

Zelluläre inflammatorische Reaktion und Keratan-Sulphat-Proteoglycan-Expression nach experimentellen Kompressionsverletzungen des Rückenmarks adulter Ratten

Von der Medizinischen Fakultät der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Marlene Krautstrunk

aus Trier

Berichter: Herr Professor Dr. med. Wilhelm Nacimientto
Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Hubert Korr

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Mai 2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
2. Einleitung.....	6
3. Stand der Forschung	9
3.1 Regeneration nach Verletzungen des peripheren Nervensystems	9
3.2. Reaktionen zentraler Neurone nach Verletzungen.....	10
3.3 Posttraumatische Reaktionen im Bereich einer Rückenmark- verletzung	12
3.4. Ursachen fehlender axonaler Regeneration nach Schädigungen des ZNS.....	13
3.4.1. Oligodendroglia-assoziierte regenerationshemmende Moleküle.....	13
3.4.2. Regenerationshemmende Faktoren im Bereich der Gliaarbeit und Einfluß der Proteoglycanexpression auf die axonale Regenerationsfähigkeit.....	14
3.4.3. Verzögerung der Wallerschen Degeneration im ZNS.....	17
3.4.4. Regenerationshemmende Einflüsse aktivierter Makrophagen und Mikroglia	17
3.5. Bedeutung der Entzündungsreaktion	17
3.5.1. Beeinflussung der Entzündungsreaktion nach Myelonverletzungen.....	19
3.5.2. Transplantation von Makrophagen in das verletzte ZNS	20
3.6. Endogene Regenerationsvorgänge nach Rückenmark- verletzungen	21
4. Fragestellung	22

5. Material und Methoden	23
5.1. Versuchstiere.....	23
5.2. Läsionsmodell	23
5.2.1. Operation.....	23
5.2.2. Postoperative Versorgung.....	24
5.3. Perfusion und Weiterverarbeitung des Gewebes.....	24
5.4. Immunhistochemie und Histochemie	25
5.4.1. Immunhistochemie nach der Avidin-Biotin-Methode	25
5.4.1.1. Doppelfärbung: Methode der doppelten Peroxidasemarkierung	26
5.4.1.2. Primärantikörper	27
5.4.2. Färbung mit Isolectin	28
5.4.3. Färbung nach Nissl	28
5.4.4. Doppelmarkierung: Methode der indirekten Immun- fluoreszenz.....	28
5.5. Quantifizierung der Immunoreaktivität im Bereich der Läsion.....	29
5.6. Statistik.....	32
6. Ergebnisse	33
6.1. Unverletztes Rückenmark	33
6.2. Zelluläre Reaktionen im Bereich der Läsion.....	36
6.3. KSPG-Expression innerhalb und in der Umgebung der Läsion.....	44
6.4. Statistik.....	49
6.5. Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia in Regionen sekundärer Degeneration distal der primären Läsion	52

6.6. MHC-II-Expression im Bereich und distal der Läsion; Vergleich zwischen Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten.....	55
7. Diskussion.....	58
7.1. Unverletztes Rückenmark und Läsionsmodell.....	58
7.2. Semiquantitative und quantitative Auswertung der zellulären Reaktionen im Bereich der Läsion	60
7.3. Aktivierung von Entzündungszellen in Regionen Wallerscher Degeneration und der Zyste distal der primären Läsion	69
7.4. Einfluß der KSPG-Expression auf die axonale Regeneration.....	70
7.5. Bedeutung der speziesspezifischen MHC-II-Expression und der Autoreaktivität nach Rückenmarkverletzungen.....	75
8. Literaturverzeichnis	79

1. Zusammenfassung

Nach Verletzungen des Rückenmarkes adulter Säugetiere kommt es nur in sehr begrenztem Ausmaß zu spontanen Regenerationsvorgängen. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, daß der eingeschränkten axonalen Regenerationsfähigkeit verschiedene neuronale und nichtneuronale Ursachen zugrundeliegen, dabei wurde in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit zunehmend auf die Rolle der eingeschränkten Entzündungsreaktion des ZNS, die Ablagerung potentiell regenerationshemmender Proteoglycane und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix gelenkt. Die komplexe posttraumatische Entzündungsreaktion innerhalb des ZNS besitzt gegensätzliche Auswirkungen auf die Regeneration; einerseits kann sie sekundäre Gewebeschädigung verursachen, andererseits fördert sie die axonale Aussprossung. Es wird vermutet, daß die innerhalb des ZNS supprimierte Entzündungsreaktion die unvollständige Regeneration mitbedingt. Außerdem soll die Ablagerung von Proteoglycanen in ZNS-Läsionen die axonale Elongation hemmen. In der vorliegenden Studie wurden in einem klinisch relevanten tierexperimentellen Modell spinaler Kompressionsverletzungen die posttraumatische zelluläre Entzündungsreaktion sowie die Expression von Keratansulfat-Proteoglycan (KSPG) und ihr zeitlicher Zusammenhang mit endogenen Regenerationsvorgängen nach unterschiedlichen Überlebenszeiten (7, 14, 21 und 28 Tage postoperativ) immunhistochemisch untersucht und qualitativ sowie quantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen, daß spontane endogene Regenerationsvorgänge nach Myelonverletzungen erstaunlich organisiert und in bemerkenswertem Ausmaß ablaufen. Diese gehen u.a. mit der Infiltration der Läsion durch Makrophagen, NGFr- (nerve growth factor receptor-) positive Zellen und mit dem Einsprossen von Axonen einher. Dieser Phase intensiver Regenerationsvorgänge folgt jedoch eine massive Reduktion der axonalen Elongation. Es ist eine eindeutige zeitliche Korrelation zwischen Regenerationsvorgängen und dem Aktivierungszustand der Makrophagen festzustellen. Zum Zeitpunkt der intensivsten axonalen Regenerationsvorgänge war die Expression des Phagozytosemarkers CR3 und somit wahrscheinlich auch die Makrophagenaktivität am größten, während die darauffolgende axonale Retraktion mit einem erheblichen Verlust der phagozytären CR3-Immunoreaktivität (IR), also vermutlich einer phagozytären Deaktivierung, einherging. Die Untersuchung der KSPG-Expression ergab, daß 21 und 28 Tage postoperativ eine deutliche KSPG-Expression in der Läsion nachweisbar war, es bestand jedoch keine inverse räumliche Korrelation zwischen KSPG-reichen Regionen und NF200 kD-positiven Axonen, was darauf hindeutet, daß zumindest einige axonale Subpopulationen den potentiell inhibitorischen Effekt dieses Proteoglycans tolerieren können. Vergleiche des Phänotyps aktivierter Mikroglia und Makrophagen in der unmittelbaren Läsion und in sekundär degenerierenden Faserbahnen distal der Läsion zeigten, daß deutliche Unterschiede im Ablauf der Entzündungsreaktion zwischen diesen Regionen

bestehen. Zudem ergab eine als Pilotstudie durchgeführte semiquantitativ vergleichende Untersuchung der posttraumatischen MHC-II-Expression zwischen Wistar- und Sprague-Dawley- (SPRD) Ratten, daß SPRD eine erheblich intensivere MHC-II-Expression aufweisen, was insofern von Bedeutung ist, als daß MHC-II-positive antigenpräsentierende Zellen den chronischen immunologischen Status nach Rückenmarkverletzungen mitbeeinflussen. Die detaillierte Charakterisierung des Immunphänotyps posttraumatisch aktivierter Makrophagen kann als Vergleichsbasis für zukünftige experimentelle Therapieansätze dienen, z.B. könnte die Identifikation regenerationsfördernder Makrophagenpopulationen deren gezielte pharmakologische Manipulation und damit eine wenig- bzw. nicht-invasive therapeutische Möglichkeit zur Behandlung von Rückenmarkverletzung eröffnen.

2. Einleitung

Eine Rückenmarkverletzung hat für den Betroffenen und sein soziales Umfeld, aber auch volkswirtschaftlich gesehen, gravierende Auswirkungen. Oft besteht eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität durch irreversible motorische, sensorische und vegetative Funktionsausfälle, deren Ausmaß von Art, Schweregrad und segmentaler Höhe des Traumas abhängt, wobei im Extremfall ein persistierendes Querschnittsyndrom entsteht (Kakulas 1999). In Europa leben z.Z. ca. 200000 Menschen mit traumatisch verursachten Querschnittslähmungen (Privat 1995), davon etwa 40000 in Deutschland. Die Inzidenz traumatisch bedingter Querschnittverletzungen liegt in Deutschland bei 1100 pro Jahr; hauptsächlich sind junge Männer mit einem durchschnittlichen Alter von 28 Jahren betroffen, wobei Verkehrsunfälle eine häufige Ursache sind (Daten aus dem Antrag auf Förderung des Forschungsverbundes „Neurotrauma-NRW“ durch den BMBF Forschungsverbund Nordrhein-Westfalen; Kakulas 1999). Bisher steht eine klinisch anwendbare Therapie, die eine funktionell relevante Regeneration durchtrennter Axone nach Rückenmarksverletzungen ermöglicht, nicht zur Verfügung.

Ramon y Cajal zeigte schon 1928 experimentell, daß nach Axotomie zentraler Neurone adulter Säugetiere keine funktionelle Restitution, sondern nur ein abortives Sprouting stattfindet (Ramon y Cajal 1928). Die Kenntnis der zugrundeliegenden Ursachen ist noch unvollständig, zu berücksichtigen sind jedoch sowohl neuronale als auch nicht-neuronale Mechanismen im Bereich sowie proximal und distal der Läsion (Stichel und Müller 1998; Nacimiento et al. 1999). Die komplexen Verschaltungen im neuronalen Netzwerk eines adulten ZNS verringern die Möglichkeit, durch Traumata unterbrochene synaptische Verbindungen mittels axonaler Aussprossung exakt wiederherzustellen; gleichzeitig schließt die fehlende axonale Regeneration das Knüpfen funktionell unsinniger synaptischer Verbindungen aus (Schwab et al. 1993).

30% aller Rückenmarksverletzungen, die beim Menschen zumeist geschlossen, d.h. ohne Eröffnen der Dura mater erfolgen, führen zu einer massiven Kompression mit Erweichung des Rückenmarks in der betroffenen Höhe (Bunge et al. 1997). Nach rascher Nekrose der grauen und teilweiser oder vollständiger Zerstörung der weißen Substanz bildet sich eine bindegewebige Narbe. In manchen Fällen dehnt sich die Läsion in Form einer Syrinx weiter nach rostral bzw. kaudal aus, was zu zusätzlichen neurologischen Funktionseinschränkungen führen kann (Kakulas 1984; Schurch et al. 1996).

In der experimentellen Paraplegiologie wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, um unterschiedliche Arten von Verletzungen des Myelons reproduzieren und somit die Traumafolgen auf molekularer, zellulärer und funktionaler Ebene untersuchen zu können (Fehlings und Tator 1988). Insbesondere das von Martin et al. konzipierte Modell erweist sich als geeignet zur Reproduktion von Kompressionsläsionen, deren Pathologie der humaner Rückenmarkverletzungen sehr ähnlich ist (Martin et al. 1992). In autoptischen Befunden humaner Rückenmarkverletzungen zeigen sich ähnliche spontane Regenerationsvorgänge wie nach experimentellen Myelonläsionen. Diese finden nach Rückenmarkverletzungen organisierter und in weit größerem Ausmaß statt, als lange Zeit angenommen wurde (Wang et al. 1996; Brook et al. 1998a), die axonale Wiederaussprossung bleibt jedoch abortiv, und es kommt es nicht zur funktionellen Restitution.

Bislang wurden zahlreiche neuronale, gliale und molekulare Mechanismen, die eine axonale Regeneration mit Wiederherstellung unterbrochener synaptischer Verschaltungen verhindern, entdeckt. Auf der Grundlage dieser Kenntnisse werden derzeit tierexperimentell Methoden zur Förderung der Regeneration axotomierter Neurone sowie zur Unterdrückung nicht-neuronaler regenerationshemmender Mechanismen entwickelt (Stichel und Müller 1998; Nacimiento et al. 1999). Das gezielte therapeutische Eingreifen in die komplexen, nach Myelonschädigungen ablaufenden Pathomechanismen erfordert jedoch detailliertere Kenntnis endogener Regenerationsvorgänge und der posttraumatischen Plastizität des ZNS.

In den letzten Jahren wurde der Rolle der eingeschränkten Entzündungsreaktion des ZNS und der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Es wird vermutet, daß die innerhalb des ZNS supprimierte Entzündungsreaktion die unvollständige Regeneration mitbedingt (Prewitt et al. 1997; Lazarov-Spiegler et al. 1998a) und daß die Ablagerung von Proteoglycanen in ZNS-Läsionen die axonale Elongation hemmt (Stichel und Müller 1998). Die vorliegende Studie konzentriert sich auf die Untersuchung der posttraumatischen zellulären Entzündungsreaktion sowie der Expression des Proteoglycans Keratansulfat-Proteoglycan (KSPG) und ihren zeitlichen Zusammenhang mit endogenen Regenerationsvorgängen nach unterschiedlichen Überlebenszeiten (7, 14, 21 und 28 Tage postoperativ) in einem klinisch relevanten tierexperimentellen Modell spinaler Kompressionsverletzungen. **Tab. 1** gibt einen Überblick über die Funktion der untersuchten Makrophagenantigene. Die posttraumatische Entzündungsreaktion und die Proteoglycansynthese sind im Zusammenhang der komplexen zellulären und molekularen Interaktionen, welche die posttraumatische Plastizität des Myelons modulieren, zu betrachten. Daher folgen zunächst ein Überblick über einige neuronale und nicht-neuronale Mechanismen, welche die axonale Regeneration im ZNS beeinflussen sowie ein Vergleich mit Regenerationsvorgängen des peripheren Nervensystems.

Tab. 1: Übersicht über die Funktion der untersuchten Makrophagenantigene

Anti-körper	Antigen	Funktion des Antigens	Referenzen
ED1	Lysosomales Glycoprotein	Assoziiert mit phagozytischer Aktivität	Damoiseaux JG et al. 1994
MHC II	major histocompatibility complex II-Antigen; Ia-Antigen (immune-associated)	Zelluläre Erkennung während der Immunantwort; Antigenpräsentation an CD4-positive T-Helferzellen, Kontrolle der T-Zell-Antwort; Vermittlung der Autoimmunreaktivität; evt. Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegen neuronale Antigene im Stadium chronischer Rückenmarkverletzungen; Signaltransduktion	De Simone et al. 1995; Finsen et al. 1993; Hart und Fabry 1995; Jander und Stoll 1996; Matsushima et al. 1994; Perry und Gordon 1988; Popovich et al. 1997; Sedgwick et al. 1993; Streit et al. 1989; Trede et al. 1991
MHC I	major histocompatibility complex I-Antigen	Antigenpräsentation an zytotoxische, CD8-positive T-Lymphozyten	Hart und Fabry 1995; Koshinaga und Whittemore 1995
OX42	CD11b; complement type 3 receptor (CR3) für iC3b	Complementbindung, Adhäsion an Endothel und anderen Liganden; involviert in Phagozytose von Myelin	Brück et al. 1992; Finsen et al. 1993; Perry und Gordon 1988; Robinson et al. 1986
LFA-1	CD11a; lymphocyte function-associated molecule	Zusammen mit Ligand ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) kostimulatorisch für T-Zellen, reguliert antigenunabhängige zelluläre und Zell-Matrix-Interaktionen; Zelladhäsion	De Simone et al. 1995; Finsen et al. 1993 Hailer et al. 1996

3. Stand der Forschung

3.1. Regeneration nach Verletzungen des peripheren Nervensystems

Nach Verletzung eines peripheren Nerven finden regenerative Vorgänge in wesentlich größerem Ausmaß statt als nach Verletzungen des zentralen Nervensystems (ZNS). Schwannzellen, die das Myelin des peripheren Nervensystems bilden, und Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle in der Regeneration des PNS (Perry et al. 1987; Hall 1989; Perry und Brown 1992; Bunge 1993). Nach Durchtrennung eines Nerven räumen Makrophagen und Schwannzellen das degenerierende distale Segment des Axons und Myelinreste ab. Schwannzellen werden in die Basallamina des distalen Nervenstumpfes eingebunden, die zuvor die Schwannzell-Axon-Einheit umgab, proliferieren und bilden die Büngner-Bänder, die das aussprossende Axon zum Nervenstumpf führen. Schwannzellen sezernieren neurotrophe Faktoren, z.B. NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) (Übersichten: z.B. Bunge 1993; Raivich und Kreutzberg 1993). Zudem produzieren sie Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixmoleküle wie Laminin. Der von Schwannzellen synthetisierte leukemia inhibitory factor (LIF) ist u.a. an der Regulation zellulärer Differenzierung und neuronalen Wachstums beteiligt. Nach Verletzung eines peripheren Nerven wird LIF von Schwannzellen vermehrt exprimiert, retrograd zum Zellkörper des Neurons transportiert und dort für die adäquate Änderung der posttraumatischen neuronalen Genexpression benötigt (Blesch et al. 1999). Schwannzellen beeinflussen demnach die axonale Aussprossung durch zwei sich ergänzende Mechanismen. Sie fördern die Regeneration von Nervenfasern durch Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren und dienen gleichzeitig als Leitstruktur, die ein zielgerichtetes, orientiertes Wachstum der Axone ermöglicht. Der von Makrophagen und aus regenerierenden Neuronen freigesetzte transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) induziert die morphologische und funktionale Transformation von Schwannzellen, wodurch die axonale Aussprossung begünstigende Verhältnisse geschaffen werden (Rogister et al. 1993).

Nach Verletzungen des PNS kommt es entlang der axonalen Regenerationsstrecke zu einer ausgeprägteren Entzündungsreaktion als nach Verletzungen des ZNS. Unterschiede bestehen u.a. hinsichtlich der Zytokinexpression und der Aktivierung von Makrophagen, die nach Verletzungen des PNS in größerer Anzahl rekrutiert werden als nach Schädigungen des ZNS (Avellino et al. 1995; Streit et al. 1998). Die Wallersche Degeneration mit Phagozytose des distalen Anteils durchtrennter Axone und der Myelinscheiden findet im PNS innerhalb weniger Tage bis Wochen nach der Verletzung statt, nimmt im ZNS dagegen oft mehrere Monate in Anspruch (Perry et al. 1987; Avellino et al. 1995). Makrophagen stimulieren die Proliferation und Aktivierung von Schwannzellen durch Sekretion von Zytokinen, z.B. TGF- β und IL-1 (Lindholm et al. 1987;

Kiefer et al. 1995; Rothwell und Hopkins 1995). Makrophagen synthetisieren zudem Apolipoprotein-E, das der Lipid-Umverteilung von degenerierenden zu regenerierenden Axonen dient, und vermitteln damit den Umsatz für die Regeneration notwendiger Strukturbausteine (Perry und Gordon 1988). Die verminderte Rekrutierung von Makrophagen im ZNS ist möglicherweise eine Ursache für die fehlende Regenerationsfähigkeit zentraler Axone (Lazarov-Spiegler et al. 1998a).

3.2. Reaktionen zentraler Neurone nach Verletzungen

Nach Durchtrennung von Axonen des ZNS adulter Säugetiere findet keine vollständige Regeneration, sondern nur ein abortives Sprouting statt. Das wirft die Frage auf, inwiefern axotomierte Neurone zum Überleben bzw. zur Regeneration fähig sind. Es zeigte sich, daß Neurone einiger Systeme des ZNS mehrere Monate nach einer Axotomie überleben, z.B. septo-hippocampale, corticospinale sowie rubrospinale Ursprungsneurone (McBride et al. 1989; Naumann et al. 1992; Tetzlaff et al. 1994), hingegen persistieren nur wenige retinale Ganglienzellen nach Axotomie des Nervus opticus (Thanos et al. 1993; Bähr und Bonhoeffer 1994). Zahlreiche der im Clarke's Nucleus gelegenen Ursprungsneurone des Tractus spinocerebellaris posterior degenerieren ebenfalls nach Axotomie, wobei die Exzitotoxizität glutamaterger Hinterwurzelafferenzen eine entscheidende Rolle spielt (Sanner et al. 1993). Der sichtbaren neuronalen Degeneration geht eine Reduktion des zytoskelettassoziierten Py-Antigens voraus (Brook et al. 1998b).

Entscheidend dafür, ob ein axotomiertes Axon überlebt oder nicht, ist u.a. die Distanz der Läsion vom Perikaryon („near-far-effect“; Tetzlaff et al. 1994). Gewöhnlich führt eine somanahe Durchtrennung des Nerven zum Absterben des Neurons, während eine vom Perikaryon entferntere Axotomie überlebt werden kann. Allerdings weisen retinale, rubrospinale und kortikospinale Neurone nach proximaler Axotomie eine größere Regenerationskapazität auf als nach distaler Verletzung (Tetzlaff et al. 1994).

Die Regenerationsfähigkeit zentraler Axone ist zudem altersabhängig (Chen et al. 1995). Vor Ausreifung der Myelinisierung, d.h. in Abwesenheit Oligodendroglia-assoziiierter inhibitorischer Moleküle, ist die Regenerationskapazität kortikospinaler Fasern wesentlich größer als nach vollständiger Myelinisierung des ZNS (Vanek et al. 1998). Der Verlust der postnatal zunächst noch bestehenden axonalen Regenerationsfähigkeit geht mit einer reduzierten Expression des Protooncogens bcl-2 einher (Chen et al. 1997). Allerdings führt die Expression wachstumsassoziiierter Gene nicht immer zu erfolgreicher axonaler Regeneration, und umgekehrt findet in einigen regenerierenden Neuronen keine vermehrte Expression dieser Gene statt (Stichel und Müller 1998).

Nach Axotomie zentraler Neurone werden verschiedene Transkriptionsfaktoren, neuronale Adhäsionsmoleküle sowie wachstumsassoziierte Gene und Proteine, z.B. GAP (growth associated protein) -43, deren Synthese vor allem während der Entwicklung des Nervensystems stattfindet, reexprimiert (Tetzlaff et al. 1991; Hökfelt et al. 1994; Aubert et al. 1995). Die Regenerationsfähigkeit proximal axotomierter Neurone des Nucleus ruber der Ratte zeigt sich in einer vorübergehend gesteigerten Expression des GAP-43 sowie der Zytoskelettproteine Aktin und Tubulin, was z.T. den regenerativen neuronalen Vorgängen nach Axotomie eines peripheren Nerven entspricht. Die Wiederaussprossung rubrospinaler Fasern bleibt jedoch unvollständig (Tetzlaff et al. 1994).

Während die Axotomie peripherer Nerven zu einer gesteigerten neuronalen Expression des regenerationsassoziierten Transkriptionsfaktors c-jun führt, induziert die Läsion zentraler Axone keine bzw. nur eine geringe c-jun-Synthese im betroffenen Neuron (Jenkins et al. 1993; Broude et al. 1997). Im regenerierenden peripheren Nerven nimmt die c-Jun-Expression nach einem anfänglichen Anstieg innerhalb weniger Tage wieder ab, dagegen weisen nach zervikalen Rückenmarkverletzungen bereits atrophische Neurone selbst einige Wochen nach dem Trauma noch eine gesteigerte c-Jun-Synthese auf (Jenkins et al. 1993).

Traumatische Einwirkungen auf das ZNS schädigen nicht nur die unmittelbar betroffenen Neurone, sondern wirken sich auch auf das umliegende neuronale Netzwerk aus. Motoneurone, welche in spinalen Vorderhörnern kaudal einer Läsion liegen, reagieren auf eine Deafferenzierung, die durch Transsektion deszendierender Bahnen verursacht wird, mit persistierender Reduktion des Acetylcholingehalts (Nacimient et al. 1996; Kakulas 1999). Die posttraumatische Plastizität einiger neuronaler Systeme zeigt sich am Beispiel kompensatorischer synaptischer Reorganisationsvorgänge nach zervikaler Hemisektion des Myelons adulter Ratten, die zu unilateraler Parese des Diaphragmas führt (Goshgarian et al. 1989; Moreno et al. 1992). Dem „crossed phrenic phenomenon“ liegt eine Reinnervation des deafferenzierten Phrenikuskerns durch ipsi- und kontralaterale deszendierende bulbospinale Fasern zugrunde, wodurch es zur partiellen funktionalen Restitution der einseitig gelähmten Zwerchfellmuskulatur kommt (Moreno et al. 1992).

In einer Umgebung, die für axonale Aussprossung permeabel ist, können zentrale Axone regenerieren und funktionsfähige synaptische Verbindungen mit ursprünglichen Zielneuronen eingehen. Eine Grundlage für die topographisch geordnete Reinnervation von Zielregionen ist die posttraumatische Reexpression von Leitmolekülen, die während der Entwicklung des ZNS das axonale Wachstum koordinieren (Bähr und Bonhoeffer 1994). Bei prinzipiell vorhandener, wenn auch eingeschränkter Regenerationsfähigkeit zentraler Neurone verhindern nicht-neuronale Vorgänge im Bereich und distal der Läsion eine axonale Wiederaussprossung mit funktioneller Restitution. Aguayo (1985) zeigte dies mit dem Nachweis, daß

durchtrennte Axone des Nervus opticus der Ratte durch Aussprossung in einen implantierten Abschnitt eines peripheren Nerven ursprüngliche mesencephale Zielgebiete reinnervieren, was mit partieller funktioneller Restitution einhergeht (Aguayo 1985; Keirstead et al. 1989). Das periphere Nervensystem fördert demnach die axonale Wiederaussprossung im Gegensatz zum ZNS, in dem regenerationshemmende Faktoren dominieren.

3.3. Posttraumatische Reaktionen im Bereich einer Rückenmarksverletzung

Im unmittelbaren Bereich einer Rückenmarkverletzung sind zelluläre und molekulare Gewebereaktionen an der Ausbildung einer regenerationshemmenden Umgebung beteiligt, wobei sowohl direkte Traumafolgen als auch sekundäre Schädigungsmechanismen, die u.a. durch Entzündungszellen vermittelt werden, eine Rolle spielen (Tator 1995; Kakulas 1999). Unmittelbar nach dem Trauma kommt es zur Einblutung in die von einem dichten Kapillarnetz durchzogene graue Substanz. Die durch Gefäßrupturen und Vasospasmen verursachte Minderperfusion führt zu Hypoxie, Hypoglykämie und ischämischer Nekrose von Neuronen und Gliazellen (Schwab und Bartholdi 1996). Da auch Endothelzellen durch die Hypoxie geschädigt werden, kommt es zum Plasmaaustritt ins Gewebe und zum interstitiellen Ödem, welches durch Kompression der Venolen die Blutstase und Ischämie verstärkt (Tator 1995). Reperfusionsbedingte Schädigungen und Elektrolytverschiebungen, v.a. der Anstieg des intrazellulären Calciums, führen ebenfalls zum Zelltod (Schwab und Bartholdi 1996). Exzitotoxische Aminosäuren, z.B. die aus Makrophagen freigesetzte Quinolinsäure, Aspartat oder Glutamat, erhöhen als NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) -Rezeptor-Agonisten den intrazellulären Calciumgehalt in Neuronen (Tator 1995; Schwab und Bartholdi 1996). Die Aktivierung Calcium-abhängiger Proteasen führt zur Zerstörung von Zellmembranen und zur Freisetzung von Arachidonsäure, deren Metabolite chemotaktisch, vasoaktiv und hämostaseologisch wirksam sind (Tator 1995; Schwab und Bartholdi 1996). Bei der Bildung von Arachidonsäuremetaboliten entsteht reaktiver Sauerstoff, der außerdem durch die „oxidative burst“-Reaktion aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen freigesetzt wird (Tator 1995; Schwab und Bartholdi 1996). Das geschädigte Gewebe ist besonders empfindlich gegenüber Sauerstoffradikalen, da es den oxidativen Streß aufgrund eingeschränkter Mitochondrienfunktion und verminderter Expression antioxidativ wirksamer Enzyme schlecht zu kompensieren vermag (Azbill et al. 1997). Aktivierte Mikroglia und Makrophagen tragen außerdem durch Freisetzung von Proteinase und NO-Derivaten zur sekundären Gewebeschädigung nach Verletzungen des Rückenmarkes bei (Banati et al. 1993; Carlson et al. 1998). Der durch Endothelläsionen verursachte Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht den Einstrom von Entzündungszellen und Serumkomponenten, z.B. Komplementfaktoren, aus dem Blut in die Läsion, wodurch sowohl sekundäre Schädigungsmechanismen als auch regenerationsfördernde

Vorgänge angestoßen werden können (Popovich et al. 1996a; Jaeger und Blight 1997). An der entzündlichen zellulären Infiltration sind zunächst Granulozyten, Mono- und Lymphozyten beteiligt (Dusart und Schwab 1993; Carlson et al. 1998). Später herrschen Makrophagen und aktivierte Mikroglia vor, wobei reaktive Mikroglia morphologisch von aus dem Blut rekrutierten Makrophagen nicht mehr zu unterscheiden sind (Popovich et al. 1997; Streit et al. 1988).

Nach einigen Tagen bis Wochen kommt es durch Proliferation und Hypertrophie von Astrozyten zur reaktiven Gliose. Aktivierte Astrozyten, die durch eine erhöhte GFAP (glial fibrillary acidic protein) -Immunoreaktivität gekennzeichnet sind, akkumulieren am Rand der Läsion und bilden eine für axonale Aussprossung undurchlässige Barriere (Schwab und Bartholdi 1996). Wurde durch das Trauma die Glia limitans des Rückenmarks verletzt, was z.B. bei Kompressionsverletzungen geschieht, migrieren Schwannzellen, Fibrozyten und Meningozyten in die Läsion und bilden durch Förderung der Neovaskularisation, durch Sekretion neurotropher Faktoren und durch Produktion extrazellulärer Matrixmoleküle eine für die begrenzt stattfindende axonale Regeneration günstige Umgebung (Tator 1995; Schwab und Bartholdi 1996). Nach Kontusionsverletzungen, die die Glia limitans unversehrt lassen, fehlt hingegen die dichte zelluläre Infiltration; die Bildung liquorgefüllter Zysten im Bereich der Läsion überwiegt (Bunge et al. 1997). Die Ursachen für die Entstehung der Zysten, die sich in unterschiedlichem Ausmaß rostrokaudal von der Läsion ausdehnen, sind noch ungeklärt (Bunge et al. 1994; Guizar-Sahagun et al. 1994; Williams 1995). Monate bis Jahre nach einem Rückenmarkstrauma können sie zur Ausbildung einer Syringomyelie führen, die durch erhöhten Liquordruck mit sekundärer Kompression des Myelons progrediente neurologische Ausfälle hervorruft (Schurch et al. 1996; Milhorat et al. 1997).

3.4. Ursachen fehlender axonaler Regeneration nach Schädigungen des ZNS

3.4.1. Oligodendroglia-assoziierte regenerationshemmende Moleküle

Während die myelinbildenden Zellen des peripheren Nervensystems die axonale Regeneration unterstützen, bilden die von Schwab et al. entdeckten Oligodendroglia-assoziierten Glycoproteine NI35 und NI250 eine wesentliche Ursache der fehlenden Regeneration durchtrennter Axone des ZNS (Caroni und Schwab 1989; Schwab et al. 1993). Die Blockierung der myelinassoziierten regenerationshemmenden Moleküle NI-35 und NI-250 durch den spezifischen Antikörper IN-1 nach unilateraler Transsektion der Pyramidenbahn adulter Ratten führt zu langstreckigem Aussprossen durchtrennter Nervenfasern (Schnell und Schwab 1990, 1993; Bregman et al. 1994; Schwab und Brosamle 1997). Bei Säugetieren wird das ZNS innerhalb der ersten Lebenswochen myelinisiert, wodurch die postnatale Entwicklungsphase des ZNS, in der eine hohe Permeabilität für axonales Wachstum besteht, beendet wird (Vanek et al. 1998). Im unverletzten ZNS adulter

Säugetiere dienen Myelin-assoziierte Glycoproteine wahrscheinlich der Stabilisierung komplex verschalteter neuronaler Netzwerke. So ist z.B. die Synthese des wachstumsassoziierten Proteins GAP-43 invers mit der Expression Oligodendroglia-assoziiierter inhibitorischer Moleküle korreliert (Kapfhammer und Schwab 1994). Nach Verletzungen beeinflussen Ausmaß und Geschwindigkeit der Myelinabräumung durch Makrophagen die axonale Regeneration (Perry et al. 1987; Frisen et al. 1994; Dyer et al. 1998). Daß es im verletzten ZNS adulter Säugetiere neben Oligodendroglia-assoziierten Wachstumsinhibitoren noch weitere bedeutende, die axonale Aussprossung verhindernde Faktoren geben muß, wird dadurch deutlich, daß nach Abräumen des Myelins im Bereich einer Läsion das proximale Segment durchtrennter Nervenfasern zwar wieder aussproßt, die Elongation in der Läsion trotz Abwesenheit Oligodendroglia-assoziiierter inhibitorischer Moleküle jedoch einstellt (Stichel et al. 1995b). Zudem zeigte sich, daß die weiße Substanz des ZNS adulter Säugetiere in Abwesenheit von Glianarben für axonales Wachstum durchlässig ist (Davies et al. 1997) und daß Oligodendroglia-assoziierte inhibitorische Moleküle auch im regenerationsfähigen ZNS niederer Vertebraten vorkommen (Sivron und Schwartz 1994). Wie groß der relative Beitrag Oligodendroglia-assoziiierter inhibitorischer Moleküle, extrazellulärer Matrixmoleküle und aktivierter Astrozyten an der Ausbildung einer regenerationshemmenden Umgebung im Bereich bzw. distal einer ZNS-Läsion ist, bleibt noch ungeklärt (Davies et al. 1997; Stichel und Müller 1998).

3.4.2. Regenerationshemmende Faktoren im Bereich der Glianarbe und Einfluß der Proteoglycanexpression auf die axonale Regenerationsfähigkeit

Während nicht-aktivierte bzw. unreife embryonale Astrozyten ein die neuronale Regeneration förderndes Milieu bilden (Giulian et al. 1993; Wunderlich et al. 1994), sind astrozytäre Reaktionen auf Verletzungen des adulten ZNS komplex und haben hauptsächlich regenerationshemmende (Barrett et al. 1981; Reier et al. 1983; Liuzzi und Lasek 1987; McKeon et al. 1991;), aber auch -fördernde (Rudge et al. 1992; Frisen et al. 1995) Auswirkungen, wobei möglicherweise die Art des Traumas und der daraus resultierende Aktivierungszustand der Astrozyten entscheidend dafür sind, welche Effekte überwiegen (Mansour et al. 1990; Frisen et al. 1994, 1995). So scheinen Areale mit isomorpher, die Wallersche Degeneration begleitender Astrozytenproliferation die axonale Aussprossung zu hemmen, während das sich im Bereich der Läsion bildende anisomorphe Narbengewebe durchlässig für axonale Regeneration ist (Mansour et al. 1990). Die Arbeitsgruppe um Privat konnte nach thorakaler Hemisektion des Myelons adulter Ratten durch lokale Applikation von Oxysterol die reaktive Astroglie hemmen, was zur vermehrten Aussprossung deszendierender serotonerger Axone der intakten Gegenseite führt, welche deafferenzierte Gebiete kaudal der Läsion reinervieren (Giménez y Ribotta et al. 1995). Von Astrozyten exprimierte Moleküle wie C-Tenascin oder Chondroitin-Sulphat-Proteoglycan (CSPG) besitzen mögli-

cherweise regenerationshemmende Eigenschaften, wobei einige Untersuchungen jedoch widersprüchliche Ergebnisse erbrachten (Niquet et al. 1995; Stichel et al. 1995a; Zhang et al. 1997).

Während der neuronalen Entwicklung verliert das ZNS seine Fähigkeit zur axonalen Regeneration in dem Alter, in dem eine vermehrte Proteoglycansynthese einsetzt (McKeon et al. 1991; Pindzola et al. 1993; Davies et al. 1997). Einige glycosylierte Proteine, die während der neuronalen Entwicklung zahlreiche Funktionen ausüben, z.B. die Bildung neuronaler Grenz- und Leitstrukturen, die Regulation zellulärer Differenzierung, Signaltransduktion und Steuerung der axonalen Aussprossung, werden nach Verletzungen des adulten ZNS innerhalb und in der Umgebung der Läsion reexprimiert (Ruoslahti et al. 1989; Ruoslahti et al. 1991; Milev et al. 1994; Silver 1994; Margolis et al. 1996, Faissner 1997; Fitch und Silver 1997; Reviews: Laywell and Steindler, 1991; Margolis und Margolis 1997). Repulsive Eigenschaften dieser Glycoproteine sollen zur fehlenden axonalen Regenerationsfähigkeit nach Verletzungen des ZNS beitragen. So wird die Reexpression von Chondroitin Sulfat Proteoglycan (CSPG) durch reaktive Astrozyten im verletzten Gehirn mit dem Verlust der Regenerationsfähigkeit transplanter Ganglienzellen korreliert (Davies et al. 1997). *In vitro* Untersuchungen zeigten, daß ein Zusammenhang zwischen den regenerationshemmenden Eigenschaften von Narbengewebe des ZNS und der Expression von CSPG besteht (McKeon et al. 1991) und daß nach Spaltung von CSPG eine vermehrte axonale Aussprossung peripherer embryonaler Neurone, die in das verletzte Rückenmark adulter Ratten transplantiert wurden, stattfindet (Zuo et al. 1998). *In vivo* Experimente hingegen zeigten, daß die Regeneration durchtrennter Fornix-Fasern durch CSPG nicht gehemmt wird (Lips et al. 1995). Unsicherheit besteht auch hinsichtlich der Rolle von Tenascin, das als regenerationshemmend gilt (Faissner und Kruse 1990). Adulte Thalamusneurone sind jedoch in der Lage, durch ein Tenascin-reiches Transplantat eines peripheren Nerven zu regenerieren (Zhang et al. 1995). Sowohl Tenascin als auch einige Proteoglycane besitzen in Abhängigkeit von Zeitpunkt und Umgebung ihrer Expression regenerationshemmende oder -fördernde Eigenschaften, so daß ihr Beitrag zur Beeinflussung axonaler Regeneration noch nicht eindeutig geklärt ist (Stichel und Müller 1998). *In vitro* Experimente weisen darauf hin, daß der Effekt, den Proteoglycane auf die axonale Regenerationsfähigkeit ausüben, sowohl von der jeweiligen neuronalen Population als auch von der Zusammensetzung der Matrix, die den Neuronen als Substrat dient, abhängt (Dou und Levine 1995). Während CSPG und Keratan Sulfat Proteoglycan (KSPG) die Aussprossung cerebellärer und Hinterwurzelganglion-Neurone auf Laminin-bedeckten Oberflächen hemmen, wirken diese Proteoglycane nur schwach inhibitorisch bzw. sogar regenerationsfördernd auf L1-bedeckten Oberflächen (Dou und Levine 1995). Im adulten ZNS wird KSPG von einer Subpopulation ramifizierter Mikroglia expriert, wobei eine inverse Korrelation mit der speziesspezifischen Intensität der MHC-II-Expression besteht (Bertoletto et al. 1995, 1998; Jander und Stoll 1996b).

Welche Rolle die KSPG Expression bei pathologischen Prozessen des ZNS spielt, ist unklar. Die Transformation verzweigter Mikroglia in Makrophagen, die z.B. bei der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE), nach kortikalen Stichverletzungen und während Wallerscher Degeneration zentraler Faserbahnen zu beobachten ist, führt zu einem Verlust ihrer KSPG-Immunoreaktivität (Giordana et al. 1994; Jander und Stoll 1996a). Während der neuronalen Entwicklung soll KSPG ähnlich CSPG an der Ausbildung repulsiver Grenzstrukturen beteiligt sein. *In vitro* Untersuchungen wiesen darauf hin, daß KSPG die neuronale Adhäsion und die axonale Elongation hemmt (Cole und McCabe 1991). Welche Moleküle die Synthese einer undurchlässigen extrazellulären Matrix nach Verletzungen des ZNS triggern, ist noch nicht bekannt; möglicherweise spielen die Verletzung der Blut-Hirn-Schranke und die posttraumatische Entzündungsreaktion eine Rolle (Fitch und Silver 1997).

Stichel et al. stellten fest, daß die Basalmembran, die einen wesentlichen Anteil der sich im Bereich von ZNS-Verletzungen bildenden Narbe darstellt, die axonale Elongation im Bereich der Läsion verhindert (Stichel und Müller 1998; Stichel et al. 1999b). Auch der Collagengehalt trägt vermutlich zu den regenerationshemmenden Eigenschaften des Narbengewebes bei. Wird die Ablagerung von Collagen Typ IV durch Applikation spezifischer Antikörper oder durch Inhibition der Collagen-Tripelhelix-Synthese gehemmt, sind durchtrennte Axone dazu fähig, die Läsion zu durchqueren und distal der Verletzung ursprüngliche Zielgebiete erneut zu innervieren (Stichel et al. 1999a).

Weitere Substanzen, die für die Entstehung einer regenerationshemmenden Umgebung im Bereich der Läsion verantwortlich sein könnten, sind Chemo-repellents wie Semaphorine und die Gruppe der Eph RPTKs (receptor protein tyrosine kinases; Miranda et al. 1999; Pasterkamp et al. 1999). Pasterkamp et al. verglichen die Expression des Chemorepellents Semaphorin III und seines Rezeptors, Neuropilin-1, in Läsionen des ZNS adulter und neonataler Ratten. Während Fibroblasten-ähnliche Zellen in ZNS-Läsionen adulter Ratten eine vermehrte Semaphorin III-Expression aufwiesen, zeigte sich in ZNS-Verletzungen neonataler Ratten keine verstärkte Semaphorin III-Expression, jedoch eine massive axonale Regeneration (Pasterkamp et al. 1999).

Astrozyten spielen eine Rolle in der Aufrechterhaltung der immunologischen Sonderstellung des ZNS. Durch Produktion von GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) hemmen sie die Antigen-präsentierende Funktion von Mikroglia (Hayashi et al. 1993). Nach Verletzung der Blut-Hirn-Schranke inaktivieren sie aus dem Blut einwandernde Makrophagen, evt. durch Sekretion von TGF- β 1 (O'Brien et al. 1994; Hailer et al. 1998). Möglicherweise wird durch die somit supprimierte Entzündungsreaktion die Regeneration nach Verletzungen des ZNS verzögert (Perry et al. 1987; Hirschberg et al. 1995).

3.4.3. Verzögerung der Wallerschen Degeneration im CNS

Nach Durchtrennung zentraler Axone werden lediglich synaptische Terminalen schon nach wenigen Tagen phagozytiert, während die Wallersche Degeneration mit Phagozytose durchtrennter Axone und ihrer Myelinscheiden mehrere Monate beansprucht (Bähr und Bonhoeffer 1994; George und Griffin 1994; Avellino et al. 1995). Die verzögerte, mit eingeschränkter Makrophagenreaktion und verspäteter Abräumung regenerationshemmende Myelinreste einhergehende Wallersche Degeneration im ZNS stellt möglicherweise einen Grund für die unvollständige axonale Wiederaussprossung zentraler Neurone dar (Brown et al. 1992; Avellino et al. 1995; Stoll und Jander 1999).

3.4.4. Regenerationshemmende Einflüsse aktivierter Makrophagen und Mikroglia

Aktivierte Mikrogliazellen induzieren möglicherweise die Apoptose von Oligodendrozyten in der weißen Substanz proximal und distal der Läsion, was zu Demyelinisierung und Degeneration auch initial unverletzter Axone führt (Shuman et al. 1997). Zudem eliminieren sie Neurone, die nach Verletzungen des ZNS geschädigt wurden, zunächst jedoch überlebten, und die somit keine Möglichkeit zur Regeneration erhalten (Thanos et al. 1993). Aktivierte Mikrogliazellen synthetisieren inhibitorische Proteoglykane, außerdem regen aus dem Blut rekrutierte Makrophagen Astrozyten zur Produktion regenerationshemmender Matrixmoleküle an (Bovolenta et al. 1993; Fitch und Silver 1997). Als Antigen-präsentierende Zellen aktivieren MHC II-positive Makrophagen mit Hilfe kostimulatorischer Moleküle, z.B. B7, T-Lymphozyten, welche sowohl bei der EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) bzw. der Multiplen Sklerose als auch nach Rückenmarkverletzungen gegen ZNS-Antigene gerichtete Autoimmunreaktionen vermitteln und zu protrahierten Gewebeschädigungen führen können (Mizrachi et al. 1983; De Simone et al. 1995; Popovich, Stokes, Whitacre 1996; Popovich et al. 1998).

3.5. Bedeutung der Entzündungsreaktion

Eine Entzündungsreaktion ist als Antwort eines Gewebes auf Infektionen, Verletzungen und andere Schädigungen der strukturellen Integrität zu verstehen und dient der Elimination von Pathogenen sowie der Regeneration verletzten Gewebes. Die Kardinalsymptome der Entzündung, d.h. rubor, calor, dolor, tumor und functio laesa, wurden schon in der Antike beschrieben und spiegeln die komplexen Reaktionen des geschädigten Gewebes wider. Während Entzündungsreaktionen peripherer Gewebe eingehend untersucht wurden, konzentrierte sich die Erforschung inflammatorischer Reaktionen des ZNS bisher auf immunologisch vermittelte Erkrankungen, z.B. die Multiple Sklerose. Entzündliche Veränderungen des ZNS spielen jedoch auch bei Tumoren,

Traumata, ischämischen Insulten, AIDS-Demenz und neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Alzheimer eine Rolle (Kreutzberg 1996; Matyszak 1998).

Während der Entzündungsreaktion wird das Gewebe mit Makrophagen infiltriert, die durch Freisetzung zahlreicher Faktoren und Zytokine die Regeneration beeinflussen (Richardson und Lu 1994; Bartholdi und Schwab 1997). Innerhalb des ZNS vermitteln aktivierte Mikroglia, die einer morphologischen Transformation unterliegen, Interaktionen zwischen dem ZNS und dem Immunsystem (Giulian 1987; Streit et al. 1988; Lotan und Schwartz 1994). Makrophagen, die das geschädigte Gewebe infiltrieren und Detritus phagozytieren, sezernieren zahlreiche Faktoren und Zytokine, von denen einige zur sekundären Gewebeschädigung führen, andere hingegen zur Regeneration beitragen (Perry et al. 1987; Lu et al. 1991; Hirschberg et al. 1994). Die posttraumatische Entzündungsreaktion nach Rückenmarkverletzungen ist daher als ein „zweischneidiges Schwert“ zu betrachten. Ihre Intensität variiert in unterschiedlichen Bereichen des Nervensystems. Nach Schädigungen peripherer Nerven kommt es zu einer ausgeprägteren Entzündungsreaktion als nach Verletzungen des ZNS (Stoll und Jander 1999). Akute Entzündungsreaktionen, die z.B. durch Lipopolysaccharid- (LPS-) Injektionen hervorgerufen werden können, sind im ZNS schwerer auszulösen bzw. gehen im Vergleich zur Reaktion peripherer Gewebe mit einer verzögerten und geringeren Immunantwort einher. Die Gründe dafür sind noch nicht hinreichend bekannt; möglicherweise sollen im ZNS potentiell schädliche entzündliche Reaktionen supprimiert werden (Kreutzberg 1996; Matyszak 1998; Schwartz et al. 1999b). Auch innerhalb des ZNS besteht eine Hierarchie bezüglich des Ausmaßes von Entzündungsreaktionen. Die außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegenden Meningen und der Plexus choroideus weisen eine dem PNS ähnliche Entzündungsantwort auf. Nach Rückenmarkverletzungen wird eine ausgeprägtere inflammatorische Reaktion induziert als nach Traumata des Gehirns (Schnell et al. 1999). Dies ist z.T. auf eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber proinflammatorischen Zytokinen zurückzuführen. Die entzündliche Reaktion nach Verletzungen des PNS stellt eine entscheidende Voraussetzung für regenerative Vorgänge dar, die eingeschränkte Entzündungsantwort nach Schädigungen des ZNS und die verzögerte Abräumung regenerationshemmender Myelinreste durch Makrophagen tragen wahrscheinlich zur eingeschränkten axonalen Regeneration bei (Prewitt et al. 1997; Lazarov-Spiegler et al. 1998a). Schwartz und Mitarbeiter zeigten, daß die phagozytäre und sekretorische Aktivität von Makrophagen durch die Exposition von regenerierenden peripheren Nerven gesteigert, in der Umgebung des ZNS jedoch gehemmt wird (Zeev-Brann et al. 1998). Die immunsupprimierenden Eigenschaften des ZNS vermindern die Makrophagenaktivierung während der posttraumatischen Entzündungsreaktion und verhindern dadurch wahrscheinlich schädigende Auswirkungen der Entzündungsreaktion, aber auch regenerationsfördernde phagozytäre Eigenschaften (Hirschberg et al. 1994; Zeev-Brann et al. 1998).

Aktivierte Mikroglia und Makrophagen unterstützen die axonale Regeneration durch verschiedene Mechanismen. In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass im Bereich einer Läsion Makrophagen die Permeabilität für axonale Aussprossung erhöhen (David et al. 1990). In vivo beeinflussen phagozytäre Zellen die axonale Regeneration u.a. durch Sekretion von Zytokinen wie TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) und durch Synthese des extrazellulären Matrixproteins Thrombospondin (Chamak et al. 1994; Arber und Caroni 1995; Kiefer et al. 1995). Während der neuronalen Entwicklung und Regeneration beeinflussen Mikroglia und Makrophagen die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix durch Sekretion von Proteinasen wie z.B. Plasminogen, die eine Rolle in der Steuerung der neuronalen Migration spielen (Perry und Gordon 1988; Kreutzberg 1996). Nach striatalen Verletzungen kommt es im Randbereich der Läsion zum Aussprossen dopaminergischer nigrostriataler Neurone (Batchelor et al. 1999). Die regenerierenden Axone sind mit aktivierten Makrophagen und Mikroglia, die GDNF (glia cell line-derived neurotrophic factor) und BDNF (brain derived neurotrophic factor) produzieren, assoziiert. In größerem Ausmaß finden die regenerativen Vorgänge nach Transplantation z.B. adrenergen Gewebes in die striatale Läsion statt, und zwar auch dann, wenn das Transplantat nicht überlebt; entscheidend ist also weniger das Implantat als die Aktivierung von Makrophagen. Aktivierte Makrophagen und Mikroglia fördern die axonale Regeneration sowohl direkt durch Produktion von GDNF und BDNF als auch indirekt durch Sekretion von IL-1 (Interleukin-1), das Astrozyten aktiviert und zur Sekretion weiterer neurotropher Faktoren wie CNTF (ciliary neurotrophic factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor) und regenerationsfördernder extrazellulärer Matrixmoleküle anregt (Giulian et al. 1986; Perry und Brown 1992; Batchelor et al. 1999). Noch unklar ist, ob die Herkunft der Makrophagen, d.h. ihre Abstammung von ortsständiger Mikroglia oder ihre Rekrutierung aus dem Blut, ihre räumliche Verteilung (in der grauen oder weißen Substanz innerhalb bzw. distal der Läsion) und der Zeitpunkt ihrer Aktivierung (unmittelbar nach dem Trauma oder verzögert) das Vorherrschen regenerationsfördernder oder -hemmender Einflüsse mitbestimmen (Popovich et al. 1997). In diesem Zusammenhang sind auch die Art und Schwere des Traumas von Bedeutung, da sie mitbestimmen, welche Makrophagenpopulation hauptsächlich rekrutiert bzw. aktiviert wird (Riva-Depaty et al. 1994; Popovich et al. 1997). Da es zahlreiche immunphänotypische, morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Aktivierungsstufen der Mikroglia/ Makrophagen gibt, stellt sich außerdem die Frage, ob der relative Beitrag einer bestimmten Population an der Entzündungsreaktion beeinflussen kann, wie groß der regenerationsfördernde Einfluß ist.

3.5.1. Beeinflussung der Entzündungsreaktion nach Myelonverletzungen

Neben der Nutzung der antiinflammatorischen Wirkung von Methylprednisolon (Bracken et al. 1997) werden noch weitere therapeutische Möglichkeiten zur gezielten Beeinflussung der Entzündungsreaktion nach Rückenmarkverletzungen

erprobt. Entzündungszellen sezernieren abhängig vom jeweiligen Aktivierungszustand regenerationsfördernde oder die sekundäre Gewebeschädigung verstärkende Faktoren. Durch adäquate Modulation der inflammatorischen Antwort lassen sich regenerationsfördernde Eigenschaften der Gliazellen verstärken und sekundäre Schädigungsmechanismen reduzieren (Schwartz et al 1999b). So führt die kombinierte Applikation von LPS (Lipopolysaccharid), das Makrophagen zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine anregt, und Indomethacin, das die Prostaglandinsynthese hemmt und die Blutzirkulation im verletzten Rückenmark fördert, zu einer partiellen Restitution motorischer Funktionen nach Kompressionsverletzungen des Myelons adulter Ratten (Guth et al. 1994; Xiao et al. 1996).

3.5.2. Transplantation von Makrophagen in das verletzte ZNS

Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, daß die Transplantation von Makrophagen bzw. Mikroglia in das verletzte ZNS adulter Ratten die axonale Regeneration unterstützt (Lazarov-Spiegler et al. 1996; Prewitt et al. 1997; Rabchevsky und Streit 1997; Schwarz et al. 1999a). Werden nach Transsektion des Rückenmarks adulter Ratten aktivierte Makrophagen in die Läsion implantiert, kommt es zur Aussprossung deszendierender Nervenfasern, was mit einer partiellen Restitution motorischer Funktionen einhergeht (Schwartz et al. 1999a). Franzen et al. (1998) zeigten, daß die Implantation autologer Peritonealmakrophagen in spinale Kompressionsläsionen adulter Ratten die Anzahl v.a. peptiderger Neurone innerhalb der Läsion erhöht. Implantierte Makrophagen fördern die axonale Aussprossung durch Induktion der Bildung einer regenerationsfördernden extrazellulären Matrix, durch Phagozytose von Myelin, durch Stimulation der Angiogenese und durch Sekretion von Zytokinen, die andere Gliazellpopulationen zur Produktion neurotropher Faktoren anregen, z.B durch Rekrutierung nerve growth factor-produzierender Schwannzellen durch Interleukin-1 oder TGF- β 1 (Rabchevsky und Streit 1997; Franzen et al. 1998). Lazarov-Spiegler et al. entwickelten aufgrund der Feststellung, daß durch peripheres Nervengewebe aktivierte Makrophagen eine größere phagozytische Aktivität und ein höheres regenerationsförderndes Potential besitzen, ein neues experimentelles therapeutisches Konzept (Lazarov-Spiegler et al. 1998b; Zeev-Brann et al. 1998). Werden durch regenerierende periphere Nerven stimulierte Makrophagen in den durchtrennten Nervus opticus der adulten Ratte transplantiert, kommt es zur vermehrten Abräumung von Myelindetritus und einer gesteigerten Regeneration des verletzten Sehnerven. Diese Methode führte auch nach experimentellen Rückenmarkverletzungen adulter Ratten zu funktionell signifikanten Verbesserungen der Regeneration motorischer Funktionen (Rapalino et al. 1998). Hingegen fördern Makrophagen, die zuvor Anteilen des ZNS exponiert waren, die axonale Regeneration deutlich weniger (Lazarov-Spiegler et al. 1998b). Das weist darauf hin, daß eine dem ZNS inhärente, z.T. reversible Immunsuppression stattfindet, die für die mangelnde Regeneration nach Verletzungen mitverantwortlich sein könnte (Zeev-Brann et al. 1998).

3.6. Endogene Regenerationsvorgänge nach Rückenmarkverletzungen

Nach Rückenmarkverletzungen sind spontane regenerative Prozesse in einem größeren Ausmaß zu beobachten, als früher angenommen wurde (Beattie et al. 1997; Brook et al. 1998a). Aus spinalen Hinterwurzeln einsprossende Schwannzellen bilden innerhalb der Läsion ein Gerüst, welches mit longitudinal orientierten Axonen assoziiert ist, die mehrere mm weit in die Läsion hineinwachsen (Beattie et al. 1997; Brook et al. 1998a). Die Proliferation und Differenzierung der den Zentralkanal umgebenden Ependymzellen tragen zur Ausbildung eines Stützwerks, das die zelluläre Infiltration der Läsion und das Aussprossen von Axonen fördert, bei (Guth et al. 1985; Beattie et al. 1997; Johansson et al. 1999). Den Ependymzellen werden außerdem Stammzeleigenschaften zugeschrieben (Johansson et al. 1999). In die Rückenmarkläsion einwandernde leptomeningeale Zellen, Astrozyten und Neurone exprimieren vermehrt Neurotrophinrezeptoren, welche die axonale Aussprossung sowie Gliazellreaktionen vermitteln (Frisen et al. 1992). Drei bis vier Wochen nach dem Trauma nimmt die Anzahl orientierter Schwannzellen und Axone ab, es kommt zur Ausbildung einer astrozytären Narbe, die den zystische Gewebedefekt im Bereich der Läsion umgibt (Brook et al. 1998a). Anfängliche regenerative Vorgänge nach Myelonläsionen spiegeln sich auch in Veränderungen der Gefäßarchitektur wider (Imperato-Kalmar et al. 1997). Nach der initialen Gewebenekrose kommt es zum Aussprossen zahlreicher Blutgefäße auch in mit Makrophagen angefüllten Regionen. Das u.a. von Makrophagen und Astrozyten synthetisierte Zytokin TGF- β 1 (O'Brien et al. 1994; Kiefer et al. 1995; Streit et al. 1998) spielt dabei möglicherweise eine Rolle als angiogenetischer Faktor (Imperato-Kalmar et al. 1997). Nach einer Woche sistiert die Neovaskularisation jedoch und bleibt wie andere regenerative Vorgänge nach Myelonschädigungen unvollständig (Imperato-Kalmar et al. 1997).

4. Fragestellung

1. Wie ist der Immunphänotyp der Makrophagen mit endogenen Regenerationsvorgängen im verletzten Rückenmark korreliert, und gehen Änderungen des phagozytären Phänotyps zeitlich mit dem Einsetzen abortiver axonaler Regeneration einher? Zur Klärung dieser Fragen wurde die zelluläre post-traumatische Entzündungsreaktion nach einer experimentellen Kompressionsverletzung bei der Ratte im zeitlichen Zusammenhang mit spontanen Regenerationsvorgängen qualitativ und semiquantitativ beschrieben.
2. Besteht in diesem Läsionsmodell eine inverse räumliche Korrelation zwischen der Lokalisation der KSPG-Expression und regenerierenden Axonen? Dazu wurden der Zeitverlauf und die räumliche Verteilung der KSPG-Expression innerhalb und in der Umgebung der Läsion untersucht.
3. Inwiefern unterscheidet sich der Ablauf der Entzündungsreaktion in Regionen sekundärer Gewebeschädigung und der primären Läsion? Dazu wurde die Immunoreaktivität (IR) aktivierter Makrophagen und Mikroglia in degenerierenden Fasersträngen distal der Läsion untersucht.
4. Existieren Unterschiede in der Entzündungsreaktion zwischen den untersuchten Wistar-Ratten und anderen Rattenspezies? Zur Beantwortung dieser Fragen wurde zusätzlich die posttraumatische MHC-II-Expression in Sprague-Dawley-Ratten untersucht.

5. Material und Methoden

Die Tierversuche der vorliegenden Studie wurden im Rahmen einer Kooperation der Klinik für Neurologie der RWTH Aachen mit den Abteilungen für Physiologie und Pathophysiologie, Neurologie, Neurochirurgie und Neuropathologie der Université de Liège in Belgien durchgeführt. Die Untersuchungen sind Bestandteil eines von der Europäischen Union (Biomed II) geförderten internationalen Verbundprojektes. Frau Dr. R. Franzen (Abteilung für Experimentelle Neuropathologie, Lüttich) operierte die Versuchstiere. Das Rückenmarksgewebe wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit in Aachen immunhistochemisch untersucht. Alle Experimente wurden entsprechend den *Rules and Regulations of the Belgian National Funds for Scientific Research concerning the use and care of laboratory animals* durchgeführt.

5.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Sprague-Dawley- und Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 200-250 g. Die Wistar-Ratten wurden nach fünf unterschiedlichen Überlebenszeiten nach der Operation (2, 7, 14, 21 und 28 Tage) getötet. Pro Überlebenszeit wurden jeweils vier Ratten benötigt. Zudem wurden vier Sprague-Dawley-Ratten (Überlebenszeiten: 7, 14, 21 und 28 Tage) verwendet. Als Kontrollen dienten 4 weitere nicht operierte Wistar-Ratten. Die Versuchstiere wurden im Tierhaus der Abteilung für Experimentelle Neuropathologie der Universität Lüttich einzeln in Käfigen gehalten (Einstreu: Sägemehl). Sie wurden mit Futter und Wasser ad libitum versorgt. Die Raumtemperatur betrug ca. 20° C.

5.2. Läsionsmodell

Zur tierexperimentellen Reproduktion geschlossener Kompressionsverletzungen des Rückenmarks wurde von der Arbeitsgruppe um Dr. D. Martin in Lüttich ein Rattenmodell entwickelt, das mit Hilfe eines subdural platzierten aufdehnbaren Ballons eine Kompression des Rückenmarks ohne Eröffnung der Dura mater am Ort der Läsion ermöglicht (Martin et al. 1992). Mittels dieser Technik lassen sich Kompressionsläsionen des Myelons, die humanen Rückenmarkverletzungen gleichen (Kakulas 1984; Bunge et al. 1997), reproduzieren, quantifizieren und mit dem Schweregrad motorischer Ausfälle korrelieren.

5.2.1. Operation

Nach einer kurzen Äthernarkose erfolgte die Anästhesie der Ratten durch intra-peritoneale Injektion von 10 mg/kg Xylazine und 75 mg/kg Ketalar. Unter Sicht durch ein Operationsmikroskop wurden auf Höhe des Segments Th 13 der Spinalkanal eröffnet und so die Hinterfläche des Myelons freigelegt. Der 2,5 mm lange und 0,88 mm dicke Ballon (Ingenor Paris, Modell GV 15) wurde an einem Katheter durch eine kleine Durainzision in den Subduralraum eingeführt und dann

2 Segmente weiter nach rostral bis auf Höhe des Segments Th11-12 vorgeschoben (s. Abb. 1). Dort füllte man ihn mit 40 µl dest. Wasser. Nach 5 min wurde der Ballon wieder geleert und zurückgezogen. Anschließend nähte man die Dura an der Stelle der Laminektomie und bedeckte sie mit subkutanem Fettgewebe. Daraufhin wurden Muskulatur, subkutanes Bindegewebe und die Haut in Lagen verschlossen und die Wunde desinfiziert.

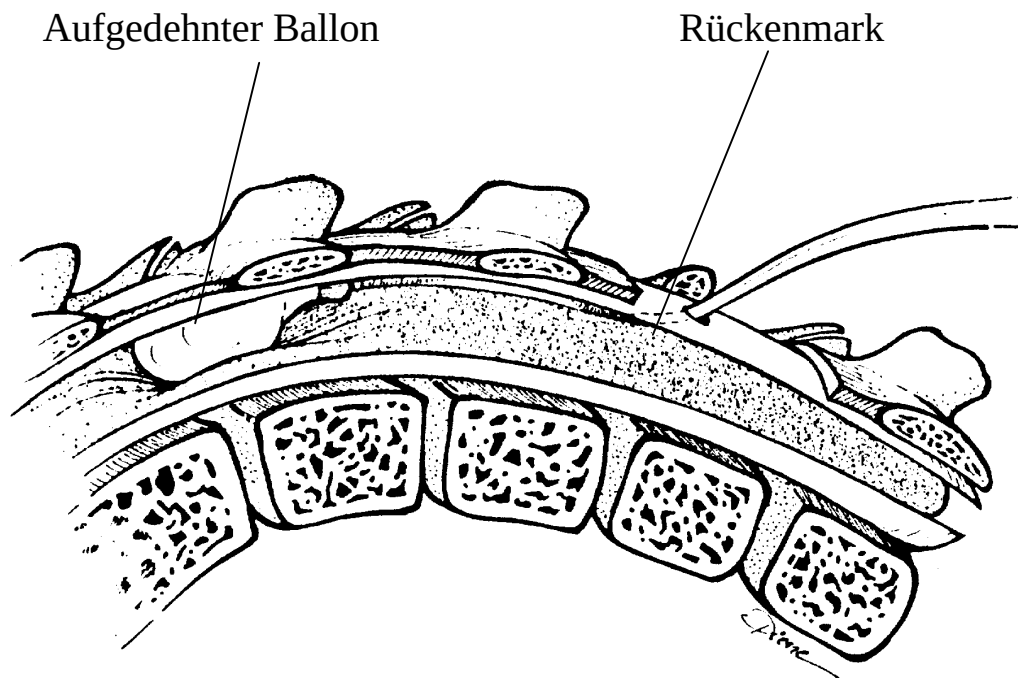


Abb. 1 Läsionsmodell (Martin et al. 1992)

5.2.2. Postoperative Versorgung

Während der Aufwachphase wurden die Versuchstiere durch Bestrahlung mit einer Rotlichtlampe vor Auskühlung geschützt. Zur Prophylaxe gegen Harnwegsinfekte erhielten die Tiere eine Woche lang täglich eine intramuskuläre Temocillin-Injektion (50 mg/kg). Bis sich eine automatische Kontrolle der Blasenentleerung einstellte, wurde den Tieren zweimal täglich die Harnblase ausgestrichen.

5.3. Perfusion der Versuchstiere und Weiterverarbeitung des Gewebes

Nach einer Überlebenszeit von jeweils 7, 14, 21 oder 28 Tagen wurden die Ratten unter Anästhesie mit 500 ml 4% Paraformaldehyd transkardial perfundiert. 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline / PBS, pH = 7,4) wurde als Standard-Fixierlösung verwendet. Das

Rückenmark wurde entnommen und in 4% PFA bei 4°C für 24 h nachfixiert. Nach weiteren 48 Stunden Kryoprotektion in 30% Saccharosesösung in PBS bei 4° C wurde das Rückenmark mit dem Skalpell in acht Gewebsblöcke zerteilt, die den oberen und unteren zervikalen, den oberen und unteren thorakalen, den kranialen und kaudalen Anteil der Läsion sowie den oberen und unteren lumbosakralen Bereich enthielten. Mit dem Rückenmark unoperierter Kontrolltiere wurde analog verfahren. Die Gewebsblöcke wurden bei -80° C in flüssigem Isopentan eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° C aufbewahrt. Am Kryomikrotom wurden 10 µm dicke transversale Gewebsschnitte angefertigt und auf mit Silane beschichtete Objektträger (5 min Aceton 100%, 5 min trocknen, 5 min Silane 2% in Aceton, 5 min trocknen, in H₂O einige Male eintauchen, 5 min H₂O dest, lufttrocknen, über Nacht in Wärmeschrank trocknen) aufgebracht. Jeweils unmittelbar aufeinanderfolgende Schnitte wurden auf unterschiedliche Objektträger aufgebracht, so daß aneinandergrenzende Schnitte mit den verschiedenen Antikörpern angefärbt werden konnten.

5.4. Immunhistochemie und Histochemie

Die MHC-II Expression wurde sowohl im Rückenmark der Wistar- als auch der Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Die Expression aller anderen untersuchten Antigene wurde dagegen nur in Wistar-Ratten untersucht.

5.4.1. Immunhistochemie nach der Avidin-Biotin-Methode

Die Kryostatschnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet und zunächst für 10 min in 80°C kaltem Aceton, dann für 5 min in 4% PFA nachfixiert, um eine Entfettung und optimale Haftung auf dem Objektträger zu erzielen. Nach Inaktivierung der endogenen Peroxidase für 10 min in 0,3% H₂O₂ und 0,1% Natrium-Azid in PBS und einstündiger Blockierung der unspezifischen Antikörperbindung folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (AK) über Nacht bei Raumtemperatur (RT). Die Konzentration jeden Antikörpers wurde so festgelegt, daß eine optimale Sensitivität und Spezifität der Markierung des nachzuweisenden Antigens erreicht wurde. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit einer Lösung aus 3% Pferdeserum, 1% bovinem Serumalbumin und 0,5% Triton X-100 in 0,1 mol PBS, die auch zur Blockierung der unspezifischen Antikörperbindung diente. Der Zusatz von Triton X-100 erhöht die Permeabilität des Gewebes.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 1 h bei RT mit dem biotinylierten 2. AK inkubiert. Da der monoklonale Erstantikörper aus der Wirtsspezies Maus stammte, wurde ein Biotin-konjugierter IgG Zweitantikörper Pferd-anti-Maus IgG verwendet (Vector). Die Konzentration des 2. AK lag bei 1:500 in 0,1 mol PBS, 2% Rattenserum und 1% BSA. Zur Präabsorption unspezifischer AK erfolgte zunächst die Inkubation des 2. AK mit Rattenserum für 30 min bei 4°C, woraufhin die Präzipitation unspezifischer Antigen-Antikörperbindungen durch fünf-

minütiges Zentrifugieren bei 5000 Umdrehungen pro min erfolgte. Nach der Applikation des 2.AK erfolgte für 1 h die Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Avidin -Biotin Komplex (ABC Standard, Vector), danach wurde die spezifische Antikörperbindung durch fünfminütige Inkubation in einer Lösung aus 0,05% 3,3' Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB; Sigma) und 0.003% H₂O₂ visualisiert. Vor und nach Inaktivierung der endogenen Peroxidase sowie ab der Inkubation mit dem 1. AK wurden die Schnitte nach jedem Färbeschritt in 0,1 mol PBS drei mal fünf min lang gewaschen, um Rückstände der Reagenzien zu entfernen. Als Negativkontrollen wurden Gewebsschnitte aus dem Läsionsbereich der jeweiligen Tiere bei der Färbung mitgeführt, bei denen die Applikation des Erstantikörpers entfiel. Stattdessen wurde das Material mit dem Antikörperlösungsmittel behandelt.

Die Schnitte wurden mit DPX eingedeckelt, für fotografische Zwecke wurden sie zuvor mit 0,02% Thionin gegengefärbt.

5.4.1.1. Doppelfärbung: Methode der doppelten Peroxidasemarkierung (Levey et al. 1986)

Diese Methode dient der gleichzeitigen Darstellung zweier unterschiedlicher Antigene in einem histologischen Präparat. Im Rahmen dieser Studie wurde die Doppelmarkierung nur für OX 42 (mAb gegen CR3) und Neurofilament 200 kD (polyklonal) durchgeführt, um die Beziehung zwischen Makrophagen und degenerierenden Axonen im Bereich der Läsion zu untersuchen. Zunächst erfolgten die Färbung mit dem mAb OX42 als 1. AK nach der Avidin-Biotin-Methode und die Visualisierung der Antikörperbindung mit DAB. Danach wurden die Schnitte für 30 min in 0,3% H₂O₂ und 0,1% Natrium-Azid in PBS inkubiert, um die überschüssige Peroxidase des Avidin-Biotin-Komplexes zu inaktivieren. Dann wurde die Markierung mit dem anderen 1. AK (NF200 kD) durchgeführt. Dessen Visualisierung erfolgte nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper und dem Avidin-Biotin-Komplex durch DBHC (Benzidin-Dihydrochlorid, Fluca). Dazu wurden die Schnitte zuerst für fünf min in einer Lösung aus 0,01% DBHC, 0,025% Natrium-Nitroprussid (Natrium Nitroferricyanid, Sigma) und 10 % 0,1 mol PBS (pH 6,8) in Aqua dest. inkubiert, die zuvor gefiltert werden mußte. Danach erfolgte die Färbereaktion durch dreiminütige Inkubation in 0,01% DBHC, 0,025% Natrium-Nitroprussid, 0.009% H₂O₂ und 10% 0,1 mol PBS (pH 6,8) in Aqua dest.

5.4.1.2. Tab. 2: Monoklonale Maus-Antikörper gegen Antigene der Ratte

Antikörper	Klon	Antigen	Verdünnung	Hersteller	Referenz
OX42	MRC OX-42	CD 11b; CR3	1:1000	Serotec	Robinson et al. 1986
ED-1	ED-1	Lysosomales Glycoprotein	1:1000	Serotec	Damoiseaux et al. 1994
LFA-1	WT.1	CD11a; LFA-1	1:5000	Serotec	Hailer et al. 1996
MHC-I	MRC OX 18	MHC I-Antigen	1:5000	Serotec	Koshinaga und Whittemore 1995
MHC-II	MRC OX-6	MHC II-Antigen; Ia-Antigen (immune-associated)	1:100	Serotec	Popovich et al. 1993
KSPG	5D4	Keratansulphat-Proteoglycan (KSPG)	1:10000	ICN	Bertoletto et al. 1993, 1998
P75 nerve growth factor receptor (NGFr)		p75 NGF receptor; low affinity neurotrophin receptor	1:50	zur Verfügung gestellt von Dr. C. Wigley	Society for Neuroscience Abstracts (1994) 23.12 and 23.13; Huber und Chao, Developmental Biology (1995) 167: 227-38.
NF 200 kD	NE14	Neurofilament 200 kD	1:10000	Sigma	Debus et al. 1982

5.4.2. Färbung mit Isolectin

Für diese Färbung wurden die Schnitte zunächst bei RT getrocknet. Nach Postfixation der Schnitte in 4% PFA und Inaktivierung der endogenen Peroxidase erfolgten die Inkubation mit 0,001% biotinyliertem Isolectin (Vector) in 0,1 mol PBS (pH 7,4) und 0,5% Triton X-100 über Nacht bei 4°C sowie die Visualisierung durch das Vector-ABC-System und DAB. Nach jedem Zwischenschritt wurden die Schnitte für drei mal fünf min in 0,1 mol PBS gewaschen.

5.4.3. Nissl - Gegenfärbung

Zur besseren Orientierung im histologischen Präparat erfolgte eine Gegenfärbung der Schnitte nach Nissl in Anschluß an die Peroxidasereaktion. Dazu wurden sie 2 min lang in 0,02% Thionin-Lösung inkubiert, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und dann mit Hilfe von DPX Mounting Medium mit einem Deckglas versehen.

5.4.4. Doppelmarkierung: Methode der indirekten Immunfluoreszenz

Nach dieser Methode können in einem histologischen Präparat zwei unterschiedliche Antigene gleichzeitig dargestellt werden. Die Doppelmarkierung für NGFr (192, monoklonal) und Neurofilament 200 kD (Sigma, 1:250, polyklonal) diente dazu, die Beziehung zwischen eingewanderten Schwann - Zellen und regenerierenden Axonen zu untersuchen. (Fotos entsprechend gefärbter Präparate wurden freundlicherweise von D. Plate zur Verfügung gestellt). Zudem wurde die Doppelmarkierung für Neurofilament 200 kD (polyclonal) und Keratan Sulphate Proteoglycan (KSPG, monoklonal) durchgeführt, um die Korrelation zwischen KSPG-Expression und aussprossenden Axonen zu untersuchen. Die Färbung erfolgte zunächst analog zur Avidin - Biotin - Methode, das Material wurde jedoch über Nacht bei Raumtemperatur in jeweils zwei Primärantikörpern gleichzeitig inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte gespült. Nach Präabsorption der Zweitantikörper mit 3% Rattenserum folgte für die NGFr-NF200kD-Doppelmarkierung die Behandlung der Schnitte mit einem Gemisch aus einem Cy₃- konjugierten Esel-anti-Maus-IgG-Antikörper (1:400) und einem DTAF-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (1:200, beide Jackson Research Laboratories). Für die KSPG-NF200kD-Doppelmarkierung wurden die Schnitte in Cy 2-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen, (1:100) und Cy 3-konjugiertem Ziege-anti-Maus inkubiert (1: 800, beides Jackson Immuno). Nach den PBS-Spülungen konnten die Schnitte voll hydriert in Immunofluore Mounting Medium (ICN Chemicals) eingebettet werden. Die Präparate wurden mit einem konfokalen Zeiss Mikroskop mit BIO-RAD MRC1024 laser scanning imaging system untersucht: Dabei regte die starke annähernd monochromatische Lichtquelle des Argon - Krypton - Lasers die mit dem Zweitantikörper gekoppelten Flouochrome zur Emission im roten (Cy₃, Anregung bei $\lambda = 568$

nm) bzw. grünen Wellenlängenbereich (DTAF, Anregung bei $\lambda = 488$ nm) an. NGFr positive Zellen bzw. KSPG positive Strukturen, die von monoklonalen Maus-Antikörpern erkannt wurden, waren also durch ein rotes Signal gekennzeichnet. Dagegen wurden Axone grün dargestellt.

5.5. Quantifizierung der Immunoreaktivität im Bereich der Läsion

Im Zentrum der Läsion der operierten und im entsprechenden Segment (Th 10/11; Abb. 2) der Kontrolltiere wurde die Intensität der NF200 kD-IR, der NGFr-IR sowie die Immunoreaktivität der Makrophagenantigene CR3 (OX42), ED1 und MHC-I densitometrisch mit dem Bildanalysesystem „ipplus 2.0“ bestimmt. Die Messungen wurden in 5 Schnitten pro Tier erhoben, wobei die Messungen in jeweils 10 festgelegten Gebieten eines Querschnittes durch die Läsion erfolgten, um zu gewährleisten, daß die gemessenen Areale die durchschnittliche Immunoreaktivität der insgesamt sehr heterogen aufgebauten Läsionen repräsentativ widerspiegeln (s. Abb. 3A, B). Die geometrischen Daten der gemessenen Rechtecke wurden im Computer gespeichert, so daß die Messungen an den Präparaten aller Tiere in konstanten, gleich großen Gebieten durchgeführt wurden. Die Registrierung der densitometrischen Meßwerte der definierten Flächen basierte auf der unterschiedlich starken Transmission von Licht durch die gefärbten Präparate, die das Bildanalysesystem in 255 verschiedene Graustufen kodierte und entsprechend folgender Formel in die mittlere Dichte, d. h. die Intensität der jeweiligen Immunoreaktivität, umrechnete:

$$\sum D_{(xy)} = \sum -\log \left(\frac{I_{(xy)} - BL}{IL - BL} \right)$$

($D_{(xy)}$ = Dichte; $I_{(xy)}$ = gemessene Graustufe; BL = maximal erreichbare Graustufe; IL = minimal erreichbare Graustufe; x, y = Koordinaten des gemessenen Pixels.)

Hierbei bildete „schwarz“ die maximal erreichbare Graustufe. Der Graustufenwert des ungefärbten Hintergrundes blieb für alle Präparate konstant. Um durch ungleichmäßige Belichtung entstehende Meßartefakte auszugleichen, wurde für jedes Präparat der Transmissionswert des ungefärbten Hintergrundes gespeichert. Mit der Funktion „background correct“ wurde die jeweils gemessene Region um diesen Faktor korrigiert.

Nach der Erfassung der Dichtewerte wurden für jedes untersuchte Antigen zunächst die Mittelwerte für die einzelnen Tiere errechnet. Dann wurden die Mittelwerte aus den 4 Tieren der jeweiligen Überlebenszeiten gebildet. Für jede Überlebenszeit wurde der Quotient des Mittelwertes der operierten Tiere zu den Kontrolltieren ermittelt und als Prozentwert ($OP/Kontrolle \times 100$) dargestellt. Außerdem wurden die mittleren Standardabweichungen graphisch dargestellt.

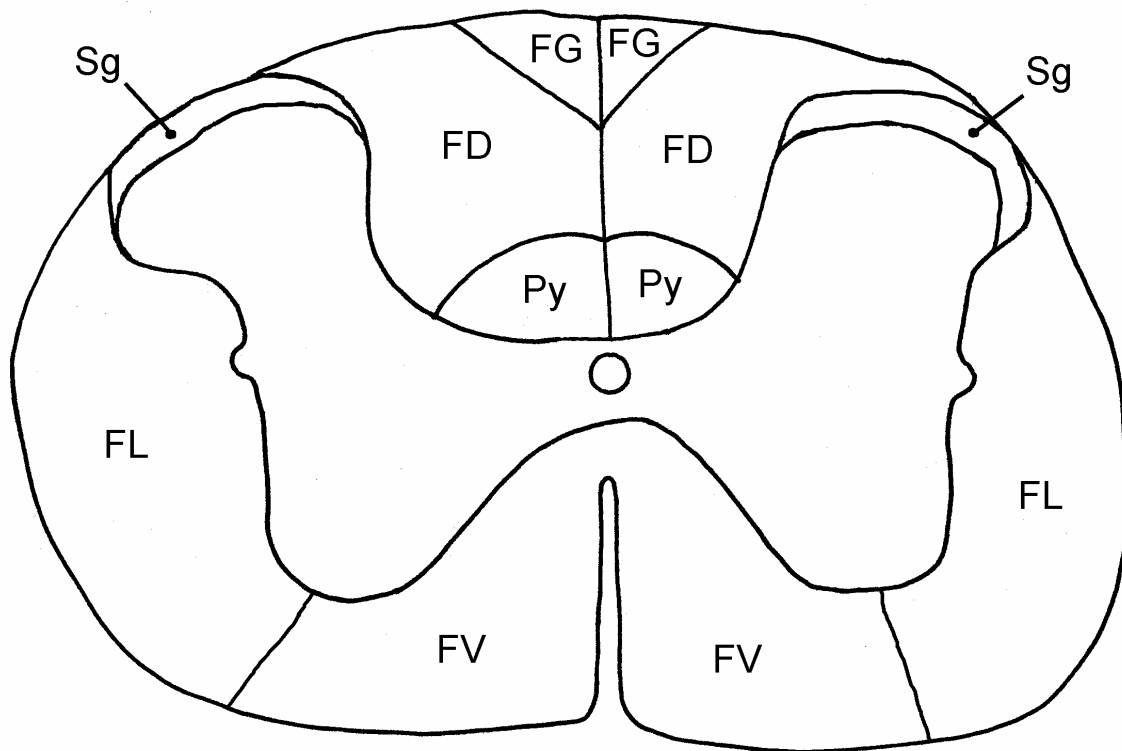


Abb. 2: Querschnitt durch das unverletzte Rückenmark auf Höhe der Kompression (Th 11); FD: Fasciculus dorsalis; FG: Fasciculus gracilis; FL: Fasciculus lateralis; FV: Fasciculus ventralis; Sg: Substantia gelatinosa; Py: Pyramidenbahn

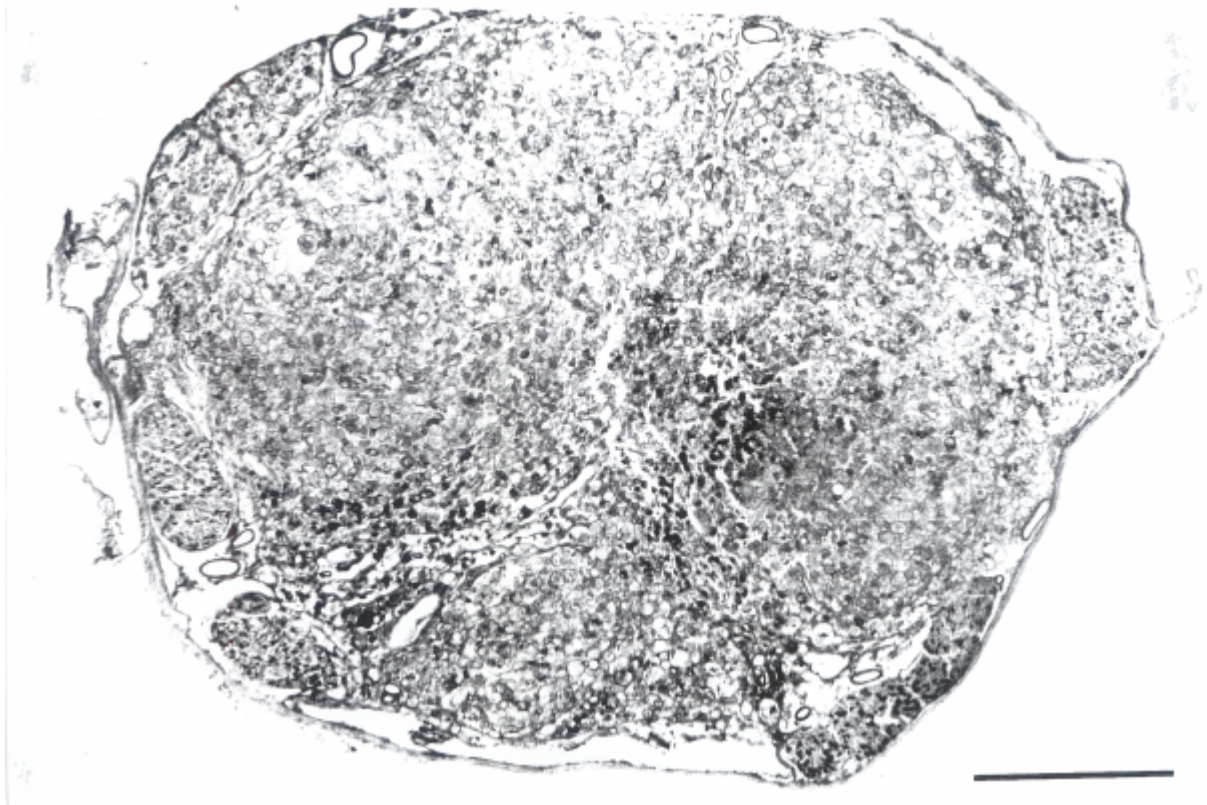


Abb. 3A Querschnitt durch die Kompressionsläsion, 28 Tage postoperativ, gefärbt mit Isolectin und Thionin, Skalierung: 0,5mm

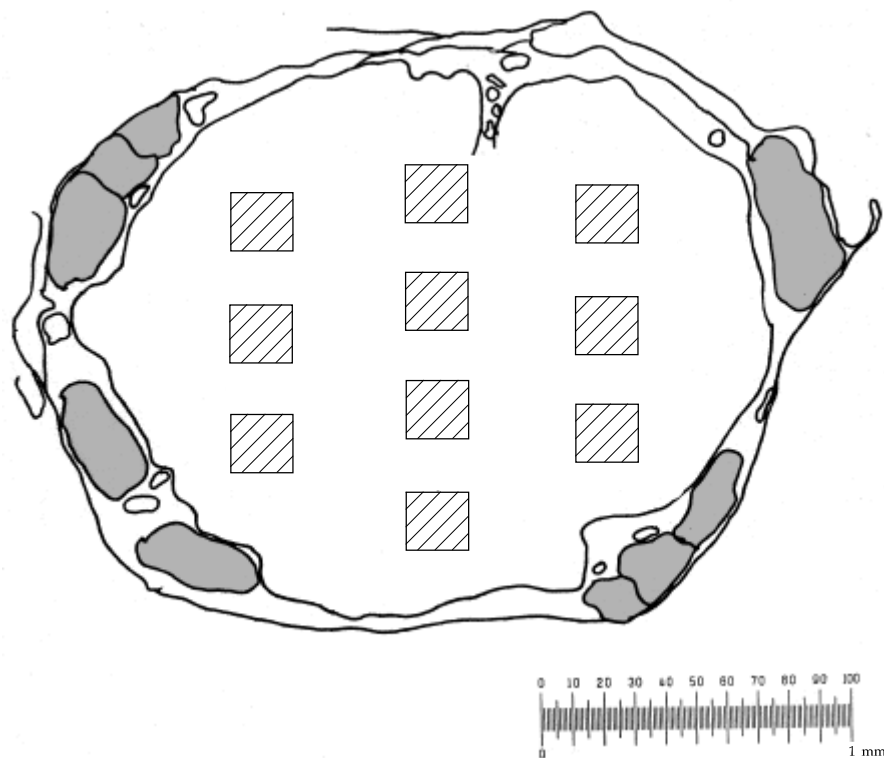


Abb. 3B Camera lucida-Zeichnung des gleichen Präparates wie 3A, maßstäblich eingezeichnet sind die Felder, deren IR in jeder Läsion quantifiziert wurde. Skalierung: 1mm

5.6. Statistik

Quantifiziert wurden die NF200 kD-IR, die NGFr-IR, die CR3 (OX42)-IR, die ED-1-IR sowie die MHC-I-IR im unoperierten Rückenmark und im Bereich der Läsion zu den verschiedenen Überlebenszeiten. Die LFA-1-IR wurde nicht gemessen, da LFA-1 im „normalen“ Gewebe nicht und in der Läsion zu allen Überlebenszeiten nur sehr gering exprimiert wird. Die IB4-Expression wurde nicht statistisch ermittelt, da außer Mikroglia/Makrophagen auch Blutgefäße und C-Fasern angefärbt werden (s. Kap. 7.1.) und bei der Quantifizierung miterfaßt würden.

Es sollte statistisch geprüft werden, ob zwischen den untersuchten Überlebenszeiten signifikante Unterschiede der Immunoreaktivität der in der Läsion vorhandenen Makrophagen zu verzeichnen waren. Zudem sollte der Zeitverlauf der NF200kD- und der NGFr-Expression innerhalb der Läsion quantifiziert werden mit der Fragestellung, ob sich Hinweise auf eine mögliche Korrelation zwischen Immunophänotyp der Makrophagen und Infiltration der Läsion mit NGFr-positiven Zellen und NF200kD positiven Axonen ergeben. Für die Vergleiche wurde der paarige t-Test zur Signifikanzprüfung angewandt. Das Signifikanzniveau wurde so festgelegt, daß bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $p < 0,05$ definitionsgemäß ein signifikanter, bei $p < 0,01$ ein sehr signifikanter und bei $p < 0,001$ ein hochsignifikanter Unterschied bestand.

Für jeden untersuchten Antikörper wurde die Immunoreaktivität des unoperierten Rückenmarkes als 100% festgelegt. Die Färbeintensität zu den unterschiedlichen Überlebenszeiten wurde jeweils prozentual auf die Immunoreaktivität des „normalen“ Gewebes bezogen. Dadurch ergaben sich für die Antigene NGFr (p75), ED1 und MHC-I zahlenmäßig sehr hohe prozentuale Steigerungen der postoperativen Immunoreaktivität, da diese Antigene im unverletzten Rückenmark nur sehr schwach exprimiert werden. Der Bezug auf das normale Gewebe ist jedoch von Bedeutung, da der postoperative Zeitverlauf der im unverletzten Rückenmark sehr starken Expression des axonalen Antigens NF200 kD untersucht und mit der Expression der verschiedenen zellulären Marker zeitlich korreliert werden sollte.

6. Ergebnisse

Die Operation führte zur vollständigen Kompression und hämorrhagischen Nekrose des Rückenmarkes auf der Höhe der unteren thorakalen Segmente. Nur einige Fasern in der äußeren weißen Substanz blieben zunächst erhalten und waren 2 Tage postoperativ noch nachweisbar, nach 7 Tagen waren sie jedoch degeneriert. Die Operation führte zu einer vollständigen, irreversiblen Lähmung der Hinterbeine. Während der ersten postoperativen Woche bestand eine schlaffe Lähmung der Hinterbeine, danach entwickelten sich eine zunehmende Spastik und eine automatische Blasenfunktion.

6.1. Unverletztes Rückenmark

In der grauen und weißen Substanz des Rückenmarks unoperierter Kontrolltiere fanden sich OX-42-positive ruhende Mikroglia. Transversale Schnitte zeigten zahlreiche OX-42-immunoreaktive Mikroglia in der grauen Substanz (Abb. 4A). Eine geringere Anzahl Mikroglia innerhalb der grauen Substanz war KSPG-positiv (Abb. 4B). In Longitudinalschnitten durch das Rückenmark unoperierter Tiere konnten OX-42- (Abb. 4C) und KSPG- (Abb. 4D) positive Mikroglia in den Faserbahnen der weißen Substanz identifiziert werden. Sie befanden sich sowohl innerhalb der als auch zwischen den perlschnurförmig aneinandergereihten Oligodendroglia-Ketten. Auch angrenzend an Blutgefäße waren OX-42- bzw. KSPG-positive Mikroglia sichtbar. Die luminale Oberfläche der den Zentralkanal auskleidenden Ependymzellen war z.T. KSPG-positiv (Abb. 4E). Auch vereinzelt Zellen zwischen den Ependymzellen zeigten eine intensive KSPG-IR, waren jedoch mit OX-42 oder anderen Mikroglia markern nicht anfärbbar. Die spinalen Wurzeln und die Meningen waren KSPG-negativ (Abb. 4F). Mit dem Isolectin *Bandeiraea simplicifolia* (IB4) ließen sich verzweigte Mikroglia (Abb. 4G) in der weißen und grauen Substanz sowie Blutgefäße und Axone in der Substantia gelatinosa der Hinterhörner nachweisen. Im unverletzten Rückenmark zeigten sich NGFr-positive Axone im Bereich der Hinterhörner und im äußeren Bereich der Hinterstränge (Abb. 4H). Angrenzend an den Zentralkanal ließen sich wenige NGFr-positive Strukturen identifizieren, bei denen es sich vermutlich ebenfalls um Axone handelte. Im unoperierten Rückenmark wiesen verzweigte Mikroglia nur eine sehr schwache, punktförmige ED-1-Immunoreaktivität (IR) der Zellfortsätze auf. Die MHC-I-IR ruhender Mikroglia war ebenfalls sehr gering. LFA-1-positive Mikroglia fanden sich im unverletzten Rückenmark nicht.

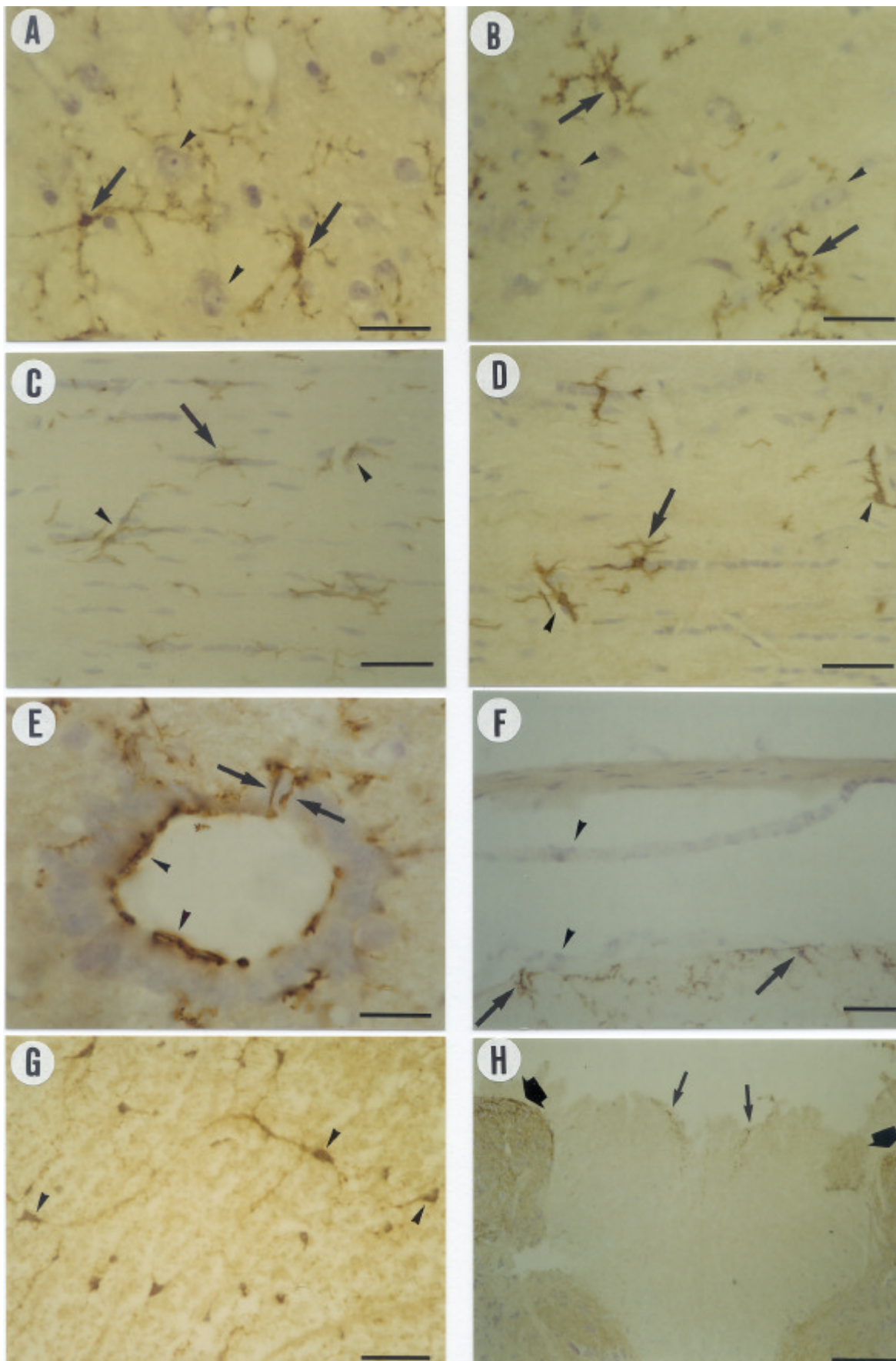


Abb. 4 Unverletztes Rückenmark.

Zu Abb. 4 A) Ramifizierte OX-42 positive Mikroglia (Pfeile) zwischen Neuronen (Pfeilspitzen) in der grauen Substanz; B) Eine geringere Anzahl ramifizierter Mikroglia (Pfeile) zwischen den Neuronen (Pfeilspitzen) ist KSPG-positiv. C) CR3-positive Mikroglia finden sich in den Faserbahnen der weißen Substanz zwischen den aneinandergereihten Oligodendroglia (Pfeile) und an der Wand von Blutgefäßen (Pfeilspitzen). D) Eine ähnliche Verteilung fand sich für KSPG-positive Mikroglia. E) KSPG-positive luminale Oberfläche der den Zentralkanal auskleidenden Ependymzellen (Pfeilspitzen) und vereinzelte KSPG-positive Zellen zwischen den Ependymzellen (Pfeile). F) KSPG-negative Meningen (Pfeilspitzen) angrenzend an KSPG-positive Mikroglia in der weißen Substanz (Pfeile). G) IB4-positive Mikroglia in der weißen Substanz (Pfeilspitzen); H) NGFr-positive Axone im Bereich der Hinterhörner (dicke Pfeile) und der Hinterstränge (dünne Pfeile). Skalierung: A, B: 30µm; C, D, F: 50µm; E: 20µm; G: 30µm; H: 240µm.

Im Rückenmark nichtoperierter Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten waren nur sehr wenige MHC-II-positive, zumeist mit Gefäßen assoziierte Zellen geringen Durchmessers nachweisbar, die häufig perivaskulären Zellen glichen. Zahlreiche MHC-II-positive Zellen waren hingegen im Subarachnoidalraum nachweisbar. Als Positivkontrolle für die MHC-II-Färbung dienten das Corpus pineale sowie der Plexus choroideus, die in beiden Spezies zahlreiche MHC-II-positive Makrophagen bzw. dendritische Zellen enthalten (Abb. 5A-D).

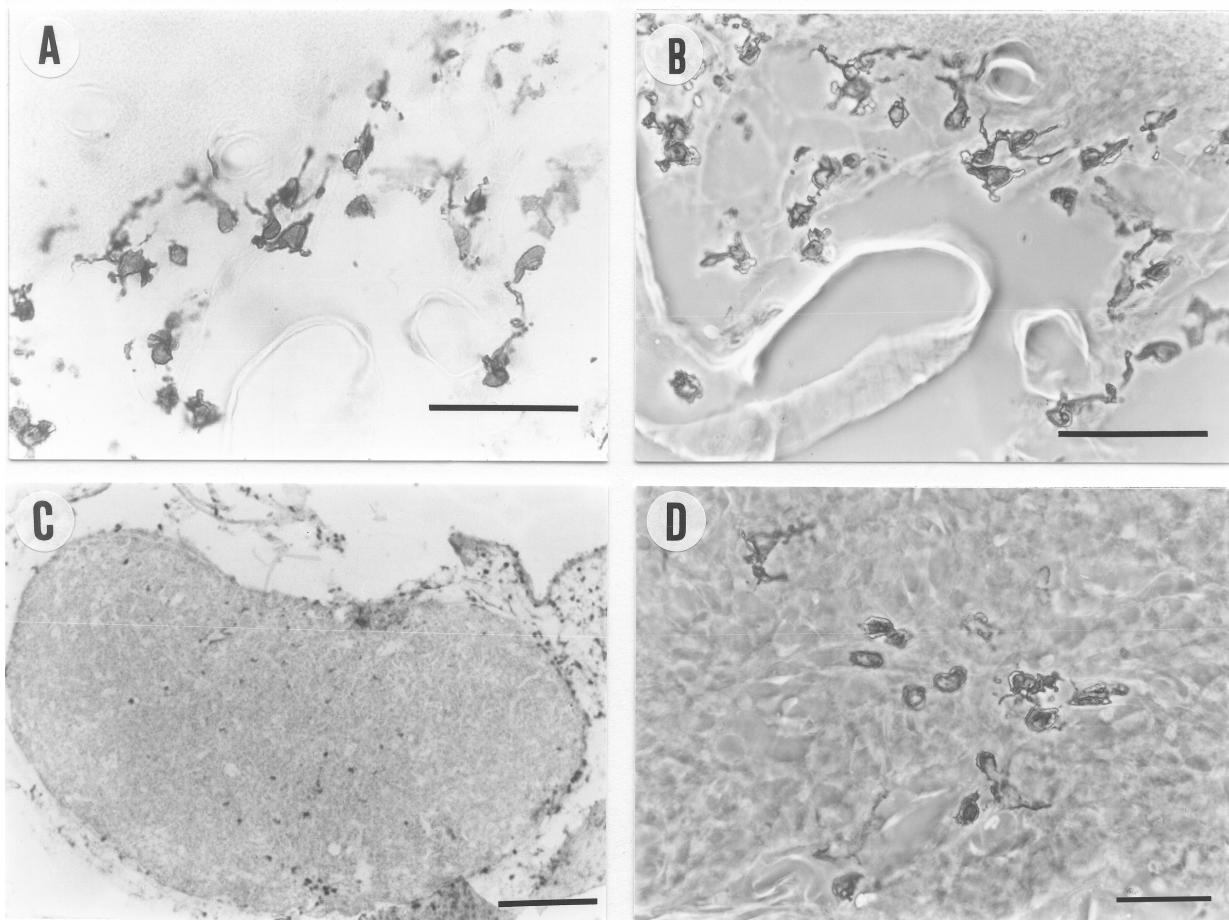


Abb. 5 A, B) MHC-II-positive Makrophagen im Plexus choroideus; C) Corpus pineale (Übersicht); D) MHC-II-positive Makrophagen und dendritische Zellen im Corpus pineale. Skalierung: A, B, D: 50µm; C: 250µm.

6.2. Zelluläre Reaktionen im Bereich der Läsion

Zwei Tage postoperativ fand sich viel NF200 kD-positiver axonaler Detritus in der Läsion. Intakte Axone waren nicht zu identifizieren. Das völlig mazerierte Gewebe war hämorrhagisch infarziert und mit Granulozyten infiltriert. Eine Woche postoperativ war die Läsion mit zahlreichen Haufen von Makrophagen, die traubenartig aneinandergelagert waren, infiltriert (Abb. 6A). Zu diesem Zeitpunkt wiesen die meisten Makrophagen eine starke OX-42-, ED-1- und MHC-I-Immunoreaktivität auf, einige Makrophagen waren nur schwach markiert. Die Makrophagen waren auch mit IB4 intensiv anfärbbar (Abb. 6B). Intrazelluläre Granula der Makrophagen erschienen durch ihre starke ED-1-IR praktisch schwarz (Abb. 6C). Einige der MHC-I-positiven Makrophagen besaßen kurze Fortsätze (Abb. 6D). Innerhalb der Läsion zeigten sich kaum LFA-1-positive Phagozyten, die meisten Makrophagen waren LFA-1-negativ. Nur wenige im Randbereich der Läsion gelegene Makrophagen wiesen eine schwache LFA-1-IR der Zelloberfläche auf (Abb. 6E). Im an das intakte Gewebe angrenzenden peripheren Bereich der Läsion zeigten sich hingegen zu allen untersuchten

Überlebenszeiten LFA-1-positive aktivierte Mikroglia (nicht gezeigt). Diese fanden sich auch im äußeren Bereich der sich in der Hinterstrangregion ausdehnenden Zyste (Abb. 14F). Die die Läsion infiltrierenden Makrophagen waren zu diesem und zu den späteren Zeitpunkten KSPG-negativ.

Die Läsion enthielt eine Woche postoperativ wenige NF 200-kD-positive Axone, die aus dem angrenzenden Gewebe in die Läsion einzusprossen begannen, und spindelförmige nerve growth factor receptor- (NGFr-) positive Zellen, die sich in enger Assoziation zu den Axonen befanden. Einige der NGFr-immunoreaktiven Zellen besaßen die Morphologie migrierender Schwannzellen und stammten wahrscheinlich aus geschädigten Hinterwurzeln. NGFr-positive Zellen befanden sich hauptsächlich in Regionen der Läsion, die dicht mit Makrophagen infiltriert waren. Der Aufbau der Läsion wirkte heterogen, d.h. einige Regionen enthielten viele, andere hingegen nur wenige oder keine Makrophagen und NGFr-positive Zellen. Die Schädigung spinaler Nervenwurzeln auf der Höhe der Kompressionsverletzung bzw. angrenzender Segmente war unterschiedlich stark. Geschädigte, "aktivierte" Wurzeln waren NGFr positiv, während intakte Wurzeln nur eine schwache NGFr-IR aufwiesen.

Die statistische Auswertung (Abb. 12 A-E) ergab, daß 7 Tage postoperativ im Vergleich zum unverletzten Gewebe die OX42-IR hochsignifikant ($p < 0,001$) um $158 \pm 9\%$ angestiegen war. Die ED-1-IR hatte ebenfalls hochsignifikant um $1548 \pm 42\%$ und die MHC-I-IR hochsignifikant um $7595 \pm 405\%$ zugenommen. Es zeigte sich ein hochsignifikanter ($p < 0,001$) Anstieg der NGFr (p75) IR im Vergleich zum unverletzten Gewebe um $1678 \pm 603\%$. Die NF200 kD-IR betrug eine Woche postoperativ $21 \pm 6\%$ der NF200 kD-IR des unverletzten Rückenmarkes, was einem hochsignifikanten ($p < 0,001$) Abfall der IR entsprach.

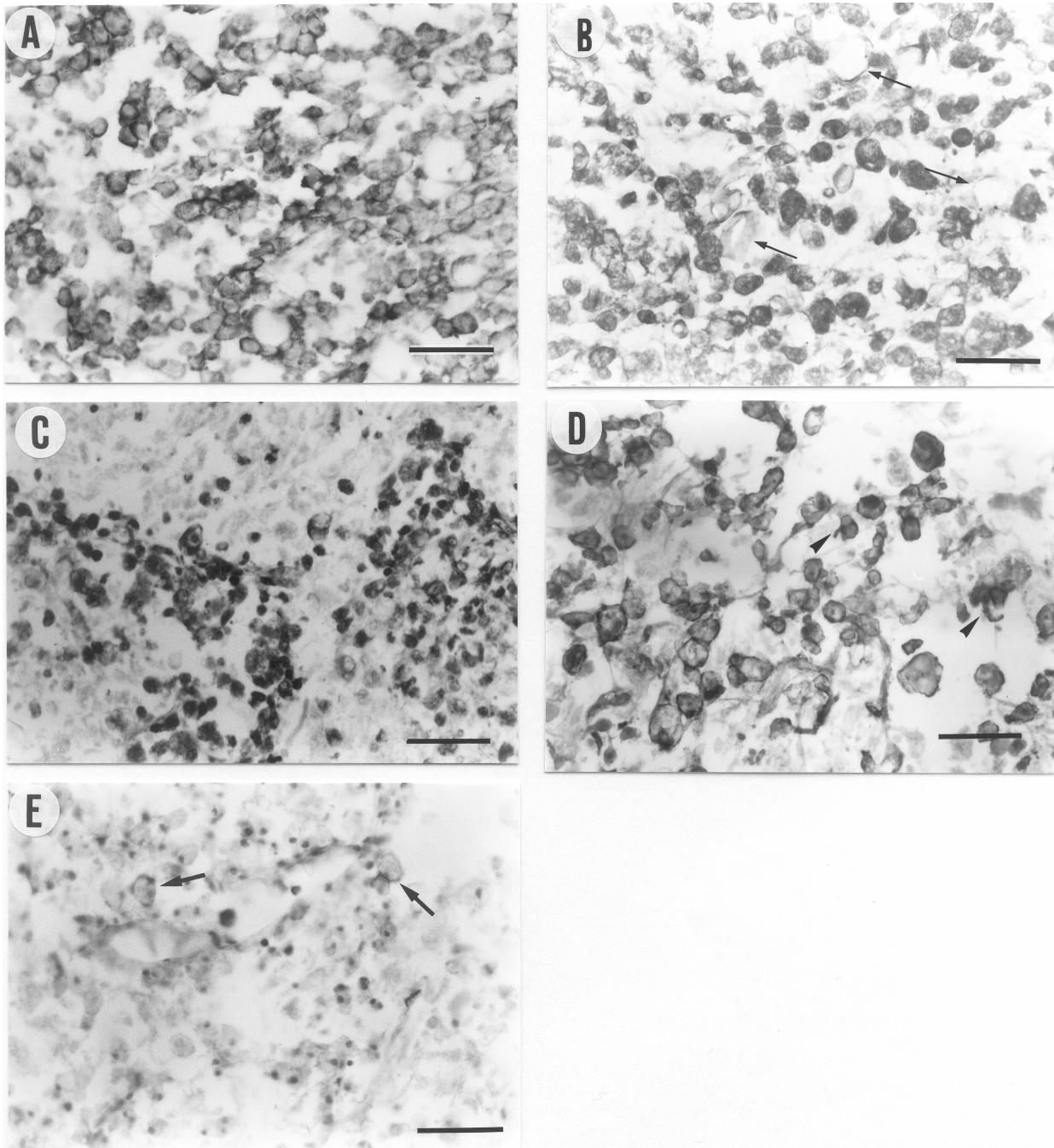


Abb. 6 Makrophagen in der Läsion, 7 Tage postoperativ. A) Die Läsion ist mit stark OX-42-positiven Makrophagen infiltriert, die traubenförmige Haufen bilden; einige Makrophagen sind nur schwach OX-42-positiv. B) starke Anfärbbarkeit der Makrophagen mit dem Lectin IB4, das auch Gefäße markiert (Pfeile); C) intensive ED-1-IR zytoplasmatischer Granula; D) MHC-I-positive Makrophagen besitzen z.T. kurze Fortsätze (Pfeilspitzen); E) In der Läsion befinden sich nur wenige schwach LFA-1-immunoreaktive Makrophagen (Pfeile), zumeist in der Nähe von Bindegewebstrabekeln oder Gefäßen, die Randbereiche der Läsion durchziehen. Skalierung: 50 μ m.

14 Tage postoperativ war die Läsion mit dichtgepackten, „schaumigen“ Makrophagen unterschiedlichen Durchmessers (6-60 μm) angefüllt (Abb. 7). Die Makrophagen wiesen eine große Heterogenität bezüglich Größe, Morphologie und Immunoreaktivität auf. Der Durchmesser der Makrophagen schien im Vergleich zur kürzeren Überlebenszeit etwas angestiegen zu sein. Viele Makrophagen zeigten eine starke OX-42-, ED-1- und MHC-I-IR (Abb. 7A, C, D) und waren auch mit IB4 deutlich nachweisbar. Dabei wirkten Makrophagen mit kleineren Durchmessern stärker OX-42-, ED-1- und MHC-I-positiv als größere Makrophagen. Durch die IB4-Markierung wurde die unterschiedliche Morphologie der Makrophagen besonders eindrucksvoll sichtbar gemacht, hier schien die Stärke der Anfärbbarkeit jedoch unabhängig von der Größe der Zellen zu sein (Abb. 7B). Wie zuvor befanden sich nur sehr wenige LFA-1-positive Makrophagen innerhalb der Läsion, hauptsächlich in Bereichen, die von Bindegewebe trabekeln oder Gefäßen durchzogen wurden (Abb. 7E). Zahlreiche NF 200 kD-positive, einzeln oder in Bündeln verlaufende Axone, die z.T. Kollateralen besaßen, waren in der Läsion in enger Nachbarschaft zu den Makrophagen nachweisbar (Abb. 11). Die sehr heterogen aufgebaute Läsion, in der sich unterschiedlich große Zysten ausbildeten, wurde von NGFr-positiven Zellen durchflochten (Abb. 11), die zwischen den eng aneinanderliegenden Makrophagen ein dichtes Netzwerk bildeten.

Die statistische Auswertung (Abb. 12) ergab einen Anstieg der OX42-IR im Vergleich zur früheren Überlebenszeit (7 Tage postoperativ) um $20 \pm 16\%$, der jedoch nicht signifikant war. Die ED-1-IR zeigte dagegen einen hochsignifikanten ($p < 0,001$) Anstieg um $29 \pm 6\%$ im Vergleich zur 7-tägigen Überlebenszeit, während die MHC-I-IR mit einem nicht signifikanten Anstieg um ca. 2% etwa gleich blieb. Verglichen mit der 7-tägigen Überlebenszeit war zu diesem Zeitpunkt die NF-200 kD-IR in der Läsion sehr signifikant ($p < 0,01$) um 99 ± 39 , also ca. das Doppelte, angestiegen. Die NGFr (p75)-IR war hochsignifikant ($p < 0,001$) um fast das Vierfache ($380 \pm 60\%$) angestiegen. Doppelimmunofluoreszenzfärbungen zeigten eine enge räumliche Korrelation zwischen NF200 kD-positiven Axonen und NGFr-positiven Zellen.

Zu **Abb. 7A-E**: 14 Tage postoperativ ist die Läsion dicht mit Makrophagen unterschiedlichen Durchmessers infiltriert. A) Die meisten Makrophagen sind OX-42-positiv, kleinere Makrophagen zeigen eine stärkere CR3-IR als größere. B) Die IB4-Markierung hebt die unterschiedliche Morphologie der Makrophagen besonders hervor, es besteht keine Relation zwischen Größe und Färbeintensität. C) Intensive ED-1-Markierung der Makrophagen, kleinere Zellen sind intensiver angefärbt als große. D) Auch die MHC-I-IR verhält sich umgekehrt proportional zur Größe der Makrophagen. E) Nur wenige kleine Makrophagen sind leicht LFA-I-positiv (Pfeile), daneben fallen große, LFA-1-negative Makrophagen auf (Sterne). Skalierung: 50 μm .

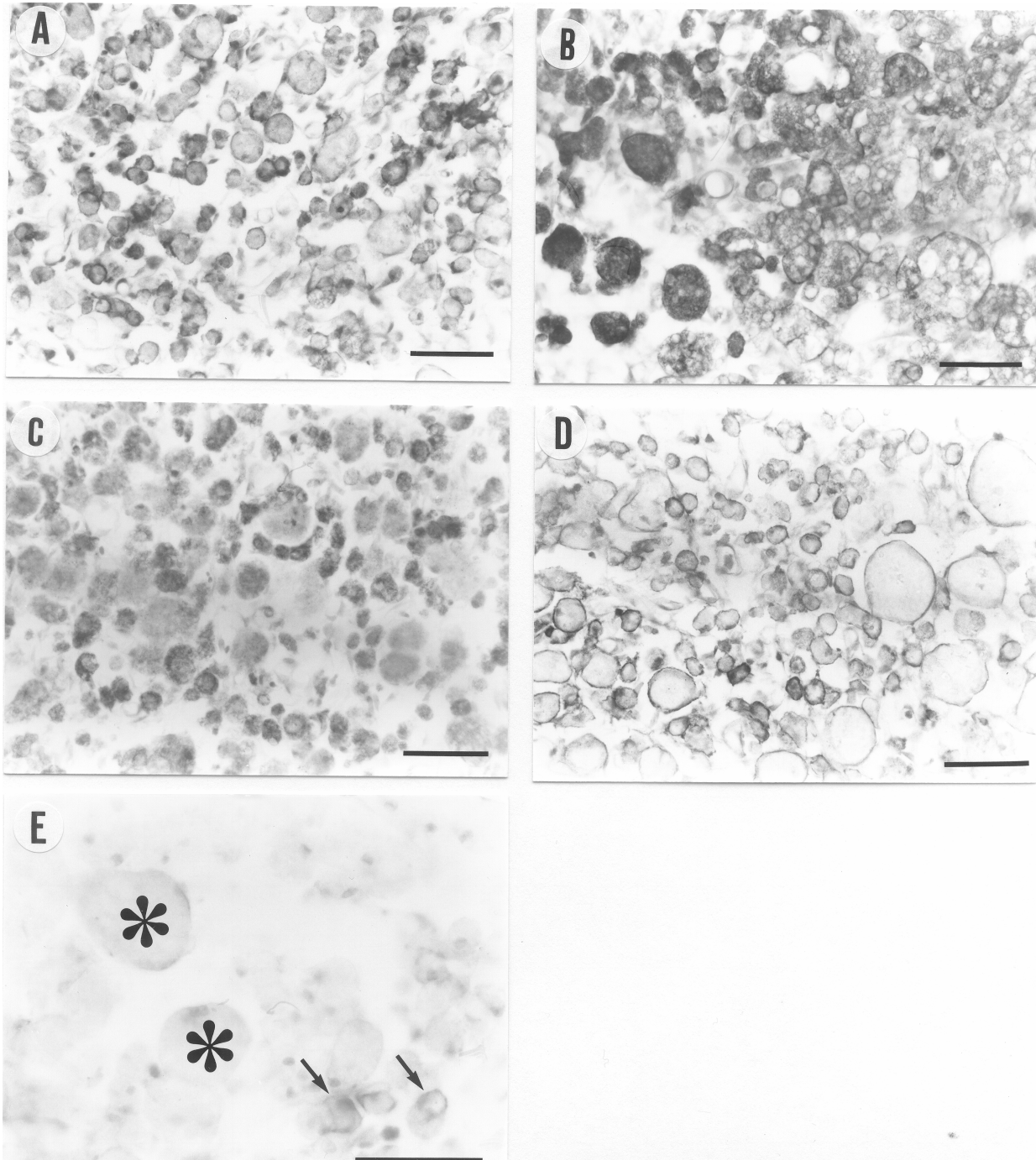


Abb. 7A-E Makrophagen in der Läsion, 14 Tage postoperativ.

21 und 28 Tage postoperativ war eine drastische Reduktion der OX-42-IR der in der Läsion vorhandenen Makrophagen nachweisbar (Abb. 8A). Nur in der Peripherie der Läsion, in der Nähe der ebenfalls geschädigten Wurzeln, waren noch einige OX-42-positive Zellen vorhanden. Z.T bestand eine enge Korrelation zwischen OX-42-negativen Makrophagen und spindelförmigen Zellen (Abb. 8A); in einigen Regionen, die mit OX-42-negativen Phagozyten angefüllt waren, fehlte jedoch die Infiltration mit spindelförmigen, Schwannzell-ähnlichen Strukturen (s. Abb. 14 A). Die immer noch sehr intensive Lectinfärbung verdeutlichte, daß die Anzahl der Makrophagen in der Läsion nicht abgenommen hatte (Abb. 8B). Nach

28 Tagen wiesen vereinzelte Makrophagen in der Läsion eine fehlende Anfärbbarkeit mit Isolectin auf. Hohe Vergrößerungen zeigten jedoch, daß es sich hier um degenerierende Makrophagen handelte, deren Membran perforiert war (Abb. 8C). Im Gegensatz zur massiv reduzierten CR3-IR erschienen die ED-1- und MHC-I-Expression verglichen mit kürzeren Überlebenszeiten nur leicht vermindert (Abb. 8D, E). Die LFA-1-IR war wie zuvor sehr schwach (Abb. 8F).

Der Aufbau der Läsion erschien 21 bzw. 28 Tage postoperativ wie zuvor heterogen. Einige Bereiche enthielten Makrophagen und NGFr-positive Zellen, in anderen überwog die Zystenbildung. Makrophagen und spindelförmige Zellen, die in Form von Trabekeln in die Läsion einsproßten, befanden sich wie zuvor in enger räumlicher Assoziation (Abb. 8A). Im Vergleich zur 7- und 14-tägigen Überlebenszeit hatte die Anzahl NF 200 kD-positiver Axone abgenommen. Parallel dazu war vermehrt NF 200 kD-positiver Detritus in der Läsion nachweisbar. Um zu überprüfen, ob der NF200 kD-positive axonale Detritus mit den wenigen noch vorhandenen OX-42-positiven Makrophagen assoziiert war, wurden Doppelfärbungen für NF200 kD und OX42 durchgeführt (Abb. 9). Die Doppelfärbungen zeigten jedoch keine Korrelation zwischen der OX-42-IR der Makrophagen und der Phagozytose von NF 200 kD-positivem Detritus. Unabhängig von der Intensität der OX-42-Expression enthielten nur vereinzelte Makrophagen NF 200 kD-positives phagozytiertes Material.

Die statistische Auswertung (Abb. 12) zeigte 21 Tage postoperativ einen Abfall der CR3-IR im Vergleich zur 14-tägigen Überlebenszeit um $77\pm 1\%$. Die CR3-IR der Läsion betrug zu diesem Zeitpunkt weniger als die Hälfte ($43\pm 3\%$) der CR3-IR des unverletzten Rückenmarkes. Der t-Test ergab, daß die CR3-IR 21 Tage postoperativ hochsignifikant niedriger ($p<0,001$) als zu den früheren untersuchten Überlebenszeiten und auch als im normalen Gewebe war. 28 Tage postoperativ war ein weiterer sehr signifikanter ($p<0,01$) Abfall der OX-42-IR auf ca. die Hälfte ($46\pm 26\%$) des vorherigen Wertes zu verzeichnen, die CR3-IR betrug nunmehr 20% des Ausgangswertes im unverletzten Gewebe und lediglich ca. 11% der maximalen OX-42 IR, die 14 Tage postoperativ zu verzeichnen war. Weder zwischen 14 und 21 noch zwischen 21 und 28 Tagen fand eine signifikante Reduktion der ED-1-IR statt. (Die ED-1 IR nahm zwischen 14 und 21 Tagen lediglich um $8\pm 6\%$, zwischen 21 und 28 Tagen postoperativ um $5\pm 13\%$ ab). Sie betrug 28 Tage postoperativ noch ca. 87% der maximalen IR, die 14 Tage postoperativ erreicht wurde. Zwischen 14 und 21 Tagen postoperativ war eine signifikante ($p<0,05$) Reduktion der MHC-I-IR um $35\pm 22\%$ zu verzeichnen. Zwischen 21 und 28 Tagen nahm die MHC-I-IR dann nicht mehr signifikant, um $7\pm 12\%$, ab.

Statistisch ließ sich 21 Tage postoperativ ein sehr signifikanter ($p<0,01$) Abfall der NF200 kD-IR auf $51\pm 10\%$ der IR, die 14 Tage postoperativ in der Läsion nachweisbar war, feststellen. Wie zur 7-tägigen Überlebenszeit betrug die NF200 kD-IR jetzt ungefähr 21% der Intensität des unverletzten Gewebes. Weitere 7 Tage

später war die NF200 kD-IR um $29\pm 23\%$ gefallen, was jedoch keinem signifikanten Rückgang entsprach. Die NGFr-IR hatte 21 Tage postoperativ im Vergleich zur 14-tägigen Überlebenszeit um ca. 50% zugenommen. Aufgrund der sehr hohen Standardabweichung (52%) entsprach dies jedoch keiner signifikanten Steigerung. Die semiquantitative Auswertung der Präparate bestätigte, daß sich der Aufbau der Läsion besonders hinsichtlich der Infiltration mit NGFr-positiven Zellen sehr heterogen gestaltete. Es läßt sich also nicht sagen, ob zwischen 14 und 21 Tagen eine unterschiedlich dichte Infiltration der Läsion mit NGFr-markierten Zellen bestand. Auch zwischen 21 und 28 Tagen postoperativ zeigte sich keine signifikante Reduktion der NGFr-IR, lediglich eine nicht signifikante Abnahme um $17\pm 29\%$. Wie zuvor bestand zwischen Axonen und NGFr-positiven Zellen eine enge räumliche Assoziation.

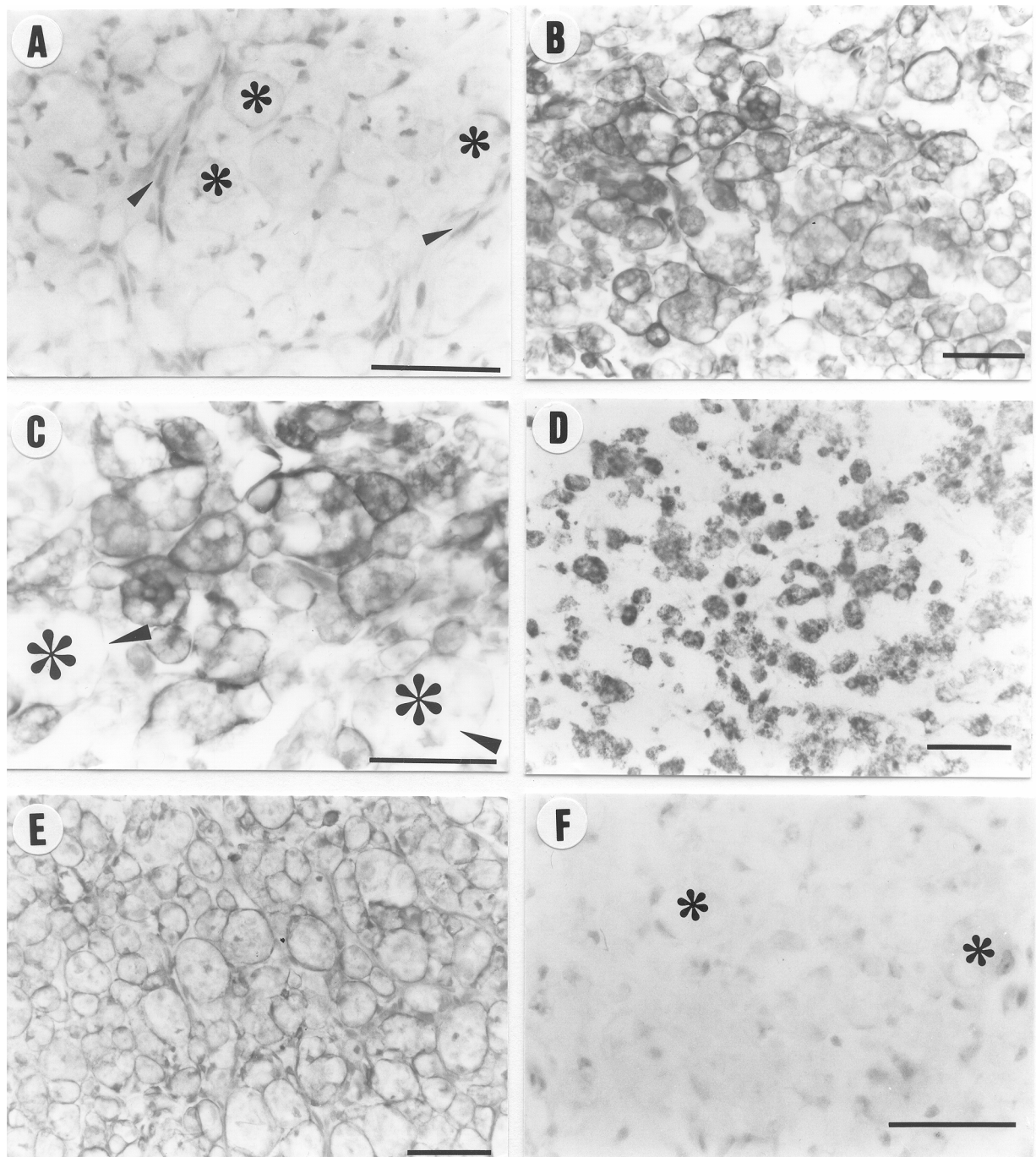


Abb. 8A-F Makrophagen in der Läsion, 21-28 Tage postoperativ.

A) OX-42-negative Phagozyten in der Läsion (Sterne). Die Makrophagen befinden sich in enger Assoziation zu Zellen mit Thionin-gefärbten spindelförmigen Zellkernen, die die Läsion durchziehen (Pfeilspitzen). B) Die intensive IB4-Markierung zeigt, daß die Läsion wie zuvor dicht mit Makrophagen infiltriert ist. C) Nach 28 Tagen zeigen sich einige IB4-negative, degenerierende Makrophagen in der Läsion (Sterne), deren Zellmembran perforiert ist (Pfeilspitzen). D) Die ED-1-IR hat nach 21 Tagen nur leicht abgenommen, es zeigt sich jedoch ein diffuses, intrazelluläres IR-Muster. E) Auch die MHC-I-IR ist im Vergleich zu früheren Überlebenszeiten nur wenig reduziert, die Membran der Makrophagen ist

deutlich MHC-I-positiv. F) Wie zuvor befinden sich hauptsächlich LFA-1-negative Makrophagen in der Läsion (Sterne). Skalierung: 50 μm .

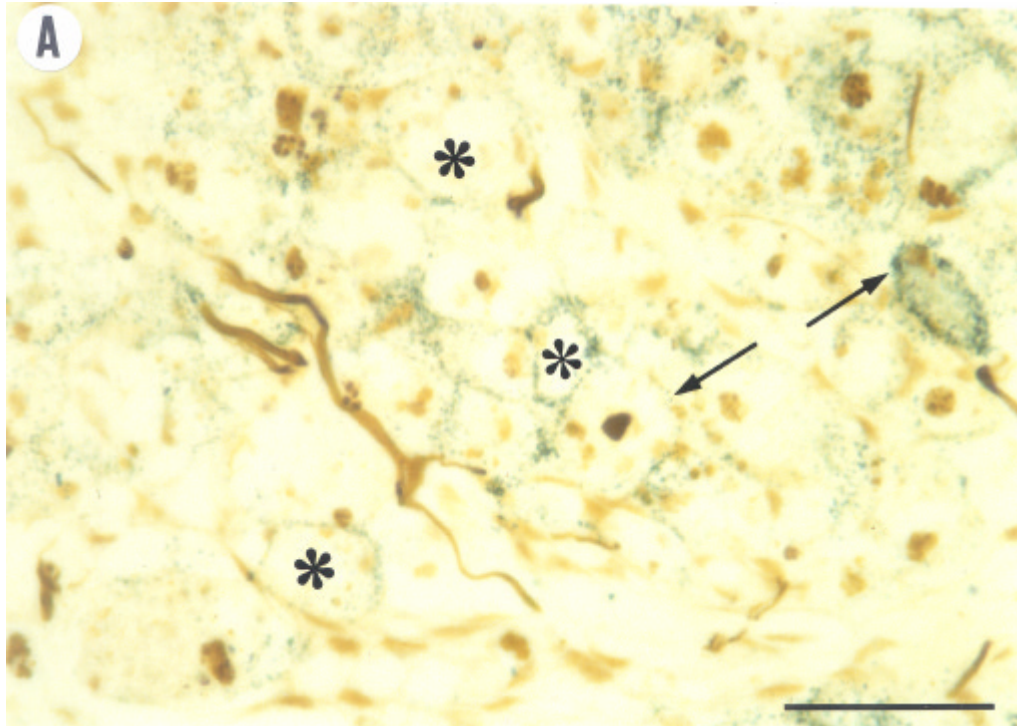


Abb. 9 Doppelfärbung NF 200 kD-positiver Axone (braun) und OX-42-positiver Makrophagen (grün), 21 Tage postoperativ. In der Läsion haben wenige Makrophagen NF 200 kD-positive Axonfragmente phagozytiert (Pfeile), andere enthalten nur sehr wenig oder gar keinen NF 200 kD-positiven Inhalt (Sterne). Es besteht keine Korrelation zwischen der Intensität der OX-42-IR und der Phagozytose von Axonen. Skalierung: 40 μm .

6.3. KSPG-Expression innerhalb und in der Umgebung der Läsion

Die KSPG-Expression innerhalb und in der Umgebung der Läsion wurde 7, 14, 21 und 28 Tage postoperativ untersucht. Dabei konnte sowohl eine zelluläre als auch eine extrazelluläre KSPG-Expression nachgewiesen werden. Anders als die ramifizierten Mikroglia zeigten Makrophagen zu allen untersuchten Überlebenszeiten keine KSPG-IR. 7 Tage nach der Operation war im Zentrum der Läsion nur eine sehr geringe KSPG-Expression nachweisbar. Es zeigte sich jedoch in den unmittelbar an die Läsion angrenzenden Regionen eine intensive KSPG-IR im Neuropil zwischen geschädigten Neuronen (Abb. 10A, B). KSPG-positive spindelförmige zelluläre Elemente sowie aktivierte Mikroglia waren ebenfalls sichtbar. Auch nach 14 Tagen war die KSPG-IR im Zentrum der Läsion noch gering. Zwischen 14 und 21 Tagen nach der Operation war jedoch ein massiver Anstieg der KSPG-IR innerhalb der Läsion zu verzeichnen. Die Verteilung der

KSPG-Expression war sehr heterogen. Einige Regionen der Läsion waren stark KSPG-positiv, wohingegen andere keine KSPG-IR aufwiesen (Abb. 10C, D). In einigen Gebieten konnte diffuse KSPG-IR zwischen den dicht gepackten Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 10E), während andere Stellen KSPG-positive spindelförmige Zellen enthielten (Abb. 10F). Doppelimmunofluoreszenzfärbungen verdeutlichten, daß keine inverse Korrelation zwischen intensiv KSPG-positiven Arealen und dem Gehalt an Axonen bestand. Einige KSPG-positive Regionen enthielten zahlreiche Axone, während in anderen keine Axone nachweisbar waren (Abb. 10G, H). Zu allen untersuchten Überlebenszeiten konnten in degenerierenden Faserbahnen distal der Läsion KSPG-positive aktivierte Mikroglia nachgewiesen werden. Einige waren verzweigt, während andere, die sich in einem stärkeren Aktivierungsgrad befanden, kurze, retrahierte Fortsätze und runde Zellkörper besaßen.

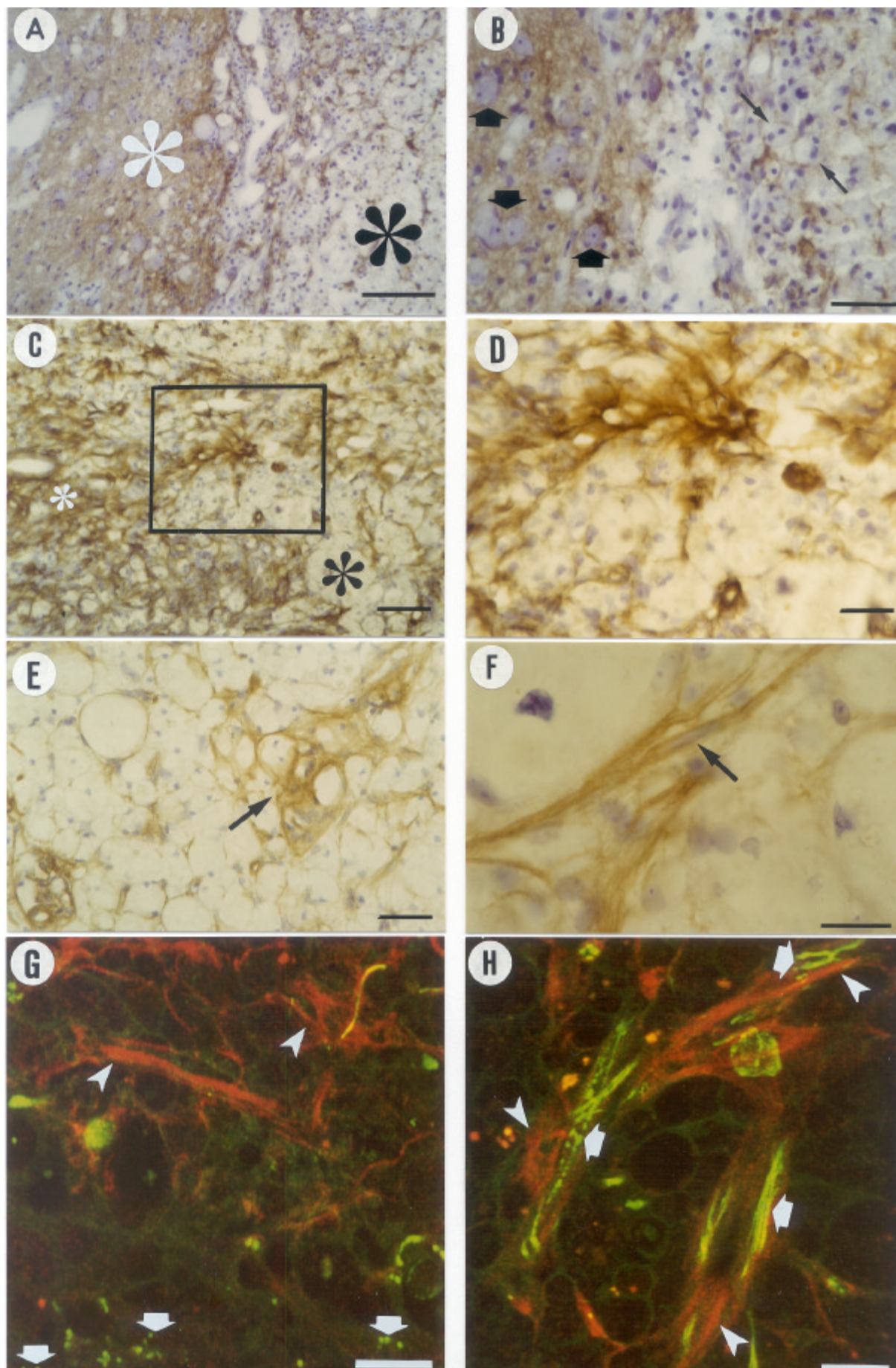


Abb. 10A-H KSPG-Expression innerhalb und in der Umgebung der Läsion

Zu Abb. 10 A-H (S. 45) KSPG-Expression innerhalb und in der Umgebung der Läsion

A) 7 Tage postoperativ zeigte sich in unmittelbar an die Läsion angrenzenden Regionen (weißer Stern) eine intensive KSPG-IR im Neuropil zwischen geschädigten Neuronen. Die Makrophagen-reiche Läsion (schwarzer Stern) enthielt wesentlich weniger KSPG. B) Geschädigte Neurone (dicke Pfeile) im an die Läsion angrenzenden, KSPG-reichen Gewebe; KSPG-negative, z.T. mehrkernige Makrophagen (dünne Pfeile) in der Läsion; C) 28 Tage postoperativ war eine intensive, heterogene KSPG-IR im Zentrum der Läsion nachweisbar. Neben KSPG-reichen Regionen (weißer Stern) existieren KSPG-freie Gebiete (schwarzer Stern). D) Vergrößerung des Ausschnitts aus (C): intensive KSPG-IR extrazellulärer Matrix-ähnlicher Strukturen. E) KSPG-Ablagerung (Pfeil) zwischen Makrophagen; F) KSPG-positives Zytoplasma einer Zelle mit spindelförmigem, Thionin-gefärbten Zellkern (Pfeil); G, H) Die Doppelimmunofluoreszenzmarkierung von KSPG (rot) und NF200 kD (grün) verdeutlicht, daß innerhalb der Läsion keine eindeutige räumliche Korrelation zwischen intensiv KSPG-positiven Arealen und dem Gehalt an Axonen bestand. G) In einigen Regionen fand sich eine inverse räumliche Korrelation, d.h. NF200 kD-positive Axonbündel (dicke Pfeile) fanden sich in KSPG-negativen Regionen, während KSPG-haltige Gebiete (Pfeilspitzen) keine Axone enthielten. H) In benachbarten Regionen bestand eine enge räumliche Korrelation zwischen NF 200kD-positiven Axonen (dicke Pfeile) und KSPG-positiven Strukturen (Pfeilspitzen). Auffälligerweise sind KSPG- und NF200-kD-positive Elemente ähnlich orientiert und teilweise parallel angeordnet. Skalierung: A: 100 µm; B: 50 µm C: 50µm: D: 30 µm; E: 50µm; F: 20µm; G, H: 20 µm.

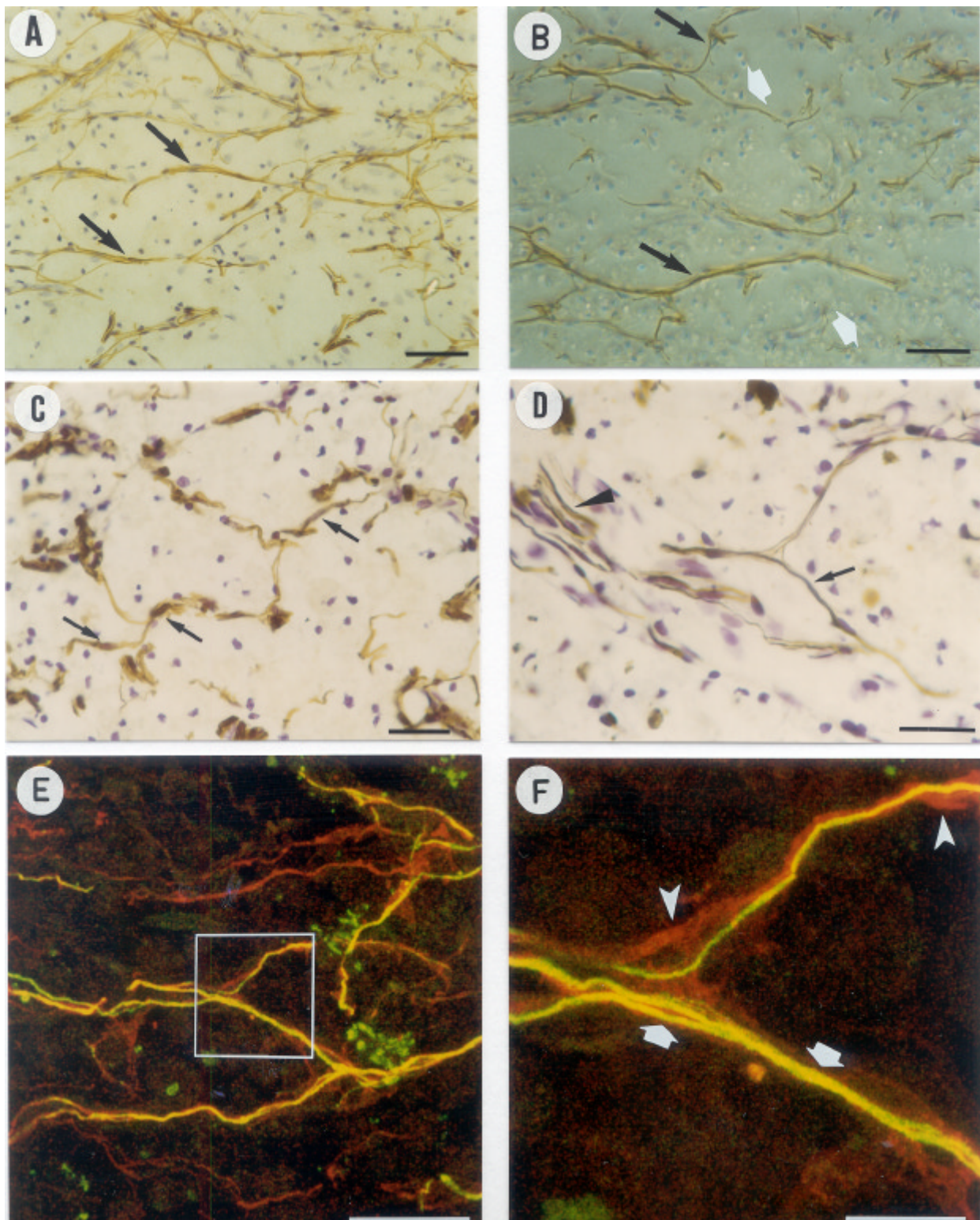


Abb. 11A-F Einsprossung von Axonen und NGFr-positiven Zellen in die Läsion

A) 14 Tage postoperativ konnten zahlreiche NF200 kD-positive Axone innerhalb der Läsion identifiziert werden, die aus dem angrenzenden Gewebe in die Läsion einwuchsen (Pfeile). Längsschnitte verdeutlichten die longitudinale Orientierung der Axone. B) Die z.T. kollateralisierten Axone (schwarze Pfeile) befanden sich in

enger räumlicher Assoziation zu den dicht gepackten Makrophagen (weiße Pfeile). C) Innerhalb der Läsion sind zahlreiche spindelförmige NGFr-positive zelluläre Elemente nachweisbar (Pfeile). D) Sowohl NF200 kD-positive kollateralisierte Axone (Pfeil) als auch Bündel von Axonen (Pfeilspitze) lassen sich in der Läsion identifizieren. E) Die Doppelimmunofluoreszenz-Markierung verdeutlicht die enge räumliche Assoziation zwischen NF200 kD-positiven Axonen (gelb) und NGFr-positiven zellulären Fortsätzen (rot). F) Vergrößerung des Ausschnitts aus (E): Axone (dicke Pfeile) befinden sich in enger Assoziation zu NGFr-positiven Zellen (Pfeilspitzen). Skalierung: A, B: 50 μm ; C, D: 30 μm ; E: 20 μm ; F: 5 μm .

6.4. Statistik (Erläuterungen: s. Kap. 6.2.)

Abb. 12A-E Statistik: Prozentuales Verhältnis der Immunoreaktivität der operierten zu den unoperierten Tieren und prozentuale Standardabweichung der jeweils ermittelten Immunoreaktivität A) OX42 (CR3); B) ED-1; C) MHC-I; D) NF200 kD und E) NGFr (p75).

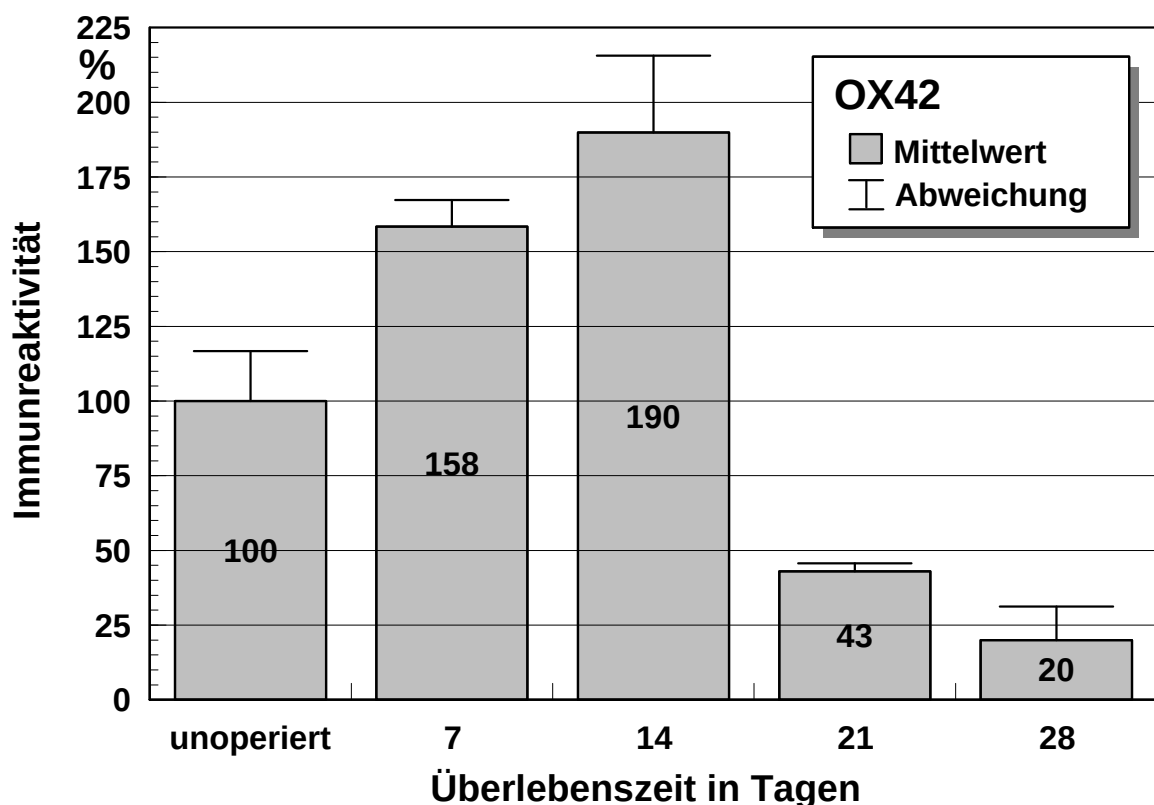


Abb. 12A

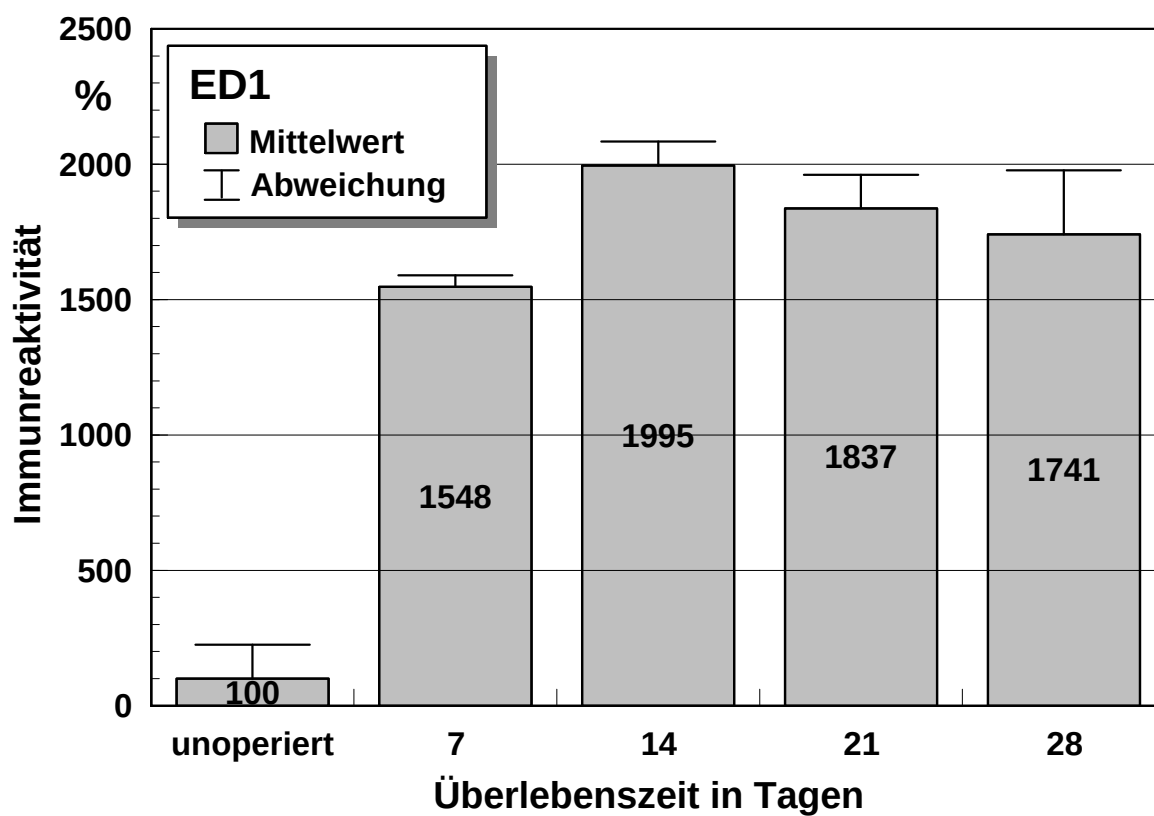


Abb. 12B

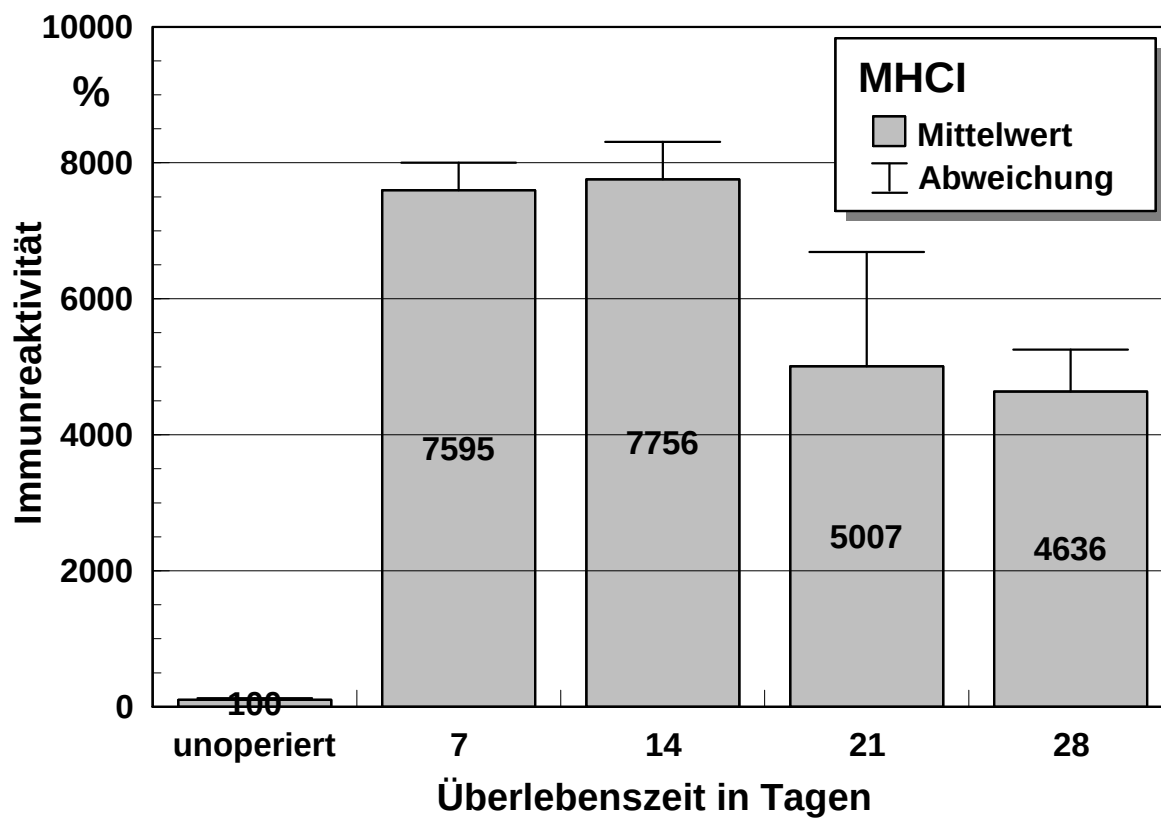


Abb. 12C

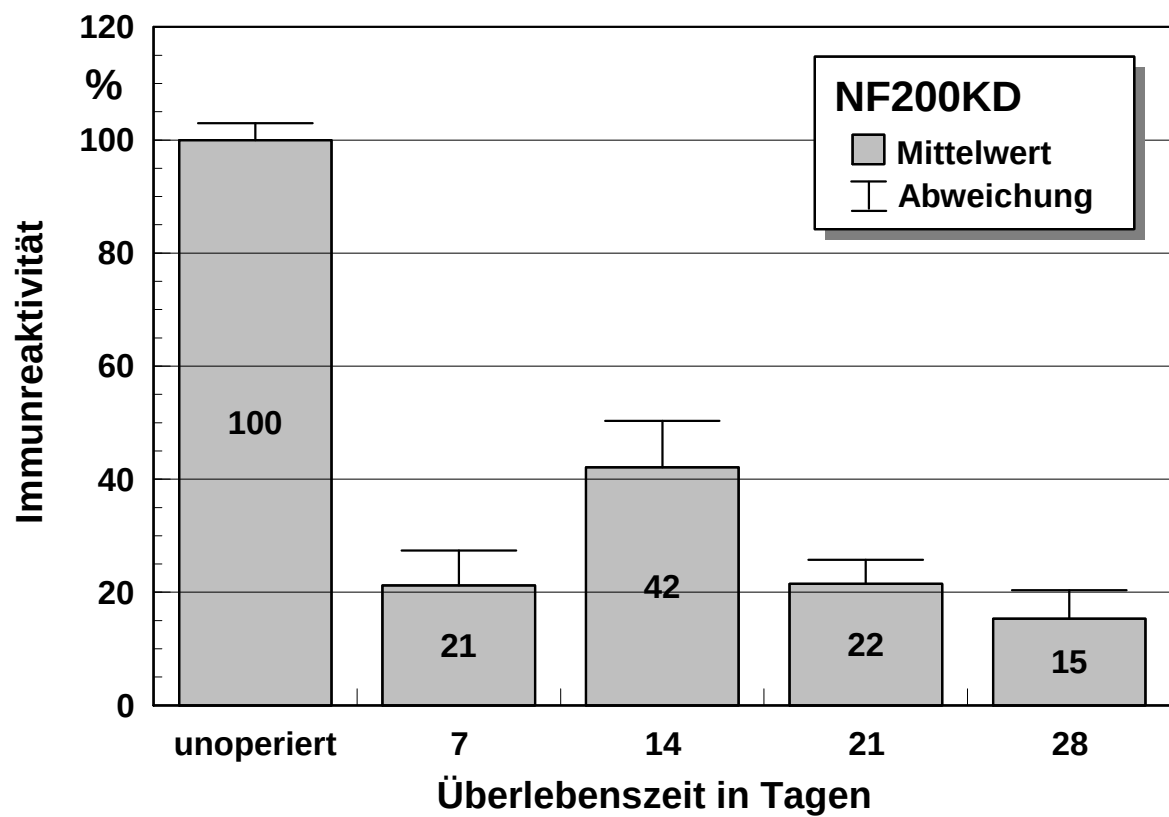


Abb. 12D

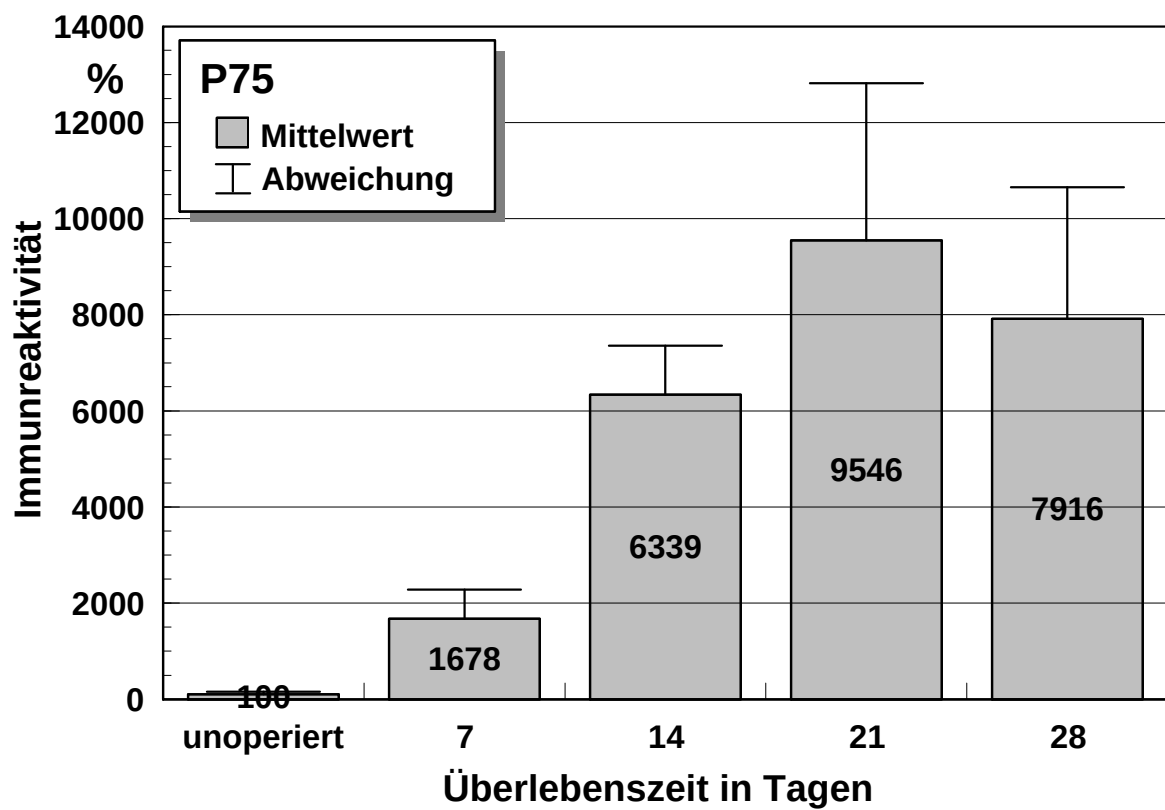


Abb. 12E

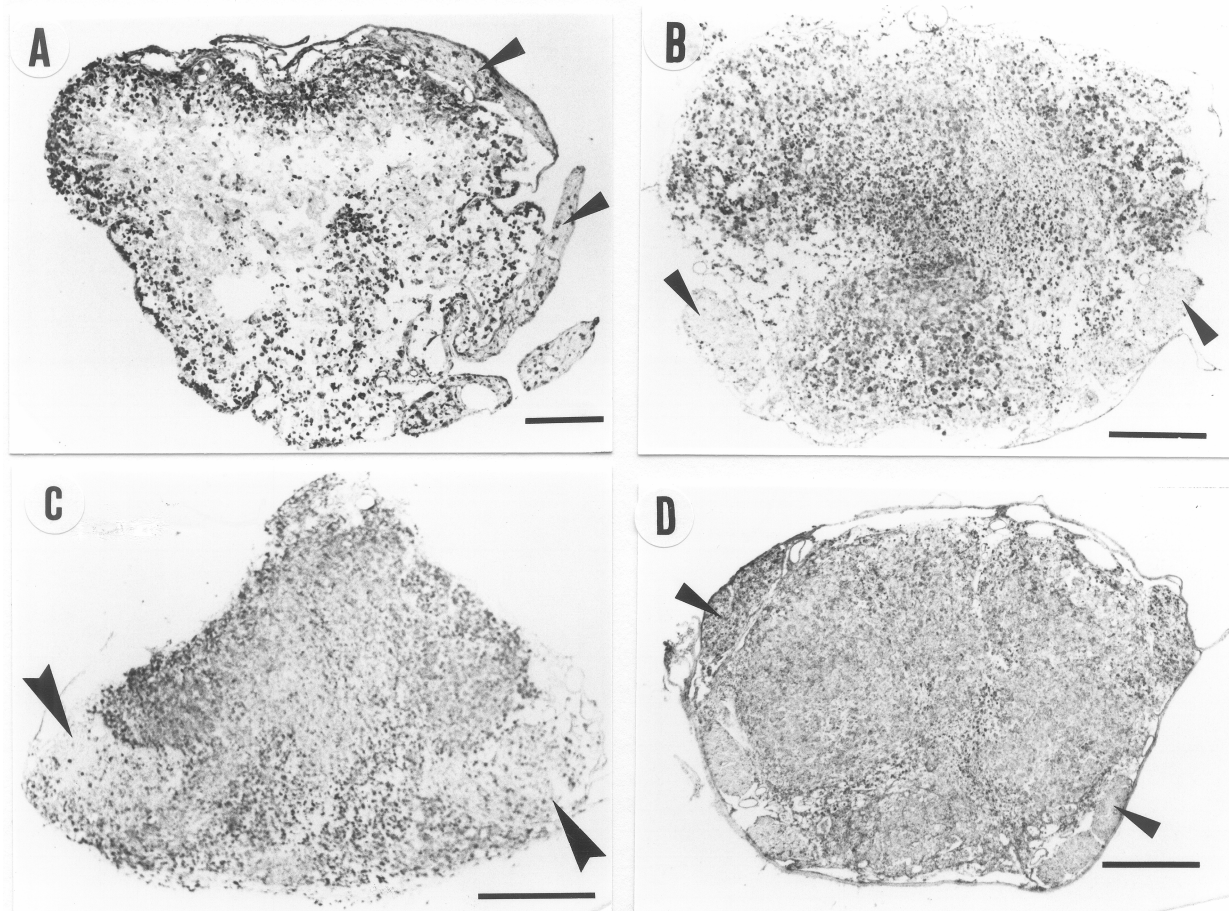


Abb. 13 ED-1-markierte Transversalschnitte der Rückenmarksläsion, Übersichtsvergrößerungen. A) 7 Tage, B) 14 Tage, C) 21 Tage, D) 28 Tage postoperativ. Die Läsion umfaßt den gesamten Querdurchmesser des Myelons. Auch die spinalen Vorder- und Hinterwurzeln wurden durch die Kompression geschädigt (Pfeilspitzen) und von ED-1-positiven Makrophagen infiltriert. Zu allen untersuchten Überlebenszeiten war die Läsion mit Makrophagen durchsetzt, nach 14 Tagen erschien die Infiltration besonders dicht (B). Skalierung: A 250 μ m, B, D 500 μ m, C 400 μ m.

6.5. Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia in Regionen sekundärer Degeneration distal der primären Läsion

Transversalschnitte durch zervikale Rückenmarks-Segmente zeigten einen deutlichen Verlust der NF200 kD-IR im Bereich des Fasciculus gracilis und im äußeren Bereich der Vorder- und Vorderseitenstränge. In angrenzenden Schnitten konnten in diesen Regionen axonaler Degeneration aktivierte Mikroglia, die OX42-, ED-1-, MHC-I- und sowie IB4- positiv waren, identifiziert werden. Hier fanden sich ebenfalls KSPG-positive Mikroglia, die z.T. verzweigt waren, während sich andere KSPG-positive Mikroglia in einem stärkeren Aktivierungszustand zu befinden schienen und runde Zellkörper sowie kurze, retrahierte Fortsätze besaßen. Die Kompression des unteren thorakalen Rückenmarks rief neben der Wallerschen Degeneration geschädigter

Nervenbahnen die Bildung einer Zyste im Bereich der Hinterstränge hervor, die sich bis in das zervikale und lumbale Myelon erstreckte (Abb. 14 A-F).

Die Degeneration der Hinterstränge führte zur Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen, die zu allen Überlebenszeiten im Bereich der Zyste nachweisbar waren. Sie wiesen eine intensive OX-42-, ED-1- und MHC-I-IR auf und waren auch mit IB4 deutlich nachweisbar. Interessanterweise stand der erheblichen Verminderung der OX-42 IR im Bereich der Läsion ein weniger starker Verlust der OX-42-Expression im Bereich der sich distal der Läsion ausdehnenden Zyste gegenüber (Abb. 14B-E). Auch nach 28 Tagen zeigten die Makrophagen innerhalb der Zyste noch eine leichte OX-42-IR. Vor allem die OX-42-IR der aktivierten Mikroglia im Randbereich der Zyste war sehr intensiv. Für NF200 kD und OX42 durchgeführte Doppelmarkierungen zeigten, daß OX42-positive Makrophagen nur vereinzelt NF200 kD-positiven axonalen Detritus enthielten. Im Gegensatz zum unmittelbaren Bereich der Läsion, in dem nur eine vereinzelte schwache LFA-1-Expression der Makrophagen stattfand, war in der Zyste distal der Läsion eine deutliche LFA-1-IR nachweisbar (Abb. 14F). Auffällig war, daß im Randbereich der Zyste, in der Übergangsregion zum normalen Gewebe, vor allem aktivierte, verzweigte Mikroglia vorhanden waren, während sich innerhalb der Zyste hauptsächlich Makrophagen befanden. Diese Transformationszone war besonders durch die OX-42-Markierung, die sowohl aktivierte Mikroglia als auch Makrophagen darstellte, gut zu erkennen (Abb. 14C-E). LFA-1 markierte die randständigen aktivierten bzw. reaktiven Mikroglia stärker als die Makrophagen innerhalb der Zyste (Abb. 14F).

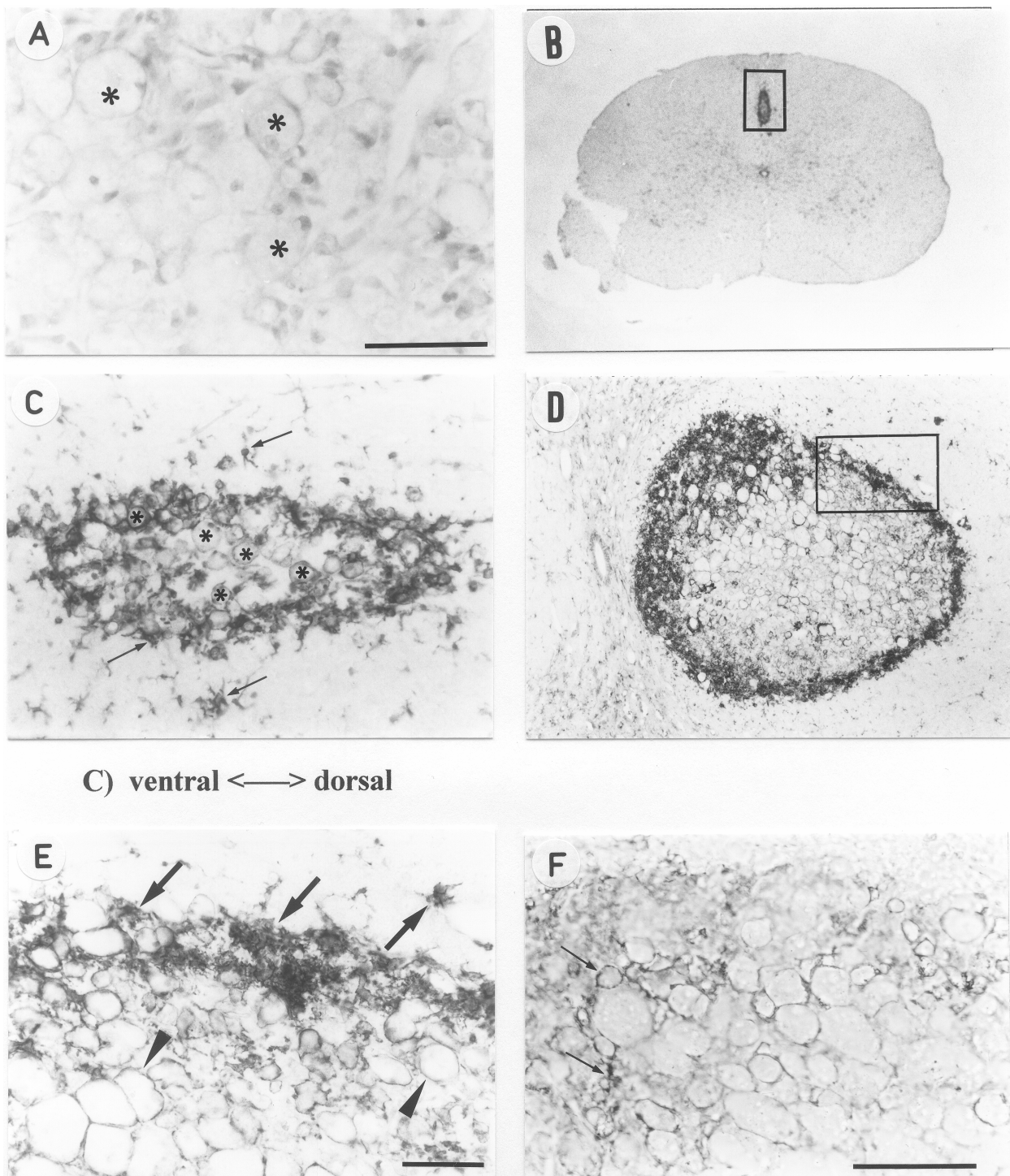


Abb. 14A-F A) Nach 28 Tagen waren die meisten Makrophagen in der Läsion OX-42-negativ (Sterne). Die Zyste in den degenerierenden Hintersträngen distal der Läsion enthielt hingegen stark OX-42-positive Makrophagen. B) Querschnitt durch das zervikale Myelon. 28 Tage postoperativ sind die Hinterstränge zystisch degeneriert und enthalten OX-42-positive Makrophagen. C) Vergrößerung des Ausschnitts aus (B): OX-42-IR der Zyste im zervikalen Rückenmark. Verzweigte, aktivierte Mikroglia am Rand der Zyste (Pfeile), phagozytische Mikroglia bzw. Makrophagen im Zentrum der Zyste (Sterne). D) OX-42-IR der Zyste im lumbalen Myelon. E) Vergrößerung des Ausschnitts aus (D): Aktivierte Mikroglia am Rand

der Zyste (Pfeile), Makrophagen im Zentrum der Zyste (Pfeilspitzen). F) Aktivierte Mikroglia und Makrophagen im Randbereich der Zyste sind stark LFA-1-positiv. Skalierung: A, C, E 50 μm ; B 500 μm ; D 200 μm ; F 100 μm .

6.6. MHC-II-Expression im Bereich und distal der Läsion

Die posttraumatische MHC-II-Expression wurde semiquantitativ vergleichend an operierten Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Während sie sich bezüglich der Morphologie und Verteilung der MHC-II-positiven Zellen ähnelte, bestanden deutliche Unterschiede hinsichtlich der Intensität der MHC-II-Expression. Sprague-Dawley-Ratten wiesen eine erheblich intensivere MHC-II-Expression auf als Wistar-Ratten. Unterschiede hinsichtlich des Zeitverlaufs bestanden insofern, als daß in Sprague-Dawley-Ratten ein rascherer Anstieg der posttraumatischen MHC-II-Expression zu verzeichnen war. Nach 7 Tagen fanden sich im Bereich der Läsion beider Spezies nur wenige, kleine MHC-II-positive Zellen, häufig in der Nähe von Gefäßen. Diese Zellen besaßen einen wesentlich kleineren Durchmesser als Makrophagen (Abb. 15A, B). Nach 14 Tagen war die Anzahl MHC-II-positiver Zellen in der Läsion der Wistar-Ratten leicht gestiegen, allerdings handelte es sich wie zuvor nicht um Makrophagen, sondern um kleinere, runde oder längliche Zellen, möglicherweise Lymphozyten oder dendritische Zellen (Abb. 15C). In Sprague-Dawley-Ratten hatte die Anzahl MHC-II exprimierender Zellen hingegen deutlich zugenommen (Abb. 15D). Nach 21 Tagen enthielt die Läsion der Wistar-Ratten nur wenig mehr MHC-II-positive Zellen als nach kürzeren Überlebenszeiten. In der Rückenmarkläsion der Sprague-Dawley-Ratten waren dagegen deutlich mehr MHC-II-immunoreaktive Zellen vorhanden als zuvor. Während es sich bei den Wistar-Ratten wie zuvor um kleine, runde oder längliche Zellen handelte (Abb. 15E), fiel im Zentrum der Läsion der Sprague-Dawley-Ratten eine Akkumulation MHC-II-positiver Makrophagen und aktivierter Mikroglia auf (Abb. 15F). Nach 28 Tagen hatte die Anzahl MHC-II-exprimierender Zellen in der Läsion der Wistar-Ratten erneut leicht zugenommen, in der Läsion der Sprague-Dawley-Ratten kam es hingegen zur Reduktion der Anzahl MHC-II-immunoreaktiver Zellen.

In degenerierenden Faserzügen und im Bereich der Zyste distal der Läsion in zervikalen sowie lumbalen Segmenten wiesen in Wistar-Ratten nur vereinzelte, meist perivaskuläre Zellen eine MHC-II-Immunoreaktivität auf. Sprague-Dawley-Ratten hingegen zeigten eine deutliche MHC-II-Expression aktivierter Mikroglia im Bereich der degenerierenden Hinterstränge und der Vorder- und Seitenstränge (Abb. 16A, B). Auffallend war, daß aktivierte Mikroglia am Rand der Zyste stark MHC-II-positiv waren, während sich MHC-II-negative Makrophagen innerhalb der Zyste befanden (Abb. 16A).

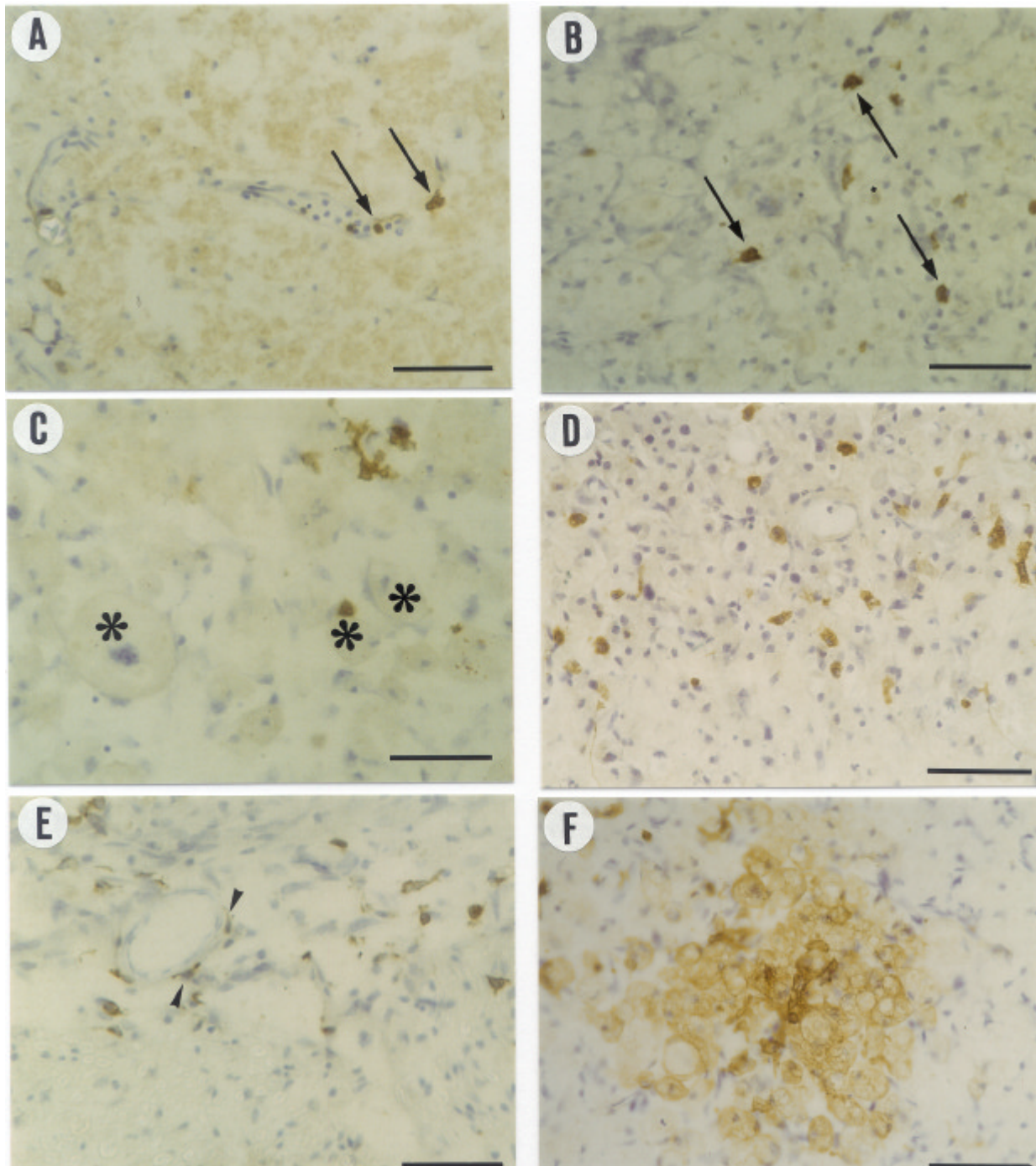


Abb. 15 A-F Vergleich der MHC-II-IR in der Läsion zwischen Sprague-Dawley- (SPRD) und Wistar-Ratten. 7 Tage postoperativ zeigten sich sowohl in der Läsion der Wistar-Ratten (A) als auch der SPRD (B) nur wenige MHC-II-positive Zellen (Pfeile), häufig in der Nähe von Gefäßen (A, dicker Pfeil). Nach 14 Tagen nahm die Anzahl MHC-II-positiver Zellen in Wistar-Ratten nur geringfügig zu, neben MHC-II-negativen Makrophagen (Sterne) zeigten sich längliche oder kleine runde MHC-II-positive Zellen (C). D) Zahlreiche MHC-II-positive Zellen in der Läsion der SPRD. E) 21 Tage postoperativ zeigte sich in der Läsion der Wistar-Ratten eine leichte Zunahme MHC-II-positiver Zellen. MHC-II-positive perivaskuläre Zellen (Pfeilspitzen). F) Im Zentrum der Läsion der SPRD fällt eine Anhäufung MHC-II-positiver Makrophagen auf. Skalierung: A, B, D, E, F: 50 µm; C: 25 µm.

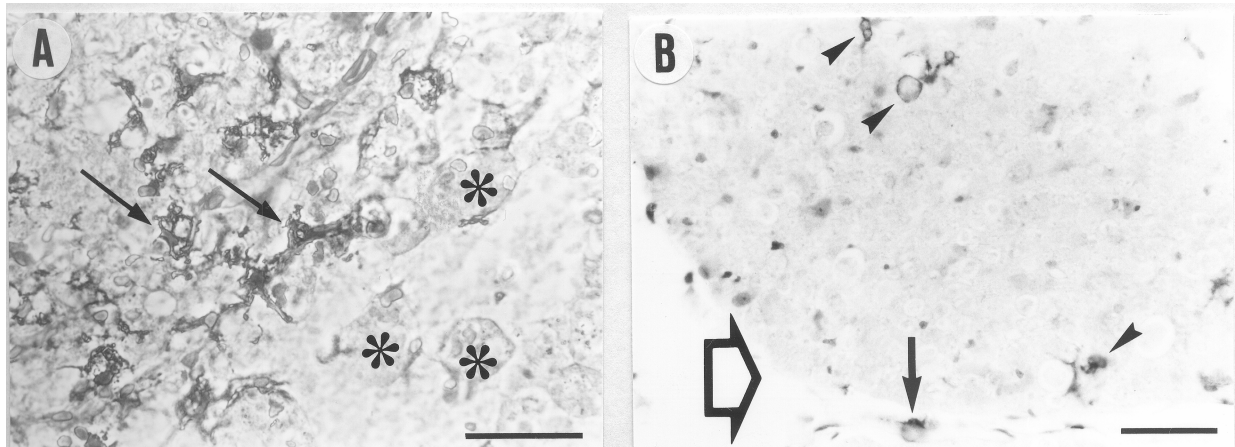


Abb. 16 A, B) MHC-II-IR in degenerierenden Faserzügen der SPRD-Ratten. Anders als in Wistar-Ratten waren in Sprague-Dawley-Ratten zahlreiche MHC-II-positive aktivierte Mikroglia in den degenerierenden Hintersträngen nachweisbar. A) Im Randbereich der Zyste zeigten sich stark MHC-II-positive aktivierte Mikroglia (Pfeile) neben MHC-II-negativen Makrophagen (Sterne). B) Auch zervikal in den degenerierenden Vordersträngen fanden sich MHC-II-positive, aktivierte Mikroglia (Pfeilspitzen), die z.T. gerundete Zellkörper und retrahierte Fortsätze besaßen. Dicker Pfeil: Fissura mediana anterior; dünner Pfeil: MHC-II-positiver Makrophage im Subarachnoidalraum. Skalierung: A: 50 μm ; B: 60 μm .

7. Diskussion

Nach Verletzungen des Rückenmarkes adulter Säugetiere kommt es nur in sehr begrenztem Ausmaß zu spontanen Regenerationsvorgängen. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, daß der eingeschränkten axonalen Regenerationsfähigkeit neben neuronalen verschiedene nichtneuronale Ursachen zugrundeliegen, z.B. oligodendrogliaassoziierte Glycoproteine (Schwab und Bartholdi 1996). In den letzten Jahren wurde die Aufmerksamkeit zunehmend auf die Rolle der eingeschränkten Entzündungsreaktion des ZNS und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix gelenkt. Es wird vermutet, daß die innerhalb des ZNS supprimierte Entzündungsreaktion die unvollständige Regeneration mitbedingt (Lazarov-Spiegler et al. 1998a; Zeev-Brann et al. 1998) und daß die Ablagerung von Proteoglycanen und anderen extrazellulären Matrixmolekülen in ZNS-Läsionen die axonale Elongation hemmt (Stichel und Müller 1998). In der vorliegenden Studie wurde in einem klinisch relevanten Modell spinaler Kompressionsverletzungen die zelluläre inflammatorische Reaktion durch eine detaillierte Charakterisierung der Antigenexpression posttraumatisch aktivierter Makrophagen untersucht. Die Korrelation des Makrophagen-Immunphänotyps mit spontanen endogenen Regenerationsvorgängen kann evt. Aufschlüsse darüber geben, welche Makrophagenpopulationen regenerationsfördernde Eigenschaften besitzen. Daneben wurde die Expression des Proteoglycans Keratansulfat-Proteoglycan (KSPG) untersucht und die Korrelation mit spontanen Regenerationsvorgängen wie dem Einsprossen von Axonen und Schwannzellen in die Läsion nach unterschiedlichen Überlebenszeiten (7, 14, 21 und 28 Tage postoperativ) beschrieben.

7.1. Unverletztes Rückenmark und Läsionsmodell

Im Rückenmark unoperierter Kontrolltiere fanden sich zahlreiche Complement-Rezeptor Typ 3 (CR3 ; OX-42) - positive ruhende Mikrogliazellen. Durch die KSPG-Markierung ließ sich eine geringere Anzahl Mikrogliazellen darstellen, was darauf hinweist, daß nur eine Subpopulation CR3-positiver Mikroglia KSPG-positiv ist (Bertoletto et al. 1998). Die Unterschiede in der Oberflächenantigen-Expression lassen vermuten, daß ramifizierte Mikroglia auch Unterschiede in ihrer Funktion aufweisen. Die Verteilung sowohl KSPG- als auch CR3-positiver Mikroglia zwischen den Oligodendrogliazellen und in der Nachbarschaft von Blutgefäßen läßt jedoch nicht auf eine Populations-spezifische Funktionalität der Mikroglia schließen. Die luminale Oberfläche der den Zentralkanal auskleidenden Ependymzellen und vereinzelte Zellen zwischen den Ependymzellen waren ebenfalls teilweise KSPG-immunoreaktiv. Interessanterweise wurde von Johansson und Mitarbeitern eine Subpopulation der Ependymzellen als Stammzellen identifiziert. Diese sollen nach Rückenmarkverletzungen proliferieren und Zellen generieren, welche in die Läsion einwandern und an der Bildung des Narbengewebes beteiligt sind (Johansson et al. 1999). Namiki und Mitarbeiter zeigten, daß nach Rückenmarkverletzungen adulter Ratten die Proliferationsrate der Ependymzellen des

Zentralkanals stark ansteigt, gleichzeitig werden die Ependymzellen Nestin-positiv und migrieren in das verletzte Rückenmark, was auf Stammzeleigenschaften der Ependymzellen hinweist (Namiki et al. 1999). Diesen Beobachtungen stehen jedoch von Doetsch und Mitarbeitern (1999) durchgeführte Experimente gegenüber, die zeigten, daß im Gehirn adulter Mäuse nur aus der subventrikulären Zone stammende Astrozyten neuronale Stammzellen bilden. Ramifizierte Mikrogliazellen im unverletzten Rückenmark zeigten eine nur sehr schwache Expression des major histocompatibility complex-I (MHC-I)-Antigens, das der Antigenpräsentation und der Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten dient (Hart und Fabry 1995), und des lysosomalen, Phagozytose-assoziierten Glycoproteins ED-1 (Damoiseaux et al. 1994; Dijkstra et al. 1994). Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen von Popovich et al. (1997). Im nicht-operierten Rückenmark wiesen ramifizierte Mikrogliazellen keine Expression des LFA-1 (leucocyte function-associated antigen-1)-Moleküls auf, welches während der Phagozytose degenerierender Axone von aktivierten Mikroglia exprimiert wird, als Adhäsionsmolekül dient und zelluläre sowie Zell-Matrix-Interaktionen vermittelt (Finsen et al. 1993; Hailer et al. 1996, 1997, 1998). Mit dem Isolectin *Bandeiraea simplicifolia* (IB4), das einen auf der Oberfläche von Makrophagen und Mikroglia exprimierten Galaktopyranosyl-Rest bindet (Tabor et al. 1989), ließen sich Mikrogliazellen in der weißen und grauen Substanz sowie Blutgefäße (Morioka et al. 1992) und Axone in der Substantia gelatinosa der Hinterhörner nachweisen. Bei den Axonen handelt es sich um sensible C-Fasern, die in die Substantia gelatinosa des spinalen Hinterhorns projizieren (Streit et al. 1987; Kitchener et al. 1993). Im Rückenmark nichtoperierter Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten waren nur sehr wenige MHC-II-positive, zumeist mit Gefäßen assoziierte Zellen geringen Durchmessers nachweisbar, die häufig perivaskulären Zellen glichen, was mit Ergebnissen von Popovich et al. (1993, 1997) übereinstimmt. Eine größere Anzahl MHC-II-positiver Zellen war hingegen im Subarachnoidalraum nachweisbar. Als Positivkontrolle für die MHC-II-Färbung dienten das außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegende Corpus pineale sowie der Plexus choroideus, die in beiden Spezies zahlreiche stark MHC-II-positive Makrophagen bzw. dendritische Zellen enthalten (Pedersen et al. 1993).

Das der vorliegenden Studie zugrunde liegende experimentelle Rattenmodell spinaler Kompressionsverletzungen, das von Martin und Mitarbeitern entwickelt wurde (Martin et al. 1992), verursacht mittels eines aufdehnbaren subduralen Ballons standardisierte thorakale Myelonkompressionen und ermöglicht die Reproduzierbarkeit eines Traumas, das viele Charakteristika humaner Rückenmarkverletzungen besitzt (Kakulas und Taylor 1992; Bunge et al. 1997). Die Kompression führt zur Mazeration und hämorrhagischen Nekrose des Myelons und schädigt auch die spinalen Wurzeln der betroffenen Segmente, die als Folge „aktiviert“ und NGFr-positiv werden, während in den ungeschädigten spinalen Wurzeln keine bzw. nur eine geringe NGFr-IR nachweisbar ist (Brook et al. 1998a). Unmittelbar nach der Kompression finden sich massenhaft axonale Fragmente und NF200 kD-

positiver Detritus innerhalb der Läsion. Frühere Untersuchungen zeigten, daß die Läsion im Rahmen der posttraumatischen Entzündungsreaktion von zahlreichen neutrophilen Granulozyten und, nach wenigen Tagen, von Makrophagen infiltriert wird (Brook et al. 1998a).

7.2. Semiquantitative und quantitative Auswertung der zellulären Reaktionen im Bereich der Läsion

7 Tage postoperativ zeigten die meisten der die Läsion infiltrierenden Makrophagen eine intensive CR3-, ED-1- und MHC-I-IR. Dabei fand sich die CR3-Markierung sowohl auf der Zellmembran als auch zytoplasmatisch. Der Complement Typ 3-Rezeptor (CR3) ist mit der phagozytischen Aktivität der Makrophagen assoziiert (Brück und Friede 1990), und die membrangebundene sowie intrazelluläre Lokalisation der CR3-IR weist wahrscheinlich auf die starke phagozytische Aktivität der Makrophagen hin, die das nekrotische Gewebe in der Läsion abräumen. Außerdem soll der besetzte CR3-Rezeptor eine Steigerung der MHC-II-Expression induzieren und die Rekrutierung myelomonozytärer Zellen aus dem Blut steigern. (Brück und Friede 1990; Reid et al. 1993). Die Phagozytose des inhibitorischen extrazellulären Myelindetritus stellt wahrscheinlich eine der die axonale Regeneration fördernden Eigenschaften der Makrophagen dar. Die ED-1-Markierung, die ein mit der Phagozytoseaktivität assoziiertes lysosomales Glykoprotein darstellt (Damoiseaux et al. 1994), fand sich vor allem auf intrazellulären Granula, während die MHC-I-Markierung hauptsächlich auf der Zellmembran nachweisbar war. Das MHC-I-Molekül dient der Antigenpräsentation, vermittelt Interaktionen mit anderen immunkompetenten Zellen, z.B. die Aktivierung CD8-positiver zytotoxischer Lymphozyten, und wird auch nach Kontusions-Verletzungen des Rückenmarks (Popovich et al. 1993) sowie nach isolierten Hinterstrangverletzungen rasch hochreguliert (Koshinaga und Whittemore 1995). Im Vergleich zum unverletzten Gewebe war 7 Tage postoperativ die OX42-IR hochsignifikant ($p < 0,001$) um $158 \pm 9\%$ angestiegen. Die ED-1-IR hatte ebenfalls hochsignifikant um $1548 \pm 42\%$ und die MHC-I-IR um $7595 \pm 405\%$ zugenommen. Wie in Kap. 5. 6. erwähnt, ergibt sich der sehr starke prozentuale Anstieg der MHC-I- und ED-1-IR daraus, daß diese Antigene im unverletzten Rückenmark nur sehr schwach exprimiert werden. Der im Vergleich dazu um den Faktor 10 bzw. 50 schwächere Anstieg der OX42-Färbeintensität ist darauf zurückzuführen, daß das CR3-Antigen im "normalen" Gewebe wesentlich stärker exprimiert wird als ED-1 bzw. MHC-I. Die Abb. 6 zeigt, daß die OX-42, die ED-1 und die MHC-I-IR zu dieser Überlebenszeit ähnlich intensiv sind. Der Nachweis LFA-1-negativer Makrophagen innerhalb der Läsion, aber LFA-1-positiver aktivierter Mikroglia im an das gesunde Gewebe angrenzenden peripheren Bereich der Läsion und der Zyste wird in 7.4. und 7.6. diskutiert. Neben Makrophagen migrierten auch spindelförmige, NGFr-positive Zellen in das geschädigte Gewebe. Einige der in der Läsion nachweisbaren NGFr-positiven Zellen entsprechen Schwannzellen, die aus den geschädigten spinalen Wurzeln stammen (Martin et al. 1992). NGFr-

positive Zellen befanden sich hauptsächlich in Regionen der Läsion, die dicht mit Makrophagen infiltriert waren, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß Makrophagen Zytokine wie TGF- β 1 sezernieren, die die Schwannzellproliferation und -migration fördern (Perry et al. 1987). Die Läsion enthielt zu diesem Zeitpunkt (7 Tage postoperativ) wenige NF 200-kD-positive Axone, die aus dem angrenzenden Rückenmark in die Läsion einzusprossen begannen und sich in enger räumlicher Assoziation zu den NGFr-positiven Schwannzellen und den Makrophagen befanden. Es bestand eine enge räumliche Assoziation zwischen Axonen und NGFr-positiven Zellen sowie Makrophagen, was darauf hinweist, daß diese Zellen regenerationsfördernde Effekte ausüben. Die statistische Untersuchung zeigte 7 Tage postoperativ einen hochsignifikanten Anstieg der NGFr (p75) IR im Vergleich zum unverletzten Gewebe um $1678 \pm 603\%$, wobei sich dieser sehr hohe Wert, ähnlich der ED-1- und MHC-I-Intensität, aus der geringen p75-Expression im "normalen" Gewebe erklärt. Die NF200 kD-IR betrug eine Woche postoperativ $21 \pm 6\%$ der NF200 kD-IR des unverletzten Rückenmarkes, was einem hochsignifikanten Abfall der IR entsprach und den erheblichen axonalen Verlust in der Läsion verdeutlicht.

14 Tage postoperativ war die Läsion mit dichtgepackten, „schaumigen“ Makrophagen angefüllt, deren große morphologische Heterogenität auffiel. Der Durchmesser der Makrophagen schien im Vergleich zur kürzeren Überlebenszeit etwas angestiegen zu sein. Viele Makrophagen zeigten eine starke OX-42-, ED-1- und MHC-I-IR. Dabei wirkten Makrophagen mit kleineren Durchmessern stärker OX-42-, ED-1- und MHC-I-positiv als größere Makrophagen. Möglicherweise handelte es sich um verschiedene Makrophagenpopulationen, die unterschiedliche Immunophänotypen besaßen. Bei den großen, schwächer angefärbten Makrophagen könnte es sich auch um ältere Zellen handeln, deren starke Phagozytoseaktivität zu einem „Verbrauch“ der Phagozytose-assoziierten und Antigen-präsentierenden Moleküle geführt hat. Die schwache Markierung großer Makrophagen könnte jedoch auch auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen sein. Die intensive IB4-Markierung verdeutlichte die unterschiedliche Morphologie der Makrophagen besonders eindrucksvoll und schien unabhängig von der Größe der Zellen zu sein, was sich evt. darauf zurückführen läßt, daß das Isolectin einen Zuckerrest (Galactopyranosyl) auf der Makrophagenmembran bindet und es sich nicht um eine immunhistochemische Antigen-Antikörper-Reaktion handelt. Wie zuvor befanden sich nur sehr wenige LFA-1-positive Makrophagen im Zentrum der Läsion, hauptsächlich in Bereichen, die von Bindegewebestrabekeln oder Gefäßen durchzogen wurden. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Anstieg der OX42-IR im Vergleich zur 7-tägigen Überlebenszeit. Die ED-1-IR zeigte dagegen einen hochsignifikanten Anstieg um $29 \pm 6\%$, während die MHC-I-IR etwa gleich blieb. Zahlreiche NF 200 kD-positive, einzeln oder in Bündeln verlaufende Axone, die z.T. Kollateralen besaßen, waren in der Läsion in enger Nachbarschaft zu den Makrophagen nachweisbar. Frühere Untersuchungen zeigten, daß GABAerge, glycinerge, monoaminerge und wenige CGrP- (calcitonin gene related peptid) und

Substanz P-positive Axone in die Läsion einsproßten, wohingegen 5HT-positive (serotonerge) und corticospinale Fasern nicht nachweisbar waren (Brook et al. 1998a). Verglichen mit der 7-tägigen Überlebenszeit war zu diesem Zeitpunkt die NF-200 kD-IR in der Läsion sehr signifikant ($p < 0,01$) um 99 ± 39 , also ca. das Doppelte, angestiegen. Dieser Nachweis überraschend intensiver axonaler Regeneration bestätigt die Beobachtung, daß es sowohl nach tierexperimentellen als auch nach humanen Rückenmarkverletzungen in größerem Ausmaß zu spontanen Reorganisationsvorgängen kommt, als früher angenommen wurde (Wang et al. 1996; Brook et al. 1998a).

Trotz der zu diesem Zeitpunkt sehr starken Expression der Phagozytose-assoziierten Antigene OX-42 und ED-1, die wahrscheinlich darauf hinweist, daß die phagozytische Aktivität der Makrophagen ihren Höhepunkt erreicht hat, scheinen die aussprossenden Axone nicht durch die Makrophagen geschädigt zu werden. Die enge räumliche Assoziation zwischen Axonen und Makrophagen weist hingegen darauf hin, daß die sekretorische Aktivität der Makrophagen die axonale Aussprossung fördert und daß das Entfernen inhibitorischer extrazellulärer Myelinreste durch Phagozytose die axonale Aussprossung unterstützt. Die sehr heterogen aufgebaute Läsion, in der sich unterschiedlich große Zysten ausbildeten, wurde von NGFr-positiven Zellen durchflochten, die zwischen den eng aneinanderliegenden Makrophagen ein dichtes Netzwerk bildeten und deren Wachstum vermutlich durch von Makrophagen produzierte Zytokine gefördert wurde. Die NGFr (p75)-IR war im Vergleich zur früheren Überlebenszeit hochsignifikant um fast das Vierfache ($380 \pm 60\%$) angestiegen. Verhältnismäßig hohe Standardabweichungen, die einige Messungen der Läsion ergaben, lassen sich wahrscheinlich auf den sehr heterogenen Aufbau der untersuchten Läsionen zurückführen.

21 bzw. 28 Tage postoperativ erschien der Aufbau der Läsion wie zuvor heterogen. Einige Bereiche enthielten Makrophagen und NGFr-positive Zellen, in anderen überwog die Zystenbildung. 21 und 28 Tage postoperativ war eine drastische Reduktion der CR-IR der in der Läsion vorhandenen Makrophagen nachweisbar. Die statistische Auswertung zeigte 21 Tage postoperativ einen Abfall der CR3-IR im Vergleich zur 14-tägigen Überlebenszeit um $77 \pm 1\%$. Die CR3-IR der Läsion betrug zu diesem Zeitpunkt weniger als die Hälfte der CR3-IR des unverletzten Rückenmarkes und war damit hochsignifikant niedriger als zu den früheren untersuchten Überlebenszeiten und auch als im normalen Gewebe. Dem Verlust der OX-42-IR, der möglicherweise eine Deaktivierung der Makrophagen widerspiegelt, könnten sowohl eine Herunterregulation bzw. verminderte Expression des CR3-Rezeptors als auch eine Denaturierung dieses Oberflächenantigens zugrunde liegen. 28 Tage postoperativ war ein weiterer sehr signifikanter Abfall der OX-42-IR auf ca. die Hälfte des vorherigen Wertes zu verzeichnen, die CR3-IR betrug nunmehr 20% des Ausgangswertes im unverletzten Gewebe und lediglich ca. 11% der maximalen OX-42 IR, die 14 Tage postoperativ zu verzeichnen war. Die immer noch sehr intensive Lectinfärbung verdeutlichte, daß die Anzahl der Makro-

phagen in der Läsion nicht abgenommen hatte. Nach 28 Tagen wiesen vereinzelte Makrophagen in der Läsion eine fehlende Anfärbbarkeit mit Isolectin auf. Hohe Vergrößerungen zeigten jedoch, daß es sich hier um degenerierende Makrophagen handelte, deren Membran perforiert war, weshalb auch die Möglichkeit der Degeneration bzw. Apoptose der Makrophagen als Ursache für den Verlust der CR3-IR in Betracht zu ziehen ist. Makrophagen und spindelförmige Zellen, die in Form von Trabekeln in die Läsion einsproßten, befanden sich in einigen Regionen der Läsion wie zuvor in enger räumlicher Assoziation. Es fanden sich jedoch auch mit OX-42-negativen Makrophagen durchsetzte Gebiete, welche nicht von spindelförmigen, NGFr-positiven Zellen durchzogen wurden. Diese Beobachtung untermauert die Theorie, daß der Verlust der phagozytischen Aktivität mit einer Reduktion der sekretorischen, die axonale Regeneration fördernden Kapazität der Makrophagen einhergeht.

Weder zwischen 14 und 21 noch zwischen 21 und 28 Tagen fand eine signifikante Reduktion der ED-1-IR statt. Sie betrug 28 Tage postoperativ noch ca. 87% der maximalen IR, die 14 Tage postoperativ erreicht wurde. Es zeigt sich jedoch ein diffuseres, intrazelluläres IR-Muster, was bedeuten könnte, daß die lysosomalen Granula nicht mehr intakt sind. Dies weist evt. auf die Digestion des phagozytierten Materials mittels lysosomaler Enzyme hin, könnte aber auch die Degeneration der Makrophagen anzeigen. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen zeigten von Popovich et al. (1997) durchgeführte Experimente, denen ein spinale Kontusionsmodell adulter Ratten zugrundelag, eine deutliche Reduktion nicht nur der OX-42-, sondern auch der ED-1-IR zwischen 14 und 28 Tagen postoperativ. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf die verschiedenen Läsionsmodelle zurückzuführen. Zwischen 14 und 21 Tagen postoperativ war eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der MHC-I-IR um $35 \pm 22\%$ zu verzeichnen, zwischen 21 und 28 Tagen nahm die MHC-I-IR dann nicht mehr signifikant ab. Die immer noch deutliche MHC-I-IR der Zellmembran weist möglicherweise auf die persistierende antigenpräsentierende Aktivität der Makrophagen hin.

Die auffällige Änderung des Immunophänotyps der Makrophagen zwischen 14 und 21 Tagen postoperativ ging zeitlich parallel mit einer massiven Reduktion des Gehalts an NF200 kD-positiven Axonen in der Läsion einher. Statistisch ließ sich 21 Tage postoperativ im Vergleich zur 14-tägigen Überlebenszeit ein sehr signifikanter Abfall der NF200 kD-IR auf $51 \pm 10\%$ feststellen. Wie zur 7-tägigen Überlebenszeit betrug die NF200 kD-IR jetzt ungefähr 21% der Intensität des unverletzten Gewebes. Parallel dazu war vermehrt NF 200 kD-positiver Detritus in der Läsion nachweisbar. Zwischen 21 und 28 Tagen postoperativ war kein weiterer signifikanter Rückgang der NF200 kD-IR nachweisbar. Die NGFr-IR veränderte sich zwischen 14 und 28 Tagen postoperativ nicht signifikant. Wie zuvor bestand zwischen Axonen und NGFr-positiven Zellen eine enge räumliche Assoziation. Doppelmarkierungen für OX-42 und NF200 kD ergaben keine Korrelation zwischen der OX-42-IR der Makrophagen und der Phagozytose von NF 200 kD-positivem Detritus. Die wenigen OX-42-positiven Makrophagen, die 21 Tage

postoperativ in der Läsion nachweisbar waren, enthielten nur vereinzelt NF 200 kD-positives phagozytiertes Material, d.h. es fand keine vermehrte Phagozytose von Axonen durch OX-42-positive Makrophagen statt. Der Verlust der phagozytären OX-42-IR und der begleitende verminderte Gehalt der Läsion an Axonen lassen vermuten, daß zwischen dem Immunophänotyp der Makrophagen und der axonalen Regeneration ein Zusammenhang besteht. Möglicherweise zeichnet sich der phagozytäre Phänotyp, der 14 Tage postoperativ in der Läsion vorherrscht, durch die Sekretion besonders regenerationsfördernder, für die axonale Elongation notwendiger Zytokine aus. Ergebnisse von Zeev-Brann et al. (1998) zeigten, daß Makrophagen, die in peripherem Nervengewebe (PNS) kultiviert werden, sich durch eine höhere Phagozytoseaktivität auszeichnen als im ZNS kultivierte Makrophagen. Die Transplantation von Makrophagen, die durch Inkubation in peripherem Nervengewebe aktiviert wurden, fördert die Regeneration verletzter zentraler Axone des Sehnerven (Lazarov-Spiegler et al. 1998b) und die funktionelle Restitution nach experimentellen Rückenmarkverletzungen adulter Ratten (Rapalino et al. 1998). Diese Ergebnisse untermauern den vermuteten Zusammenhang zwischen der phagozytischen und der sekretorischen, regenerationsfördernden Kapazität aktivierter Makrophagen. Bezogen auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bedeutet dies, daß ein kausaler Zusammenhang zwischen spontanen endogenen Regenerationsvorgängen und der starken Phagozytoseaktivität der Makrophagen 14 Tage postoperativ sehr wahrscheinlich ist. Umgekehrt ist demnach auch ein Zusammenhang zwischen der stark verminderten Nachweisbarkeit des Phagozytose-assoziierten CR3-Rezeptors und der abortiven axonalen Regeneration anzunehmen. Anders als vorausgehende, lediglich qualitative Untersuchungen, die zwischen 14 und 21 Tagen postoperativ neben dem Verlust der NF-200kD-IR auch einen gleichzeitigen Verlust der NGFr-IR in der Läsion beschrieben (Brook et al. 1998a), zeigt die quantitative Untersuchung, daß die zwischen 14 und 21 Tagen postoperativ stattfindende axonale Retraktion nicht mit einem Verlust NGFr-positiver Zellen einhergeht, was evt. darauf hinweist, daß die regenerationsfördernden Eigenschaften der Schwannzellen durch phagozytäre Zytokine moduliert werden müssen. Änderungen des phagozytären Immunophänotyps bzw. die Degeneration der Makrophagen können evt. den Verlust ihrer regenerationsfördernden Eigenschaften erklären. Der 21 und 28 Tage postoperativ zu beobachtende Verlust der CR3-IR und die IB4-negativen degenerierenden Makrophagen, die eine perforierte Membran besitzen und 28 Tage postoperativ in der Läsion nachweisbar sind, könnten ein Zeichen für die Degeneration bzw. Apoptose der Makrophagen sein. Die diffuse intrazelluläre ED-1-IR könnte ein Hinweis auf die Schädigung lysosomaler Granula und auf die Freisetzung lysosomaler Enzyme sein, welche zur Degeneration der Makrophagen führt und möglicherweise auch auf das umgebende Gewebe toxisch wirkt und somit zu sekundärer Gewebeschädigung führt.

An der Regulation der in Läsionen des ZNS stattfindenden Degeneration bzw. Apoptose von Makrophagen und Mikroglia (Shuman et al. 1997; Yong et al.

1998), die möglicherweise der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase des ZNS dient, ist wahrscheinlich TGF- β 1 beteiligt (Xiao et al. 1997; White et al. 1998; s. Abb. 17). Die Induktion der Apoptose von Entzündungszellen durch von Astrozyten produziertes TGF- β 1 könnte eine Ursache für die eingeschränkte posttraumatische Entzündungsreaktion des ZNS sein. Allerdings steuert auch der CR3-Rezeptor, der außer dem Komplementfaktor iC3b denaturiertes Protein bindet, die Apoptose von Makrophagen, so daß auch autoregulatorische Mechanismen eine Rolle spielen könnten (Reid et al. 1993; s. Abb. 17). Eine weitere mögliche Ursache für die verminderte CR3-IR könnte die Inaktivierung der Makrophagen durch von Astrozyten produzierten Faktoren wie TGF- β 1 oder GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) sein (Hayashi et al. 1993; Suzumura et al. 1993; Liu et al. 1994; Sievers et al. 1995; Hailer et al. 1998; s. Abb. 17). *In vitro* hemmt z.B. der von Astrozyten sezernierte GM-CSF die MHC-II-Expression und Antigen-Expression durch Mikroglia (Hayashi et al. 1993). Die Inaktivierung von Entzündungszellen spielt im verletzten und im normalen ZNS-Gewebe eine Rolle. Hailer und Mitarbeiter (1998) zeigten, daß amöboide Makrophagen, die in Hippocampus-Zellkulturen übertragen werden, dort eine für ramifizierte, ruhende Mikroglia typische Morphologie annehmen und eine verminderte Expression der Aktivierungsmarker LFA-1 und MHC-II aufweisen. Dieser Effekt kann auch durch Cokultivierung der Makrophagen mit Astrozyten oder durch Applikation von TGF- β 1 erzielt werden (Hailer et al. 1998; vgl. Abb. 17).

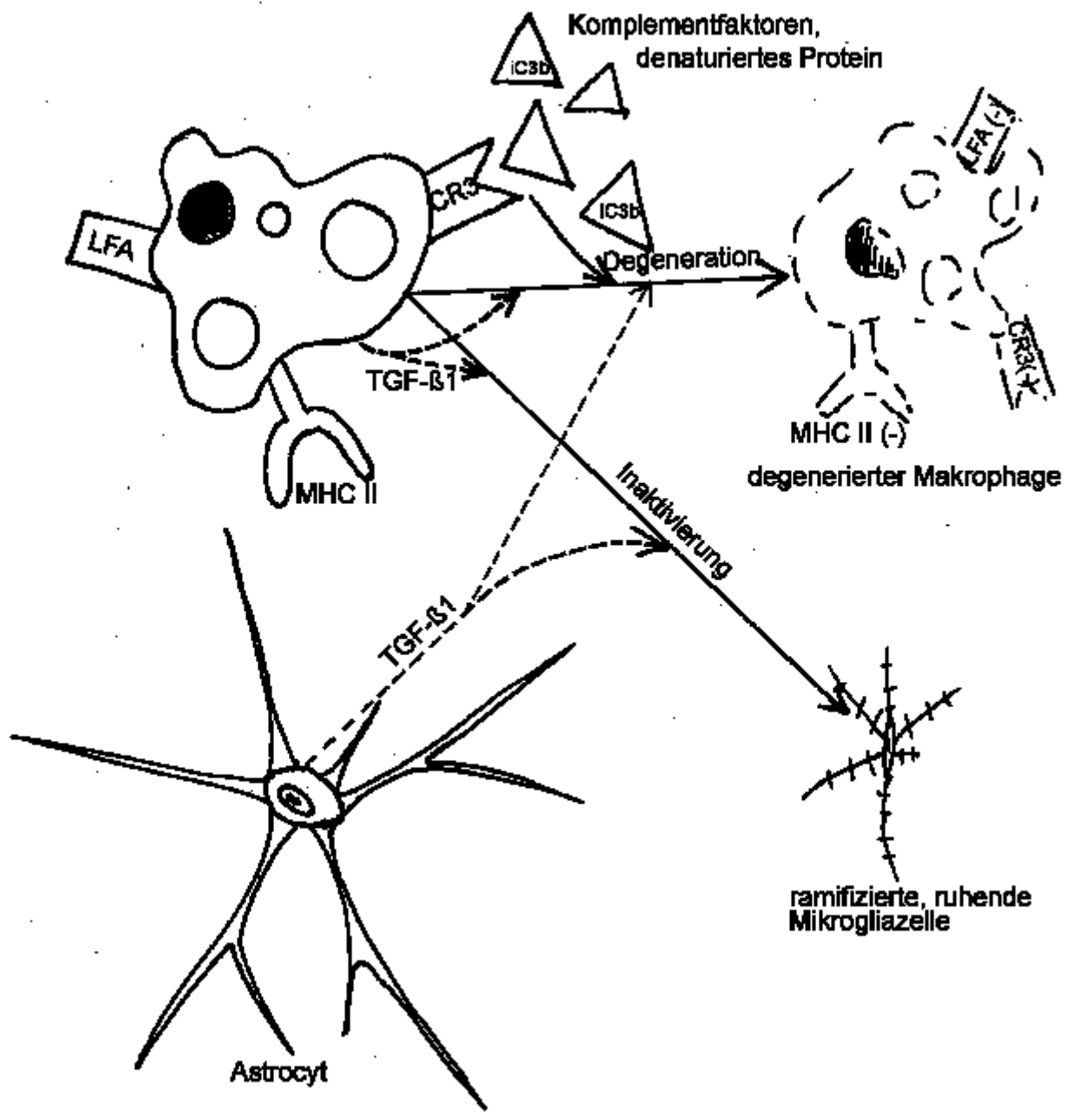


Abb. 17 Stark vereinfachte schematische Darstellung (Zusammenfassung der hier abgehandelten Literatur) einiger zellulärer Interaktionen, die im Rahmen der Immunantwort zur Inaktivierung bzw. Degeneration von Makrophagen führen.

Interessanterweise zeigten sich im hier untersuchten Läsionsmodell vorwiegend LFA-1- und MHC-II-negative Makrophagen im Zentrum der primären Läsion, jedoch LFA-1- und in Sprague-Dawley-Ratten auch MHC-II-positive aktivierte Mikroglia in Randregionen der Läsion, was evt. auf die Anwesenheit deaktivierender Faktoren wie TGF-β1 im Zentrum der Läsion hinweist (s. Abb. 18). Nach Rückenmarkverletzungen wird TGF-β1 sowohl von Astrozyten als auch von Makrophagen sezerniert, erreicht nach 7 Tagen die maximale Konzentration in der Läsion und bleibt noch über einen längeren Zeitraum erhöht (O'Brien et al. 1994; Semple-Rowland et al. 1995; Streit et al. 1998). Ob der Einfluß astrozytärer

Faktoren auch in dem hier untersuchten Läsionsmodell eine entscheidende Rolle in der Deaktivierung der Makrophagen spielt, ist unklar. Aktivierte, GFAP- (glial fibrillary acidic protein) positive Astrozyten fanden sich nicht unmittelbar innerhalb, sondern nur in Randbereichen der Läsion (Brook et al. 1998a; s. Abb. 18). Dies läßt die Inaktivierung der im Zentrum der Läsion vorhandenen Makrophagen durch astrozytäre Faktoren unwahrscheinlich erscheinen, da eine sehr weite Diffusionsstrecke vom Rand bis ins Zentrum der Läsion von den Faktoren zurückgelegt werden müßte. Zudem widerspricht die Beobachtung einer Transformationszone im an das gesunde Gewebe angrenzenden Randbereich der Läsion mit dem Nachweis LFA-1-positiver aktivierter Mikrogliazellen, die in die Läsion einzuwandern scheinen und dort LFA-1-negativ, also möglicherweise deaktiviert werden, der Hypothese, daß astrozytäre Faktoren benachbarte Makrophagen/Mikroglia deaktivieren (vgl. Abb. 17/18). In Randbereichen der Läsion, also im Bereich dieser Transformationszone, befinden sich nämlich zahlreiche Astrozyten, nicht jedoch im Zentrum der Läsion (Brook et al. 1998a). Eventuell spielen autokrine Mechanismen bei der Inaktivierung der Makrophagen eine Rolle, indem die Phagozytoseaktivität durch von Makrophagen sezerniertes TGF- β 1 gesteuert wird (s. Abb. 17). Die komplexen interzellulären Regelmechanismen, welche die posttraumatische Plastizität modulieren, sind weitgehend unklar und erfordern weitere Untersuchungen.

In vitro führt TNF- α zu einer verminderten CR3-IR der Makrophagen, die mit einer reduzierten Phagozytoseaktivität einhergeht (Brück et al. 1992). Untersuchungen, ob TNF- α von Makrophagen während der Phagozytose sezerniert wird, was ebenfalls für eine Autoregulation der phagozytären CR3-Expression spräche, führten zu unterschiedlichen Ergebnissen (Brück et al. 1992; Van der Laan et al. 1996). Eine erhöhte TNF- α -Konzentration kommt allerdings auch durch eine erneute Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke, die einige Tage bis Wochen nach Rückenmarkverletzungen auftritt, zustande (Popovich et al. 1996a; Pan et al. 1999). Abhängig vom Zeitpunkt kann die exogene Applikation von TNF- α nach Rückenmarkverletzungen sowohl zur Aktivierung als auch zur Inhibition von Entzündungszellen führen (Klusman und Schwab 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind posttraumatische Veränderungen der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nicht untersucht worden. Es ist jedoch möglich, daß eine eingeschränkte Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke zum Einstrom von Substanzen wie z.B. Zytokinen aus dem Blut führt, die je nach Distanz von der primären Läsion in unterschiedlicher Konzentration vorliegen könnten und einen weiteren Einflußfaktor auf die komplexe Entzündungsreaktion darstellen. So könnte der reduzierten OX-42-IR auch eine Sättigung des CR3-Rezeptors mit Komplement zugrunde liegen, die im Bereich der Läsion aufgrund der Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke und des posttraumatisch vermehrten Einstroms von Komplementfaktoren aus dem Blut möglicherweise eher erfolgt als in den degenerierenden Faserzügen distal der Läsion (Watanabe et al. 1999). Von Watanabe et al. (1999) wurde diese Möglichkeit, die jedoch auf rein hypothe-

tischen Annahmen beruht, als Begründung für einen wenige Stunden nach Rückenmarkverletzungen beobachteten temporären Verlust der phagozytären OX-42-IR im Bereich der Primärläsion diskutiert. Aufgrund der zeitlichen Dynamik der posttraumatischen Permeabilitätsänderungen der Blut-Hirn-Schranke ist die Sättigung des CR3-Rezeptors mit Complement jedoch auch für den 21 Tage postoperativ nachweisbaren Verlust der CR3-IR in Betracht zu ziehen.

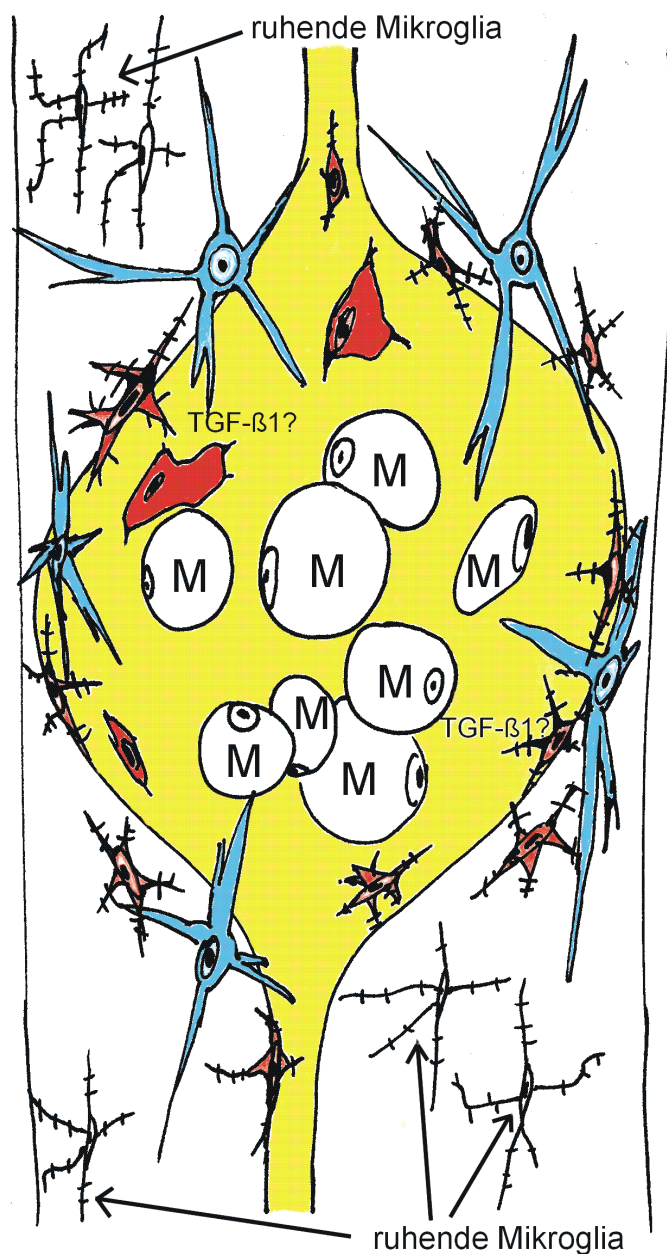


Abb. 18 Schematischer Längsschnitt durch die Läsion und die angrenzende Zyste (Zusammenfassung aus Brook et al. 1998 und eigenen Ergebnissen). Im Randbereich der Läsion und der Zyste (Läsion und Zyste **gelb**) sind aktivierte, LFA-1-positive Mikrogliazellen (**rot**) und GFAP-positive Astrozyten (**blau**) nachweisbar. Innerhalb der Läsion befinden sich LFA-1-negative Makrophagen (**M**), jedoch keine GFAP-positiven Astrozyten. An der Inaktivierung der Makrophagen ist vermutlich TGF- β 1 beteiligt.

7.3. Aktivierung von Entzündungszellen in Regionen Wallerscher Degeneration und der Zyste distal der primären Läsion

Die Kompression des unteren thorakalen Rückenmarks führte zur Bildung einer Zyste im Bereich der Hinterstränge, die sich bis in das zervikale und lumbale Myelon erstreckte. Die Ursachen für die Ausbildung der Zyste sind unklar. Transversalschnitte durch zervikale Rückenmarks-Segmente zeigten zudem einen deutlichen Verlust der NF200 kD-IR im Bereich der Vorder- und Vorderseitenstränge, in denen sich aktivierte Mikroglia, die zu allen untersuchten Überlebenszeiten OX-42-, ED-1-, MHC-I- und sowie IB4- positiv waren, befanden. In diesen Regionen Wallerscher Degeneration fanden sich ebenfalls KSPG-positive Mikrogliazellen, die z.T. verzweigt waren, während sich andere KSPG-positive Mikrogliazellen in einem stärkeren Aktivierungszustand zu befinden schienen und runde Zellkörper sowie kurze, retrahierte Fortsätze besaßen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß für die Ausbildung der Zyste im Bereich der Hinterstränge andere Faktoren neben der Wallerschen Degeneration eine Rolle spielen müssen.

Die im Bereich der zystisch degenerierenden Hinterstränge nachweisbaren aktivierten Mikroglia und Makrophagen wiesen eine intensive OX-42-, ED-1- und MHC-I-IR auf und waren auch mit IB4 deutlich nachweisbar. Interessanterweise stand der erheblichen Verminderung der OX-42 IR im Bereich der Läsion ein weniger starker Verlust der OX-42-Expression im Bereich der sich distal der Läsion ausdehnenden Zyste gegenüber. Auch nach 28 Tagen zeigten die Makrophagen innerhalb der Zyste noch eine leichte OX-42-IR. Demnach bestehen vermutlich Unterschiede im Ablauf der Entzündungsreaktion zwischen der Zyste und der unmittelbaren der Läsion. Auffällig war, daß im Randbereich der Zyste, in der Übergangsregion zum normalen Gewebe, vor allem aktivierte, verzweigte Mikroglia vorhanden waren, während sich innerhalb der Zyste hauptsächlich Makrophagen befanden.

Im Gegensatz zum unmittelbaren Bereich der Läsion, in dem nur eine vereinzelte schwache LFA-1-Expression der Makrophagen stattfand, war in der Zyste distal der Läsion zu allen untersuchten Überlebenszeiten eine deutliche LFA-1-IR nachweisbar. Aktivierte Mikrogliazellen exprimieren das Adhäsionsmolekül LFA, das zelluläre und Zell-Matrix-Interaktionen vermittelt, während der Phagozytose degenerierender Axone (Finsen et al. 1993; Hailer et al. 1997). Im Randbereich der Zyste und im äußersten Randbereich der Primärläsion schien eine Transformationszone zu existieren, in der aus dem benachbarten unverletzten Gewebe in die Zyste einwandernde verzweigte Mikroglia eine für Makrophagen typische Morphologie annahmen, dabei jedoch LFA-1-negativ wurden. Vor allem die randständigen, sich im Übergangsstadium befindenden aktivierten, noch ramifizierten Mikroglia zeigten eine intensive LFA-1-Markierung. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß sich der Aktivierungszustand und die Herkunft der Makrophagen je nach Entfernung vom primären Ort der Verletzung in verschiedenen Regionen des geschädigten Rückenmarks unterscheiden und lassen auch auf vielfältige

Funktionszustände der Makrophagen schließen. Durch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie LFA-1 werden aktivierte Mikroglia möglicherweise in Regionen axonaler Degeneration zurückbehalten, außerdem werden Interaktionen mit anderen immunkompetenten Zellen ermöglicht (Hailer et al. 1996, 1997). Die unterschiedliche Expression von Aktivierungsmarkern wie LFA-1 ist evt. auf Unterschiede in der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen. Das Ausmaß der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke variiert wahrscheinlich abhängig vom Abstand zur primären Läsion. Demnach stammt evt. ein größerer Anteil der Makrophagen, die sich im Zentrum der Läsion befinden, aus dem Blut und weist einen anderen Immunphänotyp auf als Makrophagen in Randbereichen der Läsion oder der Zyste, die eher von Mikroglia abstammen. Auch aus dem Blut in die Läsion einströmende Substanzen wie Zytokine oder Complementfaktoren beeinflussen den Immunphänotyp und die Aktivität der Makrophagen. Der Grad der Kompromittierung der Blut-Hirn-Schranke wirkt sich demnach entscheidend auf das Milieu innerhalb der Läsion aus. Ergebnisse von Fitch und Silver (1997) zeigten beispielsweise, daß die Verletzung der Blut-Hirn-Schranke ein entscheidender Stimulus für die Produktion von Proteoglycanen in Rückenmarksverletzungen ist, deren Ablagerung die axonale Regenerationsfähigkeit beeinflusst.

7.4. Einfluß der KSPG-Expression auf die axonale Regeneration

Neben der Entzündungsreaktion moduliert auch die Synthese extrazellulärer Matrixmoleküle und verschiedener Proteoglycane in ZNS-Läsionen die axonale Regenerationsfähigkeit. Während der neuronalen Entwicklung sind Proteoglycane an der Bildung von Grenzstrukturen beteiligt, welche funktionelle Einheiten umgeben. Während der axonalen Wachstumsphase lenken diese Proteoglycane aussprossende Nervenfasern durch repulsive Eigenschaften; ihre Expression wird reduziert, wenn das synaptische Netzwerk ausgereift ist. Es wurde gezeigt, daß einige dieser vermutlich inhibitorischen Proteoglycane nach Verletzungen das adulten ZNS re-exprimiert werden und durch ihre repulsiven Eigenschaften für die fehlende bzw. mangelhafte axonale Regeneration mitverantwortlich sind (Laywell und Steindler 1991; Schwab und Bartholdi 1996; Feraud-Espinosa et al. 1998). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, daß eine gesteigerte Chondroitin Sulfat Proteoglycan- (CSPG-) Expression nach Kontusionsverletzungen des Rückenmarkes innerhalb und in der Umgebung der Läsion stattfindet, die möglicherweise die axonale Regeneration beeinträchtigt (Davies et al. 1997; Lemons et al. 1999). Es ist bekannt, daß die bleibenden funktionellen Defizite nach Rückenmarkverletzungen teilweise auf regenerationshemmende Moleküle zurückzuführen sind (Review: Bartholdi und Schwab 1996). Neuere Untersuchungen zeigten, daß die regenerationshemmenden Auswirkungen der Oligodendrozyten des adulten ZNS nicht nur auf den Glycoproteinen NI-35/ NI-250 und dem Myelin-assoziierten Glycoprotein (MAG) beruhen, sondern auch auf das von Oligodendrozyten exprimierte CSPG zurückzuführen sind (Niederost et al. 1999). *In vitro*-Experimente zeigten, daß die Hemmung der oligodendrozytären Proteoglycansynthese durch beta-Xyloside die Permeabilität für axonales

Wachstum erhöht (Niederost et al. 1999). Die Bedeutung der KSPG-Expression durch die Läsion infiltrierende Zellen wie Meningozyten (Frisen et al. 1992) oder Mikroglia (Bovolenta et al. 1993) und die Auswirkungen der extrazellulären KSPG-Ablagerung sind unklar. In der vorliegenden Studie wurde daher ein möglicher Zusammenhang zwischen der mangelhaften axonalen Regeneration und der posttraumatischen KSPG-Expression untersucht.

Im unoperierten Rückenmark der Wistar-Ratten, die keine konstitutionelle MHC-II-Expression ruhender Mikroglia zeigten, konnten stark KSPG-positive ramifizierte Mikroglia nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht der Beobachtung von Jander und Stoll (1996b), daß eine speziesspezifische, inverse Korrelation zwischen der MHC-II- und KSPG-Expression ramifizierter Mikroglia besteht. Neben ruhenden Mikroglia im unverletzten Gewebe wiesen auch aktivierte Mikroglia in degenerierenden Faserzügen eine deutliche KSPG-IR auf, während Makrophagen, die die Läsion infiltrierten, zu allen untersuchten Überlebenszeiten KSPG-negativ waren. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse von Jander und Stoll (1996a, b), Bertolotto et al. (1997) und Giordana et al. (1999), die berichten, daß ein Verlust der KSPG-IR zu verzeichnen ist, sobald die Transformation von Mikroglia zu Makrophagen in verschiedenen pathologischen Zuständen des ZNS stattfindet. Die Verminderung der KSPG-IR der Entzündungszellen während inflammatorischer Reaktionen wird möglicherweise durch proinflammatorische Zytokine verursacht, die sowohl die Synthese von Proteoglycanen hemmen als auch den Proteoglycan-Abbau beschleunigen können (Bhatnagar et al. 1986; Saklatvala et al. 1986). *In vitro* hemmt IL-1 die Collagenproduktion dermalen Fibroblasten (Bhatnagar et al. 1986), und der von Makrophagen freigesetzte TNF-alpha (Tumor-Nekrosefaktor) sowie IL-1 stimulieren die Resorption und hemmen die Synthese von Proteoglycanen in Knorpelgewebe (Saklatvala et al. 1986). Der Verlust der KSPG-IR aktivierter Makrophagen weist darauf hin, daß die morphologische Transformation von Mikroglia zu Makrophagen ein komplexer Vorgang ist, der nicht nur die vermehrte Expression einiger Moleküle wie z.B. ED-1 oder MHC-I induziert, sondern auch eine reduzierte Expression bestimmter Oberflächenantigene hervorruft. Inwiefern Änderungen der Antigenexpression immunkompetenter Zellen ihre Auswirkungen auf die axonale Regeneration beeinflussen, ist unklar. Die fehlende KSPG-Expression durch Makrophagen könnte darauf hinweisen, daß Makrophagen nicht die zelluläre Quelle dieses potentiell inhibitorischen Proteoglycans sind, obwohl die Produktion regenerationshemmender Proteoglycane durch Makrophagen diskutiert wird (Fitch und Silver 1997).

Während sich zwischen 7 und 14 Tagen nach der Operation nur sehr wenig KSPG im Zentrum der Läsion befand, zeigte sich schon 7 Tage postoperativ im Neuropil der unmittelbaren Umgebung der Läsion eine deutliche extrazelluläre KSPG-Ablagerung. Zwischen 14 und 21 Tagen konnte ein massiver Anstieg des KSPG-Gehaltes der Läsion verzeichnet werden, wobei sowohl die extrazelluläre Matrix als auch zelluläre Strukturen eine intensive KSPG-IR zeigten. Dies bestätigt die

Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Stichel (Stichel et al. 1999a), die eine gesteigerte KSPG-Expression nach Transsektion des postkommissuralen Fornix der Ratte beobachtete. Während jedoch nach Fornixläsion eine frühe, transiente Steigerung der KSPG-Expression dokumentiert wurde, führt das hier untersuchte Modell spinaler Kompressionsläsionen zu einer verzögerten KSPG-Expression, die noch 28 Tage nach der Verletzung persistiert. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf die verschiedenen Läsionsmodelle zurückzuführen. Nach dorsaler Hemisektion des Myelons adulter Ratten konnte ebenfalls eine vermehrte Anzahl KSPG-positiver Zellen in die Läsion umgebenden Gewebe und in Regionen, die sekundärer Degeneration unterlagen, festgestellt werden (Grill und Tuszynski 1999). Insbesondere der Nachweis zahlreicher KSPG-positiver Zellen im Gebiet des degenerierenden corticospinalen Traktes führt zum Verdacht, daß KSPG als potentiell inhibitorisches Proteoglycan die axonale Regenerationskapazität limitiert (Grill und Tuszynski 1999).

Aus der vorliegenden Untersuchung geht jedoch hervor, daß keine inverse räumliche Korrelation zwischen KSPG-Expression und regenerierenden Axonen besteht. Innerhalb der Läsion fanden sich sowohl KSPG-reiche Regionen, die von Axonen durchquert wurden, als auch KSPG-reiche Gebiete, in denen keine Axone nachweisbar waren. Trotz des Fehlens einer inversen räumlichen Korrelation zwischen KSPG- und NF200 kD-Expression verlief die starke Steigerung der KSPG-Expression zwischen 14 und 21 Tagen postoperativ zeitlich parallel zu einem Verlust der Läsion an Axonen. Die in der vorliegenden Studie durchgeführten Experimente ermöglichen jedoch keine Aussage darüber, ob die Axone, die 21 bzw. 28 Tage nach der Verletzung in KSPG-reichen Regionen der Läsion nachweisbar waren, schon vor der gesteigerten KSPG-Expression eingesproßt waren, oder ob sie auch aktiv in KSPG-haltige Areale einwachsen konnten. Inwiefern ein kausaler Zusammenhang zwischen der gesteigerten KSPG-Expression und der Reduktion der Anzahl der Axone besteht, ist demnach unklar. Da jedoch in der unmittelbaren Umgebung der Läsion eine gesteigerte KSPG-Synthese schon 7 Tage postoperativ zu verzeichnen war und Axone diese Region penetrieren und in die Läsion einwachsen, ist es anzunehmen, daß zumindest einige axonale Populationen den potentiell inhibitorischen Effekt des KSPG tolerieren oder sogar ignorieren können. Wie Ergebnisse von Schnell und Schwab (1993) zeigten, sind adulte corticospinale Axone ebenso wie rubrospinale Axone (Xu und Martin 1990) jedoch nicht zur spontanen, funktionell relevanten Regeneration mit Überbrückung bzw. Durchquerung einer Rückenmarksläsion fähig.

Es ist auffällig, daß während der Phase der gesteigerten KSPG-Expression, 14 bis 21 Tage postoperativ, ein hochsignifikanter Abfall der CR3-IR der Makrophagen innerhalb der Läsion stattfand. Da proinflammatorische Zytokine die zelluläre Proteoglycansynthese hemmen (Bhatnagar et al. 1986; Saklatvala 1986), könnte umgekehrt eine Deaktivierung der Makrophagen durch eine verminderte Zytokinsynthese zu einer gesteigerten Proteoglycansynthese und -ablagerung, z.B. von KSPG, führen. Vermutlich besteht ein bislang jedoch ungeklärter Zusammenhang

zwischen dem Immunphänotyp bzw. dem Aktivierungszustand der Makrophagen und der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Von Stichel et al. (1999a) publizierte Ergebnisse verdeutlichen, daß die pharmakologische Verhinderung der extrazellulären Collagen Typ IV-Ablagerung nach Transsektion des post-kommissuralen Fornix zu einer gesteigerten KSPG-Synthese in der Umgebung der Läsion führt und gleichzeitig die Regeneration durchtrennter Axone fördert. Dies weist darauf hin, daß in diesem Läsionsmodell die Ablagerung von KSPG die axonale Regeneration nicht verhindert, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung übereinstimmt. Die pharmakologische Elimination von Collagen verändert die Zusammensetzung des Narbengewebes möglicherweise insofern, als daß es zu einer für die axonale Regeneration günstigeren Zusammensetzung der extrazellulären Matrix kommt, so daß das Gleichgewicht zwischen inhibitorischen und regenerationsfördernden Molekülen auf eine die Regeneration unterstützende Weise verschoben wird. Von Weidner et al. (1999) publizierte Ergebnisse, welche zeigen, daß die Elimination von Collagen die Regeneration geschädigter corticospinaler Bahnen nicht verbessert, weisen jedoch darauf hin, daß die Komposition der extrazellulären Matrix unterschiedliche Auswirkungen auf verschiedenen axonale Populationen besitzt.

Während KSPG-positive Zellen in der Umgebung geschädigter Fornixfasern die Morphologie von Mikroglia besitzen (Stichel et al. 1999a), fanden sich im hier untersuchten Läsionsmodell längliche, spindelförmige Zellen unbekannter Identität in der Läsion. Da das geschädigte Gewebe von verschiedenen Zellpopulationen, die teilweise aus verletzten spinalen Wurzeln stammen, infiltriert wird, könnte es sich bei einigen der KSPG-positiven Zellen um Schwannzellen, Fibroblasten oder Meningozyten handeln. Obwohl sich in dieser Studie in den unverletzten Meningen keine KSPG-IR zeigte, ergaben *in vitro* Untersuchungen eine starke KSPG-Expression von Meningozyten (Hirsch und Bähr 1999). Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß der Immunphänotyp bzw. der Aktivierungszustand von Meningozyten in Zellkulturen verändert wird (Calingasan et al. 1996). Analog verändert sich möglicherweise der Aktivierungszustand von in die Läsion migrierenden Meningozyten, so daß diese KSPG-positiv werden. Zukünftige Untersuchungen sind nötig, um zu klären, ob die KSPG-Expression vom Aktivierungszustand der Zellen abhängig ist. Da dies jedoch nachgewiesenermaßen bei Mikroglia/Makrophagen der Fall ist, könnte es auch bei Meningozyten eine Rolle spielen. Interessanterweise steigt neben der KSPG-Expression auch die NGFr-IR in der Läsion zwischen 14 und 21 Tagen postoperativ stark an. Es ist nicht auszuschließen, daß ein Teil der Zellen, die die Läsion zu diesem Zeitpunkt infiltrieren, sowohl KSPG- als auch NGFr-positiv sind. Eine gesteigerte zelluläre KSPG- und NGFr-IR kann sowohl durch eine vermehrte Migration von Zellen in die Läsion als auch durch eine *de novo*-Expression dieser Antigene zustande kommen. Um die Frage der Co-Expression sowie der Identität und Herkunft dieser Zellen zu klären, sind u.a. Doppelimmunofluoreszenzfärbungen erforderlich. Es ist ebenfalls nicht auszuschließen, daß sich die Art der die Läsion

infiltrierenden Zellen nach unterschiedlichen postoperativen Überlebenszeiten ändert. Möglicherweise herrscht nach den längeren Überlebenszeiten eine Zellpopulation in der Läsion vor, die weniger günstige Einflüsse auf die Regeneration ausübt. Dies würde erklären, warum 21 Tage postoperativ der Gehalt an NGFr-positiven Zellen im Vergleich zur 14-tägigen Überlebenszeit nicht abgenommen hat, die Anzahl NF200 kD-positiver Axone jedoch drastisch reduziert war. Im hier untersuchten Läsionsmodell war eine exakte Spezifizierung der die Läsion infiltrierenden spindelförmigen Zellen bisher nicht möglich. Es ist bekannt, daß neben Schwannzellen u.a. spindelförmige Fibroblasten –ähnliche Zellen Rückenmarksläsionen infiltrieren (Pasterkamp et al. 1999). Diese Zellen exprimieren das Chemorepellent Semaphorin III und tragen damit evt. zur inhibitorischen Wirkung des Narbengewebes bei (Pasterkamp et al. 1999). Welche Rolle dieser Mechanismus im hier untersuchten Läsionsmodell spielt, wurde bisher nicht geklärt. Der Einfluß der Läsion infiltrierender Meningozyten ist ebenfalls unklar. Obwohl KSPG-positive Meningozyten *in vitro* die axonale Adhäsion hemmen sollen (Hirsch und Bähr 1999), während KSPG-positive Astrozyten keinen negativen Effekt auf die axonale Elongation zu besitzen scheinen (Powell und Geller 1999), üben Meningozyten möglicherweise regenerationsfördernde Einflüsse in Myelonsläsionen aus. Frisen et al. (1992) zeigten, daß in Rückenmarksläsionen adulter Ratten einwandernde Meningozyten Neurotrophin-Rezeptoren exprimieren und sich in enger Nachbarschaft zu regenerierenden Axonen befinden. Dies stützt die Hypothese, daß die Auswirkungen KSPG- und andere Proteoglycane exprimierender Strukturen auf die axonale Regeneration u.a. von der Co-Expression weiterer Moleküle, z.B. NGFr, und der Zusammensetzung der umgebenden Matrix abhängen. Diese Theorie unterstützen auch *in vitro* Experimente, die ergaben, daß KSPG und CSPG das axonale Wachstum auf Laminin-haltigen Oberflächen hemmen, während sie nur sehr schwach inhibitorisch bzw. sogar leicht wachstumsfördernd auf L1-bedeckten Oberflächen wirken (Dou and Levine 1995; Gieling et al. 1998). Da die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix während der neuronalen Entwicklung anders ist als im verletzten adulten ZNS, üben die einzelnen Komponenten während Entwicklung bzw. Regeneration evt. unterschiedliche Einflüsse auf die axonale Elongationsfähigkeit aus. Möglicherweise wird auch die Sensibilität regenerierender Axone gegenüber inhibitorischen Faktoren durch die Komposition der umgebenden Matrix beeinflusst. Da proinflammatorische Zytokine sowohl die Synthese von Proteoglycanen hemmen als auch den Proteoglycan-Abbau beschleunigen können (Saklatvala et al. 1986), führt die im ZNS supprimiert verlaufende post-traumatische Entzündungsreaktion möglicherweise zu einer vermehrten Akkumulation potentiell inhibitorischer Proteoglycane. Neben der im ZNS abgeschwächt verlaufenden Entzündungsreaktion scheint das Gleichgewicht zwischen regenerationshemmenden und –fördernden Matrix-Molekülen im Bereich einer ZNS-Läsion die axonale Regenerationskapazität entscheidend zu beeinflussen.

7.5. Bedeutung der speziesspezifischen MHC-II-Expression und der Autoimmunreaktivität nach Rückenmarkverletzungen

In den letzten Jahren wurde den durch Rückenmarkverletzungen induzierten Autoimmunreaktionen gegen neurale Antigene eine verstärkte Bedeutung beigemessen (Popovich et al. 1998; Schwartz et al. 1999b). Durch die Verletzung der Blut-Hirn-Schranke werden ZNS-Antigene demaskiert und von Lymphozyten der peripheren Blutbahn als Fremdanigene erkannt (Popovich et al. 1998). MHC-II-exprimierende Mikroglia steuern als Antigen-präsentierende Zellen die T-Zell-Antwort und Autoimmunreaktionen nach Rückenmarkverletzungen (De Simone et al. 1995; Popovich et al. 1996b; Popovich et al. 1998). Außerdem stimulieren Liganden des MHC-II-Oberflächenantigens die Transkription einiger Zytokine kodierender Gene. (Trede et al. 1991). Unterschiede in der Intensität der MHC-II-Expression beeinflussen daher möglicherweise das Ausmaß der sekundären Gewebeschädigung und die Regenerationskapazität nach Rückenmarkverletzungen. Die genaue Rolle der durch Rückenmarkverletzungen induzierten Autoaktivität gegen neurale Antigene ist noch unklar, es werden jedoch sowohl zu sekundären Gewebeschäden führende als auch gewebsschützende Konsequenzen diskutiert. So soll die durch die MHC-II-Expression initiierte Autoreaktivität im Stadium chronischer Rückenmarkverletzungen u.a. der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegen neuronale Antigene dienen (Popovich et al. 1996b). Mehr als über die posttraumatisch induzierte Autoreaktivität ist über Autoimmunreaktionen im Rahmen der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) bekannt. Neben MHC-II-Molekülen, die u.a. CD4-positiven T-Helferzellen Antigene präsentieren, sind weitere Moleküle wie LFA-1 und ICAM (intercellular adhesion molecule) an der Vermittlung von Autoimmunreaktionen beteiligt. LFA-1 und sein Ligand ICAM-1 gelten als kostimulatorische Faktoren für die Induktion der T-Zell-Antwort bei der EAE (De Simone et al. 1995). MHC-II-Moleküle scheinen dagegen die T-Zell-Antwort zu hemmen, da Ratten, deren Mikroglia eine konstitutiv intensive MHC-II-Expression aufweisen, häufig EAE-resistent sind und umgekehrt. Ausnahmen, d.h. EAE-resistente Ratten, deren Mikroglia konstitutiv MHC-II-negativ sind, lassen darauf schließen, daß neben MHC-II andere kostimulatorische Moleküle, z.B. LFA oder B7, einen entscheidenden Beitrag zur Steuerung der T-Zell-Antwort leisten (De Simone et al. 1995).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß fast alle Makrophagen im Zentrum der Läsion LFA-1-negativ waren, aktivierte Mikroglia bzw. Makrophagen im Randbereich der Läsion und der zystisch degenerierenden Hinterstränge jedoch eine starke LFA-1-IR aufwiesen. Je nach Entfernung vom primären Schädigungsort bestehen demnach Unterschiede im Aktivierungszustand der Makrophagen, deren Bedeutung für das Überwiegen regenerationsfördernder oder -hemmender Effekte noch unklar ist (Popovich et al. 1997). Die unterschiedliche Expression der T-Zell-Antwort stimulierender Antigene wie LFA-1 in verschiedenen Bereichen des verletzten Rückenmarkes weist darauf hin, daß die diversen Ursachen der neuronalen bzw. axonalen Schädigung wie direktes Trauma oder sekundäre Degeneration die

Immunantwort auf vielfältige, z.T. sogar gegensätzliche Weise beeinflussen. Die fehlende Expression des die T-Zell-Antwort stimulierenden LFA-1 im unmittelbaren Bereich der Läsion und die starke LFA-1-IR im Bereich der degenerierenden Hinterstränge könnten ein Hinweis darauf sein, daß nicht nur die posttraumatische Autoreaktivität zu sekundärer Gewebeschädigung führt, sondern auch umgekehrt potentiell schädigende Autoimmunreaktionen erst durch eine fortschreitende sekundäre Gewebeschädigung, wie z.B. die progrediente Zystenbildung, initiiert werden.

Die semiquantitativ vergleichende Untersuchung der posttraumatischen MHC-II-Expression zwischen operierten Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten zeigte eine starke Ähnlichkeit bezüglich der Morphologie und Verteilung der MHC-II-positiven Zellen, die zumeist deutlich kleiner als Makrophagen waren, sich häufig in der Nähe von Gefäßen befanden und Lymphozyten oder perivaskulären Zellen ähnelten (Popovich et al. 1993). Dies könnte auf die Anwesenheit verschiedener Populationen von Entzündungszellen hinweisen, wobei MHC-II-positive Zellen evt. aus dem Blut stammen. Zwischen den beiden Spezies bestanden deutliche Unterschiede hinsichtlich der Intensität der MHC-II-Expression, da Sprague-Dawley-Ratten eine erheblich intensivere MHC-II-Expression aufwiesen als Wistar-Ratten. Es bestanden ebenfalls Unterschiede hinsichtlich des Zeitverlaufs, da in Sprague-Dawley-Ratten ein rascherer Anstieg und eine frühere Herunterregulation der posttraumatischen MHC-II-Expression zu verzeichnen waren. Während sich in der Läsion der operierten Sprague-Dawley-Ratten 21 Tage postoperativ, zum Zeitpunkt der stärksten posttraumatischen MHC-II-Expression, neben zahlreichen Lymphozyten-ähnlichen Zellen auch MHC-II-positive Makrophagen befanden, enthielt die Läsion der Wistar-Ratten nur wenig mehr MHC-II-positive Zellen als nach kürzeren Überlebenszeiten, jedoch keine MHC-II-positiven Makrophagen. In degenerierenden Faserzügen und der Zyste distal der Läsion wiesen in Wistar-Ratten nur vereinzelte, meist perivaskuläre Zellen eine MHC-II-Immunoreaktivität auf. Sprague-Dawley-Ratten hingegen zeigten eine deutliche MHC-II-Expression aktivierter Mikroglia im Bereich der degenerierenden Hinterstränge und der Vorder- und Seitenstränge. Auffallend war, daß aktivierte Mikrogliazellen am Rand der Zyste stark MHC-II-positiv waren, während sich MHC-II-negative Makrophagen innerhalb der Zyste befanden, was der Lokalisation LFA-1-positiver Zellen ähnelte. Durch die Expression der die T-Zell-Antwort stimulierenden Moleküle LFA-1 und MHC-II spielen aktivierte Mikrogliazellen in dieser Transformationszone vermutlich eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Antigenpräsentation und der Induktion der Autoreaktivität.

Der auffällige Unterschied in der Intensität der MHC-II-Expression zwischen Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten weist darauf hin, daß der Immunphänotyp sowie der Funktionsstatus der Mikroglia und Makrophagen z.T. genetisch determiniert sind. Die Induktion der MHC-II-Expression durch Wallersche Degeneration, die speziesspezifische Akkumulation MHC-II-positiver Mikroglia in Regionen maximaler Degeneration im Zentrum der Läsion sowie die Herunter-

regulation der MHC-II-Expression im Stadium chronischer Rückenmarksverletzungen wurden schon früher beschrieben (Popovich et al. 1993). Deutliche speziesspezifische Unterschiede der posttraumatischen MHC-II-Expression von Entzündungszellen nach Kontusionsverletzungen des Rückenmarks adulter Ratten wurden ebenfalls von Popovich et al. (1997) beobachtet. Diese Untersuchungen ergaben, daß Sprague-Dawley-Ratten eine wesentlich intensivere posttraumatische MHC-II-Expression aufweisen als Lewis-Ratten; übereinstimmend damit zeigte die vorliegende Untersuchung gleichfalls eine deutlich intensivere MHC-II-IR der Sprague-Dawley- als der Wistar-Ratten. Die Regulation der MHC-II Expression ist komplex und unterliegt verschiedenen Einflußgrößen. Beispielsweise werden die MHC-II-Expression und die Antigenpräsentation durch Makrophagen durch den von Astrozyten produzierte GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) und durch TGF- β 1 gehemmt (Loughlin et al. 1993; Hayashi et al. 1997); Astrozyten gelten als wichtige Kandidaten für die Beeinflussung der Differenzierung und Aktivierung von Mikroglia. Unterschiede in der astrozytären Produktion proinflammatorischer Zytokine zwischen EAE-susceptiblen und –resistenten Rattenspezies, die sich durch die Intensität ihrer MHC-II-Expression unterscheiden, sind bekannt (Chung et al. 1991). Die Steuerung der MHC-II-Expression unterliegt also u.a. genetisch determinierten astrozytären Einflüssen. Demnach scheint die Induktion der MHC-II-Expression durch Wallersche Degeneration und innerhalb der Läsion u.a. von genetischen Determinanten, denen die Reaktivität des Immunsystems unterliegt, abhängig zu sein. Beispielsweise gibt es Anhaltspunkte dafür, daß die speziesspezifische MHC-II- und Keratan-Sulfat-Proteoglycan (KSPG)- Expression mit der EAE-Suszeptibilität korreliert sind. Rattenspezies, die eine starke konstitutive MHC-II- und eine geringe KSPG-Expression aufweisen, sind häufig resistent gegenüber EAE, während Rattenspezies mit geringer MHC-II-Expression oft EAE-suszeptibel sind (Jander und Stoll 1996b). Der u.a. genetisch determinierte Aktivierungszustand der Mikroglia und die daraus resultierende Triggerung der Autoreaktivität entscheiden möglicherweise mit darüber, wie stark das ZNS durch pathologische Einwirkungen bzw. Zustände geschädigt wird. Zur Klärung der prognostischen Bedeutung genetisch determinierter Unterschiede des Immunphänotyps der Mikroglia /Makrophagen für die Regeneration nach traumatischen Rückenmarksschädigungen wären jedoch z.B. vergleichende Tierverhaltensstudien notwendig.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die komplexe posttraumatische Entzündungsreaktion innerhalb des ZNS gegensätzliche Auswirkungen auf die Regeneration hat. Spontane endogene Regenerationsvorgänge laufen nach Myelonverletzungen wider Erwarten erstaunlich organisiert und in bemerkenswertem Ausmaß ab. Diese gehen u.a. mit der Infiltration der Läsion durch Makrophagen, NGFr-positive Zellen und mit dem Einsprossen von Axonen einher. Dieser Phase überraschend intensiver Regenerationsvorgänge folgt jedoch eine massive Reduktion der axonalen Elongation, wobei jedoch keine inverse räumliche Korrelation zwischen NF200 kD-positiven Axonen und dem posttraumatisch ver-

mehrt exprimierten Proteoglycan KSPG festzustellen war. Die quantitative Analyse bestätigte eine eindeutige zeitliche Korrelation zwischen Regenerationsvorgängen und dem Aktivierungszustand der Makrophagen. Zum Zeitpunkt der intensivsten axonalen Regenerationsvorgänge war die Expression des Phagozytose-assoziierten Antigens CR3 und somit wahrscheinlich auch die Makrophagenaktivität am größten, während die darauffolgende axonale Retraktion mit einem erheblichen Verlust der phagozytären CR3-IR, also vermutlich einer phagozytären Deaktivierung, einherging. Die detaillierte Charakterisierung des Immunphänotyps posttraumatisch aktivierter Makrophagen kann als Vergleichsbasis für zukünftige experimentelle Therapieansätze dienen, z.B. könnte die Identifikation regenerationsfördernder Makrophagenpopulationen deren gezielte pharmakologische Manipulation und damit eine wenig- bzw. nicht-invasive therapeutische Möglichkeit zur Behandlung von Rückenmarkverletzung eröffnen.

8. Literaturverzeichnis

Aguayo AJ. Capacity for renewed axonal growth in the mammalian central nervous system. In: Central Nervous System Plasticity and Repair. Bignami A, Bloom FE, Bolis CL, Adeloye A (eds). New York, Raven Press, 1985; 31-40.

Arber S, Caroni P. Thrombospondin-4, an extracellular matrix protein expressed in the developing and adult central nervous system promotes neurite outgrowth. *J Cell Biol* 1995; 131: 1083-1094.

Aubert I, Ridet JL, Gage FH. Regeneration in the adult mammalian CNS: guided by development. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 625-635.

Avellino AM, Hart D, Dailey AT, MacKinnon M, Ellegala D, Kliot M. Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during Wallerian degeneration of axons. *Exp Neurol* 1995; 136(2): 183-198.

Azbill RD, Mu X, Bruce-Keller AJ, Mattson MP, Springer JE. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res* 1997; 765: 283-290.

Bähr M, Bonhoeffer F. Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 1994; 17(11): 473-479.

Banati-RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993; 7(1): 111-118.

Barrett CP, Guth L, Donati EJ, Krikorian JG. Astroglial reaction in the gray matter of lumbar segments after midthoracic transection of the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 1981; 73: 365-377.

Bartholdi D, Schwab ME. Expression of proinflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: An in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 1422-1438.

Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 1999; 19(5): 1708-1716.

Beattie MS, Bresnahan JC, Komon J, Tovar CA, Van Meter M, Anderson DK, Faden AI, Hsu CY, Noble LJ, Salzman S, Young W. Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp Neurol* 1997; 148(2): 453-463.

Bertoletto A, Agresti C, Castello A, Manzardo E, Riccio A. 5D4 keratan sulfate epitope identifies a subset of ramified microglia in normal central nervous system parenchyma. *J Neuroimmunol* 1998; 85: 69-77.

Bertoletto A, Caterson B, Canavese G, Migheli A, Schiffer D. Monoclonal antibodies to keratan sulfate immunolocalize ramified microglia in paraffin and cryostat sections of rat brain. *J Histochem Cytochem* 1993; 41(4): 481-487.

Bertoletto A, Manzardo E, Iudicello M, Guglielmone R, Riccio A. Keratan sulphate is a marker of differentiation of ramified microglia. *Brain Res Dev Brain Res* 1995; 86(1-2): 233-241.

Bhatnagar R, Penfornis H, Mauviel A, Loyau G, Saklatvala J, Pujol JP. Interleukin-1 inhibits the synthesis of collagen by fibroblasts. *Biochem Int.* 1986, 13(4): 709-720.

Blesch A, Uy HS, Grill RJ, Cheng JG, Patterson PH, Tuszynski MH. Leukemia inhibitory factor augments neurotrophin expression and corticospinal axon growth after adult CNS injury. *J Neurosci* 1999; 19(9): 3556-3566.

Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. Neurite outgrowth inhibitors associated with glial cells and glial cell lines. *Neuroreport* 1993; 5(3): 345-348.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings MG, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. Administration of Methylprednisolone for 24 or 48 hours or Tirilazad Mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. *JAMA* 1997; 277(20): 1597-1604.

Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 1994; 378: 498-501.

Brook GA, Plate D, Franzen R, Martin D, Moonen G, Schoenen J, Schmitt AB, Noth J, Nacimientto W. Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat. *J Neurosci Res* 1998a; 53(1): 51-56.

Brook GA, Spitzer Ch, Nacimientto W, Woodhams PL and Noth J. A novel early component of the cell body response in axotomized Clarke`s nucleus neurons revealed by monoclonal antibody Py. *Exp Neurol* 1998b; 149: 64-72.

- Broude E, McAtee M, Kelley MS, Bregman BS. c-Jun expression in adult rat dorsal ganglion neurons: differential response after central or peripheral axotomy. *Exp Neurol* 1997; 148(1): 367-377.
- Brown MC, Lunn ER, Perry VH. Consequences of slow Wallerian degeneration for regenerating motor and sensory axons. *J Neurobiol* 1992; 23(5): 521-536.
- Brück W, Brück Y, Friede RL. TNF- α suppresses CR3-mediated myelin removal by macrophages. *J Neuroimmunol* 1992; 38: 9-18.
- Brück W, Friede RL. Anti-macrophage CR3 antibody blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *Acta Neuropathol Berl* 1990; 80(4): 415-418.
- Bunge MB, Holets VR, Bates ML, Clarke TS, Watson BD. Characterization of photochemically induced spinal cord injury in the rat by light and electron microscopy. *Exp Neurol* 1994; 127: 76-93.
- Bunge RP, Puckett WR, Hiester ED. Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with particular emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Adv Neurol* 1997, 72: 305-315.
- Bunge RP. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 1993; 3: 805-809.
- Calingasan NY, Bernstein JJ, Blass JP. Absence of neuronal and glial proteins in human and rat leptomeninges in situ. *J Neurol Sci* 1996; 144(1-2): 21-23.
- Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 1998; 151: 77-88.
- Caroni P, Schwab ME. Codistribution of neurite growth inhibitors and oligodendrocytes in rat CNS: appearance follows nerve fiber growth and precedes myelination. *Dev Biol* 1989; 136(2): 287-295.
- Chamak B, Morandi V, Mallat, M. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J Neurosci Res* 1994; 438: 221-233.
- Chen DF, Jhaveri S, Schneider GE. Intrinsic changes in developing retinal neurons result in regenerative failure of their axons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7287-7291.

Chen DF, Schneider GE, Martinou JC, Tonegawa S. Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature* 1997; 385: 434-439.

Chung IY, Norris JG, Benviste EN. Differential tumor necrosis factor expression by astrocytes from experimental allergic encephalomyelitis-susceptible and -resistant strains. *J Exp Med* 1991; 173: 801-811.

Cole GJ, McCabe CF. Identification of a developmentally regulated keratan sulfate proteoglycan that inhibits cell adhesion and neurite outgrowth. *Neuron* 1991; 7(6): 1007-1018.

Damoiseaux JG, Dopp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD. Rat lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 1994; 83(1): 140-147.

David S, Bouchard C, Tsatas O, Giftochristos N. Macrophages can modify the nonpermissive nature of the adult mammalian central nervous system. *Neuron* 1990; 5(4): 463-469.

Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 1997 18-25; 390: 680-683.

Debus E, Weber K, Osborn M. Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides. *Differentiation* 1982; 25(2): 193-203.

De Simone R, Giampaolo A, Giometto B, Gallo P, Levi G, Peschle C, Aloisi F. The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54(2): 175-187.

Dijkstra CD, Dopp EA, Van den Berg TK, Damoiseaux JG. Monoclonal antibodies against rat macrophages. *J Immunol Methods* 1994; 174(1-2): 21-23.

Doetsch F, Caillé I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999, 97: 703-716.

Dou CL, Levine JM. Differential effects of glycosaminoglycans on neurite growth on laminin and L1 substrates. *J Neurosci* 1995; 15(12): 8053-8066.

Dusart I, Schwab-ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1993; 6: 712-724.

- Dyer JK, Bourque JA, Steeves JD. Regeneration of brainstem-spinal axons after lesion and immunological disruption of myelin in adult rat. *Exp Neurol* 1998; 154(1): 12-22.
- Faissner A. The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res* 1997; 290(2): 331-341.
- Faissner A, Kruse J. J1/ tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron* 1990; 5: 627-637.
- Fehlings MG, Tator CH. A review of models of acute experimental spinal cord injury. In: *Spinal Cord Dysfunction: Assessment*. Illis LS (ed). Oxford University Press 1988; 3-33.
- Fernaund-Espinosa I, Nieto-Sampedro M, Bovolenta P. A neurite outgrowth-inhibitory proteoglycan expressed during development is similar to that isolated from adult brain after isomorphic injury. *J Neurobiol* 1998; 36(1): 16-29.
- Finsen BR, Tonder N, Xavier GF, Sorensen JC, Zimmer J. Induction of microglial immunomolecules by anterogradely degenerating mossy fibres in the rat hippocampal formation. *J Chem Neuroanatomy* 1993; 6: 267-275.
- Fitch MT, Silver J. Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Exp Neurol* 1997; 148(2): 587-603.
- Franzen R, Schoenen J, Leprince P, Joosten E, Moonen G, Martin D. Effects of macrophage transplantation in the injured adult rat spinal cord: a combined immunocytochemical and biochemical study. *J Neurosci Res* 1998; 51(3): 316-327.
- Frisen J, Haegerstrand A, Fried K, Piehl F, Cullheim S, Risling M. Adhesive/repulsive properties in the injured spinal cord: relation to myelin phagocytosis by invading macrophages. *Exp Neurol* 1994; 129(2): 183-193.
- Frisen J, Haegerstrand A, Risling M, Fried K, Johansson CB, Hammarberg H, Elde R, Hokfelt T, Cullheim S. Spinal axons in central nervous system scar tissue are closely related to laminin-immunoreactive astrocytes. *Neuroscience* 1995; 65(1): 293-304.
- Frisen J, Verge VM, Cullheim S, Persson H, Fried K, Middlemas DS, Hunter T, Hokfelt T, Risling M. Increased levels of trkB mRNA and trkB protein-like immunoreactivity in the injured rat and cat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11282-11286.

- George R, Griffin JW. Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radicotomy model. *Exp Neurol* 1994; 129(2): 225-236.
- Gieling RG, Brook GA, Joosten EAJ, Houweling DA, Bär PR, Noth J, Nacimient W. Adhesion molecule L1 is associated with spontaneous axonal sprouting in the injured rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1998, 10 Suppl 10: 58-58.
- Giménez y Ribotta M, Rajaofetra N, Morin-Richaud C, Alonso G, Bochelen D, Sandillon F, Legrand A, Mersel M, Privat A. Oxysterol (7 β - Hydroxycholesteryl-3-Oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reaction. *J Neurosci Res* 1995; 41: 79-95.
- Giordana MT, Attanasio A, Cavalla P, Migheli A, Vigliani MC, Schiffer D (1994): Reactive cell proliferation and microglia following injury to the rat brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20, 163-174.
- Giulian D, Baker TJ, Shih LN, Lachman LB. Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med* 1986; 164: 594-604.
- Giulian D, Vaca K, Corpuz M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J Neurosci* 1993; 13(1): 29-37.
- Giulian D. Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* 1987; 18(1): 155-171.
- Goshgarian HG, Xu XJ, Rafols JA. Neuronal and glial changes in the rat phrenic nucleus occuring within hours after spinal cord injury. *J Comp Neurol* 1989; 284(4): 519-533.
- Grill RJ, Tuszynski MH. Temporal and spatial expression patterns of keratan sulphate proteoglycan, a putative inhibitory molecule, following injury to the adult rat spinal cord. Abstract from the Society for Neuroscience, Miami Florida, 29th annual meeting, Oct 23-28, 1999.
- Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, Franko-Bourland R, Salgado H, Ibarra A, Oliva E, Zepeda A. Development of post-traumatic cysts in the spinal cord of rats-subjected to severe spinal cord contusion. *Surg-Neurol* 1994; 41(3): 241-249.
- Guth L, Barrett CP, Donati EJ, Anderson FD, Smith MV, Lifson M. Essentiality of a specific cellular terrain for growth of axons into a spinal cord lesion. *Exp Neurol* 1985; 88(1): 1-12.

Guth L, Zhang Z, DiProspero NA, Joubin K, Fitch MT. Spinal cord injury in the rat: treatment with bacterial lipopolysaccharide and indomethacin enhances cellular repair and locomotor function. *Exp Neurol* 1994; 126: 76-87.

Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S, Nitsch R. Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus* 1997; 7(3): 341-349.

Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R. Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol* 1998; 8(3): 459-474.

Hailer NP, Jarhult JD, Nitsch R. Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 1996; 18(4): 319-331.

Hall SM. Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989; 15(6): 513-529.

Hart MN, Fabry Z. CNS antigen presentation. *TINS* 1995; 18(11): 475-481.

Hayashi M, Dorf ME, Abromson-Leeman S. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor inhibits class II major histocompatibility complex expression and antigen presentation by microglia. *J Neuroimmunol* 1993; 48: 23-32.

Hirsch S, Bähr M. Immunocytochemical characterization of reactive optic nerve astrocytes and meningeal cells. *Glia* 1999; 26(1): 36-46.

Hirschberg DL, Schwartz M. Macrophage recruitment to acutely injured central nervous system is inhibited by a resident factor: a basis for an immune-brain barrier. *J Neuroimmunol* 1995; 61(1): 89-96.

Hirschberg DL, Yoles E, Belkin M, Schwartz M. Inflammation after axonal injury has conflicting consequences for recovery of function: rescue of spared axons is impaired but regeneration is supported. *J Neuroimmunol* 1994; 50(1): 9-16.

Hökfelt T, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z. Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci* 1994; 17(1): 22-30.

Huber LJ, Chao MV. Mesenchymal and neuronal cell expression of the p75 neurotrophin receptor gene occur by different mechanisms. *Dev Biol* 1995; 167(1): 227-238.

Imperato-Kalmar EL, McKinney RA, Schnell L, Rubin BP, Schwab ME. Local changes in vascular architecture following partial spinal cord lesion in the rat. *Exp Neurol* 1997; 145: 322-328.

Jaeger CB, Blight AR. Spinal cord compression injury in guinea pigs: structural changes of endothelium and its perivascular cell associations after blood-brain barrier breakdown and repair. *Exp Neurol* 1997; 144(2): 381-399.

Jander S, Stoll G. Downregulation of microglial keratan sulfate proteoglycans coincident with lymphomonocytic infiltration of the rat central nervous system. *Am J Pathology* 1996a; 148(1): 71-78.

Jander S, Stoll G. Strain-specific expression of microglial keratan sulfate proteoglycans in the normal rat central nervous system: inverse correlation with constitutive expression of major histocompatibility complex class II antigens. *Glia* 1996b; 18(3): 255-260.

Jenkins R, Tetzlaff W, Hunt SP. Differential expression of immediate early genes in rubrospinal neurons following axotomy in rat. *Eur J Neurosci* 1993; 5(3): 203-209.

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96: 25-34.

Kakulas BA, Taylor JR. Pathology of injuries in the vertebral column and spinal cord. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Vinken PJ, Bruyn BW, Klawns HL, Frankel HL (eds). Elsevier Science Publishers 1992; 21-51.

Kakulas BA. Pathology of spinal injuries. *Central Nervous System Trauma* 1984; 1: 117-129.

Kakulas BA. The applied neuropathology of human spinal cord injury. *Spinal Cord* 1999; 37: 79-88.

Kapfhammer JP, Schwab ME. Inverse patterns of myelination and GAP-43 expression in the adult CNS: neurite growth inhibitors as regulators of neuronal plasticity. *J Comp Neurol* 1994; 340: 194-206.

Keirstead SA, Rasminsky M, Fukuda Y, Carter DA, Aguayo AJ, Vidal-Sanz M. Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. *Science* 1989; 246: 255-257.

Kiefer R, Streit WJ, Tokya KV, Kreutzberg GW, Hartung HP. Transforming growth factor-beta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system. *Int J Dev Neurosci* 1995; 13(3-4): 331-339.

Kitchener PD, Wilson P, Snow PJ. Selective labelling of primary sensory afferent terminals in lamina II of the dorsal horn by injection of *Bandeiraea simplicifolia* isolectin IB4 into peripheral nerves. *Neuroscience* 1993; 54(2): 245-251.

Klusman I, Schwab ME. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res* 1997; 762(1-2): 173-184.

Koshinaga M, Whittemore SR. The temporal and spatial activation of microglia in fiber tracts undergoing anterograde and retrograde degeneration following spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1995; 12: 209-222.

Kreutzberg GW. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS: *Trends Neurosci* 1996; 19: 312-318.

Laywell ED, Steindler DA. Boundaries and wounds, glia and glycoconjugates. Cellular and molecular analyses of developmental partitions and adult brain lesions. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 633: 122-141.

Lazarov-Spiegler O, Rapalino O, Agranov G, Schwartz M. Restricted inflammatory reaction in the CNS: a key impediment to axonal regeneration? *Mol Med Today* 1998a; 4(8): 337-342.

Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Schwartz M. Peripheral nerve-stimulated macrophages simulate a peripheral nerve-like regenerative response in rat transected optic nerve. *Glia* 1998b; 23(3): 329-337.

Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Brann AB, Hirschberg DL, Lavie V, Schwartz M. Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB-J.* 1996; 10(11): 1296-1302.

Lemons ML, Howland DR, Anderson DK. Chondroitin sulfate immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation. *Exp Neurol* 1999; 160: 51-65.

Levey AI, Bolam JP, Rye DB, Hallanger AE, Demuth RM, Mesulam MM, Wainer BH. A light and electron microscopic procedure for sequential double and antigen localization using diaminobenzidine and benzidine dihydrochloride. *J Histochem Cytochem* 1986; 34(11): 1449-1457.

Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in nonneuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 1987; 330: 658-659.

Lips K, Stichel CC, Müller HW. Restricted appearance of tenascin and chondroitin sulphate proteoglycans after transection and sprouting of adult rat postcommissural fornix. *J Neurocytol* 1995; 24: 449-464.

Liu W, Brosnan CF, Dickson DW, Lee SC. Macrophage colony-stimulating factor mediates astrocyte-induced microglial ramification in human fetal central nervous system culture. *Am J Pathol* 1994; 145: 48-53.

Liuzzi FJ, Lasek RJ. Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* 1987; 237: 642-645.

Lotan M, Schwartz M. Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB J.* 1994; 8(13): 1026-1033.

Loughlin AJ, Woodroffe MN, Cuzner ML. Modulation of interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II and Fc receptor expression on isolated microglia by transforming growth factor-beta 1, interleukin-4, noradrenaline and glucocorticoids. *Immunology* 1993; 79: 125-130.

Lu X, Richardson PM. Inflammation near the nerve cell body enhances axonal regeneration. *J Neurosci* 1991; 11(4): 972-978.

Mansour H, Asher R, Dahl D, Labkovsky B, Perides G, Bignami A. Permissive and non-permissive reactive astrocytes: immunofluorescence study with antibodies to the glial hyaluronate-binding protein. *J Neurosci Res* 1990; 25(3): 300-311.

Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU. Neurocan and phosphocan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect Dev Neurobiol* 1996; 3(4): 273-290.

Margolis RU, Margolis RK. Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. *Cell Tissue Res* 1997; 290: 343-348.

Martin D, Schoenen J, Delree P, Gilson V, Rogister B, Leprince P, Stevenaert A, Moonen G. Experimental acute traumatic injury of the adult rat spinal cord by a subdural inflatable balloon: methodology, behavioral analysis and histopathology. *J Neurosci Res* 1992; 32(4): 539-550.

Matyszak MK. Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 19-35.

McBride RL, Feringa ER, Garver MK, Williams JK. Prelabeled red nucleus and sensorimotor cortex neurons of the rat survive 10 and 20 weeks after spinal cord transection. *Neuropathol Exp Neurol* 1989; 48(5): 568-576.

McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. 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* 1991; 11: 3398-3411.

Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK, Grumet M, Margolis RU. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphocan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 1994; 127: 1703-1715.

Milhorat TH, Capocelli AL Jr, Kotzen RM, Bolognese P, Heger IM, Cottrell J. Intramedullary pressure in syringomyelia: clinical and pathophysiological correlates of syrinx distension. *Neurosurgery* 1997; 41(5): 1102-1110.

Miranda JD, White LA, Marcillo AE, Willson CA, Jagid J, Whittemore SR. Induction of Eph B3 after spinal cord injury. *Exp Neurol* 1999; 156: 218-222.

Mizrachi Y, Ohry A, Aviel A, Rozin R, Brooks ME, Schwartz M. Systemic humoral factors participating in the course of spinal cord injury. *Paraplegia* 1983; 21(5): 287-293.

Moreno DE, Xu XJ, Goshgarian HG. Identification of the axon pathways which mediate functional recovery of a paralyzed hemidiaphragm following spinal cord hemisection in the adult rat. *Exp Neurol* 1992; 116(3): 219-228.

Morioka T, Baba T, Black KL, Streit WJ. Response of microglial cells to experimental rat glioma. *Glia* 1992; 6(1): 74-79.

Nacimient W, Schmitt AB, Brook GA. Nerve regeneration after spinal cord trauma. Neurobiological progress and clinical expectations. *Nervenarzt* 1999; 70(8): 702-713.

Nacimient W, Schlozer B, Brook GA, Toth L, Töpper R, Noth J, Kreutzberg GW. Transient decrease of acetylcholinesterase in ventral horn neurons caudal to a low thoracic spinal cord hemisection in the adult rat. *Brain Res* 1996; 714(1-2): 177-184.

Namiki J, Tator CH. Cell proliferation and Nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J Neuropath Exp Neurol* 1999; 58(5): 489-498.

Naumann T, Peterson GM, Frotscher M. Fine structure of rat septohippocampal neurons. *J Comp Neurol* 1992; 325(2): 219-242.

Niederost BP, Zimmermann DR, Schwab ME, Bandtlow CE. Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci* 1999; 19(20): 8979-8989.

Niquet J, Jorquera I, Faissner A, Ben-Ari Y, Represa A. Gliosis and axonal sprouting in the hippocampus of epileptic rats are associated with an increase of tenascin-C immunoreactivity: *Neurocytol* 1995; 24: 611-624:

O'Brien MF, Lenke LG, Lou J, Bridwell KH, Joyce ME. Astrocyte response and transforming growth factor- β localization in acute spinal cord injury. *Spine* 1994; 19(20): 2321-2330.

Pan W, Kastin AJ, Bell RL, Olson RD. Upregulation of tumor necrosis alpha transport across the blood-brain barrier after acute compressive spinal cord injury. *J Neurosci* 1999; 19(9): 3645-3655.

Pasterkamp RJ, Giger RJ, Ruitenberg MJ, Holtmaat AJ, De Wit J, De Winter F, Verhaagen J. Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol Cell Neurosci* 1999; 13(2): 143-166.

Pedersen EB, Fox LM, Castro AJ, McNulty JA. Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Res* 1993; 272: 257-265.

Perry H, Gordon S. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 1988; 11(6): 273-277.

Perry VH, Brown MC, Gordon S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J Exp Med* 1987; 165(4): 1218-1223.

Perry VH, Brown MC. Macrophages and nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 1992; 2(5): 679-682.

- Pindzola RR, Doller C, Silver J. Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions. *Dev Biol* 1993; 156: 34-48.
- Popovich PG, Horner PJ, Mullin BB, Stokes BT. A quantitative spatial analysis of the blood-spinal cord barrier. I. Permeability changes after experimental spinal contusion injury. *Exp Neurol* 1996a; 142(2): 258-275.
- Popovich PG, Stokes BT, Whitacre CC. Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res* 1996b; 45(4): 349-363.
- Popovich PG, Streit WJ, Stokes BT. Differential expression of MHC class II antigen in the contused rat spinal cord. *J Neurotrauma* 1993; 10(1): 37-46.
- Popovich PG, Wei P, Stokes BT. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 1997; 377: 443-464.
- Popovich PG, Whitacre CC, Stokes BT. Is spinal cord injury an autoimmune disorder? *Neuroscientist* 1998; 4(2): 71-76.
- Powell EM, Geller HM. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia* 1999; 26(1): 73-83.
- Prewitt CM, Niesmann IR, Kane CJ, Houle JD. Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Exp Neurol* 1997; 148(2): 433-443.
- Privat A. *Daten des »Institut de la recherche sur la moelle épinière«*. Paris, 1995.
- Rabchewsky AG, Streit WJ. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 1997; 47: 34-48.
- Raivich G, Kreutzberg GW. Peripheral nerve regeneration: role of growth factors and their receptors. *Int J Dev Neurosci* 1993; 11(3): 311-324.
- Ramon y Cajal. *Degeneration and regeneration of the nervous system*. May RM. trans Oxford University Press, New York, 1928.
- Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 1998; 4: 814-821.

- Reid DM, Perry VH, Andersson PB, Gordon S. Mitosis and apoptosis of microglia in vivo induced by an anti-CR3 antibody which crosses the blood-brain barrier. *Neuroscience* 1993; 56(3): 529-533.
- Reier PJ, Stensaas LI, Guth L. The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system. In: *Spinal Cord Reconstruction*. Kao CC, Bunge RP, Reier PJ (eds). Raven, New York, 1983: 163-195.
- Richardson PM, Lu X. Inflammation and axonal regeneration. *J Neurol* 1994; 242 (1 Suppl 1): 57-60.
- Riva-Depaty I, Fardeau C, Mariani J, Bouchaud C, Delhay-Bouchaud N. Contribution of peripheral macrophages and microglia to the cellular reaction after mechanical or neurotoxin-induced lesions of the rat brain. *Exp Neurol* 1994; 128: 77-87.
- Robinson AP, White TM, Mason DW. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology* 1986; 57: 239-247.
- Rogister B, Delree P, Leprince P, Martin D, Sadzot C, Malgrange B, Munaut C, Rigo JM, Lefebvre PP, Octave JN. Transforming growth factor beta as a neuroglial signal during peripheral nervous system response to injury. *J Neurosci Res* 1993; 34(1): 32-43.
- Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines in the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 1995; 18(3): 130-136.
- Rudge JS, Alderson RF, Pasnikowski J. Expression of ciliary neurotrophic factor and the neurotrophins-nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3- in cultured rat hippocampal astrocytes. *Eur J Neurosci* 1992; 4: 459-471.
- Ruoslahti E. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 1989; 264: 13369-13372.
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; 64: 867-869.
- Saklatvala J. Tumor necrosis factor α stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 1986; 322(6079): 547-549.
- Sanner CA, Murray M, Goldberger ME. Removal of dorsal root afferents prevents retrograde death of axotomized Clarke's nucleus neurons in the cat. *Exp Neurol* 1993; 123: 81-90.

Schnell L, Fearn S, Schwab ME, Perry VH, Anthony DC. Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58(3): 245-254.

Schnell L, Schwab ME. Sprouting and regeneration of lesioned corticospinal tract fibres in the adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1993; 5(9): 1156-1171.

Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 1990; 343(6255): 269-272.

Schurch B, Wichmann W, Rossier AB. Post-traumatic syringomyelia (cystic myelopathy): a prospective study of 449 patients with spinal cord injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 60(1): 61-67.

Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 1996; 76: 319-370.

Schwab ME, Brosamle C. Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat spinal cord under experimental conditions. *Spinal Cord* 1997; 35(7): 469-473.

Schwab ME, Kapfhammer JP, Bandtlow CE. Inhibitors of neurite growth. *Ann Rev Neurosci* 1993; 16: 565-595.

Schwartz M, Lazarov-Spiegler O, Rapalino O, Agranov I, Velan G, Hadani M. Potential repair of rat spinal cord injuries using stimulated homologous macrophages. *Neurosurgery* 1999a; 44(5): 1041-1046.

Schwartz M, Moalem G, Leibowitz-Amit R, Cohen IR. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 1999b; 22(7): 295-299.

Semple-Rowland; SL, Mahatme A, Popovich PG, Green DA, Hassler G, Stokes BT, Streit WJ. Analysis of TGF- β 1 gene expression in contused rat spinal cord using quantitative RT-PCR. *J Neurotrauma* 1995; 12: 1003-1014.

Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res* 1997; 50(5): 798-808.

Sievers J, Parwaresch R, Wottge HU. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: Morphology. *Glia* 1995; 12: 245-258.

Silver J. Inhibitory molecules in development and regeneration. *J Neurol* 1994; 242: 22-24.

Sivron T, Schwartz M. The enigma of myelin-associated growth-inhibitors in spontaneously regenerating nervous systems. *Trends Neurosci* 1994; 17: 277-281.

Stichel CC, Hermanns S, Luhmann HJ, Lausberg F, Niermann H, D'Urso D, Servos G, Hartwig HG, Müller HW. Inhibition of collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons. *Eur J Neurosci* 1999a, 11(2), 632-646.

Stichel CC, Kappler J, Junghans U, Koops A, Kresse H, Müller HW. Differential expression of the small chondroitin/ dermatan sulfate proteoglycans decorin and biglycan after injury of the adult rat brain. *Brain Res* 1995a; 704(2): 263-274.

Stichel CC, Müller HW. Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Prog Neurobiol* 1998; 56(2): 119-148.

Stichel CC, Niermann H, D'Urso D, Lausberg F, Hermanns S, Müller HW. Basal membrane-depleted scar in lesioned CNS: characteristics and relationships with regenerating axons. *Neuroscience* 1999b, 93:321-333.

Stichel CC, Wunderlich G, Schwab ME, Müller HW. Clearance of myelin constituents and axonal sprouting in the transected postcommissural fornix of the adult rat. *Eur J Neurosci* 1995b; 7(3): 401-411.

Stoll G, Jander S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 1999; 58: 233-247.

Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1988; 1(5): 301-307.

Streit WJ, Kreutzberg GW. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* 1987; 16(2): 249-260.

Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol* 1998; 152: 74-87.

Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Transforming growth factor- β suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol* 1993; 151: 2150-2158.

- Tabor DR, Larry CH, Jakobs RF. Differential induction of macrophage GSIB4-binding activity. *J Leukoc Biol* 1989; 45(5): 452-457.
- Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 1995; 5(4): 407-413.
- Tetzlaff W, Alexander SW, Miller FD, Bisby MA. Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: Changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43. *J Neurosci* 1991; 11(8): 2528-2544.
- Tetzlaff W, Kobayashi NR, Giehl KM, Tsui BJ, Cassar SL, Bedard AM. Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins. *Prog Brain Res* 1994; 103: 271-286.
- Thanos S, Mey J, Wild M. Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J Neurosci* 1993; 13(2): 455-466.
- Trede NS, Geha RS, Chatila T. Transcriptional activation of IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha genes by MHC class II ligands. *J Immunol* 1991; 146: 2310-2315.
- Van der Laan LCW, Ruuls SR, Weber KS, Lodder IJ, Döpp EA, Dijkstra CD. Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-a and nitric oxide. *J Neuroimmunol* 1996, 70: 145-152.
- Vanek P, Thallmair M, Schwab ME, Kapfhammer JP. Increased lesion-induced sprouting of corticospinal fibres in the myelin-free rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1998; 10(1): 45-56.
- Wang ZH, Walter GF, Gerhard L. The expression of nerve growth factor receptor on Schwann cells and the effect of these cells on the regeneration of axons in traumatically injured human spinal cord. *Acta Neuropathol* 1996; 91: 180-184.
- Watanabe T, Yamamoto T, Abe Y, Saito N, Kumagai T, Kayama H. Differential activation of microglia after experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1999; 16(3): 255-265.
- Weidner N, Grill RJ, Tuszynski MH. Elimination of basal lamina and the collagen "scar" after spinal cord injury fails to augment corticospinal tract regeneration. *Exp Neurol* 1999; 160: 40-50.

White CA, Mc Combe PA, Pender MP. Microglia are more susceptible than macrophages to apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism not involving Fas (CD95). *Int Immunol* 1998; 10(7): 935-941.

Williams B. The cystic spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psych* 1995; 58: 649-654.

Wunderlich G, Stichel CC, Schroeder WO, Müller HW. Transplants of immature astrocytes promote axonal regeneration in the adult rat brain. *Glia* 1994; 10: 49-58.

Xiao BG, Bai XF, Zhang GX, Hojeberg B, Link H. Shift from anti- to proinflammatory cytokine profiles in microglia through LPS- or IFN- γ -mediated pathways. *NeuroReport* 1996; 7: 1893-1898.

Xiao BG, Bai XF, Zhang GX, Link H. Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis of rat microglia without relation to bcl-2 oncoprotein expression. *Neurosci Lett* 1997; 226(2): 71-74.

Xu XM, Martin GF. The response of rubrospinal neurons to axotomy in the adult opossum, *Didelphis virginia*. *Exp Neurol* 1990, 108(1): 46-54.

Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, Citron BA, Watanabe I, Berman NE, Festoff BW. Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J Neurotrauma* 1998; 15(7): 459-472.

Zeev-Brann AB, Lazarov-Spiegler O, Brenner T, Schwartz M. Differential effects of central and peripheral nerves on macrophages and microglia. *Glia* 1998; 23(3): 181-190.

Zhang Y, Campbell G, Anderson PN, Martini R, Schachner M, Liebermann AR. Molecular basis of interactions between regenerating rat thalamic axons and Schwann cells in peripheral nerve grafts. II. Tenascin-C. *J Comp Neurol* 1995; 361(2): 210-224.

Zhang Y, Winterbottom JK, Schachner M, Lieberman AR, Anderson PN. Tenascin-C expression and axonal sprouting following injury to the spinal dorsal columns in the adult rat. *J Neurosci Res* 1997; 49(4): 433-450.

Zuo J, Neubauer D, Dyess K, Ferguson TA, Muir D. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Exp Neurol* 1998; 154(2): 654-662.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. J. Noth, dem Direktor der Klinik für Neurologie der RWTH Aachen, bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik erstellen zu können.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Nacimiento, Chefarzt der Neurologischen Klinik der Wedau-Kliniken in Duisburg, bedanken. Er ermöglichte mir die Bearbeitung des Dissertationsthemas und hat mich sehr hilfreich beraten, unterstützt und gefördert.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Gary Brook, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Neurologischen Klinik. Er brachte mir die notwendigen experimentellen Techniken bei, vermittelte mir wesentliche theoretische Grundlagen für die Bearbeitung des Themas und begleitete mich mit tatkräftiger Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich Frau R. Franzen, Ph. D., danken, die die Versuchstiere operiert hat. Den Herren D. Martin, Ph. D., Prof. G. Moonen, Ph. D., Prof. J. Schoenen, Ph. D., der Universität Lüttich danke ich für die gute Kooperation in diesem Projekt.

Schließlich danke ich ganz besonders meinem Freund Dr.-Ing. Jörg Loos für seine liebevolle und geduldige Unterstützung und die Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen und Diagramme.

Aachen, im Mai 2002

Lebenslauf

Name: Marlene Krautstrunk

Geburtsdatum/ -ort: 04. 01. 1975, Trier

Schulbildung:

Grundschule: 1981 bis 1985, Viersen

Gymnasium: 1985 bis 1994, Erasmus von Rotterdam-Gymnasium, Viersen, mit Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Medizinstudium an der RWTH Aachen:

Immatrikulation Oktober 1994

Physikum September 1996

1. Staatsexamen September 1997

2. Staatsexamen März 2000

3. Staatsexamen Mai 2001

Beruf:

ÄIP in der Neurologischen Klinik der RWTH-Aachen ab Juli 2001