

**Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen
Abteilung Hirnforschung
Abteilungsleiter: Professor Dr. R. Meyermann
Sektion für Immunpathologie des Nervensystems
Leiter: Professor Dr. H. Schlüsener**

**Der Einfluß eines nicht-steroidalen Antiphlogistikums
auf die Narbenbildung nach Rückenmarkverletzung**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Tina Elbert

**aus
Remseck am Neckar**

2005

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Schlüsener

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-P. Kaps

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
1.1	Pathogenese nach Rückenmarkverletzung	3
1.1.1	Der Arachidonsäurestoffwechsel	6
1.1.2	Die Cyclooxygenase	8
1.1.3	Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR)	10
1.2	Gliale Reaktion nach ZNS-Verletzung	10
1.2.1	Die gliale Narbe	11
1.3	Die gliale Narbe und ihre Barrierefunktion	12
1.4	Versuchsansätze zur Verringerung der Barrierefunktion der glialen Narbe	13
1.4.1	Hemmung der Kollagenbildung	13
1.4.2	Verminderung der Proteoglykanbildung	14
1.5	Ziel dieser Arbeit	14
2.	Material und Methoden	15
2.1	Versuchsgruppen	15
2.2	Studiendesign	16
2.2.1	Indometacin	17
2.2.2	Dosisfindung	18
2.3	Experimentelle Verletzung des Rückenmarks	19
2.3.1	Postoperative Phase	21
2.4	Gewebeasservierung	21
2.4.1	Perfusionsfixation unter Terminalnarkose	22
2.4.2	Gewebepräparation	22
2.4.3	Einbettung des Gewebes in Paraffin	23
2.4.4	Anfertigung von Gewebeschnitten	24
2.5	Immunhistochemie	25
2.5.1	Prinzip	25
2.5.2	Immunhistochemische Einfachfärbung	26
2.5.3	Immunhistochemische Doppelfärbung	30
2.6	Lichtmikroskopische Auswertung und quantitative Analyse	31
2.6.1	Einfachfärbung	31
2.6.2	Doppelfärbung	32
2.6.3	Extrazelluläre Matrix	32
2.6.4	Fotomikroskopie	32
2.7	Statistik	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	ZNS-Wirksamkeit der Indometacindosis nach Rückenmarkverletzung	34
3.1.1	Reduktion monozytärer Zellen	34
3.1.1.1	Die Expression von COX-1 in mononuklearen Zellen	34
3.1.1.2	Die Expression von COX-2 in mononuklearen Zellen	36
3.2	Indometacinpharmakotherapie verzögert und vermindert die Bildung von Narbengewebe nach Rückenmarkverletzung	39
3.2.1	Die zellulären Narbenanteile	39
3.2.1.1	Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP)	39

3.2.1.2	Expression von Vimentin	42
3.2.1.3	Expression von Nestin	43
3.2.1.4	Aktivierte Astrozyten	45
3.2.2	Die extrazellulären Narbenanteile	48
3.2.2.1	Definition der extrazellulären Matrix	48
3.2.2.2	Die extrazelluläre Narbenausdehnung 14 Tage nach Verletzung des Rückenmarks	49
4.	Diskussion	50
5.	Zusammenfassung	55
6.	Literaturverzeichnis	57
7.	Appendix	67
7.1	Puffer und Substratlösungen	67
7.1.1	TBS-Stammlösung (10x) (=Tris-Puffer)	67
7.1.2	Substratpuffer	67
7.1.3	Zitratpuffer (10x)	67
7.1.4	0,1 % Tris-BSA	67
7.1.5	3,3`-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB; Sigma)	68
7.1.6	Fast Blue BB (Sigma-Aldrich)	68
7.2	Abkürzungen	68
8.	Danksagung	70
9.	Lebenslauf	72

1. Einleitung

Jährlich erleiden in Deutschland ca. 1800 Menschen eine Verletzung des Rückenmarks. Für einen großen Teil dieser Patienten bedeutet dies eine Bindung an den Rollstuhl für den Rest ihres Lebens. Ihre Blasen- und Mastdarmfunktion ist eingeschränkt und die Sexualfunktion gestört. Bei einer Verletzung des Zervikalmarks auf der Höhe von C4 oder darüber müssen sie dauerhaft beatmet werden. Die Verletzung und ihre Folgen beeinflussen das gesellschaftliche und soziale Leben der betroffenen Patienten sowie deren persönliches Umfeld.

Die Entwicklung effektiver Behandlungsmethoden der Rückenmarkverletzungen wäre von großem Nutzen für diese Menschen.

1.1 Pathogenese nach Rückenmarkverletzung

Eine Verletzung des Rückenmarks entsteht primär durch Zug-, Druck- oder Stoßkräfte, die auf das Gewebe einwirken. Es kommt infolgedessen zu Einblutungen in das Gewebe, Ausbildung einer Nekrosezone und schließlich zu einer Entzündung des Nervengewebes. Die vielfältigen Reaktionen, die auf ein Trauma im zentralen Nervensystem folgen, bedingen einen Sekundärschaden, der weit über das Gebiet der primären Läsion hinausgeht (Tabelle 1). Der so entstandene Gewebeverlust wird teilweise durch eine gliale Narbe gedeckt.

Tabelle 1: Pathophysiologie der Rückenmarkverletzung (modifiziert nach Tator, 1995)

<p><u>Primärschaden</u> Zug, Druck, Stoß, Schnitt, Riss</p> <p><u>Sekundärschaden</u> Systemische Effekte (neurogener Schock) Herzfrequenz – kurzer Anstieg, dann Bradykardie Blutdruck – kurz hypertensiv, dann Hypotension Kardiale Auswurfleistung – vermindert; Folge: trophische Minderversorgung Katecholamine – ansteigend, dann vermindert Lokale vaskuläre Schädigung der Mikrozirkulation im Rückenmark Mechanischer Abriss von Kapillaren und Venolen Hämorrhagie Verlust der Mikrozirkulation – mechanisch, thrombotisch, vasospastisch Verlust der Autoregulation Biochemische Veränderungen Excitotoxizität – Glutamat Neurotransmitterakkumulation – Katecholamine (Noradrenalin, Dopamin) Arachidonsäurefreisetzung Produktion freier Radikale Produktion von Eikosanoiden – Prostaglandine Lipidfreisetzung Endogene Opiode Zytokine Elektrolytverschiebungen Erhöhtes intrazelluläres Kalzium Erhöhtes extrazelluläres Kalium Erhöhtes intrazelluläres Natrium Ödem</p>

In den ersten Minuten nach der Verletzung des Rückenmarks kommt es durch die zerstörten Blutgefäße und durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke zuerst zu petechialen Einblutungen in das Gewebe, dann zu ausgeprägten Hämorrhagien (Holtz, et al., 1990). Bedingt durch die Verletzung der Gefäße und der Gefäßwände, sowie durch die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-

Schranke, tritt Wasser in das Gewebe aus. Es bildet sich ein vasogenes Ödem (Chan et al., 1983; Sharma, 1993). Die posttraumatische Hypoperfusion (Sandler und Tator, 1976; Hall und Wolf, 1986), die Bildung von Mikrothromben und der Verlust der Autoregulation führt zu Ischämien im Bereich der Läsion, die sich im Verlauf weiter nach kranial und kaudal ausbreiten. Nach 24 Stunden werden die ersten nekrotischen Axone und Neurone sichtbar. Es wurde der Begriff „posttraumatischer Infarkt“ geprägt (Tator und Fehlings, 1991).

Über die defekte Blut-Hirn-Schranke wandern aus dem peripheren Blut neutrophile Granulozyten ein (Means und Anderson, 1983; Dusart und Schwab, 1993; Taoka et al., 1997). Während ihres Aufenthalts im Gewebe phagozytieren die neutrophilen Granulozyten Fremdkörper und Zellschutt, lockern die extrazelluläre Matrix auf (Campbell et al., 1982), schädigen Endothelien und sezernieren chemotaktische Substanzen, wodurch weitere Zellen aus dem peripheren Blut angelockt werden. Es folgt eine Invasion von Monozyten, die ebenfalls über die defekte Blut-Hirn-Schranke aus dem peripheren Blut eindringen. Die Monozyten wandeln sich im Gewebe überwiegend zu Makrophagen um. Zudem werden ortsständige Mikrogliazellen aktiviert (Carlson et al., 1998; Watanabe et al., 1999). Makrophagen (Nathan, 1987; Blight, 1992) und reaktive Mikrogliazellen phagozytieren nekrotisches Zellmaterial und sezernieren Wachstumsfaktoren und Zytokine. Während des erhöhten Zellstoffwechsels werden freie Sauerstoffradikale gebildet. Aus den Zellmembranen werden Phospholipide freigesetzt und durch Phospholipasen in freie Arachidonsäure umgewandelt, die schließlich als Substrat für die Bildung von Prostaglandinen und

Thromboxanen dient. So werden Entzündungsreaktionen in Gang gesetzt, die weiteres Nervengewebe zerstören können. Die freigesetzten Moleküle wirken zytotoxisch auf Nervenzellen (Banati et al., 1993). Die geschädigten Neurone zeigen ein aufgelockertes und mit Vakuolen gefülltes Zytoplasma. Die Nervenaxonstümpfe schwellen an (Dusart und Schwab, 1993), degenerieren (Waller-Degeneration; Zhang und Guth, 1997a) und demyelinisieren (Banik, 1980). Dort, wo sich Myelin von den Axonen gelöst hat, werden periaxonale Lücken sichtbar (Tator, 1995). Es kommt zum Zelltod von Neuronen und Gliazellen. Innerhalb der nächsten 24-48 Stunden weitet sich der Nekroseherd weiter aus, der Zellverlust vergrößert sich und somit auch die initiale Läsion. In den folgenden Tagen wird das nekrotische Material durch phagozytierende Zellen abgeräumt und zurück bleiben Höhlen mit zum Teil flüssigkeitsgefüllten Pseudozysten, die Syrinx (Zhang und Guth, 1997a; Zhang et al., 1997b).

1.1.1 Der Arachidonsäurestoffwechsel

Gewebeverletzung, oxidativer Stress, Zytokine oder Wachstumsfaktoren aktivieren die Phospholipase A_2 , die wiederum die Membranphospholipide zu freier Arachidonsäure hydrolysiert (Wolfe, 1982) (Abbildung 1). Die Cyclooxygenase, auch bekannt als Prostaglandin G/H Synthase, ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Metabolisierung von Arachidonsäure zu Prostanoiden (Prostaglandine und Thromboxane).

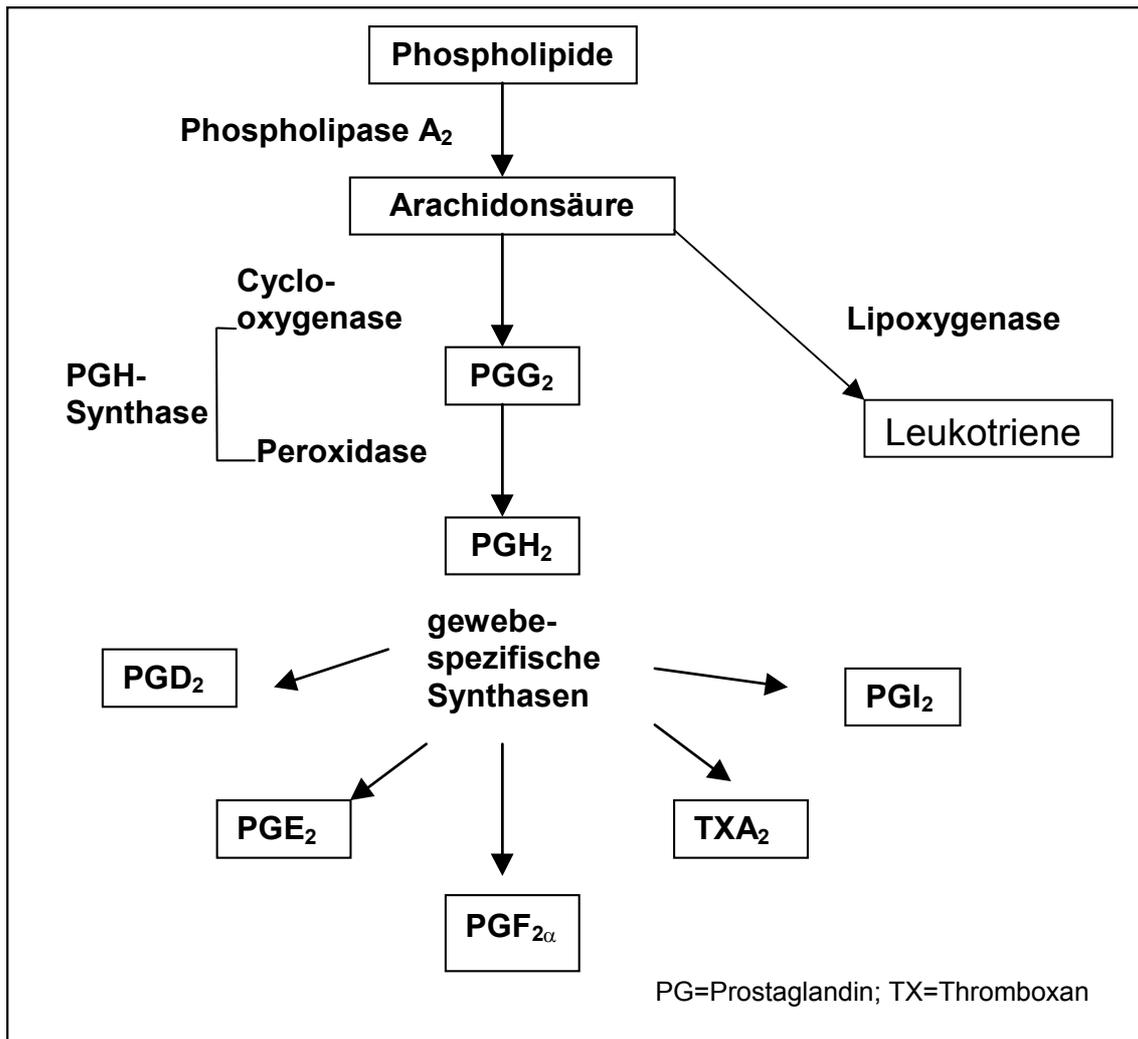


Abb.1: Der Arachidonsäuremetabolismus.

Die Phospholipase A₂ setzt aus den Phospholipiden die Arachidonsäure frei. Diese wird dann durch die Cyclooxygenase zu PGG₂ und durch die Peroxidase zu PGH₂ umgewandelt. Gewebespezifische Synthasen verwandeln PGH₂ zu weiteren Prostaglandinen und Thromboxan. Auf einem zweiten Weg wird die Arachidonsäure durch die Lipoxygenase zu Leukotrienen abgebaut.

Die Cyclooxygenase liegt in zwei Isoenzymen vor, Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2). Beide Enzyme katalysieren eine Cyclooxygenase- (bis-oxygenase) Reaktion, bei der Arachidonsäure zu Prostaglandin-G₂ oxygeniert wird, und eine Peroxidase-Reaktion, bei der Prostaglandin-G₂ zu

Prostaglandin-H₂ reduziert wird. Gewebespezifische Synthesen wandeln Prostaglandin-H₂ zu Prostaglandin-D₂, Prostaglandin-E₂, Prostaglandin-F_{2α}, Prostaglandin-I₂ (Prostazyklin) oder Thromboxan A₂ um (Needleman et al., 1986; Shimizu und Wolfe, 1990).

Die Prostaglandine beeinflussen viele physiologische wie auch pathologische Vorgänge im Organismus. Sie stellen wichtige Mediatoren in Signaltransduktionskaskaden dar, beeinflussen Entzündungsreaktionen und regulieren den Gefäßtonus und die Durchblutung verschiedenster Organe (Shimizu und Wolf, 1990; Funk, 2001).

Die Cyclooxygenase wird durch die Acetylsalicylsäure (Aspirin) und andere nicht-steroidale Antiphlogistika (Vane, 1971; Meade et al., 1993) sowie die neueren spezifischen COX-2 Blocker („Coxibs“; Fitzgerald und Patrono, 2001) blockiert.

Neben dem Cyclooxygenase-Weg wird die Arachidonsäure außerdem durch die Lipoxygenase zu Leukotrienen umgewandelt (Needleman et al., 1986).

1.1.2 Die Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase-1 und die Cyclooxygenase-2 gleichen sich zu ca. 60% in ihrer Primärstruktur (Xie et al., 1991; Jones et al., 1993). Obwohl diese Isoformen die gleiche Reaktion katalysieren und sich in ihrer Substratspezifität und Kinetik ähnlich sind (Smith und DeWitt, 1996a), gibt es Unterschiede im Vorkommen und der Verteilung. Die Cyclooxygenase-1 ist ein konstitutiv exprimiertes

Enzym, welches in fast allen Geweben und in Thrombozyten vorkommt (DeWitt, 1991; Feng et al., 1993). Die Cyclooxygenase-1 ist hauptsächlich für die physiologische Bereitstellung von Prostaglandinen, wie z.B. im Gastrointestinaltrakt, in den Nieren, den Ovarien, den Thrombozyten und den Gefäßwänden, verantwortlich (Vane und Botting, 1998). Die Cyclooxygenase-2 wird im gesunden Gewebe fast nicht exprimiert. Die Ausnahmen bilden die Ovarien (Sirois und Richards, 1992), das Gehirn (Feng et al., 1993) und Teile der Nieren (McKanna et al., 1998). Die Cyclooxygenase-2 ist ein rasch induzierbares Enzym, dessen Expression durch Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren, Hormone, bakterielle Endotoxine, Zytokine und Entzündungsmediatoren induziert werden kann (Hla und Neilson, 1992; Jones et al., 1993; Smith et al., 1996b). Die Cyclooxygenase-2 gilt in erster Linie als verantwortlich für die pathologische Produktion von Prostaglandinen, z.B. bei Entzündung, Schmerz, Fieber und Tumorwachstum.

In Gehirn und Rückenmark werden unter physiologischen Bedingungen die Cyclooxygenase-1 und -2 mRNA sowie deren Proteinprodukte konstitutiv exprimiert (Feng et al., 1993; O'Neill und Ford-Hutchinson, 1993). Nach einer mechanischen Verletzung des Rückenmarks wird die Cyclooxygenase-2 vermehrt exprimiert (Resnick et al., 1998). Zusätzlich finden sich in der Nähe des verletzten Gewebes vermehrt Cyclooxygenase-1⁺ Mikrogliazellen und Makrophagen (Schwab et al., 2000). Außerdem kann ein Anstieg der Prostaglandinproduktion beobachtet werden, was auf einen erhöhten Arachidonsäureumsatz hindeutet (Nishisho et al., 1996).

Die Arbeitsgruppe um D. L. Simmons hat eine weitere Cyclooxygenaseform, COX-3, im Gewebe des Hundes definiert (Chandrasekharan et al., 2002). Es handelt sich hierbei aber weniger um eine echte Isoform, sondern mehr um eine Splicevariante des COX-1 Gens (Warner und Mitchell, 2002). Die Rolle von COX-3 beim Menschen ist noch unklar und ob Effekte, die nicht durch COX-1 oder COX-2 zu erklären sind, auf COX-3 zurückzuführen sind, bleibt Gegenstand weiterer Forschungen (Schwab et al., 2003a; Schwab et al., 2003b).

1.1.3 Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR)

Aspirin (Acetylsalicylsäure) und nicht-steroidale Antirheumatika gehören zu einer Gruppe von Medikamenten, die analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch wirken. Einige Beispiele aus der Gruppe der NSAR sind Indometacin, Diclofenac, Ketorolac, Ibuprofen, Flurbiprofen, Naproxen und Piroxicam.

Die analgetische, antipyretische und antiphlogistische Wirkungen von Aspirin und NSAR beruhen auf der Hemmung der Cyclooxygenase und infolgedessen auf einer verminderten Prostaglandinsynthese (Mitchell et al., 1993; Vane und Botting, 1998).

1.2 Gliale Reaktion nach ZNS-Verletzung

Nach einer Verletzung des Rückenmarks reagiert das Gewebe mit der Reaktivierung von Neurogliazellen. Neben Oligodendrozyten-

vorläuferzellen, meningealen Zellen und Mikrogliazellen sind dies im besonderen die Astrozyten (Fawcett und Asher, 1999). Diese Zellen proliferieren und werden hypertroph. Ein Charakteristikum der reaktiven Astrozyten ist die vermehrte Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP) sowie der Intermediärfilamentproteine Vimentin (Calvo et al., 1991) und Nestin (Clarke et al., 1994), die sonst fast ausschließlich in embryonalem ZNS-Gewebe zu finden sind und nach dem Abschluß der Entwicklung verschwinden.

Die aktivierten Astrozyten sezernieren Kollagene, z.B. Kollagen IV, Proteoglykane, z.B. Chondroitinsulfat-Proteoglykan, Fibronectin, Laminin und Tenascin (Eddleston und Mucke, 1993; Fitch und Silver, 1997; Liesi und Kauppila, 2002). Zusätzlich setzen diese Zellen Arachidonsäuren frei, die wiederum zu Prostaglandinen umgewandelt werden und an der Entzündung mitwirken (Hartung et al., 1989).

Neben den Astrozyten sind auch reaktive Mikrogliazellen/Makrophagen und Oligodendrozyten reich an Proteoglykanen, die in das geschädigte Gewebe sezerniert werden (Jones und Tuszynski, 2002a; Jones et al., 2002b).

1.2.1 Die gliale Narbe

Die gliale Narbe setzt sich aus den zellulären und extrazellulären Narbenanteilen zusammen.

Zu den zellulären Anteilen zählen in erster Linie die Astrozyten. Ihre Zellfortsätze vernetzen sich über gap- und tight junctions zu einer dichten Struktur (Fawcett und Asher, 1999). Mit ihren langen

Fortsätzen ummanteln sie die Höhlen und Pseudozysten, die als Residualphänomene des Sekundärschadens bestehen (Dusart und Schwab, 1993). Desweiteren besteht der zelluläre Anteil der Narbe aus Mikrogliazellen, Fibroblasten, Oligodendrozyten und ihren Vorläuferzellen. Zwischen den Astrozyten bildet sich eine neue extrazelluläre Matrix aus einem Kollagen-Fibronektin-Komplex, elastischen Fasern und Proteoglykanen (Noble und Wrathall, 1985). An der Randzone zwischen gesundem und nekrotischem Gewebe bilden kollagen- und lamininhaltige Netzwerke eine neue Basalmembran (Bernstein et al., 1985; Stichel und Müller, 1998). Meningeale Zellen, die ebenfalls in diese Region einwandern, formen eine neue Glia limitans (Fawcett und Asher, 1999). Zirka 14 Tage nach der Verletzung des Rückenmarks ist der Höhepunkt der astroglialen Reaktion erreicht. Es hat sich die mature Narbe mit allen ihren Bestandteilen gebildet (Schwab und Bartholdi, 1996; Stichel und Müller, 1998). Die weitere Gestaltung des Narbengewebes kann sich noch Wochen und Monate fortsetzen.

1.3 Die gliale Narbe und ihre Barrierefunktion

Nach einer Verletzung des Rückenmarks, sowie auch des Gehirns, können sich die geschädigten Nerven nicht wieder regenerieren (Ramón y Cajal, 1928; Horner und Gage, 2000).

Geschädigte oder durchtrennte Nervenaxone, welche die Tendenz haben wieder auszusprossen, stoppen sobald sie auf gliales Narbengewebe treffen. Die Umgebung der Nervenzellen scheint für deren Wachstum von Bedeutung zu sein (Li und Raisman, 1995;

Davies et al., 1997). Das Narbengewebe stellt eine unüberwindbare Struktur dar. Die dichten Strukturen der glialen Narbe, insbesondere auch die Basalmembran, sind eine mechanische Barriere für aussprossende Nervenaxone (Feringa et al., 1980). Zahlreiche inhibitorische Moleküle in der Narbe stellen ein chemisches Hindernis für das Nervenwachstum dar. Dazu gehören unter anderem die Moleküle der extrazellulären Matrix, wie Tenascin (McKeon et al., 1991), Kollagen und Chondroitinsulfat-Proteoglykan (McKeon et al., 1995; Fidler et al., 1999).

1.4 Versuchsansätze zur Verringerung der Barrierefunktion der glialen Narbe

1.4.1 Hemmung der Kollagenbildung

Es wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um die chemischen und mechanischen Barrieren zu verringern.

Da die Basalmembran und ihre kollagenen Strukturen in der Narbe für regenerierende Axone unüberwindbar erscheinen, wurde in verschiedenen Ansätzen versucht, die Kollagenbildung durch Applikation von Antikörpern gegen Kollagen IV (anti-Coll-IV) oder Dipyrinol, ein Eisenchelator, der die Prolyhydroxylase und somit die Prokollagenbildung hemmt, zu reduzieren (Stichel et al., 1999; Hermanns et al., 2001). Tatsächlich konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass sich die Basalmembranbildung reduzieren ließ. Axone zeigten die Tendenz über das geschädigte Gewebe hinwegzuwachsen.

1.4.2 Verminderung der Proteoglykanbildung

Die Astrozyten im geschädigten Nervengewebe exprimieren verstärkt Proteoglykane, die, wie zuvor beschrieben, eine hemmende Wirkung auf die Nervenregeneration haben. In einem Versuchsansatz wurde rückenmarkgeschädigten Ratten Chondroitinase ABC intrathekal appliziert. Der Versuch hatte zum Ziel, die inhibitorische Wirkung der Proteoglykane abzuschwächen. Die Regeneration des Gewebes konnte beobachtet werden und es konnte gezeigt werden, dass die Tiere die motorische Funktion der zuvor gelähmten Hinterläufe wieder zurückerlangten (Bradbury et al., 2002).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Da der Entzündungsprozess im verletzten Rückenmarksgewebe ein entscheidender Faktor in der Zellaktivierung und nachfolgenden Narbenbildung darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Versuchsansatz entwickelt, der die Entzündung durch die Blockade der Cyclooxygenase im Arachidonsäurestoffwechsel hemmt.

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass das NSAR Indometacin zunächst aus dem systemischen Kreislauf in das Rückenmark gelangt und in der Läsion die Cyclooxygenase blockiert, und somit ZNS-wirksam ist. Darüberhinaus wird der Einfluss einer ZNS-wirksamen Indometacin-Pharmakotherapie auf die zelluläre und extrazelluläre Narbenbildung nach Rückenmarkverletzung untersucht.

2. Material und Methoden

Um eine Verletzung des Rückenmarks zu demonstrieren, wurde in einem Tiermodell Ratten eine experimentelle Verletzung ihres Rückenmarks zugefügt.

Der Versuch wurde durch die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Tübingen (HF 1/99) genehmigt.

2.1 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden randomisiert in folgende Gruppen aufgeteilt:

1. eine Indometacingruppe (Indo3) mit fünf Tieren, die posttraumatisch das Medikament Indometacin gelöst in Äthanol und verdünnt in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) erhielten und nach der Verletzung des Rückenmarks drei Tage überlebten.
2. eine dazugehörige Kontrollgruppe (Kontroll3) mit fünf Tieren, die posttraumatisch nur die Trägerlösung aus Äthanol und PBS ohne Indometacin erhielten und ebenfalls drei Tage überlebten.
3. eine weitere Indometacingruppe (Indo14) mit sieben Tieren, die posttraumatisch das Indometacin gelöst in Äthanol und verdünnt in PBS erhielten und 14 Tage überlebten.
4. eine dazugehörige Kontrollgruppe (Kontroll14) mit acht Tieren, die posttraumatisch die Trägerlösung erhielten und 14 Tage überlebten.

5. eine Gruppe mit fünf nativen Tieren, die am Rückenmark nicht verletzt waren, nicht operiert wurden und auch nicht das Medikament oder die Trägerlösung erhielten.

In dieser Studie wurden männliche Lewis Ratten (Inzucht; 250-280 g, Charles River, Sulzfeld und Harlan Winkelmann GmbH, Borchon) verwendet. Es wurden bewußt männliche Tiere gewählt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch den neuroprotektiven Effekt von Geschlechtshormonen im weiblichen Zyklus zu vermeiden. Die Tierhaltung erfolgte in Makrolonkäfigen (Techniplast) mit Sägemehleinstreu unter kontrollierten Bedingungen bei einer Temperatur von 22,7° C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % und einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus. Die Ratten erhielten Standardfutter in Pressform (Altromin, Lage a.d. Lippe) und Wasser ad libitum. Posttraumatisch wurde den paraplegischen Tieren milchfreier Grießbrei (Humana, Herford) zugefüttert.

2.2 Studiendesign

Indometacin ist ein unselektives nicht-steroidales Antirheumatikum, das sowohl die Cyclooxygenase-1 als auch die Cyclooxygenase-2 blockiert. Die Tiere der Indo3-Gruppe erhielten 10 mg Indometacin pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag (mg/kgKG/Tag). Die Tiere der Indo14-Gruppe erhielten zunächst dieselbe Dosis (10 mg/kgKG/Tag). Nach vier bis sechs Tagen verstarben einige Tiere der Indo14-Gruppe. Bei der Obduktion waren makroskopisch Ulzera und Blutungen der Magen- und Darmschleimhaut sichtbar, was auf

die typischen Nebenwirkungen von nicht-steroidalen Antirheumatika im Gastrointestinalbereich hindeutete. Die Dosis wurde daraufhin auf 1 mg Indometacin pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag reduziert und der Versuch wurde wiederholt. Als zusätzlicher Schutz der Magenschleimhaut wurde Antra (Omeprazol-Natrium, AstraZeneca; 0,57 mg/kgKG) per os gegeben. Laut Datenblatt des Herstellers bestehen keine Interaktionen von Antra mit Indometacin. Der Metabolismus von Äthanol wird nicht beeinträchtigt. Antra hat auch keine Nebenwirkungen im zentralen Nervensystem. Da Ratten nachtaktiv sind und den Hauptanteil ihrer Nahrungsaufnahme in der Dunkelphase tätigen, wurde Antra in 0,9 %iger Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; Braun, Melsungen; 0,5 ml pro Tier) gelöst und in die jeweilige Portion Grießbrei, die die Tiere erhielten, gerührt.

2.2.1 Indometacin

Indometacin (Cayman Chemical, USA) wurde laut Datenblatt des Herstellers in Äthanol (Merck, Darmstadt) in der Konzentration 6,5 mg/1ml gelöst. Bei einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht, entsprechend 2,5 mg bei einem Tiergewicht von 250 g, ergab sich ein Volumen von 0,4 ml 100 % Äthanol, in dem das Indometacin gelöst wurde. Die Lösung wurde mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Gibco, UK; pH 7,4) auf eine Endkonzentration von 13,3 % verdünnt, das entspricht einem Verhältnis von 1:7,5 oder einer PBS Menge von 2,6 ml. Die maximale Volumengabe von 3 ml pro Tag wurde gewählt, um das Herz-Kreislauf-System der Tiere nicht durch zuviel Flüssigkeit zu

belasten. Die Lösung wurde jeweils zur Hälfte morgens und abends intraperitoneal injiziert, um einen gleichmäßigen Pharmakoplasmaspiegel zu erreichen. Pro Injektion erreichten die Tiere eine Blutalkoholkonzentration von 0,65 ‰. Ratten verstoffwechseln 0,5 ‰ Alkohol innerhalb einer Stunde, so dass sich die Blutalkoholkonzentration relativ rasch wieder normalisierte. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten die gleiche Menge der Trägerlösung (Äthanol, ohne darin gelöstes Indometacin, verdünnt mit PBS). Nach der Reduktion der Indometacindosis in der Indo14-Gruppe auf 1 mg/kgKG wurden die Volumina für Äthanol und PBS wie zuvor beschrieben beibehalten.

2.2.2 Dosisfindung

Die Dosisfindung erfolgte anhand von Studien über die antientzündliche Potenz von Indometacin (Masferrer et al., 1994; Wallace et al., 1999). Es zeigte sich dabei, dass Indometacin in einer Dosis von 10 mg/kgKG/Tag die periphere Prostaglandinproduktion um ~100 % reduzierte. Die Dosis von 1 mg/kgKG/Tag reduzierte in den Vergleichsstudien die periphere Prostaglandinproduktion um ~80 %.

Indometacin hat im Vergleich zu den meisten anderen NSAR den wesentlichen Vorteil, dass es lipophil und liquorgängig ist (Bannwarth et al., 1989).

2.3 Experimentelle Verletzung des Rückenmarks

Die Methode der operativen Rückenmarkverletzung wurde aus einer früheren Studie von Schwab et al. übernommen (Schwab, J.M., Frei, E., Klusman, I., Schnell, L., Schwab, M.E., Schluesener, H.J. 2001. AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglia/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats. J. Neuroimmunol., 119, 214-222).

24 Stunden vor dem operativen Eingriff wurde die Rückenhaut der Versuchstiere enthaart. Zunächst wurde das Fell vom Nacken bis zum Steißbein ca. 6 cm breit mit einem Langhaarrasierer (Braun) entfernt. Danach wurde auf die rasierte Stelle Enthaarungscreme (Pilca med, AsidBonz GmbH, Böblingen) aufgetragen. Nach 10 Minuten Einwirkungszeit wurde die Creme unter fließend warmem Wasser abgespült. Auf die durch Pilca med leicht gereizte Haut wurde Feuchtigkeitsfluid (Esemtan, Schülke&Mayr, Norderstedt) aufgetragen.

Die Operation erfolgte unter einem OP-Mikroskop (Zeiss) in einem dafür ausgestatteten Tier-OP. Die Instrumente waren sterilisiert, die Hände, die Haut der Versuchstiere und der Arbeitsplatz waren desinfiziert.

Die Tiere erhielten eine kombinierte Inhalations- und Injektionsnarkose. Begonnen wurde mit Metofane (Methoxyfluran, Janssen-Cilag, Neuss), welches die Ratten inhalierten. Nachdem eine Narkosetiefe erreicht war, in der die Tiere nicht mehr auf äußere Reize reagierten, z.B. das Kneifen in die Hinterpfote oder das Streichen über die Wimpern, wurden zusätzlich 0,5 ml Ketanest

(Ketaminhydrochlorid, ParkeDavis, Berlin; 100 mg/kg) und 0,3 ml Rompun (Xylazinhydrochlorid 0,2 %, Bayer, Leverkusen; 2,4 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Um den Volumenverlust während des operativen Eingriffs möglichst gering zu halten, und um einen damit verbundenen hypovolämischen Schock zu vermeiden, erhielten die Tiere subcutan (s.c.) 3 ml Ringer Lactat (Braun, Melsungen). Da durch die Narkose der Lidschlussreflex vermindert ist, wurde zum Schutz der Hornhaut vor Austrocknung Oculotect Augengel (Retinolpalmitat, CIBA Vision, Großostheim) auf beide Augen aufgetragen.

Die enthaarte Haut wurde mit 70 % Alkohol (Merck) desinfiziert. Eine ca. 4 cm lange Hautinzision wurde dorsomedial entlang der Wirbelsäule mit einem Skalpell gesetzt. Der subcutan liegende Fettkörper wurde reponiert. Die Rückenmuskulatur der Thoraxwirbelsäule wurde von den Wirbelkörpern gelöst. Durch eine Bi-laminectomie des achten Brustwirbelkörpers (TH8) wurde das Rückenmark freigelegt. Nachdem die Durablätter eröffnet worden waren, wurde das Rückenmark mit einer feinen Iridectomieschere (FST, Heidelberg) von dorsal zu etwa 2/3 symmetrisch eingeschnitten. Motorische (Pyramidenbahn, extrapyramidale Bahnen) und sensorischen Nervenfasern (Hinterstränge) wurden dabei durchtrennt. Die Wunde wurde mit steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; Fresenius, Bad Homburg) gespült und schichtweise verschlossen. Die Hautnaht erfolgte mit der Einzelknopfnahntechnik und Vicryl 4-0 Faden (Ethicon, Norderstedt). Zur Stabilisierung des Kreislaufs erhielten die Tiere postoperativ 3 ml NaCl 0,9 % s.c.. Die Tiere wurden mit Temgesic (Buprenorphin 0,3 mg/ml, Essex Pharma, München; 9 µg/kg; 1:10 verdünnt in NaCl 0,9 %; s.c.)

analgetisch behandelt. Unmittelbar nach der Operation erhielten die Tiere die erste Gabe Indometacin. Die Kontrolltiere erhielten die Trägerlösung.

2.3.1 Postoperative Phase

Die analgetische Behandlung mit Temgesic s.c. zweimal am Tag wurde bis einschließlich drei Tage postoperativ fortgesetzt. Außerdem erhielten die Tiere zweimal täglich 3 ml NaCl 0,9 % s.c. und Indometacin oder die Trägerlösung. Da eine Verletzung des Rückenmarks auf Höhe TH8 mit einer Blasendysfunktion einhergeht, wurde den Tieren zweimal täglich, morgens und abends, manuell die Harnblase entleert. Die Harnblase wurde im Bereich des unteren Abdomens getastet und mit Zeige- und Mittelfinger vorsichtig massiert bis es zum Urinabgang kam. Die Tiere wurden in lauwarmem Seifenwasser gebadet, um Hautschäden durch Urinrückstände zu vermeiden.

2.4 Gewebeasservierung

Zur immunhistologischen Auswertung der Narbenbildung nach einer Rückenmarkverletzung wurden die Tiere der Indometacingruppe und der Kontrollgruppe drei bzw. 14 Tage postoperativ mit 4 %igem Formaldehyd (PFA, GIBCO, Frankreich) in PBS (pH 7,4) perfundiert. Der Untersuchungszeitpunkt drei Tage postoperativ wurde gewählt, um die beginnende Narbenbildung zu erfassen.

14 Tage postoperativ ist der frühestmögliche Zeitpunkt, um die mature Narbe nach Rückenmarkverletzung mit allen ihren Bestandteilen sicher zu beurteilen.

Zur besseren Bewertung der Zellaktivierung nach der Rückenmarkverletzung wurde das unverletzte Rückenmarksgewebe der nativen Tiere ebenfalls auf Höhe TH8 gewonnen.

2.4.1 Perfusionsfixation unter Terminalnarkose

Zunächst erhielten die Tiere eine terminale Inhalationsnarkose mit Diethyläther (Chinosol, Seelze) bis es zum Atemstillstand kam. Durch einen medianen Längsschnitt wurde die Haut über dem Thorax eröffnet und das Sternum freigelegt. Die Rippen wurden beiderseits vom Sternum abgesetzt. Nach dem Eröffnen der Thoraxhöhle wurden über die rechte Herzkammer 50 ml frisch angesetztes PFA perfundiert.

2.4.2 Gewebepräparation

Zur Präparation des Rückenmarks wurde dorsal die Haut über der Wirbelsäule vom Nacken bis zum Steißbein eröffnet. Die Wirbelsäule wurde zwischen Kreuzbein und Steißbein durchtrennt. Die paravertebrale Muskulatur wurde in ihrer gesamten Strecke von kaudal nach kranial durchtrennt. Die dorsalen Rippen wurden von den Wirbelkörpern abgesetzt. Am distalen Ende der Wirbelsäule wurde der Spinalkanal aufgesucht. Mit einer kleinen Schere wurde

seitlich, oberhalb des Rückenmarks, eingefahren und die Wirbelbögen wurden beiderseits des Rückenmarks durchtrennt. Der dorsale Anteil der Wirbelsäule wurde abgehoben. So wurde bis zum ersten Halswirbel fortgefahren. Vom Foramen magnum ausgehend wurde mit der Schere in der Medianlinie die Schädeldecke eröffnet und die Kalotte mit einer Pinzette abgehoben und entfernt. Frontal wurden die Riechorgane von der Lamina cribrosa getrennt. Das Großhirn wurde zusammen mit dem Kleinhirn aus der Schädelhöhle herausgehoben. Das Gehirn war weiterhin mit dem Rückenmark verbunden. Die Spinalnerven wurden kurz vor dem Foramen intervertebrale durchtrennt. Gehirn und Rückenmark wurden in toto entnommen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg), welches mit 4 %igem PFA in PBS (pH 7,4) gefüllt war, eingebracht und über Nacht fixiert. Das Gewebe wurde daraufhin weitere 24 Stunden in PBS (pH 7,4) gepuffert.

2.4.3 Einbettung des Gewebes in Paraffin

Das Gewebe wurde nach dem institutsüblichen Standardschema in Paraffin eingebettet und für immunhistochemische Zwecke dauerhaft asserviert. Dazu wurde das Gehirn unterhalb der Medulla oblongata vom Rückenmark abgesetzt. Das Kleinhirn wurde ebenso vom Großhirn getrennt. Nun wurden in der Frontalebene das Großhirn in vier, das Kleinhirn in zwei gleich dicke Scheiben geschnitten. Die ersten drei Großhirnscheiben wurden zusammen in eine Einbettkapsel A₁, die vierte Großhirnscheibe und die beiden Kleinhirnanteile in eine Kapsel A₂ gelegt und mit einem Deckel

verschlossen. Die Läsionstelle im Rückenmark wurde in einer Gesamtlänge von 1,5 cm vom kranialen und kaudalen Anteil des Rückenmarks abgesetzt. Die Läsionsstelle lag genau in der Mitte des Stückes. Der Läsionspart wurde danach im Längsschnitt geteilt, das restliche Rückenmark wurde quer geschnitten. Jeder Schnitt betrug ca. 8 mm. Die kranialen Querschnitte und der Läsionspart wurden zusammen in eine Kapsel B, die kaudalen Querschnitte des Rückenmarks in eine Kapsel C eingebracht und verschlossen. Immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet wurden in dieser Studie nur die Gewebeteile der Kapsel B.

Das Gewebe wurde über Nacht automatisch in einer Histokinette (Leica GmbH) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und bei 58° C in Paraffin eingebettet.

2.4.4 Anfertigung von Gewebeschnitten

Die Paraffinblöcke, in denen das Gewebe eingebettet lag, wurden bei -20° C für 10 Minuten vorgekühlt, um eine exakte Schnittdicke am Mikrotom zu erreichen. Anschließend wurden an einem Schlittenmikrotom (Mikrom, Heidelberg) 3 µm dünne Gewebeschnitte gefertigt und auf silanvorbeschichtete Objektträger aufgezogen. Die Silanbeschichtung gewährt eine bessere Haftung des Gewebes auf dem Objektträger während des Färbeprozesses. Die Schnitte wurden über Nacht zum Trocknen in einem Wärmeschrank bei 52° C belassen.

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 Prinzip

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) und der Meerrettichperoxidase oder der alkalischen Phosphatase als Indikatorenzym (Abbildung 2).

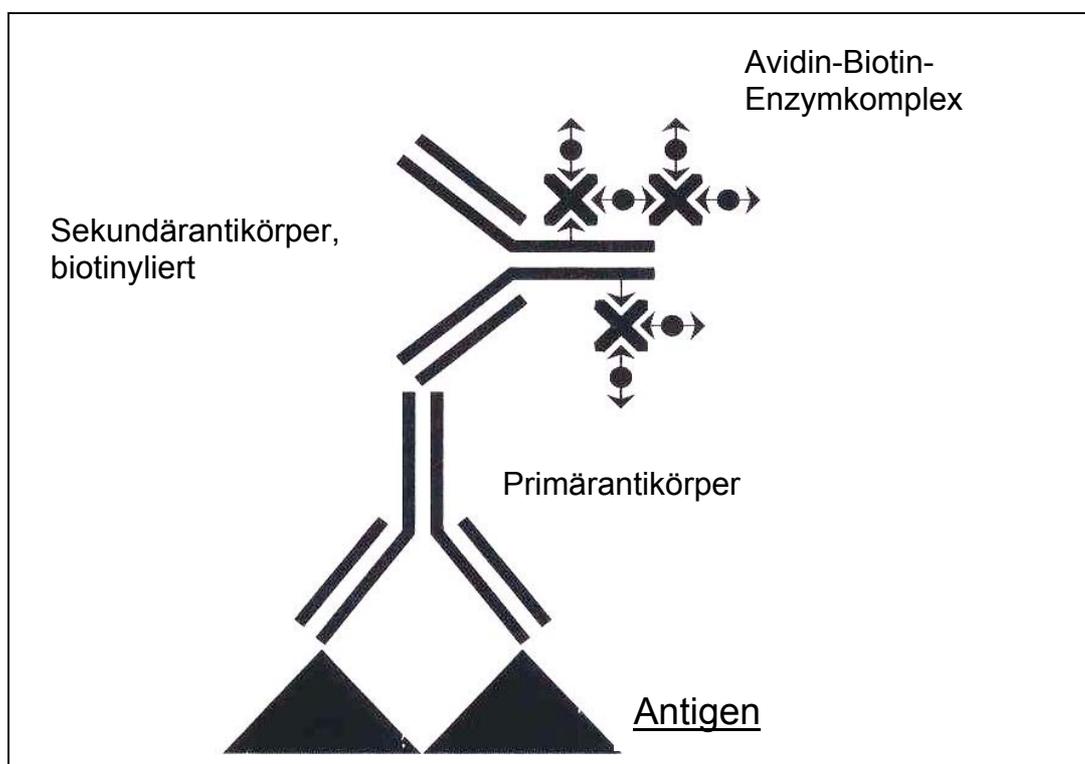


Abb. 2: Immunhistochemische Färbung nach der AB-Komplex-Methode.

An einen primären Antikörper wird über einen biotinylierten Sekundärantikörper der Avidin-Biotin-Enzym-Komplex gebunden. Das Enzym setzt das Chromogen um. Das gesuchte Antigen wird farbig sichtbar.

Diese Methode beruht auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle Biotin physikalisch zu binden. Es werden drei Reagenzien benötigt:

1. der Primärantikörper, spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet
2. der Sekundärantikörper, der an den ersten binden kann. Er ist mit Biotin konjugiert
3. der Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex, Dako, Hamburg), der mit Peroxidase oder alkalischer Phosphatase konjugiert ist.

Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und stellt so die Brücke zum AB-Komplex dar. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Die Meerrettichperoxidase wird mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Fluka, Buchs, Schweiz) als Chromogen unter zusätzlicher Verwendung eines Substratpuffers und dem Katalysator H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) sichtbar gemacht. Es entsteht ein braunes Farbprodukt. Fast Blue reagiert mit der alkalischen Phosphatase zu einem blauen Farbprodukt.

2.5.2 Immunhistochemische Einfachfärbung

Für die einfache Darstellung verschiedener Antigene wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC; DAKO) in Verbindung mit der Meerrettichperoxidase verwendet.

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte 30 Minuten in Chloroform (Merck) entparaffiniert, anschließend in einer

absteigenden Alkoholreihe (100 %, 100 %, 96 %, 70 %; Merck) rehydriert und für 5 Minuten in destilliertem Wasser (Aqua dest.) belassen. Formalin kann durch die Bildung von Aldehydvernetzungen die Bindung des Primärantikörpers behindern. Bei formalinfixierten Paraffinschnitten ist für fast jeden Antikörper eine Vorbehandlung notwendig, um falsch-negative Ergebnisse zu verhindern. Die Antigene wurden durch Erhitzen in Zitratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle (15 Minuten bei 600 Watt) demaskiert („retrieval“). Bei dem Antikörper Vimentin war laut Herstellerangaben und Protokoll keine Vorbehandlung notwendig. Nach dem Abkühlen der Schnitte auf Raumtemperatur wurden diese vom Zitratpufferbad in Aqua dest. überführt und dort für 5 Minuten belassen.

Die Substrat-Chromogenreaktion, die genutzt wird, um die Peroxidase sichtbar zu machen, kann nicht unterscheiden, ob es sich um die zugesetzte Peroxidase oder um die endogene Peroxidase handelt. Um ein falsch-positives Ergebnis zu verhindern, wurde die endogene Peroxidase irreversibel gehemmt. Dazu wurden die Schnitte für 15 Minuten in einem Bad aus 6 ml H₂O₂ (30 %) in 250 ml Methanol inkubiert. Danach wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült und für weitere 5 Minuten in TBS (pH 7,5) belassen.

Bei Zugabe des Chromogens soll eine unspezifische Hintergrundfärbung, d.h. eine positive Anfärbung eines Präparats, die nicht auf Antigen-Antikörper-Bindung beruht, verhindert werden. Die häufigste Ursache dafür ist die unspezifische Anlagerung von Antikörpern an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente der Präparate. Der Sekundärantikörper bindet trotzdem und es kommt zum falsch-positiven Signal. Durch Zugabe einer neutralen

Proteinlösung, hier ein 10 %iges Schweinenormalserum (Biochrom, Berlin; 1:10 verdünnt in Tris-BSA 0,1 %; 15 Minuten), vor der Inkubation des Primärantikörpers wird eine solche Anlagerung reduziert. Nach der Zugabe des Schweinenormalserums wurde überschüssige Flüssigkeit vom Objektträger abgeklopft, um eine weitere Verdünnung der Antikörper zu vermeiden. Der Primärantikörper (Tabelle 1) wurde auf die Schnitte aufgetropft und bei 4° C über Nacht inkubiert. Nach einem Waschvorgang in TBS folgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Tabelle 1) für 30 Minuten. Der Sekundärantikörper wurde korrespondierend zum Primärantikörper gewählt, z.B. Primärantikörper aus der Maus, Sekundärantikörper anti-Maus. Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex wurde für mindestens 30 Minuten vorinkubiert und anschließend den Schnitten zugefügt, um sich dann mit dem Biotinmolekül des Sekundärantikörpers zu verbinden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid als Chromogen sichtbar gemacht. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt und in einer Chlorwasserstoff-Lösung differenziert. Danach wurden die Schnitte unter fließendem Wasser gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, 100 %) dehydriert und für 15 Minuten in Xylol belassen. Abschließend wurde das Gewebe mit einem Deckglas (Langenbrinck, Emmendingen) und Eindeckmedium (Hico-Mic, Hirtz&Co., Köln) versiegelt. Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörperbindung wurden Negativkontrollen mitgeführt, bei denen der Primärantikörper nicht appliziert wurde. Durch die fehlende Inkubation des

Primärantikörpers konnte der biotinylierte Sekundärantikörper nicht gebunden werden, so dass keine Anfärbung stattfand.

Tabelle 1: Antikörper in der immunhistochemischen Färbung.

Primärantikörper	Verdünnung
Goat polyclonal Anti-Cyclooxygenase-1 (Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA)	1:400
Goat polyclonal Anti-Cyclooxygenase-2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)	1:400
Mouse monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (Chemicon, CA, USA)	1:500
Mouse monoclonal Anti-Vimentin (DAKO, Hamburg)	1:15
Mouse monoclonal Anti-Nestin (PharMingen, Hamburg)	1:100
Rabbit monoclonal Anti-Fibronectin (DAKO)	1:400
Mouse monoclonal Anti-Laminin (Chemicon)	1:200
Sekundärantikörper	Verdünnung
Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin (DAKO)	1:400
Biotinylated Rabbit Anti-Goat Immunoglobulin (DAKO)	1:400
Biotinylated Swine Anti-Rabbit (DAKO)	1:400

Alle Antikörper wurden mit 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA; Merck) in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS; 0,025 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5) verdünnt.

2.5.3 Immunhistochemische Doppelfärbung

Für die Darstellung der Ko-Expression verschiedener Antigene wurde die ABC-Methode in Verbindung mit der Meerrettichperoxidase sowie der alkalischen Phosphatase verwendet.

Gewebeständige Astrozyten wurden mit GFAP dargestellt. Zur weiteren Charakterisierung reaktiver Astrozyten wurden Antikörper gegen Vimentin und Nestin (Tabelle 1) eingesetzt. Bei der Kombination GFAP/Nestin wurde GFAP mit Fast Blue und Nestin mit DAB entwickelt. Da bei der Färbung mit dem Antikörper Vimentin das Gewebe zuvor einer Vorbehandlung in der Mikrowelle nicht unterzogen werden darf, wurde bei dieser Färbung zuerst mit Vimentin begonnen, das mit Fast Blue entwickelt wurde, und im zweiten Schritt der Antikörper GFAP zugefügt, der mit DAB entwickelt wurde.

Nach der Entparaffinierung der Schnitte in Chloroform und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100 %, 96 %, 70 %) wurden die Schnitte in einem Zitratpufferbad in der Mikrowelle für 15 Minuten erhitzt. Die Schnitte für die Anfärbung mit Vimentin wurden keiner Vorbehandlung unterzogen. Nach der Abkühlphase wurde die endogene Peroxidase mit H_2O_2 blockiert und eine unspezifische Hintergrundfärbung durch Inkubation mit 10 %igem Schweinenormalserum in 0,1 % Tris-BSA, wie zuvor beschrieben, verhindert. Der Primärantikörper (GFAP bzw. Vimentin) wurde den Präparaten zugefügt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers und des Alkalische-Phosphatase-Komplexes wurde die Antigen-Antikörper-Bindung mittels des Chromogens Fast-Blue BB durch blauen

Farbniederschlag sichtbar gemacht. Die Schnitte wurden erneut in Zitratpuffer in der Mikrowelle erhitzt, in H₂O₂ für 30 Minuten belassen und mit 10 % Schweinenormalserum inkubiert. Der zweite Primärantikörper (Nestin bzw. GFAP) wurde aufgetragen und über Nacht bei 4° C inkubiert. Nachdem der biotinylierte Sekundärantikörper (Tabelle 1) und der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex aufgetragen worden war, wurde mit DAB, wie zuvor beschrieben, entwickelt. Auch bei der Doppelfärbung wurden Negativkontrollen mitgeführt, bei denen das Schweinenormalserum belassen und der Primärantikörper nicht aufgetragen wurde.

2.6 Lichtmikroskopische Auswertung und quantitative Analyse

2.6.1 Einfachfärbung

COX-1⁺, COX-2⁺, GFAP⁺, Vimentin⁺ und Nestin⁺ Zellen mit deutlich erkennbarem Zellkern wurden an einem Mikroskop (Olympus BX40), das mit einem 4-, 10-, 20- und 40-fach Objektiv und Zähllokular (High-Power-Field, HPF) ausgestattet war, ausgezählt. Ein HPF ist in 10x10=100 Kleinstquadrate unterteilt. Pro Schnitt wurden 10 High-Power-Fields direkt in der Läsionstelle (periläsional) und 7,5 mm kaudal bzw. kranial davon (entferntere Areale) ausgezählt. Alle Schnitte wurden bei 20facher Vergrößerung ausgewertet. Ein HPF entspricht somit einer Fläche von 0,25 mm².

2.6.2 Doppelfärbung

In der immunhistochemischen Doppelfärbung wurden in der Läsion und in den entfernteren Arealen pro Fall jeweils 100 gefärbte Zellen ausgezählt. Es wurde der prozentuale Anteil der GFAP⁺/Vimentin⁻ oder GFAP⁺/Vimentin⁺ bzw. GFAP⁺/Nestin⁻ oder GFAP⁺/Nestin⁺ ermittelt.

2.6.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix wurde definiert als die längste und breiteste zusammenhängende Struktur, in welcher der ursprüngliche zelluläre Verbund aufgehoben ist. In diesem zellulären Verbund können auch Zellen mit eingeschlossen sein. Die Strukturen im Läsionspart, die dieser Definition entsprachen, wurden unter mikroskopischer Sicht in ihrer Länge und Breite ausgemessen.

2.6.4 Fotomikroskopie

Die angefärbten Schnitte wurden mit einem Fotomikroskop (Kamera: Olympus, C-35AD-4, Mikroskop: Olympus, AH3) auf einen Diafilm (Ektachrom 64T; Kodak) fotografiert.

2.7 Statistik

Die erhobenen Daten wurde mit der Computersoftware Graph Pad Prism Version 3.03 auf ihre Normalverteilung geprüft. Alle Daten entsprachen diesem Kriterium. Von den positiv gezählten Zellen in der Läsionsregion und in den entfernteren Arealen sowie von den Maßen der Längen- und Breitenausdehnung der extrazellulären Matrix wurde jeweils der Mittelwert gebildet und der Standardfehler berechnet ($MW \pm SF$). Das Ergebnis der Indometacingruppe wurde mit den Werten der Kontrolltiere verglichen. Die Signifikanz der Daten wurde anhand des ungepaarten zweiseitigen Student`s T-Test ermittelt. Ein Wert $p < 0,05$ galt als signifikant (*) und ein Wert $p < 0,0001$ galt als hochsignifikant (**).

3. Ergebnisse

3.1 ZNS-Wirksamkeit der Indometacindosis nach Rückenmarkverletzung

3.1.1 Reduktion monozytärer Zellen

Die Applikation von Indometacin über drei Tage (10 mg/kgKG/Tag; Indo3-Gruppe) bzw. über 14 Tage (1 mg/kgKG/Tag; Indo14-Gruppe) reduzierte die Entzündungsaktivität im verletzten Rückenmarksgewebe, gemessen an der Expression der Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1 und COX-2) in mononuklearen Zellen.

3.1.1.1 Die Expression von COX-1 in mononuklearen Zellen

Die Anzahl der läsionalen COX-1⁺ Zellen war bereits drei Tage nach Rückenmarkverletzung in der Indo3-Gruppe (31±2,6 Zellen) hochsignifikant ($p < 0,0001$) reduziert verglichen mit der Kontrollgruppe (53±4,5 Zellen) (Abbildung 3). Bis zum 14. posttraumatischen Tag stieg die Zahl COX-1⁺ monozytärer Zellen sowohl in der Kontroll14-Gruppe als auch in der Indo14-Gruppe weiter an. Durch die Indometacingabe ließ sich jedoch auch hier die Zahl COX-1⁺ monozytärer Zellen in der Indo14-Gruppe im Vergleich zur Kontroll14-Gruppe (117±7,1 Zellen versus 197±10,0 Zellen) hochsignifikant vermindern.

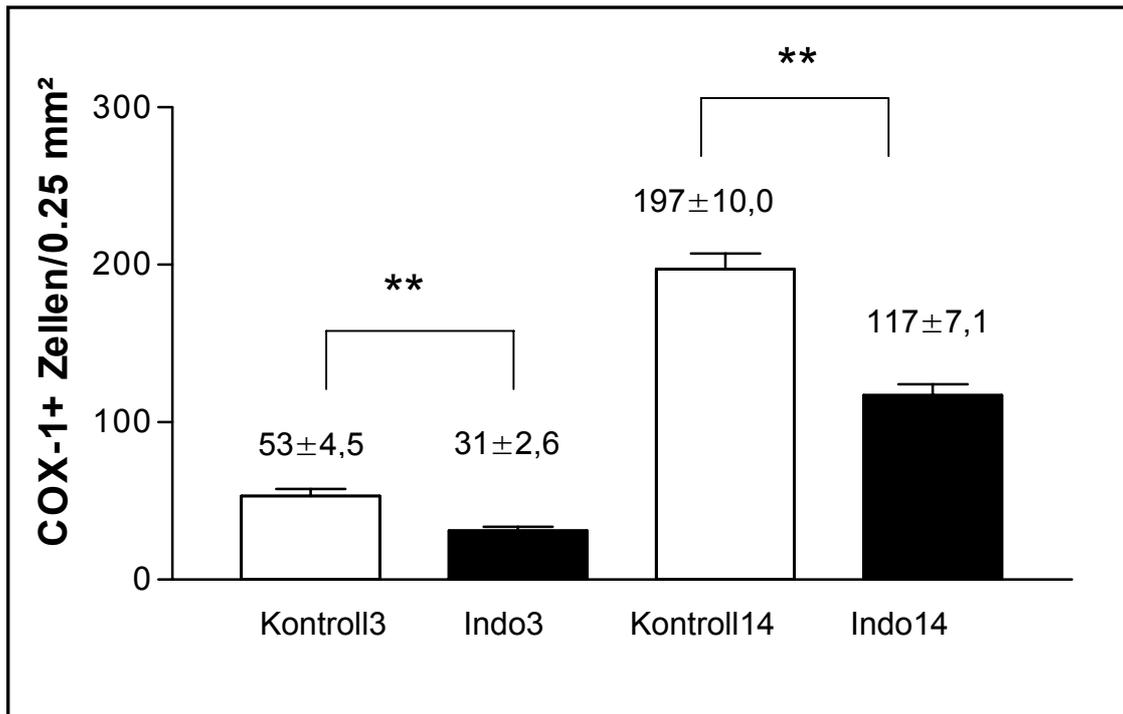


Abb. 3: COX-1⁺ monozytäre Zellen in der Läsion.

Indometacin (10 mg/kgKG/Tag bzw. 1 mg/kgKG/Tag; i.p.) reduzierte drei und 14 Tage posttraumatisch die Anzahl COX-1⁺ monozytärer Zellen hochsignifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Werte dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler (MW±SF) bezogen auf 0,25 mm².

In den entfernteren Arealen war die Anzahl COX-1⁺ Zellen sowohl in der Indometacingruppe als auch in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Läsionsarealen reduziert (Abbildung 4). COX-1 wurde drei Tage nach der Verletzung des Rückenmarks in der Indo3-Gruppe mit 18±1,6 Zellen signifikant geringer exprimiert als in der Kontroll3-Gruppe (24±1,9 Zellen). Nach 14 Tagen betrug die Zahl COX-1⁺ Zellen in der Indo14-Gruppe 55±2,6 Zellen und in der Kontroll14-Gruppe 65±4,0 Zellen. Das Ergebnis war signifikant.

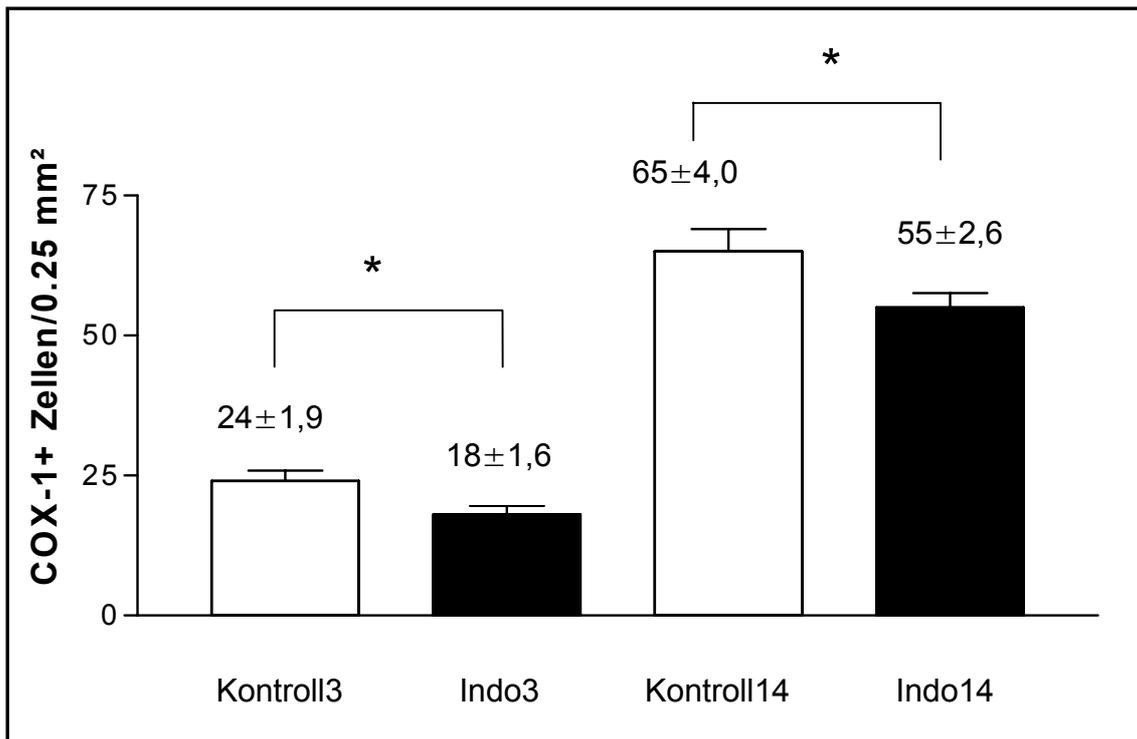


Abb. 4: COX-1⁺ monozytäre Zellen in den entfernten Arealen.

Indometacin (10 mg/kgKG/Tag bzw. 1 mg/kgKG/Tag; i.p.) reduzierte drei und 14 Tage posttraumatisch die Zahl COX-1⁺ monozytärer Zellen in den entfernten Arealen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Werte dargestellt als MW±SF bezogen auf 0,25 mm².

3.1.1.2 Die Expression von COX-2 in mononuklearen Zellen

Indometacin ist ein COX-1 und -2 blockierendes NSAR. Drei Tage nach der experimentellen Verletzung des Rückenmarks hatte sich durch Indometacin COX-2 in der Läsion von 23±1,8 Zellen in der Kontroll3-Gruppe auf 18±1,2 Zellen in der Indo3-Gruppe reduziert (Abbildung 5). Das Ergebnis war mit p<0,05 signifikant. Am 14. posttraumatischen Tag war die Reduktion deutlicher erkennbar. Die Anzahl COX-2⁺ Zellen lag in der Indo14-Gruppe im Mittel bei

25±1,0 Zellen/0,25 mm², in der Kontroll14-Gruppe im Mittel bei 41±1,5 Zellen/0,25 mm². Das Ergebnis war mit p<0,0001 hochsignifikant.

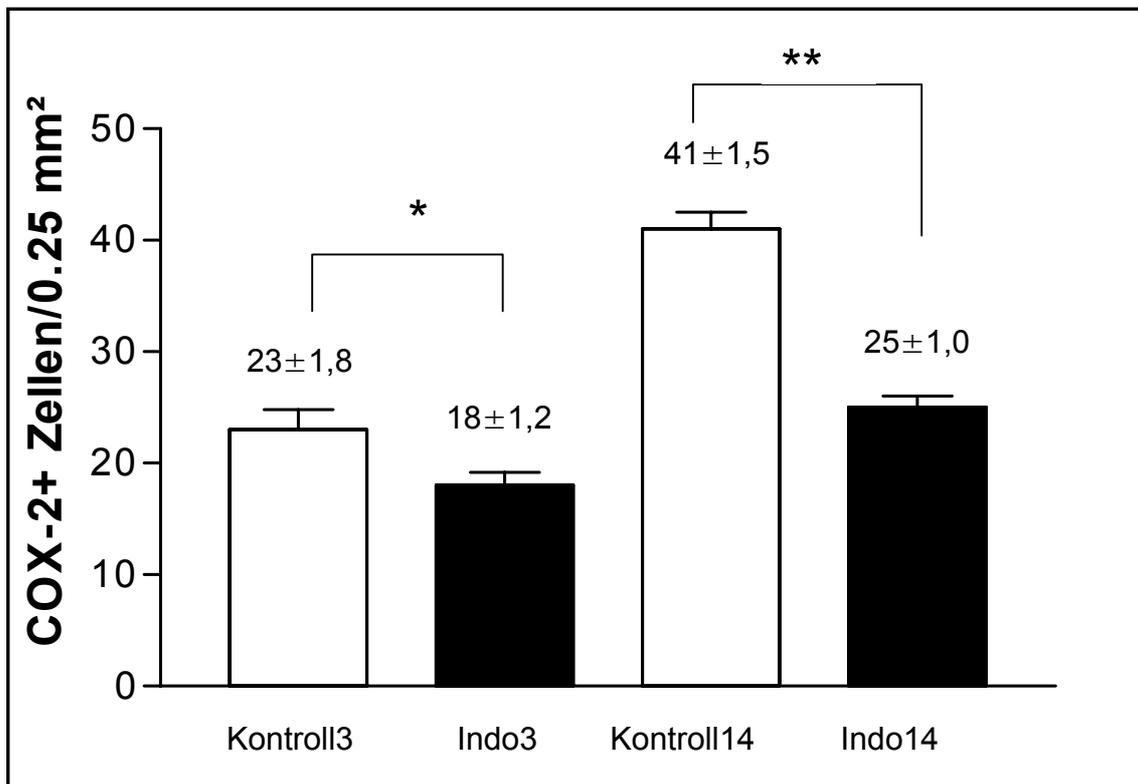


Abb. 5: COX-2⁺ monozytäre Zellen in der Läsion.

Drei und 14 Tage posttraumatisch reduzierte Indometacin die Anzahl COX-2⁺ monozytärer Zellen in der Läsion signifikant bzw. hochsignifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Werte dargestellt als MW±SF bezogen auf 0,25 mm².

In den entfernteren Arealen war sowohl drei Tage posttraumatisch als auch 14 Tage nach der Rückenmarkverletzung eine hochsignifikante Reduktion COX-2⁺ Zellen unter der Indometacintherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar (Abbildung 6). In

der Indo3-Gruppe lagen die Werte bei $18 \pm 1,2$ Zellen/ $0,25 \text{ mm}^2$ und in der Indo14-Gruppe bei $17 \pm 0,9$ Zellen/ $0,25 \text{ mm}^2$. In der Kontroll3-Gruppe lagen die Werte bei $28 \pm 2,2$ Zellen/ $0,25 \text{ mm}^2$ und in der Kontroll14-Gruppe bei $26 \pm 1,2$ Zellen/ $0,25 \text{ mm}^2$.

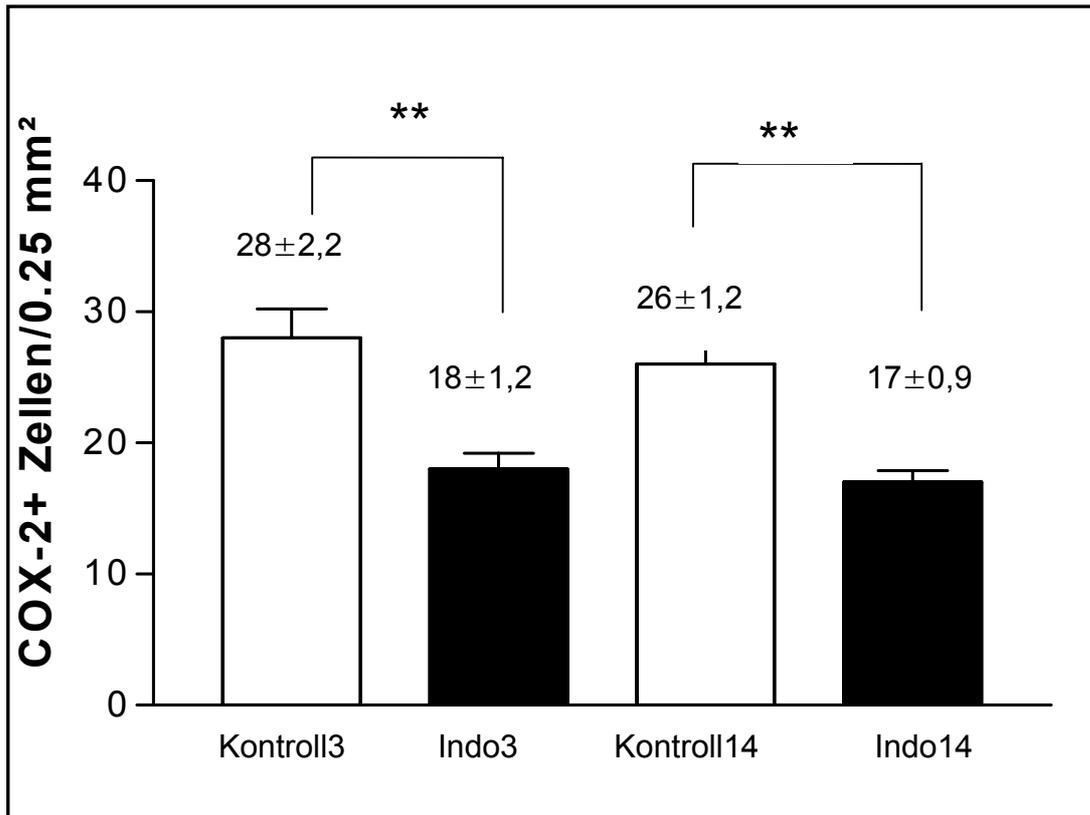


Abb. 6: COX-2⁺ monozytäre Zellen in den entfernten Arealen.

Indometacin reduzierte drei und 14 Tage posttraumatisch die Anzahl COX-2⁺ monozytärer Zellen in den entfernten Arealen hochsignifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Werte dargestellt als $MW \pm SF$ bezogen auf $0,25 \text{ mm}^2$.

3.2 Indometacinpharmakotherapie verzögert und vermindert die Bildung von Narbengewebe nach Rückenmarkverletzung

3.2.1 Die zellulären Narbenanteile

3.2.1.1 Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP)

Das saure Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein; GFAP) ist ein spezifischer Marker, um Astrozyten darzustellen.

In den nativen Tieren, die keine Verletzung des Rückenmarks aufwiesen, wurden im Mittel $31 \pm 1,8$ GFAP⁺ Astrozyten pro $0,25 \text{ mm}^2$ gezählt. Nach der Rückenmarkverletzung stieg die Anzahl der Astrozyten in der Läsion auf das Doppelte des Normalwertes an. Das wurde ersichtlich im Gewebe der Kontrollgruppen (Abbildung 7).

Die Zahl GFAP⁺ Astrozyten betrug drei Tage posttraumatisch $59 \pm 3,3$ Zellen pro $0,25 \text{ mm}^2$ in der Kontroll3-Gruppe. In den folgenden Tagen stieg die Zahl GFAP⁺ Astrozyten in der Kontroll14-Gruppe nicht mehr wesentlich an und betrug 14 Tage posttraumatisch $58 \pm 2,0$ Zellen pro $0,25 \text{ mm}^2$. Indometacin reduzierte sowohl drei wie auch 14 Tage posttraumatisch die Astrozyten um etwa die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es wurde dabei in etwa das Niveau des gesunden Gewebes erreicht. In der Indo3-Gruppe wurden $25 \pm 1,8$ GFAP⁺ Zellen pro $0,25 \text{ mm}^2$ gezählt. In der Indo14-Gruppe waren dies $35 \pm 1,5$ Zellen pro $0,25 \text{ mm}^2$.

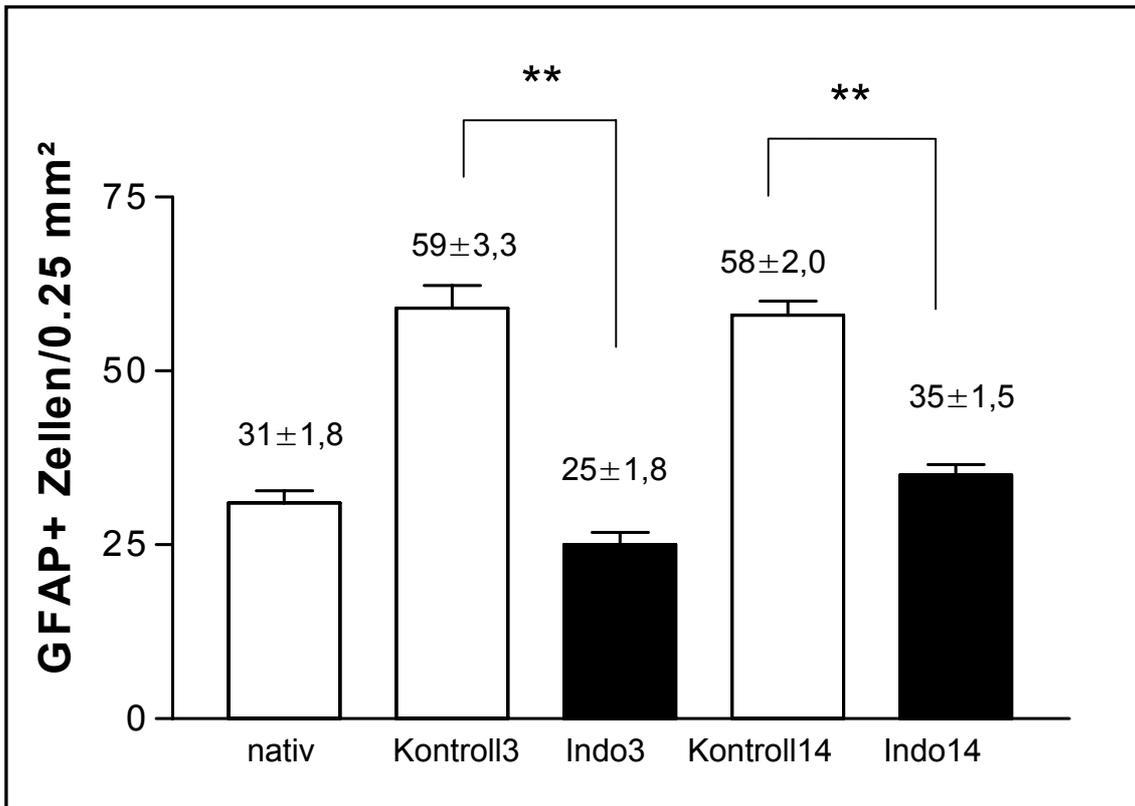


Abb. 7: GFAP⁺ Astrozyten in der Läsion.

Nach einer Verletzung des Rückenmarks stieg die Anzahl der Astrozyten auf fast das Doppelte an, im Vergleich zum normalen Gewebe unverletzter Tiere. Indometacin reduzierte die Zahl GFAP⁺ Astrozyten um die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe und erreichte ungefähr das Niveau der Astrozytenanzahl im gesunden Gewebe.

Werte dargestellt als MW±SF bezogen auf 0,25 mm².

In den entfernteren Arealen hatte die Gabe von Indometacin bis drei Tage posttraumatisch keinen signifikanten Einfluss auf die Astrozytenanzahl im Gewebe (Kontroll3: 32±2,0 Zellen versus Indo3: 32± 2,2 Zellen pro 0,25 mm²) (Abbildung 8). Bis 14 Tage posttraumatisch stieg die Astrozytenanzahl in der Kontroll14-Gruppe auf 42±1,7 Zellen pro 0,25 mm² an. Im Gegensatz dazu reduzierte

Indometacin die Anzahl GFAP⁺ Astrozyten signifikant auf 36±1,4 Zellen pro 0,25 mm².

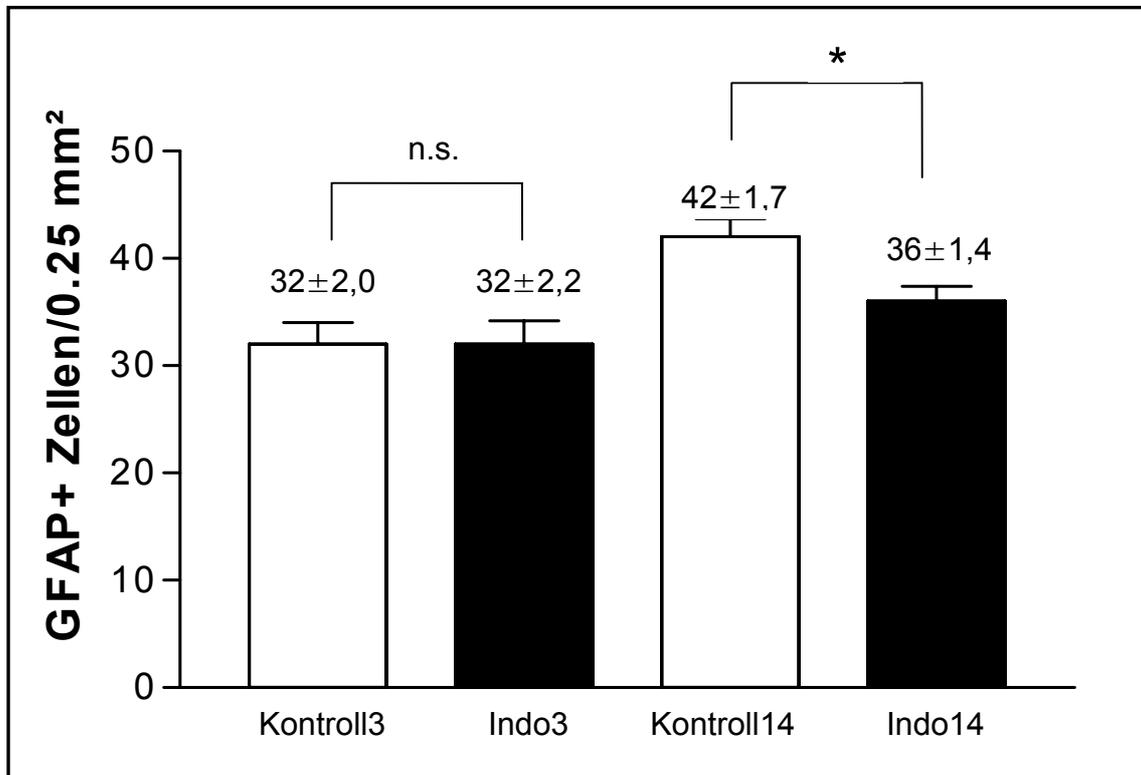


Abb. 8: GFAP⁺ Astrozyten in den entfernteren Arealen.

Die Anzahl GFAP⁺ Astrozyten in den entfernteren Arealen in der Indo3-Gruppe unterschied sich nicht signifikant (n.s.) von der Kontroll3-Gruppe. Bis 14 Tage nach Rückenmarkverletzung stieg die Astrozytenanzahl in der Kontroll14-Gruppe an. Indometacin reduzierte hier die Astrozyten signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Werte dargestellt als MW±SF bezogen auf 0,25 mm².

3.2.1.2 Expression von Vimentin

Vimentin, wie auch Nestin (siehe 3.2.1.3), sind Intermediärfilamentproteine, die im gesunden Parenchym des zentralen Nervensystems nur sporadisch vorkommen. Dies wurde ersichtlich an der geringen Zahl Vimentin⁺ Astrozyten ($6,4 \pm 0,3$ Zellen pro $0,25 \text{ mm}^2$) im Gewebe der unverletzten Tiere (Abbildung 9). Durch eine Verletzung des Rückenmarks wird die Expression dieser Proteine in den Astrozyten reaktiviert. Vimentin und Nestin stellen Marker für die aktivierten Astrozyten dar. Die Zahl Vimentin⁺ Zellen betrug drei Tage posttraumatisch in der Kontroll3-Gruppe $32 \pm 2,3$ pro $0,25 \text{ mm}^2$. Im Vergleich dazu war die Anzahl Vimentin⁺ Zellen in der Indo3-Gruppe mit $16 \pm 1,1$ Zellen um die Hälfte reduziert. In der Kontroll14-Gruppe exprimierten 14 Tage posttraumatisch fast doppelt so viele Astrozyten das Vimentin ($56 \pm 2,0$ Zellen pro $0,25 \text{ mm}^2$) wie in der Indo14-Gruppe ($27 \pm 1,0$ Zellen pro $0,25 \text{ mm}^2$).

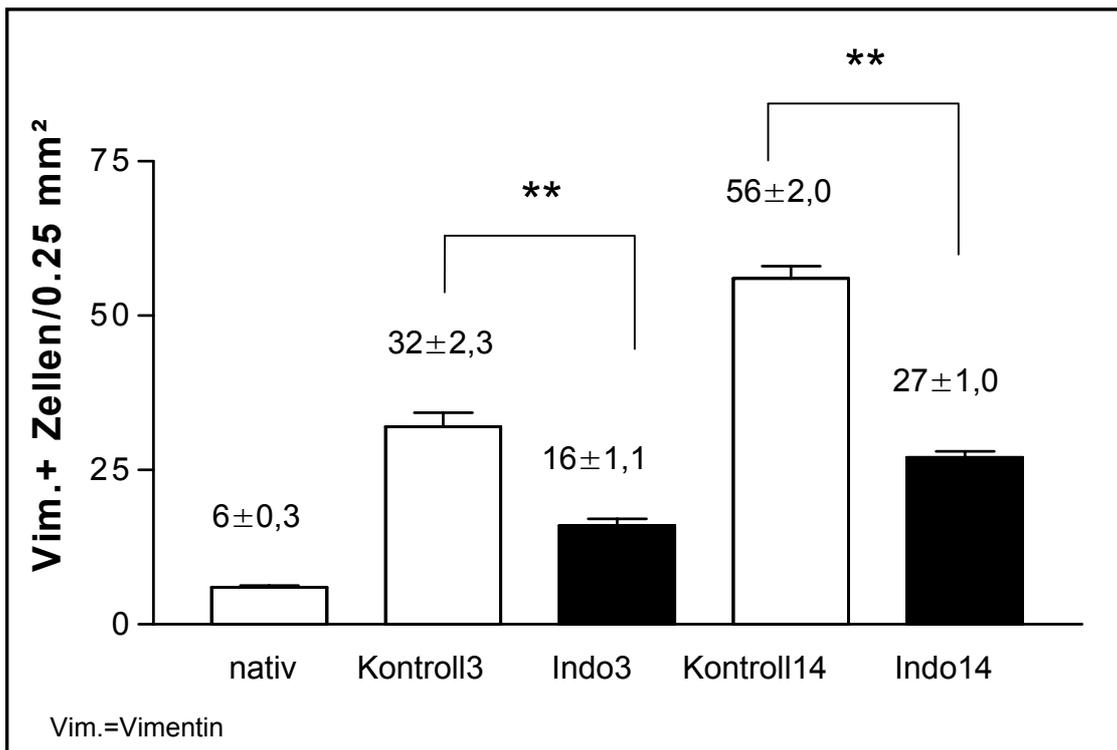


Abb. 9: Die absolute Anzahl Vimentin⁺, reaktiver Astrozyten periläsional.

Im gesunden Rückenmarkparenchym fanden sich nur wenige Vimentin⁺ Astrozyten. Nach einer Verletzung wurde in den reaktiven Astrozyten verstärkt Vimentin exprimiert (Kontroll3 und Kontroll14). Drei wie auch 14 Tage postoperativ reduzierte Indometacin die absolute Zahl der reaktiven Astrozyten (Indo3 und Indo14) um die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Werte dargestellt als MW±SF bezogen auf 0,25 mm².

3.2.1.3 Expression von Nestin

Im gesunden Parenchym des zentralen Nervensystems wird Nestin von den Astrozyten kaum exprimiert. Pro 0,25 mm² wurden lediglich 7±0,4 Nestin⁺ Zellen gezählt (Abbildung 10). Drei Tage nach der Verletzung des Rückenmarks stieg die läSIONALE Anzahl Nestin⁺ Astrozyten in der Kontroll3-Gruppe auf 36±2,5 Zellen pro 0,25 mm²

an und in der Kontroll14-Gruppe stieg die Anzahl auf $50 \pm 2,0$ Zellen an. Trotz der Gabe von Indometacin ließ sich die Zahl der reaktiven Astrozyten ($32 \pm 1,9$ Zellen pro $0,25 \text{ mm}^2$; Indo3) bis drei Tage posttraumatisch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht reduzieren. Jedoch verringerten sich dann im Verlauf bis 14 Tage posttraumatisch die läSIONalen reaktiven Nestin⁺ Astrozyten durch die Indometacinapplikation auf $38 \pm 1,6$ Zellen pro $0,25 \text{ mm}^2$.

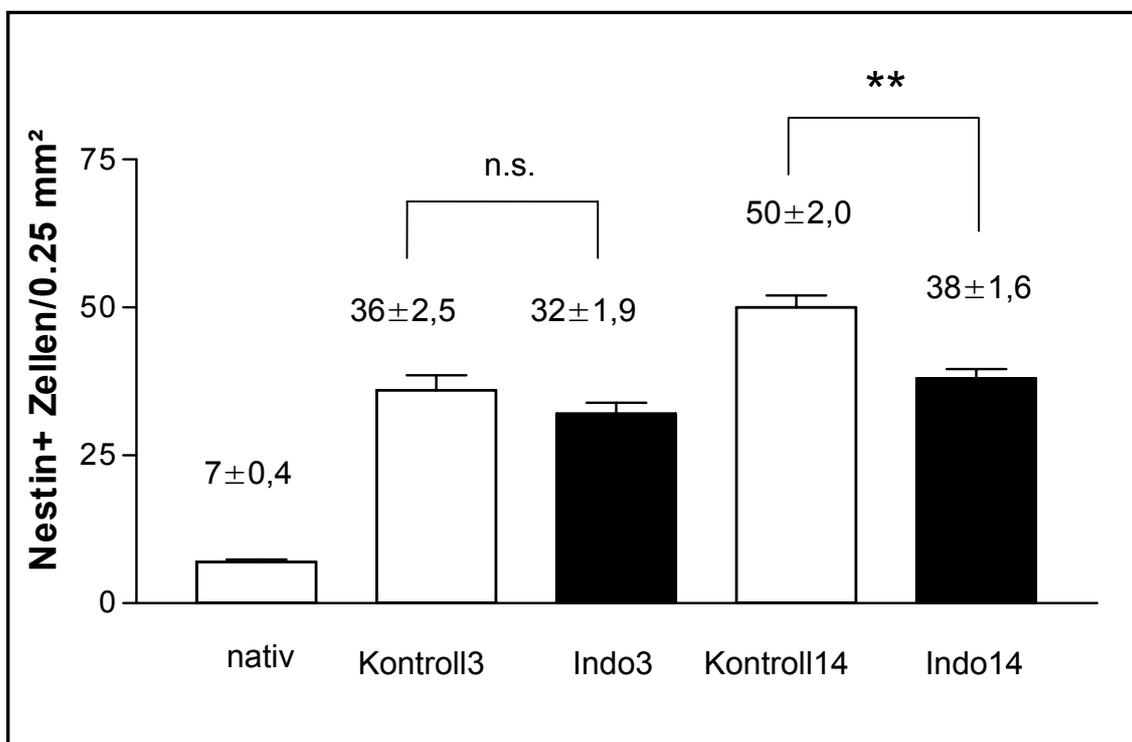


Abb. 10: Die absolute Anzahl läSIONaler Nestin⁺ Astrozyten.

Im gesunden Rückenmarkparenchym fanden sich nur wenige Nestin⁺ Astrozyten. Nach der Verletzung wurde in den aktivierten Astrozyten verstärkt Nestin exprimiert (Kontroll3 und Kontroll14). Drei Tage posttraumatisch ließ sich die absolute Anzahl der aktivierten Astrozyten (Indo3) durch Indometacin nicht signifikant (n.s.) reduzieren. Jedoch reduzierte eine prolongierte Indometacingabe (Indo14) die läSIONale Anzahl der aktivierten Astrozyten hochsignifikant.

Werte dargestellt als $MW \pm SF$ bezogen auf $0,25 \text{ mm}^2$.

3.2.1.4 Aktivierte Astrozyten

Der relative Anteil der aktivierten Astrozyten konnte mit der immunhistochemischen Doppelfärbung ermittelt werden. Dabei wurden in den Astrozyten sowohl GFAP wie auch Vimentin bzw. Nestin angefärbt. Die Aktivität der Astrozyten wurde in der murenen Narbe und in den entfernteren Arealen beurteilt.

In der murenen Narbe der Kontrolltiere waren nahezu alle Astrozyten aktiviert. Das ließ sich anhand der Doppelfärbung mit GFAP/Vimentin (Kontroll14: $86 \pm 1,9$ %) und GFAP/Nestin (Kontroll14: $90 \pm 1,0$ %) darstellen. Die Therapie mit Indometacin supprimierte den Aktivitätsgrad der Astrozyten (Abbildung 11). So exprimierten nur die Hälfte dieser Zellen neben GFAP auch Vimentin (Indo14: $52 \pm 2,2$ %). Dies wurde durch die ebenfalls stark verminderte Anzahl der GFAP⁺/Nestin⁺ Astrozyten bestätigt (Indo14: $64 \pm 1,8$ %).

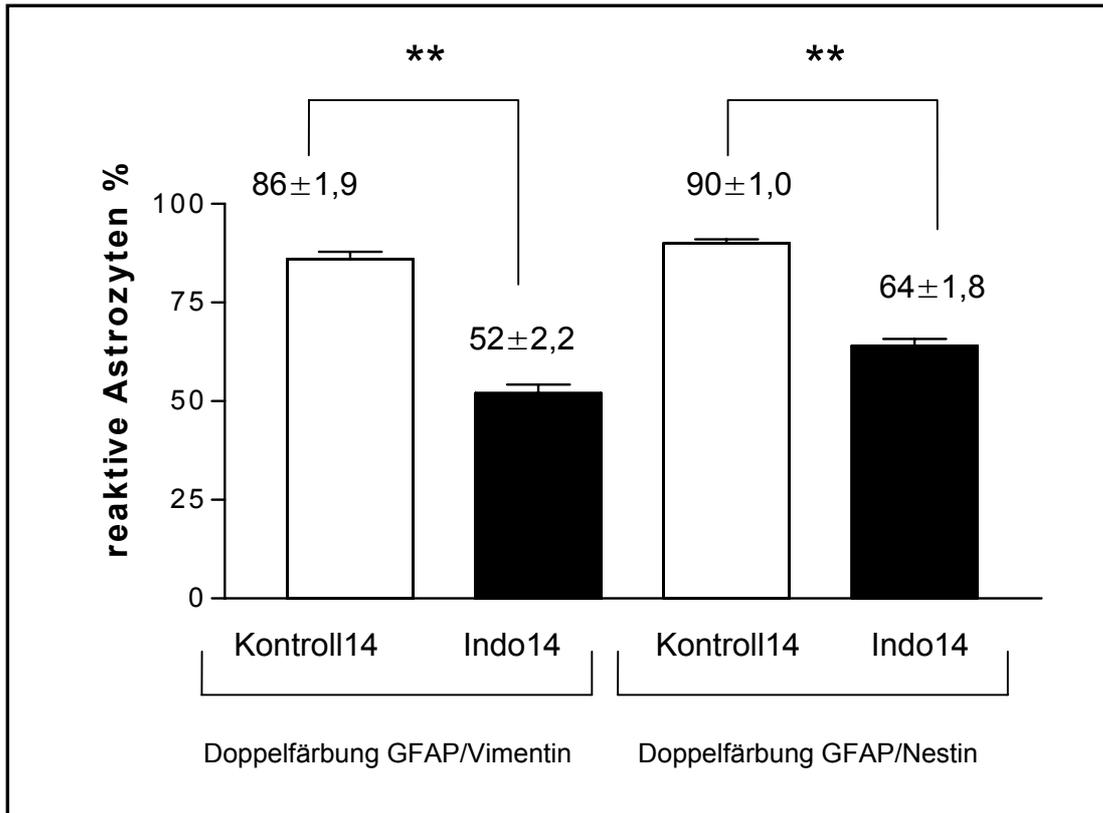


Abb. 11: Die Aktivität der Astrozyten in der Läsion.

In der Kontrollgruppe waren 14 Tage posttraumatisch fast alle Astrozyten aktiviert. Indometacin supprimierte die Aktivierung der Astrozyten. Dies wurde dargestellt durch die verminderte Ko-Expression der astrozytären Aktivierungsproteine Vimentin und Nestin.

Werte dargestellt als MW ± SF; relativer Anteil in %.

In den entfernteren Arealen wurden im Verlauf der ersten beiden Wochen nach der Verletzung des Rückenmarks weniger Astrozyten aktiviert als im Zentrum der Läsion. Im Gewebe der Kontrollgruppe exprimierten 34 ± 5,4 % der Astrozyten Vimentin (Abbildung 12). Indometacin reduzierte diese Anzahl um etwa die Hälfte auf 18 ± 3,3 %. Deutlich mehr Astrozyten waren neben GFAP auch Nestin positiv. Durch die Gabe von Indometacin ließ sich der relative

Anteil der reaktiven Astrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verringern (Indo14: $55 \pm 2,4$ % versus Kontroll14: $63 \pm 3,7$ %).

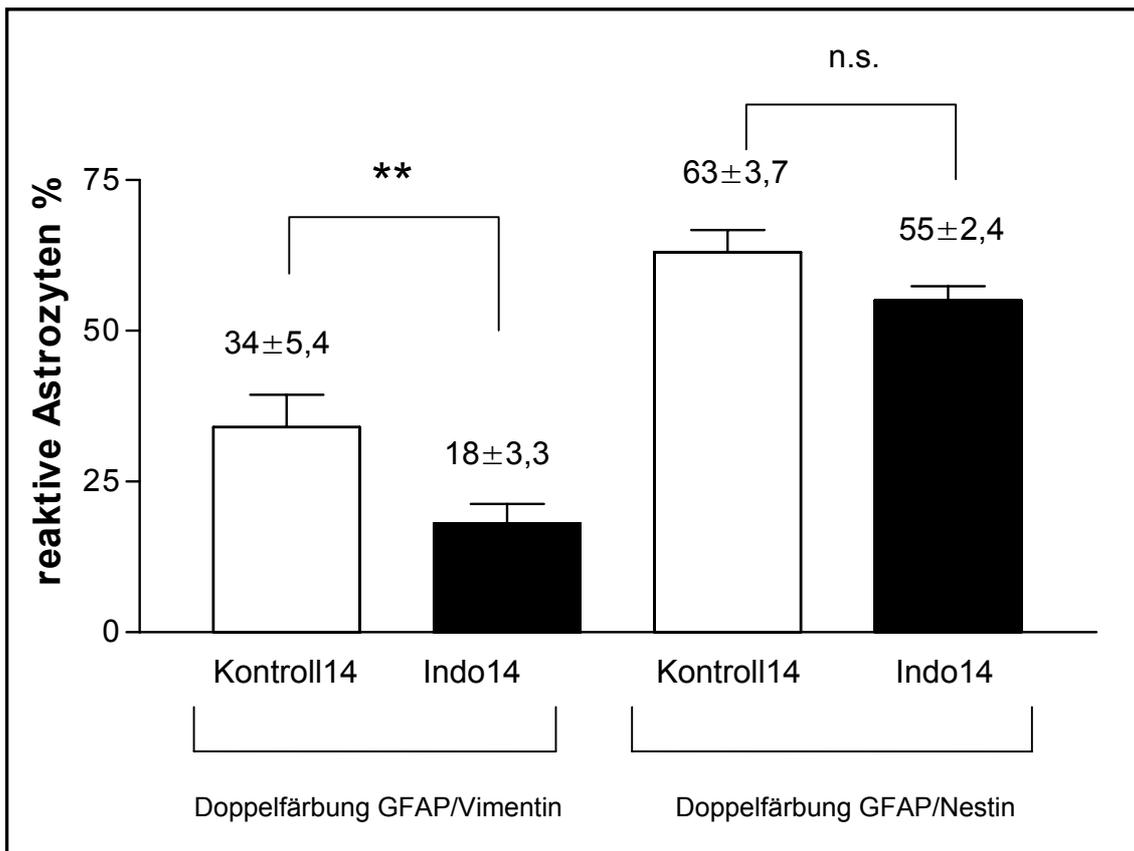


Abb. 12: Die Aktivität der Astrozyten in den entfernten Arealen.

In der Kontrollgruppe wurden 14 Tage nach Verletzung des Rückenmarks in etwa einem Drittel der Astrozyten Vimentin und in zwei Drittel der Astrozyten Nestin aktiviert. Indometacin reduzierte die aktivierten, GFAP/Vimentin positiven Astrozyten. Indometacin hatte keinen signifikanten (n.s.) Einfluss auf das Aktivitätsverhalten der GFAP/Nestin positiven Zellen.

Werte dargestellt als MW ± SF; relativer Anteil in %.

3.2.2 Die extrazellulären Narbenanteile

3.2.2.1 Definition der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) wurde definiert als die längste und breiteste zusammenhängende, Fibronectin⁺ Struktur, in welcher der ursprüngliche Zellverbund aufgelöst war. Im Verbund der neuen extrazellulären Matrix konnten auch Zellen miteingeschlossen sein. (Abbildung 13)

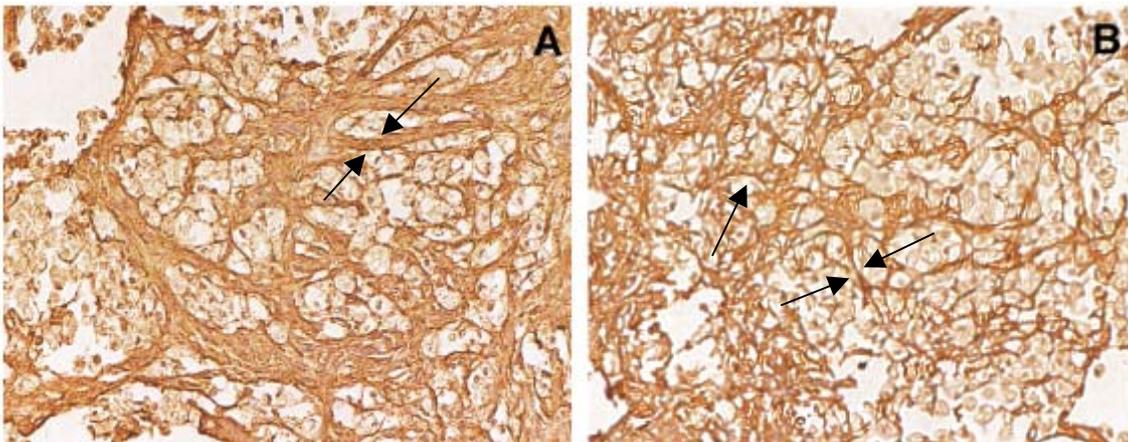


Abb. 13: Ausschnitt aus dem Narbengewebe.

Die Fibronectin⁺ extrazelluläre Matrix (braun) der Kontrolltiere 14 Tage nach der Rückenmarkverletzung (A) zeigt ein dichtes Gewebe mit kompakten, breiten Strukturen (Pfeile). Im Vergleich dazu imponiert die Fibronectin⁺ extrazelluläre Matrix der Tiere aus der Indo-14-Gruppe (B) als ein filigranes Netzwerk (Pfeile). Die EZM ist in dieser Gruppe signifikant kürzer und schmaler als in der Kontrollgruppe.

(Vergrößerung 200fach)

3.2.2.2 Die extrazelluläre Narbenausdehnung 14 Tage nach Verletzung des Rückenmarks

Die Länge der extrazellulären Matrix betrug in der Kontrollgruppe 14 Tage nach Rückenmarkverletzung $1,7 \pm 0,26$ mm, die Breite betrug $1,2 \pm 0,14$ mm (Abbildung 15). Durch die Gabe von Indometacin ließ sich die Struktur der extrazellulären Matrix verfeinern. Die Länge verkürzte sich um ungefähr die Hälfte auf $0,9 \pm 0,15$ mm. Ebenso halbierte sich die Breite der Strukturen auf $0,6 \pm 0,11$ mm.

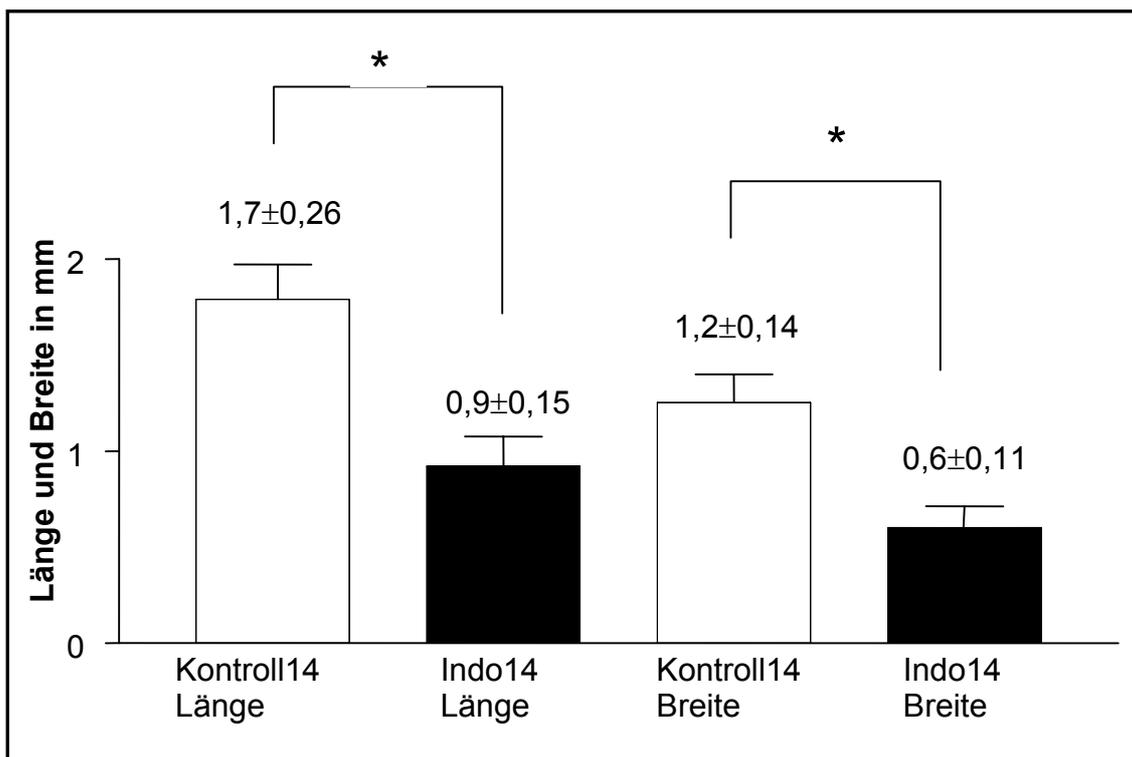


Abb. 15: Länge und Breite der extrazellulären Matrix in der Narbe 14 Tage nach Rückenmarkverletzung.

Indometacin halbierte signifikant sowohl die Länge wie auch die Breite der extrazellulären Matrix im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Werte dargestellt als $MW \pm SF$ in Millimeter (mm).

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss eines nicht-steroidalen Antiphlogistikums auf die Narbenbildung nach Rückenmarkverletzung untersucht.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde eine signifikante Reduktion von COX-1⁺, COX-2⁺, GFAP⁺, Vimentin⁺ Zellen in der periläsionalen Zone drei Tage nach der operativen Verletzung des Rückenmarks beobachtet. 14 Tage posttraumatisch war die absolute Anzahl COX-1⁺-, COX-2⁺ monozytärer Zellen und aktivierter Astrozyten in der periläsionalen Zone vermindert. Ebenso reduzierte die Indometacin-Pharmakotherapie die relative Anzahl der aktivierten Astrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die extrazelluläre Matrix ließ sich durch die Indometacingabe im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant verringern.

Aus der reduzierten Anzahl COX-1⁺ und COX-2⁺ monozytärer Zellen in der Läsion, sowohl drei wie auch 14 Tage posttraumatisch, wird deutlich, dass Indometacin im zentralen Nervensystem wirksam ist, und somit einen wichtigen Weg der Entzündungskaskade, die Bildung von Prostaglandinen, unterbricht.

Die Astrozyten stellen den zellulären Hauptbestandteil der glialen Narbe dar. Wie eingangs erwähnt, ist es für Nervenaxone fast unmöglich, die dichte Struktur der glialen Narbe zu überwinden. In der vorliegenden Studie ist es gelungen, durch die anti-inflammatorische Potenz von Indometacin, die Astrozytenaktivierung zu supprimieren. Die Sekretion von extrazellulären Narbenbestandteilen wurde verringert, wodurch sich das Netz der

extrazellulären Matrix 14 Tage nach Verletzung des Rückenmarks im Vergleich zur Kontrollgruppe kleiner und weniger dicht bildete. Die zelluläre und extrazelluläre Narbenformation im Rückenmark nach einer mechanischen Verletzung wurde zeitlich verzögert. Die Versiegelung des verletzten Rückenmarks durch die Narbenbildung wurde bis 14 Tage nach Rückenmarkverletzung reduziert. Die Indometacin-Pharmakotherapie kann ein realistisches Zeitfenster schaffen, um durch zusätzliche pharmakologische und/oder zelluläre Interventionen diejenigen geschädigten Nervenaxone zum Aussprossen anzuregen, die nicht noch zusätzlich durch die chemische Barriere der Narbe behindert werden.

In anderen Studien mit Rattenmodellen wurde in verschiedenen Ansätzen versucht, die Narbenbildung und damit die Barriere für Nervenaxone zu reduzieren. Dabei konnten auch Teilerfolge erzielt werden (siehe Einleitung). Die Nachteile dieser Studien lagen jedoch oft darin, dass die Substanzen aufwändig mittels Glaskapillaren oder Minipumpen intrathekal injiziert wurden. Es bestand dabei das Risiko, dass weiteres Nervengewebe zerstört wurde. Bei der Anwendung von Antikörpern gegen Bestandteile der Narbe, z.B. gegen Kollagen, konnten diese in den systemischen Kreislauf gelangen und andere Organe angreifen. Es bestand auch die Gefahr, dass der Organismus gegen fremdes Protein, wie z.B. Antikörper oder Chondroitinasen, reagierte. Zudem war die Herstellung und Aufbereitung der getesteten Substanzen sehr kostenintensiv (Bradbury et al., 2002; Stichel et al., 1999; Hermanns et al., 2000).

Der Vorteil der Indometacinapplikation in der nun vorliegenden Studie ist die einfache Möglichkeit der systemischen Gabe. Desweiteren ist Indometacin bereits auf dem Markt als antientzündliches Medikament zugelassen, es müßte lediglich die Indikation der Pharmakotherapie erweitert werden. Die unerwünschten Nebenwirkungen sind bereits bekannt und gering. Die wichtigsten Nebenwirkungen der NSAR sind die gastrointestinalen (GI-)Blutungen und die Verlängerung der Blutungszeit durch Hemmung der Thrombozytenaggregation. Die in der vorliegenden Studie wahrscheinlich aufgetretenen GI-Blutungen, die möglicherweise zum verfrühten Tod der Versuchstiere vor Ablauf des Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen führten, waren mit der Anlass für die Reduktion der ursprünglichen Indometacindosis von 10 mg/kgKG/Tag auf 1 mg/kgKG/Tag. Fortan erreichten die Tiere Tag 14 des Versuchszeitraumes. Außerdem wurden post-mortem in der Magen- und Darmschleimhaut makroskopisch keine Blutungszeichen mehr beobachtet. Während der Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte am Mikroskop wurde ein zusätzliches Augenmerk auf die Menge der Erythrozyten, d.h. das Ausmaß einer möglichen Blutung, in der periläsionalen Zone und in den entfernteren Arealen geworfen, um eine mögliche Thrombozytenaggregationshemmung zu beurteilen. Dabei ergab sich kein sicherer Hinweis für eine mögliche verlängerte Blutungsneigung nach dem operativen Eingriff. In den Gewebepräparaten, die 14 Tage nach der Verletzung des Rückenmarks entnommen wurden, waren lichtmikroskopisch keine Erythrozyten mehr sichtbar.

Indometacin ist ein vergleichsweise kostengünstiges Medikament. Damit ergibt sich die Option, Indometacin nach einer Verletzung des Rückenmarks beim Menschen therapiebegleitend einzusetzen.

In der vorliegenden Studie lag die Hauptaufgabe darin, mit Indometacin die Narbenbildung nach einer Rückenmarkverletzung zu reduzieren und dies dann mittels immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten zu verifizieren. Es wurde auf eine Messung der Rückkehr funktioneller und motorischer Fähigkeiten der Tiere verzichtet. Es gibt jedoch Studien, in denen sich die Motorik der rückenmarkverletzten Versuchstiere durch die systemische Gabe von Cyclooxygenasehemmern in Kombination mit anderen Substanzen verbessern ließ (Resnick et al., 1998). Guth und Kollegen führten 1994 eine Studie durch, in der sie experimentell rückenmarkverletzten Ratten Indometacin (i.p.) in Kombination mit einem Steroid (Pregnenolon; intrathekal) und Lipopolysacchariden (LPS; i.p.) verabreichten. Im Verlauf der Studie wurden die motorischen Funktionen der Tiere gemessen. Es zeigte sich dabei, dass die Kombination dieser Substanzen die physiologischen motorischen Funktionen im Vergleich zur Kontrollgruppe verbesserten (Guth et al., 1994).

Für Patienten, die eine Verletzung des Rückenmarks erlitten haben, fokussiert sich die momentane Therapie auf die Limitierung des Initialschadens, Verbesserung der Blasendysfunktion, der Spastik und des neuropathischen Schmerzes. Das Resultat der systemischen Gabe von Indometacin über einen Zeitraum von 14 Tagen könnte der Schlüssel für eine erfolgreiche Therapie sein,

um auch beim Menschen die Narbenbildung nach Rückenmarkverletzung zu reduzieren, und somit ein längeres therapeutisches Zeitfenster für neuroregenerative und/oder plastizitätsverbessernde Ansätze zu ermöglichen. Außerdem könnte diese Therapieform auch auf andere Erkrankungen des ZNS, die mit einer Entzündung einhergehen, ausgeweitet werden.

5. Zusammenfassung

Eine Verletzung des Rückenmarks entsteht primär durch Zug-, Druck- oder Stoßkräfte, wodurch das Gewebe verletzt wird. Aus den zerrissenen Kapillargefäßen kommt es zu Einblutungen in das Gewebe. Es entwickelt sich ein Ödem und das Gewebe wird nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt. Es bilden sich Nekrosen, die schließlich eine Entzündung hervorrufen. Aus dem peripheren Blut werden Monozyten angelockt, die sich zu Makrophagen umwandeln. Im Gewebe werden ortsständige Mikrogliazellen aktiviert. Das nekrotische Zellmaterial wird von den Makrophagen und Mikrogliazellen abgeräumt; zurück bleiben Höhlen und flüssigkeitsgefüllte Zysten. Die initiale Läsion weitet sich zum Sekundärschaden aus. Der Gewebeverlust wird durch eine gliale Narbe gedeckt. Die Narbe setzt sich aus den zellulären Anteilen, im besonderen Astrozyten, und aus der extrazellulären Matrix zusammen. Das gliale Narbengewebe stellt ein chemisches und mechanisches Hindernis für regenerierende und aussprossende Nervenaxone dar.

Der Entzündungsprozess im verletzten Rückenmark ist ein entscheidender Faktor in der Zellaktivierung und Narbenbildung. Wichtige Mediatoren im Entzündungsprozess sind die Prostaglandine, die durch die Cyclooxygenase aus der Arachidonsäure freigesetzt werden. Das nicht-steroidale Antirheumatikum Indometacin ist ein potenter Hemmstoff der Cyclooxygenase-Isoformen COX-1 und COX-2.

In einem Tiermodell wurde rückenmarkverletzten Ratten über einen Zeitraum von drei und 14 Tagen posttraumatisch Indometacin verabreicht. In der anschließenden immunhistochemischen

Auswertung des verletzten Gewebes ist eine signifikante Reduktion der absoluten und relativen Astrozytenzahl erkennbar. Die extrazelluläre Matrix ist in ihrer Längen- und Breitenausdehnung um die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert. Die Narbenbildung nach einer Verletzung des Rückenmarks wird durch Indometacin verringert und verzögert. Indometacin verlängert das therapeutische Zeitfenster für weitere neuroregenerative und/oder plastizitätsverbessernde pharmakologische als auch zelluläre Interventionen.

6. Literaturverzeichnis

Banati, R.B., Gehrman, J., Schubert, P., Kreutzberg, G.W. (1993)
Cytotoxicity of microglia.
Glia, 7, 111-118

Banik, N.L., Powers, J.M., Hogan, E.L. (1980)
The effects of spinal cord trauma on myelin.
J. Neuropathol. Exp. Neurol., 39, 232-244

Bannwarth, B., Netter, P., Pourel, J., Royer, R.J., Gaucher, A. (1989)
Clinical pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the cerebrospinal fluid.
Biomed. Pharmacother., 43, 121-126

Bernstein, J.J., Getz, R., Jefferson, M., Kelemen, M. (1985)
Astrocytes secrete basal lamina after hemisection of rat spinal cord.
Brain Research, 327, 135-141

Bradbury, E.J., Moon, L.D.F., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W., McMahon, S.B. (2002)
Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury.
Nature, 416, 636-640

Blight, A.R. (1992)
Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury.
J. Neurotrauma, 9, 83-91

Calvo, J.L., Carbonell, A.L., Boya, J. (1991)
Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats.
Brain Res., 566, 333-336

Campbell, E.J., Senior, R.M., McDonald, J.A., Cox, D.L. (1982)
Proteolysis by neutrophils. Relative importance of cell-substrate contact and oxidative inactivation of proteinases inhibitors in vitro.
J. Clin. Invest., 70, 845-852

Carlson, S.L., Parrish, M.E., Springer, J.E., Doty, K., Dossett, L. (1998)

Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.*, 151, 77-88

Chan, P.H., Fishman, R.A., Caronna, J., Schmidley, J.W., Prioleau, G., Lee, J. (1983)

Induction of brain edema following intracerebral injection of arachidonic acid.

Ann. Neurology, 13, 625-632

Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L.T., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., Simmons, D.L. (2002)

COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure and expression.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 13926-13931

Clarke, S.R., Shetty, A.K., Bradley, J.L., Turner, D.A. (1994)

Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin.

NeuroReport, 5, 1885-1888

Davies, S.J.A., Fitch, M.T., Memberg, S.P., Hall, A.K., Raisman, G., Silver, J. (1997)

Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system.

Nature, 390, 680-683

DeWitt, D. (1991)

Prostaglandin endoperoxidase synthase: Regulation of enzyme expression.

Biochim. Biophys. Acta, 1083, 121-134

Dusart, I., Schwab, M.E. (1993)

Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord.

Eur. J. Neurosci., 6, 712-724

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

Fawcett, J.W., Asher, R.A. (1999)
The glial scar and central nervous system repair.
Brain Res. Bull., 49, 377-391

Feng, L., Sun, W., Xia, Y., Tang, W.W., Chanmugam, P., Soyoola, E., Wilson, C.B., Hwang, D. (1993)
Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: Differential regulation of their expression.
Arch. Biochem. Biophys., 307, 361-368

Feringa, E.R., Kowalski, T.F., Vahlsing, H.L. (1980)
Basal lamina formation at site of spinal cord transection.
Ann.Neurol., 8, 148-154

Fidler, P.S., Schuette, K., Asher, R.A., Dobbertin, A., Thornton, S.R., Calle-Patino, Y., Muir, E., Levine, J.M., Geller, H.M., Rogers, J.H., Faissner, A., Fawcett, J.W. (1999)
Comparing astrocyte cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2.
J. Neurosci., 19, 8778-8788

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

Fitzgerald, G.A., Patrono, C. (2001)
The Coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2.
N. Engl. J. Med., 345, 433-445

Funk, C.D. (2001)
Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in eicosanoid biology.
Science, 294, 1871-1875

- Guth, L., Zhang, Z., Roberts, E. (1994)
Key role for pregnenolone in combination therapy that promotes recovery after spinal cord injury.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 12308-12312
- Hall, E.D., Wolf, D.L. (1986)
A pharmacological analysis of pathophysiological mechanisms of posttraumatic spinal cord ischemia.
J. Neurosurg., 64, 951-961
- Hartung, H.P., Schäfer, B., Heininger, K., Toyka, K.V. (1989)
Recombinant interleukin-1 β stimulates eicosanoid production in rat primary culture astrocytes.
Brain Res., 489, 113-119
- Hermanns, S., Reiprich, P., Müller, H.W. (2001)
A reliable method to reduce collagen scar formation in the lesioned rat spinal cord.
J. Neurosci. Meth., 110, 141-146
- Hla, T., Neilson, K. (1992)
Human cyclooxygenase-2 cDNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 7384-7388
- Holtz, A., Nystrom, B., Gerdin, B., Olsson, Y. (1990)
Neuropathological changes and neurological function after spinal cord compression in the rat.
J. Neurotrauma, 7, 155-167
- Horner, P.J., Gage, F.H. (2000)
Regeneration the damaged central nervous system.
Nature, 407, 963-970
- Jones, D.A., Carlton, D.P., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M. (1993)
Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines.
J. Biol. Chem., 268, 9049-9054

Jones, L.L., Tuszynski, M.H. (2002 a)
Spinal cord injury elicits expression of ketaran sulfate proteoglycans by macrophages, reactive microglia, and oligodendrocyte progenitors.

J. Neurosci., 22, 4611-4624

Jones, L.L., Yamagucchi, Y., Stallcup, W.B., Tuszynski, M.H. (2002b)

NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors.

J. Neurosci., 22, 2792-2803

Li, Y., Raisman, G. (1995)

Sprouts from cut corticospinal axons persist in the presence of astrocytic scarring in long-term lesions of the adult rat spinal cord.

Exp. Neurol., 134, 102-111

Liesi, P., Kauppila, T. (2002)

Induction of Type IV collagen and other basement-membrane-associated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar.

Exp. Neurol., 173, 31-45

Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isakson, P.C., Seibert, K. (1994)

Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3228-3232

McKanna, J.A., Zhang, M.Z., Wang, J.L., Cheng, H., Harris, R.C. (1998)

Constitutive expression of cyclooxygenase-2 in rat vas deferens.

Am. J. Physiol., 275, R227-233

McKeon, R.J., Schreiber, R.C., Rudge, J.S., Silver, J. (1991)

Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes.

J. Neurosci., 11, 3398-3411

McKeon, R.J., Hoeke, A., Silver, J. (1995)
Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars.
Exp. Neurol., 136, 32-43

Meade, E.A., Smith, W.L., DeWitt, D.L. (1993)
Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (Cyclooxygenase) isoenzymes by Aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs.
J. Biol. Chem., 268, 6610-6614

Means, E.D., Anderson, D.K. (1983)
Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury.
J. Neuropathol. Exp. Neurol., 42, 707-719

Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J., Vane, J.R. (1993)
Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 11693-11697

Nathan, C.F. (1987)
Secretory products of macrophages.
J. Clin. Invest., 79, 319-326

Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R., Lefkowitz, J.B. (1986)
Arachidonic acid metabolism.
Ann. Rev. Biochem., 55, 69-102

Nishisho, T., Tonai, T., Tamura, Y., Ikata, T. (1996)
Experimental and clinical studies of Eicosanoids in cerebrospinal fluid after spinal cord injury.
Neurosurgery, 39, 950-957

Noble, L.J., Wrathall, J.R. (1985)
Spinal cord contusion in the rat: Morphometric analysis of alterations in the spinal cord.
Exp. Neurol., 88, 135-149

O'Neill, G.P., Ford-Hutchinson, A.W. (1993)
Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues.
FEBS Letters, 330, 156-160

Ramón y Cajal, S. (1928)
Degeneration and regeneration of the nervous system.
Oxford University Press, London

Resnick, D.K., Graham, S.H., Dixon, C.E., Marion, D.W. (1998)
Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury.
J. Neurotrauma, 15, 1005-1013

Sandler, A.N., Tator, C.H. (1976)
Review of the effect of spinal cord trauma on the vessels and blood flow in the spinal cord.
J. Neurosurg., 45, 638-646

Schwab, J.M., Brechtel, K., Nguyen, T.D., Schlüsener, H.J. (2000)
Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury.
J. Neuroimmun., 111, 122-130

Schwab, J.M., Frei, E., Klusman, I., Schnell, L., Schwab, M.E., Schlüsener, H.J. (2001)
AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglia/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats.
J. Neuroimmunol., 119, 214-222

Schwab, J.M., Schlüsener, H.J., Laufer, S. (2003a)
COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol?
Lancet, 361, 981-982

Schwab, J.M., Schlüsener, H.J., Meyermann, R., Serhan, C.N. (2003b)
COX-3 the enzyme and the concept: steps toward highly specialized pathways and precision therapeutics?
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 69, 339-345

- Schwab, M.E., Bartholdi, D. (1996)
Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord.
Physiological Reviews, 76, 319-370
- Sharma, H.S., Olsson, Y., Nyberg, F., Dey, P.K. (1993)
Prostaglandins modulate alterations of microvascular permeability,
blood flow, edema, and serotonin levels following spinal cord injury:
An experimental study in the rat.
Neurosci., 57, 443-449
- Shimizu, T., Wolfe, L.S. (1990)
Arachidonic acid cascade and signal transduction.
J. Neurochem., 55, 1-15
- Sirois, J., Richards, J.S. (1992)
Purification and characterization of a novel, distinct isoform of
prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic
gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles.
J. Biol. Chem., 267, 6382-6388
- Smith, W.L., DeWitt, D.L. (1996 a)
Prostaglandin endoperoxide H synthases -1 and -2.
Adv. Immunol., 62, 167-215
- Smith, W.L., Garavito, R.M., DeWitt, D.L. (1996 b)
Prostaglandin endoperoxide synthases (cyclooxygenases)-1 and -2.
J. Biol. Chem., 271, 33157-33160
- Stichel, C.C., Müller, H.W. (1998)
Experimental strategies to promote axonal regeneration after
traumatic central nervous system injury.
Prog. Neurobiol., 56, 119-148
- Stichel, C.C., Hermanns, S., Luhmann, H.J., Lausberg, F.,
Niermann, H., D`Urso, D., Servos, G., Hartwig, H.G., Müller, H.W.
(1999)
Inhibition of collagen IV deposition promotes regeneration of injured
CNS axons.
Eur. J. Neurosci., 11, 632-646

Taoka, Y., Okajima, K., Uchiba, M., Murakami, K., Kushimoto, S., Johno, M., Naruo, M., Okabe, H., Takatsuki, K. (1997)
Role of Neutrophils in spinal cord injury in the rat.
Neurosci., 79, 1177-1182

Tator, C.H., Fehlings, M.G. (1991)
Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms.
J. Neurosurg., 75, 15-26

Tator, C.H. (1995)
Update on the Pathophysiology and Pathology of Acute Spinal Cord Injury.
Brain Pathology, 5, 407-413

Vane, J.R. (1971)
Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action of Aspirin-like Drugs.
Nature New Biol., 231, 232-235

Vane, J.R., Botting, R.M. (1998)
Anti-Inflammatory Drugs and their mechanism of action.
Inflamm. Res., 47, 78-87

Wallace, J.L., Chapman, K., McKnight, W. (1999)
Limited anti-inflammatory efficacy of cyclo-oxygenase-2 inhibition in carrageenan-airpouch inflammation.
Br. J. Pharmacol., 126, 1200-1204

Warner, T.D., Mitchell, J.A. (2002)
Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 13371-13373

Watanabe, T., Yamamoto, T., Abe, Y., Saito, N., Kumagai, T., Kayama, H. (1999)
Differential activation of microglia after experimental spinal cord injury.
J. Neurotrauma, 16, 255-265

Wolfe, L.S. (1982)

Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids.

J. Neurochem., 38, 1-14

Xie, W.L., Chipman, F.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L., Simmons, D.L. (1991)

Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2692-2696

Zhang, Z., Guth, L., (1997a)

Experimental spinal cord injury: Wallerian Degeneration in the dorsal column is followed by revascularization, glial proliferation, and nerve regeneration.

Exp. Neurol., 147, 159-171

Zhang, Z., Krebs, C.J., Guth, L. (1997b)

Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response.

Exp. Neurol., 143, 141-152

7. Appendix

7.1 Puffer und Substratlösungen

7.1.1 TBS-Stammlösung (10x) (=Tris-Puffer)

60,6 g Trizma Base (MW 121,14) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

163,6 g NaCl (Fluka)

in ca. 1500 ml Aqua dest. lösen, pH 7,5 einstellen, mit Aqua dest. auf 2 Liter auffüllen.

Gebrauchslösung (1x) 1:10 verdünnt mit Aqua dest.

7.1.2 Substratpuffer

42 g Zitronensäure Monohydrat (Roth, Karlsruhe)

68 g Imidazol (Fluka)

58,4 g NaCl (Fluka)

in 800 ml Aqua dest. lösen, pH 7,0 einstellen, mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Gebrauchslösung (1x) 1:10 verdünnt mit Aqua dest.

7.1.3 Zitratpuffer (10x)

42 g Zitronensäure Monohydrat (Roth)

in ca. 1500 ml Aqua dest. lösen, pH 6,0 einstellen, mit Aqua dest. auf 2 Liter auffüllen.

Gebrauchslösung (1x) 1:10 verdünnt mit Aqua dest.

7.1.4 0,1 % Tris-BSA

100 ml Tris-Puffer (1x) (Sigma-Aldrich)

+ 100 mg Albumin Fraktion V aus Rinderserum (bovine serum albumin; Merck, Darmstadt)

7.1.5 3,3`-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB; Sigma)

1 ml DAB (100 mg/ml) in 150 ml Aqua dest. lösen. 20 ml Substratpuffer und 66,6 µl H₂O₂ (30%; Merck) zugeben. Mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen und filtrieren.

7.1.6 Fast Blue BB (Sigma-Aldrich)

10 mg Naphthol AS MX Phosphatdisodiumsalz (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 500 µl NN Dimethylformamid lösen. 45 ml Aqua dest. und 5 ml 1 M Tris-Puffer pH 8,2 dazugeben. In diese Lösung nun 75 µl MgSO₄ pipettieren. 50 mg Fast Blue BB (Sigma-Aldrich) und 12 mg Levamisole (Sigma-Aldrich) dazugeben und durch einen Sterilfilter filtrieren, um die Lösung zu klären.

7.2 Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Bovine serum albumene
C4	zervikale Wirbelsäule auf der Höhe des vierten Wirbelkörpers
COX	Cyclooxygenase
cm	Zentimeter
EZM	extrazelluläre Matrix
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
g	Gramm
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GI	Gastrointestinal

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPF	high power field
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MW±SF	Mittelwert ± Standardfehler
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
n.s.	nicht signifikant
NSAR	nicht-steroidales Antirheumatikum
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
s.c.	subkutan
TBS	Tris buffered saline
TH8	thorakale Wirbelsäule auf der Höhe des achten Wirbelkörpers
TX	Thromboxan
Vim.	Vimentin
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Danksagung

Vielen Dank an Hr. Prof. Dr. Dr. Schlüsener für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese interessante und lehrreiche Forschungsarbeit in der Abteilung für Immunpathologie durchführen zu können.

Vielen Dank an Hr. Prof. Dr. Meyermann für die Bereitstellung der Ressourcen.

Vielen Dank an Hr. Dr. Dr. Schwab für die Unterstützung bei der Erarbeitung des Themas und Entwicklung des Studiendesigns. Vielen Dank auch für die Vermittlung seines umfangreichen Wissens zu diesem Thema. Und Danke dafür, dass er mir geholfen hat, meine eigenen Fähigkeiten zu erkennen und umzusetzen, und mein Selbstvertrauen zu stärken.

Danke an Fr. Conrad für die Lehrstunden im Labor, für das Vermitteln aller technischen Fertigkeiten, die für diese Arbeit notwendig waren, für die unerschöpfliche Quelle an Tipps und für ihr stets offenes Ohr.

Danke an die Mitarbeiter im Institut für Hirnforschung für ihre Hilfe bei technischen Fragen.

Danke an Prof. Wolfgramm für die interessanten Informationen über den Alkoholstoffwechsel bei Ratten.

Vielen Dank an meine Eltern für ihre finanzielle, emotionale und moralische Unterstützung, und daß sie immer an mich glauben.

Vielen Dank an meinen Bruder Bernd für die vielen hilfreichen Tipps, die mir bei meiner Arbeit am Computer weitergeholfen haben.

Vielen Dank an Ralph dafür, dass er mich angefeuert und mir Mut gemacht hat, und mich bei der zeitaufwändigen Forschungsarbeit immer unterstützt hat.

Danke an alle Freunde, Verwandte und Bekannte für das Korrekturlesen und die hilfreichen Kommentare zur ersten Fassung. Danke für ihre moralische Unterstützung.

9. Lebenslauf

TINA ELBERT

geboren am 18. Februar 1977 in Marbach/N.

Schulische Ausbildung

1983-1987 Grundschule Remseck am Neckar
1987-1993 Realschule Remseck am Neckar
1993-1996 Robert-Franck-Schule Ludwigsburg, Wirtschaftsgymnasium
Juli 1996 Abitur und allgemeine Hochschulreife

Praktikum

1996-1997 Freiwilliges Soziales Jahr im Diakonissenkrankenhaus
Stuttgart

Hochschulausbildung

1997-1999 Medizinstudium an der Universität Rostock
20.09.1999 Ärztliche Vorprüfung
01.10.1999 Wechsel an die Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
29.08.2000 Erstes Staatsexamen
10.09.2003 Zweites Staatsexamen
03.11. 2004 Drittes Staatsexamen

Famulaturen

- Klinikum Ludwigsburg, Med. Klinik II
- Marienhospital Stuttgart, Neurologische Klinik
- Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart, Innere Medizin I
- Praxis Dr. Scherer, Facharzt für Neurologie
- Praxis Dr. Federle, Dr. Corkin, Fachärzte für Anästhesie

Praktisches Jahr

20.10.2003 bis 19.09.2004 Praktisches Jahr im Marienhospital in
Stuttgart mit dem Wahlfach Anästhesie und einem 8-wöchigen
Auslandspraktikum am Toronto East General Hospital, Department
of Surgery, Toronto, Kanada.