnitte jeweils zweimal mit PBS für 10 Minuten gewaschen.

Am zweiten Tag erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem biotinylierten, sekundären Antikörper (Konzentration: 1:200), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Der ABC-Komplex wurde in dem vom Hersteller angegebenen Serum (1,5%)/PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur und nach einem intensiven Waschschrift für weitere 60 Minuten auf die Schnitte aufgetragen.

Danach wurden die Präparate für 4 Minuten mit Diaminobenzidin (DAB, Sigma; 6mg in 10ml 0,1M Trispuffer + 10µl 1% H₂O₂) angefärbt. Die Färbereaktion wurde mit Wasser gestoppt. Daraufhin wurde eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun für 30-

60 Sekunden durchgeführt. Nach dem Abwaschen der nicht reagierten Färbemittel bei laufendem Leitungswasser wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe (70%, 80%, 95%, 100%) dehydriert. Abschließend wurden die Schnitte dreimal in RotiClear für je 10 Minuten gereinigt, um danach die Deckgläser mit RotiMount zu fixieren.

Um die Spezifität der verwendeten Primär-Antikörper zu überprüfen, wurden als Positiv-Kontrolle Ratten-Nierenschnitte mit den Antikörpern für Epo und seinen Rezeptor angefärbt. Die Niere als physiologischer Ort der Epo Expression zeigte eine deutliche Immunreaktivität für das Erythropoietin und seinen Rezeptor.

Als Negativ-Kontrolle dienten: 1. die Präadsorption der Epo/EpoR-Antikörper mit den entsprechenden Kontrollpeptiden, 2. das Weglassen des Primärantiköpers in der DAB-Färbung und 3. die Verwendung von nicht-markiertem IgG als Primärantikörper auf einigen Rückenmarksschnitten.

Übersicht der verwendeten Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Spezifität	Epitop/Verdünnung	Quelle
EpoR	Erythropoietin-Rezeptor (Ratte)	in Kaninchen syn. polyklonales IgG, 1:700	Santa Cruz Biotechnology, USA, Sc-695
Epo	Erythropoietin (Ratte)	in Ziege syn. polyklonales IgG, 1:5000	Santa Cruz Biotechnology, USA, Sc-1310

Zelluläre Markerantikörper

Antikörper	Spezifität	Epitop/Verdünnung	Quelle
NeuN	NeuN, Neuron	Ratte, Neuron-specific nuclear protein, in Maus syn. monoklonales IgG, 1:1000	Chemikon, USA MAB377
GFAP	GFAP, Astrozyten	Ratte, Glial fibrillary acidic protein, in Maus syn. monoklonales IgG ₁ , 1:500	Millipore, USA MAB3402
Nf-200	Neurofilament 200kD, Neuron	Ratte, H-Kette des Neurofilaments 200kD, in Maus syn. monoklonales IgG, 1:1000	Chemikon. USA MAB5266
CD-11	CD-11b (OX-42), Makrophagen, Mikroglia	Ratte, CD-11b (OX-42), in Maus syn. monoklonales IgG, 1:10.000	Serotech, Oxford UK MCA275G

Antikörper	Spezifität	Epitop/Verdünnung	Quelle
CD-68	CD-68 (ED-1), Makrophagen	Ratte, CD-68 (ED-1), in Maus syn. monoklonales IgG, 1:200	Serotech, Oxford UK MCA341R
CNPase	CNPase, Oligodendrozyten	Ratte, 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase(CNPase), in Maus syn. monoklonales IgG, 1:250	Abcam, Cambridge UK ab6319
BLBP	Astrozyten BLBP, radiale Glia , Astrozyten	Ratte, Brain Lipid-Binding Protein (BLBP), in Kaninchen syn. polyklonales IgG, 1:1000	Chemicon, USA AB9558
Nestin	Nestin, primitives Neuroepithel	Ratte, Intermediärfilament Klasse VI (Nestin), in Maus syn. monoklonales IgG, 1:1000	Chemicon, USA MAB353
vWF	vWF, Endothel	Ratte, von-Willebrandt-Faktor, in Maus syn. monoklonales IgG, 1:50	Acris, Hiddenhausen D SM1686T

Entzündungs-assoziierte Antikörper

Antikörper	Spezifität	Epitop/Verdünnung	Quelle
CCL3	CCL3 (MIP-1 α)	Ratte, Macrophage Inflammatory Protein-1- α , in Kaninchen syn. polyklonales IgG, 1:250	Acris, Hiddenhausen D PP038P1
CCR1	CCR1	Ratte, C-C Chemokine Rezeptor Familie Typ 1, in Kaninchen syn. polyklonales IgG, 1:100	Acris, Hiddenhausen D SP4001P

Tabelle 1 tabellarische Auflistung der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper

3.2.2 Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen

Informationen zu den in der Arbeit verwendeten Primärantikörpern sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Weitere für die Färbemethode verwendete Materialien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Gewebeschnitte wurden zuerst für 10 Minuten post-fixiert in Aceton/Methanol (1:1). Daraufhin folgte eine Färbung mit Sudanschwarz (1%/70%iger Ethanol) mit vorheriger De- und anschließender Rehydratation in Ethanolreihen. Mögliche unspezifische Protein-Bindungen wurden bei Raumtemperatur auf BSA (0,1%BSA/0,2% Glycin in TBS) basierend geblockt. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte über Nacht mit dem ersten primären Antikörper bei +4°C inkubiert, der in TBS gelöst war.

Am zweiten Tag wurde der Primärantikörper mit dem entsprechenden sekundären Fluorochrom-markierten Antikörper (1:1000/TBS-T) für 1 Stunde bei 37°C in Dunkelheit konjugiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden abgedunkelt durchgeführt, um den Lichteinfall so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurde der zweite Primärantikörper auf das Gewebe pipettiert. Die Inkubation erfolgte analog über Nacht und am dritten Tag wurde der zweite Sekundär-Antikörper entsprechend inkubiert.

Abschließend wurden die Zellkerne mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI (=4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilaktat) angefärbt, um die Lokalisation der Immunreaktivität auf zellulärer Ebene präziser beschreiben zu können. Nach abschließendem Waschen in Aqua dest. wurden die Objektträger eingedeckt.

3.2.3 Auswertung und Densitometrie

Die Ergebnisse der DAB-Färbungen für Erythropoietin und des Rezeptors wurden mikroskopisch ausgewertet. Unter Zuhilfenahme der Atlanten von Paxinos & Watson der wurden die Immunreaktivitäten zu jedem der 33 untersuchten Tiere in anatomische Schemata der zervikalen, hohe thorakalen und lumbalen Segmente eingetragen (Watson et al., 2008). Eine abschließende Sichtung dieser Kartierungen brachte die Regionen hervor, die endgültig ausgewertet werden sollten. Der Auswertungsalgorithmus ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

Die Immunreaktivitätsdichte der relevanten Regionen wurden semi-quantitativ densitometrisch erfasst. Die entsprechende Region jedes Schnittes wurde in 40facher Vergrößerung am Mikroskop fotografiert. Mit der Software „ImageJ“ wurden die Bilder in eine binäre Schwarz-Weiß-Darstellung konvertiert und invertiert, sodass eine positive Immunreaktivität weiß erschien. Anschließend wurden die Aufnahmen densitometriert. Die Skala reicht von 0=schwarz bis 255=weiß und die Mittelwerte der vermessenen Areale wurden tabellarisch gespeichert und bildeten die Grundlagen für die nachfolgende statistische Auswertung der Daten.

Auswertungsalgorithmus zur Untersuchung der zeit- und läsionsabhängigen Expressionsmuster des Epo und seines Rezeptors

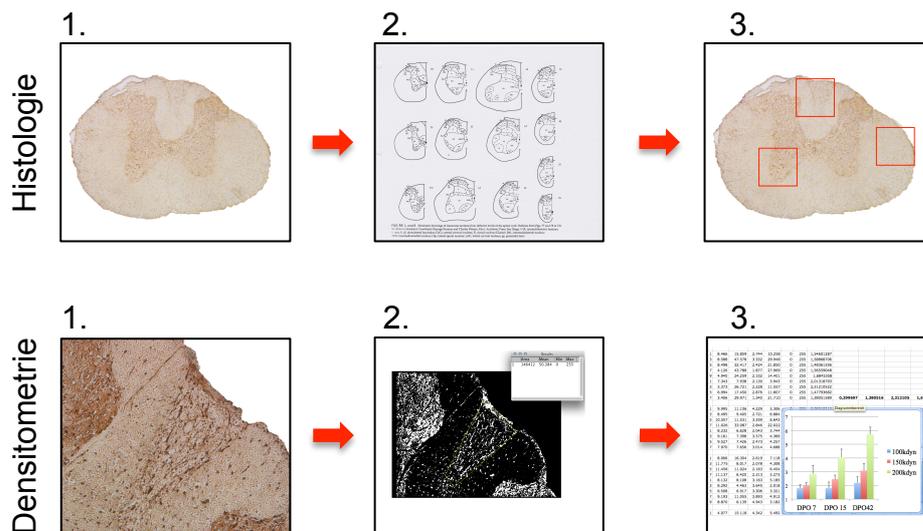


Abbildung 5

Histologie:

1. Histologische Auswertung der Gewebeschnitte am Mikroskop
2. Eintragen der Ergebnisse in anatomische Atlanten nach Paxinos und Watson (Dana Reeve Foundation)
3. Auflistung der Regionen von Interesse unter Berücksichtigung der vorherigen Schritte: Hinterstränge, Ventrolaterale weiße Substanz und Vorderhörner (lumbal)

Densitometrie:

1. Anfertigung von Fotoaufnahmen der untersuchten Regionen für alle Gewebeschnitte
2. Bearbeitung mit ImageJ (schwarz-weiß Darstellung), Invertierung der binären Darstellung, anschließende Densitometrie. Positive Immunreaktivität= weiße Darstellung n=255, Hintergrund=schwarze Darstellung n=0.
3. Archivieren der Daten in Excel, als Datengrundlage für die nachfolgende statistische Varianzanalyse (ANOVA)

Bemerkung: Die histologischen Abbildungen wurden am PC bearbeitet und schematisiert.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die Messdaten der Densitometrie wurden statistisch ausgewertet, um eine Aussage über die Signifikanz der Messungen treffen zu können. Die Epo- und EpoR Immunreaktivitäten waren in dem experimentellen Modell die abhängigen Variablen. Der Überlebenszeitpunkt und die Läsionsstärke waren die unabhängigen Variablen. Multifaktorielle Analysen erfolgten mittels Varianzanalyse (ANOVA). Der Versuchsaufbau bedingte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (Rasch, 2006). Aufgrund der multiplen Hypothesentestung wurde die Kumulation des α -Niveaus nach Bonferroni korrigiert. Hierfür stand die Software „SPSS Statistics“ der Firma IBM zur Verfügung (siehe 3.3 Materialien). Das Signifikanzniveau wurde festgelegt auf den Wert $p \leq 0,05$. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ gilt als signifikant, ein p-Wert $\leq 0,01$ ist stark signifikant. Eine hochsignifikante Korrelation besteht ab einem p-Wert $\leq 0,001$.

Statistische Analysen zu potentiellen Korrelationen der Epo/-R IR mit klinischen Daten zur motorischen Funktion und mechanischen- sowie Temperatur-Reizschwellen wurden mit dem Korrelationstest nach Pearson durchgeführt. Das Ergebnis wird als Pearson-Koeffizient (r_p) angegeben. Die Daten zu dem Verhalten der Tiere wurden in einer vorherigen Arbeit für alle Läsionsgruppen (100-, 150- und 200 kdyn) und die Tiere der Negativkontrolle im Spätverlauf am Tag 42 gesammelt (Knerlich-Lukoschus et al., 2008).

3.3 Materialien

Lösung	Mischungsverhältnis
PBS-Stocklösung 10fach (phosphate buffer solution)	160g NaCl 4g KCl 23g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 4g KH ₂ PO ₄ ad 2L Aqua dest. (pH: 7,4)
TBS (tris buffer solution)	pH 7,5, für 6L Stammlösung 6,1g TRIS ad 1L Aqua dest. 38,25g NaCl ad 5L Aqua dest.

TBS-T	1l TBS
TBS-T	1ml Triton X-100

Substanz/Gerät/Software	Bezugsquelle/Version/Details
ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA
DAB-Substrat (10x konz.)	Roche, Mannheim, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA
Eindeckmedium (RotiMount®)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eindeckmedium (ImmoMount®)	Thermo Shandon, Cheshire, UK
Mayers Hämalaun	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol ≥99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (CH ₂ O) _n	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RotiClear	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sudanschwarz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100 (z. Analyse)	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIS (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Seren	Bezugsquelle
Esel	Jackson Immuno Research, West Grove PA, USA; Charge: 91343, 97028
Kaninchen	Jackson Immuno Research, West Grove PA, USA; Charge: 102248
Pferd	Jackson Immuno Research, West Grove PA, USA; Charge: 69625
Ziege	Jackson Immuno Research, West Grove PA, USA; Charge: 103528

biotinylierte Sekundärantikörper	Bezugsquelle
Anti-goat IgG, made in rabbit	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA Charge: V0602

Anti-mouse IgG, made in horse	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA, Charge: W0107
Anti-rabbit IgG, made in goat	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA, Charge: R0720

Fluoreszierende Sekundärantikörper	Bezugsquelle
Anti-goat IgG, made in donkey, Alexa Fluor 555	Invitrogen, Eugene OR, USA, Charge: 41821A
Anti-rabbit IgG, made in donkey, Alexa Fluor 555	Invitrogen, Eugene OR, USA, Charge: 41204A
Anti-mouse IgG, made in donkey, Alexa Fluor 488	Life technologies, Eugene OR, USA, Charge: 1305303
Anti-rabbit, made in donkey, Alexa Fluor 488	Invitrogen, Eugene OR, USA, Charge: A21206

Mikroskope	Hersteller
Axiovert 200 man	Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany
Axio Observer Z1	Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany

Software, verwendete Version	Hersteller
Zen Pro, Version 1.1.2.0	Mikroskopier-Software, © Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
AxioVision40, Version 4.8.2.0	Mikroskopier-Software, © Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Image J, Version 1.46r	Densitometrie-Software, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Gimp, Version: 2.8.10	Bildbearbeitungs-Software, © 1995-2013, Spencer Kimball, Peter Mattis und das gesamte Gimp-Entwicklungsteam
Endnote X7 (Bld 9013)	Literaturverwaltungs-Software, ©Thomson Reuters
Microsoft Word:mac, Version: 14.2.0	Textverarbeitungs-Software, © 2010

Microsoft Word:mac, Version: 14.2.0	Microsoft Corporation
Power Point:mac, Version: 14.2	Design-Software, © 2010 Microsoft Corporation
Microsoft Excel:mac, Version:14.2.0	Datenverarbeitungs-Software, © 2010 Microsoft Corporation
SPSS (statisistical package for the social sciences), Version: 22	Datenverarbeitungs-Software, © IBM Inc., Somers, NY, USA

Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Materialien und der jeweiligen Bezugsquellen beziehungsweise Methoden

4. Ergebnisse

Bei der Sichtung und Auswertung aller Gewebeschnitte mit Hilfe des Atlas von Paxinos & Watson (Watson et al., 2008) zeigte sich, dass Epo und EpoR in spezifischen Regionen entlang der gesamten spinalen Achse mittels immunhistochemischer Markierung nachweisbar waren und in spezifischen anatomischen Regionen exprimiert wurden. So wurden Epo/EpoR-Immunreaktivitäten in den Hintersträngen, der ventrolateralen weißen Substanz und den Vorderhörnern nachgewiesen. Auf der Läsionshöhe (Th9) war aufgrund der ödematösen Veränderungen und späteren Ausbildung einer typischen posttraumatischen Syrinx eine valide histologische Auswertung der Ergebnisse nicht möglich. Über histologische Veränderungen ließen sich hier keine weiteren Aussagen treffen, da durch das Kontusionstrauma keine zelluläre Architektur mehr erkennbar war.

4.1 Hinterstränge

4.1.1 Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin)

Epo-Immunreaktivitätsdichtemessungen in Kontrolltieren versus Läsionsgruppe (Densitometrie)

Densitometrisch war bei den zervikalen und thorakalen Schnitten (Th5) im gesamten zeitlichen Verlauf (Tag 7, - 15, - 42) für alle Läsionsstärken (100-, 150- und 200 kdyn) die Epo-Immunreaktivität im Vergleich zu der gemessenen Immunreaktivität in den Kontrolltieren signifikant erhöht ($p \leq 0,001$) (siehe Abbildung 6). Bei den lumbalen Schnitten waren keine signifikanten Abweichungen zwischen den kontusionierten Tieren und den Kontrolltieren nachweisbar.

Am Tag 7 nach der Läsion zeigte sich densitometrisch für alle Läsionsstärken ungefähr eine Verdoppelung der Immunreaktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren in thorakalen Segmenten (Th5). Die Immunreaktivität bei einem starken Trauma war signifikant höher als nach einem leichten Trauma (100- versus 200 kdyn, $p \leq 0,05$). 15 Tage nach der Läsion stieg die Epo-IR zervikal und auf Ebene Th5 nach Applikation schwerer Läsionen signifikant an (Tag 7, 200 kdyn versus Tag 15, 200 kdyn $p \leq 0,001$). Die Immunreaktivität am Tag 15 war auf Ebene Th5 für alle

Läsionsstärken im Vergleich zu den Kontrolltieren circa dreifach erhöht ($p \leq 0,001$). Die densitometrischen Ergebnisse bewegten sich zu diesem Untersuchungszeitpunkt für die drei unterschiedlichen Läsionsstärken zunehmend auseinander. So war die Epo-IR (zervikal, Th5) für die schwere Läsion signifikant höher als für die leichte Läsion (Tag 15, 100- versus 200 kdyn, $p \leq 0,001$). Am Tag 42 erreichte die Epo-IR-Dichte auf der Ebene Th5 nach schweren Läsionen ihr Maximum und war 6-fach erhöht im Vergleich zu den gemessenen Werten in den Kontrolltieren (200 kdyn versus Kontrolle $p \leq 0,001$). Der Anstieg nach leichter Läsion auf der Ebene Th5 war schwächer und erreichte etwas weniger als das Dreifache der Referenzdichte ($p \leq 0,001$). Die Epo-IR zwischen leichter und schwerer Läsion war bei schwerer Läsion auf beiden Ebenen (Zervikal, Th5) signifikant höher als bei leichter Läsion (Tag 42, 100- versus 200 kdyn $p \leq 0,001$).

Morphologie der Epo-Immunreaktivitäten

Bei den Kontrolltieren fanden sich einzelne Zellen in den Hintersträngen (siehe Abbildung 7). Es handelte sich morphologisch dabei am ehesten um gliale Zellen. Vergleichend dazu waren in den Läsionstieren ähnliche Zellen Epo-immunreaktiv (siehe Abbildung 7). Über den weiteren postkontusionellen Verlauf wiesen diese Zellen teilweise verdickte, stark verzweigte Zellfortsätze auf im Sinne einer Gliose. Dieses war insbesondere zu den späten untersuchten Zeitpunkten nach schwerer Läsion sichtbar. Die gliotische Reaktion war in den Schnitten mit 200 am deutlichsten ausgeprägt.

Densitometrie und Varianzanalyse der zeit- und läsionsabhängigen Epo-Immunreaktivität der Hinterstränge auf der spinalen Achse

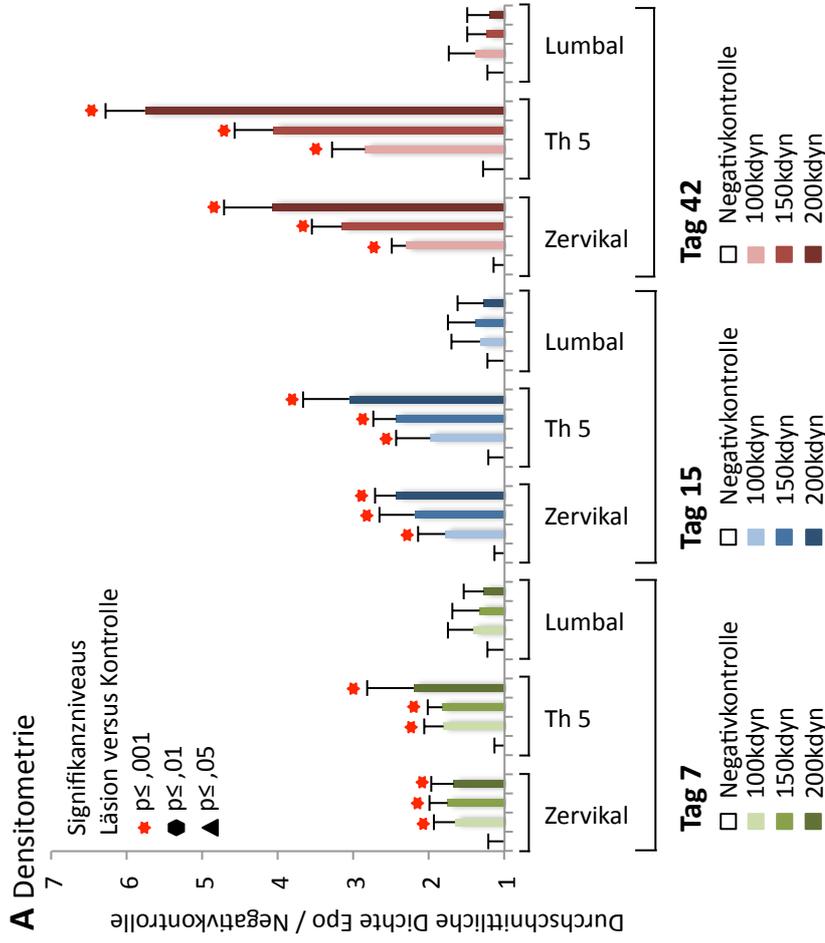
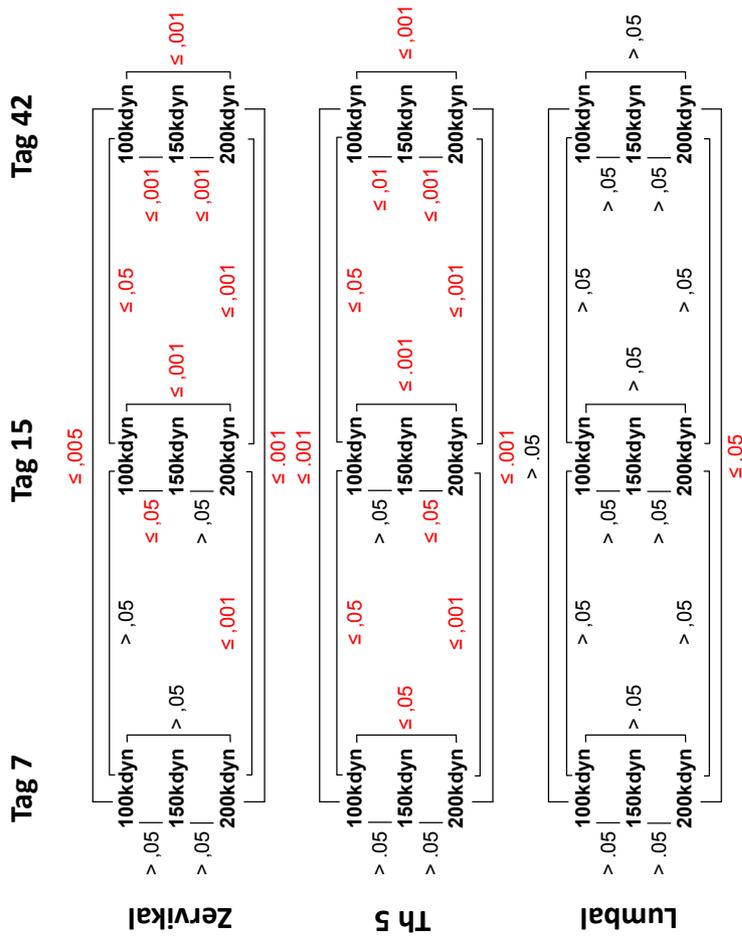


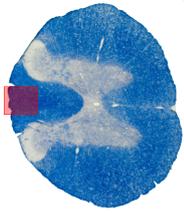
Abbildung 6

A Densitometrie: Zeit- und Läsions-abhängige Epo-Immunreaktivität (IR) der Hinterstränge der spinalen Achse (Zervikal, Th 5, Lumbal). Untersuchungszeitpunkte: Tag 7; Tag 15 und Tag 42. Die Intensität der Läsion lag bei 100-, 150- oder 200kdyn. Die densitometrischen Ergebnisse der lädierten Tiere sind relativ zu der Epo-Dichte der Tiere der Negativkontrolle dargestellt. Signifikanzniveaus der einzelnen Kohorten zur jeweiligen Kontrollgruppe sind mit p ≤ ,001 (*) p ≤ ,01 (●) und p ≤ ,05 (▲) markiert.

B Multiple Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA)



B Mit Hilfe der Multiplen Varianzanalyse werden für die unabhängigen Variablen des Traumamodells (Läsionsstärke und Überlebenszeitpunkt nach Läsion) Veränderungen der IR für Epo auf Signifikanz überprüft: p ≥ ,05 = nicht signifikant; Signifikanzniveaus p ≤ ,05; p ≤ ,01; p ≤ ,001. Auf jeder untersuchten Rückenmarksebene (Zervikal, Th5, Lumbal) wurde für die Überlebenszeitpunkte nach Läsion (Tag 7, Tag 15, Tag 42) die Varianz der Läsionsstärken zueinander auf Signifikanz überprüft (100- zu 150-; 100- zu 200-, 150- zu 200kdyn). Für die leichte (100kdyn) und starke (200kdyn) Läsion wurde jeweils die Varianz zeitabhängig auf Signifikanz untersucht (Tag 7 zu Tag 15; Tag 7 zu Tag 42; Tag 15 zu Tag 42).



Läsionsabhängige Epo-Immunreaktivität der Hinterstränge im zeitlichen Verlauf (Th5)

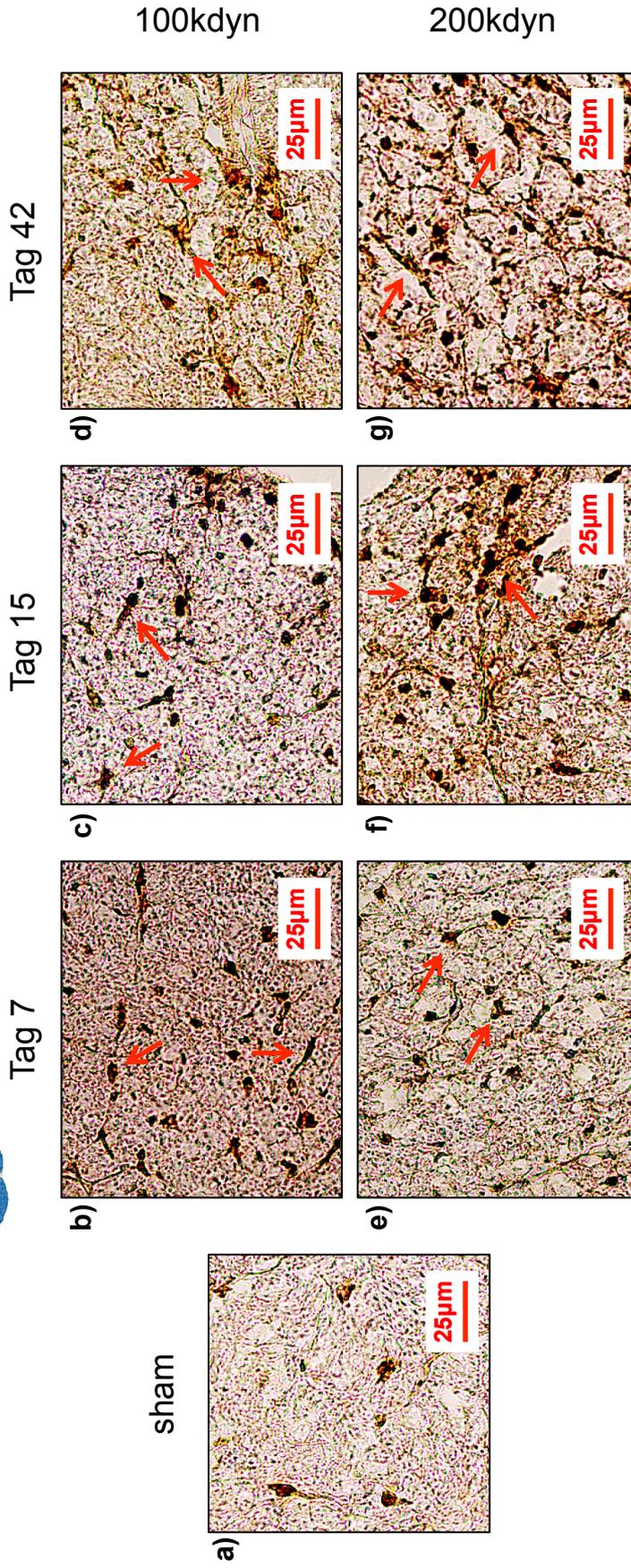


Abbildung 7 Läsionsabhängige Epo-Immunreaktivität der Hinterstränge im zeitlichen Verlauf (Th5)

- a) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: Laminektomie, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; im linken Bildrand von der Morphologie her zwei gliale Zellen
 - b) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 7; Pfeile spindelförmige Zellen (15µm);
 - c) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; Pfeile: 20µm große Zellen glialer Morphologie
 - d) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 42; Pfeile: 25µm große Zellen, verdichtete Extrazellulärmatrix
 - e) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 7; Pfeile: Zellen mit Immunreaktivität für Epo (10µm)
 - f) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; Pfeile: perlschnurartige Zellverbände (unterer Pfeil), hypertrophe Extrazellulärmatrix
 - g) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 42; dichte Extrazellulärmatrix mit positiver Immunreaktivität für Epo, rote Pfeile: spindelförmige Zellen mit Epo-IR
- Abbildung links der Überschrift zur Veranschaulichung der betrachteten Lokalisation: EC-Färbung des Rückenmarks, 5x; roter Kasten markiert die ausgewertete Region

Regressionsanalyse der Epo-Immunreaktivitäten und des Schmerz-assozierten Verhaltens im Spätverlauf

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Epo-Expressionsdichten in den Hintersträngen und der Entwicklung zentraler (neuropathischer) Schmerzen im Spätverlauf nach dem spinalen Trauma darzustellen, wurden die ermittelten Dichtewerte mit in zuvor gewonnenen Daten aus Verhaltenstests korreliert. Konkret wurden die in einem anderen Teilbereich des Projektes ermittelten Schwellenwerte bezüglich der mechanischen Sensibilität (Knerlich-Lukoschus et al., 2008) mit den Dichtewerten der Epo-Immunreaktivität an Tag 42 nach Läsion im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren korreliert: Im Spätverlauf nach spinaler Läsion (Tag 42) bestand nach den Analysen ein signifikanter Zusammenhang zwischen der erhöhten Epo-IR in Läsionstieren mit deren signifikant verminderten Reizschwellen ($r_p = -0,957$; $R^2 = 0,916$; $p < 0,001$). Letzteres kann als Verhaltenskorrelat neuropathischer Schmerzen betrachtet werden (nähere Ausführungen dazu in der Diskussion).

Regressionsanalyse der Immunreaktivitäten in den Hintersträngen mit Schmerz-assoziertem Verhalten im Spätverlauf (Tag 42)

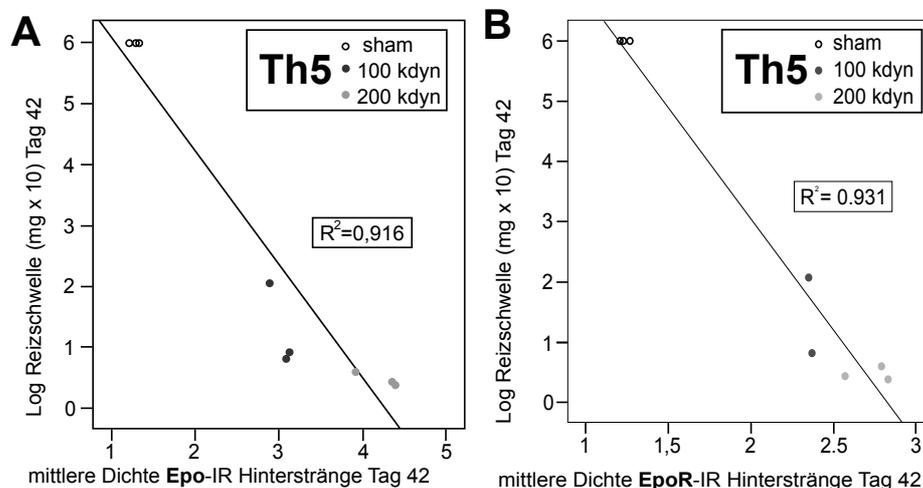


Abbildung 8 Regressionsanalyse der Hinterstrang-IR mit Schmerz-assoziertem Verhalten (Tag 42)

A Epo-IR: signifikanter Zusammenhang zwischen hoher Epo-IR und herabgesetzten mechanischen Reizschwellen. $r_p = -0,957$; $R^2 = 0,916$; $p < 0,001$ **B** EpoR-IR: signifikanter Zusammen zwischen hoher EpoR-IR und herabgesetzten mechanischen Reizschwellen. $r_p = -0,965$; $R^2 = 0,931$; $p < 0,002$. r_p = Regressionskoeffizient nach Pearson, R^2 = Bestimmtheitsmaß (≥ 0 , ≤ 1), p = Signifikanzniveau $< ,05$

4.1.2 Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin-Rezeptor)

EpoR-Immunreaktivitätsdichtemessungen in Kontrolltieren versus Läsionsgruppe (Densitometrie)

In der Densitometrie zeigte sich bei den zervikalen und thorakalen Schnitten (Th5) im gesamten zeitlichen Verlauf (Tag 7, - 15, - 42) für alle Läsionsstärken (100-, 150- und 200 kdyn) die EpoR-Immunreaktivität im Vergleich zu der gemessenen Immunreaktivität in den Tieren der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p \leq 0,001$; siehe Abbildung 9). In den lumbalen Rückenmarkssegmenten waren nach Läsion keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe nachweisbar.

Am Tag 7 war die IR für den Rezeptor von Epo auf thorakalen Schnitten (Th5) auf circa das Doppelte erhöht im Vergleich zu der IR in den Schnitten der Kontrollgruppe (100-, 150- und 200 kdyn versus Kontrollgruppe, $p \leq 0,001$). Tiere mit schwerer Läsion (200 kdyn) zeigten am Tag 7 in thorakalen Segmenten (Th5) signifikant höhere Immunreaktivitäten als Tiere mit leichter Läsion (100 kdyn) mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,005$ (Tag 7, 100 kdyn versus 200 kdyn, $p \leq 0,005$).

Am Tag 15 zeigten Tiere in zervikalen Segmenten mit leichten- und schweren Läsionen (100- und 200 kdyn) einen signifikanten Anstieg der EpoR-IR in den Hintersträngen (Zervikal, Tag 7 versus Zervikal Tag 15 für 100- und 200 kdyn; jeweils $p \leq 0,05$). Auf der Ebene Th5 bestätigte sich dies nur für Tiere mit leichter Läsion (Tag 7, 100 kdyn versus Tag 15 100 kdyn, $p \leq 0,005$). Hier zeigte sich die EpoR-IR auf das circa 2,5-fache in Bezug zu der Kontrollgruppe erhöht (100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,001$). Die Unterschiede zwischen leichter Läsion und schwerer Läsion waren auf zervikaler und thorakaler Ebene (Th5) signifikant (leichte Läsion, 100 kdyn versus schwere Läsion, 200 kdyn, $p \leq 0,05$).

Vier Wochen später am Tag 42 stieg die EpoR-Dichte sowohl für Tiere mit leichter und schwerer Läsionsstärke auf zervikalen und thorakalen Abschnitten auf die höchsten Werte im Untersuchungszeitraum an (Tag 15 versus Tag 42 jeweils für 100- und 200 kdyn, $p \leq 0,001$). In hohen thorakalen Abschnitten (Th5) war die Immunreaktivität auf das 3,5-fache der Kontrollgruppe erhöht (Tag 42; 100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,001$). Die Unterschiede zwischen allen drei Läsionsstärken 100-, 150- und 200 kdyn waren am Tag 42 in zervikalen und thorakalen Schnitten signifikant (Tag 42, zervikal und Th5; 100- versus 150 kdyn; 100- versus 200 kdyn und 150- versus 200 kdyn, $p \leq 0,005$).

Morphologie der EpoR-Immunreaktivitäten

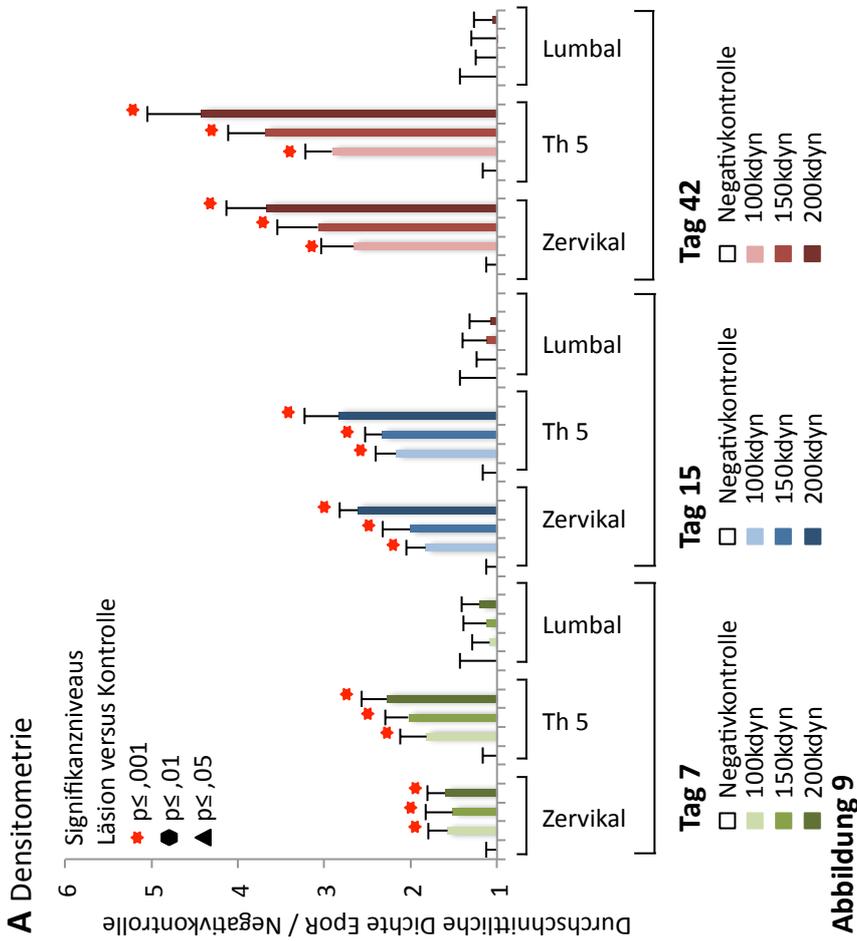
In den Hintersträngen von unversehrten Rückenmarkssträngen waren einzelne Zellen verteilt. Morphologisch handelt es sich wahrscheinlich um Zellen glialer Herkunft (siehe Abbildung 10).

Bei Tieren mit Rückenmarksläsion zeigten sich im gesamten zeitlichen Verlauf in den Hintersträngen Zellen mit Immunreaktivität für den Epo-Rezeptor. Im zeitlichen Verlauf bis hin zu Tag 42 schienen die Zellen zu hypertrophieren. Dies ist am ehesten als postkontusionelle-Gliose zu interpretieren mit maximaler Ausprägung am Tag 42 bei Tieren mit schwerer Läsion.

Regressionsanalyse der EpoR-Immunreaktivitäten und des Schmerz-assoziierten Verhaltens im Spätverlauf

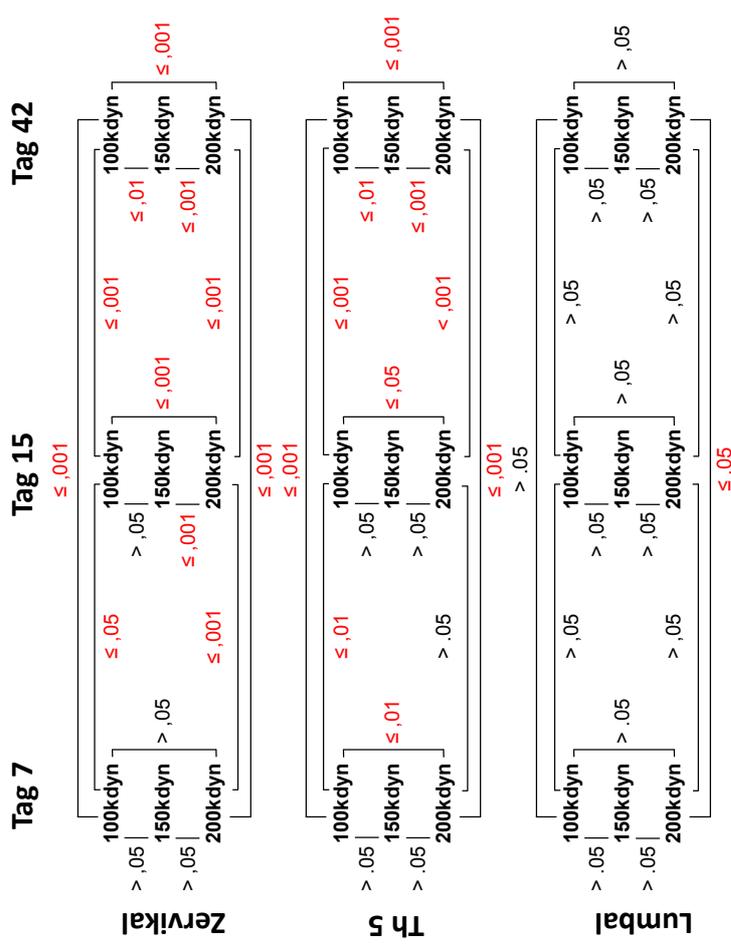
Wie für Epo wurden die EpoR-Immunreaktivitätsdichten mit den Werten aus zuvor ermittelten Reizschwellen auf mechanische Stimulationen am Tag 42 nach Läsion im Vergleich zu den Kontrolltieren korreliert (siehe Abbildung 8). Im Spätverlauf nach spinaler Läsion (Tag 42) konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der erhöhten Epo-IR in den Läsionstieren und deren signifikant verminderten Reizschwelle dargestellt werden ($r_p = -0,965$; $R^2 = 0,931$; $p < 0,002$).

Densitometrie und Varianzanalyse der zeit- und läsionsabhängigen EpoR-Immunreaktivität der Hinterstränge auf der spinalen Achse

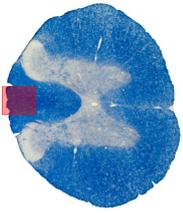


A Densitometrie: Zeit- und Läsions-abhängige EpoR-Immunreaktivität (IR) der Hinterstränge der spinalen Achse (Zervikal, Th5, Lumbal). Untersuchungszeitpunkte: Tag 7; Tag 15 und Tag 42. Die Intensität der Läsion lag bei 100-, 150- oder 200kdyn. Die densitometrischen Ergebnisse der lädierten Tiere sind relativ zu der IR-Dichte der Tiere der Negativkontrolle dargestellt; Negativkontrolle = 1. Signifikanzniveaus der einzelnen Kohorten zur jeweiligen Kontrollgruppe sind mit $p \leq ,001$ (*) $p \leq ,01$ (●) und $p \leq ,05$ (▲) markiert.

B Multiple Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA)



B Mit Hilfe der Multiplen Varianzanalyse werden für die unabhängigen Variablen des Traumamodells (Läsionsstärke und Überlebenszeitpunkt nach Läsion) Veränderungen der IR für EpoR auf Signifikanz überprüft: $p \geq ,05$ = nicht signifikant; Signifikanzniveaus: $p \leq ,05$; $p \leq ,01$; $p \leq ,001$. Auf jeder untersuchten Rückenmarksebene (Zervikal, Th5, Lumbal) wurde für die Überlebenszeitpunkte nach Läsion (Tag 7, Tag 15, Tag 42) die Varianz der Läsionsstärken zueinander auf Signifikanz überprüft (100- zu 150-, 100- zu 200-, 150- zu 200kdyn). Für die leichte (100kdyn) und starke (200kdyn) Läsion wurde jeweils die Varianz zeitabhängig auf Signifikanz untersucht (Tag 7 zu Tag 15; Tag 7 zu Tag 42; Tag 15 zu Tag 42).



Läsionsabhängige EpoR-Immunreaktivität der Hinterstränge im zeitlichen Verlauf (Th5)

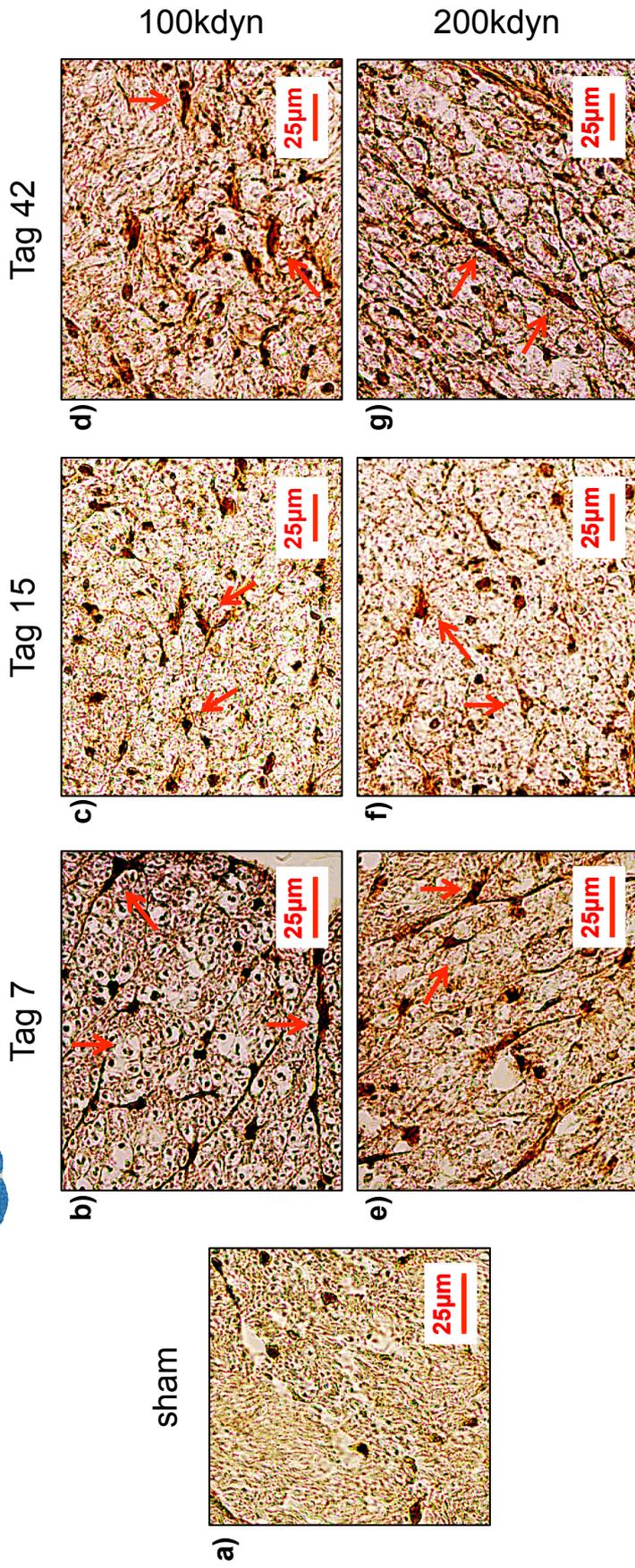


Abbildung 10 Läsionsabhängige EpoR-Immunreaktivität der Hinterstränge im zeitlichen Verlauf (Th5)

- a) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: Laminektomie, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; einige rundliche Zellen mit EpoR-IR (ca. 8 µm)
- b) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 7; rote Pfeile: Zellen mit glialer Morphologie
- c) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; Zellen mit EpoR-Immunreaktivität markiert (rote Pfeile)
- d) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 42; Zellkörper (circa 20µm), von der Morphologie her am ehesten gliale Zellen
- e) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 7; rote Pfeile: runde Zellen mit kräftigen Zellfortsätzen
- f) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; rote Pfeile: Zellen mit EpoR-Immunreaktivität
- g) Hinterstränge, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 42; rote Pfeile: perischnurartig aufgereichte Zellkörper (ca. 25 µm), dichte Extrazellulärmatrix

Abbildung links der Überschrift zur Veranschaulichung der ausgewerteten Region; EC-Färbung des Rückenmarks, 5x Vergrößerung, Ebene Th5; Roter Kasten markiert die ausgewertete Region.

4.1.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Erythropoietin)

Die Methode der Immunfluoreszenz-Mehrfachmarkierung vertiefte in der vorgelegten Arbeit die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen in den Hintersträngen bezüglich des Zytokins Epo. Für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurden geeignete Rückenmarksstränge ausgesucht (Tag 42, Läsionsstärke 200 kdyn).

Die Auswertung zeigte eine Lokalisation des Erythropoietins in Astrozyten (GFAP), radialer Glia (BLBP), neuronalen Stamm- und Progenitorzellen (Nestin) und Endothelzellen (vWF). In Axonen (Nf-200), Oligodendrozyten (CNPase) und Immuneffektorzellen (ED1, CD11) erbrachte die Mehrfachmarkierung keine Kolokalisation der entsprechenden Marker mit dem Zytokin Epo in den Hintersträngen (siehe Tabelle 3). Ausgewählte Chemokine (CCL3, CCR1) waren am Tag 42 bei schwerer Rückenmarksläsion (200 kdyn) mit Erythropoietin kolokalisiert.

In der Färbung GFAP/Epo waren die Hinterstränge mit einer dichten, GFAP-positiven Extrazellulärmatrix durchzogen. Das Zytokin Epo färbte sich in den 15µm großen Zellkörpern der Astrozyten an (Tag 42, 200 kdyn, Th5; siehe Abbildung 11).

In der Färbung BLBP/Epo waren in den Hintersträngen einige radiale Gliazellen lokalisiert, in deren Zellkörpern sich das BLBP deutlich darstellte und mit Erythropoietin kolokalisiert war (Tag 42, 200 kdyn, Th5; siehe Abbildung 11).

Durch die Färbung Nestin/Epo wurden die neuronalen Stamm- und Progenitorzellen (NSPC) in den Hintersträngen und deren Assoziation mit Epo dargestellt. In den meisten dieser 20µm großen, länglich geformten Zellen zeigte sich eine Kolokalisation mit Erythropoietin (Tag 42, 200 kdyn, Th5; siehe Abbildung 11).

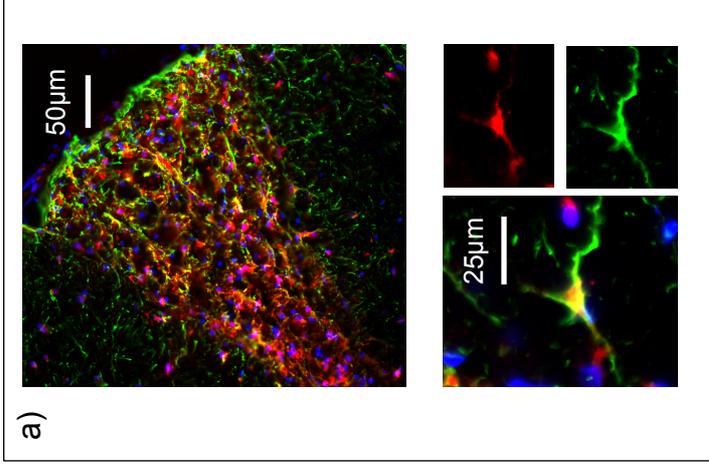
Die Hinterstrang-Gefäße, genauer die Endothelschicht, färbten sich durch die vWF-Markierung an (vWF/Epo). Das Erythropoietin war in diesen Endothelzellen lokalisiert (Tag 42, 200 kdyn, Th5; siehe Abbildung 11).

Die Doppelfärbungen mit dem Chemokin „CCL3“ (Epo/CCL3) und dem Chemokinrezeptor „CCR1“ (Epo/CCR1) ergaben in den Hintersträngen eine deutlich korrespondierende Immunreaktivität in Zellen der Größe 20- x 10µm, die länglich geformt waren (Tag 42, 200 kdyn, Th5, siehe Abbildung 12).

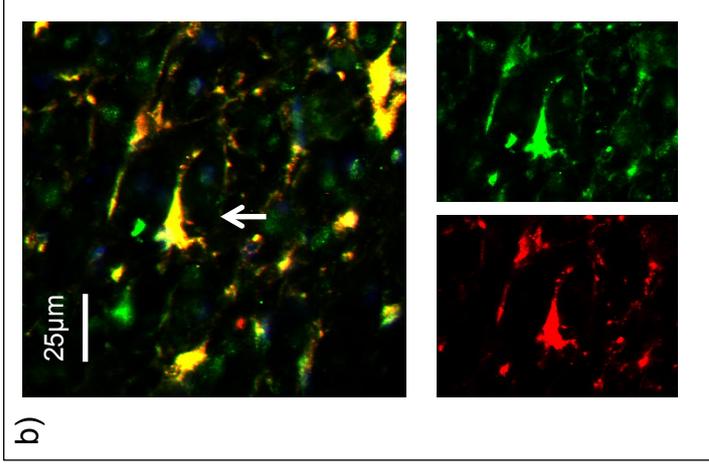
Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Zellmarker)

Hinterstränge, Erythropoietin

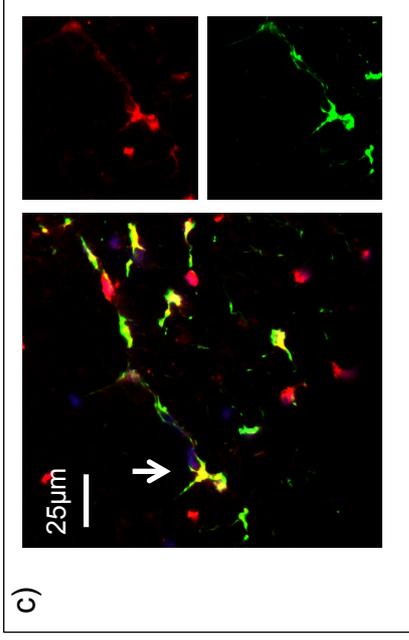
Epo/GFAP (Astrozyten)



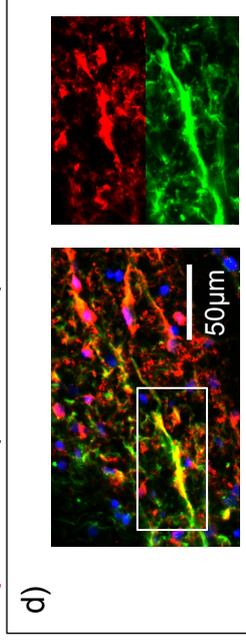
Epo/Nestin (neuronale Stamm- & Progenitorzellen)



Epo/BLBP (radiale Glia)



Epo/vWF (Endothel)



Antikörper

■ Epo

■ Zellmarker

■ DAPI
(Zellkernfärbung)

Abbildung 11

Epo/GFAP (Tag 42, 200kdyn, Th5)

a) Hinterstränge, zentraler Anteil mit Astrogliose (oben 20x-Vergrößerung), einzelner Astrozyt vergrößert (unten, 60x-Vergrößerung) mit positiver Epo-IR

Epo/Nestin (Tag 42, 200kdyn, Th5)

b) Ausschnitt der Hinterstränge (40x-Vergrößerung), Zelle mit Kolorisation von Epo und Nestin (weißer Pfeil)

Epo/BLBP (Tag 42, 200kdyn, Th5)

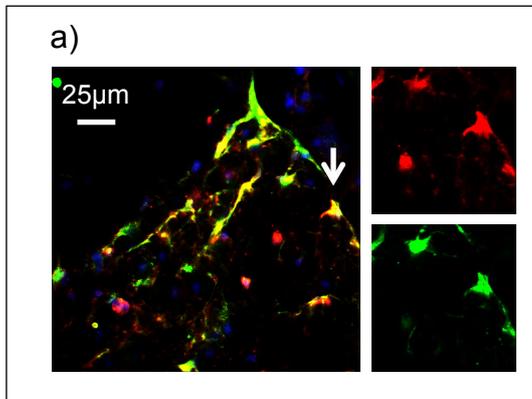
c) Ausschnitt der Hinterstränge bei 40x-Vergrößerung, weißer Pfeil: radiale Gliazelle mit Epo-IR

Epo/vWF (Tag 42, 200kdyn, Th5)

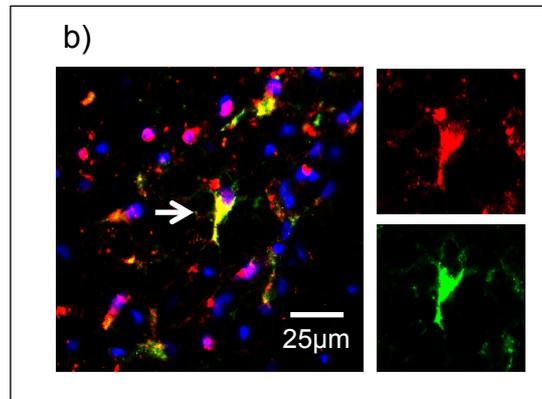
d) Ausschnitt der Hinterstränge bei 20x-Vergrößerung, weißer Kasten: Endothelzelle mit Epo-IR

Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Chemokine) Hinterstränge, Epo und EpoR

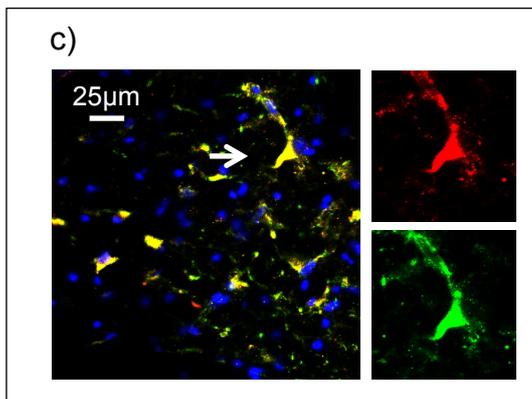
Epo/CCL3



Epo/CCR1



EpoR/CCL3



EpoR/CCR1

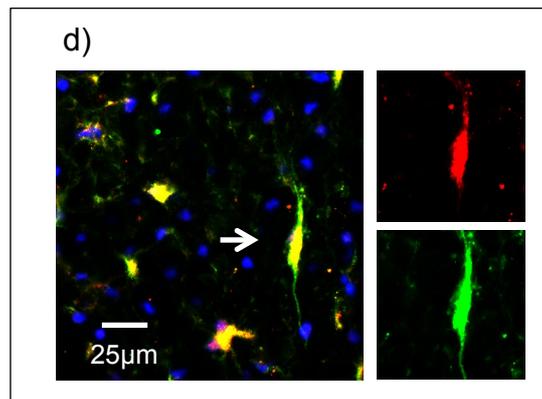


Abbildung 12

Antikörper ■ Epo/-R ■ Chemokine ■ DAPI

- Epo/CCL3** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
a) Hinterstränge, weißer Pfeil: Zelle mit korrespondierender Epo- und CCL3-IR (40x-Vergrößerung)
- Epo/CCR1** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
b) Ausschnitt der Hinterstränge (40x-Vergrößerung), zentral Zelle mit Kolokalisation von Epo und CCR1 (weißer Pfeil)
- EpoR/CCL3** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
c) Hinterstränge, weißer Pfeil: Zelle mit positiver CCL3- und Epo-IR (40x-Vergrößerung)
- Epo/CCR1** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
d) Ausschnitt der Hinterstränge (40x-Vergrößerung), subpiale Zellen mit Kolokalisation von EpoR und BLBP (weißer Pfeil)

Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Hinterstränge, Th5)

Untersuchungszeitpunkt: Tag 42, Läsionsstärke: 200 kdyn

Zelltyp	Doppelfärbung	Epo	EpoR
Astrozyt	GFAP	+	+
radiale Glia	BLBP	+	+
NSPC*	Nestin	+	+
Endothel	von-Willebrandt-Faktor	+	+
Oligodendrozyten	CNPase	-	-
Makrophagen	ED1	-	-
Mikroglia	CD11	-	-
Neuron (Axon)	Nf-200	-	-
Chemokin	CCL3	+	+
Chemokinrezeptor	CCR1	+	+

Tabelle 3 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Epo)

„+“= Kolokalisation beider Antigene

„-“= keine korrespondierende Immunreaktivität

*= Neural Stem Progenitor Cell (Neuronale Stamm- und Progenitorzellen)

Hinterstränge: Ebene Th 5, Überlebenszeitpunkt Tag 42, Läsion 200 kdyn

4.1.3 Immunfluoreszenz Doppelfärbungen (Erythropoietin-Rezeptor)

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen vertieften in der vorgelegten Arbeit die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen in den Hintersträngen bezüglich des Rezeptors für Erythropoietin. Für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurden geeignete Rückenmarksstränge ausgesucht (Tag 42, Läsionsstärke 200 kdyn).

Eine positive Immunreaktivität zeigte sich für den Rezeptor (EpoR) konkordant zu dem Zytokin Epo in Astrozyten (GFAP), radialer Glia (BLBP), NSPCs (Nestin) und Endothelzellen (vWF). In Axonen (Nf-200), Oligodendrozyten (CNPase), Mikroglia (CD11) und Makrophagen (ED1) war keine Kolokalisation festzustellen. Immunreaktivitäten für das Chemokin CCL3 und den Rezeptor (CCR1) überdeckten sich in einigen Zellen mit der Immunreaktivität für den EpoR (siehe Abbildung 13 und Tabelle 3).

In der Färbung EpoR/GFAP zeigte sich in den Hintersträngen eine starke IR für das GFAP in Form vieler Zellen und einer dichten Extrazellulärmatrix an GFAP-positiven Fasern. In den Astrozyten korrespondierte die IR für GFAP und EpoR in den Hintersträngen (Tag 42, 200 kdyn, Th5, vergleiche Abbildung 12). Die Färbung EpoR/BLBP identifizierte mit Hilfe der Immunspezifität des BLBP die radialen Gliazellen der Hinterstränge. In diesen ließ sich eine korrespondierende IR für EpoR nachweisen (Tag 42, 200 kdyn, Th5, vergleiche Abbildung 12). In einigen neuronalen Stamm- und Progenitorzellen der Hinterstränge zeigte sich eine entsprechende IR für EpoR (Tag 42, 200 kdyn, Th5; vergleiche Abbildung 12). In den Endothelzellen der Hinterstrang-Gefäße zeigte sich EpoR lokalisiert (Tag 42, 200 kdyn, Th5, siehe Abbildung 12).

Die Doppelfärbungen mit dem Chemokin CCL3 und dem Rezeptor CCR1 ergaben in den Hintersträngen eine deutliche korrespondierende Immunreaktivität mit EpoR in Zellen der Größe $20\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ mit einer länglichen Form (Tag 42, 200 kdyn, Th5, vergleiche Abbildung 12).

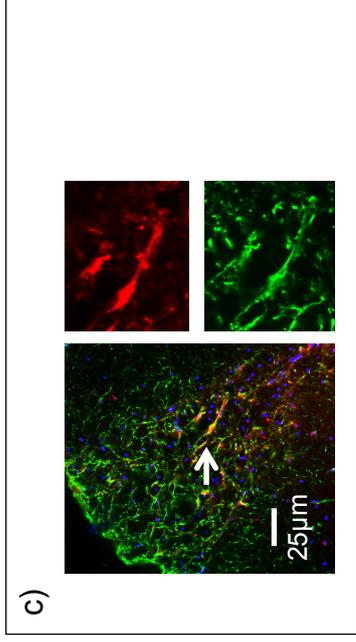
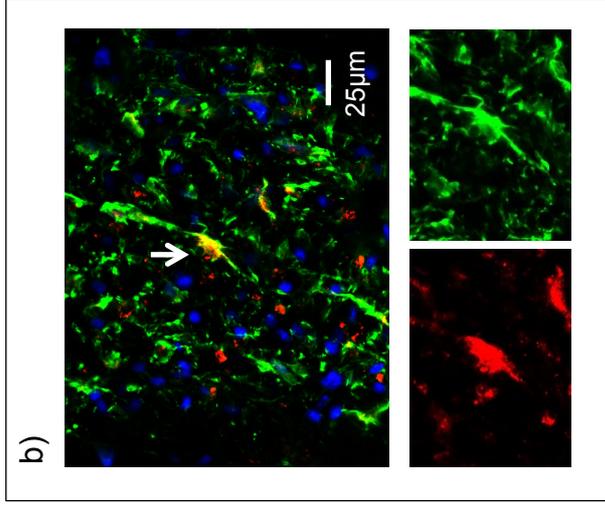
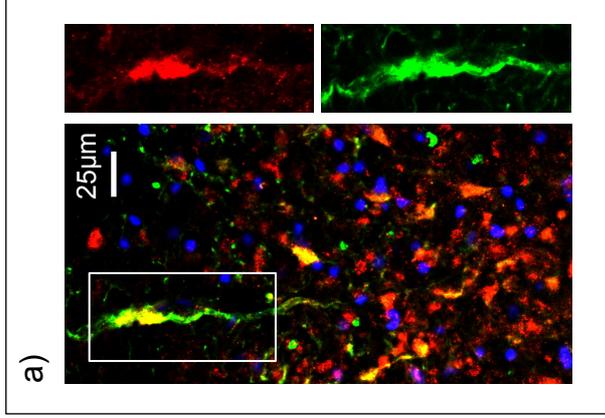
Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Zellmarker)

Hinterstränge, Erythropoietin-Rezeptor

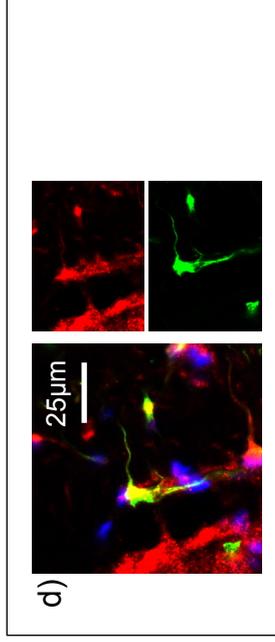
EpoR/vWF (Endothel)

EpoR/BLBP (neuronale Stamm- & Progenitorzellen)

EpoR/GFAP (Astrozyt)



EpoR/Nestin (NSPCs)



Antikörper

■ EpoR

■ Zellmarker

■ DAPI

(Zellkernfärbung)

EpoR/vWF (Tag 42, 200kdyn, Th5)

a) Hinterstränge, zentraler Anteil, weißer Kasten: Endothel mit positiver EpoR-IR (40x-Vergrößerung)

EpoR/BLBP (Tag 42, 200kdyn, Th5)

b) Ausschnitt der Hinterstränge (40x-Vergrößerung), Zelle mit Kolorisation von EpoR und BLBP (weißer Pfeil)

EpoR/GFAP (Tag 42, 200kdyn, Th5)

c) Ausschnitt der Hinterstränge bei 20x-Vergrößerung, weißer Pfeil: Astrozyt mit EpoR-IR

EpoR/Nestin (Tag 42, 200kdyn, Th5)

d) Ausschnitt der Hinterstränge bei 40x-Vergrößerung, neuronale Stamm- und Progenitor-Zelle mit EpoR-IR

4.2 Ventrolaterale weiße Substanz

4.2.1 Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin)

Epo-Immunreaktivitätsdichtemessungen in Kontrolltieren versus Läsionsgruppe (Densitometrie)

Densitometrisch war auf der gesamten spinalen Achse (Zervikal, Th5, Lumbal) im gesamten zeitlichen Verlauf (Tag 7, - 15, - 42) für die Läsionsstärken (100- und 200 kdyn) die Epo-Immunreaktivität im Vergleich zu der gemessenen Immunreaktivität in den Kontrolltieren signifikant erhöht (100-/200 kdyn versus Kontrolle $p \leq 0,05$; siehe Abbildung 14). Bei einer Läsionsstärke von 150 kdyn zeigte sich nur auf der Ebene Th5 eine durchgängig signifikant erhöhte IR für Epo (150 kdyn versus Kontrolle $p \leq 0,01$).

Am Tag 7 war die densitometrisch gemessene Dichte thorakal (Th5) um das 1,5-fache erhöht (100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,001$). Auf Ebene Th5 zeigte sich für diesen Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen leichter und schwerer Läsion (Tag 7, Th5 100- versus 200 kdyn $p \leq 0,05$).

Am Tag 15 war die Immunreaktivität für alle Segmente (Zervikal, Th5, Lumbal) und jede Läsionsstärke (100-, 150-, 200 kdyn) in der ventrolateralen weißen Substanz signifikant in Bezug zur Kontrollgruppe erhöht (Tag 15; 100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,05$). Ein Vergleich der Ergebnisse der Gruppen leichte- bzw. schwere Läsion im zeitlichen Verlauf von Tag 7 zu Tag 15 ergab keine signifikanten Abweichungen (100/200 kdyn Tag 7 versus Tag 15, $p \geq 0,05$). Ein Vergleich der densitometrischen Ergebnisse am Tag 15 zwischen leichter (100 kdyn) und schwerer Läsion (200 kdyn) zeigte signifikante Unterschiede in den zervikalen Segmenten (Tag 7; 100- versus 200 kdyn, $p \leq 0,01$).

Am Tag 42 wick die Epo-IR auf der gesamten spinalen Achse in der ventrolateralen weißen Substanz für alle Läsionsgruppen signifikant um das circa Doppelte von den Kontrolltieren ab (100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,001$).

Zervikal war der Anstieg von Tag 15 zu Tag 42 für die Tiere mit leichter und schwerer Läsion signifikant (100-/200 kdyn Tag 15 versus Tag 42, $p \leq 0,01$). Signifikante Unterschiede zwischen den Läsionsgruppen (100-, 150-, 200 kdyn) am Tag 42 waren nicht nachweisbar (100- versus 150-, 100- versus 200-, 150- versus 200 kdyn, $p \geq 0,05$).

Morphologie der Epo-Immunreaktivitäten

In der ventrolateralen weißen Substanz der Kontrolltiere befanden sich einzelne Zellen mit einer Immunreaktivität für das Zytokin Epo, die morphologisch am ehesten glialen Zellen zuzuordnen sind.

In den Läsionstieren waren auf allen untersuchten Ebenen ähnliche Zellen mit Epo-Immunreaktivität vor allem subpial lokalisiert. Von diesen Zellen gingen Zellfortsätze ab, die in die ventrolaterale Substanz einstrahlten (Vergleiche Abbildung 15).

Densitometrie und Varianzanalyse der zeit- und läsionsabhängigen Epo-Immunreaktivität der ventrolateralen weißen Substanz auf der spinalen Achse

A Densitometrie

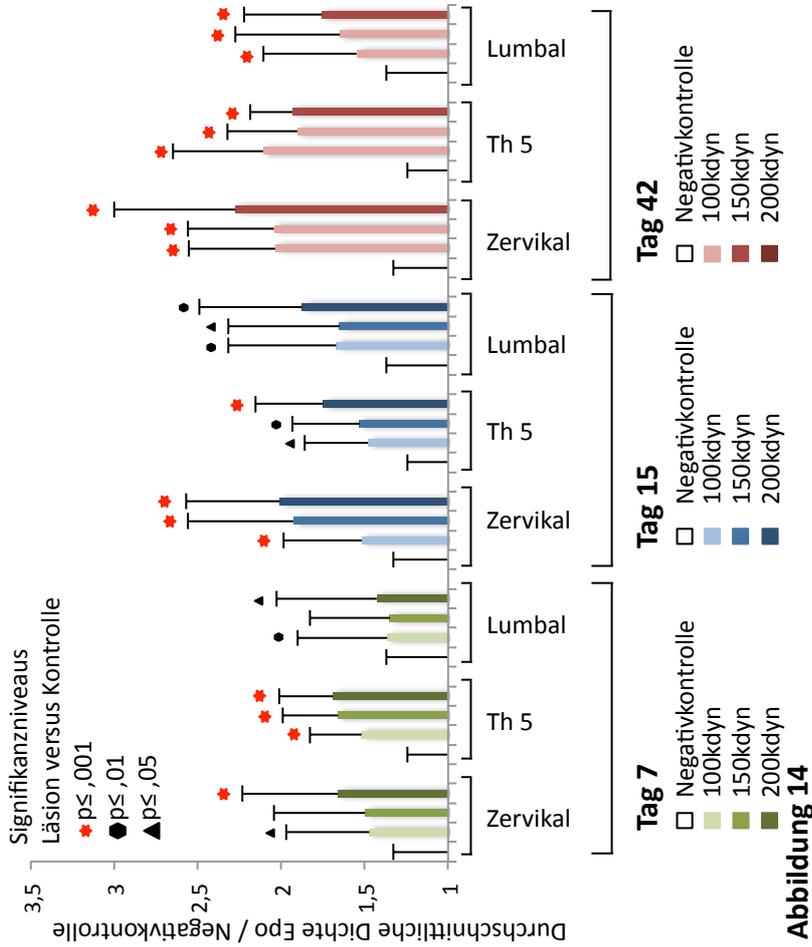
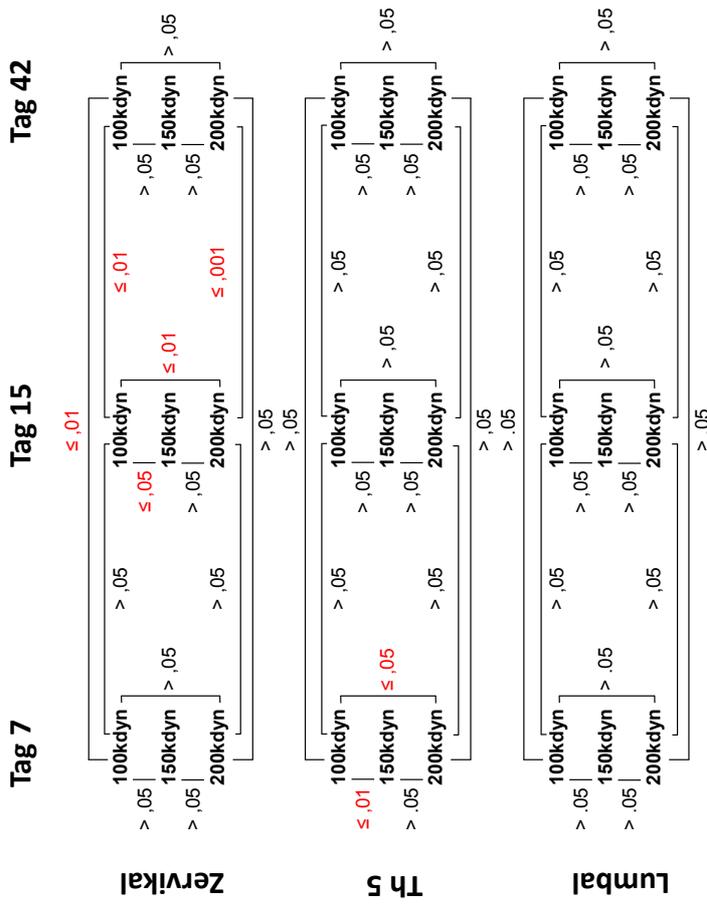


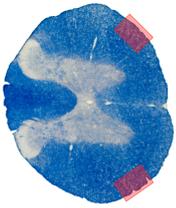
Abbildung 14

A Densitometrie: Zeit- und Läsions-abhängige Epo-Immunreaktivität (IR) der ventrolateralen weißen Substanz (VLWS) der spinalen Achse (Zervikal, Th 5, Lumbal). Untersuchungszeitpunkte: Tag 7, Tag 15 und Tag 42. Die Intensität der Läsion lag bei 100-, 150- oder 200kdyn. Die densitometrischen Ergebnisse der lädierten Tiere sind relativ zu der IR-Dichte der Tiere der Negativkontrolle dargestellt; Negativkontrolle=1. Signifikanzniveaus der einzelnen Kohorten zur jeweiligen Kontrollgruppe sind mit $p \leq ,001$ (*), $p \leq ,01$ (●) und $p \leq ,05$ (▲) markiert.

B Multiple Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA)



B Mit Hilfe der Multiplen Varianzanalyse werden für die unabhängigen Variablen des Traumamodells (Läsionsstärke und Überlebenszeitpunkt nach Läsion) Veränderungen der IR für Epo auf Signifikanz überprüft: $p \geq ,05$ = nicht signifikant; Signifikanzniveaus: $p \leq ,05$; $p \leq ,01$; $p \leq ,001$. Auf jeder untersuchten Rückenmarksebene (Zervikal, Th5, Lumbal) wurde für die Überlebenszeitpunkte nach Läsion (Tag 7, Tag 15, Tag 42) die Varianz der Läsionsstärken zueinander auf Signifikanz überprüft (100- zu 150-; 100- zu 200-, 150- zu 200kdyn). Für die leichte (100kdyn) und starke (200kdyn) Läsion wurde jeweils die Varianz zeitabhängig auf Signifikanz untersucht (Tag 7 zu Tag 15; Tag 7 zu Tag 42; Tag 15 zu Tag 42).



Läsionsabhängige Epo-Immunreaktivität der ventrolateralen weißen Substanz im zeitlichen Verlauf (Th5)

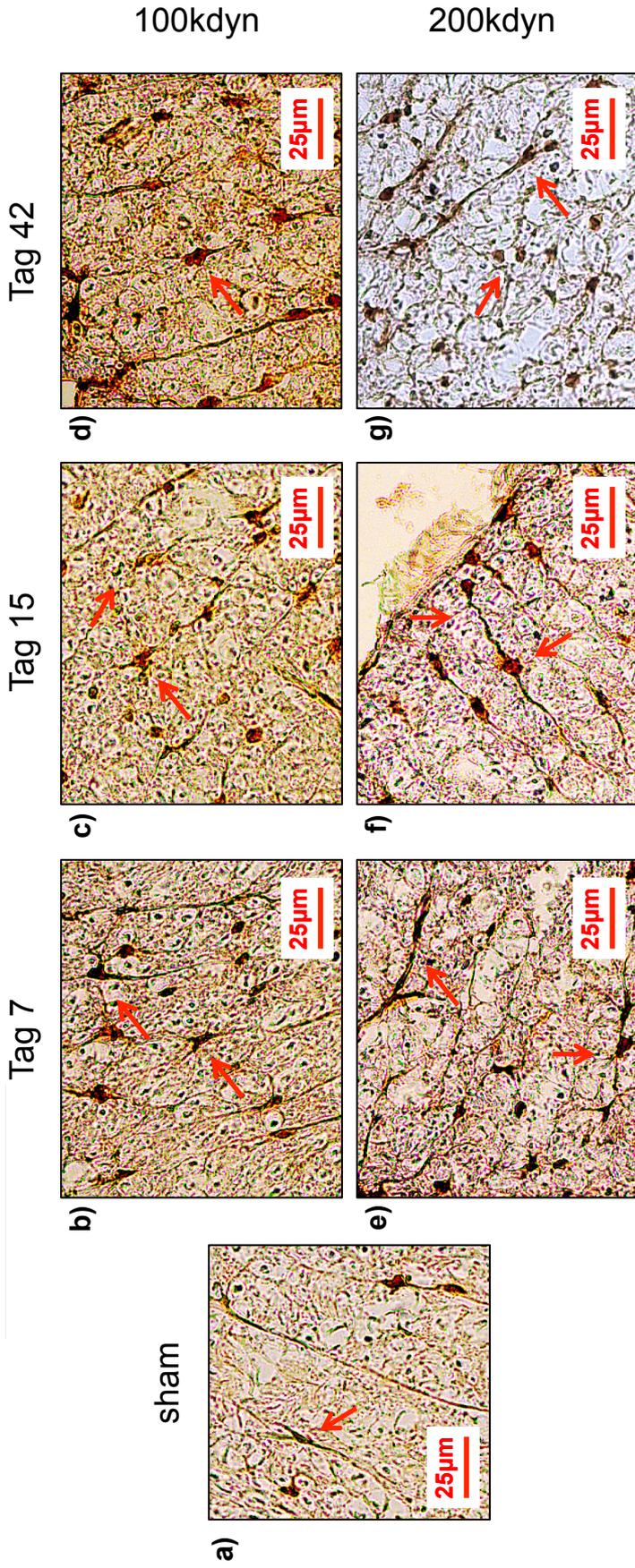


Abbildung 15 Läsionsabhängige Epo-IR der ventrolateralen weißen Substanz (VLWS) im zeitlichen Verlauf (Th5)

- a) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: Laminektomie, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; Zelle mit schlankem Zellkörper, zarten Zytoplasmafortsätzen (Markierung)
- b) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 7; Pfeile: zahlreiche spindelförmige Epo-positive Zellen (15µm)
- c) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; Pfeile: 20µm große Zellkörper
- d) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 42; Pfeile: 25µm große Zellen mit deutlicher Immunreaktivität für Epo
- e) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 7; Pfeile: Epo-positive Zellen (10µm), Zellen in perischnurartigen Verbänden angeordnet
- f) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; Pfeile: perischnurartige Zellverbände mit Zellfortsätzen,
- g) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 42; Zellgruppen sind durch dichte Fibrillen verbunden, runde Zellkörper mit Epo-IR (10µm)

Abbildung links der Überschrift zur Veranschaulichung der betrachteten Lokalisation: EC-Färbung des Rückenmarks, 5x-Vergrößerung; roter Kasten markiert die ausgewertete Region

4.2.2 Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin-Rezeptor)

EpoR-Immunreaktivitätsdichtemessungen in Kontrolltieren versus Läsionsgruppe (Densitometrie)

Densitometrisch war die Immunreaktivität für den Epo-Rezeptor in der ventrolateralen weißen Substanz im gesamten zeitlichen Verlauf für alle Läsionsstärken (100-, 150-, 200 kdyn) thorakal (Th5) signifikant erhöht (100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,05$). In den zervikalen und lumbalen Segmenten zeigten sich ähnliche Ergebnisse mit einigen wenigen Ausnahmen, in denen sich keine signifikanten Abweichungen zur Kontrollgruppe zeigten (siehe Abbildung 16).

Am Tag 7 war die EpoR-IR für alle Läsionsstärken signifikant thorakal (Th5) und lumbal in Bezug zur Kontrollgruppe erhöht (Tag 7; 100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,05$). Zervikal galt dies lediglich für Tiere, deren Rückenmarksstränge mit leichter Kraft lädiert wurden (Tag 7; 100 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,05$). Zwischen leichter-, mittlerer- und schwerer Läsion ergaben sich am Tag 7 auf der gesamten spinalen Achse keine signifikanten Unterschiede (Tag 7; 100- versus 150-, 100- versus 200-, 150- versus 200 kdyn $p \geq 0,05$).

Eine Woche später am Tag 15 waren thorakal (Th5) für alle Läsionsstärken signifikant erhöhte Dichten des EpoR im Bezug auf die Kontrolltiere zu dokumentieren (Tag 15; 100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,001$). In den zervikalen Segmenten waren die Veränderungen signifikant für schwere Läsionen (Tag 15; 150- und 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,01$), in den lumbalen Segmenten für leichte und schwere Läsionen (Tag 15; 100- und 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,05$).

Zwischen Tag 7 und Tag 15 zeigten sich keine signifikanten Abweichungen für leichte und schwere Läsionen (mit der Ausnahme zervikal, 200 kdyn Tag 7 versus zervikal, 200 kdyn Tag 15, $p \leq 0,05$). Der Vergleich der Läsionsstärken untereinander ergab am Tag 15 zervikal einen signifikanten Unterschied (100- versus 200 kdyn, $p \leq 0,05$).

Am Tag 42 war die EpoR-IR in der ventrolateralen weißen Substanz signifikant auf allen Segmenten (Zervikal, Th5, Lumbal) für alle Läsionsstärken auf ungefähr das Doppelte der Kontrollgruppe erhöht (Tag 42; 100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \leq 0,01$). Es fanden sich zwischen den unterschiedlichen Läsionsstärken zu diesem Untersuchungszeitpunkt keine signifikanten Unterschiede (Tag 42; 100- versus 150-,

100- versus 200-, 150- versus 200 kdyn, $p \geq 0,05$). Auch der Vergleich zwischen Tag 15 und Tag 42 lieferte für 100- und 200 kdyn keine signifikanten Abweichungen (jeweils 100-/200 kdyn Tag 15 versus Tag 42, $p \geq 0,05$).

Morphologie der EpoR-Immunreaktivitäten

In der ventrolateralen weißen Substanz der Kontrolltiere ließ sich in einzelnen Zellen immunhistochemisch der Rezeptor des Erythropoietins anfärben. Hierbei handelte es sich morphologisch am wahrscheinlichsten um gliale Zellen.

Von zervikal bis lumbal befanden sich ähnliche Zellen mit EpoR-Immunreaktivität in der ventrolateralen weißen Substanz von Tieren mit lädiertem Rückenmark. Von diesen Zellen gehen Zellfortsätze ab, die in die ventrolaterale Substanz einstrahlen (siehe Abbildung 17).

Densitometrie und Varianzanalyse der zeit- und läsionsabhängigen EpoR-Immunreaktivität der ventrolateralen weißen Substanz auf der spinalen Achse

A Densitometrie

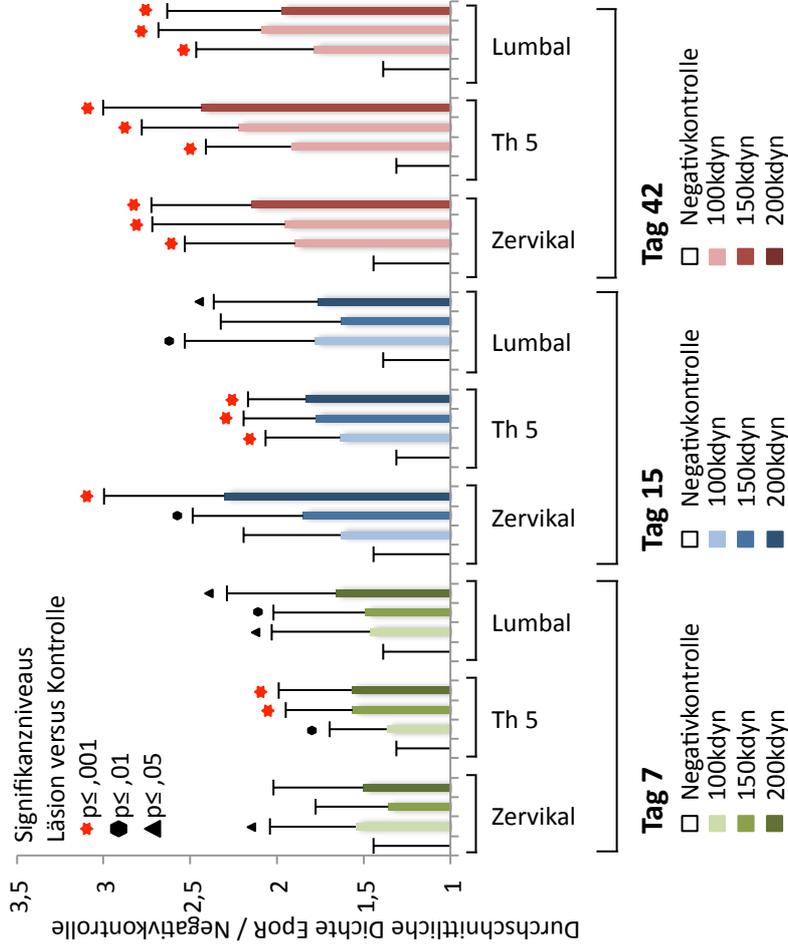
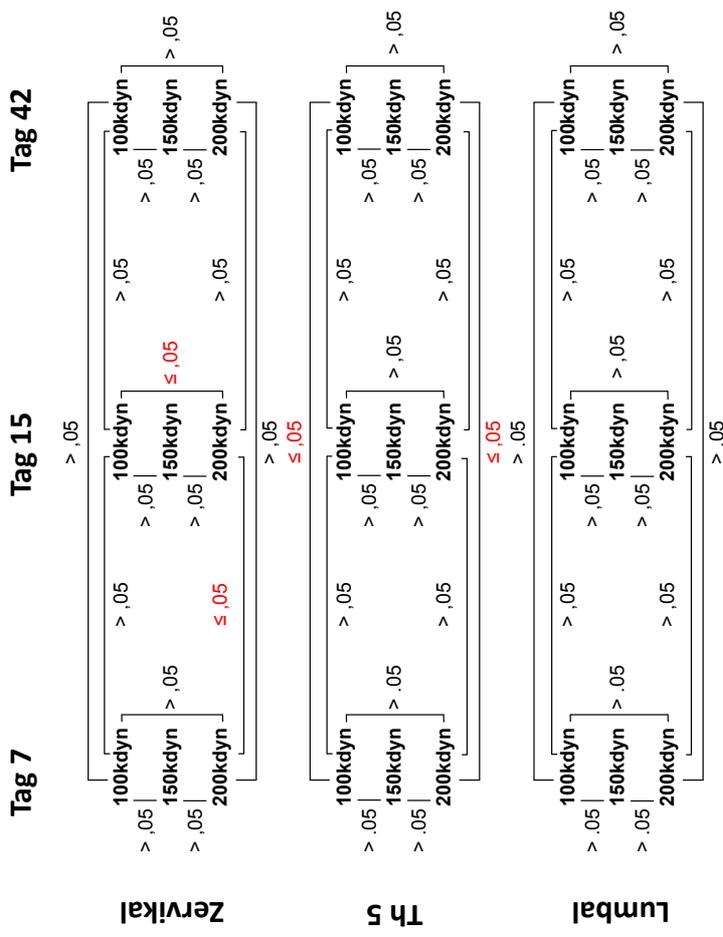


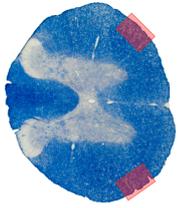
Abbildung 16

A Densitometrie: Zeit- und Läsions-abhängige EpoR-Immunreaktivität (IR) der ventrolateralen weißen Substanz der spinalen Achse (Zervikal, Th 5, Lumbal). Untersuchungszeitpunkte: Tag 7; Tag 15 und Tag 42. Die Intensität der Läsion lag bei 100-, 150- oder 200kdyn. Die densitometrischen Ergebnisse der lädierten Tiere sind relativ zu der IR-Dichte der Tiere der Negativkontrolle („sham“) dargestellt; sham=1. Signifikanzniveaus der einzelnen Kohorten zur jeweiligen Kontrollgruppe sind mit $p \leq ,001$ (★), $p \leq ,01$ (●) und $p \leq ,05$ (▲) markiert.

B Multiple Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA)



B Mit Hilfe der Multiplen Varianzanalyse werden für die unabhängigen Variablen des Traumamodells (Läsionsstärke und Überlebenszeitpunkt nach Läsion) Veränderungen der IR für EpoR auf Signifikanz überprüft: $p \geq ,05$ = nicht signifikant; Signifikanzniveaus: $p \leq ,05$; $p \leq ,01$; $p \leq ,001$. Auf jeder untersuchten Rückenmarksebene (Zervikal, Th5, Lumbal) wurde für die Überlebenszeitpunkte nach Läsion (Tag 7, Tag 15, Tag 42) die Varianz der Läsionsstärken zueinander auf Signifikanz überprüft (100- zu 150-; 100- zu 200-, 150- zu 200kdyn). Für die leichte (100kdyn) und starke (200kdyn) Läsion wurde jeweils die Varianz zeitabhängig auf Signifikanz untersucht (Tag 7 zu Tag 15; Tag 7 zu Tag 42; Tag 15 zu Tag 42).



Läsionsabhängige EpoR-Immunreaktivität der ventrolateralen weißen Substanz im zeitlichen Verlauf (Th5)

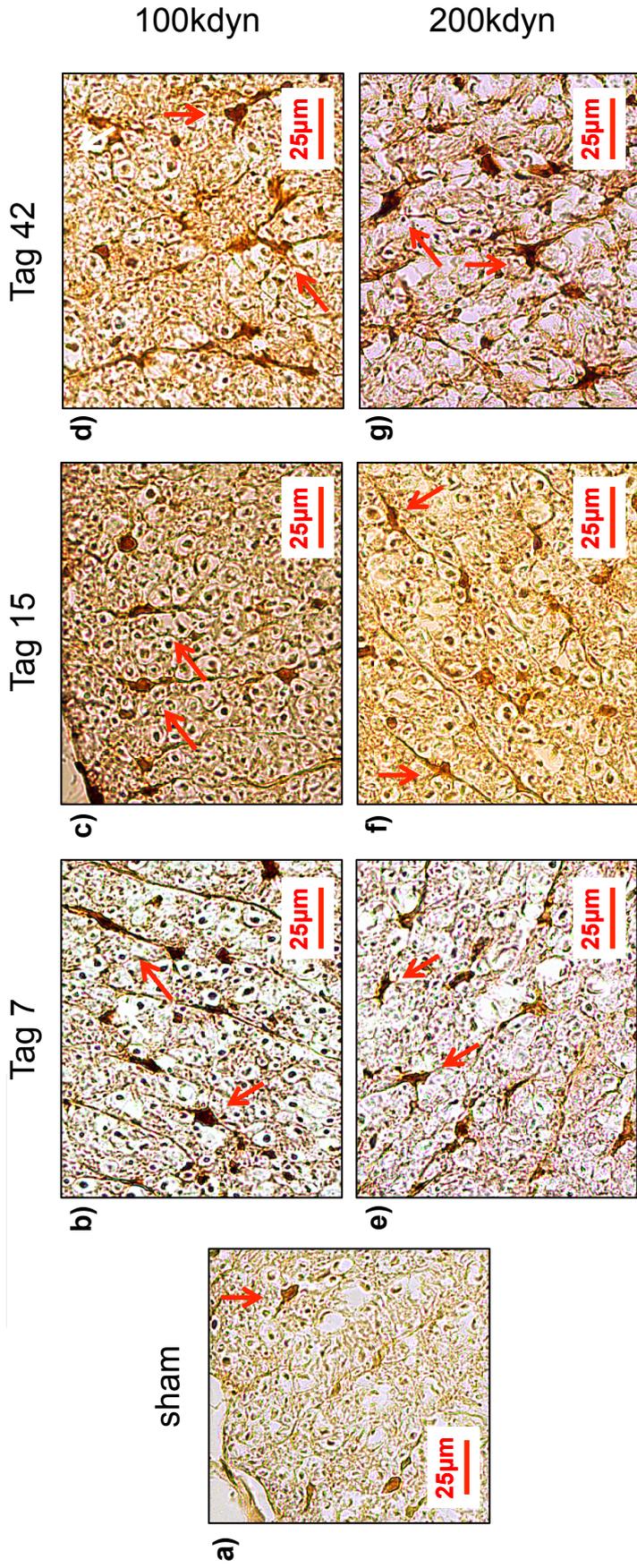


Abbildung 17 Läsionsabhängige EpoR-IR der ventrolateralen weißen Substanz (VLWS) im zeitlichen Verlauf (Th5)

- a) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: Laminektomie, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; circa 10µm großer Zellkörper mit unipolarem Zellfortsatz (roter Pfeil)
 - b) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 7; Pfeile: zahlreiche spindelförmige Epo-positive Zellen (15µm); schlanke Zellfortsätze
 - c) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; Pfeile: 10µm große, Zellkörper mit positiver EpoR-IR mit Zellfortsätzen
 - d) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 100kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 42; Pfeile: 15µm große Zellen, deren Morphologie glialen Zellen entspricht
 - e) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 7; Pfeile: 15µm große Zellen, deren Morphologie glialen Zellen entspricht
 - f) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 15; Pfeile: EpoR-IR positive Zellen (20µm), kaliberstarke, bipolare Zellfortsätze
 - g) VLWS, Th5, 20fach, Läsion: 200kdyn, Überlebenszeitpunkt: Tag 42; rote Pfeile: morphologisch gliale Zellen mit verwachsenen Zellgrenzen
- Abbildung links der Überschrift zur Veranschaulichung der betrachteten Lokalisation: EC-Färbung des Rückenmarks, 5x; roter Kasten markiert die ausgewertete Region

4.2.3 Immunfluoreszenz Doppelfärbungen (Erythropoietin)

Die Methode der Immunfluoreszenz-Mehrfachmarkierung vertiefte in der vorgelegten Arbeit die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen in der ventrolateralen weißen Substanz bezüglich des Zytokins Epo. Für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurden geeignete Rückenmarksstränge ausgesucht (Tag 42, Läsionsstärke 200 kdyn).

In den ausgewerteten Schnitten zeigte sich Epo mit verschiedenen Zellmarkern kolokalisiert: In Astrozyten (GFAP), radialen Gliazellen (BLBP), neuronalen Stamm- und Progenitorzellen (Nestin) und Endothelzellen (vWF) war eine Immunreaktivität für Epo nachweisbar (Tag 42, 200 kdyn, Th5; siehe Tabelle 4). In der ventrolateralen weißen Substanz war keine konkordante Immunreaktivität der Zellmarker für Axone (Nf-200) Oligodendrozyten (CNPase), Makrophagen (ED 1) und Mikroglia (CD 11) mit Erythropoietin nachweisbar. Bei der Untersuchung der Zytokine (CCL3, CCR1) korrespondierte die Immunreaktivität in einigen Zellen mit Erythropoietin (siehe Tabelle 4).

Bei der Färbung Epo/GFAP zeigte sich in der ventrolateralen weißen Substanz vor allem in den äußeren Abschnitten eine dichte Extrazellulärmatrix an GFAP-positiven Fasern, in welchen sich Epo nicht anfärbte. In den Zellkörpern der Astrozyten ließ sich Epo jedoch nachweisen (Epo/GFAP Tag 42, 200 kdyn, Th5). Die Zellkörper waren länglich geformt (circa 20µm) mit einigen Zellfortsätzen.

In der ventrolateralen weißen Substanz (Epo/BLBP, Tag 42, 200 kdyn, Th5) befanden sich radiale Gliazellen, in deren Zellkörpern sich Erythropoietin nachweisen ließ (siehe Abbildung 18).

Mithilfe der Nestin-IR färbten sich die neuronalen Stamm- und Progenitorzellen in der ventrolateralen weißen Substanz an (Epo/Nestin, Tag 42, 200 kdyn, Th5). In einigen dieser Zellen gelang der Nachweis von Epo. Andere Zellen zeigten ausschließlich IR für Nestin.

In den Endothelzellen der Gefäße der ventrolateralen weißen Substanz korrespondierte die IR des von Willebrandt-Faktor mit Epo (Epo/vWF, Tag 42, 200 kdyn, Th5).

Die Doppelfärbungen mit ausgewählten Chemokinen (CCL3, CCR1) zeigten in der ventrolateralen weißen Substanz eine deutliche Kolokalisation in Zellen, deren Zellkörper (20µmx15µm) länglich geformt waren (Tag 42, 200 kdyn, Th5, siehe Abbildung 19).

Zelltyp	Doppelfärbung	Epo	EpoR
Astrozyt	GFAP	+	+
radiale Glia	BLBP	+	+
NSPC*	Nestin	+	+
Endothel	von-Willebrandt-Faktor	+	+
Oligodendrozyten	CNPase	-	-
Makrophagen	ED1	-	-
Mikroglia	CD11	-	-
Neuron (Axon)	Nf-200	-	-
Chemokin	CCL3	+	+
Chemokinrezeptor	CCR1	+	+

Tabelle 4 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen

„+“= Kolokalisation beider Antigene

„-“= keine korrespondierende Immunreaktivität

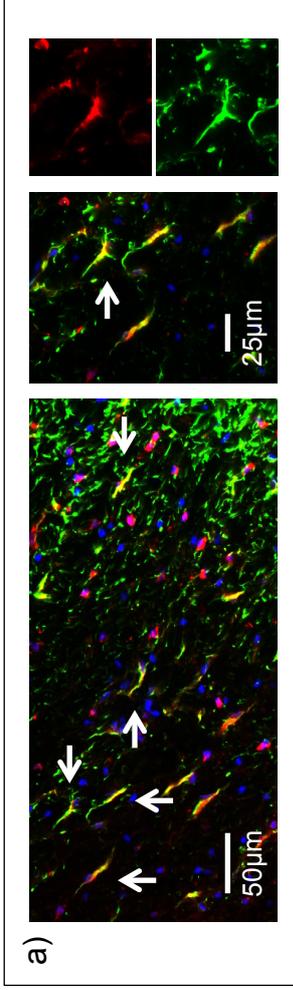
*= Neural Stem Progenitor Cell (Neuronale Stamm- und Progenitorzellen)

ventrolaterale weiße Substanz: Ebene Th 5, Überlebenszeitpunkt Tag 42, Läsion 200 kdyn

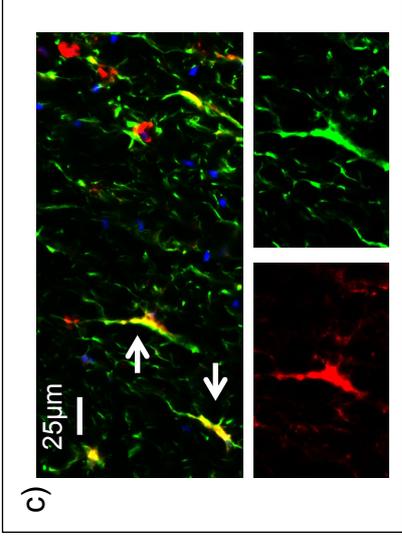
Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Zellmarker)

Ventrolaterale Weiße Substanz, Erythropoietin

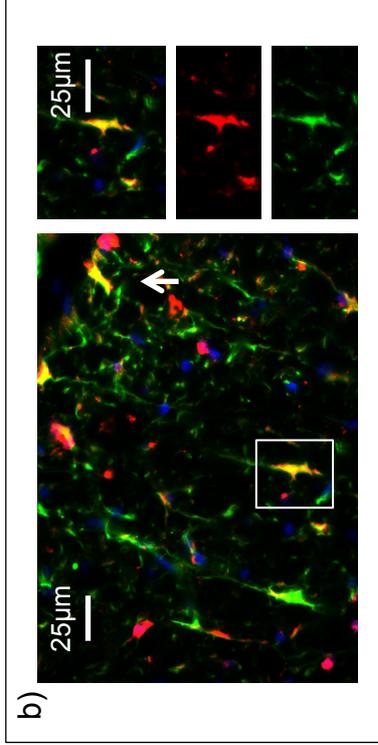
Epo/GFAP (Astrozyten)



Epo/BLBP (radiale Glia)



Epo/Nestin (neuronale Stamm- & Progenitorzellen)



Epo/vWF (Endothel)

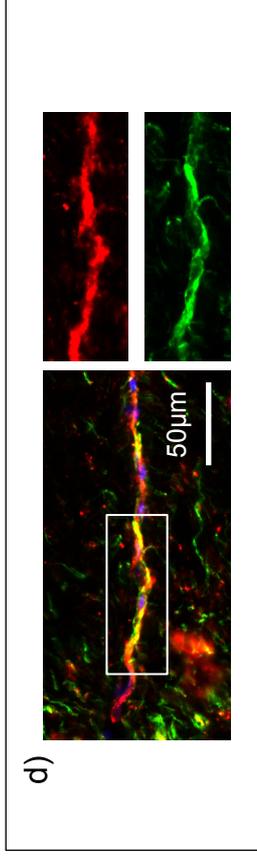
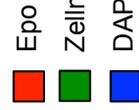


Abbildung 18

Antikörper



Epo/GFAP (Tag 42, 200kdyn, Th5)

a) Ausschnitt der ventrolateralen weißen Substanz, links 20x-Vergrößerung), rechts: Detailaufnahme Astrozyten mit Epo-IR

Epo/Nestin (Tag 42, 200kdyn, Th5)

b) Ausschnitt der ventrolateralen weißen Substanz (40x-Vergrößerung), Zelle mit Kolokalisation von Epo und Nestin (weißer Pfeil), rechts Detailaufnahme

Epo/BLBP (Tag 42, 200kdyn, Th5)

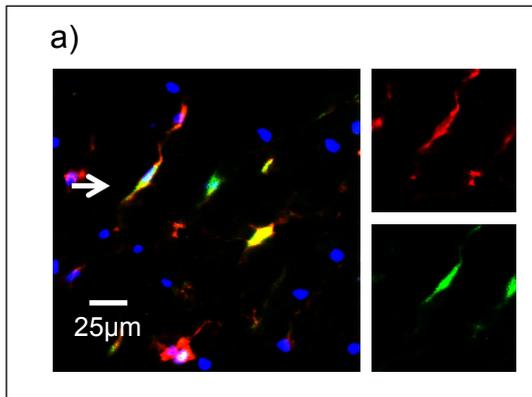
c) Ausschnitt der ventrolateralen weißen Substanz bei 40x-Vergrößerung, weißer Pfeil: radiale Gliazelle mit Epo-IR

Epo/vWF (Tag 42, 200kdyn, Th5)

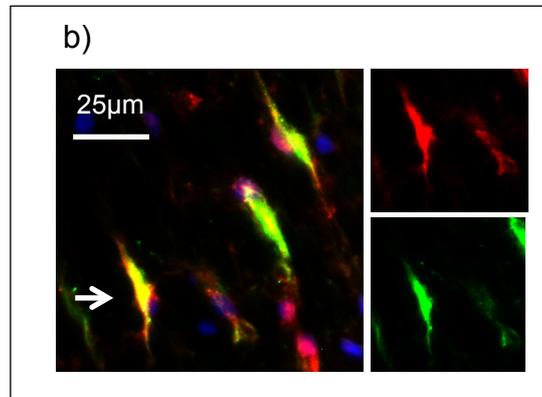
d) Ausschnitt der ventrolateralen weißen Substanz bei 20x Vergrößerung, weißer Kasten: Gefäß mit kolokalisierter vWF- und Epo-IR

Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Chemokine) ventrolaterale weiße Substanz, Epo und EpoR

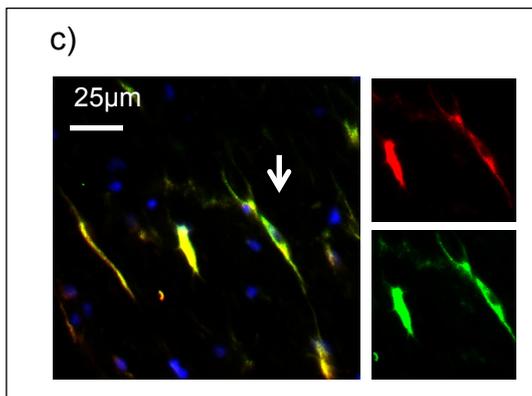
Epo/CCL3



Epo/CCR1



EpoR/CCL3



EpoR/CCR1

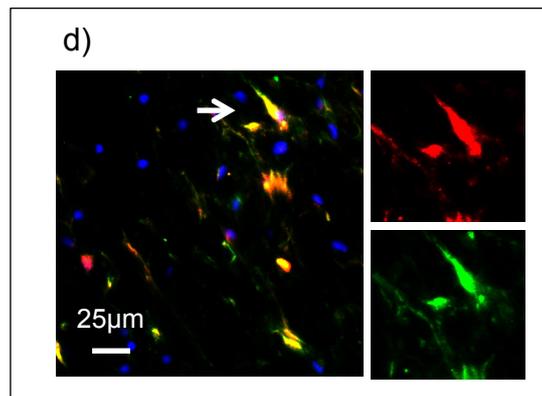


Abbildung 19

Antikörper ■ Epo/-R ■ Chemokine ■ DAPI

- Epo/CCL3** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
a) Ausschnitt derventrolateralen weißen Substanz, weißer Pfeil: Zelle mit korrespondierender Epo- und CCL3-IR (40x-Vergrößerung)
- Epo/CCR1** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
b) Ausschnitt der ventrolateralen weißen Substanz (40x-Vergrößerung), Zellen mit Kolokalisation von Epo und CCR1 (weißer Pfeil)
- EpoR/CCL3** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
c) Ventrolaterale weiße Substanz, weißer Pfeil: Zelle mit Kolokalisation von EpoR und CCL3EpoR (40x-Vergrößerung)
- EpoR/CCR1** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
d) Ausschnitt der ventrolateralen weißen Substanz (40x-Vergrößerung), Kolokalisation von EpoR und CCR1 (weißer Pfeil)

4.2.4 Immunfluoreszenz Doppelfärbungen (Erythropoietin-Rezeptor)

Die Immunfluoreszenz Doppelfärbungen des EpoR mit ausgewählten Zellmarkern und Chemokinen vertieften die Ergebnisse der Immunhistochemie und der Densitometrie für die ventrolaterale weiße Substanz. Für die durchgeführten Färbungen wurden geeignete Rückenmarksstränge ausgewählt (Tag 42, 200 kdyn, Th 5).

Die Auswertung der Doppelfärbungen von EpoR mit ausgewählten Zellmarkern zeigte, dass EpoR in Astrozyten (GFAP), radialer Glia (BLBP), neuronalen Stamm- und Progenitorzellen (Nestin) und Endothelzellen (vWF) der ventrolateralen weißen Substanz nachweisbar war. EpoR war in der ventrolateralen weißen Substanz nicht mit Zellmarkern für Axone (Nf-200), Oligodendrozyten (CNPase), Makrophagen (ED1), und Mikroglia (CD11) kolokalisiert. Bezüglich der Chemokine (CCL3, CCR1) zeigte sich eine korrespondierende IR für EpoR (siehe Tabelle 4).

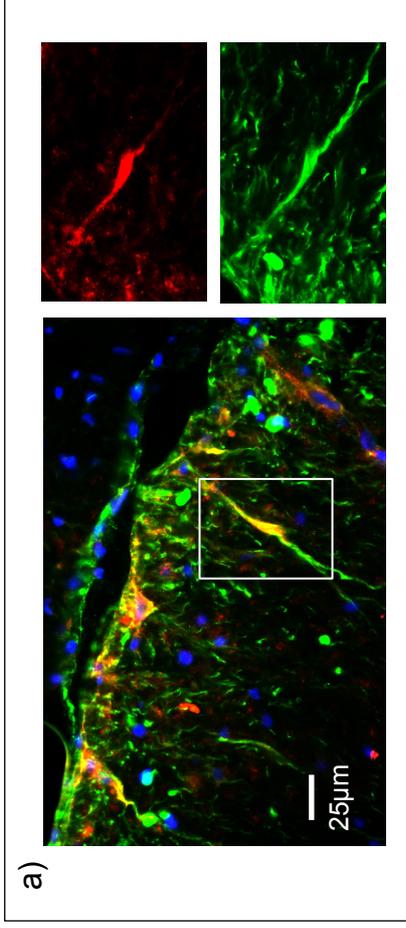
Durch die Immunreaktivität des GFAP stellten sich in der ventrolateralen weißen Substanz Astrozyten und ein dichtes Netz an Extrazellulärmatrix dar. In den Zellkörpern korrespondierte die IR für das GFAP mit EpoR (Tag 42, 200 kdyn, Th5; siehe Abbildung 20). In der Färbung EpoR/BLBP zeigte sich eine Kolokalisation des BLBP mit EpoR in radialen Gliazellen der ventrolateralen weißen Substanz (Tag 42, 200 kdyn, Th5; siehe Abbildung 20). Durch die Färbung Nestin/EpoR wurden die neuronalen Stamm- und Progenitorzellen der ventrolateralen weißen Substanz dargestellt. Die Nestin-IR korrespondierte mit EpoR in einigen Zellkörpern der Vorläuferzellen (Tag 42, 200 kdyn, Th5; siehe Abbildung 20). Durch die Doppelfärbung EpoR/vWF gelang der Nachweis des EpoR in Endothelzellen der Gefäße der ventrolateralen weißen Substanz (Tag 42, 200 kdyn, Th5, siehe Abbildung 20).

Die IR für das Chemokin CCL3 und den Rezeptor CCR1 ergab eine korrespondierende Färbung mit dem EpoR, in Zellen mit den Maßen 20µmx10µm (Tag 42, 200 kdyn, Th5; siehe Abbildung 19).

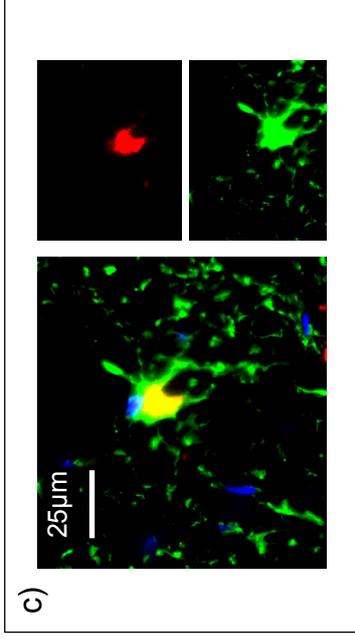
Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Zellmarker)

ventrolaterale weiße Substanz, Erythropoietin-Rezeptor

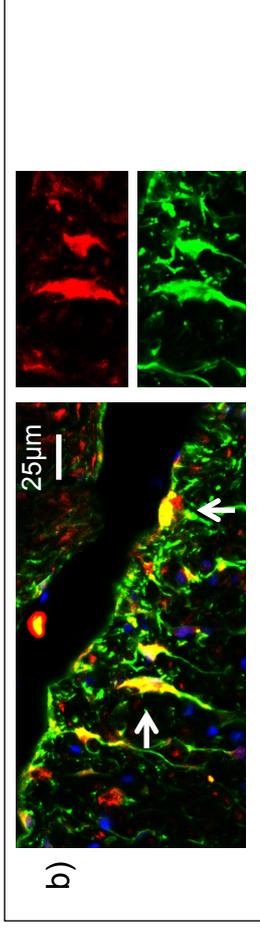
EpoR/vWF (Endothel)



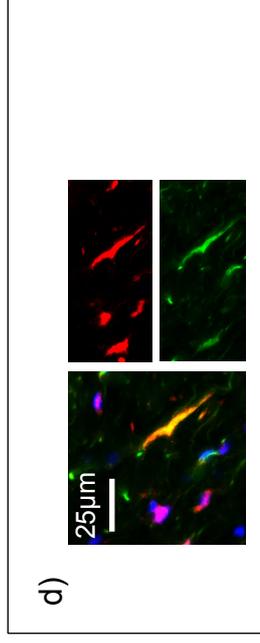
EpoR/GFAP (Astrozyt)



EpoR/BLBP (neuronale Stamm- & Progenitorzellen)



EpoR/Nestin (NSPCs)



- EpoR/vWF** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
a) ventrolaterale weiße Substanz, weißer Kasten: Endothel mit positiver EpoR-IR (40x-Vergrößerung)
- EpoR/BLBP** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
b) Ausschnitt der ventrolateralen weißen Substanz (40x-Vergrößerung), subpiale Zellen mit Lokalisation von EpoR und BLBP (weißer Pfeil)

- EpoR/GFAP** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
c) ventrolaterale weiße Substanz, Detailaufnahme Astrozyt mit EpoR-IR (60x-Vergrößerung)
- EpoR/Nestin** (Tag 42, 200kdyn, Th5)
d) Ausschnitt der ventrolateralen weißen Substanz bei 40x Vergrößerung, neuronale Stamm- und Progenitor-Zelle mit EpoR-IR

Antikörper
■ EpoR
■ Zellmarker
■ DAPI
(Zellkernfärbung)

4. Vorderhörner

In der histologischen Auswertung zeigte sich lediglich in den lumbalen Segmenten eine deutliche Immunreaktivität für Erythropoietin und den entsprechenden Rezeptor in den Vorderhörnern, insbesondere Lamina 8 und 9 (Watson et al., 2008).

4.3.1 Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin)

Epo-Immunreaktivitätsdichtemessungen in Kontrolltieren versus Läsionsgruppe (Densitometrie)

Lumbal war die Immunreaktivität für das Zytokin Epo im gesamten zeitlichen Verlauf leicht erhöht. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte sich nicht (100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \geq 0,05$).

Im zeitlichen Verlauf von Tag 7 bis hin zum Tag 15 und 42 war eine leichte Zunahme der Immunreaktivität zu beobachten. In der Varianzanalyse zeigte sich keine Signifikanz für diesen Anstieg (jeweils 100-/200 kdyn, Tag 7 versus Tag 15, Tag 7 versus Tag 42, Tag 15 versus Tag 42, $p \geq 0,05$).

An allen drei Untersuchungszeitpunkten (Tag 7, -15, -42) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Läsionsstärken nachweisbar (100- versus 150-, 100- versus 200-, 150- versus 200 kdyn, $p \geq 0,05$; vergleiche Abbildung 21).

Morphologie der Epo-Immunreaktivitäten

In den Laminae 8 und 9 der Vorderhörner zeigten sich bei den Kontrolltieren Zellen, deren Zellkörper circa 20-30 μ m im Durchmesser maßen. Angefärbt waren vor allem die Zellkörper unter Aussparung des Zellkerns. Morphologisch handelte es sich hierbei am ehesten um α -Motoneurone.

Die entsprechenden Zellen färbten sich auch in den Gewebeschnitten der kontusionierten Rückenmarksstränge an. Unterschiede in Häufigkeit oder Intensität der Färbung ließen sich im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht beobachten (vergleiche Abbildung 21).

4.3.2 Immunhistochemie und Densitometrie (Erythropoietin-Rezeptor)

EpoR-Immunreaktivitätsdichtemessungen in Kontrolltieren versus Läsionsgruppe (Densitometrie)

Über den gesamten zeitlichen Verlauf (Tag 7 bis Tag 42) zeigte sich in den lumbalen Vorderhörnern mit den Kontrolltieren vergleichend eine leicht erhöhte, aber nicht signifikante Immunreaktivität für den Erythropoietin-Rezeptor (100-, 150-, 200 kdyn versus Kontrolle, $p \geq 0,05$).

Im zeitlichen Verlauf (Tag 7, -15, -42) ließ sich keine deutliche Zu- oder Abnahme der EpoR-IR beobachten (jeweils 100-, 200 kdyn Tag 7 versus Tag 15, Tag 15 versus Tag 42, Tag 7 versus Tag 42, $p \geq 0,05$).

Auch ergaben unterschiedliche Läsionsstärken (100-, 150-, 200 kdyn) zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant abweichende EpoR-IR (100- versus 150-, 100- versus 200-, 150- versus 200 kdyn, $p \geq 0,05$; siehe Abbildung 21).

Morphologie der EpoR-Immunreaktivitäten

In den Laminae 8 und 9 der Vorderhörner zeigten sich bei den Kontrolltieren Zellen, deren Zellkörper circa 20-30 μ m im Durchmesser maßen. Der Zellkörper färbte sich homogen an. Morphologisch handelte es sich hierbei am ehesten um α -Motoneurone.

Die entsprechenden Zellen färbten sich auch in den Gewebeschnitten der kontusionierten Rückenmarksstränge an. Unterschiede in Häufigkeit oder Intensität der Färbung ließen sich im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht beobachten (vergleiche Abbildung 21).

Densitometrie der zeit- und läsionsabhängigen Epo/-R-Immunreaktivität der lumbalen Vorderhörner

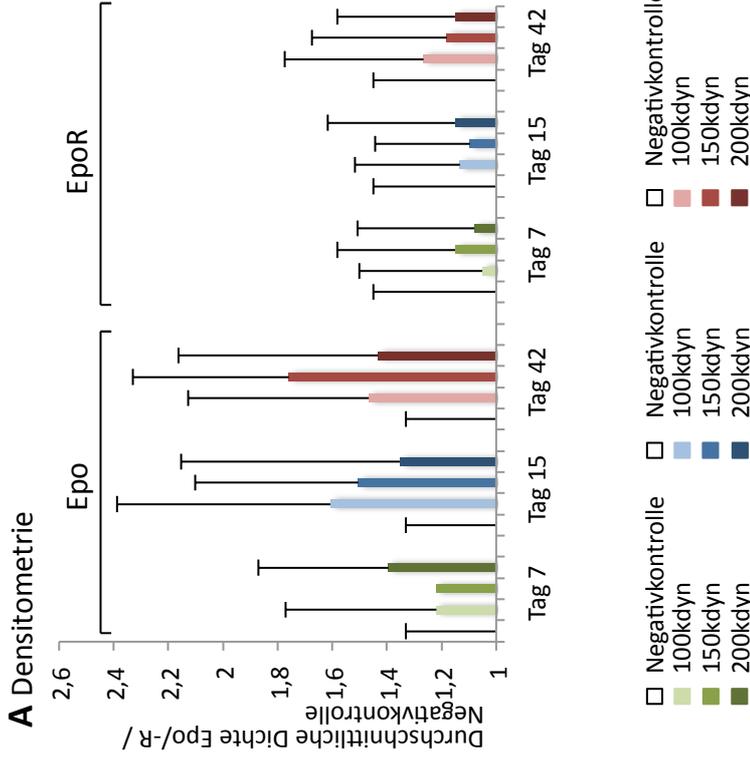
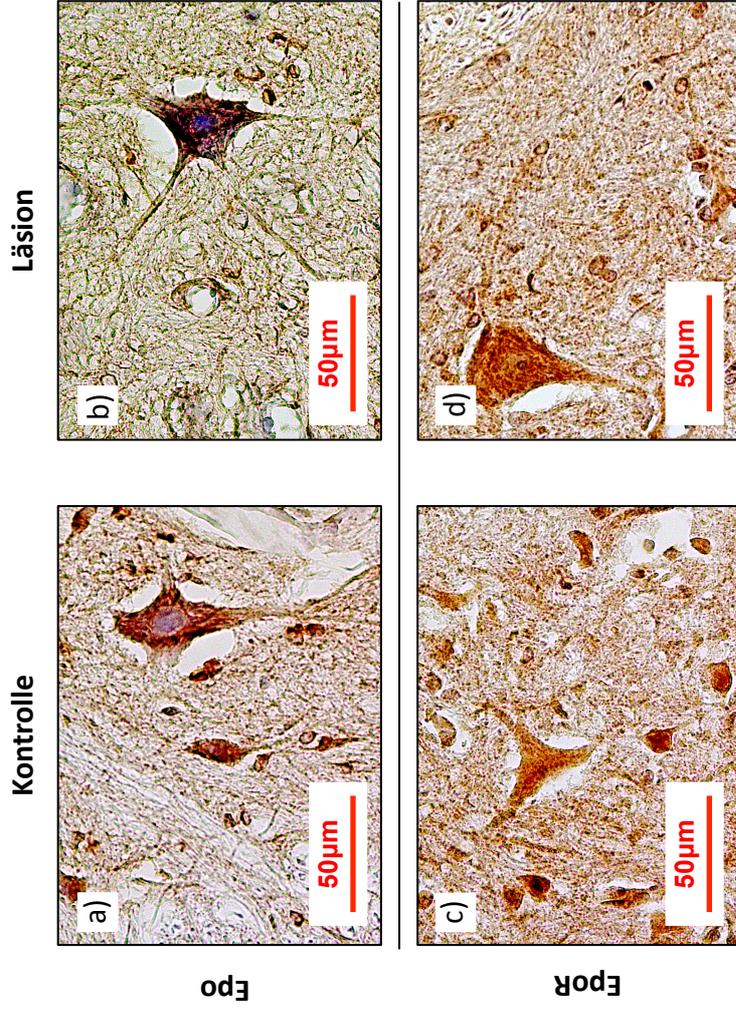


Abbildung 21

A Densitometrie: Zeit- und Läsions-abhängige Epo/-R Immunreaktivität (IR) der lumbalen Vorderhörner. Untersuchungszeitpunkte: Tag 7; Tag 15 und Tag 42. Die Intensität der Läsion lag bei 100-, 150- oder 200kdyn. Die densitometrischen Ergebnisse der lädierten Tiere sind relativ zu der IR-Dichte der Tiere der Negativkontrolle (=1) dargestellt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen lädierten Tieren und der Kontrollgruppe ($p > .05$) gezeigt werden.

B Immunhistochemie der lumbalen Vorderhörner für Epo und seinen Rezeptor



B Immunhistochemie der lumbalen Vorderhörner für Epo und EpoR

- a)** Epo, Kontrolle: Überlebenszeitpunkt Tag 7; Lumbal; Negativkontrolle, 40x-Vergrößerung; α -Motorneuron mit schwacher Epo-IR im Zytoplasma
- b)** Epo, Läsion: Überlebenszeitpunkt Tag 7; Läsion 150kdyn; Lumbal; 40x-Vergrößerung; α -Motorneuron mit deutlicher scholliger Epo-IR im Zytoplasma
- c)** EpoR, Kontrolle: Überlebenszeitpunkt Tag 7; Lumbal; Negativkontrolle, 40x-Vergrößerung; α -Motorneuron mit schwacher EpoR-IR in Zytoplasma und Zellmembran
- d)** EpoR, Läsion: Überlebenszeitpunkt Tag 7; Läsion 100kdyn; Lumbal; 40x-Vergrößerung; α -Motorneuron mit schwacher EpoR-IR in Zytoplasma und Zellmembran

4.3.3 Immunfluoreszenz Doppelfärbungen (Erythropoietin)

In der vorgelegten Arbeit wurde die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung genutzt, um nach Immunhistochemie und Densitometrie genauere Kenntnisse über das Zytokin in den Vorderhörnern der lumbalen Segmente zu erlangen. Hierzu wurden geeignete Präparate ausgesucht (Tag 42, 200 kdyn).

Die Auswertung der Doppelfärbungen mit den ausgewählten Zellmarkern zeigte lediglich eine Kolokalisation des Zytokins Epo mit NeuN in den lumbalen Vorderhörnern. Eine korrespondierende Immunreaktivität mit ausgewählten Chemokinen (CCL3, CCR1) konnte für Epo in den lumbalen Vorderhörnern nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 22, Tabelle 5).

4.3.4 Immunfluoreszenz Doppelfärbungen (Erythropoietin-Rezeptor)

Auch für ein tiefgreifendes Verständnis über die Rolle des Erythropoietin-Rezeptor bei traumatischer Rückenmarksläsion wurde die Methode der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung genutzt, um die aus Immunhistochemie und Densitometrie gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der lumbalen Vorderhörner zu erweitern. Hierfür wurden geeignete Rückenmarks-Präparate ausgewählt (Tag 42, 200 kdyn).

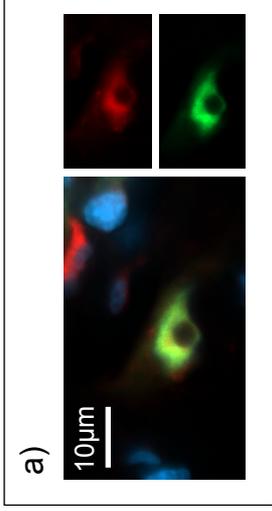
Bei den Doppelfärbungen mit gängigen Zellmarkern zeigte sich lediglich für den neuronalen Marker (NeuN) eine korrespondierende Immunreaktivität für EpoR. In den Zellkörpern der Neurone in den lumbalen Vorderhörnern färbte sich EpoR an. Für die restlichen Zellmarker zeigte sich keine Kolokalisation mit EpoR (siehe Tabelle 5).

Die Doppelfärbung mit dem Chemokin CCL3 ergab eine korrespondierende Immunreaktivität in Zellen der lumbalen Vorderhörner, deren Morphologie am ehesten Neuronen entsprach (siehe Abbildung 22, Tabelle 5).

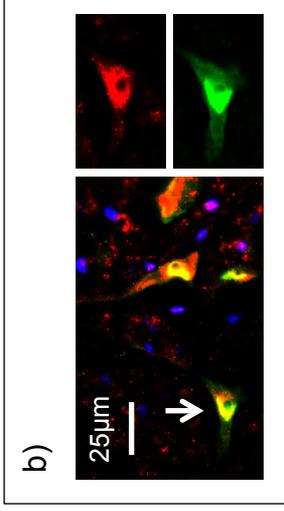
Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Zellmarker, Chemokine)

Vorderhörner (Lumbal), Epo und EpoR

Epo/NeuN



EpoR/NeuN



EpoR/CCL3

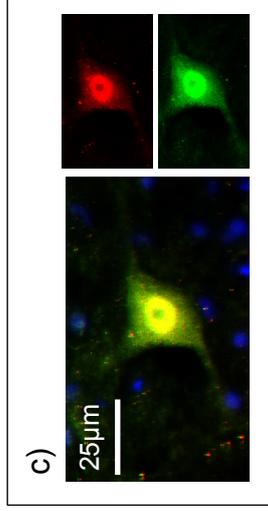


Abbildung 22

Antikörper

- Epo/-R
- Zellmarker/Chemokine
- DAPI

Epo/NeuN (Tag 42, 200kdyn, Lumbal)

a) Vorderhorn, Neuron mit korrespondierender Epo- und NeuN-IR (60x-Vergrößerung)

EpoR/NeuN (Tag 42, 200kdyn, Lumbal)

b) Vorderhorn, Neuron mit kolokalisierter IR von EpoR und (40x-Vergrößerung)

EpoR/CCL3 (Tag 42, 200kdyn, Lumbal)

c) Vorderhorn, Zelle mit Immunreaktivität für EpoR und CCL3, (40x-Vergrößerung). Morphologisch am ehesten ein residentes Neuron der grauen Substanz

Zelltyp	Marker	Epo	EpoR
Neuron	NeuN	+	+
Endothel	vWF	-	-
Astrozyt	GFAP	-	-
radiale Glia	BLBP	-	-
NSPC	Nestin	-	-
Oligodendrozyten	CNPase	-	-
Makrophagen	ED1	-	-
Mikroglia	CD11	-	-
Neuron (Axon)	Nf-200	-	-
Chemokin	CCL3	-	+
Chemokinrezeptor	CCR1	-	-

Tabelle 5

Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen Vorderhorn (graue Substanz)

Tag 42, Läsion 200 kdyn, Lumbal

„+“= Kolokalisation beider Antigene

„-“= keine korrespondierende Immunreaktivität

*= Neural Stem Progenitor Cell

(Neuronale Stamm- und Progenitorzellen)

5. Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wurden die Expressionsmuster von Epo und seinem Rezeptor im Zeitverlauf nach unterschiedlich schweren Rückenmarksläsionen mittels immunhistochemischer Techniken untersucht. Erstmals wurden auf der gesamten spinalen Achse (zervikal, thorakal und lumbal) die Verteilungsmuster des neuroprotektiven Zytokin-Effektor/Rezeptorpaars Epo/EpoR über einen post-läsionalen Zeitraum von sechs Wochen analysiert. Dabei zeigte sich ein zeit- und läsionsstärkeabhängiger Verlauf einer Epo und EpoR-Expression in spezifischen anatomischen Rückenmarksregionen der Hinterstränge und der ventrolateralen weißen Substanz entlang der gesamten spinalen Achse sowie eine unverändert konstitutive Epo/EpoR-Expression in den lumbalen Vorderhörnern. Damit betrafen die sekundären Veränderungen nach dem initialen Trauma auf der Höhe Th 9 auch davon weit entfernt gelegene anatomische Regionen. In der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zeigte sich in den oben genannten Regionen eine Kolo-kalisation von Epo/EpoR mit Zellmarkern für Astrozyten, Neuronen, Endothelzellen, Stammzellen und radiale Gliazellen. In den Hintersträngen und in der ventrolateralen weißen Substanz war dieses neuroprotektive Effektor/Rezeptorpaar auch mit inflammatorischen Chemokinen kolokalisiert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für diese Rückenmarksregionen im Einzelnen diskutiert.

Epo/EpoR-Expression in den Hintersträngen

In der vorgelegten Arbeit waren Epo- und EpoR-Immunreaktivitäten in den Hintersträngen detektierbar. Die Messung der Immunreaktivitätsdichten nach Läsion ergab im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöhte Dichtelevel an allen untersuchten Überlebenszeitpunkten. Über den zeitlichen Verlauf zeigte sich dabei bezüglich der schweren Läsionen ein statistisch signifikanter Anstieg von Tag 7 ausgehend mit maximalen Werten am letzten Untersuchungszeitpunkt (Tag 42). Die Epo/EpoR-Immunreaktivitäten waren hier kolokalisiert mit GFAP, einem Astrozytenmarker, BLBP, einem Marker für radiale Glia, Nestin, einem Marker für neuronale Stamm- und Progenitorzellen, einem Endothelzellmarker und CCL3/CCR1, einem pro-inflammatorischen Chemokine Effektor/Rezeptor-Paar.

Im Hinblick darauf, dass die Hinterstränge nach einem Trauma ein Fokus inflammatorischer Veränderungen werden, mit Nachweis von typischen Entzündungszellen und aktivierten Astrozyten (Knerlich-Lukoschus et al., 2011b), ist

die Expression von Epo/EpoR in dieser anatomischen Lokalisation zunächst im Zusammenhang unspezifischer reaktiver Veränderungen zu interpretieren. Auch die Kofärbungen von Epo/EpoR und Vorläuferzellmarkern fallen wahrscheinlich eher in den Bereich einer allgemeinen Entzündungsreaktion, zumal die Hinterstränge bisher in der Literatur nicht als adulte Stammzellnische beschrieben worden sind (Jia et al., 2009).

Ein weiterer relevanter Aspekt bezüglich dieser anatomischen Region ist ihre potentielle Involvierung in die Entwicklung posttraumatischer zentraler Schmerzen, eine häufige Komplikation im Verlauf nach traumatischer Rückenmarksläsion (Finnerup u. Jensen, 2004). Die Entwicklung von posttraumatischen beziehungsweise zentralen neuropathischen Schmerzen ist komplex und Gegenstand intensiver Forschung. Bezüglich der Hinterstränge ist unter anderem der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) als ein weiterer möglicher Botenstoff in diesem Zusammenhang identifiziert worden. VEGF unterstützt dabei unter anderem ein Aussprossen von Axonen in den Hintersträngen, welches mit der Entwicklung einer mechanischen Allodynie im Tierexperiment korrelierte (Nesic et al., 2010). Interessant dabei ist, dass VEGF und Epo sich intrazelluläre Signalwege teilen. Sie werden durch ähnliche Stimuli induziert, die in einer endothelialen Zellproliferation münden (Alvarez Arroyo et al., 1998). Ähnliche Mechanismen könnten also auch durch eine induzierte Epo/EpoR Expression in den Hintersträngen nach einem spinalen Trauma eine Rolle spielen und mit der Entwicklung zentraler Schmerzen zusammen hängen.

Unterstützt werden diese Annahmen durch die Tatsache, dass die Epo/EpoR-Immunreaktivitätsdichten mit der Entwicklung schmerzassozierten Verhaltens im Spätverlauf korrelierten (Knerlich-Lukoschus et al., 2008). Ob diese Beobachtungen klinische Relevanz haben oder lediglich Koinzidenzen darstellen, muss in weiteren funktionellen Untersuchungen überprüft werden. Immerhin konnten Jia et al. zeigen, dass sich durch Applikation von rekombinantem Erythropoietin im Tiermodell eine Reduktion von typischen mit neuropathischem Schmerz assoziierten Verhaltensweisen erzielen ließ, was mit einer reduzierten neuro-inflammatorischen Aktivierung einherzugehen schien (Jia et al., 2009). Die Autoren diskutierten, dass eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen, die Inhibition von Entzündungsmediatoren und die gliale Aktivierung durch Erythropoietin sein könnte. Bei dem Zytokin Erythropoietin könnte es sich zusammengefasst also um einen

wichtigen Regulator handeln, der das Auftreten von neuropathischen Schmerzen nach spinalen Läsionen beeinflussen könnte.

Epo/EpoR-Expression in der ventrolateralen weißen Substanz

Eine weitere anatomische Region, in der sich nach Rückenmarksläsionen eine Änderung der Epo/EpoR-Immunreaktivität zeigte, war die ventrolaterale weiße Substanz: Hier ließen sich in der vorgelegten Arbeit entlang der gesamten spinalen Achse im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöhte Epo/EpoR-Immunreaktivitäten für den gesamten Untersuchungszeitraum von 42 Tagen nachweisen.

Die ventrolaterale weiße Substanz wurde neben dem zentralen Höhlengrau als weitere Stammzellnische im adulten Rückenmark identifiziert (Yamamoto et al., 2001, Horner et al., 2000). In dem in der vorgelegten Arbeit verwendeten Tiermodell konnten in vorherigen Untersuchungen neuronale Vorläuferzellen und radiale Gliazellen in dieser anatomischen Region nachgewiesen werden (Knerlich-Lukoschus et al., 2010) Dabei waren in diesen Zelltypen auch pro-inflammatorische Chemokine immunhistochemisch nachweisbar. In den aktuellen Untersuchungen zeigte sich in der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung eine Kollokalisierung der entsprechenden Marker auch mit Epo/EpoR.

Damit wurden in dieser Arbeit Hinweise dafür detektiert, dass Epo/EpoR nach spinalen Läsionen eine potentielle Rolle in endogenen regenerativen Prozessen spielen könnte: „Radiale Glia“ wurde bereits früh als Leitstruktur migrierender Neurone beschrieben (Rakic, 1972). Im sich entwickelnden Rückenmark regulieren sie das Axonale Aussprossen und die korrekte Ausrichtung der nachwachsenden Strukturen. Das Auftreten radialer Glia nach experimenteller spinaler Läsion wurde von Shibuya et al. (Shibuya et al., 2002) nachgewiesen durch immunhistochemische Analysen 3CB2- und Nestin-positiver Zellen in der subpialen und angrenzenden weißen Substanz. Darüber hinaus ist die radiale Glia selbst als pluripotente neurale Vorläuferzellreihe im adulten ZNS beschrieben worden (Pinto u. Gotz, 2007). Vor diesem Hintergrund kann der Nachweis dieses Zelltyps nach spinaler Läsion im Rahmen regenerativer- und reparativer Prozesse interpretiert werden. Entsprechend wichtig war der in der Arbeit dargestellte neuartige Befund, der sehr langanhaltend signifikant erhöhte Epo/EpoR-Expression in dieser anatomischen Region, die als Nische neuraler Vorläufer- und Stammzellen des adulten Rückenmarks gilt. So

könnte dieses neuroprotektive Chemokin-Rezeptor/Effektor-Paar die Mikroumgebung dieser Vorläuferzellen nach einem Trauma auf unterschiedlichem spinalen Niveau wahrscheinlich erheblich beeinflussen. Dafür sprechen auch die Befunde der Koexpression von Epo/EpoR mit proliferierenden Zellen, die nach spinaler Läsion auf signifikant hohem Niveau vor allem in der postoperativen Früh- aber auch Spätphase in der subpialen und angrenzend weißen Substanz nachweisbar wurden (unveröffentlichte Daten; Cohrs et al *under revision*). Darüberhinaus konnten diese proliferierenden Zellen mit entsprechenden Markerantikörpern als neurale Vorläufer- und Stammzellen identifiziert werden (Knerlich-Lukoschus et al., 2010).

Mögliche neuroprotektive Mechanismen des Erythropoietin im Rückenmark wurden in einer Arbeit von Wu et al. demonstriert. Hier konnte gezeigt werden, dass Epo nach spinaler Läsion positiv auf transplantierte neuronale Stammzellen Einfluss nimmt, indem es pro-apoptotische Faktoren wie Caspase-3 inhibiert und anti-apoptotische Faktoren (bcl-2) fördert (Wu et al., 2015). Weitere Untersuchungen von Knabe et al. zur spinalen embryonalen Entwicklung zeigten komplexe Zusammenhänge zwischen der Epo/-R-Expression in radialer Glia, dem späteren Auftreten von EPO-positiven neuronalen Subpopulationen und dem Auftreten von apoptotischen Prozessen parallel zur abnehmenden Epo/-R-Expression im Rückenmark (Knabe et al., 2005). Eine Rekapitulation ontogenetischer Prozesse mit ähnlichen Wechselwirkungen könnte auch durch eine spinale Läsion induziert werden, was wiederum Ansätze für therapeutisch Möglichkeiten birgt.

Die Bedingungen in der Mikroumgebung neuraler Vorläuferzellen nach einer Läsion sind dabei aber kaum erforscht und werden hoch komplex sein. Neben dem neuroprotektiven Zytokin Epo wurden zahlreiche andere Botenstoffe in der ventrolateralen weißen Substanz beschrieben: Nach spinalen Läsionen lassen sich bis in den chronischen Zeitverlauf signifikant erhöhte Expressionen unterschiedlicher pro-inflammatorischer Chemokine nachweisen (Knerlich-Lukoschus et al., 2010) die teilweise, wie in den vorgelegten Ergebnissen dargestellt, mit Epo/EpoR Immunreaktivitäten kolokalisiert waren. Diese pro-inflammatorischen Chemokine können die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen in-vitro beeinflussen (Knerlich-Lukoschus et al., 2015). Li et al. zeigten, dass die Applikation von Erythropoietin nach experimenteller spinaler Läsion zu einer Reduktion der TNF- α Expression führte und dabei das Chemokine-Rezeptorpaar (SDF-1/CXCR4) erhöht nachweisbar wurde, welches die Migration von Vorläuferzellen positiv beeinflusste (Li

et al., 2015). Wie genau neuroprotektive (Epo/EpoR) und pro-inflammatorische Zytokine beziehungsweise Chemokine die Mikroumgebung neuraler Vorläuferzellen beeinflussen, muss jetzt im einzelnen in unterschiedlichen Ansätzen (in-vitro/in-vivo) untersucht werden.

Klinische Überlegungen und Ausblick

Die detaillierte anatomische und zeitliche Kartierung der Epo/EpoR-Immunreaktivitäten, sowie die Identifizierung beteiligter Zelltypen erbrachten neben den Einblicken der Epo-/Epo-R Expression in unterschiedlichen anatomischen Rückenmarksregionen nun auch den Rahmen für die Konzeption experimenteller klinischer Studien. Aufgrund der oben diskutierten potentiellen neuroprotektiven Eigenschaften von Epo und dessen Derivaten, die in der klinischen Anwendung nicht die gefürchteten Nebenwirkungen aufweisen wie Epo (Sanchis-Gomar et al., 2013), bietet die nachgewiesene langandauernde EpoR-Induktion nach einem Rückenmarkstrauma und die konstitutive EpoR-Expression auf motorischen Neuronen prinzipiell ein zeitlich breites therapeutisches Fenster.

Positive Effekte nach Epo-Applikation auf die Regeneration wurden in präklinischen und klinischen Studien durchaus verzeichnet (Grasso et al., 2006, Loblaw et al., 2007, Nekoui et al., 2015). Diese Effekte ließen sich jedoch teilweise nicht reproduzieren oder langanhaltende Effekte konnten nicht in allen Studienansätzen gezeigt werden (de Mesquita Coutinho et al., 2016, Mann et al., 2008). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Epo-Applikationen meistens auf frühe Zeitpunkte nach den Läsionen beschränkt waren (z. B. 5-, 60 Minuten oder 24 Stunden bei traumatischer Hirnverletzung (Nichol et al., 2015). Hintergrund dieser Studienansätze war es vermutlich, den sekundären Läsionskaskaden so früh wie möglich entgegenzuwirken.

Nach den Ergebnisse der vorlegten Arbeit mit langanhaltend erhöhter EpoR-Expression unter anderem in der ventro-lateralen weißen Substanz wäre nun zu überlegen, Epo-Derivate wiederholt besonders im späteren Zeitverlauf nach dem initialen Trauma zu applizieren. In Anbetracht auch der entzündungshemmenden Epo-Eigenschaften (Jia et al., 2009) könnte dies zum Beispiel anhaltenden Entzündungsreaktionen entgegenwirken, die sich ebenfalls in der ventro-lateralen Nische bis in die chronische Phase nach der Rückenmarksschädigung nachweisen lassen (Knerlich-Lukoschus et al., 2010).

Die Möglichkeit auch im Spätverlauf durch die therapeutische Applikation von Epo, in Kombination weiterer neuroprotektiver oder antiinflammatorischer und antiapoptotischer Ansätze noch Einfluss auf das Outcome der betroffenen Patienten zu haben, ist vom klinischen Aspekt her sehr attraktiv: Eine gezielte und koordinierte „adjuvante“ Therapie ist vom logistischen Aspekt erst möglich, wenn der betroffene Patient stabilisiert im Krankenhaus aus der Phase der Akutsituation geborgen wurde. Gezielte Therapien am Unfallort sind aufgrund der notwendigen primär stabilisierenden Maßnahmen schwer umsetzbar. Andere im Tierexperiment verfolgte Ansätze, zum Beispiel durch Epo-Konditionierung (Grasso et al., 2006), eine Verbesserung des neurologischen Outcomes nach Rückenmarksverletzungen zu erzielen oder Epo bereits nach fünf Minuten zu verabreichen, stellt in der klinischen Realität daher keine Option dar.

Damit liefert die vorgelegte Arbeit erstmals die Grundlage dafür, Epo-Derivate im Spätverlauf nach einem spinalen Trauma zu applizieren. Entsprechend sind nun weiterführende Versuche geplant, die in dem erarbeiteten Rahmen des verwendeten Tiermodells diese Ansätze verfolgen und überprüfen.

6. Zusammenfassung

Rückenmarksverletzungen stellen aufgrund ihrer Inzidenz und Epidemiologie unverändert ein relevantes Krankheitsbild dar. Es existieren bisher keine kausalen Therapieoptionen von Rückenmarksverletzungen und deren Folgekomplikationen. Die Behandlung sekundärer klinischer Komplikationen ist entsprechend nicht zufriedenstellend.

In der aktuellen Literatur wurde Erythropoietin, welches ursprünglich im Rahmen der Hämatopoese erforscht wurde, aufgrund seiner neuroprotektiven Eigenschaften auch als mögliches vielversprechendes Agens für die Behandlung degenerativer und traumatischer Erkrankungen des zentralen Nervensystems beschrieben. Es ist in eine Vielzahl regenerativer sowie Zell-zu-Zell-kommunikativer Prozesse involviert, die auch in der Orchestrierung des Sekundärschadens und bei endogenen neuroregenerativen Prozessen nach spinalem Trauma eine Rolle spielen könnten. Letzteres bietet potentielle innovative therapeutische Ansätze. Allerdings wurde das Effektor-Rezeptorpaar Epo/EpoR im Rückenmark noch nicht hinreichend erforscht, um für gezielte Therapieoption nach Rückenmarkläsionen effektiv genutzt werden zu können.

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es daher, durch die genaue anatomische Analyse der zeitlichen und der zugrundeliegenden zellulären Expressionsmuster von Epo und seinem Rezeptor zukünftige Ansatzpunkte gezielter experimenteller Therapiestrategien zu erarbeiten. Entsprechend wurden Epo-/EpoR-Immunreaktivitäten qualitativ und semi-quantitativ nach standardisierten thorakalen Rückenmarksläsionen unterschiedlicher Stärke (100-, 150- oder 200 kdyn; Infinite Horizon Impactor) in der Ratte im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren (Laminektomie auf der Höhe Th 9) entlang der gesamten spinalen Achse zu definierten Zeitpunkten nach Läsion (Tag 7, Tag 15, Tag 42) untersucht. Die zellulären Expressionsmuster in den so identifizierten relevanten anatomischen Rückenmarks-Regionen wurden mittels Doppelimmunfloreszenz mit Zellmarker-Antikörpern erarbeitet.

Als wesentliche Ergebnisse wurden in der vorgelegten Arbeit folgende Befunde erhoben: Zunächst bestätigten sich die in der Literatur beschriebenen konstitutiven Epo/EpoR-Expressionsmuster in den Vorderhornneuronen. Zudem wurden Immunreaktivitäten in vaskulären und glialen Strukturen der Hinterstränge und der ventrolateralen weißen Substanz nachgewiesen. Nach Applikation einer leichten,

moderaten und schweren spinalen Läsion wurden die Epo/EpoR-Immunreaktivitäten in den Dichtemessungen in den Hintersträngen und in der ventro-lateralen weißen Substanz signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren nachweisbar. Dabei waren die Immunreaktivitätsdichten in den Hintersträngen über den Zeitverlauf nach schweren Läsionen weiter signifikant ansteigend, was mit der Entwicklung neuropathischer Schmerzkorrelate in den entsprechenden Tiergruppen einherging. Epo und EpoR waren dabei mit unterschiedlichen zellulären Markern kogefärbt: In den Vorderhörnern wurden die neuronalen Expressionsmuster mittels Doppelfärbungen mit NeuN verifiziert. In den Hintersträngen und in der weißen Substanz bestand eine Kofärbungen mit glialen Markern (z.B. GFAP), Vorläuferzellen (z.B. Nestin) und vaskulären Markern (von Willebrandt Faktor). Damit konnte in der vorgelegten Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Epo/EpoR-Immunreaktivitäten in unterschiedlichen Zelltypen in Abhängigkeit von der Läsionsstärke und dem Zeitpunkt nach der initialen Läsion erhöht in anatomischen Arealen, die in endogene regenerative Prozesse (ventrolaterale weiße Substanz) und Schmerzmodulation (Hinterstränge) nach spinalen Läsionen involviert sind, messbar werden.

Entsprechend würde eine Applikation von Epo potentiell unterschiedliche Aspekte, die im Spätverlauf nach einem Rückenmarktrauma relevant werden, wie die Entstehung neuropathischer Schmerzen und die Initiierung endogener neuroregenerativer Prozesse, beeinflussen können. Diese Ergebnisse sprechen zudem dafür, Epo-Derivate nicht nur in der Frühphase nach einem Trauma, sondern auch während der klinisch gut zugänglichen Spätphase zu applizieren.

Diese Aspekte können nun auf Basis der in der vorgelegten Arbeit erstellten Zeitverläufe in weiterführenden funktionellen Experimenten näher untersucht werden, womit die Zielvorgaben der vorgelegten Arbeit erfüllt sind.

7. Literaturverzeichnis

- ALLEN 1911. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: A preliminary report. *Journal of the American Medical Association*, LVII, 878-880.
- ALLEN 1914. Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 41, 141-147.
- ALVAREZ ARROYO, M. V., CASTILLA, M. A., GONZALEZ PACHECO, F. R., TAN, D., RIESCO, A., CASADO, S. & CAMELO, C. 1998. Role of vascular endothelial growth factor on erythropoietin-related endothelial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol*, 9, 1998-2004.
- ARISHIMA, Y., SETOGUCHI, T., YAMAURA, I., YONE, K. & KOMIYA, S. 2006. Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31, 2432-8.
- BANIK, N. L., MATZELLE, D. C., GANTT-WILFORD, G., OSBORNE, A. & HOGAN, E. L. 1997. Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury. *Brain Res*, 752, 301-6.
- BARNABE-HEIDER, F. & FRISEN, J. 2008. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell*, 3, 16-24.
- BASSO, D. M., BEATTIE, M. S. & BRESNAHAN, J. C. 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 12, 1-21.
- BAZAN, J. F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6934-8.
- BENNETT, A. D., CHASTAIN, K. M. & HULSEBOSCH, C. E. 2000. Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP(8-37) in a rodent model of chronic central pain. *Pain*, 86, 163-75.
- BITTORF, T., BUCHSE, T., SASSE, T., JASTER, R. & BROCK, J. 2001. Activation of the transcription factor NF-kappaB by the erythropoietin receptor: structural requirements and biological significance. *Cell Signal*, 13, 673-81.
- BRACKEN, M. B. 2012. Steroids for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, CD001046.
- BRACKEN, M. B., SHEPARD, M. J., HOLFORD, T. R., LEO-SUMMERS, L., ALDRICH, E. F., FAZL, M., FEHLINGS, M., HERR, D. L., HITCHON, P. W., MARSHALL, L. F., NOCKELS, R. P., PASCALE, V., PEROT, P. L., JR., PIEPMEIER, J., SONNTAG, V. K., WAGNER, F., WILBERGER, J. E., WINN, H. R. & YOUNG, W. 1997. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA*, 277, 1597-604.
- CARELLI, S., MARFIA, G., DI GIULIO, A. M., GHILARDI, G. & GORIO, A. 2011. Erythropoietin: recent developments in the treatment of spinal cord injury. *Neurol Res Int*, 2011, 453179.
- CERRI, G., MONTAGNA, M., MADASCHI, L., MERLI, D., BORRONI, P., BALDISSERA, F. & GORIO, A. 2012. Erythropoietin effect on sensorimotor recovery after contusive spinal cord injury: an electrophysiological study in rats. *Neuroscience*, 219, 290-301.
- CHONG, Z. Z., KANG, J. Q. & MAIESE, K. 2002. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation*, 106, 2973-9.
- CURT, A., DIENER, H. & WEIMAR, C. 2012. Leitlinie: Querschnittlähmung. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie der Querschnittslähmung*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- DE MESQUITA COUTINHO, P. R., CRISTANTE, A. F., DE BARROS FILHO, T. E., FERREIRA, R. & DOS SANTOS, G. B. 2016. Effects of tacrolimus and erythropoietin in experimental spinal cord lesion in rats: functional and histological evaluation. *Spinal Cord*, 54, 439-44.
- DIAZ-RUIZ, A., IBARRA, A., PEREZ-SEVERIANO, F., GUIZAR-SAHAGUN, G., GRIJALVA, I. & RIOS, C. 2002. Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats. *Neurosci Lett*, 319, 129-32.
- DONNELLY, D. J. & POPOVICH, P. G. 2008. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 209, 378-88.
- DUCKER, T. B., KINDT, G. W. & KEMPF, L. G. 1971. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg*, 35, 700-8.
- ECKARDT, K. U., MOLLMANN, M., NEUMANN, R., BRUNKHORST, R., BURGER, H. U., LONNEMANN, G., SCHOLZ, H., KEUSCH, G., BUCHHOLZ, B., FREI, U. & ET AL. 1989. Erythropoietin in polycystic kidneys. *J Clin Invest*, 84, 1160-6.

- EHRENREICH, H., WEISSENBORN, K., PRANGE, H., SCHNEIDER, D., WEIMAR, C., WARTENBERG, K., SCHELLINGER, P. D., BOHN, M., BECKER, H., WEGRZYN, M., JAHNIG, P., HERRMANN, M., KNAUTH, M., BAHR, M., HEIDE, W., WAGNER, A., SCHWAB, S., REICHMANN, H., SCHWENDEMANN, G., DENGLER, R., KASTRUP, A., BARTELS, C. & GROUP, E. P. O. S. T. 2009. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke*, 40, e647-56.
- FEHLINGS, M. G., TATOR, C. H. & LINDEN, R. D. 1989. The relationships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials and spinal cord blood flow. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 74, 241-59.
- FEHLINGS, M. G., WILSON, J. R. & CHO, N. 2014. Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: counterpoint. *Neurosurgery*, 61 Suppl 1, 36-42.
- FINNERUP, N. B. & JENSEN, T. S. 2004. Spinal cord injury pain--mechanisms and treatment. *Eur J Neurol*, 11, 73-82.
- FLEMING, J. C., NORENBURG, M. D., RAMSAY, D. A., DEKABAN, G. A., MARCILLO, A. E., SAENZ, A. D., PASQUALE-STYLE, M., DIETRICH, W. D. & WEAVER, L. C. 2006. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*, 129, 3249-69.
- FRIED, L. C. & GOODKIN, R. 1971. Microangiographic observations of the experimentally traumatized spinal cord. *J Neurosurg*, 35, 709-14.
- FUMAGALLI, F., MADASCHI, L., BRENNIA, P., CAFFINO, L., MARFIA, G., DI GIULIO, A. M., RACAGNI, G. & GORIO, A. 2008. Single exposure to erythropoietin modulates Nerve Growth Factor expression in the spinal cord following traumatic injury: comparison with methylprednisolone. *Eur J Pharmacol*, 578, 19-27.
- GRASSO, G., SFACTERIA, A., ERBAYRAKTAR, S., PASSALACQUA, M., MELI, F., GOKMEN, N., YILMAZ, O., LA TORRE, D., BUEMI, M., IACOPINO, D. G., COLEMAN, T., CERAMI, A., BRINES, M. & TOMASELLO, F. 2006. Amelioration of spinal cord compressive injury by pharmacological preconditioning with erythropoietin and a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *J Neurosurg Spine*, 4, 310-8.
- GRASSO, G., SFACTERIA, A., MELI, F., FODALE, V., BUEMI, M. & IACOPINO, D. G. 2007. Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. *Brain Res*, 1182, 99-105.
- GRASSO, G., SFACTERIA, A., PASSALACQUA, M., MORABITO, A., BUEMI, M., MACRI, B., BRINES, M. L. & TOMASELLO, F. 2005. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression after experimental spinal cord injury encourages therapy by exogenous erythropoietin. *Neurosurgery*, 56, 821-7; discussion 821-7.
- GUPTA, R., BATHEN, M. E., SMITH, J. S., LEVI, A. D., BHATIA, N. N. & STEWARD, O. 2010. Advances in the management of spinal cord injury. *J Am Acad Orthop Surg*, 18, 210-22.
- HALL, E. D. & BRAUGHLER, J. M. 1989. Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 6, 303-13.
- HALL, E. D. & SPRINGER, J. E. 2004. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*, 1, 80-100.
- HALL, E. D. & WOLF, D. L. 1986. A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of posttraumatic spinal cord ischemia. *J Neurosurg*, 64, 951-61.
- HONG, Z., HONG, H., CHEN, H., WANG, Z. & HONG, D. 2011. Investigation of the protective effect of erythropoietin on spinal cord injury in rats. *Exp Ther Med*, 2, 837-841.
- HORNER, P. J., POWER, A. E., KEMPERMANN, G., KUHN, H. G., PALMER, T. D., WINKLER, J., THAL, L. J. & GAGE, F. H. 2000. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 20, 2218-28.
- HUANG, H., FAN, S., JI, X., ZHANG, Y., BAO, F. & ZHANG, G. 2009. Recombinant human erythropoietin protects against experimental spinal cord trauma injury by regulating expression of the proteins MKP-1 and p-ERK. *J Int Med Res*, 37, 511-9.
- HUGHES, J. T. 1988. The Edwin Smith Surgical Papyrus: an analysis of the first case reports of spinal cord injuries. *Paraplegia*, 26, 71-82.
- JACOBSON, L. O., GOLDWASSER, E., FRIED, W. & PLZAK, L. 1957. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*, 179, 633-4.
- JIA, H. B., JIN, Y., JI, Q., HU, Y. F., ZHOU, Z. Q., XU, J. G. & YANG, J. J. 2009. Effects of recombinant human erythropoietin on neuropathic pain and cerebral expressions of cytokines and nuclear factor-kappa B. *Can J Anaesth*, 56, 597-603.
- JUUL, S. E., YACHNIS, A. T., ROJIANI, A. M. & CHRISTENSEN, R. D. 1999. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol*, 2, 148-58.

- KANEKO, N., KAKO, E. & SAWAMOTO, K. 2013. Enhancement of ventricular-subventricular zone-derived neurogenesis and oligodendrogenesis by erythropoietin and its derivatives. *Front Cell Neurosci*, 7, 235.
- KAPTANOGLU, E., SOLAROGLU, I., OKUTAN, O., SURUCU, H. S., AKBIYIK, F. & BESKONAKLI, E. 2004. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev*, 27, 113-20.
- KASPER, C. 2003. Erythropoietin. In: A., T. & T., L. (eds.) *The Cytokine Handbook* London: Academic Press.
- KAWAKAMI, M., SEKIGUCHI, M., SATO, K., KOZAKI, S. & TAKAHASHI, M. 2001. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem*, 276, 39469-75.
- KNABE, W., KNERLICH, F., WASHAUSEN, S., KIETZMANN, T., SIREN, A. L., BRUNNETT, G., KUHN, H. J. & EHRENREICH, H. 2004. Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain. *Anat Embryol (Berl)*, 207, 503-12.
- KNABE, W., SIREN, A. L., EHRENREICH, H. & KUHN, H. J. 2005. Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing spinal cord and dorsal root ganglia. *Anat Embryol (Berl)*, 210, 209-19.
- KNERLICH-LUKOSCHUS, F. 2015. Chemokines and their receptors: important mediators to be aware of in neuroregenerative approaches for spinal cord injury. *Neural Regen Res*, 10, 562-4.
- KNERLICH-LUKOSCHUS, F. & HELD-FEINDT, J. 2015. Chemokine-ligands/receptors: multiplayers in traumatic spinal cord injury. *Mediators Inflamm*, 2015, 486758.
- KNERLICH-LUKOSCHUS, F., JURASCHEK, M., BLOMER, U., LUCIUS, R., MEHDORN, H. M. & HELD-FEINDT, J. 2008. Force-dependent development of neuropathic central pain and time-related CCL2/CCR2 expression after graded spinal cord contusion injuries of the rat. *J Neurotrauma*, 25, 427-48.
- KNERLICH-LUKOSCHUS, F., KROSSA, S., KRAUSE, J., MEHDORN, H. M., SCHEIDIG, A. & HELD-FEINDT, J. 2015. Impact of chemokines on the properties of spinal cord-derived neural progenitor cells in a rat spinal cord lesion model. *J Neurosci Res*, 93, 562-71.
- KNERLICH-LUKOSCHUS, F., NOACK, M., VON DER ROPP-BRENNER, B., LUCIUS, R., MEHDORN, H. M. & HELD-FEINDT, J. 2011a. Spinal cord injuries induce changes in CB1 cannabinoid receptor and C-C chemokine expression in brain areas underlying circuitry of chronic pain conditions. *J Neurotrauma*, 28, 619-34.
- KNERLICH-LUKOSCHUS, F., VON DER ROPP-BRENNER, B., LUCIUS, R., MEHDORN, H. M. & HELD-FEINDT, J. 2010. Chemokine expression in the white matter spinal cord precursor niche after force-defined spinal cord contusion injuries in adult rats. *Glia*, 58, 916-31.
- KNERLICH-LUKOSCHUS, F., VON DER ROPP-BRENNER, B., LUCIUS, R., MEHDORN, H. M. & HELD-FEINDT, J. 2011b. Spatiotemporal CCR1, CCL3(MIP-1alpha), CXCR4, CXCL12(SDF-1alpha) expression patterns in a rat spinal cord injury model of posttraumatic neuropathic pain. *J Neurosurg Spine*, 14, 583-97.
- KOURY, M. J. & BONDURANT, M. C. 1992. The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem*, 210, 649-63.
- KRUEGER, H., NOONAN, V. K., TRENAMAN, L. M., JOSHI, P. & RIVERS, C. S. 2013. The economic burden of traumatic spinal cord injury in Canada. *Chronic Dis Inj Can*, 33, 113-22.
- LEE, B. B., CRIPPS, R. A., FITZHARRIS, M. & WING, P. C. 2014. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord*, 52, 110-6.
- LI, J., GUO, W., XIONG, M., HAN, H., CHEN, J., MAO, D., TANG, B., YU, H. & ZENG, Y. 2015. Effect of SDF-1/CXCR4 axis on the migration of transplanted bone mesenchymal stem cells mobilized by erythropoietin toward lesion sites following spinal cord injury. *Int J Mol Med*, 36, 1205-14.
- LOBLAW, D. A., HOLDEN, L., XENOCOSTAS, A., CHEN, E., CHANDER, S., COOPER, P., CHAN, P. C. & WONG, C. S. 2007. Functional and pharmacokinetic outcomes after a single intravenous infusion of recombinant human erythropoietin in patients with malignant extradural spinal cord compression. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 19, 63-70.
- LOPACHIN, R. M., GAUGHAN, C. L., LEHNING, E. J., KANEKO, Y., KELLY, T. M. & BLIGHT, A. 1999. Experimental spinal cord injury: spatiotemporal characterization of elemental concentrations and water contents in axons and neuroglia. *J Neurophysiol*, 82, 2143-53.
- LOPEZ-VALES, R., GHASEMLOU, N., REDENSEK, A., KERR, B. J., BARBAYIANNI, E., ANTONOPOULOU, G., BASKAKIS, C., RATHORE, K. I., CONSTANTINO-KOKOTOU, V., STEPHENS, D., SHIMIZU, T., DENNIS, E. A., KOKOTOS, G. & DAVID, S. 2011. Phospholipase A2 superfamily members play divergent roles after spinal cord injury. *FASEB J*, 25, 4240-52.

- MANN, C., LEE, J. H., LIU, J., STAMMERS, A. M., SOHN, H. M., TETZLAFF, W. & KWON, B. K. 2008. Delayed treatment of spinal cord injury with erythropoietin or darbepoetin--a lack of neuroprotective efficacy in a contusion model of cord injury. *Exp Neurol*, 211, 34-40.
- MARTINEZ-ESTRADA, O. M., RODRIGUEZ-MILLAN, E., GONZALEZ-DE VICENTE, E., REINA, M., VILARO, S. & FABRE, M. 2003. Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci*, 18, 2538-44.
- MARTINO, G. & PLUCHINO, S. 2007. Neural stem cells: guardians of the brain. *Nat Cell Biol*, 9, 1031-4.
- MIZUNO, T., SAWADA, M., SUZUMURA, A. & MARUNOUCHI, T. 1994. Expression of cytokines during glial differentiation. *Brain Res*, 656, 141-46.
- MORIYA, T., HASSAN, A. Z., YOUNG, W. & CHESLER, M. 1994. Dynamics of extracellular calcium activity following contusion of the rat spinal cord. *J Neurotrauma*, 11, 255-63.
- MURPHY, E. J., BEHRMANN, D., BATES, C. M. & HORROCKS, L. A. 1994. Lipid alterations following impact spinal cord injury in the rat. *Mol Chem Neuropathol*, 23, 13-26.
- NEKOU, A., DEL CARMEN ESCALANTE TRESIERRA, V., ABDOLMOHAMMADI, S., SHEDID, D. & BLAISE, G. 2015. Neuroprotective Effect of Erythropoietin in Postoperation Cervical Spinal Cord Injury: Case Report and Review. *Anesth Pain Med*, 5, e28849.
- NEMECEK, S. 1978. Morphological evidence of microcirculatory disturbances in experimental spinal cord trauma. *Adv Neurol*, 20, 395-405.
- NESIC, O., SUNDBERG, L. M., HERRERA, J. J., MOKKAPATI, V. U., LEE, J. & NARAYANA, P. A. 2010. Vascular endothelial growth factor and spinal cord injury pain. *J Neurotrauma*, 27, 1793-803.
- NICHOL, A., FRENCH, C., LITTLE, L., HADDAD, S., PRESNEILL, J., ARABI, Y., BAILEY, M., COOPER, D. J., DURANTEAU, J., HUET, O., MAK, A., MCARTHUR, C., PETTILA, V., SKRIFVAR, M., VALLANCE, S., VARMA, D., WILLS, J., BELLOMO, R., INVESTIGATORS, E.-T. & GROUP, A. C. T. 2015. Erythropoietin in traumatic brain injury (EPO-TBI): a double-blind randomised controlled trial. *Lancet*, 386, 2499-506.
- NING, B., ZHANG, A., SONG, H., GONG, W., DING, Y., GUO, S., ZHAO, Y., JIANG, J. & JIA, T. 2011. Recombinant human erythropoietin prevents motor neuron apoptosis in a rat model of cervical sub-acute spinal cord compression. *Neurosci Lett*, 490, 57-62.
- NSCISC, N. S. C. I. S. C. 2016. *Facts and Figures at a Glance* [Online].
- OYINBO, C. A. 2011. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 71, 281-99.
- PINTO, L. & GOTZ, M. 2007. Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol*, 83, 2-23.
- RABCHEVSKY, A. G., SULLIVAN, P. G., FUGACCIA, I. & SCHEFF, S. W. 2003. Creatine diet supplement for spinal cord injury: influences on functional recovery and tissue sparing in rats. *J Neurotrauma*, 20, 659-69.
- RAKIC, P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol*, 145, 61-83.
- RASCH, F., HOFMANN, NAUMANN 2006. Quantitative Methoden. Band 2. Heidelberg: Springer.
- REN, Y. & YOUNG, W. 2013. Managing inflammation after spinal cord injury through manipulation of macrophage function. *Neural Plast*, 2013, 945034.
- RUFF, C. A., WILCOX, J. T. & FEHLINGS, M. G. 2012. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol*, 235, 78-90.
- SANCHIS-GOMAR, F., PEREZ-QUILIS, C. & LIPPI, G. 2013. Erythropoietin receptor (EpoR) agonism is used to treat a wide range of disease. *Mol Med*, 19, 62-4.
- SARGIN, D., FRIEDRICH, H., EL-KORDI, A. & EHRENREICH, H. 2010. Erythropoietin as neuroprotective and neuroregenerative treatment strategy: comprehensive overview of 12 years of preclinical and clinical research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 24, 573-94.
- SCHUSTER, S. J., BADIYAS, E. V., COSTA-GIOMI, P., WEINMANN, R., ERSLEV, A. J. & CARO, J. 1989. Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood*, 73, 13-6.
- SCHUSTER, S. J., KOURY, S. T., BOHRER, M., SALCEDA, S. & CARO, J. 1992. Cellular sites of extrarenal and renal erythropoietin production in anaemic rats. *Br J Haematol*, 81, 153-9.
- SENER, H. J. & VENES, J. L. 1978. Altered blood flow and secondary injury in experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg*, 49, 569-78.
- SHARMA, H. S. 2005. Pathophysiology of blood-spinal cord barrier in traumatic injury and repair. *Curr Pharm Des*, 11, 1353-89.
- SHIBUYA, S., MIYAMOTO, O., AUER, R. N., ITANO, T., MORI, S. & NORIMATSU, H. 2002. Embryonic intermediate filament, nestin, expression following traumatic spinal cord injury in adult rats. *Neuroscience*, 114, 905-16.

- SINGH, A., TETREULT, L., KALSIRYAN, S., NOURI, A. & FEHLINGS, M. G. 2014. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin Epidemiol*, 6, 309-31.
- SIREN, A. L., FASSHAUER, T., BARTELS, C. & EHRENREICH, H. 2009. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics*, 6, 108-27.
- SIREN, A. L., FRATELLI, M., BRINES, M., GOEMANS, C., CASAGRANDE, S., LEWCZUK, P., KEENAN, S., GLEITER, C., PASQUALI, C., CAPOBIANCO, A., MENNINI, T., HEUMANN, R., CERAMI, A., EHRENREICH, H. & GHEZZI, P. 2001. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4044-9.
- SULLIVAN, P. G., KRISHNAMURTHY, S., PATEL, S. P., PANDYA, J. D. & RABCHEVSKY, A. G. 2007. Temporal characterization of mitochondrial bioenergetics after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 24, 991-9.
- TAOKA, Y., NARUO, M., KOYANAGI, E., URAKADO, M. & INOUE, M. 1995. Superoxide radicals play important roles in the pathogenesis of spinal cord injury. *Paraplegia*, 33, 450-3.
- TOBOREK, M., MALECKI, A., GARRIDO, R., MATTSON, M. P., HENNIG, B. & YOUNG, B. 1999. Arachidonic acid-induced oxidative injury to cultured spinal cord neurons. *J Neurochem*, 73, 684-92.
- TRAN, P. B. & MILLER, R. J. 2003. Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci*, 4, 444-55.
- VAN DER KOOIJ, M. A., GROENENDAAL, F., KAVELAARS, A., HEIJNEN, C. J. & VAN BEL, F. 2008. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev*, 59, 22-33.
- VILLA, P., BIGINI, P., MENNINI, T., AGNELLO, D., LARAGIONE, T., CAGNOTTO, A., VIVIANI, B., MARINOVICH, M., CERAMI, A., COLEMAN, T. R., BRINES, M. & GHEZZI, P. 2003. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*, 198, 971-5.
- WALLACE, M. C. & TATOR, C. H. 1986. Spinal cord blood flow measured with microspheres following spinal cord injury in the rat. *Can J Neurol Sci*, 13, 91-6.
- WALLACE, M. C., TATOR, C. H. & FRAZEE, P. 1986. Relationship between posttraumatic ischemia and hemorrhage in the injured rat spinal cord as shown by colloidal carbon angiography. *Neurosurgery*, 18, 433-9.
- WATSON, C., PAXINOS, G. & KAYALIOGLU, G. 2008. *The Spinal Cord*, A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas.
- WEISS, S., DUNNE, C., HEWSON, J., WOHL, C., WHEATLEY, M., PETERSON, A. C. & REYNOLDS, B. A. 1996. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*, 16, 7599-609.
- WEN, D., BOISSEL, J. P., TRACY, T. E., GRUNINGER, R. H., MULCAHY, L. S., CZELUSNIAK, J., GOODMAN, M. & BUNN, H. F. 1993. Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood*, 82, 1507-16.
- WHO 2013. International Perspectives On Spinal Cord Injury.
- WILLIS, K., CHEUNG, M. & SLIFER, S. 2009. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl*, S1-130.
- WITIW, C. D. & FEHLINGS, M. G. 2015. Acute Spinal Cord Injury. *J Spinal Disord Tech*, 28, 202-10.
- WU, M. F., ZHANG, S. Q., GU, R., LIU, J. B., LI, Y. & ZHU, Q. S. 2015. Transplantation of erythropoietin gene-modified neural stem cells improves the repair of injured spinal cord. *Neural Regen Res*, 10, 1483-90.
- XU, G. Y., HUGHES, M. G., ZHANG, L., CAIN, L. & MCADOO, D. J. 2005. Administration of glutamate into the spinal cord at extracellular concentrations reached post-injury causes functional impairments. *Neurosci Lett*, 384, 271-6.
- YAMAMOTO, S., YAMAMOTO, N., KITAMURA, T., NAKAMURA, K. & NAKAFUKU, M. 2001. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp Neurol*, 172, 115-27.
- YU, W. R., LIU, T., FEHLINGS, T. K. & FEHLINGS, M. G. 2009. Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury. *Eur J Neurosci*, 29, 114-31.
- YU, Y., MATSUYAMA, Y., YANASE, M., ITO, S., ADACHI, K., SATAKE, K., ISHIGURO, N. & KIUCHI, K. 2004. Effects of hyperbaric oxygen on GDNF expression and apoptosis in spinal cord injury. *Neuroreport*, 15, 2369-73.
- ZANJANI, E. D., POSTER, J., BURLINGTON, H., MANN, L. I. & WASSERMAN, L. R. 1977. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med*, 89, 640-4.

ZHANG, Y., CHOPP, M., MAHMOOD, A., MENG, Y., QU, C. & XIONG, Y. 2012. Impact of inhibition of erythropoietin treatment-mediated neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus on restoration of spatial learning after traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 235, 336-44.

Danksagung

Die Durchführung dieser Arbeit war nur durch die Unterstützung einiger Personen möglich, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Meiner Betreuerin Fr. PD Dr. Knerlich-Lukoschus möchte ich für die Unterstützung bei der Konzeption und Durchführung dieser Arbeit danken. Auch nach langen Diensten war Sie stets bei Rückfragen da. Die Zusammenarbeit mit Frau Dr. Cohrs habe ich sehr geschätzt und hat ihren Teil zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Der Leiterin des neurochirurgischen Labors Frau Professor Held-Feindt, sowie den medizinisch technischen Assistent/-innen danke ich für die Bereitstellung des Labors, die Einarbeitung in die histologischen Färbemethoden und die Einbindung in die Gruppe der Kieler Neurowissenschaftler.

Dem Direktor der Klinik für Neurochirurgie Herrn Prof. Synowitz und seinem Vorgänger Herrn Prof. Mehdorn danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit.

Zuletzt gilt mein größter Dank meiner Partnerin Frau Behrends und meiner Familie, die mich unterstützt und motiviert haben, diese Arbeit neben Studium und Arbeit durchzuführen und zu Ende zu bringen.

Veröffentlichung

Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 1. Joint Meeting mit der Koreanischen Gesellschaft für Neurochirurgie (KNS). Frankfurt am Main 12.-15.06.2016. Düsseldorf German Medical Science GMS Publishing House; 2016. DocP 057

doi: 10.3205/16dgnc432, urn:nbn:de: 0183-16dgnc4322

Veröffentlicht am 08.06.2016

Cohrs G, Goerden S, Lucius R, Synowitz M, Mehdorn HM, Held-Feindt J, et al. Spatial and Cellular Expression Patterns of Erythropoietin-Receptor and Erythropoietin during a 42-Day Post-Lesional Time Course after Graded Thoracic Spinal Cord Impact Lesions in the Rat. J Neurotrauma. 2018

