

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

**„Expressionsprofile proinflammatorischer und proapoptotischer
Mediatoren beim sekundären Tethered Cord nach
operativer Myelomeningozelendeckung“**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von
Bea Drucks
aus Menden (Sauerland)
Kiel 2021

1. Berichterstatter/in: Frau Prof. Dr. med. Friederike Knerlich-Lukoschus
2. Berichterstatter/in: Frau PD Dr. med. Hiltrud Muhle

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 20.09.2021

gez.: Frau Prof. Dr. med. Friederike Knerlich-Lukoschus

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

„Du hast ein gutes Gefühl, du denkst an all die schönen Zeiten.
Es ist fast zu viel jetzt im Moment neben dir zu stehen.
Du hast kein klares Ziel, aber Millionen Möglichkeiten,
ein gutes Gefühl und du weißt es wird gut für dich ausgehen.“

Die Ärzte

In Gedenken an meinen Opa und meine Oma

Hans Kowitzke

Ursula Wrede

Meiner Oma

Hildegard Kowitzke

Meinen Eltern

Ursula Wrede-Kowitzke

Manfred Kowitzke

Meinem Ehemann und meiner Tochter

Sebastian und Wilma Drucks

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

I Tabellenverzeichnis	III
II Abbildungsverzeichnis	IV
III Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologische Daten zum Tethered Cord Syndrom	3
1.2 Diagnostik und klinische Symptomatik des Tethered Cord Syndroms.....	3
1.3 Therapie des Tethered Cord Syndroms	6
1.4 Pathophysiologie des Tethered Cord Syndroms.....	7
1.5 Entzündungsreaktionen als wichtiges Element sekundärer Schadenskaskaden nach einem spinalen Trauma und spinalen Dysraphien.....	8
1.6 Zielsetzung.....	12
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Entparaffinierung.....	14
2.1.1 Ablauf der Entparaffinierung	15
2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	15
2.2.1 Ablauf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	15
2.3 Gewebeatlanten.....	16
2.4 Immunhistochemie	17
2.4.1 Ablauf der Avidin-Biotin-Peroxidase (DAB)-Färbung.....	17
2.4.2 Ablauf der Doppelimmunfluoreszenzfärbung	18
2.4.3 Ablauf der Tripleimmunfluoreszenzfärbung	19
2.4.4 TUNEL-Färbung und Auswertung.....	23
2.4.5 Spezifität der verwendeten Antikörper.....	24
2.5 Mikroskopie und qualitative Auswertung	27
2.6 Densitometrie.....	27
2.7 Molekularbiologische Analysen	27
2.7.1 RNA-Isolation aus formalin-fixiertem paraffin-eingebettetem (FFPE-) Gewebe	
27	
2.7.2 Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung ...	28
2.7.3 DNA-Verdau und Herstellung von cDNA	28
2.7.4 Target Assay-Mix.....	30
2.7.5 Qualitative Real-Time PCR (qPCR)	30

2.7.6	Relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte.....	33
2.8	Statistik und Signifikanzniveau	36
2.9	Klinische Daten und MRT-Befunde.....	36
2.10	Ethische Anforderungen	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Klinische Daten	37
3.2	Vorarbeiten zur Immunhistochemie	40
3.3	Analyse der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und Expressionsmuster verschiedener Gewebemarker (GFAP, VIM, NeuN, NF 200kD, CNPase, Synaptophysin, CD3, CD11b, CD68)42	
3.3.1	Densitometrische Analyse der GFAP-und VIM-Immunreaktivität	45
3.4	Expressionsmuster von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen, densitometrischen und molekularbiologischen Auswertungen	48
3.4.1	Densitometrische Analysen.....	49
3.4.2	Zelluläre Lokalisation.....	51
3.4.3	Ergebnisse der qPCR.....	53
3.5	Expressionsmuster von TNF-a und TNF-Rezeptor: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen, densitometrischen und molekularbiologischen Auswertungen.....	53
3.5.1	Densitometrische Analysen.....	54
3.5.2	Zelluläre Lokalisation.....	56
3.5.3	Ergebnisse der qPCR.....	57
3.6	Expressionsmuster von HIF-1a und HIF-2a: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen und densitometrischen Auswertungen	58
3.6.1	Densitometrische Analysen.....	58
3.6.2	Zelluläre Lokalisation.....	60
3.7	Ergebnisse der Untersuchungen zur Apoptose	61
4	Diskussion.....	64
5	Zusammenfassung.....	69
6	Literaturverzeichnis	IX
7	Anhang.....	XIII
7.1	Ethikvotum	XIII
7.2	Danksagung	XV

I Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	15
Tabelle 2	16
Tabelle 3	20
Tabelle 4	21
Tabelle 5	22
Tabelle 6	23
Tabelle 7	26
Tabelle 8	29
Tabelle 9	32
Tabelle 10	32
Tabelle 11	33
Tabelle 12	34
Tabelle 13	39
Tabelle 14	40
Tabelle 15	44

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	5
Abbildung 2	13
Abbildung 3	41
Abbildung 4	41
Abbildung 5	45
Abbildung 6	47
Abbildung 7	49
Abbildung 8	50
Abbildung 9	52
Abbildung 10	53
Abbildung 11	54
Abbildung 12	55
Abbildung 13	56
Abbildung 14	57
Abbildung 15	58
Abbildung 16	59
Abbildung 17	61
Abbildung 18	62

III Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta
°C	Grad Celcius
ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Aqua bidest.	lat. Aqua bidestillatum = doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest.	lat. Aqua destillatum = destilliertes Wasser
BSA	engl. bovine serumalbumine
CD3/CD11b/CD68	engl. cluster of differentiation
cDNA	engl. copy deoxyribonucleic acid = kopierte Desoxyribonukleinsäure
CNPase	2', 3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase
cPARP	Cleaved Poly (ADP-ribose)-Polymerase
C _T	engl. cycle of threshold = Schwellenwertzyklus
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Embryonaler Tag
EDTA	Ethyldiamin-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
EPO	Erythropoetin
EPO-R	Erythropoetin-Rezeptor
et al.	lat. et alii = und andere

Fab	engl. fragment antigen binding = Antigen-bindendes Fragment
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FFPE	Formalin-fixiert, paraffin-eingebettet
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	engl. glial fibrillary acidic protein = saures Gliafaserprotein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF	engl. hypoxia inducible factor = Hypoxie-induzierbarer Faktor
HIF-1a/HIF-1 α	engl. hypoxia inducible factor -1 alpha = Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 alpha
HIF-2a/HIF-2 α	engl. hypoxia inducible factor -2 alpha = Hypoxie-induzierbarer Faktor-2 alpha
HRE	engl. hypoxia response elements
Ig	Immunglobulin
IL-1b/IL-1 β	Interleukin-1-beta
IL-1R1	Interleukin-1-Rezeptor Typ 1
JAK-2	Janus-Kinase-2
Min	Minute
MMC	engl. myelomeningocele = Myelomeningozele
Mon	Monat/Monate
mRNA	engl. messenger ribonucleid acid = Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NeuN	engl. neuronal nuclei
NF 200kD	Neurofilament 200 Kilodalton
OD	Optische Dichte

P	Primer
PBS	engl. phosphored buffered saline = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	engl. polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PBS	engl. Phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung
pH	lat. potentia hydrogenii = Stärke des Wasserstoffs, negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Protein
qPCR	engl. quantitative real-time PCR
rcf	engl. relative centrifugal force = Relative Zentrifugalkraft
RNA	engl. ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	engl. revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Sek	Sekunde
SYN	Synaptophysin
Taq	lat. thermus aquaticus
TBS(T)	engl. Tris-buffered saline (Tween®) = Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCR	engl. T-cell-receptor = T-Zellrezeptor
TCS	engl. tethered cord syndrome = Tethered Cord-Syndrom
TNF-a/α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TNF-1R1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

VIM

Vimentin

ZNS

Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Das Tethered Cord Syndrom (TCS) ist eine funktionelle Erkrankung, bei der das Rückenmark durch Fixierung seines kaudalen Endes in unelastischen Gewebsstrukturen in unphysiologischem Ausmaß gedehnt wird.

Das englische Wort „tether“ bedeutet hierbei sinngemäß übersetzt „anbinden“ (Verb) oder „Haltestrick“ (Substantiv). In der deutschsprachigen neurochirurgischen Literatur wird der Begriff als „angebundene Schnur“ übersetzt.

Der anatomische Begriff Tethered Cord (TC) subsumiert dabei unterschiedliche pathologische Formen der Anheftung des Rückenmarks, die nicht unbedingt symptomatisch werden und in ein TCS münden müssen.

Yamada und Wong unterteilten drei Kategorien des TCS (1):

- Kategorie 1 umfasst TCS, bei denen das kaudale Ende des Rückenmarks durch unelastische Strukturen am Spinalkanal fixiert ist (unelastisches Filum Terminale, kaudale Lipome oder Dysraphien wie Lipomeningozelen (LMMC) und Myelomeningozelen (MMC)). Dysraphien sind in einer fehlerhaften Neurulation während der frühen Embryonalentwicklung begründet und werden unterteilt in geschlossene (okkulte) Formen (u.a. Lipomyelomeningozelen, spinale Lipome, Fatty Filum, Diastematomyelie, kaudale Agenesie, Dysgenesie-Syndrome) und offene Formen (Myelomeningozele) (2).
- Kategorie 2 fasst TCS zusammen, bei denen Rückenmarkabschnitte aufgrund von ausgedehnten Dysraphien (ausgedehnte MMC, komplexe LMMC) oder postoperativen MMC, längerstreckig in fibrösen bzw. narbigen Geweben adhärent sind. Diese Kategorie kann in Bezug auf die postoperativen Formen auch als sekundäres TC betrachtet werden.
- Kategorie 3 subsumiert Patienten, die aufgrund einer thorakolumbalen MMC eine Paraplegie aufweisen und bei denen sowohl eine Harn- als auch eine Stuhlinkontinenz vorliegt. Die Pathologie beruht hierbei weniger auf einem Tethering als auf einem neuronalen Funktionsverlust im lumbosakralen Bereich des Rückenmarks.

Der Fokus der vorgelegten Arbeit lag auf TCS der Kategorie 2:

Infolge einer gestörten Anatomie des Rückenmarks und narbigen Veränderungen der spinalen Umgebung nach operativen Eingriffen beispielsweise geschlossener und offener Neuralrohrdefekte kann sich im weiteren Verlauf nach den Operationen ein TC und bei

entsprechender Symptomatik ein TCS entwickeln (3). Dieses sekundäre TCS stellt ein komplexes Problem nach der operativen Versorgung von Myelomeningozelen (MMC) dar.

Die Fixierung von Rückenmarkabschnitten im Spinalkanal kann zu typischen Symptomen führen und umfasst sowohl das Neuauftreten oder die Progredienz von motorischen Defiziten der unteren Extremität als auch sensible Defizite, Blasendysfunktionen und muskuloskelettale Deformitäten (4-6). Erhöhte Spannung und anomale Dehnung der jeweiligen angehefteten Rückenmarksegmente und neuralen Strukturen am Spinalkanal insbesondere während des Körperwachstums werden als Ursache für die Entwicklung eines TCS erachtet (7).

Die zugrunde liegenden Ursachen sind unterschiedlich und beinhalten hinsichtlich des nach MMC-Operationen auftretenden sekundären Tetherings beispielsweise Narbenbildung mit nachfolgenden Verwachsungen beziehungsweise Anheftungen der neuralen Strukturen im Operationsgebiet (d.h. im rekonstruierten Spinalkanal). Bemühungen bezüglich präventiver Maßnahmen zur Verhinderung der Entwicklung eines TCS nach Dysraphieoperationen sind aktuell vornehmlich chirurgischer Natur. So wird während der initialen MMC-Operation versucht, die anatomischen Verhältnisse so zu rekonstruieren, dass ein zukünftiges Anheften der betroffenen Rückenmarkabschnitte minimiert wird: Dieses betrifft zum einen die minutiöse Rekonstruktion der neuralen Plakode zu einem sekundär reneurulierten Rückenmark (d.h. Adaptation der Plakodenränder zu einem Rohr) und zum anderen die Rekonstruktion des Spinalkanals mit Anlegen einer ausreichend weiten Duraplastik, um einen entsprechend großen Raum zu schaffen, in dem die neuralen Strukturen im Liquor sozusagen „baden“ können und sich an keiner Stelle an den umliegenden Strukturen anheften können (8, 9).

Allerdings kann das Auftreten eines sekundären TC bzw. TCS auch nach Anwendung dieser Operationstechniken nicht bei allen Patienten verhindert werden. Daher ist anzunehmen, dass ein TCS nicht nur auf mechanische Probleme zurückzuführen ist, sondern eine multifaktorielle Genese vorliegt. Trotz der Entwicklung ausgefeilter Operationsmethoden gibt es keine operative Technik, die ein Anheften des Rückenmarks nach einer MMC-Operation verlässlich verhindern kann (6). Neben der Verbesserung der operativen Techniken ist es daher notwendig, weitere Faktoren wie z.B. zelluläre und molekulare Mechanismen zu untersuchen, die potenziell die Entwicklung eines klinisch relevanten TCS begünstigen und mittels adjuvanter Therapien beeinflusst werden können.

1.1 Epidemiologische Daten zum Tethered Cord Syndrom

Der Fokus der vorgelegten Arbeit lag auf dem sekundären TCS nach MMC-Deckung. Zwischen 10 und 30% der Patienten, die nach der Geburt aufgrund einer MMC operiert werden, entwickeln in ihrem weiteren klinischen Verlauf Symptome, die mit einem sekundären TC assoziiert sind (10-12). In einer weiteren aktuelleren Studie konnte gezeigt werden, dass von 502 Kindern nach MMC-Operation im Verlauf 114 Kinder (23%) Symptome entwickelten, die auf ein TC zurückzuführen werden konnten. 33 Kinder dieser Serie wurden in ihrem klinischen Verlauf mehrfach operiert, 81 Kinder wurden einmal operiert (11).

1.2 Diagnostik und klinische Symptomatik des Tethered Cord Syndroms

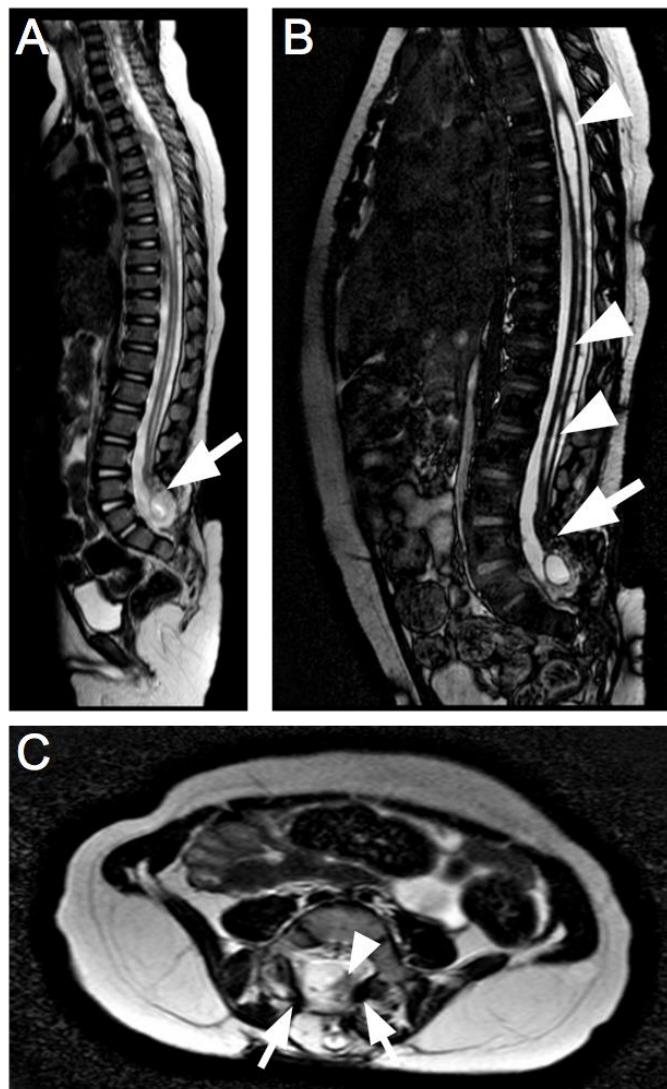
Ein TC, unabhängig davon ob primär oder sekundär, kann asymptomatisch bleiben oder im Verlauf zu klinisch relevanten Problematiken führen (Krankheitsbild TCS). Die Schwierigkeit kann dabei darin liegen, bei meist schon vorbestehenden Symptomen eine Verschlechterung zu objektivieren. Um keine schleichende Verschlechterung zu übersehen, müssen Patienten daher nach MMC-Deckung von unterschiedlichen medizinischen Disziplinen (u.a. Neurochirurgie, Urologie, Pädiatrie, Ophtalmologie) regelmäßig kontrolliert werden.

In Abhängigkeit des Alters der Patienten erfolgt bei den jeweiligen Kontrolluntersuchungen u.a. die Evaluation bezüglich neu aufgetretener Schmerzproblematiken, Dys- oder Hypästhesien, der Ermüdbarkeit beim Gehen und Laufen, dem Vorliegen einer Morgensteifigkeit, der Häufung von Harnwegsinfekten, Änderungen des Blasenmanagements und der Tonuserhöhung in den Extremitäten. Häufig zeigen sich die ersten Beschwerden während eines Wachstumsschubs.

In der klinisch-neurologischen Untersuchung liegt der Fokus insbesondere auf der Betrachtung einer eventuell vorhandenen Muskelschwäche, einer Muskelatrophie und/oder Sensibilitätsstörungen der unteren Extremitäten sowie radikulären Schmerzen, einer Tonuserhöhung (Entwicklung einer Spastik) und Gangstörungen. Aus orthopädischer Sicht stehen vor allem Deformitäten der Füße, Beinlängendifferenzen und die Entwicklung einer häufig assoziierten Skoliose im Vordergrund. Bezüglich der urologischen Pathologien geht es besonders um ein abnormales Miktionsmuster und rezidivierende Harnwegsinfekte. Einschränkungen der Blasenfunktion bzw. Verschlechterungen werden von den Eltern und später den Patienten dabei oft nicht selbst wahrgenommen. Regelmäßige Kontrollen der Blasenfunktion mittels urologischer Untersuchungen (z.B. Sonographie, Urodynamik, Zystomanometrie, Uroflow) sind daher essenziell.

Neben der klinischen Beurteilung werden ergänzend bildgebende Verfahren zur Kontrolle nach MMC-Operationen oder Diagnostik bei Verdacht auf ein klinisch relevantes Tethering angewandt. Dabei ist die Magnetresonanztomographie (MRT) Goldstandard. In MRT-Bildgebungen sieht man nach einer MMC-Rekonstruktion typischerweise immer einen tief stehenden Conus medullaris (Konustiefstand ist dabei definiert als unterhalb des zweiten Lendenwirbelkörpers endend) bzw. ein nach kaudal ziehendes Myelon (je nach Lokalisation des primären Neurulationsdefekts). Häufig erscheinen die neuralen Strukturen in dem rekonstruierten Spinalkanal bildmorphologisch fixiert. Entsprechend ausschlaggebend sind die klinischen Befunde, die immer mit der Bildgebung korreliert werden müssen. Bildmorphologische Hinweise auf ein mögliches klinisch relevantes TC sind gegebenenfalls der Nachweis einer neuen oder progredienten Syringomyelie (siehe Abbildung 1) (3). Wichtig hierbei ist es, andere Ursachen für bildmorphologisch neue Aspekte wie beispielsweise eine Verschlechterung eines bei MMC-Patienten in bis zu 80% der Fälle vorliegenden abgeleiteten Hydrozephalus, d.h. eine Shuntedysfunktion, mit assoziierten Pathologien im Bereich des kraniozervikalen Übergangs (Syringomyelien sind häufig auch mit einer Enge durch eine Chiari II-Malformation bedingt) nicht zu übersehen (13).

Die Operationsindikation eines TCS ergibt sich in der Zusammenschau der klinischen Symptomatik, der Ergebnisse der Funktionsdiagnostik, den Ergebnissen der bildgebenden Diagnostik und gegebenenfalls elektrophysiologischen Untersuchungen (14-16).

**Abbildung 1**

Die Abbildung zeigt sagittale und axiale T2-gewichtete Schichten einer Magnetresonanztomographie der spinalen Achse eines Patienten mit TCS nach Versorgung einer lumbalen MMC. In der sagittalen T2-Wichtung in (A) zeigt sich der tiefe Stand des Conus medullaris im lumbosakralen Übergangsbereich aufgrund des Tetherings des Rückenmarks in der Narbe bei Z.n. Versorgung einer spinalen Dysraphie (weißer Pfeil). (B) zeigt eine besonders dünnenschichtige Darstellung der spinalen Achse (T2-bffe-Sequenz (balance fast field echo)). Es zeigt sich eine langstreckige Syrinx im Bereich des thorakalen und lumbalen Rückenmarks (Pfeilköpfe). Des Weiteren zeigt sich die Anheftungsstelle im Bereich des dysraphischen Defektes (weißer Pfeil). (C) zeigt eine axiale Darstellung einer T2-gewichteten Sequenz des dysraphischen Defektes (Pfeile), der Plakodenbereich zeigt eine Anheftung an der dorsalen Wand des Spinalkanals (weißer Pfeilkopf).

1.3 Therapie des Tethered Cord Syndroms

Die Therapie eines TCS ist primär neurochirurgisch und besteht im operativen Lösen der angehefteten neuralen Strukturen aus den umgebenden pathologisch veränderten Strukturen (u.a. Narbengewebe), dem sogenannten „Untethering“, mit dem Ziel das Rückenmark von Verklebungen zu befreien und die Zugkraft auf funktionelles neuronales Gewebe zu verringern. Zur Prävention eines Wiederanheftens im Verlauf, d.h. eines Rezidivs, erfolgt zudem erneut eine Rekonstruktion der Rückenmarkshäute und, falls in der initialen MMC-Operation nicht erfolgt, Reneurulation der Rückenmarkplakode (s.u.).

Eine Indikation zur Operation besteht z.B. bei fortschreitenden oder neu aufgetretenen neurologischen Ausfällen, einer progradienten Skolioseentwicklung oder -zunahme, neuen Rücken- oder Beinschmerzen, der Entwicklung einer spastischen Tonuserhöhung und Verschlechterung der Blasenfunktion (verifiziert durch eine Änderung in den urologischen Funktionsdiagnostiken). Die Indikationsstellung basiert auf den in den multidisziplinären Untersuchungen erhobenen Befunden (s.o.). Leitlinien existieren nicht. Einigkeit besteht aber darin, dass der Nutzen einer Untethering-Operation (d.h. Reversibilität der potenziellen Schädigung) umso effektiver ist, je kürzer die Beschwerden der Betroffenen andauerten.

Bei der mikrochirurgischen Operation eines fixierten Rückenmarkabschnittes nach Versorgung einer offenen Dysraphie (MMC), wird zunächst die Narbe im voroperierten Bereich wiedereröffnet. Die einzelnen Schichten wie Subkutis, Muskelfasszie, Muskulatur und Wirbelbögen werden möglichst in den angrenzenden Höhen kranial und kaudal der zu operierenden Höhe dargestellt. In der Regel wird das letzte „intakte“ Wirbelsäulensegment (bzw. der Dornfortsatz plus Laminae) dargestellt. Davon ausgehend wird nach kaudal in den ehemaligen dysraphischen Defekt operiert. Besonders wichtig ist es, die verschiedenen Schichten ausgehend vom „intakten Gewebe“ sicher zu identifizieren. Nach Darstellen des in der Voroperation rekonstruierten Bereichs wird dann die Dura bzw. die ehemalige Duraplastik aus der Narbe herausgearbeitet und eröffnet, um den Plakodenbereich darstellen und lösen zu können. Die Feinpräparation der Plakode sowie der nach ventral verlaufenden Nerven kann sich dabei sehr mühsam gestalten und erfolgt unter neurophysiologischer Kontrolle. Dieser Bereich wird, falls in der Voroperation nicht erfolgt, möglichst neuruliert, d.h. die pialen Randbereiche der Plakode werden so adaptiert, dass ein Rohr mit glatter Oberfläche entsteht. Damit soll ein erneutes Anheften an die umgebenden Strukturen (Hirnhäute) vermieden werden. Um dieses Risiko weiter zu senken, kann eine Erweiterung der duralen Schicht durch das Einnähen einer Duraersatzplastik notwendig werden, wodurch der Raum um die Plakode

größer wird. Wie kurz erwähnt, sollte die Präparation am Rückenmarkgewebe stets unter intraoperativem neurophysiologischem Monitoring zur Identifizierung funktionaler Strukturen und Überwachung der vegetativen, motorischen und sensorischen Funktionen erfolgen.

1.4 Pathophysiologie des Tethered Cord Syndroms

Beim TC kommt es, wie oben ausgeführt, zu einer Fixierung des Rückenmarks an die es umgebenden Strukturen im Bereich des Wirbelkanals, was nicht unbedingt zu einer entsprechenden Symptomatik (s. Abschnitt 1.2) führen muss. Die Ursache für die mögliche klinisch resultierende Problematik des TCS ist bisher wenig erforscht. Allgemein wird das TCS als zuginduzierte funktionelle Störung des Rückenmarks verstanden: Ein zunehmender Verlust neurologischer Funktionen wird als Folge einer zunehmenden Traktionskraft auf das Rückenmark durch seine pathologische Fixierung mit eingeschränkter Bewegungsmöglichkeit im wachsenden Spinalkanal interpretiert (16).

In Bezug auf die pathophysiologischen Mechanismen konnte dabei die resultierende Hypoxie als ein Schlüsselindikator für ein klinisch relevantes Rückenmark-Tethering identifiziert werden (17). Die Distraktion des Rückenmarks führte in experimentellen Untersuchungen zu Durchblutungsstörungen mit ischämischen Veränderungen, die vor allem in der grauen Substanz auftraten (1, 17-20). Sowohl Kang et al. als auch Dolan et al. haben in ihren Studien die Veränderung des lokalen spinalen Blutflusses bei Rückenmarksdistraktion exemplarisch an Katzen untersucht (17, 19). Hierbei wurde festgestellt, dass spinale Distraktion zu ischämischen Zuständen im Bereich des Rückenmarks führt, die denen bei anderen Formen von Rückenmarkstraumata ähneln. Weiterhin wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ein Untethering vorgenommen und im Anschluss daran überprüft, ob die chirurgische Intervention einen positiven Einfluss auf die Oxygenierung des Gewebes nehmen konnte. Die Erholung des Gewebes nach dem operativen Eingriff war abhängig von dem Zeitraum, über den das Rückenmark der Ischämie ausgesetzt war – je kürzer die Durchblutungsstörungen mit folgenden ischämischen Veränderungen, desto positiver der Einfluss der Operation auf den Sauerstoffstoffwechsel. Zu dieser Schlussfolgerung kamen weitere Forscher, die ebenfalls zeigen konnten, dass der Grad der Beeinträchtigung des oxidativen Stoffwechsels einen prognostischen Wert für den neurologischen Fortschritt nach Untethering-Operationen inne hat (21, 22). Schneider et al. benutzten eine innovative Laser-Doppler-Durchflussmessung, um während der Untethering-Operation die Durchblutung zu überwachen. Es stellte sich heraus, dass bei sämtlichen Patienten die Flussrate durch die chirurgische Intervention verdoppelt

werden konnte und es postoperativ zu einer Verbesserung des neurologischen Status kam (21). Weitere Untersuchungen zu den Veränderungen den Stoffwechsel betreffend haben Yamada et al. durchgeführt und konnten nachweisen, dass das Tethered Cord Syndrom mit metabolischen Abnormalitäten auf dem Level von Cytochrome α , $\alpha 3$, die eine gestörte mitochondriale Funktion in beeinträchtigten neuronalen Zellen reflektieren, assoziiert ist (23). Neben den tierexperimentellen Studien an Katzen wurde von Kocak et al. ein Tiermodell mit Schweinen entwickelt, bei denen mittels Cyanoacrylat künstlich eine Fixierung des Filums erzeugt wurde (20). Als Folge des Tetherings konnten die Autoren eine defekte Weiterleitung in den motorischen und sensorischen Nervenzellen, reversible Veränderungen wie Ödeme und Destruktionen in den Verbindungen zwischen grauer und weißer Substanz, aber auch irreversible Veränderungen wie Narbenbildung im Bereich der Neurofilamente und Zerstörungen der Axone und des Myelins beobachten (20).

Weitere Hinweise auf neurale Schäden wurden kürzlich durch die klinischen Untersuchungen von Maurya et al. demonstriert, die die erhöhte Konzentration von Biomarkern für neuronale Schädigung (S100B) und gliale Aktivierung (GFAP) in Liquor von Patienten nach der Operation eines primären Tethered Cord Syndroms nachweisen konnten (24).

Diese Beobachtungen lassen die Hypothese zu, dass dem symptomatischen TC neben den rein mechanischen bzw. hypoxischen Mechanismen auch eine entzündliche Komponente zugrunde liegen könnte. Diesbezüglich lieferten auch Arbeiten zum spinalen Trauma und offenen Dysraphien aus dem hiesigen neurochirurgischen Forschungslabor Hinweise, dass weitere zelluläre und molekulare Kaskaden zum TCS beitragen könnten. Diese Ergebnisse, die die Grundlage für die Untersuchungen der vorgelegten Arbeit sind, werden im Folgenden kurz skizziert.

1.5 Entzündungsreaktionen als wichtiges Element sekundärer Schadenskaskaden nach einem spinalen Trauma und spinalen Dysraphien

Im neurochirurgischen Forschungslabor des UKSH, Campus Kiel wurde das Chemokine/Zytokine-Effektor-/Rezeptor-System als wichtiger Faktor neuroregenerativer und neurodegenerativer Prozesse nach einem spinalen Trauma und bei offenen Dysraphien identifiziert und näher erforscht (25). Bezüglich inflammatorischer Reaktionen nach einem Neurotrauma, ischämischen Läsionen oder neurodegenerativen Prozessen sind Zytokine und Chemokine aufgrund ihrer Multifunktionalität von besonderem Interesse, da sie in zelluläre

Prozesse involviert sind, die sie als potentielle Zielpunkte für innovative Therapiestrategien prädisponieren (26).

Zytokine stellen eine heterogene Gruppe von Polypeptiden dar (klassifiziert als Proteine, Peptide oder Glykoproteine), die von unterschiedlichsten Zelltypen sezerniert werden und klassischerweise als Aktivatoren des Immunsystems und Initiatoren der inflammatorischen zellulären Antwort identifiziert wurden (27). Die Signalkaskaden werden dabei über G-Protein gekoppelte Rezeptoren induziert. Im Sinne ihrer „traditionellen“ Rolle als Organisatoren des Immunsystems sind sie u.a. auch im ZNS für die Rekrutierung und Chemotaxie von Leukozyten in den Entzündungsherd von wesentlicher Bedeutung. Mittlerweile wurde darüber hinaus aber eine Vielzahl anderer Funktionsbereiche identifiziert, in die diese Botenstoffe als Signalmoleküle involviert sind: So haben Zytokine und Chemokine u.a. in Entwicklungsprozessen des ZNS wichtige regulatorische Funktionen; sie wurden als Mediatoren von neurodegenerativen Prozessen (Multiple Sklerose, M. Alzheimer) identifiziert, spielen in der Zell-Zell-Kommunikation eine Rolle und sind somit aufgrund ihrer Multifunktionalität unter physiologischen und pathologischen Bedingungen in Hinblick auf den Sekundärschaden nach Läsionen im ZNS besonders interessant (27). So wird z.B. das Interleukin-1beta (IL-1b) nach traumatischen kortikalen Läsionen stark in der Penumbra und darüber hinaus in gedächtnisassoziierten Gehirnarealen induziert und ist dabei mit weiteren sekundären Prozessen wie z.B. dem apoptotischen Zelluntergang assoziiert (28).

Durch die Arbeiten von Knerlich-Lukoschus et al. zur Erforschung der Rolle der Chemokine und ihrer Rezeptoren in der sekundären Schadenkaskade nach spinalen Läsionen konnte nachgewiesen werden, dass die C-C-Chemokine CCL2, CCL3, sowie das C-X-C-Chemokin SDF-1alpha und ihre Hauptrezeptoren früh nach thorakalen Rückenmarkskontusionsläsionen auf dem entsprechenden thorakalen spinalen Niveau induziert wurden. Daneben wurden auch die Zytokine IL-1beta und TNF-alpha immunhistochemisch früh auf Läsionsniveau induziert. Zelluläre Träger waren dabei inflammatorische und astrozytäre Zellen in unmittelbarer Läsionsnähe; im weiteren Verlauf nach dem initialen Trauma korrelierten die Expressionsstärken der gemessenen Chemokine-Immunreaktivitäten mit den motorischen Funktionseinschränkungen der Tiere (29).

Im weiteren Verlauf nach dem primären Trauma zeigten die untersuchten Chemokine jeweils charakteristische zeitliche, anatomische und zelluläre Expressionsmuster entlang der gesamten spinalen Achse. So waren diese in schmerzassoziierten Regionen (Hinterhörner, Hinterstränge) Läsionsstärke-abhängig und kolokalisiert mit Schmerzrezeptoren (u.a. TRPV-1) bis in den späten Zeitverlauf nach der Läsion nachweisbar. Die Expressionsstärken konnten dabei

signifikant mit dem Auftreten von neurophatischen Schmerzkorrelaten in den entsprechenden Verhaltenstests in Zusammenhang gebracht werden (29, 30). Darüber hinaus wurden die Chemokine/-Rezeptoren auch in Stammzellnischen des Rückenmarks induziert und waren hier mit Astrozyten- und Radialen Gliazellmarkern koexprimiert (31). Einen Einfluss der untersuchten Chemokine auf die astrozytäre Differenzierungstendenz von neuralen Stamm-/Vorläuferzellen konnte in anschließenden in-vitro Untersuchungen verifiziert werden (32). Im späteren posttraumatischen Verlauf wurden Chemokine und Zytokine über die spinale Ebene hinaus in diversen funktionell unterschiedlichen ZNS-Regionen auf erhöhtem Expressionsniveau nachweisbar (29).

Zusammengefasst wurden Chemokine und Zytokine entsprechend ihrer Multifunktionalität nach einer spinalen Läsion früh und langanhaltend im zentralen Nervensystem über das Läsionsniveau hinaus induziert. Dabei kann angenommen werden, dass diese Mediatoren in unterschiedliche Prozesse involviert sind, die den Spätkomplikationen nach einem Rückenmarkstrauma unterliegen (33).

Unter der Annahme, dass bei einem TCS durch mechanischen Stress ähnliche molekulare und zelluläre Prozesse induziert werden können wie durch eine spinale Läsion, sollte in der vorgelegten Arbeit untersucht werden, ob Entzündungsmediatoren wie Zytokine in entsprechenden Geweben nachweisbar waren. Diese Hypothese wurde weiter untermauert durch Untersuchungsergebnisse, die zum Sekundärschaden bei offenen Dysraphien, d.h. Myelomeningozelen, erarbeitet wurden (25). In diesen Studien konnte nachgewiesen werden, dass, ähnlich wie nach einem spinalen Trauma, auch in Plakodengeweben offener Dysraphien entzündliche zelluläre und molekulare Schadenskaskaden induziert werden: Histochemische Analysen zeigten, dass das Neuroepithel der untersuchten MMC-Gewebe stark gliotisch verändert war (signifikante GFAP- und Vimentinexpression im Vergleich zu Kontrollgeweben). In diesen Abschnitten waren dann auch spezifische Entzündungsmediatoren wie die Zytokine IL-1b sowie TNF-1alpha und deren Rezeptoren in astrozytären, neuronalen und mikroglialen Zellen auf erhöhtem Niveau im Vergleich zu den Kontrollgeweben (adultes und fetales Rückenmark) detektierbar (25).

Das Zytokin IL-1b spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung posttraumatischer inflammatorischer Prozesse im ZNS; so konnte beispielweise gezeigt werden, dass IL-1b über einen p38MAPK-Signalweg die Apoptose von Neuronen vermitteln kann (34).

Weiterhin kann IL-1b neuroprotektive Signalwege modulieren: IL-1b kann das neuroprotektive Glykoprotein-Hormon Erythropoetin über die Aktivierung von NFkB herunterregulieren und somit neuroregenerative Prozesse unterbinden (35). Das Zytokin TNF-1alpha besitzt wichtige

pro-apoptotische Eigenschaften, so konnte eine Reduktion von Apoptose in Neuronen und Oligodendroglia in einem Rückenmarkstraumamodell in Ratten nach Antagonisierung von TNF-1alpha gezeigt werden (36). Interessanterweise spielen die beiden pro-inflammatorischen Zytokine eine Rolle in der Regulation von hypoxiesensiblen Mediatoren. Für IL-1b und TNF1-alpha konnte zudem gezeigt werden, dass sie die Transkriptionsaktivität und die Akkumulation von HIF-1a steigern (37). Zusammenfassend ist das Zytokine-/Chemokine-/Effektor-/Rezeptor-System in zelluläre Prozesse des Rückenmarkgewebes nach traumatischer Rückenmarkschädigung und bei offenen Dysraphien involviert, die auch der Pathogenese der typischen TCS-assoziierten Langzeitkomplikationen zugrunde liegen und mögliche Ansätze neuer Therapieoptionen bieten könnten.

1.6 Zielsetzung

Nach der primären Versorgung einer Myelomeningozele (MMC) kann es im weiteren klinischen Verlauf des Patienten zu der Entwicklung eines Tethered Cord Syndroms (TCS) kommen. Letzteres entsteht durch sekundäres Verkleben von Rückenmarkstrukturen im Bereich des vormals vorhandenen und in der initialen Operation chirurgisch rekonstruierten dysraphischen Defekts (d.h. im Bereich der Plakode im rekonstruierten Spinalkanal). Wie in der Einleitung erörtert, geht man nach aktueller Studienlage davon aus, dass u.a. die Dehnung und Zugspannung des pathologisch fixierten Rückenmarks während des Körperwachstums bzw. des Wachstums des Spinalkanals, zu einer hypoxisch-ischämischen Stoffwechselleage führen können. Infolgedessen kann es potenziell zu einer sukzessiven Schädigung der nervalen Strukturen mit klinischer Manifestation eines TCS kommen.

Aufgrund unserer Vorarbeiten zu den zellulären Schädigungsmechanismen in humanem Plakodengewebe, durch die die Beteiligung bestimmter Botenstoffe nachgewiesen werden konnte und den bislang fehlenden Daten zu den Abläufen auf zellulärer Ebene, lag der Fokus dieser Dissertation auf der Erforschung von Mediatoren und zellulären Mechanismen im Bereich des Tetherings.

Daher sollte/sollten

1. die klinischen Daten der untersuchten Patienten bezüglich sensomotorischer Funktionen, vegetativer Funktionen, Fehlstellungen der unteren Extremitäten erhoben werden.
2. das während des Untetherings entnommene Gewebe durch immunhistochemische Färbungen mit strukturellen Antikörpern charakterisiert werden.
3. durch qualitative und semiquantitative immunhistochemische Analysen sowie PCR untersucht werden, ob und in welchem Maß ausgewählte proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α) und die durch Hypoxie induzierbaren Faktoren HIF-1 α und HIF-2 α im Bereich des Tetherings nachweisbar sind.
4. mit Doppelimmunfluoreszenzfärbungen die Zelltypen identifiziert werden, die zu untersuchenden proinflammatorischen und neuroprotektiven Zytokine sowie die Faktoren HIF-1 α und HIF-2 α exprimieren (Erstellen zellulärer Expressionsprofile).
5. zusätzlich durch immunhistochemische Färbungen untersucht werden, ob bestimmte Antikörper nachweisbar sind (z.B. Caspase und cleaved PARP), die am programmierten

Zelltod (Apoptose) beteiligt sind. Mittels gesonderter Methoden sollte die Darstellung der Zellkerne apoptotischer Zellen erfolgen (TUNEL-Methode).

Diese Untersuchungen sollten zu einem besseren Verständnis der Vorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene beim sekundären Tethering nach operativer Versorgung einer MMC beitragen und potentiell neue Ansatzpunkte für die Entwicklung innovativer Therapieoptionen, die das chirurgische Outcome optimieren könnten, herausarbeiten.

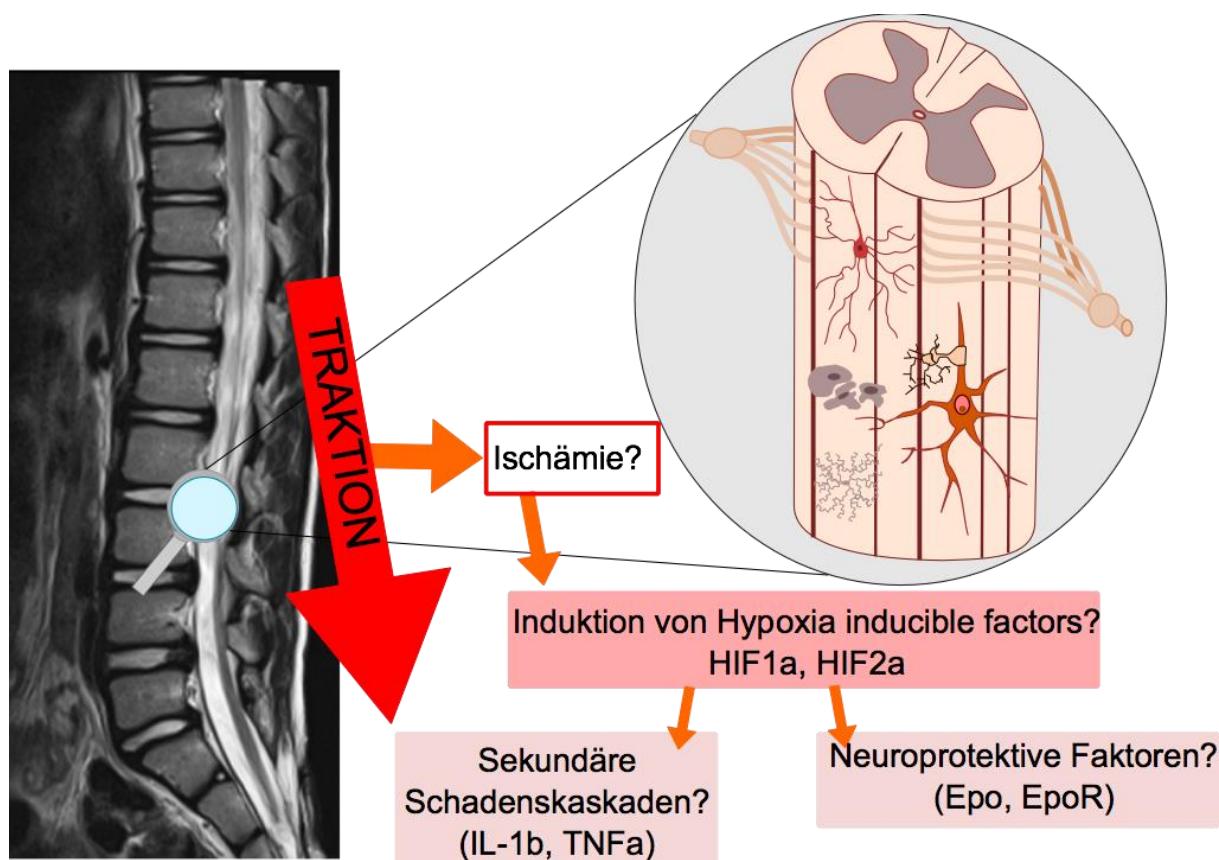


Abbildung 2

Schematische Darstellung der Fragestellung.

2 Material und Methoden

Es wurden zunächst 12 Gewebeblöcke, die Myelomeningozelenpatienten bei der operativen Versorgung eines sekundären Tethered Cord Syndroms entnommen wurden, aus dem neuropathologischen Repertoire der hiesigen Neurochirurgie von 2003 bis 2014 herausgefiltert, in denen sicher neurales Gewebe nachweisbar war.

Eine derartige Vorselektion war notwendig, da das Operationsregime in der neurochirurgischen Klinik des UKSH, Campus Kiel, beim Untethering vorsieht, möglichst viel Nervengewebe zu erhalten. Von den ausgewählten Fällen wurden 6 µm dicke Serienschnitte angefertigt, die dann zunächst mit etablierten strukturellen Markerantikörpern (Glial fibrillary acidic protein = GFAP, Synaptophysin = SYN, Vimentin = VIM, , Neurofilament 200kD= NF 200kD, Neuronal nuclei = NeuN, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase = CNPase, Cluster of differentiation 11b = CD11b, Cluster of differentiation = CD68) immunhistochemisch gefärbt und anschließend qualitativ sowie semiquantitativ ausgewertet wurden. Parallel wurden relevante klinische Daten erhoben und die individuellen klinischen Verläufe herausgearbeitet. Des Weiteren wurden die angefertigten Magnetresonanztomogramme ausgewertet und in der Zusammenschau mit der klinischen Symptomatik und den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen bewertet. Die immunhistochemischen Färbungen bezüglich der Zytokine Interleukin-1-beta, Tumornekrose-Faktor alpha und Erythropoetin sowie deren entsprechende Rezeptoren wurden für weitere qualitative und semiquantitative (densitometrische) Analysen etabliert. Weiterhin wurde die Immunreakтивität von Hypoxia-inducible factor 1/2-alpha im Zusammenhang mit der Erythropoetin-Expression untersucht. Je nach Befund wurden die Expressionsmuster der Zytokine durch entsprechende Mehrfachimmunfluoreszenzmarkierungen spezifischen Zelltypen zugeordnet. Zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen wurden molekularbiologische Analysen in Form von Polymerasekettenreaktionen durchgeführt, deren Ergebnisse abschließend mit den Ergebnissen der Färbungen korreliert wurden.

2.1 Entparaffinierung

Da es sich beim Tethered Cord Gewebe um humanes Gewebe handelt, das zur Haltbarmachung und späteren Bearbeitung in Paraffin eingebettet wurde, mussten die Schnitte vor den Färbungen entparaffiniert werden.

2.1.1 Ablauf der Entparaffinierung

Zunächst wurden die Paraffinschnitte in Xylol gewaschen (zweimal, je 5 Min). Anschließend wurden die Schnitte mit einer absteigenden Ethylalkoholreihe behandelt (zweimal 100 %, zweimal 96 %, je 2 Min). Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten in eine Methanol-H₂O₂ (30 %)-Mischung eingelegt. Es folgte die Fortsetzung der absteigenden Ethylalkoholreihe (zweimal 96 %, zweimal 70 %, je 2 Min). Nach zweimaligem Waschen in Aqua dest. (je 2 Min) wurden die Schnitte in einen mit Citratpuffer gefüllten Schnellkochtopf (Elo 99389 Praktika, Spabrücken, Deutschland) (Dampfstufe 2) gelegt und bei höchster Hitze für zwei Minuten gekocht. Abschließend wurden die Schnitte umgehend in eine mit Aqua dest. gefüllte Küvette umgebettet und für 20 Minuten stehen gelassen.

Tabelle 1

Bei der Entparaffinierung verwendete Pufferlösung

Pufferlösung:	Citratpuffer (pH 6,0) 9 ml Stammlösung A (Merck, Darmstadt, Deutschland): 0,1 M Zitronensäure (= 21,01 g C ₆ H ₈ O ₇ ·xH ₂ O in 1000 ml Aqua dest.) 41 ml Stammlösung B (Merck, Darmstadt, Deutschland): 0,1 M Natriumcitrat (= 29,41 g C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ ·2H ₂ O in 1000 ml Aqua dest.) gelöst in 450 ml Aqua dest.
---------------	---

2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Identifizierung der neuronalen Anteile der Plakoden und zur Erstellung der Gewebeatlanten zur späteren genaueren Charakterisierung des Tethered Cord-Gewebes durch die immunhistochemischen Färbungen wurden alle Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin, modifiziert nach McManus et al., gefärbt (38). Zusätzlich wurden gesunde Rückenmarkpräparate und entzündete Hirnschnitte nach demselben Protokoll gefärbt.

2.2.1 Ablauf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach der Entparaffinierung (siehe Abschnitt 2.1) wurden die Schnitte zunächst bei Raumtemperatur (RT) mit frischem depolymerisiertem Paraformaldehyd (4 %) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) fixiert (30 Min). Nach dem Waschen mit PBS (zweimal, je 10 Min) erfolgte die Kernfärbung in Hämatoxylin (5 Min) und ein kurzes

Eintauchen in ein Alkohol-Essigsäuregemisch. Dann wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser geblätzt (5 Min). Die Gegenfärbung wurde mit Eosin (0,1 %) gelöst in Aqua dest. vorgenommen (1 Min). Das überschüssige Eosin wurde mittels Aqua dest. (zweimal, je 2 Min) entfernt. Anschließend folgte die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe (zweimal 96 %, zweimal 100 %, je 2 Min). Zuletzt wurden die Schnitte in Xylol gewaschen (zweimal, je 5 Min), eingebettet (Eukitt ®, Merck) und mit den passenden Deckgläschen versehen.

Tabelle 2

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendete Puffer und Färbelösungen

Fixierlösung:	Paraformaldehyd (4 %) (Merck, Darmstadt, Deutschland) in PBS
Färbelösungen:	<p>Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland):</p> <p>1 g Hämatoxylin</p> <p>50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecyhydrat reinst</p> <p>0,2 g Kaliumjodat</p> <p>in 1000 ml Aqua dest. lösen</p> <p>5 ml 25 %-ige Salzsäure</p> <p>Eosin (Merck, Darmstadt, Deutschland):</p> <p>1 g Eosin</p> <p>in 1000 ml Aqua dest. lösen</p>
Pufferlösung:	<p>PBS (pH 7,4) (Merck, Darmstadt, Deutschland):</p> <p>137 mM NaCl</p> <p>2,7 mM KCl</p> <p>4,3 mM Na₂HPO₄ (Dinatriumhydrogenphosphat) x 7H₂O</p> <p>1,4 KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)</p> <p>gelöst in Aqua dest.</p>

2.3 Gewebeatlanten

Zur Differenzierung der unterschiedlichen Gewebetypen und zur Reproduzierbarkeit der Färbeergebnisse wurden die histologischen Schnitte, die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt worden waren, abgezeichnet, die verschiedenen Gewebetypen gekennzeichnet und besonders die neuronalen Bereiche hervorgehoben.

2.4 Immunhistochemie

Zum Nachweis der verschiedenen Gewebetypen innerhalb der Tethered Cord-Gewebe wurden immunhistochemische Färbungen mit kommerziell erhältlichen Antikörpern durchgeführt. Bei der Verwendung von Antikörpern einer bestimmten Spezies kann es zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Kreuzreaktionen mit Serumproteinen anderer Spezies kommen. Daher wird eine Präadsorption der Antikörper gegen bestimmte Serumproteine anderer Spezies vorgenommen, um die möglichen Kreuzreaktionen zu minimieren. Im Rahmen der Präadsorption gegen nahe verwandte Spezies kann die Epitoperkennung der Antikörper zum Teil stark reduziert sein. Daher wurden zunächst Kontrollfärbungen durchgeführt, um die Antikörper zu überprüfen. Für die Charakterisierung der histologischen Schnitte und zur Überprüfung der Zytokinexpression wurden Immunfärbungen nach der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode durchgeführt (39). Um die zelluläre Lokalisation der Zytokine darzustellen, schlossen sich daran Doppel- und Tripleimmunfluoreszenzfärbungen an. Als Zellmarker wurden bei den Färbungen monoklonale und polyklonale Antikörper gegen spezifische Zellstrukturproteine (siehe Tabelle 4 und 5) verwendet.

2.4.1 Ablauf der Avidin-Biotin-Peroxidase (DAB)-Färbung

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert (siehe Abschnitt 2.1) und mit frischem depolymerisiertem Paraformaldehyd (4 %) für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Darauf folgte zweimaliges Waschen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (je 1 Min) und der Transfer in eine mit TritonX-100 (0,3 %)- H₂O₂ (3 %)-Mischung gefüllte Küvette mit 30-minütiger Inkubation. Anschließend wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen (zweimal, je 10 Min). Danach wurden die Schnitte mit 10 %-igem Serum (je nach Ursprungstier der sekundären Antikörper) benetzt, wobei durch 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur die unspezifischen Bindungen blockiert wurden. Ohne erneutes Waschen wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper, der in TritonX-100 (0,3 %) und 2 %-igem Blockierungsserum verdünnt wurde, bei 4°C für 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst in PBS gewaschen (zweimal, je 10 Min) und dann mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (verdünnt 1:200 in PBS und 1,5 %-igem Blockierungsserum) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der 60 Minuten erfolgte das zweimalige Waschen in PBS (je 10 Min) und die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectorstain-Elite-ABC-Kit) für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte zweimalig in PBS gewaschen (je 10 Min) und mit der Diaminobenzidin-Färbelösung versehen

(40). Die DAB-Färbereaktion wurde nach 4 Minuten mit Leitungswasser gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun für 30-60 Sekunden. Um das Hämalaun von den Schnitten zu entfernen, wurden diese für 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Weiterhin wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe dehydriert (70 %, 80 %, 95 %, 100 %, je 1 Min) und in Xylol gewaschen (dreimal, je 10 Min). Abschließend wurden die Schnitte mit einem Eindeckmedium (Roti®-Mount) und den passenden Deckgläschern versehen.

2.4.2 Ablauf der Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte (siehe 2.1.1). Anschließend wurden die Schnitte in einer Aceton-Methanol (1:1-Mischung, -20°C) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und dreimalig in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween 20 (TBST) gewaschen (je 10 Min). Als nächstes wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe (20 %, 70 %, je 2 Min) dehydriert. Die Kontrastfärbung wurde mit Sudanschwarz (1 % in 70 %-igem Ethanol) für 10 Minuten vorgenommen. Darauf folgte die Rehydrierung durch das Schwenken in 70 %-igem Ethanol und die Einlage in 20 %-igem Ethanol für 2 Minuten. Danach wurden die Schnitte in TBST gewaschen (dreimal, je 10 Min). Die Blockierung erfolgte für 60-80 Minuten bei Raumtemperatur durch 0,1 % BSA-0,2 % Glycin verdünnt in TBS. Im Anschluss daran wurde der in TBST verdünnte primäre Primärantikörper auf die Schnitte getropft und diese für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach erfolgten sämtliche Arbeitsschritte im abgedunkelten Labor. Am zweiten Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal in TBST gewaschen (je 10 Min) und dann mit dem fluoreszierenden sekundären Primärantikörper verdünnt in TBST für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST (je 10 Min) wurde der in TBST verdünnte, primäre Sekundärantikörper aufgetropft und die Schnitte bei 4°C für 24 Stunden inkubiert. Der dritte Tag begann mit dem Waschen der Schnitte in TBST (dreimal, je 10 Min) und dem Markieren ebenjener mit dem in TBST verdünnten, fluoreszierenden sekundären Sekundärantikörper und der Inkubation für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurden die Schnitte erst in TBST (einmal 10 Min) und dann in TBS gewaschen (zweimal, je 10 Min). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI verdünnt in TBS (1:30000) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die abschließende Waschung wurde mit TBS durchgeführt (dreimal, je 10 Min). Vor dem Einbetten in das entsprechende Medium (Immomount) und der Abdeckung mit den passenden Deckgläschern wurden die Schnitte in Aqua dest. geschwenkt.

2.4.3 Ablauf der Tripleimmunfluoreszenzfärbung

Zuerst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte (siehe 2.1.1). Anschließend wurden die Schnitte in einer Aceton-Methanol (1:1-Mischung; -20°C) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und dreimalig in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween 20 (TBST) gewaschen (je 10 Min). Als nächstes wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe (20 %, 70 %, je 2 Min) dehydriert. Die Kontrastfärbung wurde mit Sudanschwarz (1 % in 70 %-igem Ethanol) für 10 Minuten vorgenommen. Darauf folgte die Rehydrierung durch das Schwenken in 70 %-igem Ethanol und die Einlage in 20 %-igem Ethanol für 2 Minuten. Danach wurden die Schnitte in TBST gewaschen (dreimal, je 10 Min). Die Blockierung erfolgte für 60-80 Minuten bei Raumtemperatur durch 0,1 % BSA-0,2 % Glycin verdünnt in TBS. Im Anschluss daran wurden der in TBST verdünnte primäre Primärantikörper und der primäre Sekundärantikörper auf die Schnitte getropft und diese für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach erfolgten sämtliche Arbeitsschritte im abgedunkelten Labor. Am zweiten Tag wurden die Schnitte zuerst dreimal in TBST gewaschen (je 10 Min) und dann mit dem fluoreszierenden sekundären Primärantikörper und sekundären Sekundärantikörper verdünnt in TBST für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST (je 10 Min) wurde das entsprechende Fab-Fragment in TBST verdünnt aufgetragen und bei Raumtemperatur für eine Stunde belassen. Danach wurden die Schnitte erneut in TBST gewaschen (dreimal, je 10 Min). Anschließend wurde der in TBST verdünnte, primäre Tertiärantikörper aufgetropft und die Schnitte bei 4°C für 24 Stunden inkubiert. Der dritte Tag begann mit dem Waschen der Schnitte in TBS (dreimal, je 10 Min) und dem Markieren ebenjener mit dem in TBS verdünnten, fluoreszierenden sekundären Tertiärantikörper und der Inkubation für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurden die Schnitte erst in TBS (einmal 10 Min) und dann in TBS gewaschen (zweimal, je 10 Min). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI verdünnt in TBS (1:30000) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die abschließende Waschung wurde mit TBS durchgeführt (dreimal, je 10 Min). Vor dem Einbetten in das entsprechende Medium (Immomount) und der Abdeckung mit den passenden Deckgläschen wurden die Schnitte in Aqua dest. geschwenkt.

Tabelle 3*Bei den immunhistochemischen Färbungen verwendete Puffer und Reagenzien*

Pufferlösungen:	<p>PBS (pH 7,4) (Merck, Darmstadt, Deutschland):</p> <p>137 mM NaCl</p> <p>2,7 mM KCl</p> <p>4,3mM Na₂HPO₄ (Dinatriumhydrogenphosphat) x 7H₂O 1,4 KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)</p> <p>gelöst in Aqua dest.</p> <p>TBS (Tris-Buffered-Saline) (= Tris-gepufferte Kochsalzlösung; TRIS= Tris-hydroxymethyl-aminomethan C₄H₁₁NO₃) (pH 7,4)</p> <p>gelöst in Aqua dest.</p>
Reagenzien:	<p>Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)</p> <p>AEC Substrate-Chromogen (3-Amino-9-Ethylcarbazol) (Dako, Hamburg, Deutschland):</p> <p>1 AEC Tablette gelöst in 2,5 ml Dimethylforinamid und 47,5 ml Acetatpuffer; zur Anwendung 2 ml Farblösung mit 1µl 30 %-igem H₂O₂ aktivieren</p> <p>Färbelösung Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland)</p> <p>Einbettungsmedium Aquatex® (Merck, Darmstadt, Deutschland)</p> <p>Paraformaldehyd (4 %) (Merck, Darmstadt, Deutschland)</p> <p>Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)</p> <p>TritonX-100 (Merck, Darmstadt, Deutschland)</p> <p>ABC-Komplex: Vectastain-Elite-ABC-Kit (Vector, Burlingame, CA, USA)</p> <p>Diaminobenzidin (Merck, Darmstadt, Deutschland)</p> <p>Einbettungsmedium Roti®-Mount (Roth, Karlsruhe, Deutschland)</p> <p>Aceton-Methanol-Gemisch (1:1, -20°C) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)</p> <p>Färbelösung Sudanschwarz (Merck, Darmstadt, Deutschland)</p> <p>0,1 % BSA, 0,2 % Glycin gelöst in TBS (Merck, Darmstadt, Deutschland)</p> <p>Färbelösung DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol) (Merck, Darmstadt, Deutschland)</p> <p>Einbettungsmedium Immomount (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland)</p>

Tabelle 4*Monoklonale Antikörper*

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Quelle
CD3 Rabbit IgG	Intrazytoplasmatischer Anteil CD3 in T-Zellen	1:300	NeoMarkers, Fremont, USA
CD11b Mouse IgG	Mikroglia, Makrophagen	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
CNPase Mouse IgG	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; Oligodendrozyten	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
GFAP Rabbit Anti-Cow	Astrozyten (Glial Fibrillary Acidic Protein)	1:200	Dako, Hamburg, Deutschland
NeuN Mouse IgG	Neuronen (Neuronal Nuclei)	1:500	Merck, Darmstadt, Deutschland
NF 200 kD Mouse IgG	Neurofilament	1:10000	Chemicon International, Hofheim am Taunus, Deutschland
cPARP	Cleaved poly-ADP-ribose polymerase	1:200	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
SYN Rabbit IgG	Neuroendokrine Zellen (Synaptophysin)	1:100	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
TNF α Goat IgG	Tumornekrosefaktor alpha	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
TNFR Goat IgG	Tumornekrosefaktor-Rezeptor	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

VIM Mouse IgG	Mesenchymale Zellen (Vimentin, Intermediärfilament)	1:200	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
------------------	---	-------	--

Tabelle 5*Polyklonale Antikörper*

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Quelle
CD68 (ED1) Rabbit IgG	Makrophagen, Monozyten	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Epo Goat IgG	Erythropoetin in humanem Gewebe	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
EpoR Rabbit IgG	Erythropoetin-Rezeptor in humanem Gewebe	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
GFAP Rabbit IgG	Astrozyten (Glial Fibrillary Acidic Protein)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
HIF-1 alpha Rabbit IgG	Hypoxia-inducible-factor 1 alpha	1:100	Novusbio, Littleton, USA
HIF-2 alpha Rabbit IgG	Hypoxia-inducible-factor 2 alpha	1:100	Novusbio, Littleton, USA
IL-1β Rabbit IgG	Interleukin-1β	1:100	Endogen, Rockford, IL, USA
IL-1RI Rabbit IgG	Interleukin-1-Rezeptor-I	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

2.4.4 TUNEL-Färbung und Auswertung

Die TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbung wurde genutzt, um DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen sichtbar zu machen. Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und rehydriert. Anschließend wurden sie in Zitratpuffer gekocht und in ein Gemisch aus TritonX-100 und Wasserstoffperoxid eingelegt. Nicht-spezifische Färbungen wurden durch die Inkubation der Schnitte mit einer Mischung aus 3%-igem Rinderserumalbumin sowie TRIS-gepufferter Kochsalzlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur reduziert. Im Anschluss daran wurde die TUNEL-Lösung appliziert und die Schnitte wurden für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen der Schnitte wurde Konverter-Peroxidase aufgebracht, woraufhin es zu einer weiteren Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei 37°C kam. Die Visualisierung des Vorgangs wurde durch die Zugabe von DAB-Substrat realisiert. Zuletzt wurden die Schnitte in ein entsprechendes Medium eingebettet. Negativkontrollen erfolgten durch die fehlende Zugabe der TUNEL-Lösung, was keine spezifische Färbung zur Folge hatte. Die Auswertung wurde durch zwei Personen mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axiovert 200, Zeiss) vorgenommen, wobei die Anzahl der vorhandenen apoptotischen Zelltode durch das Auszählen von positiven Zellen in bestimmten Arealen auf den Schnitten (5x5 mm) erfolgte.

Tabelle 6

Bei der TUNEL-Färbung verwendete Puffer und Reagenzien

Pufferlösungen:	Citratpuffer (pH 6,0) 9 ml Stammlösung A (Merck, Darmstadt, Deutschland): 0,1 M Zitronensäure (= 21,01 g C6H8O7xH2O in 1000 ml Aqua dest.) 41 ml Stammlösung B (Merck, Darmstadt, Deutschland): 0,1 M Natriumcitrat (= 29,41 g C6H5O7Na3x2H2O in 1000 ml Aqua dest.) gelöst in 450 ml Aqua dest. TBS (Tris-Buffered-Saline) (= Tris-gepufferte Kochsalzlösung; TRIS= Tris-hydroxymethyl-aminomethan C4H11NO3) (pH 7,4) gelöst in Aqua dest.
-----------------	---

Reagenzien:	Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland) TritonX-100 (Merck, Darmstadt, Deutschland) TUNEL-Lösung (terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) Diaminobenzidin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) Einbettungsmedium Roti®-Mount (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
-------------	---

2.4.5 Spezifität der verwendeten Antikörper

GFAP ist ein Protein, das im ZNS als Hauptbestandteil der zytoplasmatischen Intermediärfilamente von Gliazellen, insbesondere Astrozyten, vorkommt (41). Daher kann GFAP als Marker für Astrozyten verwendet werden. Zusätzlich kommt GFAP in Stammzellen und Ependymzellen im ZNS und in einigen Zelltypen außerhalb des ZNS vor (z.B. Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem). Normalerweise wird GFAP als Biomarker in der Hirntumor-Diagnostik verwendet, um gliale Tumore zu identifizieren (z.B. Glioblastom, Astrozytom) (42, 43). Ferner kann einer verringerten GFAP-Konzentration eine akute Infektion des Nervensystems oder eine neurodegenerative Erkrankung zugrunde liegen.

Vimentin ist ein Protein, das wie GFAP zu den Intermediärfilamenten gehört. Es kommt in verschiedenen mesenchymalen Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, Lymphozyten, etc.) vor, aber auch in anderen Zelltypen, wie beispielsweise Epithelzellen (44). Neben seiner physiologischen Funktion als Bestandteil des Zytoskeletts spielt Vimentin eine Rolle in entdifferenzierten Karzinomen. Hier zeigt sich meistens eine Koexpression mit Zytokeratinen (z.B. Nierenzellkarzinom). Des Weiteren wurde von vielen Autoren die Koexpression von Vimentin und GFAP in Gliomen beschrieben (45-47).

Bei Synaptophysin handelt es sich um ein integrales Membranprotein, das vor allem in präsynaptischen Vesikeln im ZNS und in der Netzhaut, aber auch in Vesikeln im Nebennierenmark und an den motorischen Endplatten vorkommt (48). In der Klinik wird Synaptophysin als Tumormarker für neuroendokrine Tumore verwendet (z.B. Medulloblastom). Des Weiteren dient dieses Protein in der Pathologie dazu, Zellen zu identifizieren, die an der synaptischen Signalweiterleitung beteiligt sind (49, 50).

NeuN ist ein neuronenspezifisches Kernprotein, das in nahezu allen neuronalen Zelltypen im Nervensystem exprimiert wird, also auch in Purkinje-Zellen des Kleinhirns, olfaktorischen

Zellen und Retinazellen. Es eignet sich sowohl für die immunhistochemische Charakterisierung von embryonalem als auch adultem Gewebe, da NeuN bereits auftritt, wenn die neuronalen Zellen gebildet und ihrer terminalen Bestimmung zugeführt werden. NeuN wurde außerdem in embryonalen Tumorzellen gefunden (51).

Neurofilamente gehören zu den Intermediärfilamenten und bilden zusammen mit den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli das Zytoskelett von Nervenzellen (52). Sie sind somit maßgeblich an dem strukturellen Aufbau der Nervenzellen beteiligt. Die Neurofilamente werden je nach ihrem Molekulargewicht in drei Gruppen unterteilt (light=NF-L, medium=NF-M, heavy=NF-H), wobei das in dieser Arbeit verwendete Neurofilament mit 200 kD zu den NF-H gehört.

CNPase ist ein Enzym, das vorrangig im Myelin von Oligodendrozyten im ZNS und zu einem wesentlich geringeren Anteil in Schwannzellen im peripheren Nervensystem nachgewiesen wurde (40). Daher eignet sich der Markerantikörper CNPase zur Darstellung von Oligodendrozyten.

CD11b und CD68 sind Proteinkomplexe aus der Gruppe der Cluster-of-differentiation-Komplexe, die in Mikroglia (Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen) nachweisbar und an phagozytotischen und apoptotischen Prozessen beteiligt sind (53, 54).

Bei CD3 handelt es sich ebenfalls um einen Proteinkomplex aus der Gruppe der Cluster-of-differentiation-Komplexe, der zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor (T-cell-receptor=TCR) einen Komplex bildet, der T-Zellen aktiviert, die an der inflammatorischen Reaktion beteiligt sind (55).

Cleaved PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerase) ist ein Enzym, das an der DNA-Reparatur beteiligt ist. Der PARP-Gehalt einer Zelle kann laut der aktuellen Studienlage mit dem Zelluntergang korreliert werden. PARP ist entscheidend an der Modulierung der zellulären Antwort auf Stress beteiligt. Unter mildem und moderatem Stress wird Einfluss auf die Transkription und infolgedessen auf proinflammatorische Vorgänge genommen. Sollte die Zelle schwerem Stress nach akutem neuronalem Trauma unterliegen, kommt es zu einer Überaktivierung von PARP, was wiederum den neuronalen nekrotischen und apoptotischen Zelltod zur Folge hat (56-58).

Tabelle 7*Immunglobuline, sekundäre Antikörper, Seren, Fab-Fragmente*

Immunglobuline	<ul style="list-style-type: none"> Hasenimmunglobulin-G IgG (abcam, Cambridge, UK)
Sekundäre Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> Antiserum des Pferdes gegen biotinyliertes Maus-IgG (Vector, Burlingame, CA, USA) Verdünnung 1:200 Antiserum des Hasen gegen biotinyliertes Ziegen-IgG (Vector, Burlingame, CA, USA) Verdünnung 1:200 Antiserum der Ziege gegen biotinyliertes Hasen-IgG (Vector, Burlingame, CA, USA) Verdünnung 1:200 Antiserum des Affen gegen Hasen-IgG (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 555 Antiserum des Affen gegen Ziegen-IgG (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 555 Antiserum des Affen gegen Maus-IgG (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 488 Antiserum des Affen gegen Hasen-IgG (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 488
Seren	<ul style="list-style-type: none"> Normales Ziegenserum (Jackson Immuno Research, Newmarket, UK) Normales Pferdeserum (Jackson Immuno Research, Newmarket, UK) Normales Hasenserum (Jackson Immuno Research, Newmarket, UK)
Fab-Fragmente	<ul style="list-style-type: none"> Affini Pure Fab Fragment des Affen gegen Hasen-IgG (Jackson Immuno Research, Newmarket, UK) Affini Pure Fab Fragment des Affen gegen Maus-IgG (Jackson Immuno Research, Newmarket, UK)

2.5 Mikroskopie und qualitative Auswertung

Die Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 200, Zeiss) und einem Fluoreszenzmikroskop mit ApoTome (Observer.Z1, Zeiss; ApoTome.2, Power Supply, Zeiss; Ebq 100 Isolated, Kübler) beurteilt und mit den Programmen AxioVision Rel.4.8 und ZEN pro 2012 fotografisch festgehalten (AxioCam MRC5 und MRm, Zeiss). Die qualitativen Auswertungen erfolgten anhand der Fotos (Formate tif, ziv).

Die Beurteilung, ob eine Färbung der Bereiche vorlag, bezog sich dabei grundsätzlich nur auf die Areale der Schnitte, die zuvor durch eingehende Beurteilung der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen als Rückenmarkgewebe identifiziert werden konnten.

2.6 Densitometrie

Mit Hilfe der densitometrischen Messungen wurden die Schnitte semiquantitativ beurteilt. Hierbei wird die Farbdichte der Fotos (Formate tif, ziv), die von den Schnitten angefertigt wurden, mit einem speziellen Computerprogramm (ImageJ) gemessen und in Form eines Diagramms mit den Expressionsstärken der jeweils untersuchten Zytokine korreliert. Auf diese Weise kann man anhand der Diagramme das Expressionsniveau der verschiedenen Fälle untereinander und das der Kontrollschnitte von gesunden Rückenmarkpräparaten miteinander vergleichen.

2.7 Molekularbiologische Analysen

Zur Gewinnung von RNA wurde aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe RNA extrahiert und cDNA synthetisiert. Diese wurde mittels Real-time Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) auf das Vorliegen der inflammatorischen, neuroprotektiven und ischämischen Mediatoren in Tethered Cord-Geweben untersucht.

2.7.1 RNA-Isolation aus formalin-fixiertem paraffin-eingebettetem (FFPE-) Gewebe

Die IL-1b-, IL-1R1-, EPO- und EPO-R-mRNA-Mengen in den Plakoden ($n = 6$), in den adulten Kontrollgeweben ($n = 4$) und den fetalen Kontrollgeweben ($n = 4$) wurden mittels Real-time RT-PCR gemessen. Hierfür wurden TaqMan Primer-Sonden verwendet. Die RNA der einzelnen Proben wurde aus jeweils zehn 5 µm dicken Paraffinschnitten mit Hilfe des High Pure FFPE RNA Isolations-Kits isoliert. Die Plakoden und das Rückenmarkgewebe der Kontrollen wurden von den Schnitten geschabt. Zu dem präparierten Gewebe wurden 800 µl Xylene und 400 µl Ethanol hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen und Spintervallen wurde der

Überstand abgelassen und 1 ml Ethanol hinzugefügt. Anschließend wurde nach erneuten kurzen Vortexintervallen der Überstand entfernt. Die so erhaltenen Gewebepellets wurden bei 55°C getrocknet (10 Min). Vor einer 30-minütigen Inkubation bei 85°C und 600 Umdrehungen pro Minute wurden 100 µl RNA Lysis Buffer, 16 µl SDS and 40 µl Proteinase K hinzugegeben. Danach wurden die Proben auf unter 55°C heruntergekühlt und mit 80 µl Proteinase K vermischt und für 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden 325 µl RNA Binding Buffer und 325 µl reines Ethanol hinzugefügt. Nachdem das Lysat auf einem Filterrohr platziert wurde, wurden die Proben zentrifugiert (30 Sek 6000 rpm und 2 Min 16000 rpm) und anschließend mit 100 µl DNase Working Solution vermischt. Die Inkubation auf dem Filterpapier erfolgte bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Nach zweimaligem Waschen und Zentrifugation bei 6000 rpm (zweimal 20 Sek) und bei 16000 rpm (2 Min) wurde die RNA mit 20 µl RNA Elution Buffer herausgelöst. Zuletzt wurde erneut bei 6000 rpm zentrifugiert (1 Min).

2.7.2 Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung

Um äquivalente Mengen an RNA im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu verwenden, wurde der RNA-Gehalt der Proben gemessen.

Das Nanodrop 2000c Spectrophotometer® (Thermo Scientific, Wilmington, USA) wurde benutzt, um die RNA in den Extraktionsproben zu messen und mögliche Kontaminationsquellen zu identifizieren. Nach Eichen des Spektrometers mit 2 µl Aqua dest. wurden 2 µl des Eluats zugegeben und gemessen.

2.7.3 DNA-Verdau und Herstellung von cDNA

In der Real-Time PCR wird nur c-(copy)DNA oder DNA detektiert. Daher musste die aus den Paraffinschnitten gewonnene Gesamt-RNA durch Reverse Transkription in cDNA überführt werden. Dies erfolgte mittels RevertAidTM H Minus Reverse Transkriptase.

Vor der Herstellung der cDNA erfolgte ein DNA-Verdau zur Eliminierung genomischer DNA, da diese sonst im Rahmen der PCR eine Fehlerquelle darstellen würde. Da beide Arbeitsschritte im Gradienten-Cycler durchgeführt wurden und einander angeschlossen waren, werden sie im Folgenden auch im direkten Übergang abgehandelt.

→ Reinigung der Gesamt-RNA von genomischer DNA:

Zur Herstellung identischer Konzentrationen aller Proben und Erreichen des für diesen Arbeitsschritt geforderten Mengenverhältnisses wurden Verdünnungen von 2 µg RNA ad 7 µl

Aqua dest. angefertigt. Im Falle der mit High Pure FFPE RNA Isolation Kit gewonnenen RNA musste das dafür einzusetzende RNA-Volumen (x) zunächst aus den ermittelten Konzentrationen der Proben (RNA) berechnet werden ($2 \text{ } \mu\text{g}/\text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = x [\mu\text{l}]$).

Der RNA-Probe wurde ein MasterMix beigelegt, zusammengesetzt aus je 1 μl DNase-Puffer (10x) sowie 1 μl DNase (1 u/ μl). Daraufhin erfolgte eine Inkubation von 15 Minuten bei 37°C und im Anschluss die Zugabe von jeweils 1 μl EDTA (20 mM,), um den Verdauungsprozess zu stoppen. Bei 65°C erfolgte eine weitere Inkubation für 10 Minuten.

→ Herstellung von cDNA (reverse Transkription):

Den Proben wurden daraufhin jeweils 2 μl Random Hexamer-Primer-Gemisch (Verdünnung 1:10) hinzugefügt. Dieses Gemisch bestand aus willkürlich ausgewählten kurzen Oligonukleotidsequenzen, die über die gesamte Länge der RNA unspezifisch binden und somit der Reversen Transkription als Startpunkt dienen. Es erfolgte eine Inkubation bei 70°C (5 Min, Schmelzen der RNA-Sekundärstrukturen). Dann wurden die Proben auf Eis gekühlt (2 Min). Nach kurzer Zentrifugation der Proben bei 10.000 rcf wurden jeweils 8 μl Mastermix hinzugefügt. Es folgten nacheinander Inkubationen bei 25°C (10 Min, Annealing), bei 42°C (60 Min, Elongation) und bei 70°C (10 Min, Denaturierung der Reversen Transkriptase), um die Reaktion zu beenden. Erneut wurden die Proben zum Abkühlen auf Eis gelegt. Die Proben wurden unverdünnt weiterverwendet. Diese durch Reverse Transkription hergestellte cDNA konnte nun im Weiteren als Template für die PCR dienen.

Tabelle 8

Ansatz zur Herstellung von cDNA

Volumen	Reagenz
4 μl	Reaktionspuffer (5x)
2 μl	dNTP- Mix (10 mM)
1 μl	ddH ₂ O
1 μl	Reverse Transkriptase

2.7.4 Target Assay-Mix

Zur Vervielfältigung spezifischer c-DNA-Sequenzen im Rahmen der Real-Time Polymerase-Kettenreaktion mittels TaqMan-Methode kamen Target Assays zum Einsatz. Diese enthalten spezifische Primer und Sonden.

Die Sequenzen der aus 15-30 Basen bestehenden Primer müssen jeweils so gewählt werden, dass sie komplementär zu Zielsequenzen der zu vervielfachenden DNA sind.

Folgende Primer wurden verwendet (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): Epo (Hs01071097_m1), EpoR (Hs00959427_m1), GAPDH (Hs99999905_m1), IL-1beta (Hs01555410_m1) und IL-1R1 (Hs00991010_m1).

2.7.5 Qualitative Real-Time PCR (qPCR)

Nach Isolation der RNA aus dem Paraffinmaterial, photometrischer RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung sowie dem genomischen DNA-Verdau und der Reversen Transkription waren die Voraussetzungen zur Untersuchung der Proben mittels quantitativer Real-Time PCR erfüllt. Die quantitative Real-Time PCR ist eine sensitive, reproduzierbare und spezifische Methode, mit der die Expression eines Gens nachweisbar ist. Im Unterschied zur konventionellen PCR ermöglicht die Real-Time-Methode eine Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte und ihre Visualisierung. Die Quantifizierung und Visualisierung werden dabei mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen umgesetzt, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden. Da die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt, lassen sich über die Fluoreszenzzunahme direkte Rückschlüsse auf die Zunahme der PCR-Amplifikate ziehen. Zur Auswertung wird die logarithmisch-lineare Phase des Fluoreszenz-Anstiegs verwendet. Hier werden optimale Reaktionsbedingungen angenommen. So liefert jeder einzelne Zyklus bereits Informationen für die quantitative Auswertung. Die hier verwendete Methode basierte auf dem TaqMan-Prinzip und wurde mittels eines „Quantstudio® 5 Single Color Real-time PCR detection system“ (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific, USA), einer Kombination aus Thermocycler und Fluoreszenzoptik, durchgeführt. Das System ermöglicht die Amplifikation und die simultane Messung der Fluoreszenzzunahme und damit den Nachweis des PCR-Produktes. Die Quantifizierung der PCR-Amplifikate wurde durch softwaregestützte Berechnung des Fluoreszenzschwellenzyklus, auch Cycle of Threshold oder CT-Wert genannt, angegeben. Dieser Wert beschreibt die Zykluszahl, bei der die Reporterfluoreszenz einen festgelegten

Schwellenwert überschreitet. Je höher der CT-Wert einer Probe ausfällt, desto geringer ist der Gehalt an mRNA der untersuchten Zielsequenz.

Um die TaqMan-Methode durchführen zu können, muss dem Ansatz der PCR zusätzlich zu den für die Amplifikation erforderlichen spezifischen Primern eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugegeben werden, die an die zu amplifizierende cDNA bindet. Diese TaqMan-Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert ist, der die Extension dieses Endes während der PCR vermeiden soll.

Wird die intakte TaqMan-Sonde durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz angeregt, kommt es durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher zur Unterdrückung des Reporter-Farbstoffes.

Zunächst hybridisiert die Sonde während der PCR mit den Primern an den Matrizenstrang. Sie wird jedoch im Rahmen der Extensionsphase durch Aktivierung der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der TaqMan-Polymerase hydrolysiert. Dieser Prozess führt zu einer Aufhebung der räumlichen Nähe von Reporter und Quencher und damit des FET. Somit steigt entsprechend der Akkumulation der PCR-Amplifikate die Fluoreszenz des Reporters mit jedem Zyklus der PCR. Da nicht-hybridisierte freie Sonden keine Spaltung erfahren, ist das entstehende Fluoreszenz-Signal sequenzspezifisch und zu jedem Zeitpunkt proportional zur Konzentration der amplifizierten Zielsequenz.

Um einen besseren Vergleich der CT-Werte der Proben ermöglichen zu können, wurde zusätzlich zu den spezifischen Primern auch jeweils der Gehalt des Haushaltsgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) in einem eigenen Ansatz untersucht.

Dieses Haushaltsgen soll als nicht reguliertes Gen unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden und dient daher als interner Standard. Jede Primer-mischung, die verwendet wurde, wurde durch eine Negativkontrolle überprüft. Das heißt, es wurde lediglich der Primer-mix ohne Zugabe von cDNA in ein Well gegeben. Diese Negativkontrollen sollten bei regelrechter Arbeitsweise keine PCR-Amplifikate aufweisen. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Durchführung der PCR:

Auf jede 96-Well-Platte wurden nun zunächst jeweils 2 µl cDNA (100 ng) pro Well als Doppelbestimmung vorgelegt. Es folgte die Zugabe von jeweils 18 µl eines Primer-spezifischen Reaktionsansatzes. Daraus resultierte ein Gesamtvolume von 20 µl pro Well.

Alle cDNA-Proben wurden jeweils auf den Gehalt der folgenden Primer untersucht: GAPDH, Epo, Epo-R, IL-1b, IL-1R1. Für jeden Primer erfolgte, wie zuvor bereits beschrieben, eine Negativkontrolle. In die hierfür vorgesehenen Wells wurde daher ausschließlich der jeweilige Primer-spezifische Reaktionsansatz ohne cDNA pipettiert. Für die Untersuchung von GAPDH fand zusätzlich eine Positivkontrolle statt, um den internen Standard zu validieren. Schließlich wurden die Platten mit einer optischen Folie verschlossen, zur Analyse in das „Quantstudio® 5 Single Color Real-time PCR detection system“ eingelegt und das Programm am hierfür vorgesehenen Laptop gestartet.

Tabelle 9

Ansatz für TaqMan-PCR

Volumen	Reagenz
10 µl	TaqMan Universal Master Mix
7 µl	ddH2O
1 µl	Target Assay Mix

Tabelle 10

Real-Time PCR-Programm

Zyklus	Wiederholungen	Zeit	Temperatur	Prozessbeschreibung
1	-	10 Min	95°C	Polymeraseaktivierung
2	50	15 Sek	95°C	Denaturierung
3	-	1 Min	60°C	Annealing und Kettenverlängerung

Tabelle 11*Gebrauchsfertige Reagenziensysteme und zugehörige Bezugsquellen*

Reagenziensysteme	Hersteller
(Die genaue Zusammensetzung der Reagenziensysteme wird durch den Hersteller geschützt und kann daher im Folgenden nicht weiter angegeben werden)	
DNAse (Konzentration.: 1U/ μ l) DNAse-Puffer (10x), DNAse Stop	Promega, Madison, WI, USA
dNTP Mix 10mM, 1ml	Thermo Scientific, Waltham, USA
RevertAidTM H Minus Reverse Transkriptase, Reaktionspuffer (5x) (Konzentration: 200 U/ μ l)	Thermo Scientific, Waltham, USA
TaqMan®-Universal PCR Master Mix	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
High Pure FFPE RNA Isolation Kit -RNA Tissue Lysis Buffer -Proteinase K, PCR grade -RNA Binding Buffer -Wash Buffer I -Wash Buffer II -DNase I -DNase Incubation Buffer (1x) -RNA Elution Buffer -Reagent Preparation Buffer -High Pure Filter Tubes -Collection Tubes	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland Roche Life Sciences

2.7.6 Relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte

Wie bereits zuvor erwähnt, sollten die ermittelten Genexpressionswerte aller Marker nicht nur rein quantitativ erfasst, sondern zusätzlich in Relation zu der GAPDH-Expression der gleichen Probe gesetzt werden. Dieses Vorgehen ermöglichte schließlich den Vergleich zwischen den relativen Genexpressionen im MMC-Gewebe und den Kontrollgeweben. Die relative

Quantifizierung erfolgte über die Ermittlung der sogenannten ΔCT -Werte, deren Berechnung folgende Formel zugrundeliegt:

$$\Delta\text{CT p} = (\text{1CT p} + 2\text{CT p}) / 2 - (\text{1CT GAPDH} + 2\text{CT GAPDH}) / 2$$

Dabei steht CT p für die erforderlichen Threshold-Zyklen der jeweiligen Primer-Ansätze und CT GAPDH dementsprechend für die Threshold-Zyklen des GAPDH-Ansatzes, die zur Überschreitung des festgelegten Schwellenwertes führen. Die Zahlen 1 und 2 stellen die Doppelbestimmungen der jeweiligen Probe dar, aus denen somit jeweils der Mittelwert gebildet wurde. Der Mittelwert des CT -Wertes von GAPDH wurde jeweils von den Mittelwerten der anderen Primer-Ansätze subtrahiert, um schließlich den $\Delta\text{CT p}$ -Wert des jeweiligen Primer-Ansatzes zu erhalten.

Da sich der ΔCT -Wert umgekehrt proportional zur Fluoreszenzzunahme der Probe verhält, steht er in diesem Verhältnis auch zu den PCR-Amplifikaten. Zur weiteren Auswertung der PCR-Ergebnisse wurde im Rahmen der Stimulationen der n-fache Unterschied der Genexpression zwischen den unterschiedlich stimulierten Zellen nach folgender Formel ermittelt: n-facher Unterschied $p = 2^{-\Delta\text{CT MMC}} / 2^{-\Delta\text{CT Kontrolle}}$.

Der n-fache Unterschied p , der für jeden Marker (P , Primer-Ansatz) in allen Stimulation-versuchen berechnet wurde, stellt also die n-fache Über- oder Unterexpression der untersuchten Zytokine dar. Es wird das Verhältnis der ΔCT - Werte von MMC ($\Delta\text{CT MMC}$) zu den Kontrollen ($\Delta\text{CT Kontrolle}$) gebildet.

Tabelle 12

Geräte, Verbrauchsmaterialien und dazugehörige Bezugsquellen

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Autoklav (Lösungen)	Goessner, Hamburg, Deutschland
Autoklav (S2 Abfall)	Syntec, Hamburg, Deutschland
Brutschrank, Heracell 240	Hereaus GmbH, Langenselbold, Deutschland
Digitalkamera, AxioCam MRm	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Einmalpipette (10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eismaschine: AF-10	Scotsman, Glasgow, Schottland
Eppendorfgefäß	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Gefrierschrank	National Lab GmbH, Mölln, Deutschland
Gefrierschrank	Sanyo, Moriguchi, Japan
Gefrierschrank	Kryotec, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	National Lab GmbH, Mölln, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Messzylinder	Duran/Schott-Glas, Mainz, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
optische Folie	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PCR-Detektionssystem, iQ5TM Multi Color real-time PCR Detection System + Laptop und iCycler Optical System Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
pH- Meter: WTW, pH 526	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexer, REAX top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waage EW600-2M	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Waage CP224S-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge, Biofuge pico	Hereaus GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifuge, 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.8 Statistik und Signifikanzniveau

Sämtliche statistischen Auswertungen wurden mit Excel® (Version 2010) durchgeführt. Hierbei wurde mit dem in Excel implementierten Student'schen t-Test (zweiseitig) auf Signifikanz getestet. Das Signifikanzniveau wurde dabei wie folgt gewählt: Signifikant bei p kleiner gleich 0,05, gekennzeichnet mit Sternchen/Dreieck (*); hoch signifikant bei p kleiner gleich 0,01, gekennzeichnet mit zwei Sternchen/Dreiecken (**); höchst signifikant bei p kleiner gleich 0,001, gekennzeichnet mit drei Sternchen/Dreiecken (***)�.

Die Korrelation der klinischen Daten wurde mit IBM SPSS Statistics 22 vorgenommen. Als Korrelationskoeffizient diente der Pearson-Korrelationskoeffizient.

2.9 Klinische Daten und MRT-Befunde

Zur Beurteilung der klinischen Relevanz der experimentellen Ergebnisse wurden die klinischen Daten der Patienten erfasst. Hierbei ging es um das Patientenalter bei der Tethered Cord-Operation, das Geschlecht, die Motorfunktion und vegetative Funktionen (Blasen- und Mastdarmfunktion). Weiterhin wurden die Magnetresonanztomogramme bezüglich der Syrinxausdehnung und der Konusposition evaluiert.

Die klinischen Daten wurden mit Hilfe des klinikinternen digitalen Archivs der Klinik für Neurochirurgie, des Archivs der Kinderklinik und des neurochirurgischen Archivs des UKSH, Campus Kiel, erhoben.

2.10 Ethische Anforderungen

Es wurde ausschließlich Material untersucht, das ohnehin bei der indizierten Operation des Tetherings gewonnen wurde. Es wurde kein Gewebe nur für diese Studie entnommen. Die Patienten bzw. die Erziehungsberechtigten wurden entsprechend der gesetzlichen Vorgaben über die geplanten Untersuchungen aufgeklärt. Das positive Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät Kiel liegt vor (siehe 7.1).

3 Ergebnisse

Es fanden histologische Untersuchungen von Gewebeproben statt, die während der Myelolyse-Operation (=Untethering) von Patienten, die nach MMC-Deckung im Säuglingsalter ein sekundäres Tethered Cord-Syndrom entwickelten, gewonnen wurden. Die Untethering-Operationen wurden an der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, von 2003-2014 durchgeführt und das entnommene Gewebe im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums archiviert. Aus der neuropathologischen Datenbank des Pathologischen Instituts wurden Gewebeproben von TCS-Patienten mittels Evaluation entsprechender Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitte selektiert, bei denen ausreichend neuroepithiales Gewebe für die geplanten Untersuchungen vorhanden war. Auf diese Weise konnten Gewebeproben von 12 Patienten für diese Studie selektiert werden.

3.1 Klinische Daten

Die klinischen Daten der in die Untersuchungen eingeschlossenen Patienten wurden retrospektiv mittels elektronischer Datenbank des UKSH ermittelt. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden mit einer Myelomeningozele geboren, die innerhalb von 72 Stunden nach der Geburt operativ gedeckt wurde. Hierbei wurden schrittweise das Neuralrohr, die Dura und der Spinalkanal rekonstruiert und im Anschluss daran die Haut schichtweise plastisch verschlossen. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten entwickelten im weiteren Verlauf Zeichen eines klinisch relevanten Tethered Cord-Syndroms. Die klinischen Charakteristika wie Geschlecht, Alter bei der Untethering-Operation, die anatomische Lage der direkt nach der Geburt operativ versorgten Myelomeningozele, die motorische Funktion, das Vorhandensein von Bein- und/oder Rückenschmerzen, das Vorliegen einer Blasen- und Mastdarmstörung wurden retrospektiv erhoben (siehe Tabelle 13).

Weiterhin wurden die präoperativ angefertigten MRT-Bildgebungen in Hinblick auf das Vorhandensein einer Syrinx, deren maximalen Durchmesser und Ausdehnung im Rückenmark, sowie die Position des Konus im Bezug zur Lendenwirbelsäule reevaluiert (siehe Tabelle 14). Unter den zwölf untersuchten Patienten befanden sich drei männliche Tethered Cord-Patienten (männlich n = 3; weiblich n = 9). Lediglich ein Patient wurde bereits im ersten Lebensjahr an einem klinisch relevanten sekundären TCS operiert (5 Monate).

Fünf der Patienten waren bei der Operation maximal drei Jahre alt (16 Monate; 19 Monate; 2 Jahre; 3 Jahre n = 2). Die übrigen Operationen fanden zwischen dem siebten und 46. Lebensjahr

statt (7 Jahre n = 1; 8 Jahre n = 1; 11 Jahre n = 1; 12 Jahre n = 1; 21 Jahre n = 1; 46 Jahre n = 1).

Die nach der Geburt versorgten Neuralrohrdefekte befanden sich auf der Höhe zwischen dem thorakalen und lumbosakralen Rückenmark, wobei es sich in den meisten Fällen um lumbale Myelomeningozelen handelte (lumbal n = 5; lumbosakral n = 4; thorakolumbal n = 3).

Bei der Hälfte der Patienten bestand eine Paraplegie, die bei vier der Patienten bereits vorbekannt war (n = 6). Bei weiteren drei Patienten zeigte sich eine vorbekannte Parese, wobei bei einem der drei Patienten ein sensorisches Defizit der unteren Extremitäten vorlag. Zunehmende Deformitäten der unteren Extremitäten wurden bei zwei Patienten festgestellt.

Rücken- oder Beinschmerzen wurden bei drei Patienten dokumentiert (ggf. lückenhafte klinische Dokumentation bei den anderen Patienten). Bis auf einen Patienten präsentierte alle eine Blasen- und Mastdarmstörung (n = 11), die bei zwei der Patienten massiv progredient war. Bezuglich der bildmorphologischen Gegebenheiten wurde bei vier Patienten eine Syrinx beschrieben. Diese hatten einen maximalen Durchmesser zwischen 3 und 6 Millimetern (3 mm n = 1; 4 mm n = 1; 5 mm n = 1; 6 mm n = 1) und ein Ausmaß über 3 bis 7 vertebrale Segmente (3 Segmente n = 1; 4 Segmente n = 2; 7 Segmente n = 1). Die auf den MRT-Bildgebungen sichtbaren Konuspositionen variierten in Bezug zur Wirbelsäule zwischen dem ersten und fünften Lendenwirbelkörper (L1 n = 1; L2 n = 2; L3 n = 1; L3/4 n = 1; L4 n = 2; L4/5 n = 3; L5 n = 2).

Tabelle 13

Klinische und bildmorphologische Charakteristika der TCS-Patienten.

w = weiblich; m = männlich; Mo = Monate; J = Jahre; L = lumbal; LS = lumbosakral; T = thorakal; TL = thorakolumbal; UE = untere Extremität; PP = Paraplegie

Fall	Geschlecht	Alter bei OP	MMC	Motorische Funktion	Rücken-schmerz	Bein-schmerz	Blasen- und Mastdarm-störung
1	m	19 Mo	LS	Zunehmende Deformität UE	-	-	Progredienz
2	m	5 Mo	LS	Zunehmende Deformität UE	-	-	Progredienz
3	w	46 J	LS	Vorbekannte Parese	-	ja	ja
4	w	7 J	LS	Beinschmerzen	-	ja	ja
5	m	8 J	L	Vorbekannte Parese	-	-	ja
6	w	3 J	L	PP (vorbekannt), zunehmende Spastik	-	-	ja
7	w	12 J	TL	PP (vorbekannt)	-	-	ja
8	w	11 J	L	PP (vorbekannt)	-	-	ja
9	w	3 J	TL	Zunehmende PP	-	-	ja
10	w	2 J	L	PP	-	-	ja
11	w	16 Mo	TL	PP (vorbekannt)	-	-	ja
12	w	21 J	L	Sensorisches Defizit UE, vorbekannte Parese	ja	-	normal

Tabelle 14

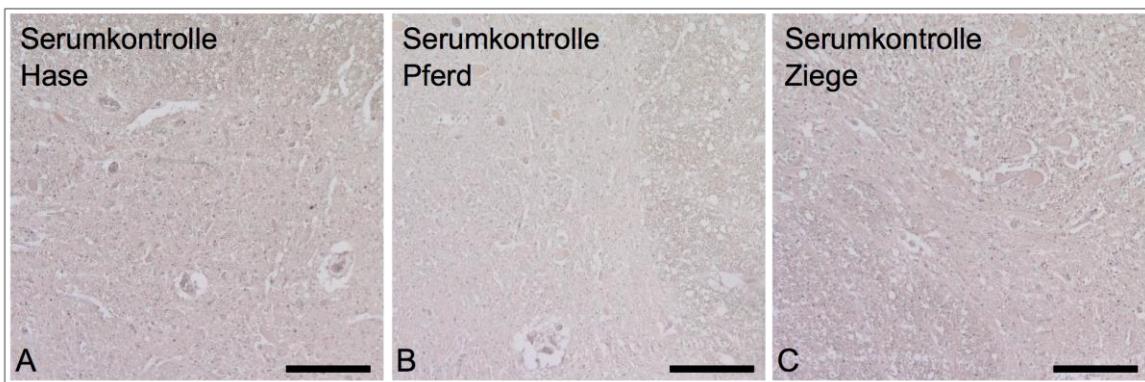
Bildmorphologische Charakteristika der TCS-Patienten.

mm = Millimeter, L = auf Höhe des entsprechenden Lendenwirbelkörpers

Fall	Syrinx	Maximaler Syrinx-durchmesser (in mm)	Syrinxausmaß (Vertebrale segmente)	Konusposition
1	ja	6	4	L3/4
2	ja	4	4	L4/5
3	-	-	-	L5
4	-	-	-	L1
5	-	-	-	L4
6	-	-	-	L4/5
7	-	-	-	L2
8	-	-	-	L2
9	ja	5	3	L5
10	-	-	-	L4
11	ja	3	7	L3
12	-	-	-	L4/5

3.2 Vorarbeiten zur Immunhistochemie

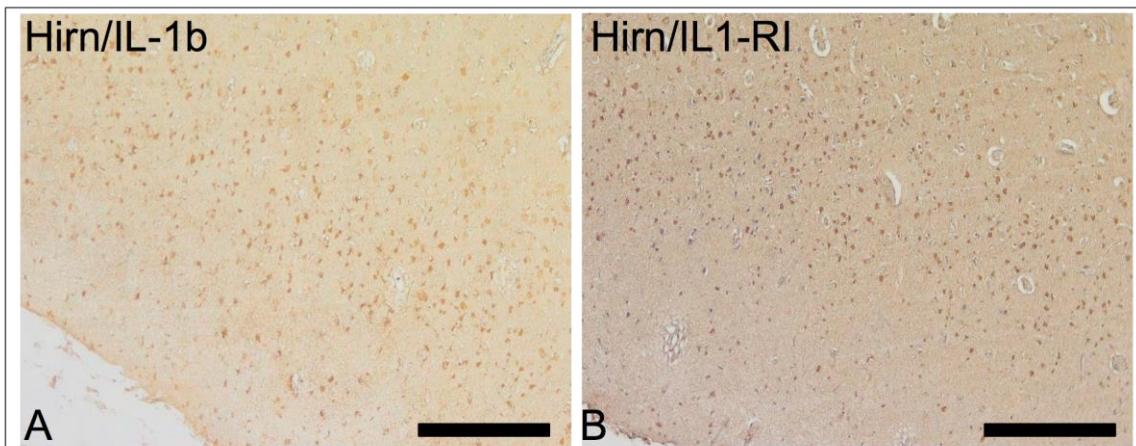
Vor der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen mit den Standardmarkern und den Zytokinen wurden zunächst Kontrolluntersuchungen bezüglich der Spezifität der verwendeten Antikörper sowie zur Definition des Färbehintergrundes durchgeführt. Die Abbildung 3 zeigt die Serumkontrollen für die verwendeten Seren von Hase, Pferd und Ziege auf dem adulten Rückenmarkkontrollgewebe.

**Abbildung 3**

Aufnahmen nach Diaminobenzidin-Färbungen der Kontrollgewebe (adultes Rückenmark). a) Serumkontrolle Hase (10x Vergrößerung) b) Serumkontrolle Pferd (10x Vergrößerung) c) Serumkontrolle Ziege (10x Vergrößerung)

Maßstab 100µm.

Um die proinflammatorischen Antikörper zu etablieren, wurden die Antikörper gegen Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor zunächst auf anonymisiertem sicher entzündlich verändertem adulten Hirngewebe getestet (siehe Abbildung 4). Hierbei zeigte sich sowohl bei der Färbung mit einem Antikörper gegen Interleukin-1-beta als auch bei seinem Rezeptor eine deutliche Färbung.

**Abbildung 4**

Aufnahmen nach Diaminobenzidin-Färbungen des anonymisierten adulten entzündeten Hirngewebes mit einem Antikörper gegen

- a) Interleukin-1-beta (10x Vergrößerung)*
- b) Interleukin-1-R (10x Vergrößerung)*

Maßstab 100µm.

3.3 Analyse der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und Expressionsmuster verschiedener Gewebemarker (GFAP, VIM, NeuN, NF 200kD, CNPase, Synaptophysin, CD3, CD11b, CD68)

In dieser Arbeit wurden die folgenden Standardmarker verwendet: Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin (VIM), Neuronal Nuclei (NeuN), Neurofilament (NF 200kD), CNPase, Synaptophysin (SYN) sowie CD3, CD11b und CD68. Bei der Auswertung der gefärbten Schnitte wurde ein Plus für eine detektierbare Färbung und ein Minus für eine nicht vorhandene Färbung vergeben.

Die Erarbeitung der Expressionsmuster der genannten Gewebemarker diente dazu, das untersuchte Gewebe zu charakterisieren bzw. dessen Zusammensetzung (Gewebearten und nachweisbare Zelltypen) darzustellen.

Bezüglich der Färbungen mit einem Antikörper, der sich gegen GFAP richtete, konnte festgestellt werden, dass sämtliche TCS-Gewebeproben der 12 Patienten und auch die Rückenmarkkontrollgewebe eine konsistente Färbung aufwiesen (siehe Tabelle 15). Somit wurde demonstriert, dass die untersuchten Gewebe gliales Gewebe enthielten beziehungsweise Astrozyten detektierbar waren. In den Geweben, die während der Myelolyse gewonnen wurden, wiesen diese Zellen morphologische Zeichen eines aktivierte Zustands im Sinne einer Gliose auf.

Die Färbungen mit Antikörpern gegen Vimentin, das wie GFAP zu den Intermediärfilamenten gehört, ergaben ebenfalls in allen Patientenproben sowie den Kontrollgeweben eine konsistente Färbung, die in den TC-Geweben intensiver erschien, was densitometrisch verifiziert werden konnte (siehe Abbildung 6).

Zusätzlich wurden diverse neuronale Marker, nämlich Neuronal Nuclei, Neurofilament 200kD, CNPase und Synaptophysin verwendet. In allen TCS-Gewebeproben und in den Kontrollgeweben zeigten sich Immunreaktivitäten der genannten Marker. In Bezug auf die angefärbten zellulären Strukturen, wurden NeuN im Bereich der Zellkerne und NF 200kD vor allem im Bereich der Zellsomata nachweisbar (siehe Abbildung 5).

Weiterhin wurden Antikörper verwendet, die sich gegen Proteinkomplexe von Mikroglia richten. Hierbei wurde bezüglich CD11b in 10 der TCS-Proben eine konsistente Färbung sichtbar. Zwei Patienten-Gewebeproben sowie die Rückenmarkkontrollgewebe wiesen keine Färbung auf. Bezüglich CD68 zeigten sich Immunreaktivitäten in allen untersuchten TCS-Gewebeproben, allerdings konnte keine Färbung der Kontrollgewebe detektiert werden.

Zur Identifizierung inflammatorischer Bereiche wurde zudem der T-Zellmarker CD3 verwendet. Wie im Fall der Färbungen mit Antikörpern gegen CD11b wurden Immunreaktivitäten in zehn der untersuchten TCS-Gewebeproben sichtbar. Die zwei übrigen Patienten-Gewebeproben sowie die Kontrollgewebe wiesen keine Färbung auf. Insgesamt konnten also in über 80% der Fälle moderate bis ausgeprägte Entzündungsreaktionen beschrieben werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sämtliche untersuchte TCS-Gewebeproben ausgeprägte gliotische Veränderungen aufwiesen (Färbungen mit Antikörpern gegen GFAP und Vimentin). Außerdem wurden die neuronalen Marker deutlich nachweisbar, sodass die weiteren Untersuchungen durchführbar waren. In über 80% der Fälle wurden entzündliche Veränderungen detektiert (CD3). Die Kontrollgewebe wiesen keine Immunreaktivität der inflammatorischen Marker auf. Außerdem kam es bei den Kontrollen zwar zu Färbungen mit den Antikörpern gegen GFAP und Vimentin, doch die Zellen zeigten sich nicht in einem aktivierten Zustand.

Tabelle 15

Immunreaktivitäten der phänotypischen Marker in TCS-Geweben und adulten Rückenmark-Kontrollgeweben.

+ = detektierbar, - = nicht detektierbar; GFAP = glial fibrillary acidic protein, saures Gliafaserprotein; VIM = Vimentin; NeuN = Neuronal Nuclei; NF 200kD = 200 kDa Neurofilament; SYN = Synaptophysin; CNPase = 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; CD3 = cluster of differentiation 3; CD11b/Integrin = Cluster of differentiation 11b; CD68/ED1 = cluster of differentiation 68; RM = Rückenmark.

Fall	GFAP	VIM	NeuN	NF200kD	CNPase	SYN	CD3	CD11b	CD68
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	-	-	+
12	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Kontrolle	+	+	+	+	+	+	-	-	-

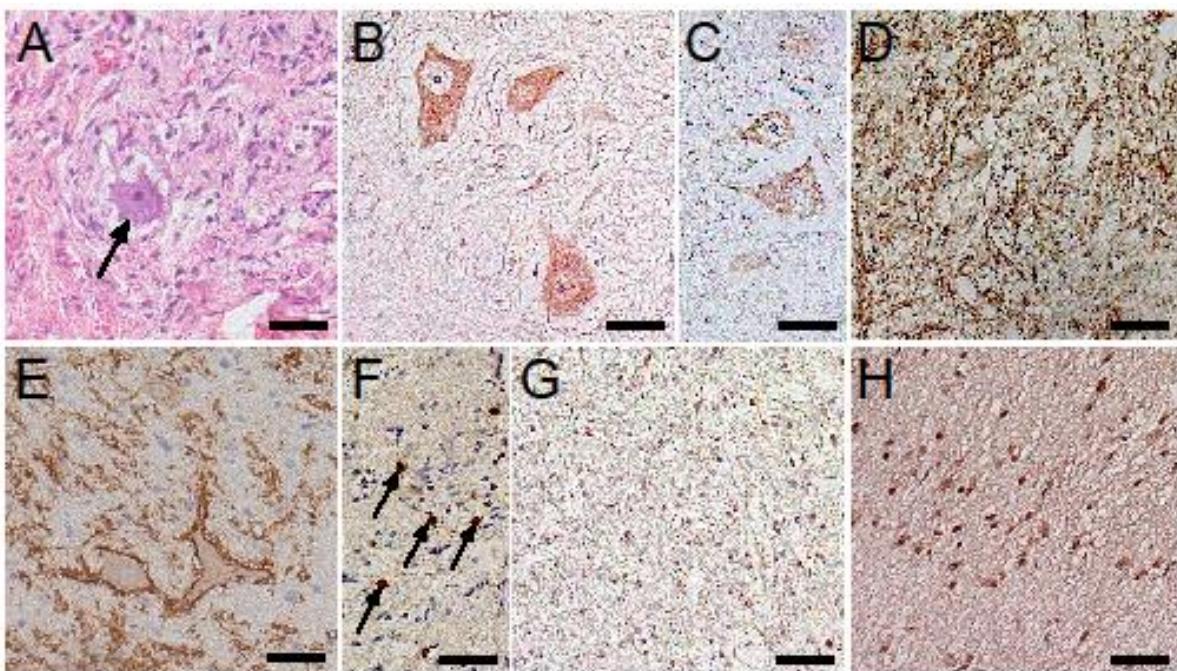


Abbildung 5

Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen bestimmte Gewebemarker in neuroepithelialem TCS-Gewebe. (A) Bei den Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurden unter anderem Zellen mit morphologischen Eigenschaften von neuronalen Zellen sichtbar (Pfeil). Außerdem werden exemplarisch die Ergebnisse der Färbungen mit neuronalen Markern – NeuN (B) und Neurofilament (C) gezeigt. Zellen, die positiv für den Oligodendrozytenmarker CNPase waren, wurden ebenfalls im Bereich des Neuroepithels sichtbar (D). Die Färbungen mit einem Antikörper gegen Synaptophysin ergaben eindeutige Färbungen im Bereich der Randstrukturen neuronaler Elemente in den neuroepithelialen Bereichen (E). (F) zeigt CD3-positive inflammatorische Zellen (Pfeile). Die übrigen beiden Abbildungen stellen CD11b- (G) und CD68-positive mikrogliale Zellen in den neuroepithelialen Strukturen der TCS-Gewebeproben dar (H).

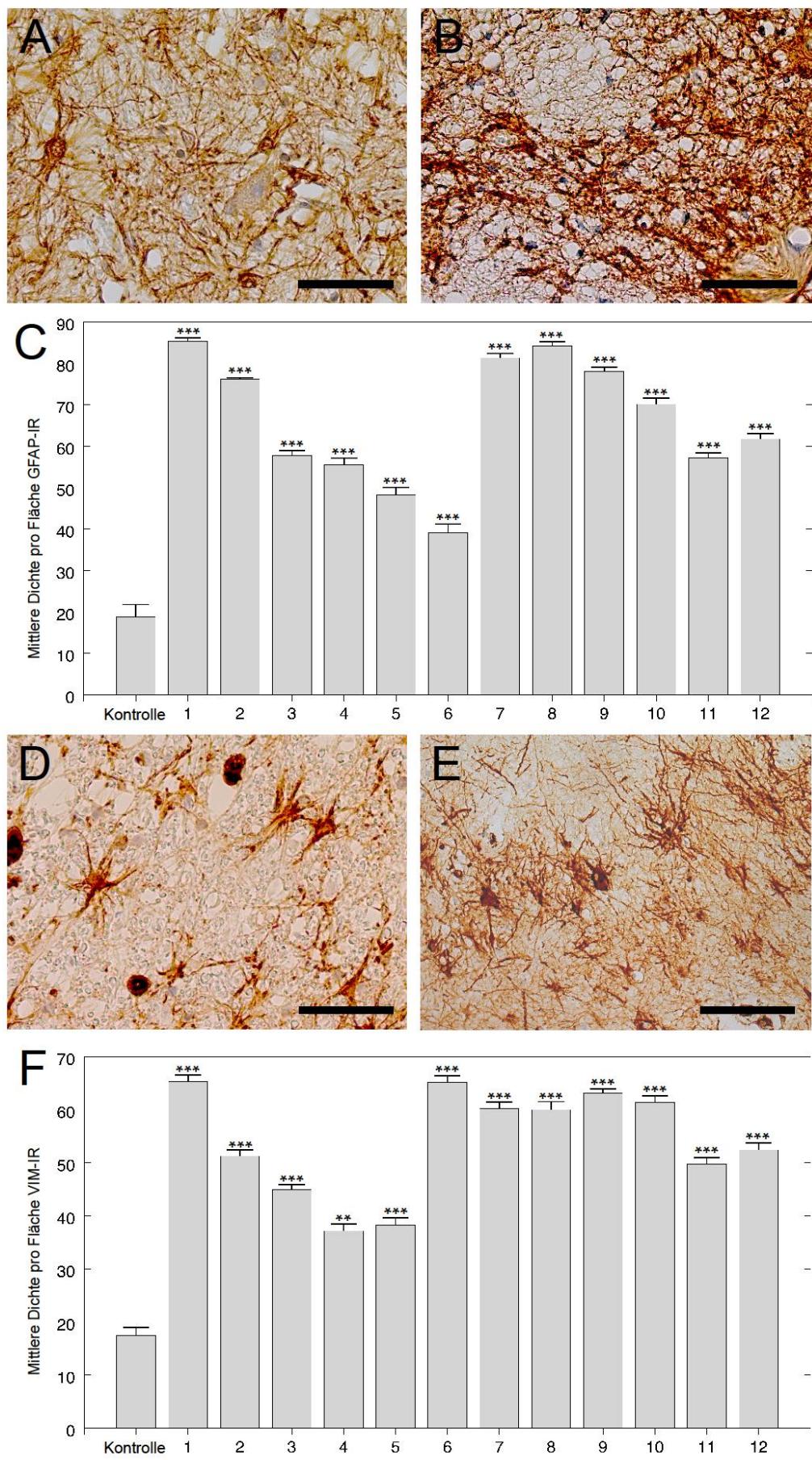
Maßstab 100µm.

3.3.1 Densitometrische Analyse der GFAP-und VIM-Immunreaktivität

Zur Verifizierung der semiquantitativen Ergebnisse in Bezug auf die Immunreaktivitäten von GFAP und Vimentin wurden densitometrische Analysen durchgeführt (siehe Abbildung 6). Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt gewählt: signifikant bei $p \leq 0,05$ (gekennzeichnet durch *), hoch signifikant bei $p \leq 0,01$ (gekennzeichnet durch **), höchst signifikant bei $p \leq 0,001$ (gekennzeichnet durch ***).

Die densitometrische Auswertung von GFAP ergab in allen Fällen höchst signifikante Ergebnisse im Vergleich zu den Kontrollgeweben. In 33,3% der Fälle (4 von 12 Fällen) ergab die Densitometrie Werte über 80, in sechs Fällen (50% der Fälle) lagen die Werte zwischen 50 und 80. Lediglich in drei Fällen lagen die Werte unter 50, wobei bei einem Fall der Wert unter 40 lag (39,17). Die Densitometrie der Kontrollgewebe hat einen durchschnittlichen Wert von 18,84 ergeben.

Somit konnte die zuvor anhand morphologischer Kriterien und durch die semiquantitative Auswertung festgestellte Astrogliose durch die densitometrische Analyse nachgewiesen werden. Die densitometrische Auswertung von Vimentin ergab in 91,6% der Fälle höchst signifikante Ergebnisse im Vergleich zu den untersuchten Kontrollgeweben. Die Signifikanzniveaus wurden wie oben beschrieben gewählt. Das heißt, dass lediglich in einem der zwölf Fälle das Expressionsniveau mit einer Signifikanz von $p \leq 0,01$ hoch war. Das Ergebnis dieses Gewebes, das eine hohe Signifikanz ergeben hat, lag bei 37,18. Von den zwölf Fällen lagen die Ergebnisse in 66,7% (8 von 12 Fällen) zwischen 50 und 70. In vier Fällen (33,3%) wurden densitometrische Werte unter 50 ermittelt, wobei die Ergebnisse in zwei der vier Fälle unter 40 lagen. Die Densitometrie der Kontrollgewebe hat einen durchschnittlichen Wert von 17,47 ergeben.

**Abbildung 6**

Darstellung der GFAP- und Vimentin-Immunreaktivitäten im Neuroepithel der TCS-Gewebeproben nach Diaminobenzidinfärbungen.

(A) und (B) zeigen die Immunreaktivitäten von GFAP in den adulten Rückenmarkkontrollgeweben (A) im Vergleich zu den untersuchten TCS-Gewebeproben (B). In Abschnitt (C) sind die Ergebnisse der densitometrischen Analysen der Immunreaktivitätslevel der TCS-Gewebeproben gegenüber den Ergebnissen bezüglich der Kontrollgewebe aufgetragen. Es wird deutlich, dass signifikant erhöhte Expressionslevel in den TCS-Gewebeproben detektiert werden konnten (dargestellt durch *** bei $p \leq 0,001$).

Positive Immunreaktivitäten nach Färbungen mit Antikörpern gegen Vimentin wurden sowohl in den adulten Rückenmarkkontrollgeweben (D) als auch in den untersuchten TCS-Gewebeproben (E) sichtbar. Außerdem wurden auch die semiquantitativen Ergebnisse bezüglich Vimentin durch densitometrische Analysen verifiziert (F). Hier konnten in sämtlichen Fällen statistisch signifikant erhöhte Expressionslevel festgestellt werden (gekennzeichnet durch ** bei $p \leq 0,01$ und *** bei $p \leq 0,001$).

Maßstab 50 μ m.

3.4 Expressionsmuster von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen, densitometrischen und molekularbiologischen Auswertungen

Im Anschluss an die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit den etablierten Standardmarkern folgten die immunhistochemischen Färbungen mit bestimmten Zytokinen, die aufgrund der im Vorfeld erfolgten Studien ausgewählt wurden.

Sämtliche untersuchte Gewebeproben wiesen ausgeprägte Immunreaktivitäten im neuroepithelialen Gewebe bei den Färbungen mit Antikörpern gegen Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor auf. Hierbei zeigten sich die Immunreaktivitäten bezüglich IL-1b sowohl in Zellen mit neuronalen als auch mikroglialen bzw. entzündlichen morphologischen Eigenschaften. Die Immunreaktivitäten bezüglich IL-1R1 wurden besonders in Zellen sichtbar, die vom Aussehen her den neuronalen Zellen zuzuordnen sind.

Bei den adulten Rückenmarkkontrollgeweben hingegen konnten keine spezifischen Färbungen nach Verwendung von Antikörpern gegen Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor nachgewiesen werden.

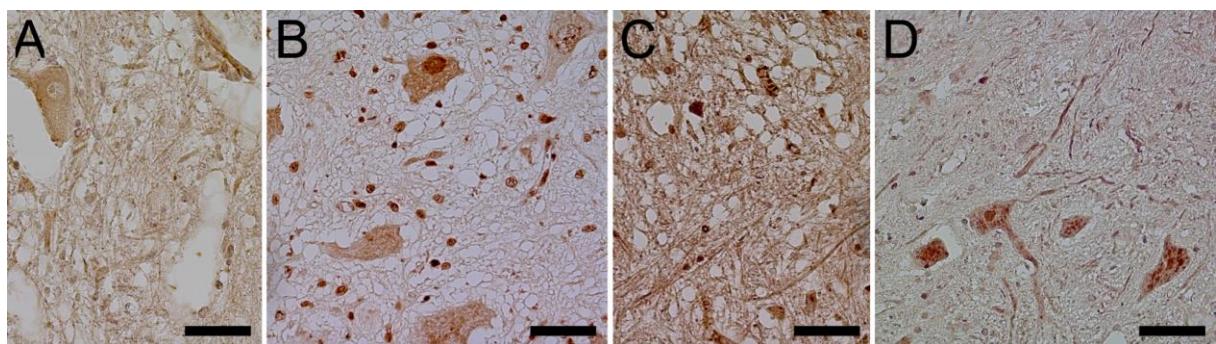


Abbildung 7

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Diaminobenzidinfärbungen mit Antikörpern gegen Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor auf den Kontrollgeweben und den TCS-Gewebeproben. Bezuglich IL-1-beta konnte auf den Kontrollgeweben lediglich eine schwache, sich kaum von Hintergrund abhebende Färbung einzelner Zellen sichtbar gemacht werden (A), wohingegen sich auf den TCS-Gewebeproben starke Färbungen unter anderem von Zellen mit morphologischen Charakteristika neuronaler Zellen sowie kleinen, runden Zellen zeigten (B). Die Färbungen mit einem Antikörper gegen IL-1-RI ergaben auf den adulten Rückenmarkkontrollgeweben keine spezifischen Färbungen (C). Auf den untersuchten TCS-Gewebeproben konnten unter anderem positive Immunreaktivitäten in morphologisch neuronal anmutenden Zellen detektiert werden (D).

Maßstab 50µm.

3.4.1 Densitometrische Analysen

Die zuvor beschriebenen semiquantitativen Ergebnisse in Bezug auf die Immunreaktivitäten von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor wurden mittels Densitometrie verifiziert (siehe Abbildung 8).

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt gewählt: signifikant bei $p \leq 0,05$ (gekennzeichnet durch *), hoch signifikant bei $p \leq 0,01$ (gekennzeichnet durch **), höchst signifikant bei $p \leq 0,001$ (gekennzeichnet durch ***).

Interleukin-1-beta betreffend ergaben die densitometrischen Analysen in allen untersuchten Fällen ein Expressionsniveau, das gegenüber den Kontrollgeweben als höchst signifikant einzustufen war ($p \leq 0,001$). In vier Fällen (33,3%) lagen die Werte zwischen 50 und 63, die übrigen acht Fälle (66,7%) wiesen Werte unter 50 auf. Hierbei waren in 41,7% der Fälle (5 von 12 Fällen) die Werte zwischen 20 und 30 verteilt. Der niedrigste Wert lag bei 20,99, der höchste Wert bei 62,92. Die densitometrischen Untersuchungen der adulten Rückenmarkkontrollen ergaben einen durchschnittlichen Wert von 1,24.

Die densitometrische Analyse der Färbungen mit einem Antikörper gegen Interleukin-1-Rezeptor ergab in allen 12 TCS-Fällen ein höchst signifikant erhöhtes Expressionsniveau gegenüber den adulten Rückenmarkkontrollgeweben ($p \leq 0,001$). In 33,3% der Fälle (4 von 12 Fällen) lagen die Werte zwischen 50 und 66, in 50% der Fälle (6 von 12 Fällen) zwischen 30 und 50 und in lediglich 2 der 12 Fälle (16,7%) ergaben sich Werte unter 30. Der niedrigste densitometrisch festgestellte Wert lag bei 26,99 und der höchste Wert bei 65,41. Bezuglich der densitometrischen Untersuchungen der Kontrollgewebeproben zeigte sich ein durchschnittlicher Wert von 4,48.

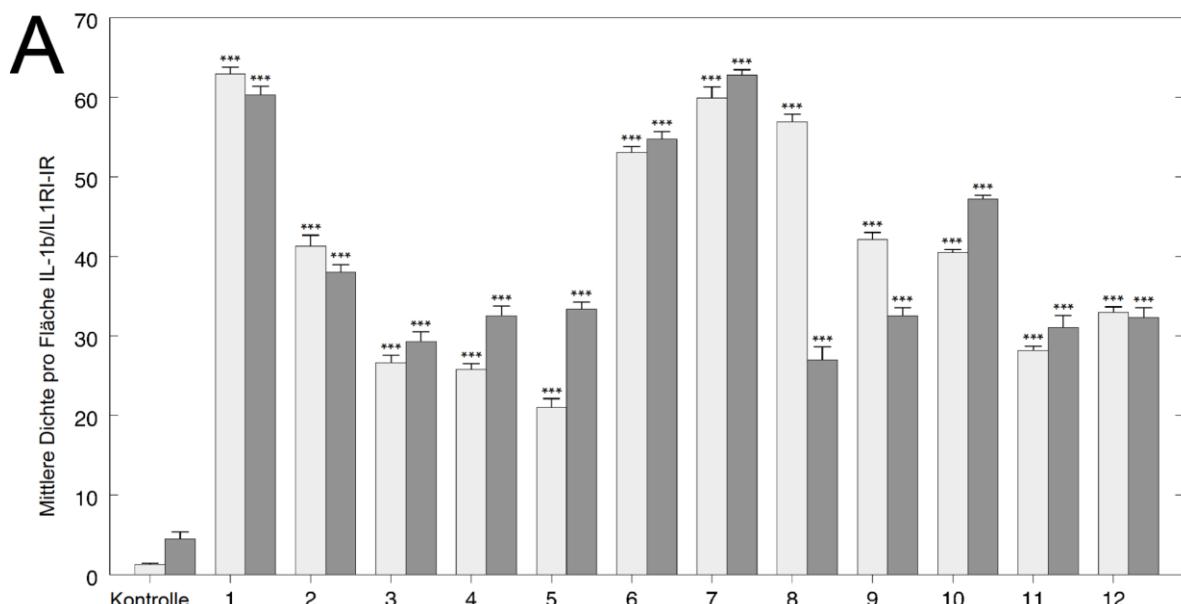


Abbildung 8

Die Abbildung zeigt die densitometrischen Analysen der Immunreaktivitäten von Interleukin-1-beta (hellgrau) und Interleukin-1-Rezeptor (dunkelgrau). Es wird deutlich, dass in sämtlichen Fällen die Expressionslevel sowohl von IL-1-beta als auch von IL-1-R1 in den TCS-Gewebeproben gegenüber den Kontrollgeweben statistisch signifikant erhöht sind mit $p \leq 0,001$ (dargestellt durch ***).

3.4.2 Zelluläre Lokalisation

Die mikroskopische Auswertung der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen diente dem Nachweis der Kolokalisation von Interleukin-1-beta sowie Interleukin-1-Rezeptor und der neuronalen, astrozytären und mikroglialen Marker, die zuvor bereits durch die semiquantitative Analyse der Diaminobenzidinfärbungen mit den entsprechenden Gewebemarkern und den Zytokinen vermutet worden war.

Die Abbildung 9 zeigt die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen das untersuchte Zytokin-Rezeptor-Paar, die mit einem rot fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht wurden, sowie mit Antikörpern gegen NeuN, GFAP und CD68, die wiederum mit einem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper versehen wurden. Weiterhin wurde DAPI zur Kernfärbung verwendet, was sich in den Abbildungen blau darstellt.

Bezüglich Interleukin-1-beta wird in Abbildung 9 A klar sichtbar, dass Zellen mit morphologischen Eigenschaften neuronaler Zellen angefärbt wurden. Abbildung 9 a' zeigt die isolierte Färbung mit Antikörpern gegen NeuN (grün), Abbildung 9 a'' zeigt die isolierte Färbung mit Antikörpern gegen IL-1b. In Abschnitt A werden beide Färbungen übereinandergelegt, wobei die Koexpression von Interleukin-1-beta und NeuN durch die Gelbfärbung der Zellen sichtbar wird.

Auch bei der Färbung mit Antikörpern gegen GFAP zeigten sich ähnlich Ergebnisse. Abbildung 9 B verdeutlicht die Koexprimierung von GFAP und IL-1-b in morphologisch astrozytären Zellen mit sternförmigen Zellausläufern.

Die Abbildungen 9 c' und c'' zeigen jeweils die Färbungen mit Antikörpern gegen Interleukin-1-beta und CD68 mit den entsprechenden rot und grün fluoreszierenden Sekundärantikörpern, was wiederum in der Gesamtheit (siehe Abbildung 9 C) das Zytokin zusammen mit dem Mikrogliamarker koexprimiert in kleinen, rundlichen Zellen erscheinen lässt.

Zusammenfassend ist also davon auszugehen, dass Interleukin-1-beta in den untersuchten TCS-Gewebeproben in neuronalen sowie astrozytären Zellen und auch Zellen der Mikroglia exprimiert wurde.

Bezüglich der Färbungen mit Antikörpern gegen den zugehörigen Rezeptor wurde deutlich, dass eine Koexpression mit NeuN in morphologisch neuronalen Zellen (siehe Abbildung 9 D) vorlag, was durch die Gelbfärbung der Zellen sichtbar wurde.

Weiterhin wurde durch die durchgeführten Doppelimmunfluoreszenzfärbungen Interleukin-1-Rezeptor koexprimiert mit CD68 als Mikrogliamarker dargestellt (siehe Abbildung 9 E).

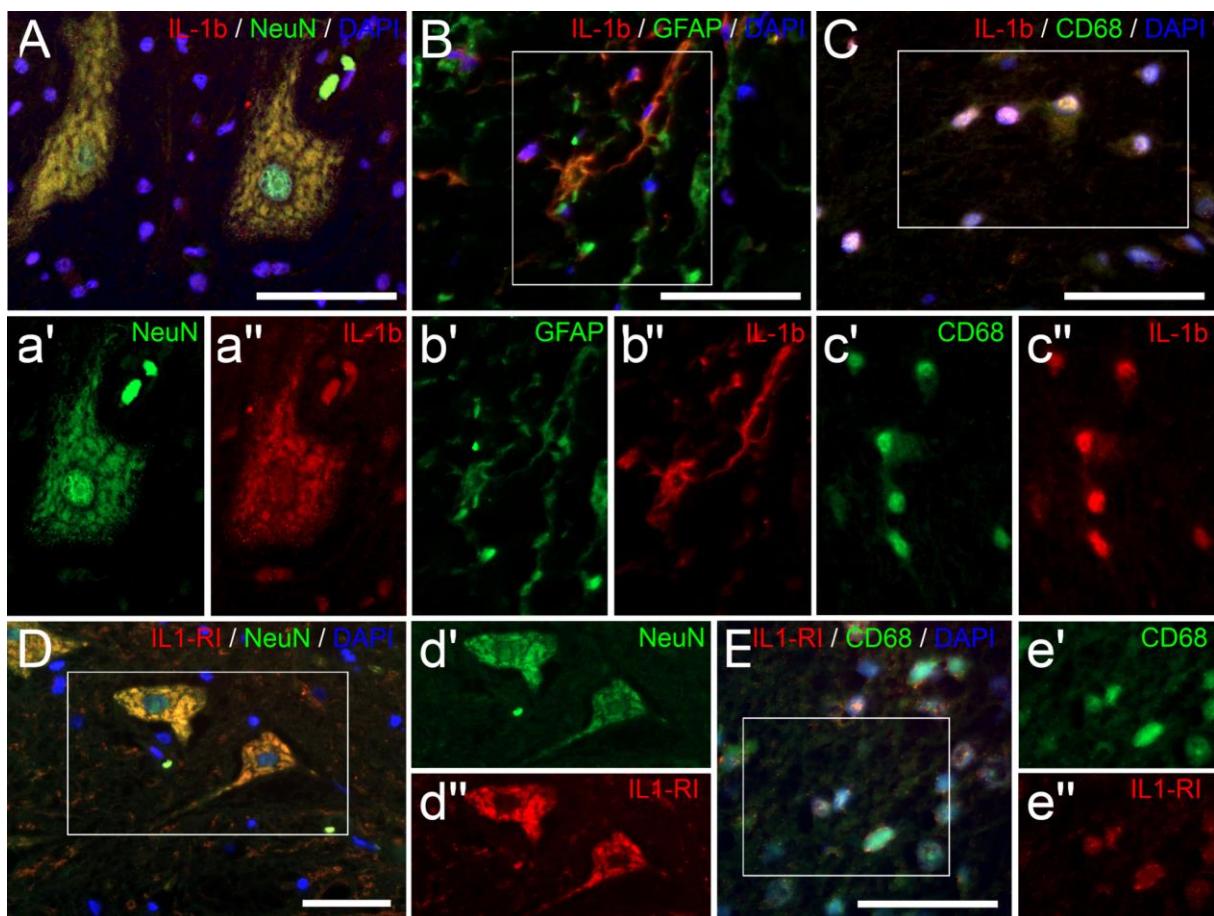


Abbildung 9

Die Abbildung zeigt die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen des Zytokin-Rezeptorpaars Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor mit neuronalen, astrozytären und mikroglialen Markern (A-E). Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau).

In (a'-c') sind isoliert die Färbungen mit Primärantikörpern gegen NeuN, GFAP und CD68 (grün) dargestellt, in (a''-c'') die isolierten Färbungen mit Primärantikörpern gegen IL-1-b (rot) dargestellt. Die jeweils fusionierten Bilder (A-C) zeigen jeweils die Koexpression von IL-1-b mit den entsprechenden Gewebemarkern dar (gelb).

In (d'-e') sind isoliert die Färbungen mit Primärantikörpern gegen NeuN und CD68 abgebildet (grün) sowie in (d''-e'') die entsprechenden Färbungen mit Primärantikörpern gegen IL-1-R1. IL-1-R1 zeigt sich in den fusionierten Bildern (D-E) koexprimiert mit dem neuronalen Marker NeuN und dem mikroglialen Marker CD68 (gelb).

Maßstab 50µm.

3.4.3 Ergebnisse der qPCR

Neben den immunhistochemischen Untersuchungen mit den anschließenden densitometrischen Analysen wurden molekularbiologische Tests in Form einer qualitativen Real-Time PCR durchgeführt (siehe Abbildung 10). Die Ergebnisse der delta CT Werte wurden als Boxplots für die mRNA-Expression in den Kontrollgeweben und den TCS-Geweben dargestellt.

Hierbei zeigten sich sowohl bei Interleukin-1-beta als auch Interleukin-1-Rezeptor tendenziell höhere mRNA-Expressionslevel in den untersuchten TCS-Gewebeproben im Vergleich zu den adulten Rückenmarkkontrollgeweben. Statistisch signifikante Ergebnisse konnten allerdings nicht erhoben werden.

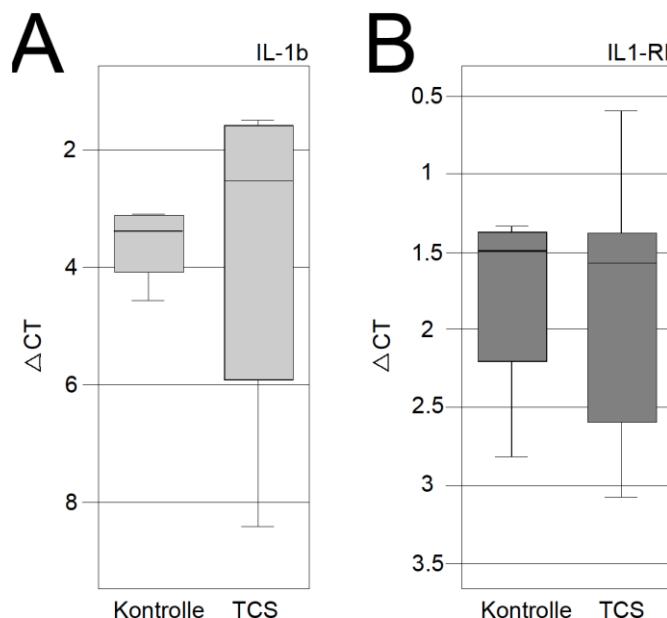


Abbildung 10

Die Abbildung zeigt die mRNA-Expressionslevel von Interleukin-1-beta (A) und Interleukin-1-Rezeptor (B) in den TCS-Gewebeproben und den Kontrollgeweben. Die Delta CT-Werte sind dargestellt als Boxplots für die mRNA-Expression. Es zeigten sich für IL-1b tendenziell höhere Werte bei den TCS-Gewebeproben ohne statistische Signifikanz.

3.5 Expressionsmuster von TNF-a und TNF-Rezeptor: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen, densitometrischen und molekularbiologischen Auswertungen

Neben dem zuvor beschriebenen Zytokin-Rezeptor-Paar wurde ein weiteres proinflammatorisches Zytokin und sein Rezeptor, nämlich Tumornekrosefaktor-alpha und Tumornekrosefaktor-Rezeptor, untersucht.

In sämtlichen untersuchten Gewebeproben wurden nach den Färbungen mit Antikörpern gegen TNF-a und TNF-Rezeptor starke Immunreaktivitäten deutlich. Diese zeigten sich bei den Diaminobenzidinfärbungen vorrangig in Zellen mit neuronalen morphologischen Eigenschaften sowie kleinen, rundlichen Zellen, die vom Aussehen her am ehesten mikroglialen Zellen zuzuordnen sind (siehe Abbildung 11).

Im Vergleich dazu zeigten sich bei den Färbungen mit Antikörpern gegen dieses Zytokin-Rezeptor-Paar keine spezifischen Färbungen auf den adulten Rückenmarkgeweben, die als Kontrolle dienten. Bezuglich TNF-a hoben sich hier allenfalls einzelne Zellen schwach vom Hintergrund ab (siehe Abbildung 11).

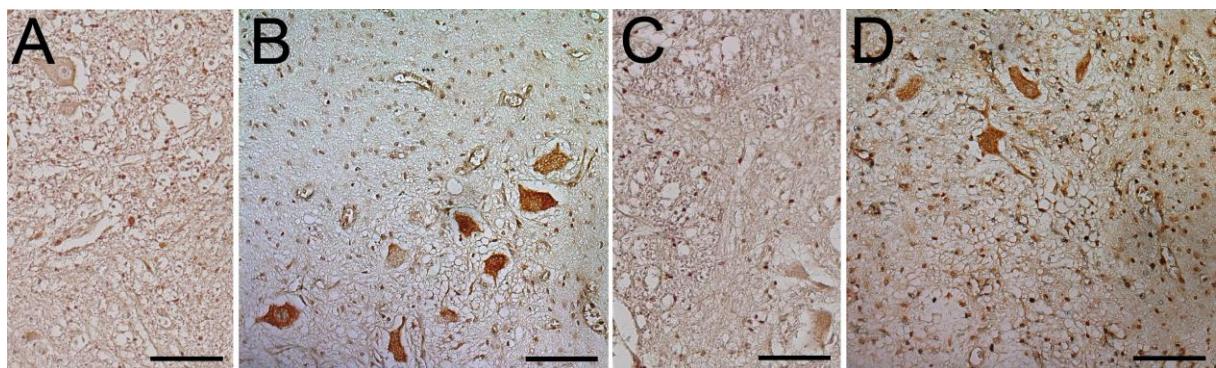


Abbildung 11

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Diaminobenzidinfärbungen mit Antikörpern gegen Tumornekrosefaktor-alpha (A-B) und Tumornekrosefaktor-Rezeptor. Es wird deutlich, dass sich auf den Kontrollgewebe (A, C) keine spezifischen Färbungen zeigten. Auf den TCS-Gewebeproben wurden hingegen deutliche Immunreaktivitäten sowohl nach Färbung mit Antikörpern gegen TNF-a (B) als auch TNF-R (D) deutlich.

Maßstab 100µm.

3.5.1 Densitometrische Analysen

Zur Verifizierung der zuvor anhand der DAB-Färbungen beschriebenen Immunreaktivitäten von TNF-a und TNF-Rezeptor wurden densitometrische Analysen durchgeführt (siehe Abbildung 12).

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt gewählt: signifikant bei $p \leq 0,05$ (gekennzeichnet durch *), hoch signifikant bei $p \leq 0,01$ (gekennzeichnet durch **), höchst signifikant bei $p \leq 0,001$ (gekennzeichnet durch ***).

Die densitometrischen Untersuchungen der Immunreaktivitäten von Tumornekrosefaktor-alpha in den untersuchten TCS-Gewebeproben im Vergleich zu den adulten Rückenmarkkontrollgeweben ergaben in allen zwölf Fällen höchst signifikante erhöhte Expressionslevel ($p \leq 0,001$). In 75% der Fälle (9 von 12 Fällen) ergaben sich Werte zwischen 20 und 35, wobei der höchste Wert bei 34,27 lag. In lediglich drei Fällen (25%) wurden Werte unter 20 festgestellt. Der niedrigste densitometrisch gemessene Wert lag bei 11,88. Bei den untersuchten Kontrollgeweben ergab sich ein Durchschnittswert von 2,93.

Bei den densitometrischen Analysen der Färbungen mit einem Antikörper gegen Tumornekrosefaktor-Rezeptor wurde ebenfalls in allen Fällen ein statistisch signifikant erhöhtes Expressionsniveau (höchst signifikant mit $p \leq 0,001$) gegenüber den adulten Rückenmarkkontrollen festgestellt. Insgesamt waren die absoluten Werte höher als bei den densitometrischen Ergebnissen von TNF-a. In 66,7% der Fälle (8 von 12 Fällen) lagen die ermittelten Werte zwischen 30 und 44. Die übrigen vier Fälle (33,3%) wiesen Werte unter 30 auf. Der niedrigste Wert lag bei 23,47, der höchste Wert bei 43,89. Bei den densitometrischen Untersuchungen der adulten Rückenmarkkontrollgewebe wurde ein durchschnittlicher Wert von 1,81 festgestellt.

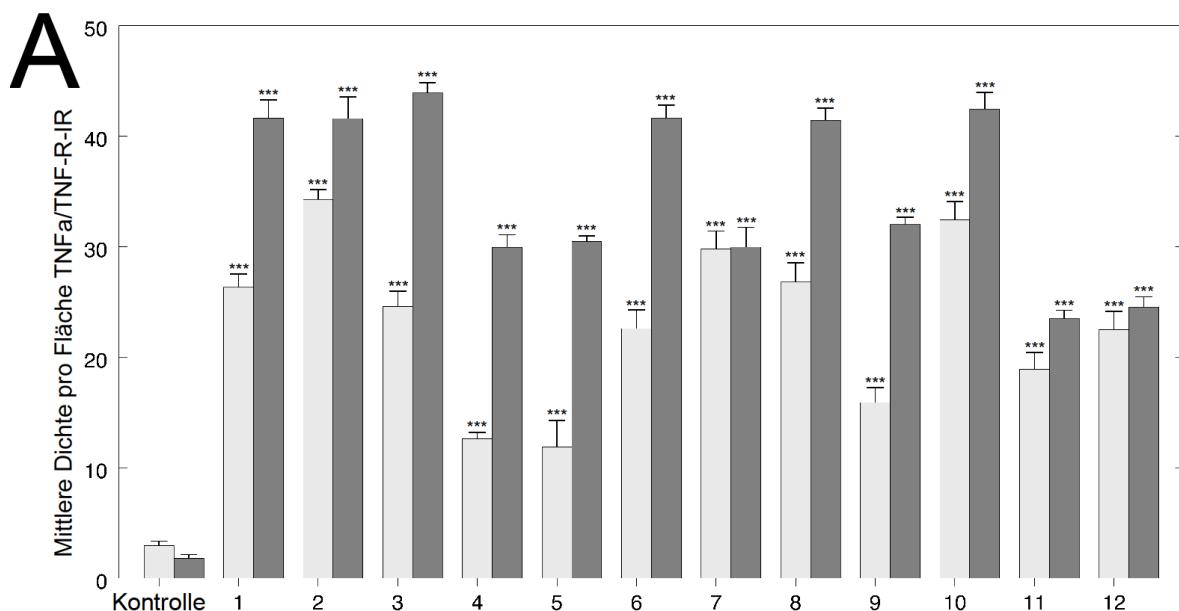


Abbildung 12

Die Abbildung zeigt die densitometrischen Analysen der Immunreaktivitäten von TNF-a (hellgrau) und TNF-R (dunkelgrau). Die Expressionslevel der TCS-Gewebeproben ergaben in sämtlichen Fällen statistisch signifikante Erhöhungen mit $p \leq 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollgeweben (dargestellt durch ***).

3.5.2 Zelluläre Lokalisation

Um die durch die semiquantitativen Ergebnisse der Diaminobenzidinfärbungen vermuteten Kolokalisationen von Tumornekrosefaktor-alpha und seinem Rezeptor mit verschiedenen Gewebemarkern nachzuweisen, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. TNF-a und TNF-R wurden mittels rot fluoreszierender Sekundärantikörper sichtbar gemacht, die Gewebemarker mit grün fluoreszierenden Sekundärantikörpern. Die Zellkerne wurden mittels DAPI blau dargestellt.

Durch die Doppelimmunfluoreszenzfärbung konnte TNF-Rezeptor nicht nur koexprimiert in inflammatorischen Zellen, sondern auch in neuronalen Zellen gezeigt werden. Abbildung 13 a' zeigt isoliert die positive Immunreaktivität von NeuN in einer morphologisch neuronalen Zelle, Abbildung 13 a'' zeigt wiederum isoliert die positive Immunreaktivität von TNF-Rezeptor in derselben Zelle. Zusammengefasst wird in Abbildung 13 A durch die gelbe Färbung der eben beschriebenen Zelle dargestellt, dass eine Koexpression von TNF-Rezeptor mit dem neuronalen Gewebemarker NeuN vorliegt.

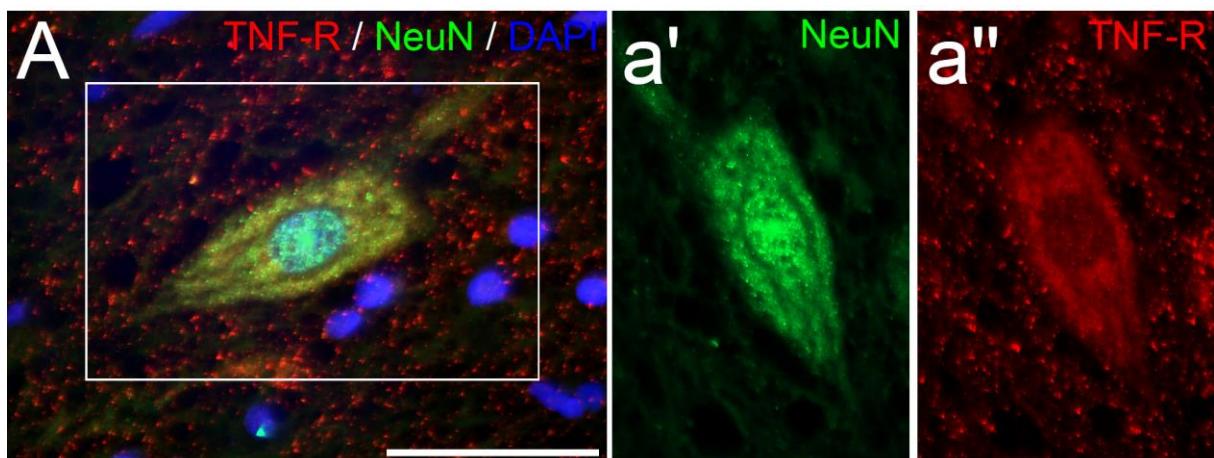


Abbildung 13

Die Abbildung zeigt exemplarisch eine fusionierte Doppelimmunfluoreszenzfärbung (A) von TNF-R (rot) und NeuN (grün). Die Kernfärbung mittels DAPI ist blau dargestellt. In (a') wird die isolierte Färbung mit einem Primärantikörper gegen NeuN gezeigt, die mit einem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht wurde. In (a'') ist entsprechend isoliert die Färbung mit einem Primärantikörper gegen TNF-R dargestellt, die mit einem rot fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht wurde.

Maßstab 50µm.

3.5.3 Ergebnisse der qPCR

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen und den densitometrischen Analysen der TCS-Gewebepröben und der adulten Rückenmarkkontrollen wurden qualitative Real-Time-PCR-Untersuchungen durchgeführt (siehe Abbildung 14).

Die Ergebnisse der delta CT Werte wurden als Boxplots für die mRNA-Expression in den TCS-Geweben und den Kontrollgeweben dargestellt.

Bezüglich TNF-a zeigten sich die mRNA-Expressionslevel gegenüber den Kontrollgeweben nicht signifikant erhöht. Die Auswertung der mRNA-Expressionslevel von TNF-Rezeptor ergab im Vergleich zu den mRNA-Expressionsniveaus der adulten Rückenmarkkontrollgeweben eine statistisch signifikante Erhöhung mit $p \leq 0,05$ (siehe Abbildung 14 B, dargestellt durch *).

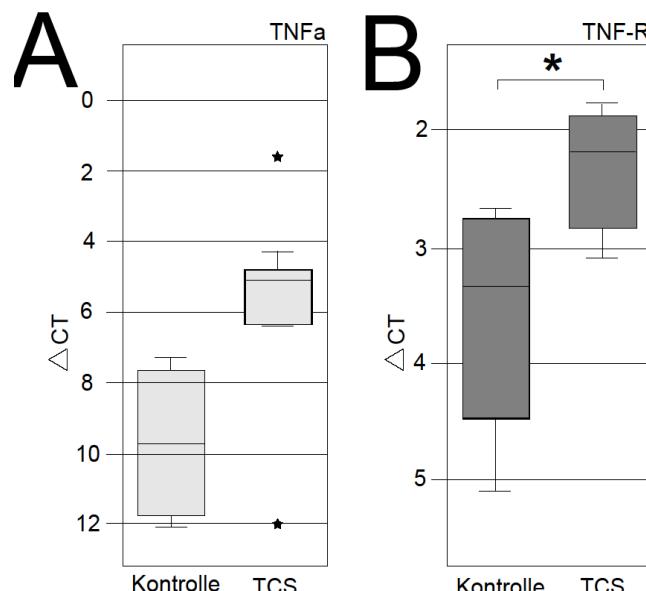


Abbildung 14

Die Abbildung zeigt die mRNA-Expressionslevel von Tumornekrosefaktor-alpha (A) und Tumornekrosefaktor-Rezeptor (B) in den TCS-Gewebepröben und den Kontrollgeweben. Die Delta CT-Werte sind dargestellt als Boxplots für die mRNA-Expression. Es zeigten sich bezüglich TNF-a bei den TCS-Gewebepröben keine statistisch signifikant erhöhten Werte (A). Die mRNA-Expressionslevel von TNF-R in den TCS-Gewebepröben zeigten sich gegenüber den Kontrollgeweben mit $p \leq 0,05$ signifikant erhöht (B, dargestellt durch *).

3.6 Expressionsmuster von HIF-1a und HIF-2a: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen und densitometrischen Auswertungen

Zusätzlich zu den oben genannten Zytokin-Rezeptor-Paaren wurden die TCS-Gewebeproben mit Antikörpern gegen Hypoxia-inducible-factor 1- und 2-alpha immunhistochemisch gefärbt und anschließend untersucht.

Sämtliche Gewebeproben wiesen ausgeprägte Immunreaktivitäten nach den Färbungen mit den oben genannten Antikörpern auf. Hierbei zeigten sich die Immunreaktivitäten sowohl von HIF-1a als auch von HIF-2a in Zellen mit neuronalen morphologischen Eigenschaften (siehe Abbildung 15 C und D).

Bei den adulten Rückenmarkkontrollgeweben wurden keine spezifischen Färbungen nach Verwendung von Antikörpern gegen HIF-1a und HIF-2a sichtbar (siehe Abbildung 15 A und B).

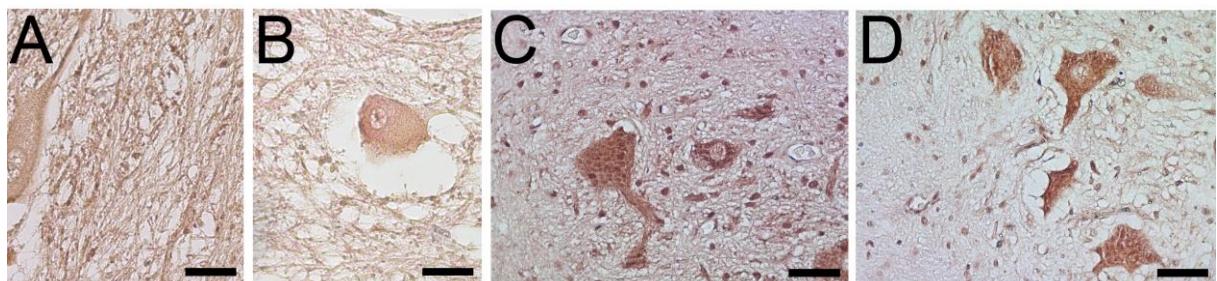


Abbildung 15

Darstellung der Ergebnisse nach Diaminobenzidinfärbungen mit Antikörpern gegen HIF-1a und HIF-2a der adulten Rückenmarkkontrollgewebe (A-B) und der TCS-Gewebeproben (C-D). In (A-B) zeigten sich keine spezifischen Färbungen. Auf den TCS-Gewebeproben (C-D) wurden hingegen deutliche Immunreaktivitäten in Zellen mit morphologischen Charakteristika von neuronalen Zellen sichtbar.

3.6.1 Densitometrische Analysen

Zur Verifizierung der semiquantitativen Untersuchungen wurden densitometrische Analysen durchgeführt (siehe Abbildung 16).

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt gewählt: signifikant bei $p \leq 0,05$ (gekennzeichnet durch *), hoch signifikant bei $p \leq 0,01$ (gekennzeichnet durch **), höchst signifikant bei $p \leq 0,001$ (gekennzeichnet durch ***).

Das Expressionsniveau von HIF-1a zeigte sich in sämtlichen untersuchten TCS-Gewebeproben gegenüber den Kontrollgeweben statistisch höchst signifikant erhöht ($p \leq 0,001$). In 58,3% der Fälle (7 von 12 Fällen) lagen die ermittelten Werte zwischen 30 und 39 mit dem höchsten Wert bei 38,42. In den übrigen fünf Fällen (41,7%) lagen die Werte zwischen 20 und 30. Der mit Abstand niedrigste Wert lag bei 20,75.

Die densitometrischen Untersuchungen der adulten Kontrollgewebe ergaben einen durchschnittlichen Wert von 2,38.

Die densitometrisch ermittelten absoluten Werte von HIF-2a lagen insgesamt weit über denen von HIF-1a. Im Vergleich zu den Kontrollgeweben wurde in allen Fällen eine höchst signifikante Erhöhung der Expressionslevel festgestellt ($p \leq 0,001$). In 41,7% der Fälle (5 von 12 Fällen) ergaben die Untersuchungen Werte zwischen 60 und 97. Davon lagen die Werte in zwei Fällen (16,7%) über 90, der höchste Wert lag bei 96,08. Die Werte in den drei anderen Fällen lagen jeweils zwischen 80 und 90, 70 und 80 sowie 60 und 70. In 33,3% der Fälle (4 von 12 Fällen) wurden Werte zwischen 40 und 50 ermittelt. In den übrigen drei Fällen (25%) lagen die Werte unter 40. Der niedrigste Wert wurde mit 28,55 angegeben.

Die densitometrischen Untersuchungen der adulten Rückenmarkkontrollgewebe ergaben einen Durchschnittswert von 2,29.

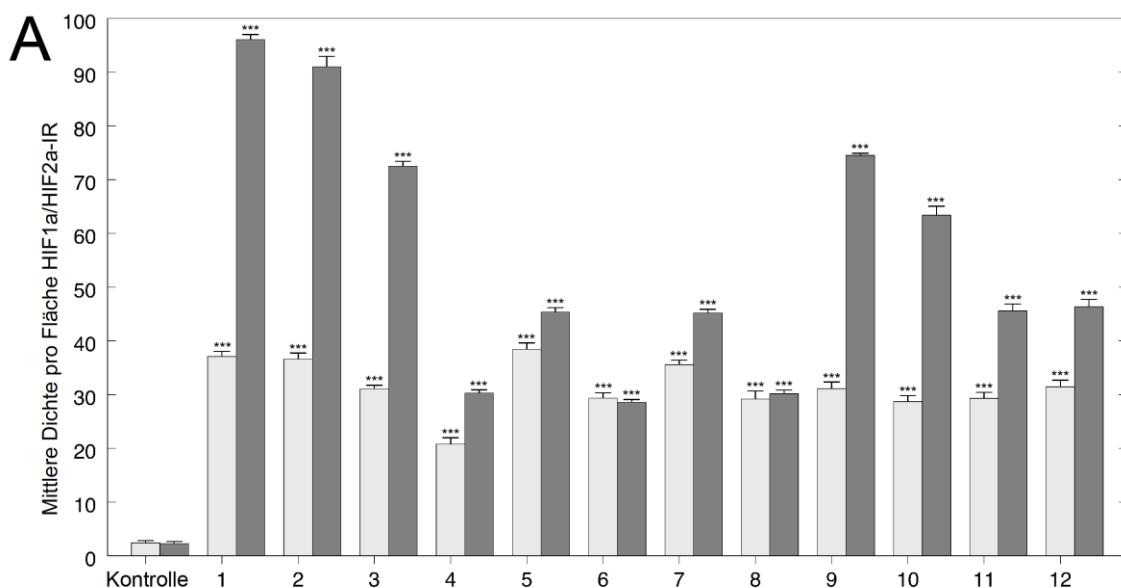


Abbildung 16

Die Abbildung zeigt die densitometrischen Analysen der Immunreaktivitäten von HIF-1a (hellgrau) und HIF-2a (dunkelgrau). Die Expressionslevel der TCS-Gewebeproben ergaben in sämtlichen Fällen statistisch signifikante Erhöhungen mit $p \leq 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollgeweben (dargestellt durch ***).

3.6.2 Zelluläre Lokalisation

Zum Nachweis der vermuteten Kolokalisation von HIF-1a und HIF-2a mit neuronalen, mikroglialen und entzündlichen Markern wurden Doppel- und Tripleimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Die Abbildungen 17 A, B, C zeigen die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen HIF-1a und HIF-2a, die mit einem rot fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht wurden sowie mit Antikörpern gegen NeuN und CD68, die wiederum mit einem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper versehen wurden. Weiterhin wurde für die Kernfärbung DAPI verwendet, was als blauer Farbstoff sichtbar wird.

In den Abschnitten A und B der Abbildung 17 zeigen sich die Koexpression von HIF-1-a und NeuN als neuronaler Marker und CD68 als mikroglialer Marker, was durch die gelb wirkenden Zellen deutlich wird. Die angefärbten Zellen erfüllen jeweils die morphologischen Charakteristika von neuronalen Zellen und von Mikroglia.

In Abbildung 17 c“ sieht man isoliert die positive Immunreaktivität von NeuN, c“ zeigt ebenfalls isoliert die starke Immunreaktivität von HIF-2a. Die gleichzeitige Darstellung beider Färbungen macht in Abschnitt C der Abbildung 17 die Koexpression von HIF-2a und NeuN als neuronalem Gewebemarker deutlich, da die Zelle gelb erscheint.

Außerdem wird exemplarisch eine Tripleimmunfluoreszenzfärbung gezeigt (siehe Abbildung 17 D). Hierbei wurden drei Primärantikörper verwendet, deren positive Immunreaktivitäten jeweils mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht wurden (grün = NeuN, rot = IL-1b, türkis = HIF-2a). In diesem Fall zeigen sich sämtliche Primärantikörper kolokalisiert, sodass davon auszugehen ist, dass in neuronalen Zellen in den TCS-Geweben sowohl das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1-beta als auch der Hypoxia-inducible-factor 2-alpha exprimiert werden.

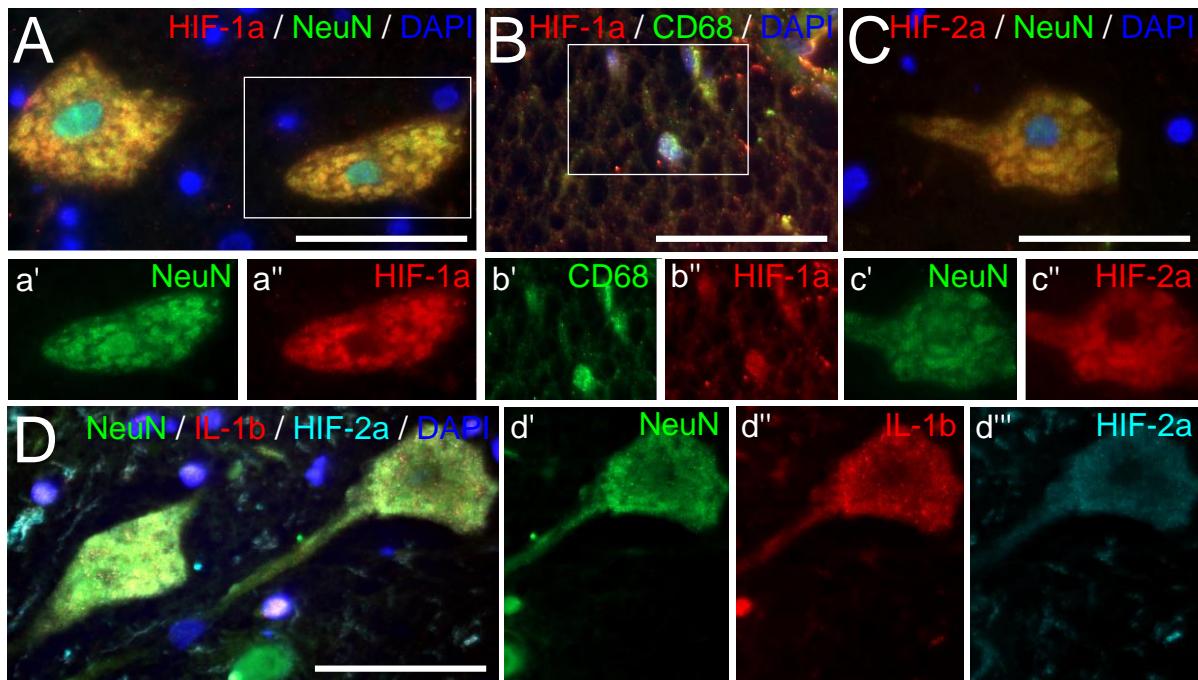


Abbildung 17

Die Abbildung zeigt die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von HIF-1a und HIF-2a mit neuronalen und mikroglialen Markern (A-C) sowie eine Tripleimmunfluoreszenzfärbung von HIF-2a mit NeuN und dem proinflammatorischen Marker IL-1b (D). Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau).

In (a'-c') sind isoliert die Färbungen mit Primärantikörpern gegen NeuN und CD68 (grün) dargestellt, in (a''-c'') die isolierten Färbungen mit Primärantikörpern gegen HIF-1a und HIF-2a (rot) dargestellt. Die fusionierten Bilder (A-C) zeigen jeweils die Koexpression von HIF-1a bzw. HIF-2-a mit den entsprechenden Gewebemarkern (gelb).

In (d') ist isoliert die Färbung mit einem Primärantikörper gegen NeuN abgebildet (grün), in (d'') die entsprechende Färbung mit einem Primärantikörper gegen IL-1b sowie in (d''') die Färbung mit einem Primärantikörper gegen HIF-2a (türkis) abgebildet. HIF-2a zeigt sich in dem fusionierten Bild (D) koexprimiert mit dem neuronalen Marker NeuN und dem proinflammatorischen Marker IL-1b (gelb).

Maßstab 50µm.

3.7 Ergebnisse der Untersuchungen zur Apoptose

Cleaved PARP (cPARP) wurde genutzt, um apoptotische Vorgänge in den TCS-Gewebeproben zu untersuchen. Weiterhin wurden TUNEL-Färbungen vorgenommen, um TUNEL-positive Zellen zu zählen und die Häufigkeit derer in den TCS-Geweben mit den adulten Rückenmarkkontrollgeweben zu vergleichen (siehe Abbildung 18).

Die Untersuchungen der Kontrollgewebe nach Färbung mit einem Antikörper gegen cPARP ergaben keine spezifischen Färbungen (siehe Abbildung 20 A). Bei den TCS-Gewebeproben zeigten sich positive Immunreaktivitäten in Strukturen, die morphologische Eigenschaften von apoptotischen Zellfragmenten aufwiesen, in Bereichen, die sich zuvor als positiv für neuroepitheliale Marker gezeigt hatten (siehe Abbildung 18 B).

Bezüglich der TUNEL-Färbungen ergaben sich ebenfalls keine spezifischen Färbungen auf den adulten Rückenmarkkontrollgeweben (siehe Abbildung 18 C), jedoch konnten TUNEL-positive Fragmente auf den TCS-Gewebeproben nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18 D). Die Auszählung der TUNEL-positiven Zellen pro definiertem Areal erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollgeweben und den TCS-Gewebeproben (dargestellt als Boxplots in Abbildung 18 E).

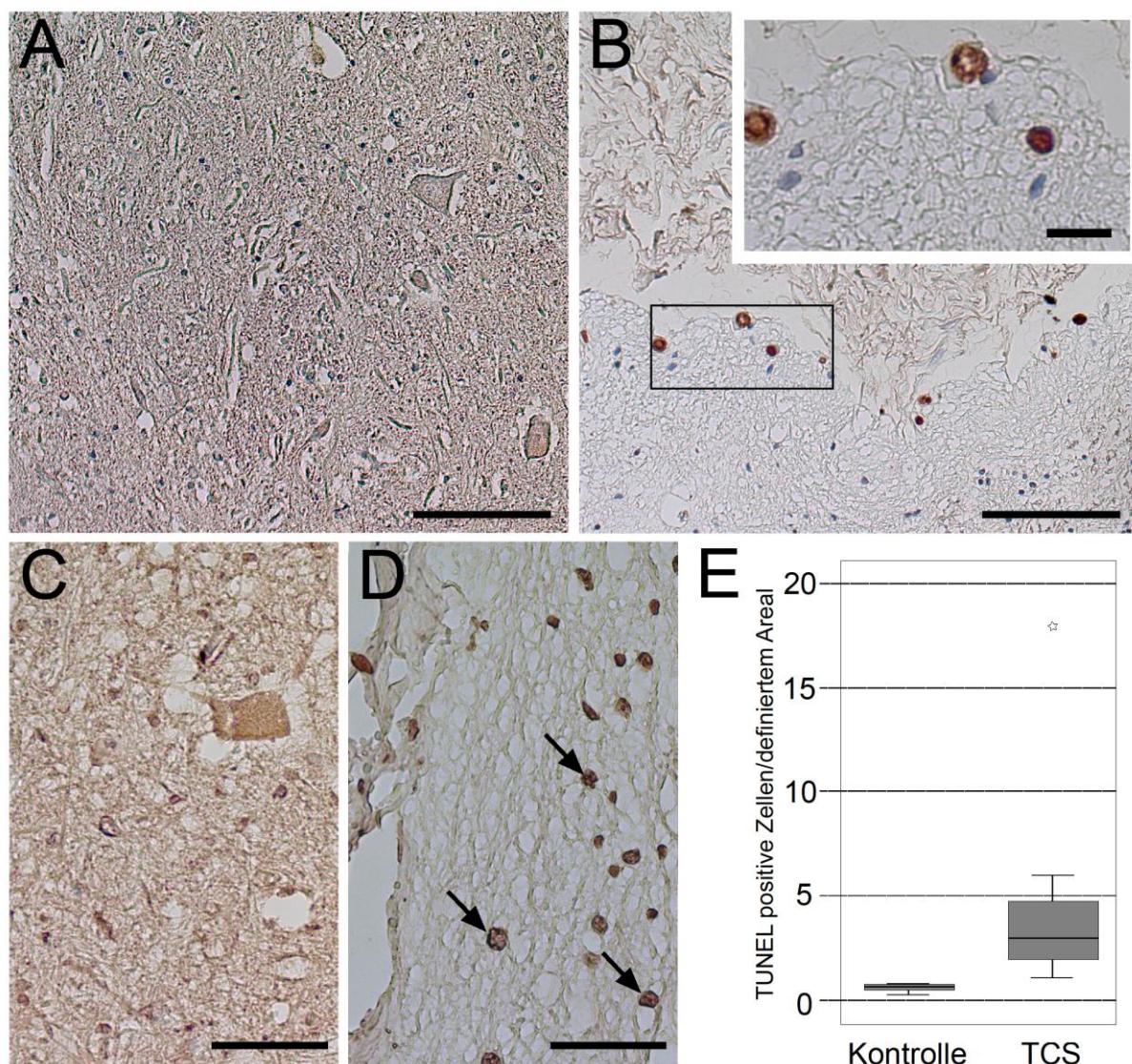


Abbildung 18

Darstellung der Ergebnisse der Färbungen mit Antikörpern gegen Cleaved PARP und der TUNEL-Färbungen sowie die Auszählung der TUNEL-positiven Zellen (A-E).

In (A) ist die Färbung mit Antikörpern gegen cPARP dargestellt, wobei sich keine spezifische Färbung zeigte. In den TCS-Gewebeproben konnten hingegen im Bereich des neuroepithelialen Geweben angefärbte kleine Zellfragmente nachgewiesen werden (B). Die Vergrößerungen in (B) zeigen kondensierte oder fragmentierte Zellkerne. Um die Zahl der Apoptosen nach TUNEL-Färbung innerhalb der adulten Rückenmarkkontrollgeweben (C) und der TCS-Gewebeproben (D) feststellen zu können, wurden die TUNEL-positiven Zellen pro definiertem Areal ausgezählt (E). Hierbei ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die TUNEL-positiven Zellen sind jeweils als Boxplots mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt.

Maßstäbe (A-B) 200µm. Maßstab Vergrößerung (B) 20µm. Maßstäbe (C-D) 50µm.

4 Diskussion

Das Tethered Cord Syndrom ist, wie in der Einleitung beschrieben, ein Problem, das sehr häufig mit spinalen Dysraphien einhergeht. Bezuglich seiner Ätiopathogenese fokussierten sich bisherige Studien v.a. auf die mechanischen Aspekte der Zugwirkung auf das funktionelle Rückenmarkgewebe und die damit einhergehenden Veränderungen des spinalen oxidativen Stoffwechsels (5, 18, 24, 25, 59). Histopathologische und molekulare Veränderungen, die der Entstehung eines Tethered Cord Syndroms nach der operativen Versorgung offener Neuralrohrdefekte im Verlauf mit zugrunde liegen könnten, wurden bislang kaum adressiert. In der vorliegenden Dissertation wurden diese Aspekte nun thematisiert, indem Rückenmarkgewebeproben, welche bei Myelolyseoperationen (aufgrund eines sekundären TCS) gewonnen wurden, hinsichtlich zellulärer und molekularer Botenstoffe potenziell schädigender Prozesse untersucht wurden.

Da bei der Myelolyse (Details zum Operationsverlauf siehe Einleitung Abschnitt 1.3) funktionserhaltend präpariert wird und daher wenig Rückenmark- bzw. Plakodengewebe für folgende histopathologische Untersuchungen zur Verfügung steht, mussten, wie im Abschnitt Material und Methoden dargelegt, zunächst die neurochirurgische und pathologische Datenbank hinsichtlich geeigneter Patientenfälle durchsucht werden. Dabei wurden durch das Mikroskopieren von Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten Fälle herausgesucht, die ausreichend neuroepithiale Abschnitte aufwiesen. Durch weitere Färbungen mit zellulären Standardmarkern wurden daraus schließlich die Proben herausgefiltert, die durch das Vorhandensein von neuronalen und glialen Zellelementen für die geplanten Untersuchungen infrage kamen. Entsprechend heterogen fiel die Patientenkolorte hinsichtlich der Zeitpunkte der Myelolyseoperationen aus (die Operationen erfolgten im Alter von 5 Monaten bis 46 Jahren). Dabei wurden zwölf Patienten auf vergleichbare Art und Weise bei der primären und sekundären Operation versorgt (die Informationen zu den einzelnen operativen Schritten wurden aus den vorliegenden Operationsberichten ermittelt; von zwei Patienten lagen dabei keine Operationsberichte vor). Trotz der Altersunterschiede der Patienten konnte vom operativen Aspekt her davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Gewebeproben bezüglich der Anatomie vergleichbar waren. Ebenso im Hinblick auf die klinischen Gesichtspunkte war das untersuchte Patientenkollektiv insofern homogen, als dass alle Betroffenen vor der Operation symptomatisch wurden. Das heißt, es lagen typische neurologische oder urologische Problematiken vor, die im Verlauf nach der primären MMC-Versorgung entweder neu auftraten oder sich zunehmend verschlechterten.

Bei der Analyse der Expressionsmuster der verschiedenen Gewebemarker wurde deutlich, dass alle TC-Gewebeproben signifikant erhöhte GFAP- und Vimentin-Immunreaktivitäten im Vergleich zu den Kontrollgeweben aufwiesen. Dabei wurden auch morphologisch Astrozyten mit typischen Aktivierungsmerkmalen nachweisbar. Ähnliche zelluläre Veränderungen wurden in vorangegangenen Analysen in Gewebeproben nachgewiesen, die bei der primären operativen Versorgung der offenen spinalen Dysraphie (MMC) gewonnen wurden (25, 60-64).

Neben dem Nachweis von aktivierte Astrozyten in ausgeprägt gliotischen Zellverbänden war das Auftreten von Monozyten und aktiverter Mikroglia ein weiterer Hinweis darauf, dass entzündlichen Prozesse bei dem „Symptomatischwerden“ eines Tetherings eine wichtige Funktion zukommen könnte. Im Vergleich zu den Kontrollgeweben zeigten die meisten TC-Gewebeproben eine Färbung von inflammatorischen Markern wie CD3, CD68 und CD11b in runden Zellen, die morphologische Eigenschaften von aktivierte Mikrogliazellen, Monozyten oder Makrophagen aufwiesen. Diese Veränderungen könnten dabei als globale zelluläre Antwort auf die durch die Zugkräfte verursachten Schäden im Rahmen eines Tetherings interpretiert werden. Die vorgelegte Arbeit liefert damit erstmalig Hinweise dafür, dass bei einem TCS ähnliche zelluläre Veränderungen nachweisbar werden, die auch im Rahmen sekundärer Schadenskaskaden nach einem spinalen Trauma auftreten können (65, 66).

Die ebenfalls detektierbare Induktion von IL-1 β und TNF- α sowie deren Rezeptoren auf immunhistochemischer und mRNA-Ebene unterstützte diese Hypothese. Diese vornehmlich inflammatorischen Moleküle werden zusammen mit anderen Zytokinen und Chemokinen bekanntermaßen als Reaktion auf eine Vielzahl von pathologischen Einflüssen auf das zentrale Nervensystem früh und langanhaltend aktiviert (67). Sie sind u.a. in das Rekrutieren von weiteren Immun- und Entzündungszellen, der Ausbildung von Narbengewebe (d.h. die Ausbildung von zum Gesunden hin abschirmenden gliotischen Zellrändern) (65), sowie die Induktion von apoptotischen Prozessen involviert (68, 69). Letztere wurden auch in der vorgelegten Arbeit in weiteren Untersuchungen nachweisbar.

In diesem Zusammenhang ist ein weiteres wichtiges Ergebnis der Nachweis von TNF- α und des zugehörigen Rezeptors auf hohem, signifikant induzierten Immunreaktivitäts- und mRNA-Niveaus. TNF- α ist ein potenter inflammatorischer Mediator mit pro-apoptotischen Eigenschaften (36, 70). So wie bei Rückenmarktraumata könnten apoptotische Prozesse ebenfalls eine Rolle in Läsionskaskaden spielen, die durch Zug oder durch die veränderte Mikroumgebung in postoperativen Narbenstrukturen der Neuroplakode nach MMC-Deckung induziert werden. Hinweise lieferten diesbezüglich die TUNEL- und cPARP-Färbergebnisse der vorliegenden Arbeit. Für TNF-alpha konnte insbesondere ein rascher Expressionsanstieg in der

experimentellen Rückenmarksverletzung in der Ratte gezeigt werden, dieser wurde ca. eine Stunde nach stattgehabtem Trauma nachweisbar, daraufhin erfolgte der Nachweis sogenannter „Initiator“-Caspasen, insbesondere Caspaspe-8 und -9, ca. 6 Stunden nach dem Trauma (71). TNF1-alpha wirkt insbesondere über den sogenannten Todesrezeptorsignalweg. Es ermöglicht über das Adapterprotein FADD (Fas-Associating Protein with Death Domain) die Rekrutierung von Procaspsase-8 an den CD-95-Rezeptor-Ligand-Komplex DISC (death inducing signaling complex). Dadurch wird Procaspsase-8 autoproteolytisch aktiviert und kann somit die Caspasekaskade starten (72). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass neben inflammatorischen Kaskaden und hypoxie-vermittelten Prozessen auch apoptotische Vorgänge einen neurologischen Funktionsverlust beeinflussen könnten, wie er bisher in Modellen zur Rückenmarksverletzung beobachtet werden konnte (73).

Ein weiteres relevantes Ergebnis unserer Studie war die Koexpression der untersuchten proinflammatorischen sowie proapoptotischen Zytokine mit HIF-1a- sowie HIF-2a-Immunreaktivitäten in den TC-Gewebeproben, die auf erhöhtem Immunreaktivitätsniveau in den TC-Geweben nachweisbar wurden. Hypoxia-inducible-factors können als sensible Marker für klinisch relevante hypoxische/ischämische Zustände betrachtet werden (74). Wie in der Einleitung dargelegt, liegen Hinweise aus experimentellen Studien vor, nach denen ischämischen Prozessen und einem damit gestörten Energiestoffwechsel bei der Entstehung des TCS eine wichtige Rolle zukommt (17, 18, 22, 23, 69). So nutzten Dolan et al. experimentelle in-vivo Streckvorrichtungen an Katzen, mit denen nachgewiesen werden konnte, dass der infolgedessen auftretende ischämische Zustand ein essentieller Faktor in der Pathophysiologie des Tethered Cord Syndroms ist (17). In Korrelation zur angewandten Kraft, die auf die neuralen Strukturen ausgeübt wurde, zeigten sich dabei ein signifikant verringelter Blutfluss in den angehefteten Rückenmarksegmenten (besonders in der grauen Substanz) und verringerte spinal evozierte Potenziale (17). Diese Ergebnisse untermauerten die Befunde von Schneider et al., die mit Hilfe von intraoperativen Monitoringverfahren während Myelolyseoperationen in Patienten einen verbesserten Blutfluss in den betreffenden Rückenmarkabschnitten nach dem operativen Lösen demonstrierten konnten (21).

Hinsichtlich der Ergebnisse der vorgelegten Arbeit, dass HIFs koexprimiert mit inflammatorischen Zytokinen in den TC-Geweben nachweisbar wurden, ist die Studie von Imtiyaz et al. zu erwähnen, die zeigte, dass TNF-a und Interleukin-1-beta die Akkumulation und die Transkriptionsaktivität von HIFs steigern können (37). Da dem TCS eine Hypoxie durch Traktionskräfte zugrunde liegen kann, erscheint die Möglichkeit zur weiteren Induktion pro-inflammatorischer Zytokine die These bezüglich eines second-hit-Theorems in der spinalen

Dysraphie zu unterstützen. Zudem können HIFs wiederum neuroprotektive Mediatoren wie Epo aktivieren, dieses erscheint bezüglich einer möglichen Antagonisierung dieser proinflammatorischen Aspekte interessant (75, 76).

Ebenso fanden Basu et al. in ihrer Studie mit genetisch veränderten Mäusen mit fehlendem Interleukin-1-Rezeptor heraus, dass nach hypoxischen Insulten in einem Schlaganfallmodell die Ausdehnungen der Läsionen verringert waren (35). Eine regulierende Seite des IL-1-beta Promoters beinhaltet unter anderem den Hypoxia-inducible-factor, der die Transkription der IL-1-mRNA in sehr frühen Stadien nach ischämischen Insulten ermöglicht (77, 78). Interleukin kann daher als früher Marker für neuronale Schäden betrachtet werden (67).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse bezüglich der erhöhten HIF-1a- und HIF-2a-Immunreaktivitäten in den untersuchten TC-Gewebeproben der vorgelegten Arbeit zusammen mit den Ergebnissen früherer Studien Hinweise dafür lieferten, dass die Hypoxie eine wesentliche Komponente des Schädigungskanons ist, der einem symptomatischen TC zugrunde liegen könnte (21-23). Mit dem aktuellen experimentellen Ansatz der vorgelegten Arbeit konnte nicht geklärt werden, wann die dargelegten zellulären und molekularen Veränderungen im klinischen Zeitverlauf nach der primären Operation (d.h. nach dem Verschluss der offenen Dysraphie) induziert werden. Zytokine und HIFs werden früh unter unterschiedlichen pathologischen Bedingungen im ZNS nachweisbar (67, 79).

So ist es nicht abwegig zu vermuten, dass auch durch die chirurgische Manipulation an sich eine Entzündungsreaktion angestoßen werden könnte. Allerdings benötigen einige der nachgewiesenen Mediatoren von den Signalkaskaden her mehr Zeit bis zur Expression als die eigentliche operative Manipulation an den neuralen Geweben andauert. Es gibt dabei bisher keine Studien, die die durch eine Operation bedingte Induktion inflammatorischer Mediatoren nach neurochirurgischen Eingriffen untersuchten. Es gibt lediglich Hinweise aus anderen medizinischen Disziplinen (bspw. Unfallchirurgie), die erhöhte Zytokin-Level (IL-1b, IL-6, nicht TNF-a) im Blut nach operativen Interventionen nachweisen konnten (80, 81). Dabei handelte es sich allerdings um operative Eingriffe (wie das Einbringen einer Hüftprothese), die nicht mit der mikrochirurgischen Operation einer Myelolyse vergleichbar waren.

Ein Nachteil der vorgelegten Arbeit, der hier ebenfalls zum Tragen kommt, war, dass kein Kontrollgewebe von asymptomatischen Patienten nach MMC-Operation zur Verfügung stand: Aufgrund fehlender Evidenz dafür, dass mit einer „prophylaktischen“ Myelolyse ein besserer klinischer Verlauf nach MMC-Operation erzielt werden kann, werden diese Eingriffe in der Regel nicht an klinisch asymptomatischen Patienten durchgeführt. Als Konsequenz lag kein entsprechendes Kontrollgewebe vor.

Nach einem spinalen Trauma werden Zytokine, Chemokine und aktivierte inflammatorische Zellen sowie astrogliale Veränderungen nicht nur zu frühen Zeitpunkten induziert, sondern bleiben bis weit in den chronischen post-traumatischen Verlauf entlang der spinalen Achse und darüber hinaus auf erhöhtem Expressionsniveau nachweisbar (30, 31, 82). Diese Expressionsmuster korrelierten mit dem Auftreten von typischen Spätkomplikationen (motorische Defizite, posttraumatische Schmerzen (siehe Einleitung Abschnitt 1.2) (30, 32). Vor diesem Hintergrund und in Zusammenschau mit den Ergebnissen bezüglich der Analysen von Gewebeproben, die während MMC-Operationen (25) und bei geschlossenen Dysraphien gewonnen wurden (83), kann die Hypothese formuliert werden, dass gliotische Veränderungen mit einhergehender Expression von spezifischen Entzündungsmediatoren auch ein wesentliches Element in der Pathogenese chronischer Funktionseinschränkungen bei Vorliegen einer Dysraphie darstellen. Das Wissen um den zeitlichen Verlauf dieser Läsionskaskaden (Wann werden sie induziert, wie lange dauern sie an?) ist eine Voraussetzung dafür, diese Aspekte in Zukunft gezielt in die Therapiestrategien der jeweiligen Dysraphien mit einzubeziehen. Die in der vorgelegten Arbeit identifizierten zellulären und molekularen Veränderungen könnten nun unter standardisierten Bedingungen eines adäquaten Tiermodells zu unterschiedlichen Zeitpunkten (von intrauterin zu postnatal) genauer untersucht werden, um bezüglich des optimierten Therapiezeitpunktes weitere Erkenntnisse zu erarbeiten (dieses wurde mittlerweile für die offene Dysraphieform der MMC umgesetzt und entsprechende Untersuchungen laufen derzeit in dem neurochirurgischen Forschungslabor des UKSH Kiel). Alternative Möglichkeiten, diese Fragestellungen weiter zu bearbeiten, könnten sich in Zukunft auch durch die Etablierung von experimentellen bildgebenden Verfahren („molecular imaging“) ergeben (84-86). Solche potentiellen bildgebenden Verfahren könnten zur Darstellung zeitabhängiger molekularpathologischer Prozesse *in situ* herangezogen werden und würden damit die Indikationsstellung bezüglich der Durchführung einer Myelolyse bei nicht eindeutiger klinischer Verschlechterung unterstützen können (84). Als Kandidaten für solche Surrogatmarker kämen nach den vorgestellten Ergebnissen das IL-1b und TNF-a sowie GFAP infrage.

5 Zusammenfassung

Die Studien über histopathologische und molekulare Veränderungen, die eventuell einem sekundären Tethered Cord Syndrom nach der operativen Versorgung einer Myelomeningozele zugrunde liegen könnten sind bisher überschaubar.

Daher lag der Fokus dieser Dissertation auf der Untersuchung von Gewebeproben, die während der Myelolyseoperationen von Patienten entnommen wurden, die nach der Geburt an einer Myelomeningozele operiert worden waren. Neben der Untersuchung der Gewebeproben von 12 Patienten wurden die klinischen Charakteristika bezüglich des präoperativen neurologischen Status, der Blasen- und Mastdarmfunktion sowie Kontrakturen und Spastiken der unteren Extremitäten und Bein- und Rückenschmerzen retrospektiv zusammengetragen. Zusätzlich wurden die spinalen MRT-Bilder hinsichtlich einer vorhandenen Syringomyelie und der Konuspositionen untersucht. Es wurden zelluläre Markerprofile etabliert. Auf histologischer Ebene wurden außerdem die Immunreaktivitäten von IL-1b/IL-1R1, TNF-a/TNF-R und HIF-1a/2a qualitativ und quantitativ densitometrisch analysiert. Weiterhin wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit zellulären Markern durchgeführt. Die Zytokine wurden auf mRNA-Ebene analysiert. Um apoptotische Zellen zu detektieren, wurden immunhistochemische Färbungen mit cPARP und TUNEL vorgenommen.

Bedeutende Ergebnisse dieser Untersuchungen waren der Nachweis von Monozyten, aktiverter Mikroglia und apoptotischen Zellen in den TCS-Gewebeproben. Diese Zellen zeigten sich koexprimiert mit IL-1b und TNF-a sowie deren Rezeptoren. Die untersuchten Zytokine IL-1b und TNF-a konnten in den TCS-Gewebeproben auf signifikant erhöhten Immunreaktivitätsniveaus und teilweise auch auf mRNA-Ebene signifikant erhöht nachgewiesen werden. Mittels der Färbungen mit Antikörpern gegen HIF-1a/-2a konnte die Induktion von Hypoxie-induzierten Faktoren bestätigt werden. HIF-1a/-2a zeigten sich koexprimiert mit IL-1b. Des Weiteren konnte durch TUNEL und PARP-positive Zellen in den TCS-Gewebeproben nachgewiesen werden, dass auch der apoptotische Zelltod eine Rolle in der Pathogenese des TCS spielt.

Durch unsere Studien konnten wir spezifische proinflammatorische und proapoptotische Mediatoren identifizieren, die neben der mechanischen Schädigung und der infolge entstehenden hypoxischen Zustände, einem sekundären Tethered Cord Syndroms nach postnataler operativer Behandlung einer Myelomeningozele zugrunde liegen könnten.

Die Prävention dieser Läsionskaskaden durch die Gabe von antiinflammatorischen und antiapoptotischen Faktoren in Kombination mit einer sorgfältigen, unkomplizierten und

effektiven Operationstechnik könnte zu einem besseren Outcome bei Patienten mit einem sekundären Tethered Cord Syndrom führen.

Aufgrund seiner bekannten und durch diverse Studien nachgewiesenen antiapoptotischen sowie antiinflammatorischen Eigenschaften und der bewiesenen klinischen Anwendbarkeit seiner nicht-hämatopoetischen rekombinanten Form, könnte Erythropoetin ein passendes Beispiel sein (87-89). Der potenzielle Effekt solcher Faktoren als adjuvante Therapeutika bei sekundären Tethered Cord Syndromen sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Yamada S, Won DJ, Pezeshkpour G, Yamada BS, Yamada SM, Siddiqi J, et al. Pathophysiology of tethered cord syndrome and similar complex disorders. *Neurosurg Focus*. 2007;23(2):E6.
2. Filippidis AS, Kalani MY, Theodore N, Rekate HL. Spinal cord traction, vascular compromise, hypoxia, and metabolic derangements in the pathophysiology of tethered cord syndrome. *Neurosurg Focus*. 2010;29(1):E9.
3. Bassuk AG, Craig D, Jalali A, Mukhopadhyay A, Kim F, Charrow J, et al. The genetics of tethered cord syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005;132A(4):450-3.
4. Lew SM, Kothbauer KF. Tethered cord syndrome: an updated review. *Pediatr Neurosurg*. 2007;43(3):236-48.
5. Herman JM, McLone DG, Storrs BB, Dauser RC. Analysis of 153 patients with myelomeningocele or spinal lipoma reoperated upon for a tethered cord. Presentation, management and outcome. *Pediatr Neurosurg*. 1993;19(5):243-9.
6. Hudgins RJ, Gilreath CL. Tethered spinal cord following repair of myelomeningocele. *Neurosurg Focus*. 2004;16(2):E7.
7. Safavi-Abbasi S, Mapstone TB, Archer JB, Wilson C, Theodore N, Spetzler RF, et al. History of the current understanding and management of tethered spinal cord. *J Neurosurg Spine*. 2016;25(1):78-87.
8. Guthkelch AN, Pang D, Vries JK. Influence of closure technique on results in myelomeningocele. *Childs Brain*. 1981;8(5):350-5.
9. Samuels R, McGirt MJ, Attenello FJ, Garces Ambrossi GL, Singh N, Solakoglu C, et al. Incidence of symptomatic retethering after surgical management of pediatric tethered cord syndrome with or without duraplasty. *Childs Nerv Syst*. 2009;25(9):1085-9.

10. Hertzler DA, 2nd, DePowell JJ, Stevenson CB, Mangano FT. Tethered cord syndrome: a review of the literature from embryology to adult presentation. *Neurosurg Focus.* 2010;29(1):E1.
11. Bowman RM, Mohan A, Ito J, Seibly JM, McLone DG. Tethered cord release: a long-term study in 114 patients. *J Neurosurg Pediatr.* 2009;3(3):181-7.
12. Shurtleff DB, Duguay S, Duguay G, Moskowitz D, Weinberger E, Roberts T, et al. Epidemiology of tethered cord with meningocele. *Eur J Pediatr Surg.* 1997;7 Suppl 1:7-11.
13. Tamburrini G, Frassanito P, Iakovaki K, Pignotti F, Rendeli C, Murolo D, et al. Myelomeningocele: the management of the associated hydrocephalus. *Childs Nerv Syst.* 2013;29(9):1569-79.
14. Shokei Yamada JS, Shoko Yamada. Anomalies of the spinal cord length and filum thickness. *Tethered cord syndrome in children and adults.* New York: Thieme; 2010.
15. Yamada S, Won DJ, Siddiqi J, Yamada SM. Tethered cord syndrome: overview of diagnosis and treatment. *Neurol Res.* 2004;26(7):719-21.
16. Yamada S, Colohan AR, Won DJ. Tethered cord syndrome. *J Neurosurg Spine.* 2009;10(1):79-80; author reply -1.
17. Dolan EJ, Transfeldt EE, Tator CH, Simmons EH, Hughes KF. The effect of spinal distraction on regional spinal cord blood flow in cats. *J Neurosurg.* 1980;53(6):756-64.
18. Tani S, Yamada S, Knighton RS. Extensibility of the lumbar and sacral cord. Pathophysiology of the tethered spinal cord in cats. *J Neurosurg.* 1987;66(1):116-23.
19. Kang JK, Kim MC, Kim DS, Song JU. Effects of tethering on regional spinal cord blood flow and sensory-evoked potentials in growing cats. *Childs Nerv Syst.* 1987;3(1):35-9.

20. Kocak A, Kilic A, Nurlu G, Konan A, Kilinc K, Cirak B, et al. A new model for tethered cord syndrome: a biochemical, electrophysiological, and electron microscopic study. *Pediatr Neurosurg.* 1997;26(3):120-6.
21. Schneider SJ, Rosenthal AD, Greenberg BM, Danto J. A preliminary report on the use of laser-Doppler flowmetry during tethered spinal cord release. *Neurosurgery.* 1993;32(2):214-7; discussion 7-8.
22. Yamada S, Zinke DE, Sanders D. Pathophysiology of "tethered cord syndrome". *J Neurosurg.* 1981;54(4):494-503.
23. Yamada S, Knerium DS, Mandybur GM, Schultz RL, Yamada BS. Pathophysiology of tethered cord syndrome and other complex factors. *Neurol Res.* 2004;26(7):722-6.
24. Maurya VP, Rajappa M, Wadwekar V, Narayan SK, Barathi D, Madhugiri VS. Tethered Cord Syndrome-A Study of the Short-Term Effects of Surgical Detethering on Markers of Neuronal Injury and Electrophysiologic Parameters. *World Neurosurg.* 2016;94:239-47.
25. Kowitzke B, Cohrs G, Leuschner I, Koch A, Synowitz M, Mehdorn HM, et al. Cellular Profiles and Molecular Mediators of Lesion Cascades in the Placode in Human Open Spinal Neural Tube Defects. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016;75(9):827-42.
26. Knerlich-Lukoschus F. Chemokines and their receptors: important mediators to be aware of in neuroregenerative approaches for spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2015;10(4):562-4.
27. Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 1995;18(3):130-6.
28. Knerlich F, Schilling L, Gorlach C, Wahl M, Ehrenreich H, Siren AL. Temporal profile of expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1beta and interleukin converting enzyme after cryogenic lesion of the rat parietal cortex. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;68(1-2):73-87.

29. Knerlich-Lukoschus F, Juraschek M, Blomer U, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Force-dependent development of neuropathic central pain and time-related CCL2/CCR2 expression after graded spinal cord contusion injuries of the rat. *J Neurotrauma.* 2008;25(5):427-48.
30. Knerlich-Lukoschus F, Noack M, von der Ropp-Brenner B, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. 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.* 2011;28(4):619-34.
31. Knerlich-Lukoschus F, von der Ropp-Brenner B, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Chemokine expression in the white matter spinal cord precursor niche after force-defined spinal cord contusion injuries in adult rats. *Glia.* 2010;58(8):916-31.
32. Knerlich-Lukoschus F, Krossa S, Krause J, Mehdorn HM, Scheidig A, Held-Feindt J. Impact of chemokines on the properties of spinal cord-derived neural progenitor cells in a rat spinal cord lesion model. *J Neurosci Res.* 2015;93(4):562-71.
33. Knerlich-Lukoschus F, Held-Feindt J. Chemokine-ligands/receptors: multiplayers in traumatic spinal cord injury. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:486758.
34. Wang XJ, Kong KM, Qi WL, Ye WL, Song PS. Interleukin-1 beta induction of neuron apoptosis depends on p38 mitogen-activated protein kinase activity after spinal cord injury. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(8):934-42.
35. Basu A, Lazovic J, Krady JK, Mauger DT, Rothstein RP, Smith MB, et al. Interleukin-1 and the interleukin-1 type 1 receptor are essential for the progressive neurodegeneration that ensues subsequent to a mild hypoxic/ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(1):17-29.
36. Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Watanabe S, et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2011;36(17):1350-8.

37. Imtiyaz HZ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;345:105-20.
38. McManus J. Staining Methods. Histologic and histochemical. New York: Harper; 1960.
39. Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(11):1349-53.
40. Sprinkle TJ. 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit Rev Neurobiol.* 1989;4(3):235-301.
41. Levitt P, Rakic P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol.* 1980;193(3):815-40.
42. Deck JH, Eng LF, Bigbee J, Woodcock SM. The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropathol.* 1978;42(3):183-90.
43. Duffy PE, Graf L, Rapport MM. Identification of glial fibrillary acidic protein by the immunoperoxidase method in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1977;36(4):645-52.
44. Schnitzer J, Franke WW, Schachner M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol.* 1981;90(2):435-47.
45. Yung WK, Luna M, Borit A. Vimentin and glial fibrillary acidic protein in human brain tumors. *J Neurooncol.* 1985;3(1):35-8.
46. Roessmann U, Velasco ME, Gambetti P, Autilio-Gambetti L. Neuronal and astrocytic differentiation in human neuroepithelial neoplasms. An immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1983;42(2):113-21.

47. Herpers MJ, Ramaekers FC, Aldeweireldt J, Moesker O, Slooff J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein- and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 1986;70(3-4):333-9.
48. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(10):3500-4.
49. Wiedenmann B, Kuhn C, Schwechheimer K, Waldherr R, Raue F, Brandeis WE, et al. Synaptophysin identified in metastases of neuroendocrine tumors by immunocytochemistry and immunoblotting. *Am J Clin Pathol.* 1987;88(5):560-9.
50. Gould VE, Wiedenmann B, Lee I, Schwechheimer K, Dockhorn-Dworniczak B, Radosevich JA, et al. Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunocytochemistry. *Am J Pathol.* 1987;126(2):243-57.
51. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 1992;116(1):201-11.
52. Shaw G, Osborn M, Weber K. Reactivity of a panel of neurofilament antibodies on phosphorylated and dephosphorylated neurofilaments. *Eur J Cell Biol.* 1986;42(1):1-9.
53. Kato H, Kogure K, Liu XH, Araki T, Itoyama Y. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 1996;734(1-2):203-12.
54. Roy A, Jana A, Yatish K, Freidt MB, Fung YK, Martinson JA, et al. Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(5):686-99.
55. Rojo JM, Bello R, Portoles P. T-cell receptor. *Adv Exp Med Biol.* 2008;640:1-11.

56. Mortusewicz O, Ame JC, Schreiber V, Leonhardt H. Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(22):7665-75.
57. Gown AM, Willingham MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(4):449-54.
58. Koh DW, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res.* 2005;52(1):5-14.
59. Yamada S, Won DJ. What is the true tethered cord syndrome? *Childs Nerv Syst.* 2007;23(4):371-5.
60. Qian BJ, You L, Shang FF, Liu J, Dai P, Lin N, et al. Vimentin regulates neuroplasticity in transected spinal cord rats associated with miRNA138. *Mol Neurobiol.* 2015;51(2):437-47.
61. Pineau I, Sun L, Bastien D, Lacroix S. Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain Behav Immun.* 2010;24(4):540-53.
62. Reis JL, Correia-Pinto J, Monteiro MP, Costa M, Hutchins GM. Vascular and apoptotic changes in the placode of myelomeningocele mice during the final stages of in utero development. *J Neurosurg Pediatr.* 2008;2(2):150-7.
63. Ribotta MG, Menet V, Privat A. Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice. *Acta Neurochir Suppl.* 2004;89:87-92.
64. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett.* 2014;565:30-8.

65. Herx LM, Rivest S, Yong VW. Central nervous system-initiated inflammation and neurotrophism in trauma: IL-1 beta is required for the production of ciliary neurotrophic factor. *J Immunol.* 2000;165(4):2232-9.
66. Bastien D, Lacroix S. Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury. *Exp Neurol.* 2014;258:62-77.
67. Basu A, Kraday JK, Levison SW. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res.* 2004;78(2):151-6.
68. Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, et al. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J Neuroinflammation.* 2012;9:65.
69. Huang SL, Peng J, Yuan GL, Ding XY, He XJ, Lan BS. A new model of tethered cord syndrome produced by slow traction. *Sci Rep.* 2015;5:9116.
70. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):45-65.
71. Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, et al. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 1999;16(10):851-63.
72. Adrain C, Slee EA, Harte MT, Martin SJ. Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem.* 1999;274(30):20855-60.
73. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, et al. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(5):422-9.

74. Dehne N, Brune B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp Cell Res.* 2009;315(11):1791-7.
75. Semenza GL. HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell.* 2001;107(1):1-3.
76. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(13):5680-4.
77. Minami M, Kuraishi Y, Yabuuchi K, Yamazaki A, Satoh M. Induction of interleukin-1 beta mRNA in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem.* 1992;58(1):390-2.
78. Legos JJ, Whitmore RG, Erhardt JA, Parsons AA, Tuma RF, Barone FC. Quantitative changes in interleukin proteins following focal stroke in the rat. *Neurosci Lett.* 2000;282(3):189-92.
79. Auron PE. The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9(3-4):221-37.
80. Baigrie RJ, Lamont PM, Kwiatkowski D, Dallman MJ, Morris PJ. Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg.* 1992;79(8):757-60.
81. Clementsen T, Krohn CD, Reikeras O. Systemic and local cytokine patterns during total hip surgery. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006;66(6):535-42.
82. Knerlich-Lukoschus F, von der Ropp-Brenner B, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Spatiotemporal CCR1, CCL3(MIP-1 α), CXCR4, CXCL12(SDF-1 α) expression patterns in a rat spinal cord injury model of posttraumatic neuropathic pain. *J Neurosurg Spine.* 2011;14(5):583-97.
83. Cohrs G, Drucks B, Synowitz M, Held-Feindt J, Knerlich-Lukoschus F. Expression Patterns of Hypoxia-Inducible Factors, Proinflammatory, and Neuroprotective Cytokines

- in Neuroepithelial Tissues of Lumbar Spinal Lipomas-A Pilot Study. World Neurosurg. 2020;141:e633-e44.
84. Sharma U, Pal K, Pratap A, Gupta DK, Jagannathan NR. Potential of proton magnetic resonance spectroscopy in the evaluation of patients with tethered cord syndrome following surgery. J Neurosurg. 2006;105(5 Suppl):396-402.
85. Song F, Tian M, Zhang H. Molecular imaging in stem cell therapy for spinal cord injury. Biomed Res Int. 2014;2014:759514.
86. Albadawi H, Chen JW, Oklu R, Wu Y, Wojtkiewicz G, Pulli B, et al. Spinal Cord Inflammation: Molecular Imaging after Thoracic Aortic Ischemia Reperfusion Injury. Radiology. 2017;282(1):202-11.
87. Arishima Y, Setoguchi T, Yamaura I, Yone K, Komiya S. Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. Spine (Phila Pa 1976). 2006;31(21):2432-8.
88. Hattermann K, Knerlich-Lukoschus F, Lucius R, Mehdorn M, Held-Feindt J. Erythropoietin and CCL3 antagonise their functional properties during neuroinflammation. Neurol Res. 2015;37(11):1025-8.
89. Yang L, Yan X, Xu Z, Tan W, Chen Z, Wu B. Delayed administration of recombinant human erythropoietin reduces apoptosis and inflammation and promotes myelin repair and functional recovery following spinal cord compressive injury in rats. Restor Neurol Neurosci. 2015;34(4):647-63.

7 Anhang

7.1 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



A.D. 1665

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Dr. med. Gesa Cohrs
Klinik für Neurochirurgie
UKSH, Campus Kiel
Arnold-Heller-Straße 3, Haus 41
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel
Telefon 0431 / 597-1809
Telefax 0431 / 597-5333
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 10. März 2015

AZ.:
Studienplan:

D 430/15 (bitte stets angeben)
Multimodale Charakterisierung geschlossener Dysraphien: Histologische und bildmorphologische Identifizierung potentieller begünstigender Faktoren der Tethered-Cord-Entwicklung bei Lipomyelomeningocele
Anschreiben, Projektbeschreibung; Informationsblatt und Einverständniserklärung für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material

Studienleiter und
Antragsteller:

Dr. Gesa Cohrs, UKSH, Campus Kiel

Antrag vom: 2. März 2015
Nachreichung vom: 3. März 2015 – Unterschrift des Klinikdirektors

Sehr geehrte Frau Kollegin Cohrs,

wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein.

Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als stellvertretenden Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

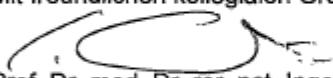
Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzugezeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Projektleiter und den an der Studie teilnehmenden Ärzten.
3. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass für eventuell in Zukunft weitere teilnehmende Zentren eine berufsrechtliche Beratung bei der jeweils für sie zuständigen Ethik-Kommission erforderlich ist.
4. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schluss-

folgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi
Stv. Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

7.2 Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Michael Synowitz für die Möglichkeit in seiner Klinik zu promovieren.

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Friederike Knerlich-Lukoschus, für die Überlassung des Themas. Ich bewundere ihr Engagement und ihren Optimismus, mit denen sie mich in den letzten Jahren begleitet hat, und hoffe für die Zukunft auf eine weitere fruchtbare Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Gesa Cohrs, die meine Arbeit über einen längeren Zeitraum begleitet hat, bedanken. Durch ihre wertvollen Hilfestellungen hat sie einen maßbeglichenen Beitrag zum erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit geleistet.

Ein weiterer Dank geht an Frau Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt für die Möglichkeit, die Laborräume zu nutzen. Weiterhin bedanke ich mich für ihre konstruktiven Anregungen, die zu meinem Fortkommen beigetragen haben.

Vielen herzlichen Dank an die Mitarbeiter des neurochirurgischen Labors Frau Fereshteh Ebrahim und Frau Brigitte Rehmke. Sie haben sich bei den Laborarbeiten immer Zeit für meine Sorgen und Probleme genommen und mich so bestmöglich unterstützt. Durch die liebenswerte Art der Beiden hat mir die Arbeit im Labor immer viel Spaß gemacht.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie für einfach alles danken – ohne sie wäre ich nicht bis hierhergekommen. Ein weiterer besonderer Dank gilt meiner Tochter Wilma, meinem Ehemann Sebastian und meinen besten Freunden für die gute Zeit.