

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Akupunktur auf die Mobilisation von Stammzellen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Miriam Burgauner

aus München

Datum der Promotion: 11.12.2015



***Just as the highest and the lowest notes are equally inaudible, so perhaps, is the greatest sense and the greatest nonsense equally unintelligible.***

Genauso wie die höchsten und tiefsten Töne nicht hörbar sind, ist vielleicht der höchste Sinn und der größte Unsinn nicht mit dem Intellekt zu erfassen.

Alan Watts



## Inhaltsverzeichnis

•	Zusammenfassung / Abstract	S.9
I	Abkürzungen und Fachbegriffe	S.10
II	Abbildungsverzeichnis	S.12
III	Tabellenverzeichnis	S.13
1	Einleitung	S.15
1.1	Traditionelle chinesische Medizin	S.15
1.1.1	Tradition und Geschichte	S.15
1.1.2	Philosophische Grundsätze	S.16
1.1.3	Grundlagen und Diagnostik der ganzheitlichen TCM- Behandlungsweise	S.17
1.1.4	Meridiansystem	S.18
1.1.5	Elektroakupunktur	S.21
1.1.6	Akupunkturschema bei Spinalläsion	S.22
1.2	Klinische Wirksamkeit der Akupunktur	S.22
1.2.1	Wirksamkeit der Akupunktur bei ZNS-Schäden	S.23
1.2.2	Modelle zur Wirkungsweise der Akupunktur	S.25
1.2.3	Neuronale und biochemische Auswirkungen von Akupunktur	S.27
1.3	Spinalläsion	S.29
1.3.1	Therapie der Spinalläsion	S.31
1.4	Stammzellen	S.32
1.4.1	Definition, Differenzierung und klinische Verwendung der Stammzelle	S.32
1.4.2	Stammzelltransplantation bei Spinalläsion	S.34
1.5	Gewählte Zell- und Zytokinmarker	S.35
1.5.1	Bedeutung der Glykoproteine	S.35
	CD 34	S.35
	CD 133	S.35
	CD14	S.36
	CD45	S.36
	CD4	S.37
	CD19	S.37

1.5.2	Zytokine	S.38
	Bedeutung der Zytokine	S.38
	SDF-1	S.38
	Matrixmetalloproteinasen	S.38
	- MMP-8	S.39
	- MMP-9	S.39
	G-CSF	S.40
	IL-6	S.41
	Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF	S.42
	Nerve Growth Factor, NGF	S.42
1.6	Zielsetzung der Arbeit – Untersuchung der Akupunktur-behandlung bezüglich potenzieller Stammzellmobilisation	S.44
2.	Material und Methoden	S.45
2.1	Studiendesign – Praktische Durchführung	S.45
2.2	Probanden	S.46
2.3	Durchführung der Akupunktur	S.47
2.3.1	Die Praxis der Nadelung	S.47
2.3.2	Behandlungsschema der Akupunktur bei Spinalläsion	S.48
2.4	Material	S.50
2.4.1	Geräte und Hilfsmaterialien	S.50
2.4.2	Chemikalien	S.51
2.4.3	Verbrauchsmaterialien	S.51
2.4.4	ELISA-Kits	S.52
2.4.5	Antikörper	S.52
2.4.6	Verwendete Medien und Stammlösungen	S.53
2.4.7	Computersoftware	S.53
2.5	Labormethoden	S.54
2.5.1	Untersuchungen auf Zellebene	S.54
2.5.1.1	Blutabnahmeschema	S.54
2.5.1.2	Aufarbeitung von Citratblut über Ficoll	S.54
2.5.1.3	Behandlung von Citratblut mit BD-Optilyse	S.55
2.5.1.4	Glykoproteinbestimmung mittels Durchflusszytometrie	S.55
2.5.2	Immunphänotypisierung von Stamm- und ausgewählten	S.58

	Tochterzellen	
2.5.3	Serumparameter	S.58
2.5.3.1	Bestimmung von Nerve Growth Factor und Brain-Derived Neurotrophic Factor aus Serum	S.59
2.5.3.2	Bestimmung von IL-6	S.59
2.5.4	Anzüchtung von Stammzellen im Kulturmedium	S.60
2.6	Statistische Auswertung	S.60
3.	Messergebnisse	S.62
3.1	Untersuchungen der Probanden	S.62
3.1.1	Unerwünschte Wirkungen der Akupunktur und Blutentnahmen	S.62
3.1.2	Blutdruck und Puls	S.62
3.1.3	Blutbilder	S.63
3.2	FACS-Analysen	S.64
3.3	Stammzellen in Kultur	S.69
3.4	Auswertungen der Serumparameter	S.69
3.4.1	BDNF Auswertung	S.70
3.4.2	MMP-9 Auswertung	S.72
3.4.3	Auswertung der ELISAs der Kontrollgruppe	S.75
3.5	Korrelation der CD133(+)-, BDNF- und MMP-9- Werte zueinander	S.75
3.6	Beobachtung einer Probandin über acht Tage nach Akupunktur	S.77
4.	Diskussion	S.79
4.1	Beurteilung der Akupunktur unter wissenschaftlichen Bedingungen	S.79
4.2	Diskussion der signifikant veränderten Parameter	S.80
4.2.1	Anstieg von CD133(+) Zellen	S.80
4.2.1.1	Neurogenes Potential von CD133(+)	S.81
4.2.1.2	Interpretation der CD133(+)CD34(-) Zellen	S.82
4.2.2	Senkung der BDNF-Werte	S.82
4.2.2.1	BDNF-Aktivität bei ZNS-Verletzungen	S.83
4.2.2.2	BDNF und Stammzellen	S.83
4.2.2.3	BDNF-Veränderungen nach Akupunktur	S.84
4.2.2.4	Interpretation der akupunkturbedingt veränderten BDNF Werte	S.84
4.2.3	Senkung der MMP-9-Werte	S.85
4.2.3.1	MMP-9 Aktivität bei ZNS-Verletzungen	S.85

4.3	Normabweichung der gemessenen CD34(+)-Werte	S.87
4.4	Ergebnisdifferenzen zwischen Ficoll- und BD-Optilyse-Messungen	S.88
4.5	Interindividuelle Differenzen der Messergebnisse von CD133(+)-, BDNF- und MMP-9	S.89
4.6	Potenzierung eines natürlichen Prozesses? - Stammzellmobilisierung nach Trauma	S.90
4.7	Stammzellkultur	S.92
5	Schlussfolgerung	S.93
6	Danksagung	S.94
7	Literaturverzeichnis	S.97
•	Curriculum Vitae	S.119
•	Publikationsverzeichnis	S.121
•	Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung an erfolgter Publikation	S.123



## **Zusammenfassung**

Akupunktur für Spinalläsion kann klinische Besserung beschleunigen. Tierversuche weisen darauf hin dass Akupunktur Gehirnzellproliferation und die Migration neuronaler Stammzellen induzieren kann. Ob dies auch auf Menschen zutrifft ist unbekannt. Hier wird eine Pilotstudie präsentiert, in welcher CD133(+)<sup>34</sup>(-)-Progenitorzellen, ein potenziell neurogener Stammzelltyp, nach Akupunktur als erhöht gemessen wurde. Vierzehn gesunde Testprobanden wurden akupunktiert und unterliefen Blutentnahmen vor und nach Akupunktur bis zum zweiten Folgetag, um die Häufigkeit von CD133(+)-, CD34(+)-, CD4(+)-, CD14(+)-, CD19(+)- und CD45(+)-Zellen sowie Serumkonzentrationen von Matrixmetalloproteinase (MMP) 8 und 9, Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Nerve Growth Factor (NGF), Stroma-Derived Factor (SDF) 1 und Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) zu bestimmen. CD133(+)<sup>34</sup>(-) Zellen waren 48 Stunden nach Akupunktur signifikant erhöht ( $31.3 \pm 6\%$  versus  $12.2 \pm 5.3\%$ ,  $p=0.015$ ) mit einhergehend signifikantem Abfall von BDNF und MMP-9-Werten. Das Ergebnis dieser Untersuchungen könnte unseres Wissens nach erstmals den Hinweis auf die Akupunkturwirkung auf Stammzellebene beim Menschen darstellen.

## **Abstract**

Acupuncture for spinal cord injury (SCI) can accelerate clinical improvement. Animal studies indicate that acupuncture can induce brain cell proliferation and neural stem cell migration. If that is also the case in humans is unknown. Here we show a pilot study in which acupuncture increases the frequency of CD133(+)<sup>34</sup>(-) progenitor cells, a potentially neurogenic stem cell subtype. Fourteen healthy study participants were acupunctured and had blood drawn before and after acupuncture until the second consecutive day in order to determine the frequency of CD133(+)-, CD34(+)-, CD4(+)-, CD14(+)-, CD19(+)- und CD45(+)-cells as well as serum concentrations of matrix metalloproteinases (MMP) 8 and 9, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), stroma-derived factor (SDF) 1 and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). CD133(+)<sup>34</sup>(-) cells were significantly increased 48 hours after acupuncture ( $31.3 \pm 6\%$  versus  $12.2 \pm 5.3\%$ ,  $p=0.015$ ) with concomitant, significant decreases of BDNF and MMP-9 levels. We anticipate our study to possibly be the first index for a human stemcell-based efficacy of acupuncture.

## I Abkürzungen und Fachbegriffe

AIS	Abbreviated Injury Scale
ASIA	American Spinal Injury Association
B27	Spezifisches Nährmedium neuronaler Vorläuferzellen
BL 64/65	„Blase 64/65“- spezielle Akupunkturpunkte auf dem Blasenmeridian
BCSF	B-Zell-Stimulationsfaktor 2
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BSF-2	B-Zell-Stimulationsfaktor
CD	Cluster of Differentiation
G-CSF	Granulocyte Stimulating Factor
FGF-2	Fibroblast growth factor-2
GERAC	German Acupuncture Trials
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HCT	Hematocrit (dt. Hämatokrit)
HGB	Hemoglobin (dt. Hämoglobin)
HSF	Hepatozyten-Stimulationsfaktor
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
ISHAGE	International Society for Hematotherapy and Graft Engineering
LCA	Leucocyte Common Antigen
LcK	Lymphocyte-specific Protein-Tyrosine Kinase
LPS	Lipopolysacharid
LV	Lateraler Ventrikel
MAG	Myelin-associated glycoprotein
MSZ	Mesenchymale Stammzelle
MW	Mittelwert
n	Probandenzahl bzw. Zahl der Versuchstiere
NADPHd	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-Diaphosphase
NIH	National Institutes of Health
NEAA	Nonessential amino acids
nNOS	neuronale Form der Stickstoffmonoxid-Synthase

NO	Stickstoffmonoxid
NPZ	Neuronaler Progenitorzellen
NT-3	Dritter Nerve Growth Factor neben NGF und BDNF
p	Signifikanz
PBS	Phosphate buffered solution
PLT	Platelets (dt. Thrombozyten)
PPD	(3-Phosphoryloxy-Phenyl-1,2-Dioxetane)
PSC	Propagated Sensation along the channel
PVT	Paraventriculärer Thalamuskern
PKT/Akt	Proteinkinase B RM Rückenmark
RMS	Rostrales Migrationszentrum
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungszahl)
ROS	Reactive Oxygen Species (dt. reaktive Sauerstoffspezies)
SCI	Spinal Cord Injury, Spinalläsion
SDO	Sleeping Disorder, Schlafstörung
SDS-Gel	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel
SEM	Standard Error of the Mean
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SSR	Somatosympathische Reflexe
SVZ	Subventrikularzone
SZ	Stammzelle
TAT	Transactivator of Transcription
TCM	Traditionelle chinesische Medizin
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TRKB	Neurotrophe Tyrosinkinase, BDNF/NT-3 Wachstumsfaktor-Rezeptor
V3	Dritter Ventrikel
VZ	Ventrikularzone
WBC	White Blood Cells
WNT	Wingless Int-1 (bestimmter Signaltransduktionsweg)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## II                    Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:            Yin-Yang-Symbol
- Abbildung 2:            Duke. Alte Akupunkturtafel. Duke b 1973
- Abbildung 3:            mögliche Mechanismen des analgetischen Akupunktur-Effektes. In Anlehnung an Stux c 2008.
- Abbildung 4:            Moldenhauer. Stammzellen nach Isolierung.
- Abbildung 5:            A,B: Moldenhauer et al Klassische Behandlungspunkte der SCI-Akupunktur
- Abbildung 6:            Streulicht-Dot-Plot
- Abbildung 7:            Prozentuale Darstellung der Häufigkeit von CD133-positiven Zellen nach BD-Messung
- Abbildung 8:            Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenantigene CD133/1, CD133/2 und CD34 (nach BD-Optilyse-Zellaufbereitung) aus vier Versuchen im zeitlichen Verlauf nach Akupunkturbehandlung, überlagert auf IgG-Kontrollen (FITC und PE)
- Abbildung 9:            Boxplot BDNF. Verteilung und Mittelwerte der 14 akupunktierten Probanden
- Abbildung 10:            Boxplot MMP-9: Verteilung und Mittelwerte der 14 akupunktierten Probanden
- Abbildung 11:            Proband 0, gemessen über den Zeitraum von 8 Tagen nach Akupunktur

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Probanden: Alter, Geschlecht, Medikamentenanamnese
Tabelle 2:	Genadelte 11 Punkte mit chinesischer Bezeichnung und Lokalisationsbeschreibung
Tabelle 3:	Verwendete Antikörper
Tabelle 4:	Fluoreszeinfarbstoffe. Auswahl von Absorptions- und Emissionsmaxima der in der Durchflusszytometrie eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe
Tabelle 5:	Über FACS-Flow bestimmte Antikörper/Zytokin NGF
Tabelle 6:	Blutdruck und Puls vor und nach Akupunkturbehandlung
Tabelle 7:	Blutdruck und Puls der beiden nicht akupunktierten Probanden
Tabelle 8:	Blutbilder der 14 akupunktierten Probanden im zeitlichen Verlauf
Tabelle 9:	Blutbilder der beiden nicht akupunktierten Probanden im zeitlichen Verlauf
Tabelle 10:	Prozentuale Messergebnisse (Mittelwerte und SEM) der Zellpopulationen von 14 akupunktierten Probanden nach Zellaufbereitung anhand BD-Optilyse
Tabelle 11:	Mittelwerte und SEM der Zellpopulationen/µl nach FACS-Messung (Zellaufbereitung anhand BD-Optilyse) der 14 akupunktierten Probanden
Tabelle 12:	Prozentuale Messergebnisse (Mittelwerte und SEM) der Zellpopulationen von zwei nicht akupunktierten Kontrollprobanden
Tabelle 13:	Prozentuale Messergebnisse (Mittelwerte und SEM) der Zellpopulationen von 13 akupunktierten Probanden nach Zellaufbereitung anhand Ficoll
Tabelle 14:	Mittelwerte und SEM der Zellpopulationen/µl nach FACS-Messung (Zellaufbereitung anhand Ficoll) von 13 akupunktierten Probanden
Tabelle 15:	ELISAs der Cytokine / Chemokine und SEM der 13 akupunktierten Probanden
Tabelle 16:	ELISAs der Cytokine / Chemokine – Mittelwerte und SEM der beiden nicht akupunktierten Probanden.

- Tabelle 17: Prozentuale Zu-/Abnahme von BDNF pro Proband.
- Tabelle 18: Prozentuale Zu-/Abnahme von MMP-9 pro Proband
- Tabelle 19: ELISAs der Cytokine / Chemokine – Mittelwerte und SEM der beiden Kontrollprobanden.

# **1. Einleitung**

## **1.1 Traditionelle chinesische Medizin**

### **1.1.1 Tradition und Geschichte**

Eindeutig lässt sich der Ursprung der Akupunktur bis heute nicht feststellen. Erste schriftlich datierte Erwähnungen finden sich in dem Werk Shiji des chinesischen Geschichtsschreibers Sima Qian (ca. 145-90 v.Chr.), in dem ein mit Nadeln arbeitender Wanderarzt erwähnt wird. Auch indische Einflüsse werden im Zuge der Etablierung vermutet (Stux a 2008).

Als ältestes Standardwerk der chinesischen Medizin lässt sich das „Huang Di Nei Jing“ erwähnen – laut Erstübersetzer Schmidt „Der Klassiker des gelben Kaisers zur Inneren Medizin“ (Schmidt 1993). Von unbekanntem Autoren zwischen 300 v. Chr. und 100 n. Chr. verfasst gilt es als die Urquelle der chinesischen Medizinteorie (Kaptchuk a 1983, Sivin 1993). Die Akupunktur wird hier erstmals in die gesamte chinesische Medizin eingebettet. Beschrieben werden die Hauptleitbahnen der heutigen Meridianlehre, verschiedene Nadeln, Stichtechniken sowie Indikation und Anwendung von 160 Akupunkturpunkten (welche schließlich auf 361 ergänzt wurden). Das Huang Di Nei Jing stellt den Menschen als Teil eines kosmischen, energetischen Wirkgefüges dar. Besonders für seinen diagnostischen Teil gilt dieses alte Werk auch heute noch als wichtige Grundlage der TCM-Ausbildung im Osten wie im Westen (Stux a 2008). Neben der Akupunktur nimmt die Kräuterheilkunde einen wesentlichen Sektor der TCM ein. Außerdem bedeutsam sind Diätetik, Tui Na und An Mo (chinesische Massagetechniken), Moxibustion, Bädertherapien, sowie die Bewegungskunde, welche heute auch zunehmend im Westen praktiziert wird (Qi Gong und Taiji Quan) und die Atemtherapie. Die TCM-Ausbildung an einer chinesischen Hochschule mit TCM-Lehrkrankenhaus dauert mindestens fünf Jahre und wird heutzutage auch außerhalb Chinas in vergleichbarem Umfang angeboten.

Das allgemeine Interesse des Westens gegenüber der chinesischen Medizin erwachte während der wirtschaftlichen Öffnung Chinas in den 70er und 80er Jahren. Folglich propagierte Erfolge, vor allem dramatische Berichte über die Akupunkturanästhesie (Duke a 1973, Kaptchuk b 1983), riefen im Westen sowie auch in der dritten Welt intensives Interesse hervor.

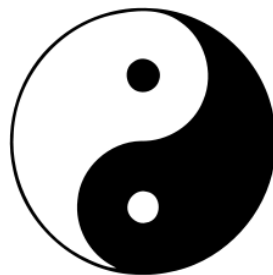
1996 wurden Akupunkturnadeln schließlich vom FDA (Food and Drugs Administration)

in den USA in die Klasse II der medizinischen Produkte aufgenommen, was sie zur Behandlung durch qualifizierte Akupunkturpraktiker zuließ. Somit wurde die Akupunktur – insbesondere in der Behandlung von Schmerzen, was chinesische Spezialisten als „Mainstream-Akupunktur“ bezeichnen (Kwokming 2013) - einer breiteren Gesellschaft zugänglich. Des Weiteren wurde der Akupunktur in einer medizinischen Konsens-Konferenz der NIH (NIH Consensus Development Program 1997) im Jahr 1997 im Wesentlichen wissenschaftliche Geltung zugesprochen.

Auch wenn Wirksamkeitsstudien zur Akupunktur seit langem ganze Bibliotheken füllen (Kaptchuk c 1983, Han 2011) wurde diese im Praktischen oft aus ihrem essentiellen philosophischen Zusammenhang gerissene Kunst seit jeher von Kritikern dem Aberglauben zugeschrieben und wissenschaftlich gering geschätzt (Prokop 1977). Nicht zuletzt zum Zweck der weiteren Entmystifizierung gilt es, die genauen Wirkmechanismen im Heilprozess durch Akupunktur zu entschlüsseln.

### **1.1.2 Philosophische Grundsätze**

„Das Konzept von Yin und Yang ist wohl die einzigartigste, wichtigste und charakteristischste Theorie der Chinesischen Medizin. ...Das Konzept von Yin und Yang hat, zusammen mit dem Konzept von Qi, die chinesische Philosophie über die Jahrtausende durchdrungen und unterscheidet sich radikal von jeglichen westlichen philosophischen Ideen.“ (Maciocia a 2008).



**Abbildung 1:** Yin-Yang-Symbol

Bekannt als Yin-Yang-Symbol spricht dieses Abbild von eben dem Fließgleichgewicht, welches seine Grenzen ständig verändert und welches im ausbalancierten Zustand den freien Fluss von Qi darstellt. Die Opposition zweier sich gegenseitig hervorbringender Ausdrucksformen reiner Kraft (Qi) bildet das dynamische Gesetzespaar welches allem Leben zugrunde liegt. Zum intuitiven Verständnis dieses Prinzips können analoge



Begriffspaare wie Tag und Nacht, Ein- und Ausatmen, Aktivität und Ruhe oder Geben und Nehmen als beispielhafte Vergleiche helfen. Passend zur Vergesellschaftung mit der westlichen Medizin wird gerne die Homöostase als wissenschaftliches Beispiel des Yin-Yang-Gleichgewichtes angeführt (Kwokming 2013). Aufbauend auf dieser zentralen Idee wird erklärt, wie Krankheit entsteht und Gesundheit erhalten bleibt (Maciocia b 2008).

„Qi“, als wesentlicher Begriff der TCM – laut Stux „die Essenz der Akupunktur“ (Stux d 2008) – bezeichnet das Spannungsfeld energetischer Einflüsse, dem der Mensch unterliegt, das energetische Potential in und um den menschlichen Körper in untrennbarem Zusammenhang mit Geist und Psyche. Der ungestörte Fluss von Qi entspricht demzufolge im weitesten Sinn dem Zustand des Gesunden. Qi ist sowohl Aktivität als auch aktive Substanz, es bezieht sich auf die Verhaltensweise der räumlichen Ausbreitung eines physischen Mediums und gehört für die Chinesen zum Reich der konsensuellen Realität. Das kosmische Qi ist nach traditioneller Auffassung omnipräsent. Im menschlichen Körper durchläuft es als Jing (durchfließen, Kanal) und Luo (Verbindung) bezeichnete Bahnen. Es werden verschiedene Formen von Qi aufgeführt, wie das Atmungs-, Nähr-, Anzestrals-, und das Abwehr-Qi (Stux d 2008).

Qi ist jedoch nicht einfach der Energiefluss durch die Meridian-Kanäle, der bei pathologischen Veränderungen als unterbrochen bemerkt wird, oder die Reaktion auf Nadeln oder andere Stimulationen entlang der Kanäle. Es erscheint in Begriffen, die beispielsweise Dinge wie die Atmosphäre, Gerüche oder Feuchtigkeit bezeichnen. Es beschreibt von Personen ausgestrahlte Sympathie, ebenso wie die physische Aufruhr im Sinn von Wut (Wiseman 1994).

### **1.1.3 Grundlagen und Diagnostik der ganzheitlichen TCM-Behandlungsweise**

Die Wichtigkeit der Akupunktur innerhalb der TCM ist im Osten und Westen nicht gleich verteilt. Während in China der traditionellen Kräuterheilkunde mindestens ebenso viel Bedeutung zugesprochen wird wie der Akupunktur, ist die TCM im Westen vor allem über die Akupunktur verbreitet. Der ihnen gemeinsame philosophische Unterbau gilt hierbei in allen Teilen der TCM als unabdingbares Fundament.

Die traditionell chinesische Medizin imponiert oft mit der Diagnostik unerwarteter „Organstörungen“, welche mit westlichen Organdiagnosen oft nichts Ersichtliches zu tun

haben und insbesondere aus Übersetzungsschwierigkeiten zwischen den beiden medizinischen Systemen rühren. In der TCM gilt das sensuell erfasste Erscheinungsbild als Ausdruck des Zustandes besagter Lebenskraft in den verschiedenen Leitbahnen. Kann eine Dysbalance am Effektor ausgeglichen werden, folgt auch Besserung des Endorgans. Damit steht die traditionell chinesische Diagnostik in großem Gegensatz zu westlichen maschinellen, teils invasiven Verfahren zur Betrachtung des „Inneren“ (Blutuntersuchungen, Röntgen, Endoskopie, etc.).

Es gelten vier diagnostische Bereiche der TCM: das Betrachten, Befragen, Tasten und Auskultieren. In der Praxis besteht keine klare Abgrenzung zwischen diesen Untersuchungen. Besonders von westlicher Methodik zu unterscheiden ist die chinesische Gesichts-, Zungen- und Pulsdiagnostik, jeweils in Relation zu Entsprechungsorganen. Der Puls wird an den Radialarterien beider Hände getastet und auf zwei Ebenen an jeweils drei Punkten, mit je drei Fingern des Untersuchers gemessen. Die insgesamt zwölf Pulse sind ebenso wie die Zungenbereiche bestimmten Organkreisläufen zugeordnet. Je nach getasteter bzw. ersehener Qualität werden sie als momentaner Funktions- und Spannungszustand der entsprechenden Einheit – sprich der Präsenz von Qi – interpretiert. Die Konstitution überwiegt einzelne Symptome. Einzelne Symptome werden in Beziehung zum ganzen Körper gedeutet. Die Resonanz der einzelnen Körperteile zum ganzen Körper findet sich analog in der Beziehung von Mikro- zu Makrokosmos wieder (Maciocia e 2008).

In der chinesischen Nosologie werden die individuellen Befunde und Symptome nach acht diagnostischen Kriterien (Ba Gang) analysiert. Hieraus werden individuelle Störungsmuster der funktionellen Yin- und Yang- Organe (Zang und Fu) erörtert. Derart analysierte Störungsmuster gelten letztendlich als die Diagnosen der chinesischen Medizin, oft auch vereinfacht als Syndrome bezeichnet (Stux e 2008). Ohne die Kenntnis der Funktion der Zang- und Fu-Organen, deren genauere Erläuterung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, bleiben diese Syndrome jedoch unverständlich. Es sei auf Standardwerke der TCM verwiesen.

#### **1.1.4 Meridiansystem**

Europäische Ärzte verglichen die Qi-Kanäle mit den Meridianen der Erde, woher die deutsche Bezeichnung „Meridiansystem“ rührt. Die Ausbreitung von Qi im menschlichen Körper verläuft laut Standardwerken der Akupunktur über 12 Hauptleitbahnen

(Hauptmeridiane, Jing) und eine große Zahl von sekundären Leitbahnen, darunter acht außerordentliche Meridiane (Qi Jing Ba Mai). Von Letzteren sind zwei von besonderer Bedeutung: Ren Mai, zu Deutsch „Konzeptionsgefäß“, auf der Mittellinie der Körperfront verlaufend, und Du Mai, das „Lenkergefäß“, auf der Mittellinie der Körperrückseite. Diese beiden außerordentlichen Meridiane bilden zusammen mit den zwölf Hauptleitbahnen das System der 14 Hauptmeridiane. Auf diesen wiederum verlaufen die 361 klassischen Akupunkturpunkte und gelten als äußere Zugangspunkte zum Qi (Maciocia c 2008).

Die Akupunkturpunkte sind entsprechend ihrer Meridiane bestimmten Organkreisläufen zugeordnet. Diese wiederum stehen in Analogie zu den fünf Elementen (Holz, Feuer, Erde, Metall, Wasser), welche im Wandel ihrer Existenz ineinander übergehen („Wandlungsphasen“) (Maciocia d 2008). Die chinesischen Organkreisläufe und ihre Meridiane sind mit anatomischen Zusammenhängen im westlichen Sinn nicht vergleichbar: „Das Studium der Leitbahnen in der traditionellen chinesischen Medizin kann als Äquivalent zum Studium der Anatomie in der westlichen Medizin angesehen werden. Die chinesische Medizin gab der physischen Struktur des Körperinneren nur wenig Beachtung, ...“ (Deadman 2000). Anstatt mit am toten Körper erforschter Anatomie befasst sich die TCM mit einer Art energetischer Anatomie des Menschen, oder abstrakter ausgedrückt, mit der Anatomie von Einflüssen und Interaktionen. „Darüber hinaus gab es kein Studium der Verteilung der Nerven oder des Ursprungs und der Insertionsstellen der Muskeln. Die TCM beschrieb jedoch sehr detailliert die Verläufe einer großen Anzahl von Leitbahnen, die der Zirkulation des Qi und des Blutes in jeden Körperteil dienen.“ (Deadman 2000).

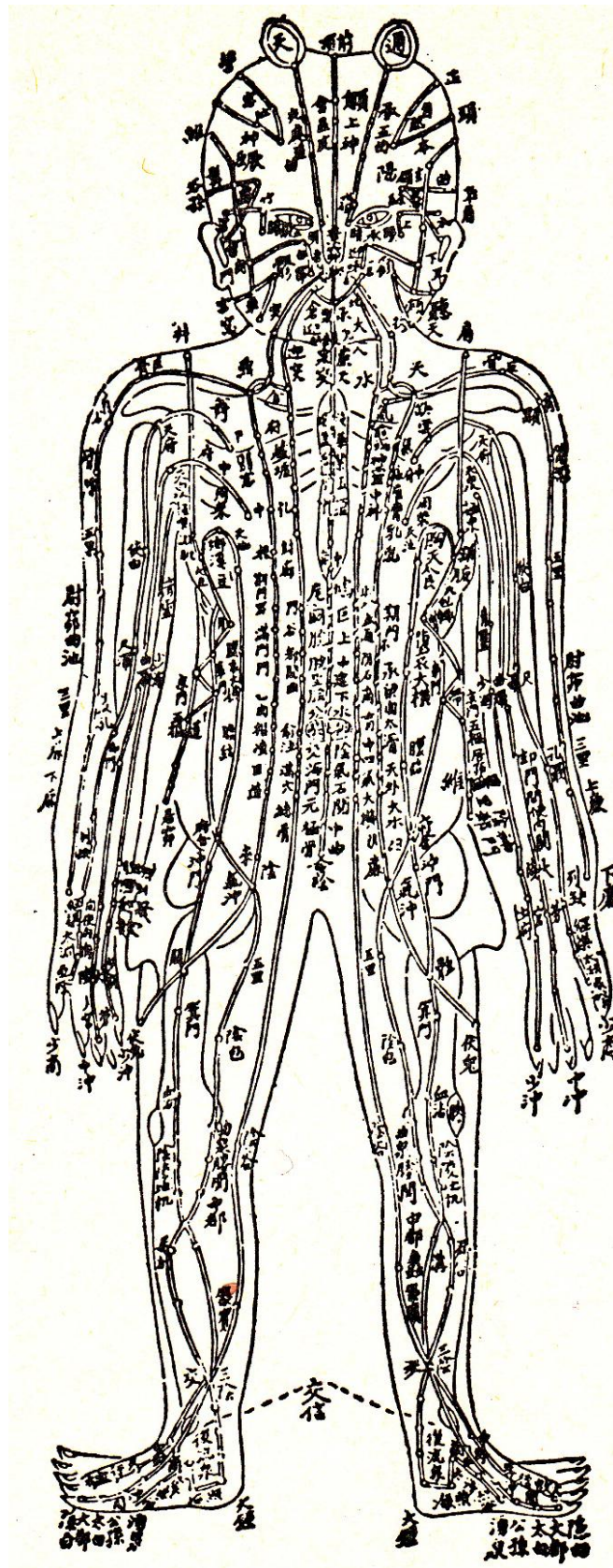


Abbildung 2: Duke. Alte Akupunkturtafel, die Meridiane und Punkte angibt und schriftlich bezeichnet. Ca. 500 v. Chr. (Duke b 1973)

Bei der Störung oder Blockierung der strömenden Lebensenergie (Qi) wird von Energiefülle, -Leere, sowie von Kälte- oder Hitze-Überschuss bzw. -Mangel gesprochen. Der chinesischen Terminologie näher liegend sind Bezeichnungen wie Yin- oder Yang-Schwäche, bzw. deren Fülle. Des Weiteren wird zwischen so genannten „inneren“ (Li) und „äußeren“ (Biao) Krankheiten unterschieden. Hierbei handelt es sich um in Herkunft und Lokalität differierende Krankheitsbilder. Es existieren elf Organe bzw. Funktionskreisläufe. Sie werden in sechs Yang-Organen und fünf Yin-Organen unterteilt. Während die Yang-Organen, auch genannt Fu-Organen, die Hohlorgane Dick- und Dünndarm, Magen, Blase, Gallenblase und „Sanjiao“ umfassen, meinen die Yin-Organen, auch als Zang-Organen betitelt, die Speicherorgane wie Lunge, Herz, Herzbeutel, Milz- Pankreas, Niere und Leber.

In der TCM gibt es ebenso wie in der westlichen Medizin klassische, klar definierte Krankheitsbilder. Viele Krankheitskategorien ähneln sich. Schwierigkeiten beim Vergleich der Krankheitszustände machen nicht zuletzt die Übersetzungen aus dem Chinesischen in Begriffe der westlichen Medizinliteratur. In manchen Fällen wurden chinesische Auslegungen westlich-medizinischer Fachbegriffe in chinesische Fachtermini übernommen während in anderen Fällen neue erfunden wurden. So ergeben sich Präzedenzfälle im Umgang mit der Übersetzung, welche schließlich einheitlich und unter Vermerk eventueller Bedeutungsabweichungen vom Ursprung des Begriffes festgehalten sein sollten (Wiseman 1994).

### **1.1.5 Elektroakupunktur**

Das Drehen der Akupunkturnadeln nach Einstich in die Zielregion in einem Drehwinkel von 90°-180° erzeugt je nach Stärke der Manipulation eine Frequenz zwischen 1-8 Hz (Lian b 2004). Hierdurch wird in vielen Fällen eine stärkere Wirksamkeit der Behandlung erreicht, weshalb in China die auf die gleiche Weise funktionierende Methode der Elektroakupunktur (EA) entwickelt wurde. Im klassischen Modell wird hierbei auf die platzierten Nadeln elektrischer Strom in ähnlich niedriger Frequenz (2-4 Hz) wie bei der manuellen Manipulation gegeben. Im fernen Osten sowie auch in Europa werden heute sehr viele Akupunkturbehandlungen, insbesondere zur Schmerzstillung, in Form der EA - mit besseren Erfolgen als durch manuelle Akupunktur - praktiziert (Sator-Katzenschlager 2004, Han 2011).

### **1.1.6 Akupunkturschema bei Spinalläsion**

In der TCM wird die Spinalläsion als Störung des hinteren Mittelkanals (dt.: Lenkergefäß, engl.: Governor Vessel, chin.: Du-Mai) gesehen, dessen Blockierung zu einer plötzlichen Stagnation der Lebensenergie und des Blutflusses führt. Dieser Meridian reicht vom Unterbauch über das Perineum hin zum Inneren der Wirbelsäule. Jene durchläuft er aufwärts zum Genick und setzt sich ins Gehirn fort. Entlang der Mittellinie der Schädeldecke reicht er hinauf bis zum Vertex und beginnt dort seinen Abstieg über Stirn, Nase, Oberlippe und endet schließlich an deren Frenulum. Das Lenkergefäß birgt Yang-Qi, sprich, die aufsteigende Energie des Körpers. Schädigungen dieses Kanals werden folglich als Yang-Störungen klassifiziert (vgl. Kapitel 1.1.2. philosophische Grundsätze). Diese reichen über alle Abstufungen mangelnder Aktivität bis hin zur ernsthaften Körperschwäche, einschließlich der Spinalläsion (Gao 1996). Nach traditionell chinesischer Erklärung geht es beim angewandten Behandlungsmuster darum, das stagnierte Qi in dieser Bahn zu stärken bzw. zu regulieren und so das Rückenmark direkt oder über Reflexbahnen zu stimulieren (Schnorrenberger 1992). Weitere, in diesem Rahmen genutzte Akupunkturpunkte liegen auf anderen Yang-Meridianen und unterstützen die Stärkung des verletzten Mittelkanals. Die Darstellung des Schemas ist in Abbildung 5 zu finden. Bei der Behandlung kranker Patienten wird auf die Differenzierung von Symptomen und Zeichen eingegangen.

### **1.2 Klinische Wirksamkeit der Akupunktur**

Die Wirksamkeit der Akupunktur fällt, so wie es sämtliche im Folgenden zitierte Forschungsarbeiten bestätigen, seit den 70er Jahren auch unter naturwissenschaftlichen Messvoraussetzungen positiv aus. Zahlreiche naturwissenschaftliche Untersuchungen (Chapman 1977, Han 2002, Shin 2009) widerlegen die mittlerweile weitgehend veraltete Vermutung, der zufolge die Wirksamkeit der Akupunktur mit Plazeboeffekten (Wall 1972) zu erklären sei. Auch die seit jeher erfolgreiche Akupunkturbehandlung an Tieren (Chan 2001) und kleinen Kindern (Ochi 2013, Wong 2010) spricht gegen eine solche Pseudowirkung.

Zum einen wurde über die letzten Jahre die Wirksamkeit des altchinesischen Heilungssystems erforscht, zum anderen wurden Anstrengungen zum Ergründen

ursächlicher Zusammenhänge unternommen.

Parallel zum Überspringen der 10-Millionen-Dollar-Grenze zur Erforschung der Akupunktur und Alternativmedizin in Bezug auf diverse Krankheitsbilder in den USA im Jahr 2002 (Stux b 2008) wurde die deutsche GERAC-Studie (German Acupuncture Trials) angesetzt. Über einen Zeitraum von drei Jahren (2002-04) behandelte man mehr als 2.000 Patienten mit chronischem Kreuz- bzw. chronischem Knieschmerz mit einer Verum-Akupunktur nach den Regeln der TCM, einer sog. Sham-Akupunktur – bei der nach Lehre der TCM eigentlich unwirksame Punkte gestochen werden – oder mit einer Standardtherapie der westlichen Schulmedizin. Es wurde festgehalten, dass Akupunktur ein bei chronischen Rücken- oder Knieschmerzen wirksames Verfahren ist, welches zu einer klinisch relevanten Minderung der Schmerzsymptomatik und damit verbundener Begleitsymptomaten führt. Das in Fachkreisen breit diskutierte Problem der GERAC-Studien ist die Sham-Akupunktur, welche der Wirkung von Verum-Akupunktur in nichts nachstand.

Der scheinbar am besten untersuchte Bereich der Akupunktur ist die Akupunktur-Analgesie. In diesem Fachgebiet ließen sich in China sowie im Westen anhand zahlreicher Untersuchungen eindeutig signifikante Ergebnisse gewinnen (Wang Q a 1990, Wang Q b 1990), beispielhafte Studien finden sich in nachfolgenden Kapiteln zitiert. Derzeit erfolgreiche Behandlungsfelder der Akupunktur umfassen nicht zuletzt die postoperative Schmerzreduktion (Hamza 1999), die Behandlung unterer Rückenschmerzen (Ghonaime 1999, Hamza 1999) und diabetischer Neuropathie (Hamza 2000) sowie spastischen Muskelschmerz spinalen Ursprungs (Wang JZ 2000). Auch genaueren epidemiologischen Aspekten der Schmerzlinderung durch Akupunktur wurde in jüngster Zeit nachgegangen, nicht zuletzt durch Kollegen der Charité in Berlin (Witt 2011).

### **1.2.1 Wirksamkeit der Akupunktur bei ZNS-Schäden**

Bereits seit den 70er Jahren werden insbesondere aus China stammende breitflächige Untersuchungen zur Akupunkturwirkung bei Spinaltrauma mit stark positivem Outcome verbreitet. Den meisten der früheren Studien in diesem Gebiet mangelt es jedoch an unabdinglichen Kontrollgruppen (Schnorrenberger 1992). 2009 erstellten Shin und Kollegen eine Zusammenfassung von sieben chinesischen Forschungsuntersuchungen zu SCI-Akupunktur, welche ebenfalls eine hohe Rekonvaleszenzrate unter

Akupunkturbehandlung beschreiben. Neben ausbleibenden Kontrollgruppen fehlt auch hier die Verblindung in fast jeder der bearbeiteten Untersuchungen (Shin BC 2009).

Eine randomisierte Kontrollstudie lieferten schließlich Wong und seine Kollegen. Unter den 50 akupunktierten SCI-Patienten mit initialem ASIA Score A oder B erreichte eine signifikante Anzahl bessere sensomotorische Fähigkeiten als die 50 Goldstandard-Kontrollpatienten. Dies manifestierte sich sowohl im ASIA-Score, als auch in spezifischeren Bewegungsscores (Wong 2003). Die vollständige Durchtrennung des Rückenmarkes lasse sich allerdings mit Akupunktur ebenso unzureichend behandeln wie durch Methoden der westlichen Schulmedizin. Was den Zeitpunkt der Akupunkturbehandlung betrifft, wird der Zustand des spinalen Schocks für den zeitlich am besten geeigneten Behandlungsbeginn gehalten (Wang H 1992).

Bemerkenswerte Untersuchungen zum EA-Effekt speziell in Bezug auf neurogene Blasenentleerungsstörung bei Querschnittslähmung führten P.T. Cheng (Cheng PT 1998) und seine Kollegen durch. Die Hälfte von 80 ausgewählten Patienten mit Spinalläsion mit konventionell intermittierender Katheterisierung erfuhren EA an vier klassischen Punkten. Die andere Hälfte der Betroffenen unterzog sich einem anerkannten Blasentrainingsprogramm. Die Zeit bis zur balancierten Blasenentleerung war bei der akupunktierten Patientengruppe mit einem Durchschnitt von 57,1 +/- 22,5 versus 85,2 +/- 27,4 Tagen signifikant kürzer als bei der Kontrollgruppe. Zwischen oberer und unterer Neuroläsion bestand kein ausschlaggebender Unterschied. Auch in dieser Analyse fiel eine direkte positive Beziehung zwischen Trauma-zeitnahe Akupunktur und Balancierung der Blasenaktivität auf.

Wie bereits erwähnt, scheint die Behandlung der vollständigen Markdurchtrennung durch Akupunktur nicht möglich, und manche Autoren vertreten die Meinung, dass bei kompletter Querschnittslähmung mit areflektorischer Blase keine Blasenkontraktilität erreicht werden könne. Wyandaele (Wyandaele 1991) jedoch wies auf die Existenz einer afferenten Nervenstrombahn von der Blase zum zerebralen Kortex bei über einem Drittel der klinisch komplett querschnittsgelähmten Patienten hin. Ähnlich gilt laut Dimitrijevic (Dimitrijevic 1988) eine Mehrheit der so genannten klinisch kompletten Querschnittsverletzungen eigentlich als subklinisch inkomplett, wobei nachweislich neuronale Signalübertragung zwischen Segmenten über- und unterhalb der Durchtrennungsebene besteht. Folglich könnte Elektroakupunktur die verloren gegangene Detrusorkontraktilität durch das Aktivieren der existenten Nervenfasern provozieren, wie es Cheng in oben genannter Untersuchung zeigte.



## 1.2.2 Modelle zur Wirkungsweise der Akupunktur

Verschiedenste Denkansätze und Sichtweisen prägen die Erforschung der Wirkungsweise der Akupunktur. Das am weitesten verbreitete Erklärungsmodell zur Wirkungsweise der Akupunktur bezieht sich auf neuronale Zusammenhänge der Akupunkturpunkte und -meridiane. In den 70er Jahren stellten verschiedene Autoren das Zusammenfallen vieler Akupunkturpunkte (71%) mit Triggerpunkten fest (Gunn 1980, Melzack 1977). Dies lässt auf die nadelbedingte Aktivierung sensorischer Nerven an diesen speziellen Punkten schließen, welche teils von Muskeln, teils von der Haut ausgehen. Sie leiten Schmerzsignale, wie auch propriozeptive- und Berührungsreize. Laut Thalmann spielt hier vermutlich die Vermaschung der Regelkreise der Haut mit den Regelkreisen der einzelnen Organe entsprechend der Head'schen Zonen eine besondere Rolle (Thalmann 2005).

Einen hormonell bedingten Wirkungsansatz lieferte Cai (Cai 1992) mit dem Nachweis hoher Konzentrationen an Neurotransmittern und Hormonen neben peripheren Nervenendigungen innerhalb der tatsächlichen Akupunkturpunkte. Auch diese Hormone könnten Hemmung, Steigerung oder beides zugleich an Zielnerven bewirken.

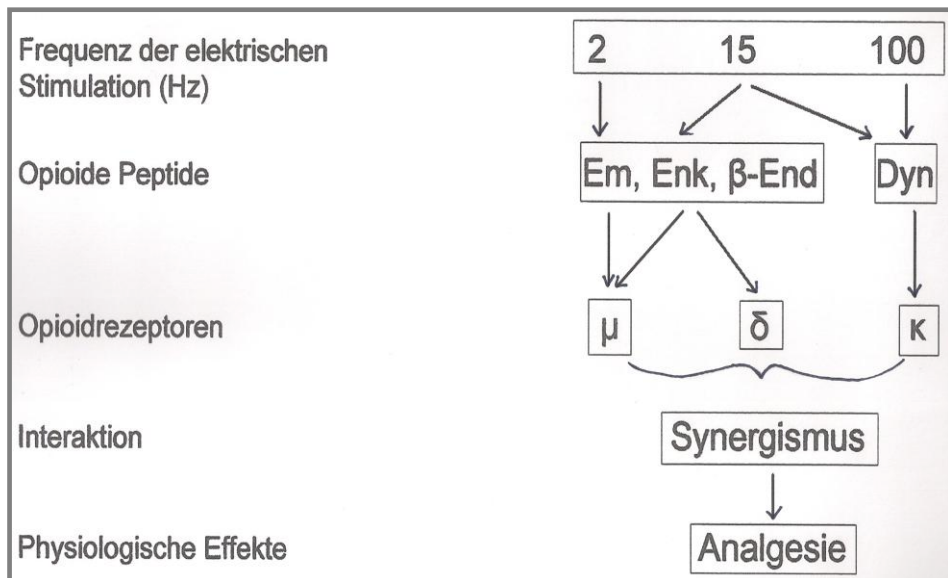
Ein weiterer Ansatz auf der Suche nach naturwissenschaftlich erklärbaren Zusammenhängen der chinesischen Leitbahnen mit anatomischen Gegebenheiten liegt in der Untersuchung der genauen Morphologie der Akupunkturpunkte. Der wasserreiche, diese Gefäß-Nerven-Bündel umlagernde Perforationsbereich ermöglicht eine physikalische Erklärung für die elektrische Akupunkturpunktmessung auf Basis eines elektrisch niederpotenziellen Hautwiderstandes an Akupunkturpunkten. Dieser wurde zuletzt von Pomeranz durch biometrische Methoden durchgeführt und teilweise sichergestellt (Stux f 2008). Die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse ließe das Modell direkter, von lokalen Nervenverdichtungen ausgehender Reizübertragung als morphologische Basis für die Akupunkturpunkte und -meridiane dienen.

Auch zahlreiche Forschungsergebnisse der Neurophysiologie und Neurochemie bestätigen den Wert dieser auf praktisch angewandter Philosophie etablierten Kunst. Zum einen wurde bereits in den 70er Jahren ein opioidergischer Mechanismus bei der Vermittlung von Akupunkturanalgesie erkannt und anhand diverser Untersuchungen bestätigt (Mayer 1977, Sjolund 1979). Übereinstimmend hob die Mikroinjektion von Naloxon in das periaquäduktale Grau und den Hypothalamus im Tierexperiment die Analgesiewirkung der Akupunktur auf (Wang Q a 1990).

Des Weiteren ist belegt, dass Niederfrequenzstimulation somatischer Nerven selektive und langanhaltende Unterdrückung vasokonstriktorischer Komponenten der im Mittelhirn evozierten kardiovaskulären Schutzantwort erzeugt (Lovick 1995). Diese Untersuchungen bestätigen nicht nur, dass EA-Analgesie naloxonreversibel ist (Pomeranz 1979), sondern stellen auch die an der Akupunkturanalgesie beteiligten Hirnregionen dar. Überdies sind die Endorphinwirkungen in drei Gehirnbereichen (Rückenmark, Mittelhirn und Hypothalamus) nachweisbar.

Dieser opioiderge Wirkungsmechanismus scheint laut weiterführender Untersuchungen nicht der einzige neuroaktive Einfluss der Akupunktur zu sein (Stux c 2008). Die Interaktion der Akupunktur mit verschiedenen zentralnervösen Strukturen wird sowohl in Abhängigkeit der Reizfrequenz als auch betreffs unterschiedlicher Transmitter als spezifisch beobachtet (Chen S 2002, Han JS 2004, Ma SX 2004, Stux c 2008) und in Hinsicht auf gewisse Bereiche anhand Dynorphin- und Enkephalininhibitoren in Kombination mit vorangegangener Akupunkturbehandlung bestätigt (Han JS 2002). Die genauen neuronalen Leitungsbahnen und Neurotransmitter der nicht-opioidergen Effekte der EA (die lange Induktionszeit und die langanhaltenden Effekte der Akupunktur) sind weitgehend unbekannt (Ma SX 2004).

**Abbildung 3 (Stux c 2008): Mögliche Mechanismen des analgetischen**



**Akupunktur- Effektes.** Bei Akupunkturanalgesie mitwirkende Opioidpeptide und -rezeptoren. Eine Reizfrequenz von 2 Hz führt zur Enkephalinausschüttung. Bei einer Frequenz von 15 Hz sind beide Komponenten der dargestellten Reizverarbeitung beteiligt. 100 Hz Stimulierung führt zur Ausschüttung von Dynorphin. Abkürzungen: Em, Endomorphin; Enk, Enkephalin; β-End, β-Endorphin; Dyn, Dynorphin. Simultanes Inkrafttreten aller drei Opioidrezeptortypen führt zum synergistischen analgetischen Effekt.

Parallel zur Entwicklung der modernen Hirnforschung wird die Akupunkturwirkung mit den voranschreitenden Erkenntnissen im Bereich zentraler autonomer Regulation von somatosympathischen Reflexen und zentraler Schmerzverarbeitung abgeglichen und nicht zuletzt in feinen Aspekten belegt (Chen S 2003, Leem 1994, Ma SX 1997, Ma SX 2002).

### **1.2.3 Neuronale und biochemische Auswirkungen von Akupunktur**

Elektroströme zwischen 1 und 10 mA wurden u.a. 1992 in einer Untersuchung von Wang (Wang H 1992) et al. angewandt, welche der Wirksamkeit verschiedener traditionell chinesischer wie auch westlicher Behandlungsmethoden der (unvollständigen) traumatischen Paraplegie an mehreren Patientengruppen nachging. Ströme dieser Stärke können nachweislich einen fördernden Effekt auf das Nervenwachstum haben (Mcdevitt 1987, Pomeranz 1986).

Ein zur Behandlung des Spinaltraumas genutztes klassisches Akupunkturmuster wurde in Kapitel 1.1.6 und Abbildung 5 beschrieben (Gao 1996, Wong 2003). Hierzu gehören spezielle Punkte auf dem so genannten Lenkergefäß (engl. Governorvessel, chin. Du-mai), darunter Baihui, Dazhui und Mingmen. Die Blockade dieses Meridians gilt im chinesischen Verständnis als das essentielle Problem der Rückenmarksverletzung. Per Nadelsetzung soll eine solche Energieblockade reguliert werden. Sowohl an Tieren wie auch beim Mensch wurde aufgezeigt, dass entsprechende Akupunktur Sekundärschäden des Spinaltraumas eingrenzen kann (Han QM 2005, Xie 2006). Insbesondere die Stimulation des an der Kopfkronen gelegenen Punktes Baihui ließ sich im Rattenmodell als fördernd bezüglich der zentralen Neurotransmission von Monoaminen nachweisen, was eine Zunahme spontaner lokomotorischer Aktivität der Versuchstiere bedeutete (Chang 1996). Chen et al kamen 2008 zu dem Ergebnis, dass EA des Lenkergefäßes zu NT-3 Sekretion im verletzten Rückenmark führt und die Differenzierung transplanteder neuronaler Stammzellen in neuronähnliche Zellen am Verletzungsort fördert (Chen YY 2008). In Kombination mit neuronaler Stammzelltransplantation erreicht EA des Lenkergefäßes axonale Regeneration und funktionelle Verbesserung im komplett durchtrennten Rückenmark von Ratten (Li XB 2004).

Dieses Thema führten Y. Ding und Kollegen (Ding 2009) noch einen Schritt weiter, indem sie den Effekt von EA auf das Überleben und die Differenzierung transplanteder

mesenchymaler Stammzellen (MSZ) sowie die axonale und funktionelle Regeneration in Ratten mit durchtrenntem Rückenmark evaluierten. Es zeigten sich deutlich positivere sensomotorische und vegetative Ergebnisse der akupunktierten, SZ-transplantierten Tiere im Vergleich zu detailliert erstellten Kontrollgruppen. Per Fluoreszenz-Immunochemie konnte eine Differenzierung in neuronähnliche Zellen und Oligodendrozyten eingegrenzt werden, was mit einer Erhöhung der NT-3- und cAMP-Spiegel im verletzten Markgewebe einherging. Die Latenzzeit auf evozierte Rückenmarkspotentiale war bei genannter Gruppe bedeutsam kürzer, die Überlebenszeit signifikant länger. Die Autoren diskutieren cAMP, welches als starkes Überlebenssignal für Neurone gilt (Hanson 1998, Dugan 1999), als bedeutsamen Faktor im noch ungeklärten biochemischen Akupunkturmechanismus. So wäre denkbar, dass das pulsierende elektrische Feld der EA-Therapie die Depolarisation von Neuronen herbeiführt, was wiederum den  $Ca^{2+}$ -Einstrom über L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle bewirken würde, mit der Folge der  $Ca^{2+}$ -induzierten Erhöhung des cAMP-Spiegels über die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Adenylzyklase (Cooper 1995). Abgesehen davon ist eine intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Erhöhung aufgrund neuronaler Depolarisation im Stande, autokrine neurotrophe Mechanismen zu stimulieren, was zur Synthese und Freisetzung neurotropher Faktoren wie NT-3 und BDNF durch die Neuronen selbst führt (Gosh 1994, Hansen 2001).

Auch Cheng et al (Cheng H 2008) interessierten sich für die neuronale Akupunkturwirkung und unternahmen Nadelungen an Mäusen mit charakteristischer Alzheimer-Symptomatik (senescence-accelerated mouse prone 8, SAMP8) entsprechend für Demenz- und Alterungsmodellen als günstig erwiesenem Akupunkturmuster (Takeda 1997, Chu 2005, Ding 2006). Im Gegensatz zu den Sham-akupunktierten sowie nicht-akupunktierten Kontrollen zeigte sich eine signifikante Verbesserung kognitiver Fähigkeiten der verum-akupunktierten Gruppe. Aus den mikroskopischen Untersuchungen schließen die Autoren, dass Akupunktur die Zellproliferation in verschiedenen Hirnregionen von SAMP8-Mäusen induzieren kann. Letzten Endes sprechen die Ergebnisse der Untersuchungen von Cheng und Kollegen für einen Einfluss der Akupunktur auf den Ursprung, die Entwicklung, Reifung und das zukünftige Verhalten/Funktion proliferierter Nervenzellen, welche zum Lern- und Gedächtnisprozess von SAMP8-Mäusen beitragen.

Nach Akupunktur bei ZNS-Schäden könnten auch bei Menschen mit spinaler Schädigung positive zellbiologische Effekte denkbar sein.

### 1.3 Spinalläsion

Die jährliche Inzidenzrate der Spinalläsion (Synonym: Spinaltrauma, Para- bzw. Tetraplegie, spinales Querschnittssyndrom, Querschnittläsion) beträgt 15-40 pro Million. Es sind hauptsächlich Menschen zwischen 10 und 40 Jahren betroffen.

Neben traumatischen Ursachen können pathologische Frakturen, Tumore, iatrogene oder traumatisch bedingte peridurale oder intraspinale Hämatombildung sowie neurologische Symptomkomplexe (z.B. Syringomyelie) für das Krankheitsbild der Querschnittslähmung verantwortlich sein (Striebel 2005, Trenz a 2001). Die traumatische Spinalläsion entsteht durch Verletzung des Rückenmarks oder Nerven der Cauda Equina durch Wirbelkörperfraktur oder Verschiebung der Disci Intervertebrales. Schädigungen von C4 oder darüber sind aufgrund der einhergehenden Zwerchfellläsion mit 7,1fach erhöhter Mortalitätsrate assoziiert als Verletzungen unterhalb C4 ( $p=0,01$ ) (Daneshvar 2013). Ein voll ausgeprägtes spinales Querschnittssyndrom mit hoher Läsion (HWS-Bereich) läuft in drei Phasen ab. Initial kommt es über nur wenige Minuten zu arterieller Hypertonie, gefolgt vom spinalen Schock. Kompletter Ausfall von Sensibilität, Motorik und Muskeleigenreflexen unterhalb der Querschnittshöhe sind unmittelbare Auswirkungen. Auch in den ersten posttraumatischen Wochen bis Monaten folgen hypotone Krisen, schlaffe Lähmung in abhängigen Segmenten, Ausfall der Muskeleigenreflexe und Kontrollverlust von Blase und Mastdarm. Im Gegensatz dazu ist die chronische Phase durch eine übersteigerte Regulation gekennzeichnet, worunter spastisch überhöhter Muskeltonus, übersteigerte Muskeleigenreflexe, Rigidität und autonome Hyperreflexie zu nennen sind. Auf Seiten des Gefäßsystems sind Blutdruckspitzen möglich. Die Willkürmuskulatur kann mit unkontrollierbaren Beugesynergien reagieren, die anfallartigen Charakter haben. Die Mehrzahl der Patienten mit Spinalläsion leidet neben den meist lebenslangen sensomotorischen und vegetativen Behinderungen insbesondere auch an chronisch neurogenen Schmerzen. Einhergehend mit hohem Langzeitüberleben in Ländern mit gehobenem Entwicklungsstatus bestehen enormer persönlicher Leidensdruck und auch beträchtliche Kostenfaktoren gegenüber der Gesellschaft (Sekhon 2001).

Zur systematischen Einschätzung des neurologischen Schadens wird die Klassifikation nach Frankel herangezogen, die von der American Spinal Injury Association (ASIA) modifiziert wurde. Hierunter findet sich eine Schweregrad-Abstufung von A (Komplette Verletzung: keine motorische oder sensible Funktion unterhalb der Verletzungshöhe)

bis E (Erholung: normale Motorik und Sensibilität, pathologische Reflexe können persistieren) (Maynard 1997).

Nach Spinaltrauma führen sowohl die primären mechanischen Verletzungen des Rückenmarkes als auch diverse sekundäre Verletzungen zu Axonruptur, Zelltod und Ruptur von Blutgefäßen. Hinzukommende perifokale Ödeme und fehlende neuronale Wiederherstellung münden in funktioneller Behinderung. Hierbei wirken Apoptose, verminderte Perfusion, Entzündung und Narbenbildung als die Neuroregeneration hemmende Faktoren.

Nachdem Axone im Vorgang des akuten Traumas durchtrennt wurden, degeneriert in der chronischen Phase deren distales, vom Zellkörper geteiltes Segment, während das proximale Nervenende gewöhnlich überlebt und theoretisch auch zur Neuaussprossung fähig ist. Myelinassoziierte Proteine und die Glianarbe – bestehend aus reaktiven Astrozyten, glialen Progenitorzellen, Mikroglia, Makrophagen, Fibroblasten und Schwannzellen – welche alsbald die Rupturseite der denervierten Axonaltrakte umgibt, behindern das axonale Wachstum (Schwab 2004, Busch 2007, Hyun 2010). Auch die von reaktiven Astrozyten exprimierten Chondroitinsulfat-Proteoglykane gelten als wachstumshemmende Moleküle und unterdrücken die axonale Wiederaussprossung (Busch 2007). Gleichwohl haben andere Untersuchungen eine nützliche Rolle der Glianarbe während der akuten Phase (1-2 Wochen) nach Rückenmarksverletzung aufgewiesen: transgene Mäuse mit erhöhter Astrozytenmigration zeigten bei frühzeitiger Glianarbenbildung eine raschere Genesung (Okada 2006). Die Elimination reaktiver Astrozyten oder die Inhibition ihrer Migration und folgender posttraumatischer Narbenbildung ergab des Weiteren eine gestörte Reparatur der Blut-Hirn-Schranke begleitet von massiver Infiltration inflammatorischer Zellen und vermehrtem Untergang von Neuronen und Oligodendrozyten bei schlechterem funktionellen Ergebnis (Faulkner 2004, Okada 2006). Somit scheint eine initiale Astrozytenantwort wichtig zur Eindämmung der Entzündungsreaktion, jedoch kann dies auf Kosten axonaler Wiederaussprossung geschehen.

Sekundäre, die Heilung unterbindende Mechanismen, als da wären lipide Peroxidation, Ödeme und eine Vermehrung an freien Radikalen und übersteigerte Transmitterausschüttung, werden am Ort des Querschnitttraumas oft durch Ischämie herbeigerufen und führen zum Tod verschiedener Zellen der näheren Umgebung (Sekhon 2001). Zerstörender noch als der Zelltod ist der Verlust an Oligodendrozyten und die mangelnde Expression myelinassoziiierter Gene, so dass selbst bei der

häufigen inkompletten Querschnittslähmung völlige Funktionsaufgabe auf dem Grund der Demyelinisierung stattfindet. Mangels Isolierung durch Myelinscheiden verschlechtert sich die Leitungsfähigkeit elektrischer Impulse übriger, nahe des Querschnitts gelegener, aber nicht betroffener Axone (McDonald 2006).

In der chinesischen Medizinlehre bedeutet Spinalläsion die Störung eines bestimmten Meridians, des sogenannten Lenkergefäßes. In der TCM ist das Ziel, bei der Durchtrennung des größten Nervenstranges im menschlichen Körper verlorene Energiebahnen wiederherzustellen, um die Funktion dieser Nerven ansatzweise zurückzuholen. Die genaue Vorgehensweise der Akupunktur bei Spinalläsion wird in Kapitel 2.3.2 „Behandlungsschema der Akupunktur bei Spinalläsion“ beschrieben.

### **1.3.1 Therapie der Spinalläsion**

Bisher sind keinerlei kurative Therapien der Spinalläsion bekannt. Die Versorgung in der akuten Phase ist durch äußerst schonenden Transport, symptomatische Behandlung zur Kreislaufstabilisierung und frühzeitige (innerhalb von 8 Stunden), hochdosierte Kortikosteroidgabe darauf begrenzt, weitere Verletzungen zu verhindern. Kortikosteroide wie Methylprednisolon erwiesen antiapoptotische Effekte auf Oligodendrozyten wie auch antiinflammatorische und antioxidatorische Effekte (Xu 2009, Barnes PJ 1998). Aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen wie Infektionen oder gastrointestinalen Komplikationen sowie unzureichender Evidenz für eine Standardbehandlung des SCI bleibt diese Intervention jedoch stark umstritten (Hyun 2010). Seit über 40 Jahren ist die baldige chirurgische Stabilisierung und Dekompression je nach Nutzen-Risiko-Abwägung die Therapie der Wahl um Spätschäden vorbeugen (Trenz b 2001, Fogaca 2012). In der subakuten und chronischen Phase richtet sich die Behandlung auf symptomatische Erleichterung (z.B. gegen Schmerz oder opportunistische Infektionen) und Physiotherapie aus (Baptiste 2007). Letztere stimuliert nachweislich u.a. intrinsische neuronale Regelkreisläufe (Ferreira 2010).

In den letzten Jahren entwickelten sich schließlich einige pharmakologische Therapieansätze zu neuroprotektiver und neurorestaurativer Behandlung der inkompletten Spinalläsion. Die meisten Untersuchungen zu derartigen Pharmazeutika befinden sich in experimentellen Stadien, wenige laufen bereits als Phase-3 Studien (Bryan 2010, Domingo 2012, Jefferson 2013).

Das direkte Übertragen von Neurotrophinen (Schnell 1994) in die cerebrospinale Flüssigkeit oder den intraparenchymalen Raum sowie die Beeinflussung inhibierender Faktoren (wie z.B. Chondroitinase ABC) (Jefferson 2011) hatte aufgrund kurzer Halbwertszeiten und schneller Elimination nur beschränkten Erfolg. Auf der Suche nach Methoden struktureller und funktioneller Restauration nach SCI wurde in den letzten beiden Jahrzehnten intensiviert nach molekularen und zellulären Mechanismen geforscht. Hierbei wurden insbesondere myelinbasierte Inhibitoren, welche die axonale Aussprossung hemmen, extrazelluläre Matrixkomponenten sowie diffusionsfähige Chemorepellents untersucht (Busch 2007, Giger 2010). Auch Stimulatoren des axonalen Wachstums wie neurotrophe Faktoren und die Aktivierung von Wachstumsprogrammen, welche die begrenzte intrinsische Regenerationsfähigkeit verletzter Neurone unterstützen gehören zu den im Fokus stehenden Forschungsgebieten (Thuret 2006, Busch 2007). Um diese Ansätze voll nutzen zu können und den Parenchymverlust des Rückenmarks zu kompensieren bzw. um das verletzte Gewebe zur Regeneration zu führen bedarf es Zellersatzstrategien. Besonders hoffnungstragend sind moderne, aber noch nicht ausreichend gereifte Forschungsansätze zur Stammzelltransplantation nach Spinalläsion (Enzmann 2006, Parr 2007, Sharp 2007) bis hin über nicht-virale Gentherapie zur Transfektion endogener Zellen und Produktion therapeutischer Moleküle (Yao 2012).

Weitere Ansätze umfassen den Einsatz autologer Stammzellen (Mendoza 2014).

## **1.4 Stammzellen**

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick zu Definition, Differenzierung und klinischer Relevanz der Stammzellen (SZ) gegeben. Erläuterung von Theorie und Praxis der Stammzelltransplantation bei Paraplegie dient als Diskussionsgrundlage für potenzielle Wirkungsweisen der Akupunktur bei Spinalläsion.

### **1.4.1 Definition, Differenzierung und klinische Verwendung der Stammzelle**

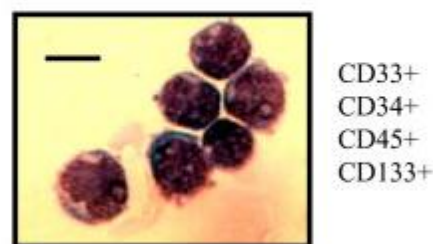
Der Sammelbegriff „Stammzellen“ (SZ) bezieht sich im allgemein auf Körperzellen mit besonderem Proliferations- bzw. Selbsterneuerungspotential, welche zudem zu besonderer Plastizität bzw. Differenzierbarkeit fähig sind (Eblenkamp 2008).



Die ontogenetische Entwicklung embryonaler SZ verläuft über fetale und neonatale Stadien zu SZ der drei Keimblätter (endo-, meso- und ektodermal) und damit zu adulten Stammzellen. Diese wiederum unterscheiden sich in spezifische SZ verschiedener Gewebetypen (hämatopoetisch, mesenchymal und neuronal), welche sie – hauptsächlich – generieren und aus welchen sie wiederum geerntet werden können (Sander 2012). Neuronale SZ und somit alle ihnen folgenden Nervenzellen entstehen aus dem ektodermalen Keimblatt. Bis in die 90er Jahre galt die Überzeugung, dass im adulten Organismus keine weitere Neurogenese stattfindet. Diese Hypothese wurde in den letzten beiden Jahrzehnten von verschiedenen Wissenschaftlern widerlegt (Emsley 2005, Kempermann 2012, Kalandarishvili 2012). Von adulten SZ nahm man lange an, sie seien – im Gegensatz zu embryonalen SZ – in ihrem Phänotyp insoweit determiniert, dass sie zwar über lange Zeit proliferieren, sich aber nur in die Zellen ihres bestimmten Gewebetyps differenzieren können (Martin-Rendon 2003, Prockop 2003, Weissman 2000). Die experimentelle Transplantation von neuronalen adulten Stammzellen aus Mäusegehirnen in Maus- oder Hühnerembryonen jedoch resultierte in deren Differenzierung in Gewebe aller drei Keimblätter (Clarke 2000). Adulte SZ sowie ihre Effektorzellen entstehen über viele Reifungsstufen u.a. im Knochenmark unter Mitwirkung verschiedener Zytokine. Ihre Mobilisierung bedeutet ein Loslösen dieser SZ aus dem Knochenmark und das Einwandern in die Blutbahn. Als Homing bezeichnet man den umgekehrten Vorgang. Sowohl Homing als auch Mobilisierung sind von spezifischen Mobilisierungs- und Migrationsfaktoren abhängig.

Im Allgemeinen sind hämatopoetische Stammzellen mit ihrer Größe zwischen 10 und 15µm lichtmikroskopisch sichtbar (s. Abbildung 4). Ihr Erscheinungsbild entspricht dem eines kleinen bis mittelgroßen Lymphozyten (Hoffbrand 2001).

*Post isolation*



**Abbildung 4.** Moldenhauer 2008. Hämatopoetische Stammzellen nach Isolierung. Größenbar: 1µm.

SZ dienen als Modellsystem für entwicklungsbiologische Fragestellungen und bieten ein hohes Potential in der Entwicklung regenerativer Therapeutika bei Erkrankungen, die mit dem Untergang von Gewebe einhergehen wie z.B. Myokardinfarkte, Diabetes mellitus Typ I, Leberzirrhose, Morbus Parkinson, oder periphere Durchblutungsstörungen (Weissman 2000).

So werden humane hämatopoetische SZ seit Jahrzehnten bei Leukämien und Stoffwechselerkrankungen als Transplantate verwendet, um das maligne oder dysfunktionale Knochenmark zu ersetzen bzw. das Überleben einer Hochdosischemotherapie zu ermöglichen (Gratwohl 2002, Verfaillie 2002).

#### **1.4.2 Stammzelltransplantation bei Spinalläsion**

Zahlreiche Untersuchungen am Modell von Nagetieren weisen darauf hin, dass die Transplantation embryonaler Stammzellen die Regeneration nach Spinaltrauma verbessern kann (Enzmann 2006, Parr 2007, Sharp 2007). Diesen positiven Ergebnissen wurde an Primaten (Deng 2005), sowie über die letzten Jahre vereinzelt auch am Menschen (Dobkin 2006, Yoon 2007) nachgegangen.

In-vivo werden zur SZ-Transplantation aufgrund erleichterter Rekrutierung meist mesenchymale SZ genutzt. Bereits hierbei zeigte sich funktionelle Besserung nach SCI und Apoplex im Tiermodell (Hofstetter 2002, Cho 2009), sowie verstärkte Exprimierung neurogener Wachstumsfaktoren (Mahmood 2004).

In den vergangenen Jahren folgten schließlich Untersuchungen zu hämatopoetischen / endothelialen CD133(+)-SZ aus dem menschlichen peripheren Blut am Tiermodell. Die Verabreichung von ex-vivo expandierten CD133(+)-Zellen an SCI-Mäuse führte zu signifikant stärkerer Angiogenese, Astrogliose, axonalem Wachstum und funktioneller Verbesserung als die Zugabe von CD133(-)-Zellen (Naosuke 2013).

In einer Phase I/II-Studie kam es bei 30,4% der mit autologen Stammzellen transplantierten und G-CSF behandelten Patienten zu einer klinischen Besserung, während die Dekompressions- und Fusionsoperation bei Kontrollpatienten ohne Zelltransplantation keine signifikante Besserung erzielte (Yoon 2007).

Das Verhalten der transplantierten Zellen im „feindlichen Milieu“ des Empfängers ist somit weder ausreichend verstanden noch kontrollierbar (McLean 2015).

## **1.5 Gewählte Zell- und Zytokinmarker**

Entsprechend dem im Vordergrund der Untersuchung stehenden Interesse an stammzell- und neuronal relevantem Geschehen wurde der Fokus sowohl auf die Identifizierung von Hauptvertretern der hämatopoetischen Reihe, als auch auf spezielle, die Migration und Chemotaxis von Stammzellen gerichtete Marker gelegt. Genaue Abläufe und Rezepturen der unterschiedlichen Nachweismethoden werden im entsprechenden Methodenteil der Arbeit einzeln aufgeführt und erläutert.

### **1.5.1 Bedeutung der Glykoproteine**

Als Stammzellmarker dienen CD34 und CD133.

#### **CD34**

Der monoklonale Antikörper wurde Mitte der 80er Jahre von Andrews et al. (Andrews 1986) auf sehr primitiven koloniebildenden Vorläuferzellen entdeckt und schließlich als Antigen auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen identifiziert. Er hat das Molekulargewicht von 105–120kD und bekam den Cluster of Differentiation-Code CD34. Des Weiteren wird CD34-Expression auf Leukämie- und Endothelzellen sowie auf einigen fetalen mesenchymalen Zellen beschrieben (Fina 1990, Krause 1994). Dass CD34-positive Zellen eine bedeutsame Rolle in der Hämatopoese spielen, zeigten nicht zuletzt Versuche an knock-out-Mäusen (Cheng 1996). Die Unterteilung der heterogenen CD34 Zellpopulation gelang anhand weiterer Oberflächenmarker in eine Vielzahl von Untergruppen unterschiedlicher Funktionalität.

#### **CD133**

Yin et al. (Yin 1997) identifizierten Ende der 90er Jahre über einen neu entwickelten Antikörper das Antigen AC133. Diese, schließlich zu CD133 umbenannte Membran-Mikrodomäne, ist ein apikalständiges 5-transmembranäres Zelloberflächen-Antigen mit dem Molekulargewicht von 117 kD (Miraglia 1997). Mittlerweile hat CD133, des Weiteren bekannt als Prominin-1, sich als spezifischer Marker für hämatopoetische, endotheliale und fetale neurogene Stamm- und Progenitorzellen (Barraud 2007, Uchida

2000), wie auch ependymale Zellen des erwachsenen Rattenhirnes (Pfenninger 2007) durchgesetzt.

Im hämatopoetischen System ist die CD133(+)- Expression auf eine Untergruppe der CD34(+) Stamm- und Vorläuferzellen in menschlicher fetaler Leber, Knochenmark, Nabelschnurblut und peripherem Blut beschränkt (Bühning 1999). Im Gegensatz zu hämatopoetischen und endothelialen Progenitorzellen exprimieren CD133(+) neurogene Stammzellen kein CD34 (Clarke 2003).

## **CD14**

Bei der Differenzierung pluripotenter Stammzellen zu funktionellen Monozyten/ Makrophagen und Granulozyten markiert CD14 vor allem reife Zellen der monozytären Reihe (Goyert 1988). Es bestehen zwei Isoformen dieses Rezeptors für Lipopolysaccharid-Bindeproteine mit 50 und 55 kD.

Die Interaktionen von CD14 mit „nonself“- Komponenten (Lipopolysaccharide, LPS) und „self“- Komponenten (apoptotische Zellen) verursacht unterschiedliche Makrophagenantworten und unterstützt hierbei die Erkennung und Tilgung apoptotischer Zellen. Ebenfalls trägt dieser Zellrezeptor durch Bindung bakterieller LPS zur Verstärkung der Entzündungsantwort bei. Die hierbei mögliche Überstimulierung der LPS kann das häufig fatale Toxic-Schock-Syndrom erzeugen (LeVan 2001).

## **CD45**

Das CD45 Antigen ist auch unter dem Namen leukocyte common antigen (LCA) bekannt, was seine Expression auf Leukozyten impliziert. Auch ist diese Tyrosin-Phosphatase auf allen menschlichen Zellen hämatopoetischen Ursprungs präsent – mit Ausnahme der Erythrozyten und Thrombozyten sowie deren Vorläuferzellen. Im Vordergrund seiner Zielwirkung steht die B- und T- Zellaktivierung. Es existieren fünf Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht zwischen 120 und 220 kD (Egerton 1990). CD45 ist außerdem zu finden auf Lymphomzellen, bei chronischer lymphozytärer B-Zell-Leukämie, Haarzelleukämie und akuter nichtlymphoblastischer Leukämie.

## **CD4**

CD4 ist die offizielle Bezeichnung für das T-Zell-Antigen T4/leu3, welche mit der Empfehlung des „Committee on Human Leukocyte Differentiation Antigens“ (Committee on Human Leukocyte Differentiation Antigens 1984) übereinstimmt. Maddon et al. (Maddon 1987) zeigten in einer Arbeit zu Struktur und Expression menschlicher sowie mauseigener T4-Gene, dass T4 RNA nicht nur auf T-Lymphozyten, sondern auch auf B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten exprimiert wird. Ferner spielt es eine entwicklungsregulierende Rolle für spezifische Regionen des Gehirns. Dementsprechend schlagen die Autoren vor, dass T4 eher bei der Vermittlung von Zellerkennungs-Prozessen eine Rolle spielt als in der Immunantwort.

CD4 steigert die T-Zell Sensitivität gegenüber Allergenen und bindet an LcK (Lymphocyte-specific Protein-Tyrosine Kinase) sowie an MHC-II-Moleküle (Li QJ 2004). Bei transgenen Mäusen mit menschlichem CD4 Gen wurde menschliches CD4 auf Mikroglia, den mononukleären Phagozyten im Gehirn gefunden (Buttini 1998). In Postmortem-Gehirnuntersuchungen von AIDS-Patienten mit opportunistischen Infektionen, aber ohne HIV Enzephalitis, korrelierte die CD4 Expression mit der Neurodegeneration. Folglich wird CD4 als wichtiger Mediator von indirekten neuronalen Schäden bei Infektionen und immunvermittelten Krankheiten des ZNS vermutet. Die wichtige Rolle humaner CD4 Expression auf Mikroglia/Makrophagen schafft eine pathogenetische Verbindung zwischen dem Immunsystem und dem ZNS (Buttini 1998).

## **CD19**

CD19 ist ein Oberflächenmarker auf follikulären dendritischen Zellen und B-Lymphozyten, welcher während der frühen Prä-B-Zell-Differenzierung bis zur endgültigen Differenzierung zu Plasmazellen exprimiert wird. CD19 nimmt an der Entwicklung von B-Lymphozyten, an der B-Zell-Aktivierung, der Reifung von B-Gedächtniszellen und an der Toleranzregulation teil (Sato 1997). Auch wurde es auf peritonealen Mastzellen, co-lokalisierend mit CD21/CD35, entdeckt. Vermutlich spielt es eine Rolle bei der Komplement-vermittelten Mastzellaktivierung (Tedder 1994).

## **1.5.2 Zytokine**

Faktoren, welche die oben besprochene Differenzierung von SZ zu Zielzellen initiieren und im Weiteren sowohl proliferierende als auch eingrenzende Wirkung auf sie ausüben sind als Zytokine bekannt. Es handelt sich um hochaffine Glykoproteine, die in fünf Hauptgruppen unterteilt sind: Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. Einige Zytokine werden folglich als Wachstumsfaktoren bezeichnet, andere haben spezielle immunologische Funktionen und gelten dabei als Mediatoren. In Hinsicht auf die Mobilisierung und Transmigration von Stammzellen aus dem Knochenmark sind einige der im Folgenden aufgeführten Zyto- und Chemokine von besonderer Bedeutung (Leary 1988, Kollet 2012, Yu 2006, Saito 1994). In der Regel wirkt ein Zytokin auf verschiedene Zellreihen ein.

## **1.5.3 Bedeutung der Zytokine**

### **SDF-1**

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) wird konstitutiv von Knochenmarksstromazellen exprimiert und ist in vielen anderen Geweben präsent (Tashiro 1993, Bluel 1996). Es wirkt potent chemotaktisch auf hämatopoetische Stammzellen, Lymphozyten und Monozyten und verstärkt die B-Zell-Proliferation (Tashiro 1993, Bluel 1996), was zu dem Vorschlag führt, dass es eher der Immunüberwachung als der Immunantwort dient (Bluel 1996). SDF-1 ist maßgeblich für die Wanderung der Zellen in geschädigtes Gewebe verantwortlich (Ma 2005), seine Rolle bei Auswanderung und Homing von Lymphozyten und hämatopoetischen Stammzellen gilt als belegt (Bluel 1996).

Der hier verwendete SDF-1  $\alpha$  Immunoassay misst speziell humanes SDF-1 $\alpha$  in Zellkultur sowie im Überstand und plättchenarmem Plasma. Er basiert auf E.-coli-exprimiertem, rekombinant-humanem SDF-1 $\alpha$  und enthält gegen rekombinanten Faktor gerichtete Antikörper.

### **Matrixmetalloproteinasen**

Matrix-Metalloproteinasen sind eine Familie von proteolytischen Enzymen mit der Fähigkeit, extrazelluläre Matrixproteine zu zerstören, welche beim Gewebsumbau im

Zuge verschiedener pathologischer sowie physiologischer Prozesse auftreten (Birkedal-Hansen 1993). Ihre Aktivität wird durch Inhibitoren sehr genau reguliert. Hierzu gehört vor allem die MMP-spezifische Familie der tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Dieser Balanceakt kann in Prozessen wie z.B. Gewebemorphogenese, Wundheilung, Zellmigration und Angiogenese beobachtet werden. MMPs sind in der Lage, die endotheliale Permeabilität weitgehend zu steigern (Alexander 2002) und spielen auch nach Spinaltraumata eine wichtige Rolle bei der Eingrenzung der funktionellen Wiederherstellung wie im Folgenden beschrieben (Noble 2002). Weitere Kennzeichen für Mitglieder der Metalloproteinase-Familie sind Blockierbarkeit durch Chelatbildner und die Aktivierung latenter Formen durch organische Quecksilberverbindungen (Nagase 1992). Entsprechend ihrer Hauptstruktur können MMPs unterteilt werden in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Matrilysine (Docherty 1992).

#### **- MMP-8**

Die neutrophile Kollagenase MMP-8 hat große Strukturähnlichkeit mit fibroblastischen MMP-1. Sie spaltet unter anderem Kollagen Typ I, II, III und Aggrecan (Birkedal-Hansen 1993). Ihr Vorläufer (proMMP-8), welcher nach dem Translokationsprozess glykosyliert wird, befindet sich in spezifischen Granulozyten und Neutrophilen. Er wird im Zuge von Entzündungsprozessen ausgeschüttet und schließlich in Körperflüssigkeiten und Gewebe aktiviert (Hasty 1986).

#### **- MMP-9**

MMP-9, auch Gelatinase B, ist mit 83 kD eines der größeren Proteine unter den Metalloproteinasen. Wie auch andere Varianten der genetischen MMP-Familie wird MMP-9 als Vorläuferform (proMMP-9) abgesondert, die durch organische Quecksilberverbindungen oder Proteinase wie Trypsin,  $\alpha$ -Chymotrypsin, Cathepsin G und MMP-3 (Stromelysin-1) oder Hypochlorsäure aktiviert wird (Okada 1992, Wilhelm 1989). Aktives MMP-9 baut vor allem endotheliale Basallaminae und die Tight Junction Proteine Occludin und Claudin ab (Yang 2007). Die Proteinase MMP-9 hat eine große substratspezifische Bandbreite für native Kollagene, mitunter Typ I, III, IV, und V sowie Gelatine, Proteoglykane und Elastin (Okada, 1992). Sie wurde in einer Vielzahl von

Gewebe und Körperflüssigkeiten unter pathophysiologischen Konditionen identifiziert (Wilhelm 1989, Mackay 1990). MMP-9 gilt als wichtiger Faktor bei der Carcinom-invasion und Methastasierung (Mackay 1990, Ballin 1988), der Auswanderung inflammatorischer Zellen (Welgus 1990), der uterinen Einwanderung von Trophoblasten (Librach 1991) und bei Knochenresorption.

Laut Noble und Kollegen spielt MMP-9 eine Schlüsselrolle bei der Dysfunktion der Blut-Rückenmarks-Schranke, bei Entzündungen und motorischer Wiederherstellung nach Spinaltrauma. Im Versuch an Mäusen zeigte sich unter MMP-9-Inhibition eine signifikant geringere Störung der Blut-Rückenmarks-Schranke, eine Hemmung der Infiltration von neutrophilen Granulozyten und eine signifikant bessere Wiederherstellung motorischer Funktionen im Vergleich zu nicht manipulierten Mäusen. Folglich schlagen die Autoren die Hemmung von MMP-9 als potenziell effektive Behandlungsstrategie bei akuter Querschnittslähmung vor (Noble 2002).

Shirvaikar et al beschrieben das Ausbleiben einer MMP-9 Sekretion im Ruhezustand der SZ. Eine Stammzellmobilisierung durch Neupogen (G-CSF) geschieht über die Aktivierung neutrophiler Granulozyten mit anschließender Freisetzung von MMP, welche schließlich SZ mobilisieren. Im Verlauf wirken SZ an diesem Prozess schließlich direkt mit, indem sie – stimuliert durch Wachstumsfaktoren wie G-CSF – selbst MMP-9 und MMP-2 freisetzen. Dies wiederum führt zu ihrer beschleunigten Migration aus dem Knochenmark. Folglich wird vermutet, dass die Modulation u.a. der MMP-9 Expression in Hinsicht auf die Entwicklung neuer, stammzellbasierter Therapien von großem Nutzen sein könnte (Shirvaikar 2012).

Zudem stellten Choi und Kollegen nach Akupunkturbehandlungen an SCI-Patienten neben klinischen Vorteilen und bedeutsamen Veränderungen im Bereich weiterer neuroaktiver Faktoren auch verminderte MMP-9 Werte fest (Choi 2010).

## **G-CSF**

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) ist ein pleiotropes Zytokin mit spezifischer proliferativer, differenzierender und aktivierender Wirkung auf hämatopoetische Zellen. G-CSF wird von aktivierten Monozyten und Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Astrozyten, Osteoblasten und Knochenmarkszellen synthetisiert (Saito 1994). Sowohl in humanen als auch in murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen und neutrophilen Granulozyten besteht dieselbe Klasse hochaffiner



G-CSF-Bindungsstellen. Rezeptoren befinden sich auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie plazentären Zellen, Endothelzellen, verschiedenen Karzinomzelllinien und myeloblastischen Leukämiezellen (Fukunaga 1990).

G-CSF wird zum Aktivieren und Mobilisieren von Knochenmarksstammzellen im Rahmen der Transplantation hämatopoetischer SZ verwendet. Eine Rolle von G-CSF in der Neuroregulation wird vermutet, denn es aktiviert Makrophagen im ZNS zur Beseitigung von Myelintrümmern, welche die axonale Regeneration behindern (Kim 2005). Des Weiteren ist G-CSF vermutlich dazu imstande, die Proliferation neuronaler SZ zu erhöhen und die neuronale Apoptose zu verhindern, was in der Verbesserung neurologischer Funktionen im Tiermodell nach Spinaltrauma zum Ausdruck kam (Kim 2005).

## **IL-6**

Interleukin 6 (IL6) gilt als eine Mediatorsubstanz des Immunsystems mit breitem Wirkungsspektrum. Es ist als Aktivator der Akute-Phase-Reaktion sowie als B-Zell-Stimulationsfaktor bekannt (Nishimoto 2008). IL-6 gilt als entscheidender Faktor der angeborenen Immunität sowie begünstigend für erworbene Immunantworten (Jones 2005). Viele unterschiedliche Zellen sind zur IL-6-Synthese fähig. Darunter befinden sich Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Mastzellen, T-Zellen und viele Tumorzelllinien (Kishimoto 1995).

IL-6 wird in der Literatur auch als Interferon  $\beta$ 2, B-Zell-Stimulationsfaktor (BCSF), B-Zell-Stimulationsfaktor 2 (BSF-2), Hepatozyten-Stimulationsfaktor (HSF), und unter vielen anderen Namen aufgeführt.

Bei der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in vitro zeigen IL-3 und IL-6 synergistische Effekte (Leary 1988). Kishimoto berichtet von Versuchen im Sinn der Transplantationspräparation von Knochenmarkszellen: Wurden diese vor Transplantation in Kultur mit IL-6 und IL-3 gegeben, erhöhte sich ihre Überlebensrate um 90%. Außerdem wurde ein morphologischer Wandel zu Zellen mit verlängerten Neuriten beobachtet. Auch die Sekretionszunahmen von NGF wird durch IL-6 nachweislich gefördert (Kishimoto 1989). Ein weiterer Hinweis für bestimmte IL-6-Effekte auf Nervenzellen ist die bewiesene Induktion von IL-6 mRNA durch IL-1 Stimulation von Glioblastom- oder Astrozytomzellen. Kishimoto folgert daraus eine mögliche Beteiligung von IL-6 an zellulären Reparaturmechanismen (Kishimoto 1989).

Durch IL-6 begünstigte posttraumatische Nervenregeneration wird von verschiedenen Autoren bestätigt (Hirota 1996, Nakamura 2005, Mukaino 2005).

### **Brain - Derived Neurotrophic Factor, BDNF**

Neurotrophe Faktoren kontrollieren inter- sowie intrazelluläre Signalwege, welche neuronale Kreisläufe während der Gehirnentwicklung formen und die Plastizität wie auch das Überleben der Gehirn- und Nervenzellen des Erwachsenen fundamental regulieren (Mattson 2004). Peripher wird BDNF vor allem in Neuronen (Zafra 1991), aber auch in Schwannzellen peripherer Motoneurone gebildet (Acheson 1991). Im ZNS ist BDNF ubiquitär verteilt und wird dort unter anderem von den Gliazellen produziert (Leibrock 1989). BDNF ist in Neuronen des embryonalen, postpartalen und adulten ZNS zu finden, die höchste Konzentration findet sich im Hippocampus. Inzwischen ist die BDNF-Produktion auch durch viele andere Körperzellen bekannt (Cartwright 1994). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) ist innerhalb des zentralen Nervensystems einer der am weitesten verbreiteten Faktoren, welcher speziell über einen hochaffinen Zelloberflächenrezeptor wirkt (TrkB). Indem er die intrazelluläre Proteinkinase B (PKT/Akt), mitogen-aktivierte Proteinkinasen, und die extrazellulär signalregulierten Kinasen aktiviert, verhindert BDNF wirkungsvoll den neuronalen Zelltod nach verschiedenen Traumata wie etwa der zerebralen Ischämie (Schäbitz 2000). BDNF und andere Mitglieder der Familie neurotropher Faktoren spielen somit eine bedeutsame Rolle bezüglich Zelldifferenzierung und neuronaler Reparatur (Yamamoto 1996). Neben qualitativer Verbesserung neuronal struktureller Plastizität erhöht die Präsenz von BDNF nachweislich die Anzahl junger Neurone in etlichen Gehirnarealen (Pencea 2001). Bei experimentellem Spinaltrauma begünstigt die Behandlung mit BDNF die Regeneration und verbessert lokomotorische Funktionen (Houweling 1998).

### **Nerve Growth Factor, NGF**

Das Neurotrophin NGF wirkt bekannter Maßen auf zentrale cholinerge Neurone und Subpopulationen peripherer Nervenzellen. Außerdem spielt er sehr wahrscheinlich eine besondere Rolle im Erhalt konzertierter Aktionen von nervalem, immunogenem und endokrinem System (Aloe 1997). NGF wird von einer Vielfalt von Zellen außerhalb des Nervensystems synthetisiert und gespeichert, was annehmen lässt, dass er über eine

Vielzahl von Übertragungswegen arbeitet, um die physiologische Homöostase sowie pragmatische Verhaltensstrukturen zu regulieren (Alleva 2001). Neuroendokrine, neurochemische und verhaltensbasierte Veränderungen beim Erwachsenen, wie sie bei den meisten neuropsychiatrischen Störungen vorkommen, werden entscheidend durch Gehirnentwicklung und -Plastizität, beiderseits vermittelt über Neurotrophine, beeinflusst (Cirulli 2001). Schwankungen betreffs Alter und Geschlecht sind teilweise widersprüchlich, wobei keine geschlechtsspezifischen Veränderungen, jedoch eine leichte altersabhängige Reduktion auffällt (Lang 2003).

Wie BDNF ist auch NGF neuroprotektiv und gilt entsprechend einem Experiment an Primaten zu Ischämie und traumatischer Hirnverletzung als Regulator der postischämischen Gliazellproliferation (Tonchev 2011). Intraventrikulär oder intraparenchymal applizierter NGF verbessert das räumliche Gedächtnisvermögen und senkt den apoptotischen Nervenzellverlust nach Gehirntraumata (Dixon 1997, Sinson 1995).

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit –**

### **Untersuchung der Akupunkturbehandlung bezüglich potenzieller Stammzellmobilisation**

Aufgrund klinischer Erfolge rückte die Akupunktur über die letzten Jahrzehnte in neues Forschungslicht. Im Rahmen der Schmerztherapie hat sie seitdem auch im Westen eine anerkannte Stellung. Bezüglich der Spinalläsion existieren klinische Studien, welche auf eine mögliche Wirksamkeit der Akupunktur hinweisen. Die Wirkmechanismen werden bislang auf Manipulationen des Nervensystems zurückgeführt. Zellulären Effekten, insbesondere bezüglich der Beeinflussbarkeit von Stammzellen durch Akupunktur, wurde im Tierexperiment ansatzweise nachgegangen. Wir stellen die Arbeitshypothese auf, dass Akupunktur bei Spinalläsion potenziell Stammzellen mobilisiert. Aus dieser Hypothese heraus ergeben sich die Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit:

Das zelluläre Geschehen nach im Folgenden beschriebener Akupunktur-Therapie soll anhand gesunder Testprobanden (n=14) untersucht werden.

Von Interesse ist die Zunahme von potenziellen Stammzellpopulationen in zeitlichem Zusammenhang zur Akupunkturbehandlung. Somit sollen Stammzellen quantitativ sowie auf ihre genaue Charakteristik hin identifiziert werden. Es folgt die Messung von Mobilisierungs- und Transmigrations- sowie Wachstumsfaktoren, die eine Regeneration von Nervengewebe positiv beeinflussen könnten. Um einen möglichen Einfluss der Akupunktur auch auf andere Blutzelltypen zu untersuchen, wird das Glykoproteinprofil peripherer Blutzellen durchflusszytometrisch bestimmt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign – Praktische Durchführung**

Wir führten eine prospektive, experimentelle, nicht-randomisierte Studie an insgesamt vierzehn Testprobanden durch. Bei zwei weiteren Personen, einem Mann und einer Frau, wurden wie bei den Probanden Zellprofile und potenzielle Mobilisierungsfaktoren bestimmt, ohne dass diese sich einer Akupunktur unterzogen.

Insgesamt partizipierten acht weibliche und acht männliche gesunde freiwillige Studienteilnehmer im Alter von 24 bis 52 Jahren ( $34,3 \pm 7,4$  Jahre). Bei der Einstufung im ASIA-Score (American Spinal Injury Association-Score) (Savic 2007) gehörten alle Probanden zur Kategorie E, was dem Normalbefund entspricht.

Sonstige gravierende Krankheiten wurden vor der Teilnahme ausgeschlossen. Ebenfalls nicht eingeschlossen wurden Personen, welche in den vergangenen sechs Monaten an anderen Studien teilgenommen oder sich in dieser Zeit Akupunkturbehandlungen bzw. Operationen unterzogen hatten. Die Probanden 0-14 erhielten jeweils vor und nach der Nadelung Puls- und Blutdruckmessung sowie Blutentnahmen mittels Vacutainer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) zur Untersuchung auf diverse, in späteren Kapiteln aufgelistete Zyto- und Chemokine sowie Zellmarker. Erneute Blutentnahmen zur Bestimmung derselben Laborparameter folgten 24 und 48 Stunden nach Akupunktur. Proband 15 und 16 dienten ausschließlich der Negativkontrolle. Sie wurden nicht akupunktiert, Untersuchungsproben wurden vor und nach halbstündiger Bauchlage sowie 24 und 48 Stunden später entnommen. Das Blut einer Probandin (Proband 0) wurde über insgesamt acht Tage nach einmaliger Akupunkturbehandlung analysiert.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité, EA 2/059/07 genehmigt und es liegen schriftliche Einverständniserklärungen aller Untersuchungsteilnehmer vor.

## 2.2 Probanden

**Tabelle 1:** Probanden: Alter, Geschlecht, Medikamentenanamnese

Proband	Alter	Geschlecht	Medikation	Wirkstoffgruppe	Indikation
0	38	♀	keine		
1	33	♀	keine		
2	33	♀	Leios	Östrogen-Gestagen-Kombination	Kontrazeption
3	29	♀	keine		
4	34	♂	Omeprazol Metoprolol 100mg 50-0-5	Protonenpumpen-Inhibitor  β-Blocker	Refluxösophagitis  Hypertonie
5	50	♀	Diane 35 100mg 1x1	Östrogen-Gestagen-Kombinationen	Kontrazeption
6	25	♂	keine		
7	45	♂	Metoprolol 100mg 50-0-50	β-Blocker	Hypertonie
8	29	♀	keine		
9	29	♂	keine		
10	24	♂	keine		
11	32	♂	keine		
12	30	♀	keine		
13	31	♂	keine		
14	37	♀	keine		
15	38	♂	ASS 500 vor 3 Tagen	Cyclooxygenase-hemmer	Kopfschmerzen

## **2.3 Durchführung der Akupunktur**

### **2.3.1 Die Praxis der Nadelung**

Die Akupunktur zur Behandlung der Spinalläsion (im Folgenden SCI-Akupunktur) findet ausschließlich in Bauchlage statt.

Zur Auffindung der individuellen Körperpunkte wird in der Überlieferung der chinesischen Tradition in Cun gemessen. Dies ist eine simple Methode, die Eigenmaße des Probanden/Patienten mit allgemeinen Messangaben abzustimmen, denn ein Cun entspricht der Daumenbreite der behandelten Person selbst (Lian c 2004).

Prinzipiell erfolgt vor der Nadelung eine sachgerechte Hautdesinfektion. Nach dem Spannen der Haut wird die je nach Grundtypus des Patienten und erwünschter Wirkung in Dicke und Länge gewählte Nadel schnell durch die Haut eingeführt und langsam bis zur vorgesehenen Tiefe geschoben. Der Einstichwinkel variiert je nach topografischer Gegebenheit des jeweiligen Akupunkturpunktes und seinen Zielstrukturen. In vorliegendem Forschungsprojekt wurden sterile Einwegnadeln (0,3 x 0,3, Wandrey, Berlin, Deutschland) bei der manuellen Insertion senkrecht zur Haut gesetzt und sogleich im Uhrzeigersinn 45° um die eigene Achse gedreht. Anschließend lagen die Probanden für 30 Minuten ruhig in Bauchlage.

Bei korrekter Lokalisierung der Einstichstelle tritt meist ein vom reinen Einstichschmerz abzugrenzendes „dampf-drückendes“, „elektrisch-kribbelndes“ Gefühl ein. Die chinesische Literatur beschreibt diese Sensation als De-Qi (Erreichen oder Ankommen des Qi). Auch kann sich De-Qi entlang des punktierten Meridians ausbreiten und wird dann als PSC-Phänomen (Propagated Sensation along the channel) bezeichnet. Letzteres, sowie auch das De-Qi-Gefühl, ist nicht an jedem Akupunkturpunkt auslösbar und unterliegt inter- sowie intraindividuellen Schwankungen. Beschriebene Sensationen können im Fall unzureichender Spontanreaktion durch manuelle Manipulation der gesetzten Nadel wie leichtes Heben und Senken oder durch Drehen der Nadel hervorgerufen werden. Ist die De-Qi-Sensation beim Patienten erreicht, können die ausgewählten Punkte in spezifischer Weise weiter beeinflusst werden. Hier spricht man von ableitenden (chin. Xie) und auffüllenden (chin. Bu) Techniken, die je nach Beschwerdebild synchron zum oben beschriebenen Fülle-Leere-Zustand eingesetzt werden (Lian a 2004). Bei vorliegender Forschungsunternehmung wurde das Drehen der Nadeln beim Setzen im „auffüllenden“ Sinn angewandt.

### 2.3.2 Behandlungsschema der Akupunktur bei Spinalläsion

Soweit es sich um eine standardisierte Akupunkturbehandlung der Paraplegie handelt wie in vorliegendem Forschungsprojekt, werden wie in Abbildung 5 ersichtlich klassische elf Punkte genadelt (Gao 1996, Wong 2003).

Auch werden Punkte auf vier weiteren Meridianen hinzugezogen. Sie werden im Chinesischen mit komplexen Namen bezeichnet, die im europäischen Sprachgebrauch nicht eindeutig übersetzt werden können.

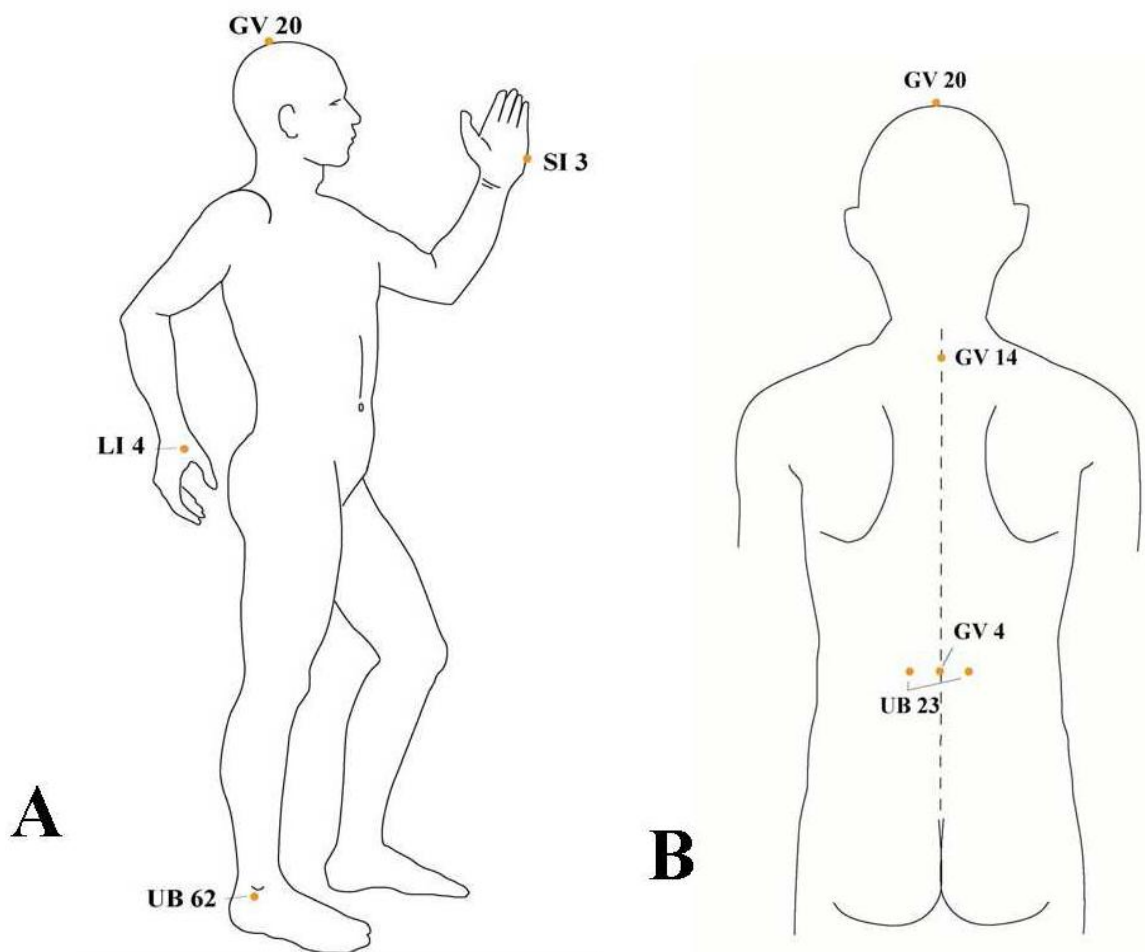


Abbildung 5 A,B: Moldenhauer et al 2010

Klassische Behandlungspunkte der SCI-Akupunktur (Gao 1996, Wong 2003)



**Tabelle 2:** genadelte 11 Punkte mit chinesischer Bezeichnung und Lokalisationsbeschreibung  
(Deadman 2000)

<b>Akupunkturpunkte</b>	<b>Chinesische Terminologie</b>	<b>Lokalisation</b>
LG 20 - Lenkergesäß 20	Baihui	Schädelzentrum
LG 14 - Lenkergesäß 14	Dazhui	HWK 7, unterhalb des Processus spinosus
LG 4 - Lenkergesäß 4	Mingmen	LWK 2, unterhalb des Processus spinosus
Dü 3 (rechts und links) - Dünndarm 3	Houxi	Ulnares Ende der distalen Palmarfalte proximal des fünften Metacarpophalangeal-Gelenkes
Di 4 (rechts und links) - Dickdarm 4	Hegu	Zwischen erstem und zweitem Metacarpalknochen
BL 23 (rechts und links) - Blase 23	Shenshu	1,5 Cun lateral zu LG4
BL 62 (rechts und links) - Blase 62	Shenmai	Einkerbung direkt unter dem Außenknöchel

## 2.4 Material

### 2.4.1 Geräte und Hilfsmaterialien

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Lichtmikroskop: Leica DMRBE	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, D
Sicherheitswerkbank Lamin Air HB 2472	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Wasserbad Julabo ED	JULABO Labortechnik GmbH Seelbach im Schwarzwald, D
Mini Rocker MRA	Lab 4 You, Berlin, D
Vortexer Genie 2 (G 560E)	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Pipettierhilfe Easypet 4420	Eppendorf, Hamburg, D
Neubauerkammer 0,1 mm Tiefe	Fein-Optik, Bad Blankenburg, D
Kamera: Nikon E4500	Nikon, Japan
Blutbilder: Sysmex XE-2100	Sysmex GmbH, SLT, D
SPECTRA I Mikrotiterplattenphotometer	SLT Spectra, Austria
Brutschrank Heraeus Scientific, 5% CO <sub>2</sub> , 37°C	Heraeus Instruments, Hanau, D
Kühl- und Gefrierschrank Liebherr Glass Line	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, D
MSI Wind Notebook PC U100	MSI Technology GmbH, Frankfurt, D
Apple Macintosh iMac G3	Apple Distribution International, Hollyhill Industrial Estate Hollyhill, Cork, Republic of Ireland

## 2.4.2 Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
steriles Wasser	Delta Select, Pfullingen, D
BD FACS Lysing Solution	Shannon, Irland
Fetal Bovine Serum (FBS)	HyClone, Utah, USA
1 M Schwefelsäure	Berlin-Apotheke an der Charite, Berlin, D
Bicoll-Trennlösung	BioChrom AG, Berlin, D
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FACS Safe	Becton Dickinson, Heidelberg, D
0,5 % Trypanblau	Biochrom AG Berlin, D
Alkoholisches Hautantiseptikum Octeniderm	Schülke, Norderstedt, D

## 2.4.3 Verbrauchsmaterialien

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Falcon Polystyrene Rundboden- röhrchen (5ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Falcon Konisches Röhrchen (15ml, 50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Falcon 6-Well-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Falcon Einmalpipetten (5ml, 10ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Eppendorf Biopur Einwegpipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg, D
Akupunkturnadeln 0,3x0,3	Jan Wandrey, Berlin
Butterflies, Adapter	Vacutainer Systems, Blood Collection Set Becton Dickinson, France/Japan
Blutentnahme-Röhrchen: EDTA, Citrat, Serum	Becton Dickinson & Company, 2004, Bd, UK

## 2.4.4 ELISA-Kits

### ELISA-Kit-Set

### Hersteller

Biotrak ELISA System  
Amersham Matrix Metalloproteinase-8

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Biotrak ELISA System  
Amersham Matrix Metalloproteinase-9

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Quantikine Human CXCL12/SDF-1 $\alpha$

R&D Systems GmbH,  
Wiesbaden- Nordenstadt

Quantikine HS Human  
G-CSF Immunoessay

R&D Systems GmbH,  
Wiesbaden-Nordenstadt

Immulite IL-6

DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim

## 2.4.5 Antikörper

**Tabelle 3:** Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Markierung	Klon	Firma
Antihuman CD133/1	FITC	AC133	Miltenyibiotec, Bergisch Glattbach
Antihuman CD133/2	FITC	AC141	Miltenyibiotec, Bergisch Glattbach
Antihuman CD34	PE	AC136	BD Pharmigen, San Diego
Antihuman CD14	FITC	M5E2	BD Pharmigen, San Diego
Antihuman CD45	PE	HI30	BD Pharmigen, San Diego
Antihuman CD4	FITC	RPA-T4	BD Pharmigen, San Diego
Antihuman CD19	PE	HIB19	BD Pharmigen, San Diego
Recombinant Human beta-NGF	PE	MGC16142/ MGC161428	Immunotools Friesoyte
Mouse IgG	FITC	MCG1 (mouse)	Immunotools Friesoyte
Mouse IgG	PE	203	Immunotools Friesoyte

## 2.4.6 Verwendete Medien und Stammlösungen

### 10x Phosphate buffered solution (PBS)

80g Natriumchlorid  
2g Kaliumchlorid  
2g Kaliumhydrogenphosphat  
14,4g di-Natriumhydrogenphosphat  
→ auf 1000ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt

### Stammzellmedium

160ml IMDM  
40ml FBS  
2ml Glutamin (200mM)  
200µl Gentamycin (50µg/ml)  
200µl Mercaptoethanol (50mM)  
→ gut gemischt und steril filtriert

## 2.4.7 Computersoftware

### Software

### Hersteller

Open Office für Windows 2000	Oracle America, USA
Microsoft Word für Windows 2007	Microsoft Corporation, USA
Excel 2000	Microsoft Corporation, USA
SPSS 15	Tree Star, Inc., Ashland, OR 97520
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, D
GraphPad Prism Version 3.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Adobe InDesign CS3, Version 5	Adobe Systems Incorporated, USA

## **2.5 Labormethoden**

### **2.5.1 Untersuchungen auf Zellebene**

Grundlage der Bestimmung einzelner Zellpopulationen und deren Veränderung im zeitlichen Verlauf ist die Aufarbeitung des mit Citrat gerinnungsunfähig gehaltenen Vollblutes zur Isolierung der messrelevanten Zellen.

Hierbei boten sich zwei verschiedene Methoden an. Zum einen die Isolation von Stammzellen durch Ficoll mit anschließender Antikörpermarkierung, zum anderen die Lysierung der Erythrozyten. Dieser Zellselektion, beziehungsweise Zellmarkierung folgt die eigentliche Messung im Durchflusszytometer. Dabei wird für jede Blutprobe zu allen Zeitpunkten eine IgG-Kontrolle angesetzt und im Zuge der Messung als Bezugspunkt mit ausgewertet.

#### **2.5.1.1 Blutabnahmeschema**

Die ersten Blutabnahmen erfolgten bei allen Teilnehmern vor der Akupunkturbehandlung bzw. vor halbstündiger Bauchlage ohne Akupunktur. Die zweiten Blutentnahmen geschahen direkt nach Akupunktur bzw. Bauchlage. Dritte und vierte Blutentnahmen erfolgten zwischen 24 bzw. 48 Stunden nach Akupunktur. Dabei wurden jeweils ein Monovetten-Röhrchen EDTA, Citrat und Nativ abgenommen. Unmittelbar nach der Abnahme wurden die Entnahmeprouben gut durchmischt. Die Weiterverarbeitung der meisten Proben wurde innerhalb einer, wenige innerhalb von zwei Stunden begonnen. Blutbilder wurden innerhalb einer Stunde nach Abnahme am Sysmex XE-2100 erstellt. Das Nativblut wurde zur Gewinnung von Serum bei 1800rpm über 10 min zentrifugiert.

#### **2.5.1.2 Aufarbeitung von Citratblut über Ficoll**

Bei der Aufarbeitung des Citratblutes über Ficoll werden initial 5 bis 6 ml Vollblut benötigt. Diese Blutproben werden einzeln vorsichtig über je 15 ml Ficoll in 45 ml umfassende Falconröhrchen geschichtet. Nach 40-minütiger Zentrifugation der Falconröhrchen bei 1800rpm ohne Bremse werden die Buffy-Coats vorsichtig entnommen und zum ersten Waschschrir auf ca. 4°C gekühltes PBS zu 15ml gegeben. Nach der Befüllung mit PBS wird das Falconröhrchen bei 1800 rpm 7 min zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen und die verbleibenden Pellets werden zum zweiten Waschschrift, der der Ausfällung von Thrombozyten gilt, mit einfachem PBS resuspendiert. Es folgt die Zentrifugation bei 1000 rpm für 7 min. Der Überstand wird erneut verworfen und die Pellets werden nun in 1ml PBS resuspendiert. Die Zellzahl wird unter dem Mikroskop per Hämozytometer gezählt. Dazu werden die Proben zuerst mit je 90 µl PBS resuspendiert. Erneut werden 10 µl entnommen und mit 10 µl 10fach verdünntem Trypanblau resuspendiert. Im Hämozytometer werden 10 µl eingefüllt und die vitalen Zellen in vier Quadranten bei 100facher Vergrößerung gezählt. Die gezählten Zellen werden auf 1 ml aufgerechnet, was in diesem Fall der absoluten Zellzahl (ZZ) entspricht. Der Rechenweg stellt sich wie folgt dar:

*ZZ pro ml= Summe aus 4 Quadranten/4 \* 10<sup>4</sup> \* Verdünnungsfaktor = Konzentration.*

Die Zellsuspension (10µl + 90µl PBS), versetzt mit Trypanblau (10µl) ergab einen für jede Probe identischen Verdünnungsfaktor von 20. Der übrig gebliebene Zellbestand wird auf jeweils vier FACS-Röhrchen verteilt und mit 1,8 µl Antikörpern markiert. Nach 30minütiger Inkubation bei 4°C und einem anschließend letzten Waschschrift mit 0,9 ml PBS bei 1800 rpm für 10 min wird der Überstand verworfen und in 300 µl PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

### **2.5.1.3 Behandlung von Citratblut mit BD-Optilyse**

Hierzu wurden jeder Blutprobe 50 µl entnommen und auf FACS-Röhrchen verteilt. Hier werden je 10 µl des benötigten Antikörpers zugegeben. Nach sanftem Vortexen wird bei Raumtemperatur (20–25 °C) im Dunklen inkubiert. Nach 15 min werden 450 µl BD FACS Lysing Solution zugegeben und es folgt eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur zu 15–30 min. Die Proben sind nun zur Messung im FACS-Durchflusszytometer bereit.

### **2.5.1.4 Glykoproteinbestimmung mittels Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension. Die unterschiedlichen Streulichteigenschaften lassen eine grobe Differenzierung der Zellen zu. Anhand von spezifischen, fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern können einzelne Zellpopulationen aufgrund unterschiedlicher Oberflächenantigene voneinander

abgegrenzt werden. Eine Ansaugkapillare befördert die zu untersuchende Zellsuspension zum Ort der eigentlichen Messung. Zellaggregate werden durch hydrodynamische Fokussierung aufgelöst und die einzelnen Zellen treffen perlschnurartig aneinandergereiht in einen zentralen Hüllstrom am Messpunkt. Dort findet die Bestrahlung der Zellen durch monochromatisches Licht aus einem Argonlaser mit der Wellenlänge 488 nm statt und ergibt je nach Zellgröße ein unterschiedlich starkes Streulicht. Dieses wird erfasst und verstärkt. Das 90°-Seitwärtsstreulicht ist von der Zellbeschaffenheit, d.h. ihrer Oberflächen- und Membranstruktur unabhängig, weswegen als Maß der Zellgröße nur die Intensität des Vorwärtsstreulichtes (FSC) nach Ausblenden des ungebrochenen Mittelstrahles gilt. Optische Filter erfassen zusätzlich im Seitwärtsstreulicht dessen Intensität für die speziellen Wellenlängen 515nm, 580nm, 680nm (FL1, FL2 und FL3).

Hier kommen die kennzeichnenden Emissionsspektren fluoreszierender Farbstoffe (s. Tabelle 4) zur Geltung, welche die Intensität des zugehörigen Streulichtes bedingen. Diese Farbstoffe sind kovalent an spezifische monoklonale Antikörper gebunden. Photomultiplier messen die Lichtstreuung als Maß für Zellgröße und Zellgranularität sowie die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe.

**Tabelle 4: Fluoreszeinfarbstoffe.** Auswahl von Absorptions- und Emissionsmaxima der in der Durchflusszytometrie eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe.

Fluorochrom	Absorptionsmaxima [nm]	Emissionsmaxima [nm]	Abkürzung
Fluoreszeinisothiozyanat*	495	519	FITC
Phycoerythrin*	480; 565	578	PE

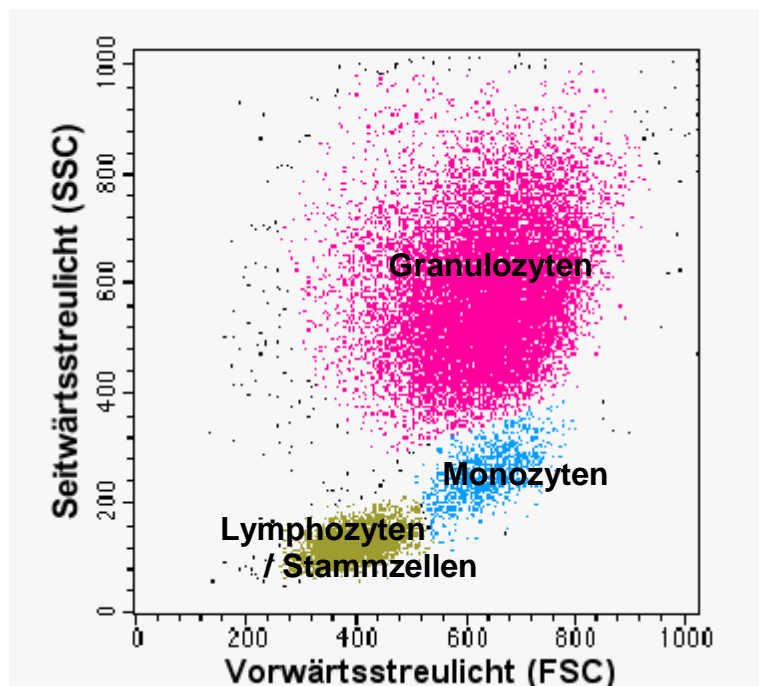
Die Fluoreszenzintensität steht analog zur Oberflächendichte des jeweiligen Zellantigens, gegen das der monoklonale Antikörper gerichtet ist.

Die oben genannten fünf Streulichtparameter werden für jede durch den Messpunkt tretende Zelle erfasst. Es wurden 10.000 bis 100.000 Einzelergebnisse gesammelt. Zur Auswertung wurde ein X-Y-Diagramm verwendet, in dem jeweils zwei Streulichtparameter gegeneinander aufgetragen sind und jedes Messereignis als Punkt dargestellt wird.

Das zur groben Vordifferenzierung der Zellen in verschiedene Zellpopulationen (z.B.



Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Zelldebris) dienende FSC-SSC-Diagramm (s. Abbildung 6) erfasst im Auswertefenster alle Populationen. In einem FL1-FL2-Diagramm wird anschließend zur weiteren Differenzierung die Expression zweier vorgegebener Oberflächenantigene erfasst. Die Einteilung in Quadranten (Quadrant UL-oben links-, FL1- FL2+, Quadrant UR -oben rechts- FL1+ FL2-, Quadrant LL -unten links- FL1-FL2-, Quadrant LR -unten rechts- FL1+FL2-) ermöglicht die automatisierte Auswertung der relativen Häufigkeit der einzelnen Populationen.



**Abbildung 6: Streulicht-Dot-Plot.** Die x-Achse zeigt das vorwärts-, die y-Achse das Seitwärtsstreulicht. Anhäufungen von Zellen mit ähnlichen Streulichteigenschaften sind wie in diesem Beispiel auch ohne deren vorangehende AK-Markierung zu erkennen.

## 2.5.2 Immunphänotypisierung von Stamm- und ausgewählten Tochterzellen

Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung veränderter Stammzellmobilisation und weiteren Auswirkungen der Akupunktur auf das Zellgeschehen sind für diese Arbeit einige Oberflächenmarker von besonderem Interesse. Die Analyse der im zeitlichen Verlauf zur Akupunktur gemessenen Zellpopulationen (s. Tabelle 5) betrifft die im Folgenden dargelegten Zellen sowie sie potenziell beeinflussende Zytokine und Chemokine (vgl. 1.3.2 Zytokine).

**Tabelle 5:** über FACS-Flow bestimmte Antikörper/Zytokin NGF-Rezeptor

CD 133 (+)	CD 34 (+)	CD 45 (+)	CD 14 (+)	CD 19 (+)	CD 4 (+)	Rh-NGF(+)-Rezeptor
Neurogene SZ *	Hämatopoetische SZ	Leukozyten	Monozyten	B-Lymphozyten	T-Lymphozyten	Nerve Growth Factor

\*: der Autorin ist bewusst, dass CD133-Positivität alleine nicht zur Identifizierung neurogener Stammzellen genügt. Diese werden daher in Folgetabellen mit Anführungszeichen („“) als potenziell neurogen gekennzeichnet.

## 2.5.3 Serumparameter

Die hier verwendeten ELISAs benutzen die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Auf eine mit monoklonalen Antikörpern spezifisch für verschiedene Epitope von G-CSF, SDF-1, MMP-8 oder MMP-9 vorbeschichtete Mikroplatte werden Standards sowie Proben pipettiert. Vorhandenes Zytokin wird vom zugehörigen immobilisierten Antikörper gebunden. Durch mehrere Waschschrte werden ungebundene Substanzen entfernt und ein enzymgebundener polyklonaler Antikörper spezifisch für das jeweilige Zytokin wird auf die Wells zugegeben. Nach weiteren Waschschrten zur Säuberung von ungebundenen Antikörper-Enzym Substanzen wird eine Substratlösung den Wells hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit gemäß Gebrauchsinformation wird durch die Zugabe einer Verstärkungslösung eine Farbenentwicklung entsprechend der Menge des im Initialschritt gebundenen Zytokins initiiert. Die Farbenentwicklung wird gestoppt und ihre Intensität wird photometrisch unter der vom Hersteller empfohlenen Wellenlänge gemessen.

### **2.5.3.1 Bestimmung von Nerve Growth Factor und Brain-Derived Neurotrophic Factor aus Serum**

Die für gewöhnlich im Hirngewebe bestimmten Neurotrophine Nerve Growth Factor (NGF) und Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) wurden für die vorliegende Studie mittels spezifischer und hochsensitiver fluorometrischer NGF-/BDNF-ELISA in dem neurochemischen Labor von Herrn Prof. Dr. Hellweg von der Psychiatrischen Klinik der Charité in Berlin im Serum gemessen. Die Details dieser Messmethoden wurden bereits mehrfach veröffentlicht; im Folgenden sollen diese nur in gekürzter Form laut Ziegenhorn et al. (Ziegenhorn 2007) dargestellt werden.

Die wieder aufgetauten Serumproben wurden mit Probe-Puffer verdünnt, welcher verschiedene Proteaseinhibitoren enthält und unspezifische IgG Antikörper, um mögliche unspezifische Reaktionen, d.h. ein Hintergrundrauschen zu minimieren. Insbesondere NGF ist bekannt dafür, mit hoher Affinität an Proteine wie Albumin und 2-Makroglobuline (Crookston 1994, Ronne 1979) zu binden. Im Fall der NGF-Untersuchung wurde das beste Signal zur Rauschzahl bei einer 1:5 Lösung erhalten (z.B. 1 Vol. Serum + 4 Vol. Probe-Puffer) in Kombination mit Überschuss-Erfassung von anti-NGF Antikörper 27/21. Die NGF Konzentrationen wurden anhand der Regressionslinie für den NGF Standard bestimmt (welcher von 0,25 bis 1000 pg/ml gereinigtem Maus 2,5 S NGF reicht) und bei jeder Probe unter denselben Voraussetzungen inkubiert. Die gemessenen NGF-Werte wurden anhand des durchschnittlichen Überschusses an zugesetztem Maus-NGF (125 pg/ml) kalibriert, der für jede Probe bestimmt wurde. Aufgrund hoher BDNF Werte im Serum, wie zuerst durch Radka und Kollegen beschrieben (Radka 1996), wurden die Serumproben vor den BDNF Messungen 1:200 verdünnt (1 Vol. Serum + 199 Vol. Probepuffer). Der BDNF Gehalt wurde quantitativ im Vergleich zum rekombinanten humanen BDNF berechnet. Die untere Nachweisgrenze des BDNF Tests lag bei 1pg/ml. Die Begrenzung des Nachweises spezifischer und unspezifischer Neurotrophinbindung für NGF und BDNF beinhaltete vierfache Fluoreszenz-Bestimmung für jede Serumprobe.

### **2.5.3.2 Bestimmung von IL-6**

IL-6 wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Lun anhand eines sequentiellen Festphase-Chemilumineszenz immunometrischen Assays der Firma DPC Biermann,

Bad Nauheim, gemessen.

Als Festphase dient eine im Immulite-Teströhrchen enthaltene, mit spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern beschichtete Polystyrolkugel. IL-6 aus aufgetautem Probandenserum bildet zusammen mit einem polyklonalen Sekundärantikörper (Kaninchen-AK, mit alkalischer Phosphatase markiert) und dem primären Antikörper während der 30-minütigen Inkubation bei 37°C einen Sandwichkomplex. Ungebundene Reaktionspartner werden durch Zentrifugation eliminiert. Während einer 10minütigen Inkubation wird zugegebenes Chemilumineszenz-Substrat (PPD, 3-Phosphoryloxy-Phenyl-1,2-Dioxetane) vom gebundenen Enzym umgesetzt. Die Menge des gebundenen Enzymkonjugates wird mit Hilfe eines hochsensitiven Chemilumineszenzsubstrates, dem Adamantyl Dioxyetan Phenylphosphat (ADDPP) bestimmt. Der Zerfall eines hierbei durch enzymkatalysierte Dephosphorylierung gebildeten Anions (ADP) als instabiles Zwischenprodukt führt zu einer Lichtemission. Letztere ist zur Konzentration des in der Serumprobe gemessenen Parameters direkt proportional.

#### **2.5.4 Anzüchtung von Stammzellen im Kulturmedium**

Aus den bei der Blutaufbereitung übrig gebliebenen Buffy-Coats wurden Zellkulturen in Stammzellmedium angesetzt. Diese wurden bei 37°C über fünf Tage im Zellinkubator bebrütet. Anschließend wurden die Zellen unter einem Leica Mikroskop in 20.000- sowie 40.000-facher Vergrößerung mit einer Nikon E4500 Kamera fotografiert.

#### **2.6 Statistische Auswertung**

In vorliegender Pilotstudie wird eine Stichprobe von 14 freiwilligen gesunden Probanden der Akupunkturbehandlung unterzogen. Damit kann mit einer Teststärke von 90% eine Mobilisation von Stammzellen bei mindestens 17,46% der Population und mit einer Teststärke von 80% eine Mobilisation von Stammzellen bei mindestens 12,55% der Population nachgewiesen werden (Berechnung Dr. Ekkehart Dietz, Institut für Biostatistik).

Dabei ist die Möglichkeit eines Fehlers 1. Art (Entscheidung dass ein Mobilisierungseffekt vorhanden ist, obwohl er tatsächlich nicht vorliegt) minimiert. Die Ergebnisse wurden deskriptiv per Mittelwert (MW), Standard Error of the Mean ( $\pm$  SEM) und t-Tests

dargestellt. Die Berechnungen liefen auf Microsoft Excel 2000. Signifikante Veränderungen der Resultate in Abhängigkeit von der Zeit wurden von Herrn Dr. Dietz und Kollegen anhand eines nicht-parametrischen Wilcoxon-Testes für gepaarte Proben auf der „Statistical Package for Social Sciences“ (SPSS 15) bestimmt. Des Weiteren wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman zwischen CD133(+), BDNF und MMP-9 berechnet.

### 3. Messergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen der Probanden

##### 3.1.1 Unerwünschte Wirkungen der Akupunktur und Blutentnahmen

Alle Studienteilnehmer haben sowohl Akupunkturbehandlung als auch Blutentnahmen gut und ohne Komplikationen vertragen. Geringe Nebenwirkungen waren lokale Blutergüsse (ein Proband), Hämatome der Ellbeuge (drei Probanden), vorübergehende Hypästhesie der Hände (zwei Probanden), Unterarme (zwei Probanden), oder des Kopfes (drei Probanden).

##### 3.1.2 Blutdruck und Puls

Hinsichtlich der Blutdruck- und Pulsamplitude hat sich bei den meisten Probanden nach Akupunkturbehandlung eine signifikante Senkung der Werte ergeben.

**Tabelle 6:** Blutdruck (RR) und Puls von vierzehn Probanden vor und nach Akupunktur, anschließend Mittelwert und SEM (standard error of the mean).

Signifikanzen: Puls:  $P(\text{Stunde } 0:\text{Stunde } 1)=0,029$ ; Systolischer Blutdruck:  $P(\text{Stunde } 0:\text{Stunde } 1)=0,0016$ ; Diastolischer Blutdruck:  $P(\text{Stunde } 0:\text{Stunde } 1)=0,038$ .

Proband	Puls vor Aku	RR vor Aku	Puls nach Aku	RR nach Aku
0	88	120/75	80	120/80
1	72	130/80	nicht bestimmt	110/70
2	65	120/80	65	120/80
3	60	115/85	60	105/70
4	72	135/85	76	120/85
5	88	130/80	76	125/85
6	72	110/80	64	100/70
7	68	135/105	60	130/90
8	76	110/70	76	90/60
9	56	100/70	48	105/65
10	72	130/80	72	130/90
11	76	105/75	64	100/75
12	64	120/80	48	105/65
13	64	110/75	76	105/75
<b>Mittelwert</b>	70,93	120/80	66,54	111/75
<b>SEM</b>	2,48	3,05/2,28	2,95	3,3/2,56

**Tabelle 7:** Blutdruck (RR) und Puls der beiden nicht akupunktierten Kontrollprobanden vor und nach halbstündiger Bauchlage (BL).

Proband	Puls vor BL	RR vor BL	Puls nach BL	RR nach BL
14	91	120/90	72	160/80
15	73	140/80	60	135/80
<b>Mittelwert</b>	81	130/85	66	147,5/80
<b>SEM</b>	0,5	10/5	6	12,5/0

### 3.1.3 Blutbilder

Die Auswertung der großen differenzierten Blutbilder erfolgte jeweils sofort am Tag der Blutentnahme aus heparinisiertem Blut am Sysmex XE-2100-Gerät. Es ließen sich keine signifikanten Veränderungen der Blutbilder, Hämatokrit- oder Hämoglobinwerte über die vier Zeitpunkte hinweg erkennen ( $P > 0,05$ ). Ebenso in Tabelle 9 ersichtlich die Mittelwerte der Blutbilder beider Kontrollprobanden.

**Tabelle 8:** Mittelwerte und SEM der Blutbilder der 14 akupunktierten Probanden vor und nach Akupunktur im zeitlichen Verlauf.

Stunde	WBC ( $10^3/\mu\text{l}$ )	HGB (g/dl)	HCT (%)	PLT ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Lympho- zyten ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Mono- zyten ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Neutro- phile ( $10^3/\mu\text{l}$ )
0	$5,6 \pm 1,3$	$14,0 \pm 1,4$	$39,9 \pm 3,5$	$242,4 \pm 59$	$1,8 \pm 0,5$	$0,45 \pm 0,1$	$3,2 \pm 1,0$
1	$5,6 \pm 1,4$	$14,0 \pm 1,4$	$39,7 \pm 3,7$	$232,6 \pm 58$	$1,7 \pm 0,5$	$0,43 \pm 0,1$	$3,3 \pm 1,0$
24	$5,5 \pm 1,3$	$13,6 \pm 1,5$	$39 \pm 3,9$	$243,2 \pm 66$	$1,7 \pm 0,6$	$0,43 \pm 0,1$	$3,1 \pm 1,0$
48	$5,6 \pm 1,2$	$13,9 \pm 1,5$	$39,7 \pm 3,8$	$241,1 \pm 60$	$1,8 \pm 0,6$	$0,45 \pm 0,1$	$3,2 \pm 1,0$

**Tabelle 9:** Mittelwerte und SEM der Blutbilder der zwei nicht akupunktierten Kontrollprobanden vor und nach Bauchlage im zeitlichen Verlauf

Stunde	WBC (10 <sup>3</sup> /µl)	HGB (g/dl)	HCT (%)	PLT (10 <sup>3</sup> /µl)	Lympho- zyten (10 <sup>3</sup> /µl)	Mono- zyten (10 <sup>3</sup> /µl)	Neutro- phile (10 <sup>3</sup> /µl)
0	4,3 ± 0,3	14,1 ± 0,1	39,6 ± 1,5	213 ± 33	1,9 ± 0,9	0,8 ± 0,5	2,6 ± 0,1
1	4,2 ± 0,2	14,4 ± 0,5	41 ± 2,4	219,5 ± 22	1,8 ± 0,8	0,8 ± 0,5	2,5 ± 0,1
24	4,7 ± 0,2	14,5 ± 0,1	41,1 ± 0,7	224 ± 22	1,4 ± 0,1	0,3 ± 0	2,8 ± 0,2
48	5 ± 0,1	14,4 ± 0,2	40,2 ± 0,6	215 ± 24	1,3 ± 0,1	0,3 ± 0	3,2 ± 0,2

### 3.2 FACS-Analysen

In den FACS-Analysen wurden unter BD-Optilyse und Ficoll-Aufbereitung unterschiedliche Ergebnisse erzielt wie in Tabelle 10, 11, 13 und 14 dargestellt.

Tabelle 12 zeigt die prozentualen Messergebnisse der beiden Kontrollprobanden.

**Tabelle 10:** Prozentuale Messergebnisse (Mittelwerte und SEM) der Zellpopulationen von 14 akupunktierten Probanden nach Zellaufbereitung anhand BD-Optilyse. CD133 stieg stetig an mit signifikanten Unterschieden 48 Stunden nach Akupunktur.

Gelb gekennzeichnet: signifikanter Unterschied (P=0,015) verglichen mit dem Ausgangswert (Std 0).

BD- Optilyse	“Neuro- gene” SZ (%)	Hämato- poetische SZ (%)	Leuko- zyten (%)	Monozyten (%)	T-Lympo- zyten (%)	B- Lympho- zyten (%)
Stunde	CD133(+)	CD34(+)	CD45(+)	CD14 (+)	CD4(+)	CD19(+)
0	11,4 ± 5,0	0,14 ± 5,0	9,4 ± 2,8	7,6 ± 4,4	28,7 ± 7,9	1,7 ± 1,5
1	17,7 ± 6,0	2,05 ± 2,0	11,6 ± 5,8	8,8 ± 3,0	23,1 ± 7,3	0,3 ± 0,2
24	22,9 ± 7,4	1,95 ± 2,0	15,1 ± 5,3	3,5 ± 0,8	26,9 ± 5,9	1,6 ± 0,9
48	29,1 ± 6,0	0,02 ± 5,0	19,7 ± 5,7	2,6 ± 0,6	30,3 ± 5,7	0,5 ± 0,2



**Tabelle 11:** Mittelwerte und SEM der Zellpopulationen/ $\mu\text{l}$  nach FACS-Messung (Zellaufbereitung anhand BD-Optilyse) der 14 akupunktierten Probanden. Die Absolutzahlen wurden nach dreischrittiger Formel berechnet: (Zellzahl in  $10^3/\mu\text{l}$  \* %CD)/100  $\rightarrow$  Zellzahl \* CD/nl  $\rightarrow$  \*1000  $\rightarrow$  ZZ \* CD/ml = CD %.

Gelb gekennzeichnet: signifikanter Unterschied ( $P=0,015$ ) verglichen mit dem Ausgangswert (Std 0).

BD-Optilyse	“Neurogene” SZ (/μl)	Hämatopoetische SZ (/μl)	Leukozyten (/μl)	Monozyten (/μl)	T-Lymphozyten (/μl)	B-Lymphozyten (/μl)
Stunde	CD133 (+)	CD34 (+)	CD14 (+)	CD45 (+)	CD4 (+)	CD19 (+)
0	599,8 ± 273	7,9 ± 6	417,1 ± 219	497,9 ± 148	1458,2 ± 393	153,9 ± 142
1	885,1 ± 295	95,0 ± 94	409,8 ± 155	598 ± 298	1214,9 ± 377	15,1 ± 10
24	1039,7 ± 358	88 ± 88	179,5 ± 43	819,8 ± 288	1449,5 ± 303	81,8 ± 45
48	1604,4 ± 356	1,32 ± 1	147,3 ± 31	1180,6 ± 364	1750,3 ± 351	27,1 ± 8

**Tabelle 12:** Prozentuale Messergebnisse (Mittelwerte und SEM) der Zellpopulationen von zwei nicht akupunktierten Kontrollprobanden nach Zellaufbereitung anhand BD-Optilyse.

(Pipettierfehler betr. Zeitpunkt 1 (CD133) ließ hier keine SEM-Berechnung zu).

Die CD133-Werte sind insgesamt sehr viel höher als die der Akupunktur-Probanden.

BD-Optilyse	“Neurogene” SZ (%)	Hämatopoetische SZ (%)	Leukozyten (%)	Monozyten (%)	T-Lymphozyten (%)	B-Lymphozyten (%)
Stunde	CD133(+)	CD34(+)	CD45(+)	CD14 (+)	CD4(+)	CD19(+)
0	68,2 ± 2,5	0 ± 0	6,9 ± 0,3	3,2 ± 0,3	51,2 ± 0,6	0,2 ± 0
1	71	0 ± 0	5,6 ± 0,2	1,6 ± 0,1	60,0 ± 13,8	0,2 ± 0,2
24	48,8 ± 6,5	0 ± 0	7,9 ± 0,1	2,0 ± 0	37 ± 0,9	0,3 ± 0
48	68,7 ± 0,8	0 ± 0	9,0 ± 0,6	2,5 ± 0,5	41,4 ± 5,9	0,1 ± 0,1

**Tabelle 13:** Prozentuale Messergebnisse (Mittelwerte und SEM) der Zellpopulationen von 13 akupunktierten Probanden nach Zellaufbereitung anhand Ficoll.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Messzeitpunkte.

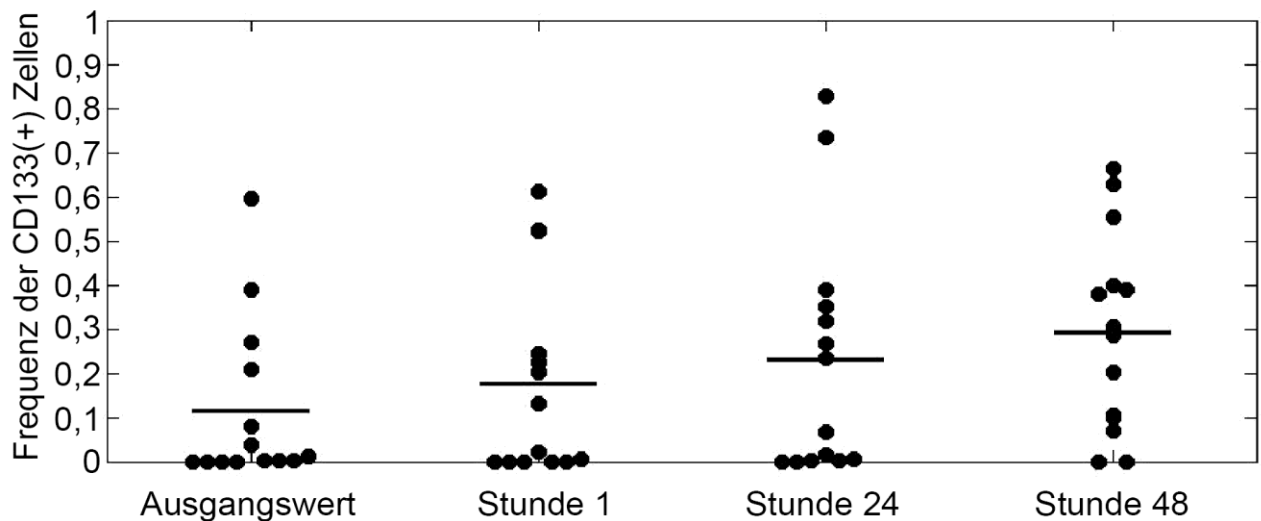
Ficoll	“Neurogene” SZ (%)	Hämatopoetische SZ (%)	Leukozyten (%)	Monozyten (%)	T-Lymphozyten (%)	B-Lymphozyten (%)
Stunde	CD133 (+)	CD34 (+)	CD14 (+)	CD45 (+)	CD4 (+)	CD19 (+)
0	0,3 ± 0,1	3,4 ± 1,0	39,2 ± 5,6	72,2 ± 7,2	2,84 ± 0,6	5,9 ± 1,4
1	0,4 ± 0,2	3,0 ± 0,7	41,0 ± 4,9	77,1 ± 4,5	3,2 ± 0,7	5,1 ± 0,8
24	0,3 ± 0,2	5,7 ± 2,0	36,7 ± 4,3	75,1 ± 6,0	7,0 ± 1,8	8,7 ± 1,5
48	0,4 ± 0,3	2,3 ± 0,7	33,1 ± 5,3	71,4 ± 7,4	4,7 ± 2,5	5,1 ± 0,9

**Tabelle 14:** Mittelwerte und SEM der Zellpopulationen/µl nach FACS-Messung (Zellaufbereitung anhand Ficoll) von 13 akupunktierten Probanden.

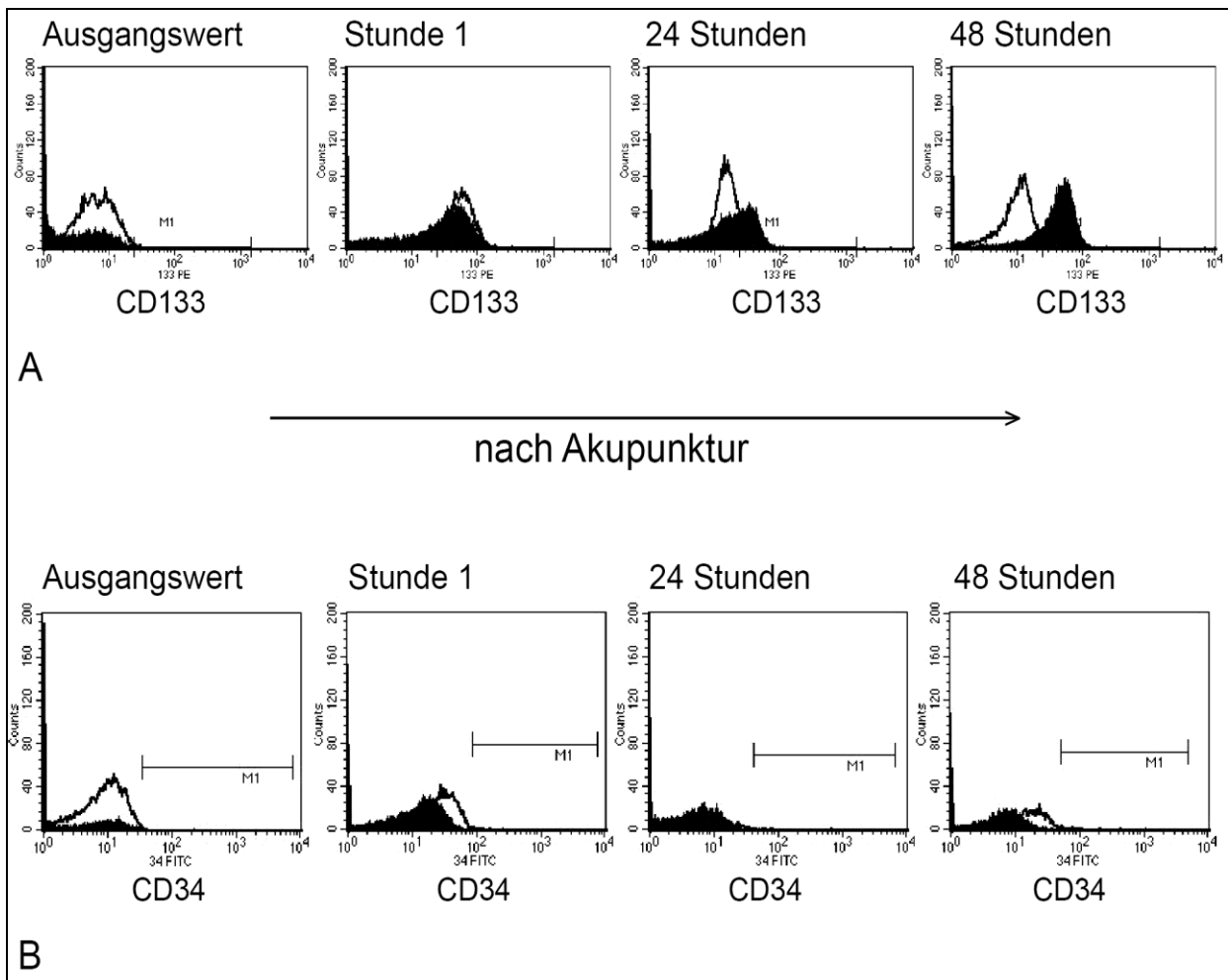
Ficoll	“Neurogene” SZ (/µl)	Hämatopoetische SZ (/µl)	Leukozyten (/µl)	Monozyten (/µl)	T-Lymphozyten (/µl)	B-Lymphozyten (/µl)
Stunde	CD133 (+)	CD34 (+)	CD45 (+)	CD14 (+)	CD4 (+)	CD19 (+)
0	2,68 ± 1,3	27,0 ± 7,8	854,1 ± 321,2	408,0 ± 158,3	28,0 ± 7,2	44,3 ± 9,1
1	3,86 ± 2,4	51,7 ± 18,9	885,8 ± 240,5	550,0 ± 220,0	20,5 ± 5,2	37,2 ± 9,2
24	0,86 ± 0,4	43,0 ± 15,0	748,4 ± 161,4	329,9 ± 75,4	50,5 ± 21,7	69,8 ± 22,3
48	6,39 ± 5,2	36,3 ± 13,3	1022,7 ± 161,4	438,5 ± 80,1	43,4 ± 18,1	62,4 ± 14,7

Betreffs Häufigkeiten des Auftretens von CD34(+), CD14(+), CD45(+), CD4(+) und CD19(+) Zellen ergaben sich zu den vier gemessenen Zeitpunkten keine auffälligen Unterschiede. Bezüglich CD133(+)/CD34(-) Zellen hingegen erreichten zwölf von 14 Probanden unter BD-Optilyse-Solution-Messung nach Akupunktur höhere Werte im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Akupunktur. Die relativen und absoluten Werte mit BD-Solution aufbereiteten CD133(+)/CD34(-) markierten Zellen (siehe Tabelle 10 und 11) nahmen bei sechs Teilnehmern direkt nach der Akupunkturbehandlung zu und stiegen 24 Stunden später bei fünf dieser sechs Probanden noch weiter an. In diesem

Zeitraumen nahmen die CD133(+)/CD34(-) Fraktionen auch bei zwei weiteren Probanden zu. Vier andere Studienteilnehmer mobilisierten 48 Stunden später. Der CD133(+)-Anstieg über die vier Zeitpunkte hinweg lässt sich in Tabelle 10 und 11, sowie Abbildung 7 ersehen. Ein repräsentatives Profil der Durchflusszytometrie findet sich in Abbildung 8. Nur ein Proband wies keine Veränderung auf, während ein anderer zu Beginn höhere CD133(+)/CD34(-) Werte hatte als nach der Akupunktur. Signifikant war der Anstieg der prozentualen sowie absoluten CD133(+) Ergebnisse 48 Stunden nach Akupunktur im Verhältnis zur Nulllinie ( $p=0,015$ ). CD34 (+)-Zellen waren im peripheren Blut während dessen nicht zu verzeichnen (vgl. Tabelle 10, 11 und Abbildung 8). Die Veränderungen der CD133(+)/CD34(-) Zellen korrelierten im Vergleich von Stunde 24 zu Stunde 48 invers miteinander ( $r= -0.598$ ,  $p= 0.024$ ).



**Abbildung 7:** Prozentuale Darstellung der Häufigkeit von CD133-positiven Zellen nach direkter Markierung der Zellen im peripheren Blut ohne Ficollisolation.



**Abbildung 8:** Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenantigene CD133/1, CD133/2 und CD34 (nach BD-Optilyse-Zellaufbereitung) eines Probanden (Proband 10) im zeitlichen Verlauf nach Akupunkturbehandlung, überlagert auf IgG-Kontrollen in weiß.

**A:** CD133(+) Zellen (schwarz) auf IgG-Kontrolle (weiß, PE-Markierung)

**B:** CD34(+) Zellen (schwarz) auf IgG-Kontrolle (weiß, FITC-Markierung)

Im Gegensatz zu den akupunktierten Probanden waren die Ausgangswerte der Kontrollprobanden bereits sehr hoch und fielen nach 24 Stunden ab.

Unter Aufbereitung des Blutes über Ficoll ergaben sich keine mit der BD-Optilyse-Solution-Aufbereitung vergleichbaren Veränderungen der Messergebnisse über die vier Zeitpunkte hinweg.

### 3.3 Stammzellen in Kultur

Nach Aufbereitung des Blutes über Ficoll wurde ein kleiner Anteil des gereinigten Zellsubstrates kultiviert. In den bei 37°C bebrüteten Zellkulturen ließen sich nach fünf Tagen große Zellen erkennen, die Stammzellen ähneln. Neuronale Formationen lassen sich zu diesem Zeitpunkt nicht erkennen.

### 3.4 Auswertungen der Serumparameter

Die Messergebnisse der unter Punkt 2.3.3 aufgeführten Zytokine und Chemokine wurden hier ihrer genaueren Beschreibung vorweg tabellarisch aufgelistet. Quantitativ zeigten sich teilweise signifikante Veränderungen:

**Tabelle 15:** ELISAs der Cytokine / Chemokine - Mittelwerte und SEM der 13 akupunktierten Probanden. Gelb gekennzeichnet: signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert. Signifikanzen: MMP-9: P (Stunde 0:Stunde 24)=0,028; P (Stunde 0:Stunde 48)=0,022; BDNF: P (Stunde 0:Stunde 48)=0,014.

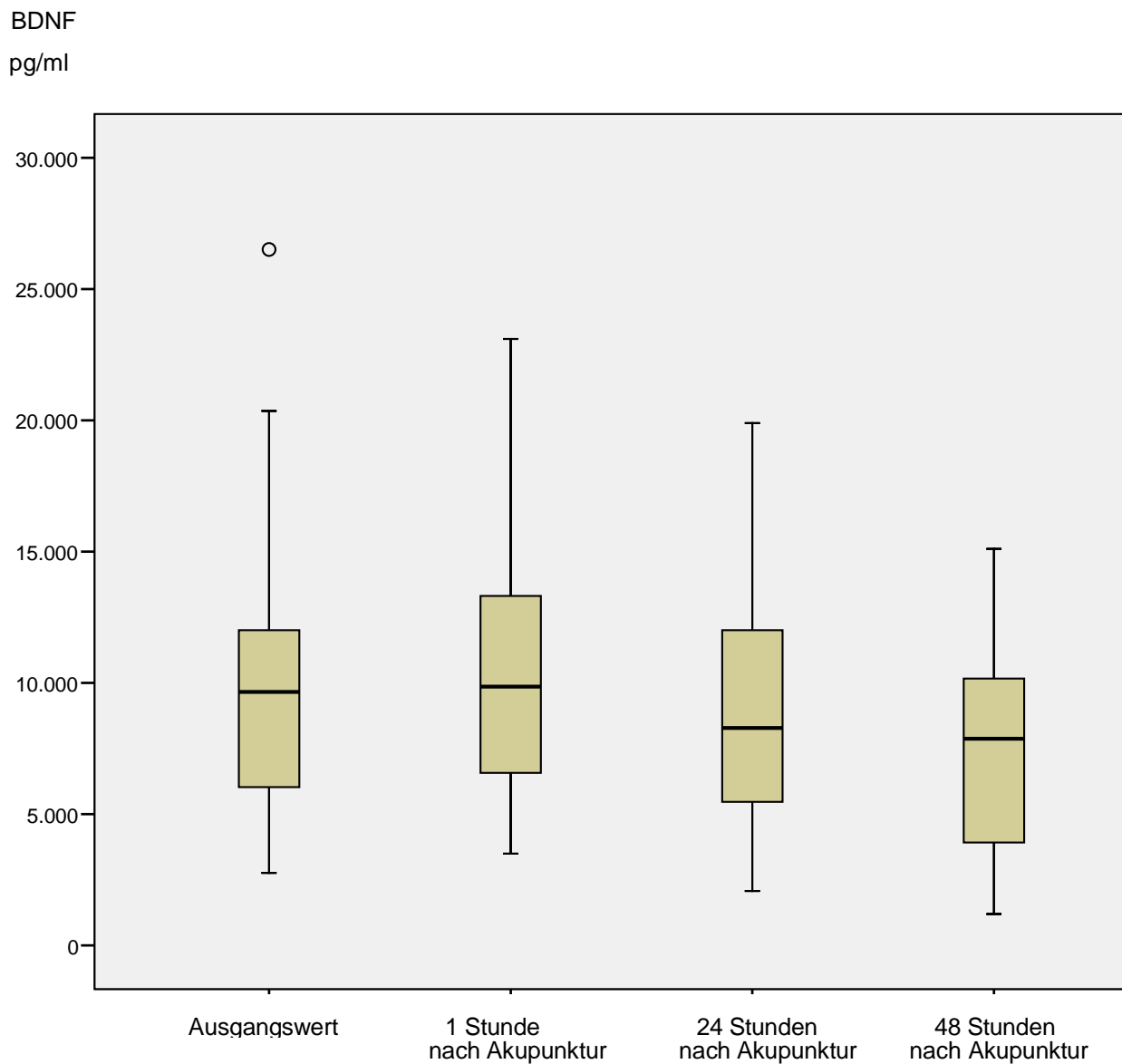
Std	SDF-1	G-CSF	MMP-9	MMP-8	NGF	BDNF
	ng/ml	pg/ml	ng/ml	ng/ml	pg/ml	ng/ml
0	1,8 ± 70,0	0,64 ± 0,06	44,6 ± 1,9	0,043 ± 0,01	22,7 ± 8,7	10,8 ± 1,7
1	18 ± 61,6	0,65 ± 0,06	43,4 ± 1,5	0,0043 ± 0,0	17,9 ± 8,3	10,4 ± 1,4
24	1,8 ± 69,6	0,60 ± 0,04	41,8 ± 1,5	0,041 ± 0,03	21,2 ± 8,1	9,2 ± 1,2
48	18 ± 77,2	0,65 ± 0,06	40,9 ± 1,5	0,11 ± 0,04	22,5 ± 8,7	7,5 ± 1,0

**Tabelle 16:** ELISAs der Cytokine / Chemokine – Mittelwerte und SEM der beiden nicht akupunktierten Probanden.

Std	SDF-1	G-CSF	MMP-9	MMP-8	NGF	BDNF
	pg/ml	pg/ml	ng/ml	ng/ml	pg/ml	ng/ml
0	1720 ± 270	0,52 ± 0,03	58,75 ± 19	0,31 ± 0,31	5,79 ± 1,09	10,43 ± 0,21
1	1540 ± 290	0,53 ± 0,01	51,63 ± 13,88	0,29 ± 0,29	nicht gemessen	9,50 ± 0,12
24	1785 ± 165	0,6 ± 0,07	55,13 ± 16,13	0,42 ± 0,01	6,13 ± 1,58	10,15 ± 0,61
48	1912 ± 37,5	0,6 ± 0,08	53,5 ± 19,75	0,46 ± 0,12	5,73 ± 1,1	10,90 ± 0,06

### 3.4.1 BDNF Auswertung

Der Akupunkturbehandlung folgend zeigte sich eine Reduktion des BDNF, die nach 48 Stunden signifikant war (Tabelle 15, Abbildung 9). Bei Proband 0 (Abbildung 15) erreichte der Wert an Tag 6 wieder den Ausgangswert.



**Abbildung 9: Boxplot BDNF:** Verteilung und Mittelwerte der 14 akupunktierten Probanden. Zum Zeitpunkt des Ausgangspunktes fiel als Ausreißer (Proband 2) mit einem vergleichsweise hohen BDNF-Wert von 26500 pg/ml auf.

Der prozentuale Zu-/ Abnahmewert der BDNF-Werte der jeweiligen Probanden zu den drei Zeitpunkten nach Akupunktur im Verhältnis zum Ausgangswert lässt sich aus Tabelle 17 entnehmen. Die Abnahmetendenz lässt sich bereits 24 Stunden nach

Akupunktur mit einem Mittelwert von -3,8% feststellen und ist 48 Stunden nach Akupunktur mit -20,9% signifikant. Unter den beiden Kontrollprobanden (s. Unterkapitel 3.4.3, Tabelle 19) hingegen ergab sich zu Stunde 1 und Stunde 24 nach Bauchlage zwar ein geringer BDNF-Abfall von -9% bzw. -2,7% im Vergleich zum Ausgangswert, bis Stunde 48 hingegen ein leichter BDNF-Anstieg (4,5%).

**Tabelle 17.** Prozentuale Zu-/Abnahme von BDNF pro Proband - Einzelwerte, Mittelwert und SEM. Die prozentuale Zu-/Abnahme wurde nach regulärer Prozentsatzrechnung erstellt, indem von den jeweiligen Einzelwerten der Stunden 1, 24 und 48 nach Akupunktur der jeweilige Ausgangswert vor Akupunktur abgezogen und die errechneten Differenzen anschließend durch den Ausgangswert dividiert und mit 100 multipliziert wurden.

Proband	Zu-/Abnahme Stunde 1 verglichen mit dem Ausgangswert (%)	Zu-/Abnahme Stunde 24 verglichen mit dem Ausgangswert (%)	Zu-/Abnahme Stunde 48 verglichen mit dem Ausgangswert (%)
Proband 0	9,2	-22,7	3,2
Proband 1	-32,7	-57,7	-52,9
Proband 2	-12,9	-25	-43
Proband 3	4,1	-64	-74,3
Proband 4	18,1	20,9	-88,5
Proband 5	65,7	44,4	-21
Proband 6	-29,9	-49,2	-31,1
Proband 7	47,7	64,8	12,8
Proband 8	26,5	-25	30,2
Proband 9	-9,3	-13,9	-14,9
Proband 10	-19,6	25,1	3,5
Proband 11	5,3	10,9	11,5
Proband 12	-14,4	0	-5
Proband 13	-25	38,7	-23,6
Mittelwert	2,4	-3,8	-20,9
SEM	7,8	10,6	9,2

Als wichtige Quelle für Serum-BDNF gelten Thrombozyten (Fujimura 2002). Um bei der BDNF Messung eine Abhängigkeit von der Thrombozytenzahl auszuschließen, wurden die Thrombozytenzahlen (PLT) mit den BDNF-Frequenzen abgeglichen. Die Thrombozytenzahl blieb, wie schon in Tabelle 8 gezeigt, während des Beobachtungszeitraums konstant. Die Reduktion der BDNF-Konzentration erfolgte unabhängig von der Plättchenzahl.

### 3.4.2 MMP-9 Auswertung

MMP-9 nahm bei zehn der Testprobanden kontinuierlich ab, stieg bei zwei anderen an und blieb bei zwei weiteren konstant. Die MMP-9 Abnahme war ab 24 Stunden nach Akupunktur signifikant ( $p=0,033$ ). Die Werte sanken nochmals bis 48 Stunden nach Akupunktur. Die Kurven von MMP-9 verliefen insgesamt relativ flach. Bei einer mittleren Reduktion der MMP-9 Werte um -1,5% zwischen dem Zeitpunkt vor Akupunktur und Stunde 1 nach Akupunktur sank die MMP-9 Konzentration in fünf Fällen leicht ab. Im Verlauf verstärkte sich diese Tendenz unter neun Probanden, was einer durchschnittlichen Reduktion von -5,7% zwischen dem Zeitpunkt vor Akupunktur und 24 Stunden nach Akupunktur entspricht. Die durchschnittliche Reduktion ab dem Ausgangszeitpunkt bis Stunde 48 beträgt -7,4%. Zwischen Stunde 24 und 48 sanken die Werte bei vier Probanden. Bei den restlichen zehn stieg die MMP-9-Konzentration bis zur 48. Stunde erneut an (Abbildung 10).

Die Auswertung der Messungen an den beiden nicht akupunktierten Kontrollprobanden (s. Unterkapitel 3.4.3, Tabelle 19) ergab eine Senkung bis zur ersten Stunde nach Bauchlage von -12,1%. Zu Stunde 24 nach Bauchlage betraf die Senkung verglichen mit dem Ausgangswert nur mehr -6,2%, zu Stunde 48 wiederum -8,9%.

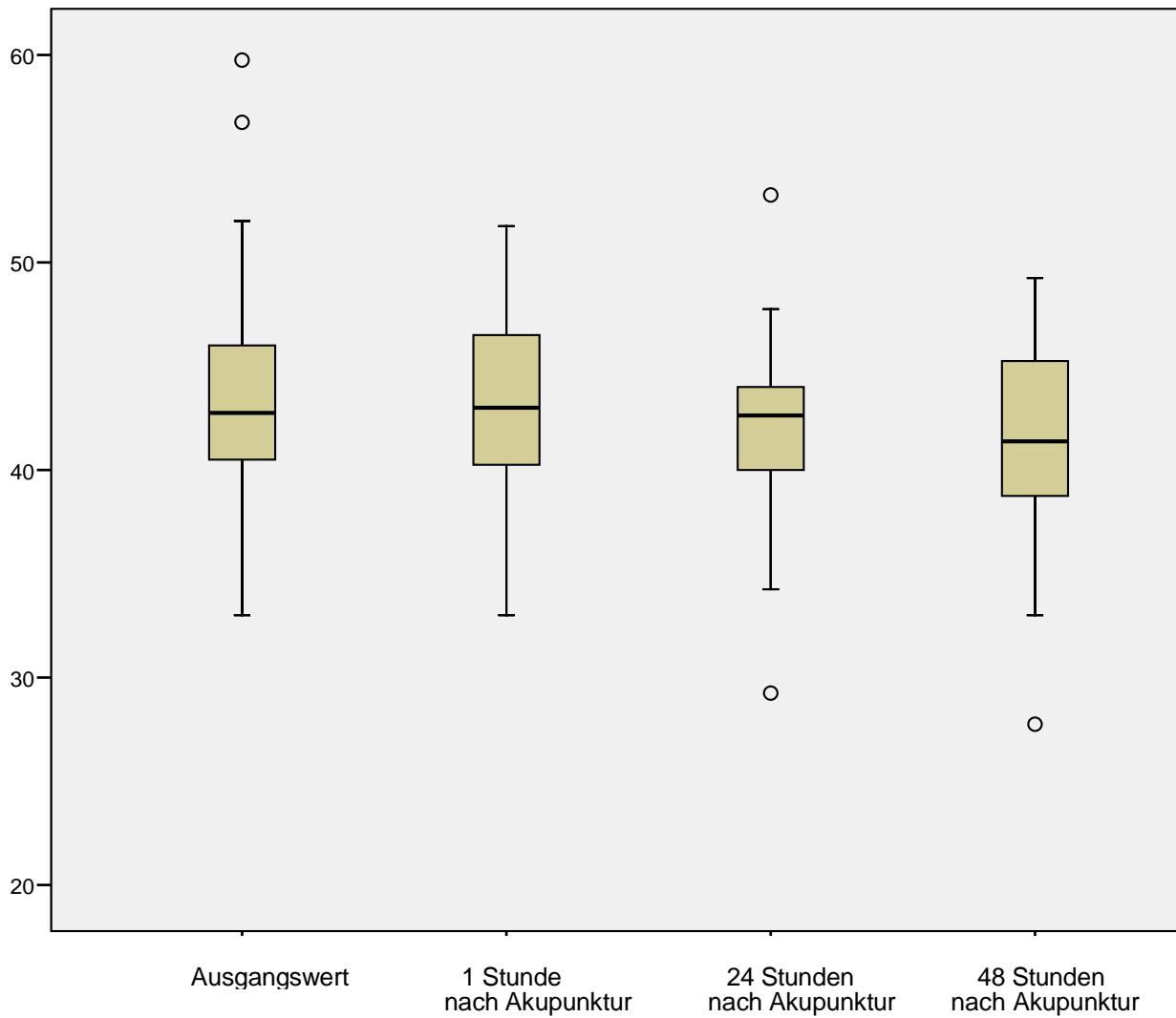
Aufgrund der geringen Anzahl der Kontrollprobanden ist eine statistische Aussage nicht möglich.



**Tabelle 18.** Prozentuale Zu-/Abnahme von MMP-9 pro Proband - Einzelwerte, Mittelwert und SEM.  
Die Prozentsatzberechnung geschah wie zu Tabelle 17 erläutert.

<b>Proband</b>	<b>Zu-/Abnahme Stunde 1 verglichen mit dem Ausgangswert (%)</b>	<b>Zu-/Abnahme Stunde 24 verglichen mit dem Ausgangswert (%)</b>	<b>Zu-/Abnahme Stunde 48 verglichen mit dem Ausgangswert (%)</b>
<b>Proband 0</b>	3,6	-3,6	-2,4
<b>Proband 1</b>	8,7	-3,8	-1,9
<b>Proband 2</b>	0	-11,4	0
<b>Proband 3</b>	-41,8	-26,4	-29,3
<b>Proband 4</b>	-0,6	-5,6	-37,6
<b>Proband 5</b>	6,2	-15,4	-3,7
<b>Proband 6</b>	10	6,1	1,1
<b>Proband 7</b>	-2,4	4,2	9,7
<b>Proband 8</b>	-0,48	-17,3	-8,7
<b>Proband 9</b>	1,1	-7,1	-1,6
<b>Proband 10</b>	13,8	10,7	-8,8
<b>Proband 11</b>	-0,6	-0,6	0
<b>Proband 12</b>	-9,4	-2,9	-7
<b>Proband 13</b>	-8,8	-6,2	-13,2
<b>Mittelwert</b>	-1,5	-5,7	-7,4
<b>SEM</b>	3,6	2,6	3,3

MMP-9 ng/ml



**Abbildung 10: Boxplot MMP-9.** Verteilung und Mittelwerte der 14 akupunktierten Probanden. Ausreißer zum Ausgangszeitpunkt: Proband 3 (59,75ng/ml) und Proband 13 (56,75ng/ml); Ausreißer 24 Stunde nach Akupunktur: Proband 13 (53,25ng/ml) und Proband 2 (29,25ng/ml); Ausreißer 48 Stunden nach Akupunktur: Proband 4 (27,75ng/ml).

Bei den übrigen Parametern (G-CSF, SDF-1, MMP-8 und IL-6) gab es keine akupunkturinduzierten Veränderungen.

### 3.4.3 Auswertung der ELISAs der Kontrollgruppe

**Tabelle 19:** ELISAs der Cytokine / Chemokine – Mittelwerte und SEM der beiden Kontrollprobanden.  
Stunde 1 für NGF nicht gemessen.

Stunde	NGF pg/ml	BDNF ng/ml	G-CSF pg/ml	SDF-1 pg/ml	MMP-9 ng/ml	MMP-8 ng/ml
0	5,79 ± 1,09	10,43 ± 0,21	0,52 ± 0,03	1720 ± 270	58,75 ± 19	0,31 ± 0,31
1	-	9,50 ± 0,12	0,53 ± 0,01	1540 ± 290	51,63 ± 13,88	0,29 ± 0,29
24	6,13 ± 1,58	10,15 ± 0,61	0,6 ± 0,07	1785 ± 165	55,13 ± 16,13	0,42 ± 0,01
48	5,73 ± 1,1	10,90 ± 0,06	0,6 ± 0,08	1912 ± 37,5	53,5 ± 19,75	0,46 ± 0,12

Betreffs der beiden nicht akupunkturierten Kontrollprobanden ergaben sich unter den Parametern NGF, G-CSF und MMP-9 keine groben Veränderungen über die vier Zeitpunkte hinweg. SDF-1 und MMP-8 zeigten leichte Steigungen, Die Ergebnisse der MMP-9- und BDNF-Messungen der Kontrollprobanden werden unter Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 behandelt. Bei der Zahl von nur zwei Probanden kann nicht von Signifikanz ausgegangen werden.

### 3.5 Korrelation der CD133(+)/CD34(-), BDNF- und MMP-9-Werte zueinander

Um die Korrelationen zwischen BDNF, MMP-9 und CD133 zu betrachten, wurden ihre Verläufe zu einzelnen Zeitpunkten und ihre Relationen zueinander statistisch überprüft.

#### – Vergleich CD133 % mit BDNF (ng/µl):

Während BDNF und CD133 zu Stunde 1 nach Akupunktur bei sechs Probanden gleiche Verläufe aufwiesen (vier steigend, zwei sinkend), stiegen zu Stunde 24 bei vier der Probanden die beiden Werte gleichzeitig (Proband 0, 1, 9 und 12), bei zwei anderen sanken sie simultan (Proband 10 und 13). Zu Stunde 48 stiegen CD133(+)-Zellen und BDNF bei zwei der Probanden und sanken gleichzeitig bei zwei anderen. Im Gegensatz dazu verhielten sich CD133 und BDNF direkt nach Akupunktur bei fünf, nach 24 Stunden bei acht und nach 48 Stunden bei zehn Probanden antiparallel.

Entsprechend verhielt sich der CD133 Wert zu Stunde 1 bei fünf der Probanden konstant (Proband 1, 2, 3, 5, 7). Zu Stunde 24 zeigten – bei stärker ansteigenden Einzelwerten – nur mehr zwei Probanden einen konstanten Verlauf (CD133 der Probanden 3 und 6). Zu Stunde 48 zeigten sich weder BDNF noch CD133(+)/34(-)

Werte konstant.

Beim Vergleich der Ausgangswerte mit den Werten zu Stunde 48 war die Zunahme der CD133(+)/34(-) Zellen bei neun von zwölf Probanden von sinkenden BDNF Konzentrationen begleitet (Proband 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13). Fünf dieser Fälle ging ein initialer Anstieg voraus (bei Proband 3, 5 und 11 je von Stunde 0 zu Stunde 1, Proband 4 und 7 je von Stunde 0 zu Stunde 1 und weiter zu Stunde 24).

#### **- Vergleich CD133 % mit MMP-9 (ng/µl):**

Bei MMP-9 ließ sich, verglichen zur Tendenz von CD133(+)/34(-), zu Stunde 1 in vier Fällen gleiche Tendenz (Proband 0, 9 und 10 steigend, Proband 12 sinkend) feststellen, wobei in sechs der Fälle einer bzw. zwei der beiden Parameter (MMP-9: Proband 2, 4, 8, 11; CD133: Proband 1,3; BDNF: Proband 3) verhältnismäßig konstant blieb. Zu Stunde 24 zeigten fünf Fälle bezüglich MMP-9 und CD133 gleiche Tendenzen (Proband 6, 8, 9, 12 steigend, Proband 10 sinkend), während je ein Einzelwert verglichen mit vorherigem Messpunkt unverändert blieb (MMP-9: Proband 11, CD133: Proband 3). Zu Stunde 48 stiegen in drei Fällen CD133(+)/34(-) gleichzeitig mit MMP-9 (Proband 6, 7, 10) und sanken parallel bei drei anderen Probanden (Proband 0, 9, 12). Die Veränderungen von MMP-9 korrelierten mit denen von CD133(+) Zellen nach 24 Stunden ( $r= 0.612$ ,  $p= 0.02$ ).

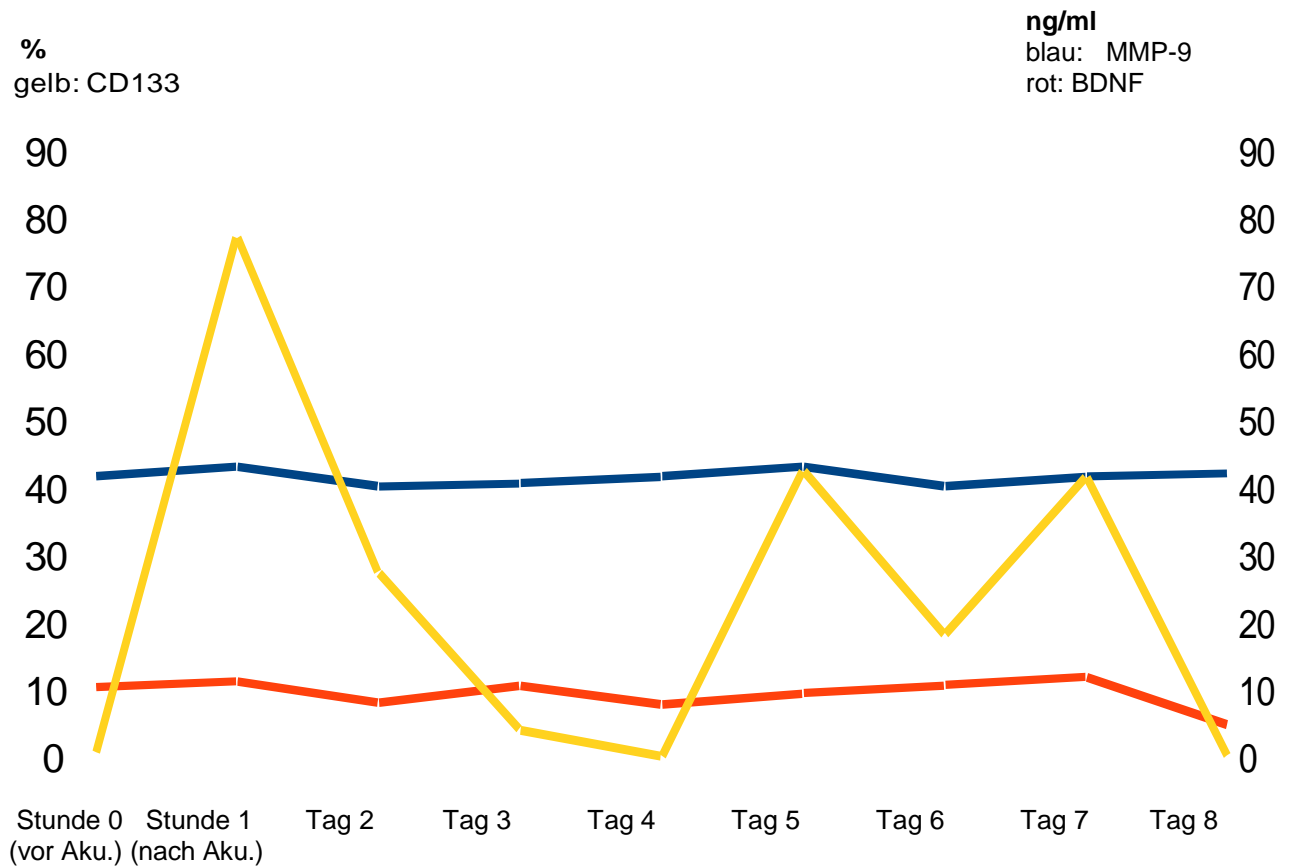
#### **- Vergleich BDNF und MMP-9**

Eine Stunde nach Akupunktur korrelierten die BDNF Werte stark mit dem MMP-9 Gehalt zum selben Zeitpunkt ( $r= -0.849$ ,  $p< 0.001$ ), und BDNF Konzentrationen zu Stunde 24 korrelierten mit MMP-9 Werten zu allen Zeitpunkten ( $r= -0.533$  bis  $-0.655$ ,  $p< 0.05$ ). Zeitabhängige Änderungen von BDNF korrelierten mit zeitabhängigen Änderungen von MMP-9 ( $\Delta$ MMP-9 vor Akupunktur bis zu Stunde 1 nach Akupunktur versus  $\Delta$ BDNF von Stunde 24 zu Stunde 1:  $r= 0.564$ ,  $p= 0.035$ ).

### **3.6 Beobachtung einer Probandin über acht Tage nach Akupunktur**

Über den Zeitraum von 8 Tagen wurden bei Proband 0 dieselben Parameter gemessen wie bei den übrigen Studienteilnehmern. Es ergaben sich keine markanten Unterschiede in Blutbild, Hämatokrit- oder Hämoglobinwert, CD34(+), CD14(+), CD45(+), CD4(+) und CD19(+) Zellen. Auch die ELISAS für G-CSF, SDF-1 $\alpha$ , MMP-8 und NGF fielen unauffällig aus. Betreffs der bei den übrigen Probanden über zwei Tage gemessenen signifikant ausgefallenen Parameter war auch hier ein steiler initialer Anstieg der CD133(+)/CD34(-) Zellen in der Stunde nach Akupunktur von 0,6 auf 77,0 % zu verzeichnen. Der Wert fiel wieder nach 24 Stunden und sank bis Tag vier auf den Ausgangswert. Zwei weitere Peaks von 40% wurden an Tag 5 und 7 festgestellt. Gefolgt von einem M-förmigen Peak zwischen Tag vier und acht erreichte er zu diesem letzten Messzeitpunkt wieder den Ausgangswert. BDNF sowie MMP-9 verliefen bei dieser Probandin beide mit mäßigen Variationsbreiten von 41,25 ng/ml  $\pm$  0,38 für MMP-9 und 9,4 ng/ml  $\pm$  0,75 für BDNF, welcher zum letzten Messzeitpunkt seinen extremsten Tiefpunkt von 4,7 ng/ml erreichte (Abbildung 11).

### Proband 0: MMP-9, BDNF und CD133 über 8 Tage



**Abbildung 11: Proband 0, gemessen über den Zeitraum von 8 Tagen nach Akupunktur.**

gelb: CD133 - vor Akupunktur: 0,58%  
 - 1 Stunde nach Akupunktur: 77,0 %  
 - 8 Tage nach Akupunktur: 0,00 %

blau: MMP-9 - vor Akupunktur: 41,5 ng/ml  
 - 48 Stunden nach Akupunktur: 40,5ng/ml  
 -Tag 8: 42 ng/ml

rot: BDNF - vor Akupunktur: 10,3 ng/ml  
 - 48 Stunden nach Akupunktur: 10,6 ng/ml  
 -Tag 8 nach Akupunktur: 4,7 ng/ml

## **4. Diskussion**

Bei gesunden Probanden konnten wir nach Akupunktur entsprechend des klassischen Akupunkturmusters bei SCI innerhalb von zwei Tagen einen signifikanten Anstieg von CD133(+)/CD34(-) Zellen im Blut feststellen. Parallel sanken Serumkonzentrationen der Migrations- bzw. Wachstumsfaktoren MMP-9 und BDNF. Nach unserem Wissen ist dies die erste Studie an Menschen, die einen Zusammenhang zwischen Stammzellmobilisation und Akupunktur thematisiert. Die heutige Datenlage sowohl zur Akupunktur als auch zur Stammzellwirkung in der Therapie des SCI ist jedoch sehr viel umfangreicher. Die Mobilisierung neurogener Zellen aus dem Knochenmark wird kontrovers diskutiert. Die Identität von Neurotrophin-sezernierenden Zellen im Blut ist nicht vollständig geklärt und ihre Position im Stammzellbaum bleibt ungesichert.

### **4.1 Beurteilung der Akupunktur unter wissenschaftlichen Bedingungen**

Die Akupunktur stellt die westliche Wissenschaft seit jeher vor das Problem mangelnder Objektivierbarkeit. Der TCM geht es, wie im Kapitel „1.1.2 Philosophische Grundsätze“ beschrieben, um mehr als die Eradikation von Symptomen. Der traditionell chinesisch arbeitende Arzt bemüht sich darum, mit der patienteneigenen Konstitution unter Miteinbeziehung aktueller, stets wandelbarer Faktoren zu interagieren. Durch die spezifische chinesische Diagnostik ist der Behandler jederzeit im Stande, spontane Änderungen des Zustandes seines Patienten zu verfolgen und im Sinn einer dynamischen Behandlung, sei es durch Manipulation oder Versetzen der Nadeln etc., zu interagieren. Es kann also kein anderer als der sachkundige TCM-Arzt die Nadeln setzen.

In der Einleitung wurde die GERAC Studie genannt, welche ein klassisches Beispiel für Schwierigkeiten bezüglich objektiver Beurteilung der Akupunktur liefert. Ihr zufolge ist eine Akupunkturtherapie der an aktuellen Leitlinien orientierten Standardtherapie bei Rücken- und Knieschmerzen sogar überlegen, was letztendlich zur heutigen Kostenübernahme durch die gesetzlichen Krankenkassen bei wenigen Schmerzindikationen führte (Stux b 2008, German Acupuncture Trials). Nichtsdestotrotz konnten in der GERAC-Studie keine unterschiedlichen Ergebnisse zwischen Verum- und Sham- Akupunktur festgestellt werden. Neurophysiologen und Akupunkteure wie

Thalmann setzen entgegen, dass im Zuge der GERAC-Studie wichtige klassische Akupunkturpunkte nicht mit einbezogen wurden, welche mit Headschen Zonen zusammenfallen und mittels derer vermutlich noch stärkere Wirkungen erzielt werden könnten. Außerdem wird das falsche Einstechen zu nahe an anderen Headschen Triggerpunkten bei der Sham-Akupunktur angefochten, welche hierdurch an Aussagekraft verliere (Thalmann 2005). Diese Ansicht beruht auf der Erklärung der Akupunkturwirkung über die ebenfalls oben aufgeführten komplexen neurophysiologischen Regelkreise der Schmerzentstehung und -übertragung (Stux c 2008).

In vorliegender Untersuchung zur SCI-Akupunktur wurde im zeitlichen Verlauf zur Akupunktur keine subjektive Schmerzschwelle der gesunden Probanden, sondern biochemisches, zelluläres Geschehen gemessen. Hiermit wird willentliche, genauso wie unterbewusste Manipulation durch die Probanden ausgeschlossen. Die Durchführung durch eine klassisch geschulte Akupunktur-Fachärztin ermöglichte zudem eine hohe Punktpräzision. Die gesunden Probanden sind bezüglich Alter, Geschlecht und Begleitmedikation nicht durchweg homogen. So sind bei gesunden Frauen beispielsweise menstionsabhängige BDNF-Konzentrationen bekannt (Pluchino 2009). Ebenso werden orale Kontrazeptiva bezüglich neurogener Stoffwechselfvorgänge kritisch diskutiert (Jayaraman 2014). Zum noch präziseren Ausschluss derartiger oder ähnlicher Einflussfaktoren wäre eine spezifischere Probandenauswahl günstig.

## **4.2 Diskussion der signifikant veränderten Parameter**

Es folgt die Betrachtung der in vorliegender Pilotstudie signifikant veränderten Marker im Einzelnen, im Zusammenspiel und nicht zuletzt im Abgleich mit Ergebnissen bisheriger Forschung zur Spinalläsion und Akupunktur bei ZNS-Schäden.

### **4.2.1 Anstieg von CD133(+) Zellen**

Wie im vorangehenden Kapitel dargelegt, ergaben sich bei den FACS-Messungen der Zellphänotypen deutlich steigende Werte im Bereich von CD133(+)-Zellen unter Hämolyse des Probandenblutes anhand BD-Optilyse-Solution nach vorangegangener Antikörpermarkierung. Signifikanz wurde nach 48 Stunden erreicht. Eine Assoziation der steigenden CD133(+)-Zellen zu CD34(+)-Zellen war nicht



gegeben. Neben der Betrachtung der Ergebnisse im Kontext sonstiger wissenschaftlicher Ergebnisse zum Themenkomplex steht zur Diskussion, dass die positiven Ergebnisse für CD133(+)-Zellen nach Ficoll-Zellaufbereitung trotz gleichem Messgerät nicht reproduzierbar waren. Zudem ist die gemessene Baseline der CD133(+)-Zellen im Vergleich zu anderen Studien teilweise ausgesprochen hoch, was auch an der Nicht-Eingrenzung einer bestimmten Zellpopulation liegen kann. Ziel dieser Studie war es nicht, hämatopoetische Stammzellen zu identifizieren, sondern eine möglicherweise neurogene Stammzellpopulation ausfindig zu machen. Eine Einschränkung der Messergebnisse auf einen bestimmten Zelltyp hämatopoetischen Ursprungs befanden die Initiatoren dieser Studie daher als nicht sinnvoll. Vielmehr weist die Tatsache, dass in Ficoll keine nennenswerte CD133(+)/CD34(-)-Population messbar war, darauf hin, dass es sich bei der Zunahme im peripheren Gesamtblut nicht um Blutstammzellen handelt.

Unter Vorwegnahme der Ergebnisse der Fortsetzungsstudie weisen wir darauf hin, dass auch an Patienten mittels CoulterCounter eine Zunahme an CD133(+)/CD34(-) Zellen nach Akupunktur festgestellt wurde (Manuskript in Vorbereitung).

#### **4.2.1.1 Neurogenes Potential von CD133(+)**

CD133 befindet sich auf fötalen neurogener Stammzellen (Barraud 2007) als auch auf den Ependymzellen des erwachsenen Gehirns (Pfenninger 2007). Es sind einige Arbeiten zu CD133(+)/CD34(+) Zellen bekannt, entsprechend derer diese Population als Supporter neuronaler Regeneration fungiert. So erwiesen sich aus dem peripheren Blut anhand von CD133-Antikörpern isolierte Zellen am Spinaltrauma-Modell der Maus als fähig, Angiogenese, Astrogliose, axonales Wachstum und funktionelle Wiederherstellung zu begünstigen. CD133(-) Zellen hingegen fördern weder axonales Wachstum noch funktionelle Wiederherstellung, verbessern aber geringfügig Angiogenese und Astrogliose (Kamei 2013). Das neurogene Potential von CD133 ließ sich zudem per Infiltration von CD133(+) Zellen in die verletzten Nn. Ischiadici von Ratten bestätigen. Innerhalb von 8 Wochen regenerierten die Nn. Ischiadici strukturell sowie funktionell und die transplantierten CD133(+) Zellen differenzierten zu Schwannzellen (Kijima 2009).

Forschungsarbeiten zu hautzellabkömmlichen CD133(+)-Antikörper-markierten Zellpopulationen zeigten ferner, dass diese unter speziellen Bedingungen betreffs

Nährmedium und Zugabe fördernder Wachstumsfaktoren proliferierten, Sphären schafften und in vitro zu Neuronen, Astrozyten und selten zu Oligodendrozyten differenzierten (Belicchi 2004).

#### **4.2.1.2 Interpretation der CD133(+)/CD34(-) Zellen**

Wie bereits in den Kapiteln 1.5.1 und 4.2.1.1 erwähnt tritt CD133 keineswegs ausschließlich als Zellmarker in hämatopoetischen Linien auf. Vielmehr findet sich CD133 als Stammzellmarker im embryonalen Gehirn, auf Ependymzellen und ihren Progenitoren, Oligodendrozyten und Astrogliazellen sowie einer Subpopulation von B-Zellen (Corbeil 2009, Pfenninger 2009, Olausson 2014). Die ausbleibende Korrelation des CD133(+)-Anstiegs mit CD34(+)-Zellen könnte vielmehr den Ausschluss von CD133-positiven hämatopoetischen und endothelialen Progenitorzellen erlauben und bestärkt die Vermutung einer durch Akupunktur geförderten Neurogenese.

Unter Annahme korrekt gemessenen CD133(+)/CD34(-)-Anstiegs lassen sich weitere Schlussfolgerungen bezüglich der Genese dieser Zellen auf der Basis bisheriger Forschungsinvestitionen ziehen. So gehen Meletis und Kollegen z.B. von einer Stammzellfunktion der Ependymzellen im erwachsenen Rückenmark aus (Meletis 2008). Hypothetisch gesprochen würde sich dies u.a. mit CD133 als besagtem Ependymzellmarker (Pfenninger 2009) decken und ließe die Differenzierung der detektierten CD133-Zellen in die neurogene Linie offen, was wiederum mit der positiven Empirik im Bereich der SCI-Akupunktur konsistent wäre (Vgl. Kapitel 1.2.1). Ob in vorliegender Arbeit gemessene CD133(+)/CD34(-) Zellen nun primitive hämatogene Zellen oder etwa durch Akupunktur mobilisierte Mesenchym- oder Ependymzellen aus dem Knochenmark sind und ob sie sich schließlich in neurogene Zellen entwickeln können bleibt ohne Weiterführung ähnlicher Akupunkturversuche unklar.

Einen systematischen Fehler im laboranalytischen Vorgehen schließen wir aus.

#### **4.2.2 Senkung der BDNF-Werte**

In vorliegender Studie sanken die BDNF-Werte bei einer Mehrzahl der akupunktierten Probanden nach Untersuchung der Serumproben im Sandwich-ELISA kontinuierlich ab. Entsprechend der Berechnung mit SPSS 15 sowie unter Abgleich im Wilcoxon-Test zeigt das Ergebnis Signifikanz ( $P=0,014$ ).

Während des BDNF-Abfalls traten keine Veränderungen des verwandten Neurotrophins NGF auf, was unsere Hypothese nicht zusätzlich stärkt. Auch IL-6 verhielt sich permanent negativ, was ein potenzielles Entzündungsgeschehen oder Stress nach Nadelung als Ursache der BDNF Veränderungen ausschließt.

#### **4.2.2.1 BDNF-Aktivität bei ZNS-Verletzungen**

Die Rolle von BDNF beim Überleben der Gehirn- und Nervenzellen sowie seine Beschaffenheit wurden in Kapitel 1.5.3 dargelegt. Neben seinen physiologischen Eigenschaften spielt BDNF auch unter pathologischen Bedingungen wie z.B. Spinaltraumata eine entscheidende Rolle.

Bei gesunden, nicht gelähmten Tieren wurde eine BDNF-induzierte Neurogenese in vivo beobachtet (Pencea 2001). Endogen auftretendes BDNF, ebenso wie seine exogene Zufuhr, wirkt entgegen der Bildung neuer Granulomzellen im Gyrus dentatus, die nach globaler Ischämie im Rattenhirn stattfindet (Larsson 2002). Des Weiteren wurde dargelegt, dass die mit Lernen, Gedächtnis und mit sensomotorischer Genesung assoziierte synaptische und axonale Plastizität durch BDNF entscheidend gefördert wird (Schäbitz 2004). Diese Entdeckungen bestätigen die Rolle von BDNF als Modulator der Neurogenese im Gehirn und zur Verbesserung des funktionellen und neurologischen Langzeitergebnisses nach zerebraler Ischämie.

#### **4.2.2.2 BDNF und Stammzellen**

Naheliegender ist die Frage des Einflusses von BDNF auf Stammzellen. Hier forschten Kerr et al an embryonalen SZ und deren Einsatzmöglichkeit in Hinsicht auf Motoneuronen-Verletzungen bei Ratten. Einhergehende in vitro Untersuchungen bestätigten die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie BDNF durch embryonale SZ. Des Weiteren förderten embryonale SZ in Lösung das Überleben von Motoneuronen, während das axonale Auswachsen durch BDNF-neutralisierende Antikörper inhibiert wurde (Kerr 2003).

Ein zum Transplantat neuronaler Progenitorzellen zugegebener lentiviraler, BDNF exprimierender Vektor induzierte das axonale Wachstum der Transplantat-abstammigen Neuronen in deutlich stärkerem Ausmaß als die Zugabe von reinem BDNF. Tiere mit BDNF Lentivirus zeigten signifikant mehr und signifikant längere Axone als eine

Kontrollgruppe, bei welcher GRP (glial restricted progenitors) Lentivirus hinzugezogen worden war (Bonner 2010). Ähnlich positive Ergebnisse erzielten Sasaki et al bei ihren Untersuchungen anhand humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSZ), welche in SCI-Ratten implantiert wurden. Hier kam es zu deutlich verbesserter lokomotorischer Rehabilitation unter der Verwendung genetisch modifizierter, BDNF-hypersekretierender hMSZ. Dies ging mit strukturellen Veränderungen im Sinn vermehrten Auswachsens des verletzten kortikospinalen Traktes und serotonerger Projektionen einher und stand im Gegensatz zu Tieren mit normalen hMSZ (Sasaki 2009).

Schlussfolglich ist die fördernde Auswirkung von BDNF auf die neurogene Entwicklung verschiedener SZ anzunehmen.

#### **4.2.2.3 BDNF-Veränderungen nach Akupunktur**

In näherer Vergangenheit wurden bereits Daten zum Einfluss der Akupunktur auf die Sekretion nervaler Wachstumsfaktoren erhoben. Diesen Untersuchungen zufolge wird BDNF nach peripherer Stimulation über Hautareale im Rahmen von Elektroakupunktur bei schubweiser Einwirkung von 100Hz, jedoch nicht bei konstanter, ausschließlich nieder- oder ausschließlich hochfrequenter Anwendung (1 Hz/100Hz) ausgeschüttet. Dies wurde anhand von Primärkulturen hippokampaler Neuronen verifiziert, bei welchen Schübe hochfrequenter Stimuli die augenblickliche Sekretion von BDNF zusammen mit der Induktion einer Langzeitpotenzierung evozierten (Gärtner 2002).

Die Möglichkeit peripherer Stimulation im Sinne der Akupunktur zur Beschleunigung der Freisetzung nervaler Wachstumsfaktoren hat laut Ji-Sheng Han ohne Zweifel klinische Bedeutung (Han 2002).

#### **4.2.2.4 Interpretation der akupunkturbedingt veränderten BDNF Werte**

Die peripher gemessene BDNF-Reduktion stellt die Frage nach einem zentralen neurotrophen Geschehen in den Raum. Aufgrund bisheriger Untersuchungen zu BDNF bei ZNS-Erkrankungen hätten wir einen zentralen Anstieg der BDNF-Werte erwartet. In unserer Studie fiel ein signifikanter Abfall der BDNF-Serumkonzentrationen auf. Es wäre zu untersuchen, ob dieser periphere Abfall einem zentralen Anstieg entspricht. Zu verifizieren wäre dies jedoch nur anhand von Liquorpunktionen, die den Rahmen der geplanten Untersuchungen innerhalb dieser Pilotstudie gesprengt.

Eine andere Erklärung für das Sinken der BDNF-Werte im Verlauf wäre die potenziell im Rahmen einer Mobilisierung von CD133(+) Zellen stattgehabte Bindung an die solchen. Kritisch betrachtet ist bei ausbleibenden Veränderungen sonstiger Mobilisationsfaktoren (NGF, SDF-1, G-CSF) eine tatsächlich stattgehabte SZ-Mobilisierung nicht gesichert.

Unter den beiden Kontrollprobanden ergab sich bis zur ersten Stunde nach Bauchlage zwar ein geringer BDNF-Abfall, bis Stunde 48 jedoch waren die BDNF-Werte höher als zum Ausgangszeitpunkt. Auch wenn die Ergebnisse der Kontrollprobanden aufgrund der geringen Fallzahl nicht statistisch ausgewertet werden können, ist zumindest festzuhalten, dass bezüglich BDNF keine gleichartig abfallende Tendenz wie bei den akupunktierten Probanden beobachtet wurde.

### **4.2.3 Senkung der MMP-9-Werte**

In unserer Studie sanken die MMP-9-Konzentrationen zwar marginal, aber dennoch signifikant 24 und 48 Stunden nach Spinaltrauma-assoziiertes Akupunktur. Folglich sehen wir neben der Mobilisierung potenziell neurogener Stammzellen einen womöglich zweiten Wirkmechanismus der Akupunktur, nämlich die Reduktion von Matrixmetalloproteinasen, die die klinisch verbesserte Rekonvaleszenz akupunktierter gegenüber nicht-akupunktierter Querschnittspatienten erklären könnte.

#### **4.2.3.1 MMP-9 Aktivität bei ZNS-Verletzungen**

ZNS-Verletzungen ziehen zwei Pathomechanismen nach sich, den oxidativen Stress und die lokale Entzündung. Entzündung ist generell – zusammen mit den folglich ausgeschütteten Proteinasen – der wahrscheinliche Mediator früher Sekundärantwort in der Pathogenese nach Spinaltrauma. So wird von Noble und Kollegen vermutet, die Unterdrückung der MMP-9-Antwort könnte eine effektive Therapiemethode bei Patienten mit Spinalläsion sein (Noble 2002).

Oxidativer Stress gilt als pathologische Stoffwechsellage in diversen Krankheitsgeschehen. Ein Überhandnehmen freier Sauerstoffradikale wird schließlich nicht mehr durch oxidierende bzw. reduzierende Stoffe neutralisiert und überfordert die normale Reparatur- und Entgiftungsfunktion der Zellen.

Oxidativer Stress besteht u.a. bei Ischämie sowie bei Spinaltrauma. Hierbei wird eine

MMP-2 und MMP-9 Hochregulation beobachtet (Gasche 2001, Pustovrh 2005). MMP-9 war in den Meningen und Neuronen geschädigten Markes nachweisbar und nahm nach mäßiger Rückenmarkskontusion rasch zu. 24 Stunden nach dem traumatischen Ereignis war es in Gliazellen, Makrophagen, Neutrophilen und vaskulären Elementen des verletzten Markes zu finden. MMP-9 spielt bewiesenermaßen eine Schlüsselrolle bei einer abnormalen vaskulären Permeabilität und bei Entzündungen in den ersten drei Tagen nach Spinaltrauma. Die Blockierung von MMP-9 während dieser kritischen Phase dämpft das vaskuläre Geschehen und führt zu einer verbesserten motorischen Wiederherstellung (Noble 2002, Gasche 2001). Einen Zusammenhang zwischen Zerstörung der Blut-Hirnschranke (BHS) und der Hochregulation von MMP-9 bestätigten Cucullo et al. an einem in vitro BHS Modell einer menschlichen Gefäßendothelzelllinie (Cucullo 2008). Aus Inhibitions-Experimenten lässt sich schließen, dass bei intrathekaler Injektion von SB-3CT (ein selektiver MMP-2/MMP-9 Inhibitor) die MMP-9 Aktivität abnimmt und die neuronale Apoptose sowie die Infarktausweitung bei zerebraler Ischämie gemindert werden (Gu 2005).

Eine weitere in vitro Arbeit zeigte, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) MMPs (-1, -2 und -9) aktivierten und Gewebelinhibitoren von MMP in einem BHS-Modell unterdrückten (Haorah 2007). Auch die Überexpression der Kupfer/Zink-Superoxiddismutase (SOD1) in transgenen (tg) Nagern wurde als Induktor und Aktivator von MMPs dargestellt. Nach kälteinduziertem Gehirnschaden und fokaler zerebraler Ischämie gilt sie als entscheidendes Antioxidations-Enzym bei der Ausscheidung von Superoxid (Kamada 2007). Den neuroprotektiven Effekt der SOD1 nach Spinaltraumata demonstrierten Sugawara et al. (Sugawara 2002). Im Rattenmodell wurde ein signifikanter MMP-9 Anstieg nach Rückenmarksdurchtrennung beobachtet (Yu F 2008).

Eine Senkung von MMP-9 wie in vorliegender Studie könnte eine akupunkturinduzierte Gegenregulation des Körpers signalisieren. In Anbetracht der Werte der Kontrollprobanden, bei denen ebenfalls MMP-9 Reduktionen beobachtet wurden, ist eine Abhängigkeit von nicht-Akupunktur-assoziierten Umgebungseinflüssen (Bauchlage, Blutentnahmen) nicht auszuschließen.

### 4.3 Normabweichung der gemessenen CD34(+)-Werte

Die Baseline der CD34(+) Zellen nach Aufbereitung des Probandenblutes anhand BD-FACS-Lysing Solution ergab sich mit einem Durchschnitt von  $7,9 \pm 6$  CD34(+)-Zellen/ $\mu$ l als erhöht im Vergleich zu Standardangaben von 2-4 Zellen/ $\mu$ l zu Messungen aus peripherem Blut (Dauber 2010).

Sowohl eine, als auch 24 Stunden nach Akupunktur zeigte sich eine deutliche, wenngleich statistisch nicht signifikante Erhöhung der CD34(+)-Werte auf über Zehnfaches. Zugrunde liegen stark erhöhte Werte nach Vollblutlyse insbesondere einer Probandin (Proband 0), bzw. betreffs der Baseline zweier Probanden (Proband 0 und Proband 4). Zur Baseline betrug der höchste CD34(+) Wert unter den beiden genannten Probanden 83 CD34(+)-Zellen/ $\mu$ l, eine Stunde nach Akupunktur stieg er bei Proband 0 auf 1314 CD34(+)-Zellen/ $\mu$ l und 24 Stunden nach Akupunktur bei selber Probandin auf 1232 CD34(+)-Zellen/ $\mu$ l. Zum vierten Zeitpunkt, sprich 48 Stunden nach Akupunktur, betrug der CD34(+) Wert bei den sonst so ausreißenden Werten besagter Probandin (Proband 0) nur mehr 0,87 Zellen/ $\mu$ l. Der Durchschnitt ist zum vierten Zeitpunkt mit 1,32 CD34(+)-Zellen/ $\mu$ l entsprechend zitierten Standardangaben normwertig. Während die CD133(+) Werte von Proband 0 parallel zu entsprechenden CD34(+) Werten zu Zeitpunkt zwei und drei ebenfalls überdurchschnittlich hoch waren, zeigten sich die übrigen zellulären Surface-Marker bei Proband 0 - CD4(+), CD14(+), CD 19(+), CD45(+) - ohne auffallende Unterschiede im Vergleich mit dem Gruppenquerschnitt bzw. mit den sonstigen Einzelwerten der Teilnehmerin. Die Messungen der Proben aller Probanden wurden zum gleichen Zeitpunkt und unter stets unveränderten Voraussetzungen vorgenommen. Keine der Blutproben wurde länger konserviert als die der übrigen Teilnehmer (maximal 3 Stunden).

Nachdem sich die Exaltation der CD(34)-Durchschnittswerte aus den Messungen an genanntem Proband 0 ergeben wurden individuelle Besonderheiten erneut geprüft. Vorwegzunehmen seien ethnische Unterschiede bei CD34(+) Zellen wie sie in Untersuchungen von Ballen und Kollegen ausschließlich für Menschen afrikanischer Abstammung gemessen wurden (Ballen 2004); Proband 0 hingegen trägt genetisch asiatischen Einfluss, bezüglich dessen keine CD34(+)-Unterschiede im Vergleich mit anderen ethnischen Gruppen bekannt sind. Zudem sind bei Patienten mit unterschiedlichen Leukämien ebenfalls hohe CD34(+) Werte von bis zu knapp 70 Zellen/ $\mu$ l festgestellt (Tamul 1995) - was mit Proband 0, bei welchem weder zum

Zeitpunkt der Messung noch in Folge eine Leukämie bekannt wurde, mit über zehnfach erhöhten Werten nicht in Verhältnis gesetzt werden kann.

Eine mögliche Störquelle im Bereich der mit BD FACS Lysing Solution bearbeiteten Blutproben stellt theoretisch das in der Lysereagens enthaltene Fixativum dar. Fixativa können die Fluoreszenzintensität verändern und auch die Zellgröße beeinflussen. Die Anfälligkeit der Zellen in Lysereagens besteht jedoch eher, wenn die Messung nach Lyse zeitlich verzögert und nicht entsprechend des Protokolls erfolgt (Sutherland 1996, Whitby 2012) – welches in vorliegenden Untersuchungen mit Gewissheit beachtet wurde. Neben rein praktischen Vorteilen des Lyseverfahrens im Vergleich mit herkömmlichen Verfahren im Sinn der kürzeren Verarbeitungsdauer gelten als ergebnisorientierte Vorteile ein geringerer Verlust an Lymphozytensubpopulationen sowie bessere Vergleichpräzision (Jackson 1990, Tamul 1995).

Die Messungen nach Ficoll-Aufbereitung des Blutes ergaben sich mit einer Baseline von  $27 \pm 7,8$  und  $51,7 \pm 18,9$  CD34(+)-Zellen/ $\mu$ l (höchster Wert nach Akupunktur) als hoch, was die Vermutung einer Fehlerquelle nahelegt. Häufige Fehler laut den Richtlinien der International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) sind das Verwenden suboptimaler Antikörper und falsches Gating (Sutherland 1990, Whitby 2012). Erstaunlicher Weise beschreiben Tamul et al unter Ficollaufbereitung eher zu niedrig oder negativ gemessene CD34(+)-Ereignisse im Vergleich zur Messung derselben Proben nach Vollblutlyse (Tamul 1995). Somit könnte für die beiden CD34(+) Werten im dreistelligen Bereich letztendlich ein Kommafehler angenommen werden. Unter Annahme isolierter Kommafehler im Bereich der CD34(+) Messung nach Vollblutlyse bleiben die Ergebnisse der CD133(+)-Messungen unbeeinflusst.

#### **4.4 Ergebnisdifferenzen zwischen Ficoll- und BD-Optilyse-Messungen**

In unseren Untersuchungen gab es eine deutliche Differenz der Messergebnisse nach unterschiedlicher Zellaufbereitung. Wie in vorangehenden Kapiteln dargelegt handelt es sich bei der Aufarbeitung der Zellsuspension über Ficoll um ein mehrschrittiges, teils manuelles Verfahren, in dem der Buffy Coat isoliert wird. Der Buffy-Coat als Grenzschicht zwischen roten Blutkörperchen und Plasma enthält neben den naturgemäß wenigen peripheren Stammzellen vor allem Leukozyten und Thrombozyten. Er macht etwa ein Prozent der Blutprobe aus.

Wie bereits in Kapitel 4.3 diskutiert ist die direkte Zellmarkierung mit anschließender



Lyse der nicht-markierten Zellen eine leicht standardisierbare, weniger zeit- und materialaufwendige Methode als die Zelltrennung über Ficoll. Bei der Zellaufarbeitung über Ficoll könnte die bei der direkten Markierung gemessene CD133(+)/34(-) Zellpopulation jedoch eventuell aufgrund einer hohen Sedimentationskonstante der Zellen in Ficoll verloren gegangen sein, was Berichten negativer Messungen diverser Zellkolonien nach Ficoll-Aufarbeitung im Vergleich zur Vollblutlysemethode entspricht (Tamul 1995).

#### **4.5 Interindividuelle Differenzen der Messergebnisse von CD133(+)-, BDNF- und MMP-9**

Die in den Kapiteln 3.2, 3.4 und insbesondere 3.5 (Korrelation der CD133(+)/34(-)-, BDNF- und MMP-9-Werte) dargelegten Resultate zeigen deutliche Signifikanzen, aber kein rein homogenes Muster.

Interindividuelle Unterschiede können verschiedene Ursachen haben. Zunächst wurden die Ergebnisse mit den Einflussparametern auf einzelne Probanden (Kapitel 2.2) verglichen. Einer dieser untersuchten Faktoren waren von Probanden eingenommene Medikamente. Weder bezüglich Östrogen-Gestagen-Präparaten noch Betablockern (je zwei Probanden) wurden besondere Unterschiede zu Mittelwerten beobachtet.

Bei einem Mittel von 33 Jahren befanden sich zehn der 14 Probanden und Probandinnen unter oder gleich diesem Durchschnittsalter. Die beiden mit Abstand ältesten Probanden (45 und 50 Jahre) mobilisierten CD133(+)/34(-) Zellen ohne signifikante Unterschiede zu jüngeren Teilnehmern. Die BDNF-Werte zeigten bei der 50jährigen Probandin insgesamt einen relativ geringen Abfall von 5,5 auf 4,4 ng/ml, und einen nur leichten Anstieg bei dem 45jährigen Probanden von 9,0 auf 10,2 ng/ml. An dieser Stelle sei auf eine Untersuchung von Prof. Ziegenhorn und Prof. Hellweg verwiesen, welche Altersabhängigkeit u.a. von BDNF- Werten im größeren Querschnitt belegt (Ziegenhorn 2007). Letztere Untersuchungen betrafen Probanden und Patienten zwischen 70 und 103 Jahren, jedoch wiesen bereits vorangehende Untersuchungen auf mit dem Alter stetig sinkende BDNF-Werte hin (Lommatzsch 2005).

Des Weiteren wurden die Ergebnisse unter geschlechtsspezifischen Aspekten betrachtet. Männliche Studienteilnehmer wiesen zu Stunde 48 im Durchschnitt 27,5% CD133(+)/34(-)-Zellen mehr als zum Ausgangszeitpunkt auf, während die Zunahme unter den Teilnehmerinnen auf insgesamt 8,01% beruhte. Hingegen waren bei den

Frauen zur 48sten Stunde insgesamt stärkere BDNF- und MMP-9 Abfälle im Vergleich zu Ausgangswerten als bei Männern (BDNF-Abfall bis zu Stunde 48 ♀: 4,9ng/ml; ♂: 1,7ng/ml. MMP-9-Abfall bis zu Stunde 48 ♀: 4ng/ml; ♂:2,7ng/ml). Drei einzelne Probandinnen wiesen initiale BDNF-Werte von über 15ng/ml auf (fünf Frauen mit initialen BDNF-Werten über 10ng/ml). Bis auf zwei männliche Teilnehmer mit initialen BDNF-Werten von 10,4 und 10,6ng/ml lagen die anderen sechs Männer bei Werten unter 10ng/ml. Die Studienlage zu ungleicher Geschlechterverteilung hinsichtlich BDNF ist laut Ziegenhorn und Kollegen kontrovers und in keiner Richtung signifikant. Ob etwa geschlechtsspezifisch unterschiedliche Reizschwellen für BDNF- oder MMP-9 existieren wäre eine vage Hypothese. Interindividuell wurden von Ziegenhorn zumindest für NGF große Varianzbreiten gezeigt, während die Werte innerhalb eines Individuums jeweils relative Stabilität aufwiesen. Dies lässt bei vermuteten 10% der besetzten NGF-Rezeptoren eine hohe Rezeptorsensitivität annehmen (Ziegenhorn 2007).

Proband 12 war der einzige, bei dem über zwei der vier Zeiträume sinkende CD133(+)/34(-)-Zellen festgestellt wurden. Die Ursache dafür kann letztendlich nicht geklärt werden. MMP-9 und BDNF verhielten sich bei diesem Patienten auffälliger Weise annähernd parallel zu CD133(+)/34(-).

Nicht ganz geklärt sind die vergleichsweise hohen CD133-Ausgangswerte der beiden nicht akupunktierten Kontrollpersonen. Bei dem männlichen Kontrollprobanden wurde ein Jahr nach der Blutentnahme ein Hodenkarzinom diagnostiziert. Man weiß inzwischen, dass eine Reihe von Krebsstammzellen das CD133 Antigen tragen (Cheng JX 2009). Eventuell wurden zum Zeitpunkt der Studie bereits zirkulierende Krebsstammzellen nachgewiesen, die sich später manifestierten. Eine lagerungs- oder blutabnahmebedingte Mobilisation wurde in keiner der Kontrollpersonen festgestellt. Die Aussagekraft bei n=2 Kontrollpersonen ist wie bereits erwähnt als sehr gering einzustufen.

#### **4.6 Potenzierung eines natürlichen Prozesses? - Sammzellmobilisierung nach Trauma**

Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine Besserung der klinischen Symptomatik bei Patienten nach diversen Traumata mit vermehrter Ausschüttung von Stammzellen einhergeht. Die mobilisierten SZ wandern nachweislich zum Verletzungsort hin, was eine adaptative und notwendige Systemantwort zur

erfolgreichen Wundheilung und Gewebsreparatur zu sein scheint (Shah 2009). Am Beispiel der Gefäßregeneration ist belegt, dass die dort stattfindende Heilung teilweise durch zirkulierende endotheliale Progenitorzellen vermittelt wird (Asahara 1999, Takahashi 1999). Im Steady-State zählen Progenitorzellen  $<0,01\%$  aller zirkulierenden monoklonalen Zellen. Unter ischämischen Zuständen werden Populationen knochenmarksabkömmlicher endothelialer Progenitorzellen mobilisiert und sammeln sich in den ischämischen Zonen, wo sie den Neovaskularisationsprozess beschleunigen (Kalka 2000).

Ebenso wie Ischämie bewirken auch Entzündungen und Gefäßverletzungen eine vermehrte Stammzellzirkulation (Asahara 1999, Gill 2001). Der Mobilisationsprozess scheint aus proteolytischer Matrixdegeneration, vermehrter Migration durch Chemokine und Cytokine, sowie der Induktion von Adhäsionsmolekülen zu resultieren (Lapidot 2002). Auch bezüglich der Spinalläsion finden Untersuchungen zur traumabedingten Mobilisierung von Progenitorzellen statt. Im Jahr 2005 identifizierten Azari und Kollegen die Mobilisierung endogener neuronaler Progenitorzellen (NPZ) im Rückenmark nach Axotomie in Kombination mit der Verletzung motorischer Neuronen bei Mäusen. Die NPZ-Differenzierung in Astrozyten konnte nachgewiesen werden. Eine signifikante Differenzierung in verschiedene Neuralzelltypen wurde innerhalb der ersten beiden Wochen nach Querschnitt jedoch nicht verzeichnet (Azari 2005).

Bemerkenswert ist insbesondere auch eine Publikation von Ritz et al, welche CD34(+) Mobilisation bei 35 Polytraumapatienten untersucht. Acht der untersuchten Patienten erlitten eine traumatische Hirn- oder Spinalverletzung, was eine Minderheit unter den Untersuchten ausmacht. Während hier am 1., 3. und 7. Tag nach Trauma ein signifikanter Anstieg von CD34(+)-Zellen zu verzeichnen war, maßen CD133(+)-Zellen in dieser Zeitspanne zwar keine signifikante, aber dennoch eine geringe Erhöhung von  $0,14\pm 0,03\%$  an Tag 1, auf  $0,23\pm 0,13\%$  an Tag 7 bei erhöhten CD133(+)-Werten gegenüber der Kontrollgruppe ( $0,08\pm 0,04\%$ ) am Tag 1. Eine Auffächerung der Werte entsprechend der spezifischen Form der Polytraumata wurde nicht veröffentlicht (Ritz 2014). Eine entsprechende Studie zu proangiogener zellulärer systemischer Antwort an SCI-Patienten ergab in Messungen zu selbigen Zeitpunkten wie bei Ritz's Untersuchungen u.a. signifikant erhöhte endotheliale Progenitorzellen mit sowohl CD34, als auch CD133 Positivität (Paczkowska 2014). Da bei akutem Trauma jeder Art von einer systemischer Antwort auszugehen ist, sollte kritisch hinterfragt werden, ob die CD34(+) Antwort neuronenspezifisch oder eher in Bezug auf generelle

Gefäßerneuerung mit der CD133(+) Antwort korreliert.

Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, gibt es Experimente an Versuchstieren, welche den Nutzen der Akupunktur bei ZNS-Verletzungen bestätigen. So induzierte Elektroakupunktur an Ratten die Migration von neurogenen Stammzellen (Chen 2008) wie auch die Proliferation von Gehirnzellen (Cheng 2008) und führte zu axonaler Regeneration (Ding 2009). Außerdem wurde durch EA die stressinduzierte Abnahme von hippokampalen Progenitorzellen geschwächt (Liu 2007). Nicht zuletzt vor dem Hintergrund der beschriebenen Rolle von MMP-9 und BDNF bei ZNS-Verletzungen lassen die Ergebnisse vorliegender Arbeit eine durch Akupunktur angestoßene Selbstregulation in Richtung Rückenmarksregeneration vermuten. Dies würde eine Unterstützung des natürlichen Heilvorganges des Körpers bedeuten.

Da es die mobilisierten Zellen negativ für CD34 waren, ist ein hämatogener Charakter der aufgezeigten CD133(+) Zellen unwahrscheinlich. Um bei unseren Untersuchungen eine traumabedingte Mobilisation von Stammzellen auszuschließen, haben wir bewusst in dieser ersten Studienphase auf die Behandlung und Untersuchung von Patienten nach Spinalläsion verzichtet und stattdessen gesunde Probanden eingeschlossen.

#### **4.7 Stammzellkultur**

Wie in Kapitel 3.3. beschrieben waren Zellkulturen aus dem per Ficoll extrahierten Buffy-Coat angesetzt und über 5 Tage inkubiert worden. Wir verwendeten ein Kulturmedium, das für die Expansion neurogener Zellen aus traumatisierter Hirnmasse eingesetzt wird (Zhu 2006).

Zu erkennen waren schließlich große Zellen, welche entsprechend ihrer Größe mit Stammzellen verglichen werden können, jedoch keine axonalen Auswachsungen entsprechend ausgewachsenen neurogenen Stammzellen zeigten.

Dem in vorliegender Untersuchung ausbleibenden axonalen Aussprossen der kultivierten Zellen sei vorweggenommen, dass die hier verwendete, über Ficoll extrahierte Zellsuspension in den FACS-Messungen keine CD-133-Positivität ergab, was das Nichtvorhandensein neuronaler Stammzellen bestätigt. Neuronale Differenzierungsprotokolle zirkulierender neurogener Stammzellen aus dem peripherem Blut gibt es bisher nicht, so dass alternative, empirische Kulturmodelle unter Anwendung von z.B. FGF, EGF, IL-6 mit und ohne NGF oder BDNF in der Fortsetzung unserer Studie in Erprobung sind.

## **5. Schlussfolgerung**

Die Akupunktur erfreut sich über die letzten Jahrzehnte hinweg zunehmender Beliebtheit – und ebenso Kritik.

In vorliegender Arbeit zeigte sich bei der Untersuchung verschiedener Messparameter zum einen die signifikante Erhöhung von CD 133(+)<sup>34</sup>(-)-Zellen im zeitlichen Rahmen von zwei Tagen nach Akupunktur von Punkten zur Behandlung einer Spinalläsion, sowie zum anderen signifikante Änderungen im Bereich der mit einer Stammzellmobilisation zusammenhängenden Faktoren (MMP-9 und BDNF). Eine Akupunktur-induzierte Veränderung anderer Mobilisierungsfaktoren hämatopoetischer Stammzellen, z.B: SDF-1, G-CSF oder IL-6 ließ sich nicht nachweisen.

Unsere Ergebnisse scheinen im Zusammenhang betrachtet einen Hinweis auf ein akupunkturbedingtes zelluläres Geschehen zu liefern. Für eine definitive Schlussfolgerung sollten die Resultate unserer Untersuchungen an spinallädierten Patienten verifiziert werden.

## 6. Danksagung

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Vorbereitungen und Untersuchungen wurden im Zeitraum April 2007 bis Mai 2008 im Institut für Transfusionsmedizin an der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt und von Frau PD Dr. med. A. Moldenhauer betreut.

Prof. Dr. Abdulgabar Salama aus dem Institut für Transfusionsmedizin fungierte als mein Doktorvater. Ihm als Gastgeber gilt ein gesondertes Wort des Dankes für die großzügige Bereitstellung diverser Laborräume im Forschungshaus des Virchow Klinikums in Berlin.

Frau PD Dr. Anja Moldenhauer entwarf und koordinierte das Studiendesign vorliegender Arbeit und leitete bzw. überwachte den Gesamtprozess, insbesondere die Auswertungen. Als langjährige leitende Mitarbeiterin am Institut für Transfusionsmedizin ermöglichte sie die Arbeit und unterstützte sie im praktischen sowie theoretischen Teil in aller Hinsicht. Ich danke ihr von Herzen für ihren jederzeit motivierenden, hilfsbereiten, zuverlässigen und kritischen Beistand sowie ihre vielen unentbehrlichen Hinweise und Ratschläge auf der Basis ihres fundierten Fachwissens. Wie oft sie meine Arbeit las um erneut Korrekturvorschläge einzubringen habe ich nicht gezählt, ich bewundere nicht zuletzt ihre Geduld. Auch verdanke ich ihr einen ausgesprochen persönlichen Bezug zu den Untersuchungen, indem sie sowohl sich selbst als Probandin einbrachte als auch mir diese Möglichkeit gab. Noch vielmehr bedanke ich mich insbesondere für ihren unverzichtbaren, konstruktiven Beistand selbst während ihrer Schwangerschaft und sogar nach Verlassen der Charité. Auch verdanke ich ihr zahlreiche Gelegenheiten zum Präsentieren und damit Hinterfragen meiner Arbeit, deren Einreichung sie schließlich ermöglichte. Eine bessere Betreuung der Arbeit hätte ich mir nicht vorstellen können.

Frau Dr. Sonja Moldenhauer hatte die ausschlaggebende Idee zur Erforschung zellulärer Hintergründe im speziellen Kontext und führte die Akupunkturbehandlungen durch. Ich danke Frau Dr. Sonja Moldenhauer sehr für das Teilen ihres Fachwissens sowie für ihr äußerst freundliches, praktisches Mitwirken an der Arbeit. Besonders auch für das wiederholte Lesen und kritische Betrachten meiner Arbeit bedanke ich mich ebenfalls sehr herzlich, denn ihre Hinweise haben zu deutlicher Verbesserung beigetragen und einige Missverständnisse meinerseits bezüglich der Akupunktur im besagten Spezialbereich effektiv verhindert.

BDNF- und NGF- ELISAS wurden von Sarah Eckard als Doktorandin von Herrn Prof. Dr. Rainer Hellweg nach der von ihm entwickelten Messmethode im Forschungslabor der Abteilung für Psychiatrie der Charité Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin bzw. Campus Mitte ausgeführt. Für die erfolgreiche Zusammenarbeit und das Engagement bezüglich der BDNF- und NGF- Untersuchungen sowie für seine Korrekturhilfe möchte ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Rainer Hellweg und auch sehr bei Sarah Eckard bedanken.

Für die Bereitstellung von Räumen, Geräten und Material danke ich Herrn Prof. Dr. Kieseewetter als Gastgeber bezüglich der Räume zur praktischen Durchführung der Akupunktur.

Herr PD Dr. Andreas Lun führte die IL-6 Messungen durch und stellte das Sysmex XE-2100 Gerät zum Erstellen der Blutbilder zur Verfügung. Auch Herrn Lun gilt somit besonderer Dank für sein Interesse und seine Bereitschaft.

Herr Dr. Ekkehart Dietz aus dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin begleitete vorliegendes Projekt zuerst beratend bei der Studienplanung und schließlich mit seiner statistischen Auswertung aller Messergebnisse. Ich danke ihm und auch seinem Kollegen Steffen Sander für ihr Interesse an der Akupunktur und ihre professionelle Hilfe nicht zuletzt auch im Erklären von Hintergründen und Nutzung der statistischen Systeme.

Die Biologin und medizinisch technische Assistentin Kerstin Schmidt leitete mich vor Ort bei der Ausführung der ELISAs an. Ihr wie auch der ehemaligen medizinisch technischen Assistentin Gesche Genter gilt besonderer Dank für ihre tatkräftige Unterstützung während der gesamten Einarbeitung, Messdurchführung und für das Vermitteln der Grundbegriffe von FACS- Analysen bzw. ELISAs sowie deren Durchführung. Marina Hohenböken danke ich sehr für ihre Mühe bei der Weiterführung dieser Arbeit im Sinn einer vergleichenden Studie zu Akupunktur bei Schlafstörung, ebenfalls unter Obhut von Frau PD Dr. Moldenhauer. Gürkan Bal danke ich für spontane Hilfsbereitschaft beim praktischen Umgang mit Laborgeräten.

Ebenso gilt mein Dank natürlich allen Probanden, die sich als Teilnehmer für diese Studie zur Verfügung gestellt haben.

Für ihre freundschaftliche Unterstützung betreffs Form und Ausdruck danke ich Ulla Ziemann und Beatrice Höller. Mark Riesland danke ich für seine freundschaftliche Bereitschaft zur Erklärung mathematischer Anwendungen und das Erstellen des Dotplots für die einzelnen CD133-Werte. Matthes Schröter danke ich für seine freundschaftliche

Einführung in ein Text- und Bildbearbeitungsprogramm, ohne seine Unterstützung hätten bestimmte Grafiken nicht die jetzige optische Qualität erreicht.

Selbstverständlich möchte ich hier auch meiner gesamten Familie für die liebevolle Unterstützung in diversen Lebenssituationen danken, ohne welche mein Studium nur schwer möglich gewesen wäre, meinen herzlichsten Dank sagen. Meinem Freundes- und Kollegenkreis danke ich für Interesse, Verständnis und Diskussionsbereitschaft. Großer Dank für Vertrauen und Lehre, nicht zuletzt für das Verleihen wichtiger Fachbücher gilt außerdem der Heilpraktikerin Manuela Heider de Jahnsen, die mein Interesse an der Akupunktur seit langem unterstützt hat. Nicht zuletzt möchte ich auch meinem TCM-Lehrer Prof. Johannes Greten für belebte Kurse und Diskussionsgelegenheiten danken.

Durch die gute Teamarbeit mit allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe unter Obhut von Frau PD Dr. Moldenhauer war es eine schöne und lehrreiche Zeit.



## 7. Literaturverzeichnis

**Acheson** A, Barker PA, Alderson RF, Miller FD, Murphy RA. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: Inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* 1991;7(2): 265-275.

**Alexander** JS, Elrod JW. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat* 2002;200(6):561-74.

**Alleva** E, Santucci D. Psychosocial vs. "physical" stress situations in rodents and humans: role of neurotrophins. *Physiol Behav* 2001;73(3):313-320.

**Aloe** L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L. The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* 1997;52(9):883-894.

**Andrews** RG, Singer JW, Bernstein ID. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 1986;67(3):842-5.

**Asahara** T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization, *Circ Res* 1999;85(3):221-228.

**Azari** MF, Profyris C, Zang DW, Petratos S, Cheema SS. Induction of endogenous neural precursors in mouse models of spinal cord injury and disease. (Abstract) *Eur J Neurol* 2005;12(8):638-48.

**Ballen** KK, Kutzberg J, Lane TA et al. Racial diversity with high nucleated cell counts and CD34 counts achieved in a national network of cord blood banks. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10(4):269-275.

**Ballin** M, Gomez DE, Sinha CC, Thorgeirsson UP. Ras oncogene mediated induction of a 92 kDa metalloproteinase; strong correlation with the malignant phenotype. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;154(3):832-8.

**Baptiste** DC, Fehlings MG. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma* 2006;23:38-334.

**Baptiste** DC, Fehlings MG. Update of the treatment of spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 2007;161:217-233.

**Baptiste** DC, Tighe A, Fehlings MG. Spinal cord injury and neuronal repair: focus on neuroregenerative approaches for spinal cord injury. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2009;18:663-673.

- Barnes PJ.** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 1998;94(6):557-572.
- Barraud P, Stott S, Mollgard K, Parmar M, Björklund A.** In vitro characterization of a human neural progenitor cell coexpressing SSEA4 and CD133. *J Neurosci Res* 2007;85(2):250-259.
- Belicchi M, Pisati F, Lopa R et al.** Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J Neurosci Res*. 2004;77(4):475-86.
- Birkedal-Hansen H.** Role of matrix metalloproteinase in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993;64(5 Suppl):474-84. Review.
- Bluel CC, Fuhlbrigge RC, Casanovas JM et al.** A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 1996;184(3):1101-1109.
- Bonner J, Blesch A, Neuhuber B, Fischer I.** Promoting Directional Axon Growth from Neural Progenitors Grafted into the Injured Spinal Cord. *J Neurosci Res* 2010;88(6):1182-1192.
- Bryan BA, Dennstedt E, Mitchell DC et al.** RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis. *The FASEB Journal* 2010;24(9):3186-3195.
- Bühning HJ, Simmons PJ, Pudney M et al.** The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999;94(7):2343-2356.
- Busch SA, Silver J.** The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2007;17(1):120-127.
- Buttini M, Westland CE, Masliah E et al.** Novel role of human CD4 molecule identified in neurodegeneration. 1998;4(4):441-6.
- Cai W.** Acupuncture and the nervous system. *Am J Chinese Med* 1992;20(3-4):331-337.
- Cawston TE, Galloway WA, Mercer E et al.** 1981. Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. *Biochem J*. 1992;195(1):159-65.
- Cartwright M, Mikheev AM, Heinrich G.** Expression of neurotrophin genes in human fibroblasts: differential regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Int J Dev Neurosci* 1994;12(8):685-693.
- Chan W-W, Chen K-Y, Liu H, Wu L-S, Lin J-H.** Acupuncture for General Veterinary

Practice. *Journal of Veterinary Medical Science* 2001;63:1057-1062.

**Chang YH**, Hsieh M-T, Cheng J-T. Increase of locomotor activity by acupuncture on Bai-Hui point in rats. *Neuroscience Letters* 1996;211(2):121-124.

**Chapman CR**, Chen AC, Bonica JJ. Effect of intrasegmental electrical acupuncture on dental pain: evaluation by threshold estimation and sensory decision theory. *Pain* 1977;3(3): 213-227.

**Chen PT**, Wong MK, Chang PL. A therapeutic trial of acupuncture in neurogenic bladder of spinal cord injured patients – a preliminary report. *Spinal Cord* 1998; 36(7):476-480.

**Chen S**, Ma SX. Effects of L-arginine-derived nitric oxide synthesis on cardiovascular responses to stimulus-evoked somatosympathetic reflexes in the gracile nucleus. *Brain Res* 2002;958(2):330–337.

**Chen S**, Ma SX. Nitric oxide in the gracile nucleus mediates depressor response to acupuncture (ST36). *J Neurophysiol* 2003;90(2):780–785.

**Chen YY**, Zhan W, Chen YL, Chen SJ, Dong HX, Zeng YS. Elektro-acupuncture improves survival and migration of transplanted neural stem cells in injured spinal cord in rats. *Acupunct Electrother Res* 2008;33(1-2):19-31.

**Cheng J**, Baumhueter S, Cacalano G et al. Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood* 1996;15;87(2):479-90.

**Cheng JX**, Liu BL, Zhang X. How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? *Cancer Treat Rev.* 2009;35:403-408.

**Cheng H**, Yu J, Jiang Z et al. Acupuncture improves cognitive deficits and regulates the brain cell proliferation of SAMP8 mice, *Neurosci* 2008;432(2):111-116.

**Cheng PT**, Wong MK, Chang PL. A therapeutic trial of acupuncture in neurogenic bladder of spinal cord injured patients – a preliminary report. *Spinal Cord.* 1998;36(7):476-80.

**Cho JS**, Park HW, Roh S, Kang SK, Paik KS, Chang MS. Transplantation of mesenchymal stem cells enhances axonal outgrowth and cell survival in an organotypic spinal cord slice culture. *Neurosci Lett* 2009;454:43-48.

**Chu Q**, .Yu JC, Han JX. Improvement of acupuncture on cognitive function in senescence accelerated mouse P8 (in Chinese). *Chin. J. Behav. Med. Sci.* 2005;11:964-965, 994.

**Cirulli F**. Role of environmental factors on brain development and nerve growth factor expression. *Physiol Behav* 2001;73(3):321-330.

**Clarke** DL, Johansson CB, Wilbertz J et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 2000;288(5471):1660-1663.

**Clarke** DL. Neural stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32 Suppl 1:S13-7. Review.

**Choi** CD, Lee JY, Moon YJ, Kin SW, Oh TH, Yune TY. Acupuncture-mediated inhibition of inflammation facilitates significant functional recovery after spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*. 2010;39:272-282.

**Committee** on Human Leukocyte Differentiation Antigens, IUIS WHO Nomenclature Subcommittee. Proposed nomenclature for human leukocyte differentiation antigens. *Bull. WHO* 5: 809-811, 1984. Note: Alternate: *Immunology Today* 1984;5:280 only.

**Cooper** DMF, Mons N, Karpen JW. 1Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signaling. *Nature* 1995;374(6521):421-424.

**Corbeil** D, Joester A, Fargeas CA et al. Expression of distinct splice variants of the stem cell marker prominin-1 (CD133) in glial cells. *Glia* 2009;57:860-874.

**Coyne** TM, Marcus AJ, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells* 2006;24(11):2483-2492.

**Cucullo** L, Couraud O, Weksler B et al. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28(2):312-328.

**Daneshvar** P, Roffey DM, Brikeet YA, Tsai YA, Bailey CS, Wai EK. Spinal cord injuries related to cervical spine fractures in elderly patients: factors affecting mortality. *Spine J*. 2013; Epub ahead of print.

**Dauber** K, Becker D, Odendahl M, Seifried E, Bonig H, Tonn T: Enumeration of viable CD34(+) cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: results of a study of the novel BD-TM stem cell enumeration kit.

**Deadman** P, Al-Khafaji M, Baker K. *Großes Handbuch der Akupunktur, Das Netzwerk der Akupunkturpunkte und Leitbahnen*, Verlag für ganzheitliche Medizin, Kötzing 2000, S.15.

**Deng** YB, Yuan QT, Liu XG, Liu XL, Liu Y, Liu ZG et al. Functional recovery after rhesus monkey spinal cord injury by transplantation of the bone marrow mesenchymal-stemcell-derived neurons. *Chin Med J (engl)* 2005;118(18):1533-1541.

**Dimitrijevic** MR. Residual motor function in spinal cord injury. *Adv Neurol*. 1988;47:138-155.

**Ding X**, Yu J, Yu T, Fu J, Han JX. Acupuncture regulates the aging-related changes in gene profile expression of hippocampus in senescence-accelerated mouse (SAMP10). *Neurosci.Lett.* 2006;399(1-2):11-16.

**Ding Y**, Yan Q, Ruan JW et al. Electro-acupuncture promotes survival, differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells as well as functional recovery in the spinal cord-transected rats. *BMI Neuroscience* 2009;10:35.

**Dixon CE**, Flinn P, Bao J, Venya R, Hayes RL. Nerve growth factor attenuates cholinergic deficits following traumatic brain injury in rats. *Exper Neurol.* 1997;146(2):479-490.

**Dobkin BH**, Curt A, Guest J. Cellular transplants in China: observational study from the largest human experiment in chronic spinal cord injury. *Neurorehabil. Neural Repair* 2006;20(1):5-13.

**Docherty AJ**, O'Connell J, Crabbe T et al. The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases. *Trends Biotechnol.* 1992;10(6):200-7. Review.

**Domingo A**, Al-Yahya AA, Asiri Y, Eng JJ, Lam T. Spinal Cord Injury Rehabilitation Evidence Research Team. A systematic review of the effects of pharmacological agents on walking function in people with spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2012;29(5):865-79.

**Dugan LL**, Kim JS, Zhang Y et al. Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 1999;274:25842-25858.

**Duke a**: Duke M. Akupunktur. Chinas heilende Nadeln. Bern, München, Scherz Verlag, 1973, S.9-25.

**Duke b**: Duke M. Akupunktur. Chinas heilende Nadeln. Bern, München, Scherz Verlag, 1973, S.142.

**Eblenkamp M**, Neuss-Stein S, Salber S, Jacobs V PD, Wintermantel E. *Medizintechnik Life Science engineering.* Springer Verlag, 2008, S. 421-449.

**Eftekharpour E**, Karimi-Abdolrezae S, Wang J, El Beheiry H, Morshead C, Fehlings MG. Myelination of congenitally dysmyelinated spinal cord axons by adult neural precursor cells results in formation of nodes of Ranvier and improved axonal conduction. *J. Neurosci.* 2007;27(13),4316-3428.

**Egerton M**, Pruski E, Pilarski LM. Cell generation within human thymic subsets defined by selective expression of CD45 (T200) isoforms. *Hum Immunol.* 1990;27(4):333-47.

**Emsley JG**, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol.*

2005;75(5):321-41.

**Enzmann** GU, Benton RI, Talbott JF, Cao Q, Whittemore SR. Functional consideration of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair. *J. Neurotrauma* 2006;23(3-4),479-495.

**Faulkner** JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 2004;24(9)2143-2155.

**Ferreira** AF, Real CC, Rodrigues AC, Alves AS, Britto LR. Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain. *Brain Res.* 2010;1361:31-42.

**Fina** L, Molgaard HV, Robertson D et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75(12):2417-26.

**Fogaca** AC, Pessoa de Barros Filho TE, Marcon RM, Letaif OB, Dias da Rocha I. Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics* 2012;67(10):1219-1224.

**Fukunaga** R, Seto Y, Mizushima S, Nagata S. Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(22):8702-8706.

**Fujimura** H, Altar CA, Chen R et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost* 2002;87(4):728-734.

**Gao** X, Gao C, Gao J, Han F, Han B, Han L. Acupuncture treatment of complete traumatic paraplegia--analysis of 261 cases. *J Tradit Chin Med.* 1996;16(2):134-7.

**Gärtner** A, Staiger V. Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(9):6386-6391.

**Gasche** Y, Copin JC, Sugawara T et al. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21(12):1393-1400.

**Ghonaie** EA, William F, Craig MD et al. Percutaneous electrical nerve stimulation for low back pain: a randomized crossover study. *J. Am. Med. Assoc.* 1999;281(9):818-823.

**German Acupuncture Trials** [Online im Internet:] [www.gerac.de](http://www.gerac.de) (zugegriffen am 16.08.2014).

**Giger** RJ, Hollis ER 2<sup>nd</sup>, Tuszynski MH. Guidance molecules in axon regeneration. *Cold*

spring Harb Perfect Biol 2:a001867. 2010.

**Gill M**, Dias S, Hattori K et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2 + AC133+ endothelial precursor cells. *Circ res* 2001;88(2):167-174.

**Gosh A**, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 1994;263(5153):1618-1623.

**Goyert SM**, Ferrero E, Rettig WJ et al. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science*. 1988;239(4839):497-500.

**Gratwohl A**, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J, Urbano-Ispizua A. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* 2002;100(7):2374-2386.

**Gu Z**, Cui J, Brown S et al. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. 2005;25(27):6401-8.

**Gunn CC**, Milbrandt WE, Little AS, Manson KE. Dry needling of muscle motor points for chronic low-back pain. *Spine* 1980;5(3):279–291.

**Hamza MA**, Ghoname EA, White PF et al. Effect of the duration of electrical stimulation on the analgesic response in patients with low back pain. *Anesthesiology*. 1999;91:1622-1627.

**Hamza, MA**, White PF, Ahmed HE, Ghoname EA. Effect of the duration of electrical nerve stimulation on the postoperative opioid analgesic requirement and recovery profile. *Anesthesiology* 1999;91:1232-1238.

**Hamza MA**, White PF, Craig WF et al. Percutaneous electrical nerve stimulation: a novel analgesic therapy for diabetic neuropathic pain. *Diab. Care* 2000;23:365-370.

**Han JS**: Han JS, Ding XZ, Fan SG. Cholecystokinin octapeptide (CCK-8): Antagonism to electroacupuncture analgesia and a possible role in electroacupuncture tolerance. *Pain* 1986;27(1):101–115.

**Han JS**, Chen XH, Sun SL, Xu XJ, Yuan Y, Yan SC. Effect of low-and high-frequency TENS on met-enkephalin-Arg Phe and dynorphin A immunoreactivity in human lumbar CSF. *Pain* 1991;47:295–298.

**Han JS**. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. *Trends in Neurosci*. 2002;26(1);17-22.

**Han JS**. Acupuncture and endorphins. *Neurosci* 2004;361(1-3):258-261.

**Han JS**, Zhang M, Ren MF. The effect of spinal transection on acupuncture analgesia

and morphine analgesia. In: Ma SX. Neurobiology of Acupuncture: Toward CAM. Oxford University Press 2004;1(1)41–47.

**Han JS**, Ho YS. Global trends and performances of acupuncture research. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35(3):680-687.

**Han QM**, Xie J, Chai S-T, Fang J, Liu Q. Effect of Governor Meridian electro-acupuncture on water channel aquaporin-4 in experimental spinal cord injured rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi (Article in Chinese).* 2005;25(7):637-639.

**Hansen MR**, Zha XM, Bok J, Green SH. Multiple distinct signal pathways, including an autocrine neurotrophic mechanism, contribute to the survival-promoting effect of depolarization on spiral ganglion neurons in vitro. *J Neurosci* 2001;21(7):2256-2267.

**Hanson MG Jr**, Shen S, Wiemelt AP, Mc Morris FA, Barres BA. Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci* 1998;18(18):7361-7371.

**Haorah J**, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J. Neurochem.* 2007;101,566-576.

**Hasty DL**, Courtney HS, Simpson WA, McDonald JA, Beachey EH. Immunochemical and ultrastructural mapping of the gelatin-binding and cell-attachment regions of human plasma fibronectin with monoclonal antibodies. *J Cell Sci.* 1986;81:125-41.

**Hirota H**, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T. Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med* 1996;183(6):2627-2634.

**Hitzler JK**, Martinez-Valdez H, Bergsagel DB, Minden MD, Messner HA. Role of interleukin-6 in the proliferation of human multiple myeloma cell lines OCI-My 1 to 7 established from patients with advanced stage of the disease. *Blood.* 1991;78(8):1996-2004.

**Hoffbrand AV**, Pettit JE, Moss PAH, Hoelzer D. *Grundkurs Hämatologie*, 2.Auflage, Malden, USA, Victoria, Australia. Blackwell Publishing, 2001, S.2.

**Hofstetter CP**, Schwarz EJ, Hess D et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and prompt recovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2199-2204.

**Hofstetter CP**, Holmstrom NA, Liljy JA et al. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat. Neurosci.* 2005;8(3)346-353.



**Houweling** DA, Bär PR, Gipsen WH, Joosten EA. Spinal cord injury: bridging the lesion and the role of neurotrophic factors in repair. *Prog Brain Res* 1998;117:455-471.

**Irons** H, Lind JG, Wakade CG et al. Intracerebral xenotransplantation of GFP mouse bone marrow stromal cells in intact and stroke rat brain: graft survival and immunologic response. *Cell Transplant* 2004;13(3):283-294.

**Jackson** A. Basic phenotyping of lymphocytes: Selection and testing of reagents and interpretation of data. 1990. *Clinical Immunology Newsletter*. 10(4):43-55.

**Jefferson** SC et al. Chondroitinase ABC promotes recovery of adaptive limb movements and enhances axonal growth caudal to a spinal hemisection. *J. Neurosci.* 2011;31:5710-5720.

**Jefferson** R. Wilson MD, Nicole Forgione PhD, Michael G. Fehlings MD PhD. Emerging therapies for acute traumatic spinal cord injury. *CMAJ* 2013. DOI:10.1503/cmaj.121206

**Jones** SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol.* 2005 175(6):3463-8.

**Kalandarishvili** E, Bukia R, Taktakishvili A, Chinchinadze G, Kharebava I. (Postnatal neurogenesis and regenerative capabilities of the central nervous system (review)). *Georgian Med News.* 2012;206:67-72.

**Kalka** C, Masuda H, Takahashi T et al. Transplantation of ex-vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(7):3422-3427.

**Kamada** H, Yu F, Nito C, Chan PH. Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats: relation to blood-brain barrier dysfunction. *Stroke.* 2007;38(3):1044-1049.

**Kamei** N, Kwon SM, Alev C, et al. Ex-vivo expanded human blood-derived CD133(+) cells promote repair of injured spinal cord. *J Neurol Sci* 2013, 328(1-2) :41-50.

**Kaptchuk a:** Kaptchuk TJ. *Chinese Medicine. The web that has no weaver*, London, Melbourne, Auckland, Johannesburg, Rider&Company, 1983, S.23.

**Kaptchuk b:** Kaptchuk TJ. *Chinese Medicine. The web that has no weaver*, London, Melbourne, Auckland, Johannesburg, Rider&Company, 1983, S. 19.20.

**Kaptchuk c:** Kaptchuk TJ. *Chinese Medicine. The web that has no weaver*, London, Melbourne, Auckland, Johannesburg, Rider&Company, 1983, S. 20.

**Kempermann** G. New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(10):727-36

**Kerr** D, Lladò J, Shamlott M, Maragakis N, Irani D, Crawford T. Human Embryonic

Germ Cell Derivatives Facilitate Motor Recovery of Rats with Diffuse Motor Neuron Injury. *The Journal of Neuroscience* 2003;23(12):5131-5140.

**Kijima** Y, Ishikawa M, Sunagawa T, et al. Regeneration of peripheral nerve after transplantation of CD133(+) cells derived from human peripheral blood. *J Neurosurg* 2009, 10(4):758-767.

**Kim** JK, Choi BH, Park HC et al. Effects of GM-CSF on the neural progenitor cells. *Neuroreport* 2005;15;2161-2165.

**Kishimoto** T. 1989. The Biology of Interleukin-6. *Blood* 74(1):1-10.

**Kishimoto** T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6-family of cytokines and gp130. *Blood* 1995;86(4):1243-1254.

**Kollet** O, Canaani J, Kalinkovich A, Lapidot T. Regulatory cross talks of bone cells, hematopoietic stem cells and the nervous system maintain hematopoiesis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012 Jan 20 (Epub ahead of print).

**Krause** DS, Ito T, Fackler MJ et al. Characterization of murine CD34, a marker for

**Kwokming** JC. Neurobiological Mechanisms of Acupuncture for Some Common Illnesses: A Clinician's Perspective. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 2013;7(3):105-114.

**Lang** UE, Gallinat J, Danker-Hopfe H, Baibouri M, Hellweg R. Nerve growth factor serum concentrations in healthy human volunteers: physiological variance and stability. *Neurosci Lett*. 2003;344(1):13-16.

**Lao** L, Zhang RX, Zhang G, Wang X, Berman BM, Ren K. A parametric study of electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats. *Brain Res*. 2004;1020(1-2):18-29.

**Lapidot** T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization. The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines and stromal cells. *Exp Hematol* 2002;30(9):973-981.

**Larsson** E, Mandel RJ, Klein RL, Muzyczka N, Lindvall O, Kokaia Z. Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*. 2002;177(1):1-8.

**Leary** AG, Ikebuchi K, Hirai Y. Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. *Blood* 1988; 71(6):1759-63.

**Leem** JW, Lee BH, Willis WD, Chung JM. Grouping of somatosensory neurons in the spinal cord and the gracile nucleus of the rat by cluster analysis. *J Neurophysiol*

1994;72(6):2590–2597.

**Leibrock** J, Lottspeich F, Hohn A et al. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 1989;341(6238):149-152.

**LeVan** TD, Bloom JW, Bailey TJ et al. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol.* 2001;167(10):5838-44.

**Li** QJ, Dinner AR, Qi S et al. CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse. *Nat Immunol.* 2004;5(8):791-9.

**Li** WM, Sato A, Suzuki A. The inhibitory role of nitric oxide (NO) in the somatocardiac sympathetic C-reflex in anesthetized rats. *Neurosci Res* 1995;22(4):375–380.

**Li** XB, Zeng YS, Chen YL, Guo JS, Li XJ, Chen SJ. Effects of Du Meridian electroacupuncture and transplanted neural stem cells on the functional recovery of the hind limbs in spinal cord transected rats. *Acta Anatomica Sinica* 2004;35:582-588.

**Lian a:** Lian YL, Chen CY, Hammes M, Kolster BC. *Dägfa Bildatlas der Akupunktur.* Marburg, KVM-Verlag, 2004, S.14-16.

**Lian b:** Lian YL, Chen CY, Hammes M, Kolster BC. *Dägfa Bildatlas der Akupunktur.* Marburg, KVM-Verlag, 2004, S.16-17.

**Lian c:** Lian YL, Chen CY, Hammes M, Kolster BC. *Dägfa Bildatlas der Akupunktur.* Marburg, KVM-Verlag, 2004, S. 11.

**Librach** CL, Werb Z, Fitzgerald ML et al. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol.* 1991;113(2):437-449.

**Liu** Q, Yu J, Mi WL, Mao-Ying QL, Yang R, Wang YQ, Wu GC. Electroacupuncture attenuates the decrease of hippocampal progenitor cell proliferation in the adult rats exposed to chronic unpredictable stress. *Life Sci* 2007;81:1489-1495.

**Lommatzsch** M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging* 2005;26:115-123.

**Lovick** TA, Li P, Schenberg LC. Modulation of the cardiovascular defence response by low frequency stimulation of a deep somatic nerve in rats. *J Auton Nerv Syst* 1995;50(3):347-354.

**Ma** SX, Holley AT, Sandra A, Cassell MD, Abboud FM. Increased expression of nitric oxide synthase in the gracile nucleus of aged rats. *Neuroscience* 1997;76(3):659–663.

**Ma** SX, Cornford ME, Vahabnezhad I, Wei S, Li X. Responses of nitric oxide synthase expression in the gracile nucleus to sciatic nerve injury in young and aged rats. *Brain*

Res 2000;855(1):124–131.

**Ma SX, Li YX.** Increased neuronal nitric oxide synthase expression in the gracile nucleus of brainstem following electroacupuncture given between cutaneous hindlimb scupuncturepoints BL64&BL65 in rats. *Acupunct Electrother Res.* 2002;27(3-4):157-169.

**Ma SX.** A novel signal pathway: Nitric oxide mediates acupuncture induced neuronal activity and analgesia in the dorsal medulla-thalamic tract. *The First World Congress on Chinese Medicine 2003*;95:A7. In: Ma S-X. *Neurobiology of Acupuncture: Toward CAM.* Oxford University Press 2004;1(1)41–47.

**Ma J, Ge J, Zhang S et al.** Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 205;100(3):217-23.

**Mackay AR, Hartzler JL, Pelina MD et al.** Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. *J Biol Chem.* 1990;265(35):21929-34.

**Macioccia a:** Macioccia G. *Grundlagen der chinesischen Medizin*, 2.Auflage, Elsevier, München. 2008, S.1.

**Macioccia b:** Macioccia G. *Grundlagen der chinesischen Medizin*, 2.Auflage, Elsevier, München. 2008, S.77-92.

**Macioccia c:** Macioccia G. *Grundlagen der chinesischen Medizin*, 2.Auflage, Elsevier, München. 2008, S.315.

**Macioccia d:** Macioccia G. *Grundlagen der chinesischen Medizin*, 2.Auflage, Elsevier, München. 2008, S.19-39.

**Macioccia e:** G. *Grundlagen der chinesischen Medizin*, 2.Auflage, Elsevier, München. 2008, S.287-377.

**Maddon PJ, Molineaux SM, Maddon DE et al.** Structure and expression of the human and mouse T4 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9155-9.

**Mahmood A, Lu D, Chopp M.** Intravenous Administration of Marrow Stromal Cells (MSCs) Increases the Expression of Growth Factors in Rat Brain after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* 2004;21(1):33-39.

**Manson DY, André P, Bensussan A et al.** CD antigens. *Tissue Antigens.* 2001;58(6):425-30.

**Martin-Rendon E, Watt SM.** Stem Cell Plasticity. *Br J Haematol.* 2003;122(6):877-91.

**Mattson MP, Maudsley S, Martin B.** BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related

neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2004;27(10):589-594.

**Mayer DJ**, Price DD, Raffi A. Antagonism of acupuncture analgesia in man by the narcotic antagonist naloxone. *Brain Res* 1977;121(2):368–72.

**Maynard FM Jr**, Bracken MB, Creasey G et al. International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. American Spinal Injury Association. *Spinal Cord.* 1997;35(5):266.274.

**McDevitt L**, Fortner P, Pomeranz B. Application of weak electric field to the hindpaw enhances sciatic motor nerve regeneration in the adult rat. *Brain Res* 1987, 416(2):308-314.

**McDonald JW**, Belegu V. Demyelination and remyelination after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 2006;23(3-4)345-359.

**McLean AK**, Steward C, Kerridge I. Untested, unproven, and unethical: the promotion and provision of autologous stem cell therapies in Australia. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):12.

**Meletis K**, Barnabe-Heider F, Carlen M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisen J. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6:e182.

**Melzack R**, Stillwell DM, Fox EJ. Trigger points and acupuncture points for pain: correlations and implications. *Pain* 1977;3(1):3–23.

**Mendoça MV**, Larocca TF, Souza BS et al. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(6):126.

**Miraglia S**, Godfrey W, Yin AH et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stemcell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997;90(12):5013-21.

**Moldenhauer A**, Genter G, Lun a; Bal G, Kiesewetter H, Salama A. Hematopoietic progenitor cells and interleukin-stimulated endothelium: expansion and differentiation of myeloid precursors. *BMC Immunol.* 2008;9:56.

**Moldenhauer S**, Burgauner M, Hellweg R. et al. Mobilization of CD133(+)CD34(-) cells in healthy individuals following whole-body acupuncture for spinal cord injuries. *J Neurosci* 2010;88(8):1645-50.

**Mukaino M**, Nakamura M, Okada S, Toyoma Y, Liu M, Okano H. Role of IL-6 in regulation of inflammation and stem cell differentiation in CNS trauma. (Abstract). *Clin*

Rev Allergy Immunol. 2005;28(3):197-204.

**Nagase** H, Barrett AJ, Woessner JF. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. Matrix Suppl. 1992;1:421-424.

**Naosuke** K, Sang-Mo K, Cantas A, et al. Ex-vivo expanded human blood-derived CD133 cells promote repair of injured spinal cord. Journal of the Neurological Sciences. 2013;328:41-50.

**Nakamura** M, Okada S, Toyama Y, Okano H. Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. Clin Rev Allergy Immunol. 2005;28(3):197-204.

**NIH Consensus Development Program** [Online im Internet:] <http://consensus.nih.gov/1997/1997acupuncture107html.htm> (zugegriffen am 16.08.2014)

**Nishimoto** N, Kishimoto T. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. Handbook Exp Pharmacol. 2008;181:151-160.

**Noble** LJ, Donovan F, Igarashi T et al. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. J. Neurosci. 2002;22(17):7526-7535.

**Ochi** JW. Acupuncture instead of codeine for tonsillectomy pain in children. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 2013;77:2058–2062.

**Okada** Y, Gonoji Y, Naka K et al. Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. J Biol Chem. 1992;267(30):21712-9.

**Okada** S, Nakamura M, Katoh H et al. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. Nat.Med.2006;12(7)829-834.

**Olausson** KH, Maire CL, Haidar S et al. Prominin-1 (CD133) Defines Both Stem and Non-Stem Cell Populations in CNS Development and Gliomas. PLoS ONE 9(9):e106694. Doi:10.1371/journal.pone.0106694.

**Paczkowska** E, Roginska D, Pius-Sadowska E et al. Evidence for proangiogenic cellular and humoral systemic response in patients with acute onset of spinal cord injury. J Spinal Cord Med. 2014 Jun 26 (Epub ahead of print).

**Parr** AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for repair of central nervous system injury. Bone marrow Transplant 2007;40(7):609-619.

**Pencea** V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. J Neurosci

2001;21(17):6706-6717.

**Pfenninger** CV, Roschupkina T, Hertwig F. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res* 2007;67(12):5727-36.

**Pfenninger** CV. Characterization of CD133-positive cells in stem cell regions of the developing and adult murine central nervous system. Dissertation. Prozesswissenschaften der TU Berlin 2009; [Online im Internet:] <http://dnb.info/1013840259/34> (zugegriffen am 21.12.2014).

**Pluchino** N, Cubeddu A, Begliuomini S et al. Daily variation of brain-derived neurotrophic factor and cortisol in women with normal menstrual cycles, undergoing oral contraception and in postmenopause. *Hum Reprod.* 2009;24(9):2303-9.

**Pomeranz** B, Paley D. Electroacupuncture hyalgesia is mediated by afferent nerve impulses: an electrophysiological study in mice. *Exp Neurol* 1979;66(2):398–402.

**Pomeranz** B. Effects of applied DC fields on sensory nerve sprouting and motor-nerve regeneration in adult rats. *Prog Clin Bio Res* 1986;210:251-258.

**Prockop** DJ, Gregory CA, Spess JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;1:11917-11923.

**Prokop** O, Mattig W. *Medizinischer Okkultismus*. 4.Auflage, Jena, Fischer; 1977.

**Pubmed** „Akupunktur“ [Online im Internet:]

[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=acupuncture](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=acupuncture) (zugegriffen am 16.08.2014)

**Pustovrh** MC, Jawerbaum A, Capobianco E et al. Oxidative stress promotes the increase of matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in the fetoplacental unit of diabetic rats. *Free Radic Res* 2005;39(12):1285-1293.

**Radka** SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res.* 1996;709(1):122-301.

**Ritz** U, Spies V, Mehling I, Grusza D, Rommes PM, Hofmann A. Mobilization of CD34(+)-Progenitor Cells in Patients with severe Trauma. *PLoS ONE* 9(5):e97369. Doi:10.1371/journal.pone.0097369.

**Saito** S, Fukunaga R, Ichijo M, Nagata S. Expression of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor at the fetomaternal interface in murine and human pregnancy. *Growth Factors*.1994;10(2):135-143.

**Sander** B, Prang P, Rivera FJ, Aigner L, Blesch A, Weidner N. Neural stem cells for

spinal cord repair. *Cell Tissue res* 2012; 349-362

**Sato S**, Steeber DA, Janasen PJ, Tedder TF. CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. *J Immunol.* 1997;158(10):4662-4669.

**Sator-Katzenschlager SM**, Scharbert G, Kozek-Langenecker SA, Szeles JC, Finster G, Schiesser AW, Heinze G, Kress, HG. The Short- and Long-Term Benefit in Chronic Low Back Pain Through Adjuvant Electrical Versus Manual Auricular Acupuncture. *Anesthesia & Analgesia* 2004;98(5):1359-1364.

**Sasaki M**, Radtke C, Tan A, Zhao P, Hamada H, Houkin K. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J Neurosci* 2009;29(47):14932-14941.

**Savic G**, Bergström EM, Frankel HL, Jamous MA, Jones PW. Inter-rater reliability of motor and sensory examinations performed according to American Spinal Injury Association standards. *Spinal Cord* 2007;45(6):444-451.

**Schäbitz WR**, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke* 2000;31(9):2212-2217.

**Schäbitz WR**, Berger C, Kollmar R et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke.* 2004;35(4):992-997.

**Schmidt WGA**. *Der Klassiker des Gelben Kaisers zur inneren Medizin.* 1. Auflage, Freiburg Basel Wien, Herder-Verlag, 1993, S. 25.

**Schnell L** et al. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 1994;367:170-173.

**Schnorrenberger CC**. *Therapie mit Akupunktur, Band III,* Stuttgart, Hippokrates-Verlag GmbH, 1992, S.354-356.

**Schwab ME**. Nogo and axon regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2004;14(1):118-124.

**Schwartz G**, Fehlings MG. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *Journal of Neurosurgery.* 2001;94:245-256.

**Sekhon LH**, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of



acute spinal cord injury. *Spine* 2001;26:2-12.

**Shah S**, Ulm J, Sifri ZC, Mohr AM, Livingstone GH. Mobilization of bone marrow cells to the site of injury is necessary for wound healing. (Abstract) *J Trauma* 2009;67(2):315-21.

**Sharp J**, Keirstead HS. Therapeutic applications of oligodendrocyte precursors derived from human embryonic stem cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007;18(5):434-440.

**Shin BC**, Lee MS, Kong JC, Jang I, Park JJ. Acupuncture for spinal cord injury survivors in Chinese literature: A systematic review. *Complement Ther Med* 2009;17(5-6):316-327.

**Shirvaikar N**, Marquez-Curtis LA, Wieczorek AJ. Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Homing after Transplantation: The Role of MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP. *Biochemistry Research International* 2012; Article ID 685267, 11 pages.

**Sinson G**, Voddi M, McIntoshTK. Nerve growth factor administration attenuates cognitive but not neurobehavioral motor dysfunction or hippocampal cell loss following fluid-percussion brain injury in rats. *J Neurochem.* 1995;65(5):2209-2216.

**Sivin N**. "Huang ti nei ching 黃帝內經." In *Early Chinese Texts: A Bibliographical Guide*, Herausgeber: Michael Loewe. Berkeley, Los Angeles: University of California Press;1993:196-215.

**Sjolund BH**, Eriksson MB. The influence of naloxone on analgesia produced by peripheral conditioning stimulation. *Brain Res* 1979;173(2):295–301

**Stacher G**, Wancura I, Bauer P, Lahoda R, Schulze D. Effect of acupuncture of pain threshold and pain tolerance determined by electrical stimulation of the skin: a controlled study. *Am J Chin Med* 1975, 3(2):143-149.

**Striebel HW**. *Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin*, 6. Auflage; Stuttgart New York, Schattauer Verlag, 2005, S.171, 178, 445.

**Stux a**: Stux G, Stiller N, Berman B, Pomeranz B. *Akupunktur Lehrbuch und Atlas*, 7.Auflage; Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 2008, S.1.

**Stux b**: Stux G, Stiller N, Berman B, Pomeranz B. *Akupunktur Lehrbuch und Atlas*, 7.Auflage; Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 2008, S.5, 6.

**Stux c**: Stux G, Stiller N, Berman B, Pomeranz B. *Akupunktur Lehrbuch und Atlas*, 7.Auflage; Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 2008, S.9-19.

**Stux d**: Stux G, Stiller N, Berman B, Pomeranz B. *Akupunktur Lehrbuch und Atlas*, 7.Auflage; Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 2008, S.8, 39, 40.

**Stux e**: Stux G, Stiller N, Berman B, Pomeranz B. *Akupunktur Lehrbuch und Atlas*,

7.Auflage; Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 2008, S.47-57.

**Stux f:** Stux G, Stiller N, Berman B, Pomeranz B. Akupunktur Lehrbuch und Atlas, 7.Auflage; Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 2008, S.27.

**Sugawara T,** Lewén A, Gasche Y, Yu F, Chan PH. Overexpression of SOD1 protects vulnerable motor neurons after spinal cord injury by attenuating mitochondrial cytochrome c release. *FASEB J.* 2000;16(14):1997-9.

**Sutherland DR,** Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE Guidelines for CD34(+) Cell Determination by Flow Cytometry. *Journal of Hematotherapy* 1996;5:213-226.

**Takahashi T,** Kalka C, Masuda H et al. Ischemia- and cytokine induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5(4):434-438.

**Takeda T,** Matsushita M, Kurozumi K, Takemura K, Higuchi K, Hosokawa M. Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM), *Exp. Gerontol.* 1997;32:117-127.

**Tamul K,** Schmitz JL, Kane K, Folds JD. Comparison of the Effects of Ficoll-Hypaque Separation and Whole Blood Lysis on Results of Immunophenotypic Analysis of Blood and Bone Marrow Samples from Patients with Hematologic Malignancies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 1995:337-342.

**Tashiro K,** Tada H, Heilker R et al. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science.* 1993;261(5121):600-603.

**Tedder TF,** Zhou LJ, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today.* 1994;15(9):437-442.

**Thalmann H.** Stellungnahme zur Gerac-Akupunktur (Sham) im Vergleich zur TCM-Akupunktur beim Kreuzschmerz, *Schmerz & Akupunktur* 2005;1:6-10.

**Thuret S,** Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci,* 2006;7:628-643.

**Tonchev AB.** Brain ischemia, neurogenesis, and neurotrophic receptor expression in primates. *Arch Ital Biol.* 2011;149(2):225-231.

**Trenz a:** Trenc O, Bühren V. Traumatologie, 5.Auflage; Stuttgart New York, Thieme Verlag, 2001; S.167.

**Trenz b:** Trenc O, Bühren V. Traumatologie, 5.Auflage; Stuttgart New York, Thieme Verlag, 2001; S.154-158.

**Uchida N,** Buck DW, He D et al. Direct isolation of human central nervous system stem

cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(26):14720-5.

**Van Praag** H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus, Nature 2002;415(6875):1030-1034.

**Verfaillie** CM. Hematopoietic stem cells for transplantation. Nat Immunol 2002;3(4):314-317.

**Wall** P. An eye on the needle. Nurse Times. 1972;68(34):1061-1063.

**Wang** H. A survey of the treatment of traumatic paraplegia by traditional Chinese medicine. J Tradit Chin Med. 1992;12(4):296-303.

**Wang**, JZ, Han JS. Post-traumatic spinal spasticity treated with Han's Acupoint Nerve Stimulator (HANS). Chin. J. Pain Med. 2000;6:217-224. In: Han, JS. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. Trends in Neurosci. 2002;26(1):17-22.

**Wang** Q a: Wang H, Mao LM, Han JS. The arcuate nucleus of hypothalamus mediates low but not high frequency electroacupuncture analgesia in rats. Brain Res 1990;513(1):60-66.

**Wang** Q b: Wang Q, Mao LM, Han JS. The role of periaqueductal gray in mediation of analgesia produced by different frequencies electroacupuncture stimulation in rats. Int J Neurosci 1990;52(2-4):167-172.

**Weissman** IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science 2000;287(5457):1442-1446.

**Welgus** HG, Campell EJ, Cury JD et al. Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. J Clin Invest 1990;86(5):1496-1502.

**Whitby** A, Whitby L, Fletcher M et al., ISHAGE Protocol: Are We Doing It Correctly? Cytometry 2012;82B:9-17.

**Wilhelm** N, Ellis A. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. J Biol Chem 1989;264(29):17213-21.

**Wiseman** N, Ellis A. Fundamentals of Chinese Medicine. Paradigm Publications, Brookline MA, 1994, S. X, XI.

**Witt** CM, Schützler L, Lüdtker R, Wegscheider K, Willich SN. Patient characteristics and variation in treatment outcomes: which patients benefit most from acupuncture for chronic pain? Clin J Pain 2011;27(6):550-555.

**Wong** AM, Leong CP, Su TJ, Yu S-W, Tsai WC, Chen CP. Clinical Trial of Acupuncture

for Patients with Spinal Cord Injuries. *Am J Phys Med Rehabil* 2003;82(1):21–27.

**Wong VC**, Chen WX. Randomized controlled trial of electro-acupuncture for autism spectrum disorder. *Altern Med Rev* 2010; 15(2):136-146.

**Wyandaele JJ**. Investigation of the afferent nerves of the lower urinary tract in patients with complete and incomplete spinal cord injury. *Paraplegia* 1991;29(7):490-494.

**Xie J**, Feng X, Liu Q. Effect of electroacupuncture at acupoints of the governor vessel on aquaporin-4 in rat with exxperimental spinal cord injury. *J Tradit Chin Med* 2006;26(2):148-152.

**Xu J**, Chen S, Chen H et al. STAT5 mediates antiapoptotic effects of methylprednisolone on oligodendrocytes. *J Neurosci* 2009;29(7):2022-2026.

**Jayaraman A**, Pike CJ. Differential effects of synthetic progestagens on neuron survival and estrogen neuroprotection in cultured neurons. *Mol Cell Endocrinol.* 4;384:52-60.

**Yamamoto M**, Sobue G, Yamamoto K. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3 and GDNF) and their receptors p75NGFR, trkA, trkB and trkC in the adult human peripheral nervous system ans nonneural tissues. *Neurochem Res* 1996;21(8):929-938.

**Yang Y**, Estrada EY, Thompson JF. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 2007;27(4):697-709.

**Yao L**, Yao S, Daly W, Hendry W, Windebank A, Pandit A. Non-viral gene therapy for spinal cord regeneration. *Drug Discovery Today* 2012;17:998-1005.

**Yin AH**, Miraglia S, Zanjani ED et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;15;90(12):5002-12.

**Yoon SH**, Shim YS, Park YH et al. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells* 2007;25(8):2066-2073.

**Yu F**, Kamada H, Niizuma K, Endo H, Chan PH. Induction of mmp-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2008;25(3):184-95.

**Yu, XF**, Han ZC. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Histol Histopathol.* 2006;21(5)519-31.

**Zafra** F, Castren E, Thoenen H, Lindholm D. Interplay between glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *PNAS U S A* 1991;88(22):10037-10041.

**Zhou** LJ, Ord DC, Omori SA, Tedder TF. Structure of the genes encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. *Immunogenetics*. 1992;35(2):102-11.

**Ziegenhorn** AA, Schulte-Herbrüggen O, Danker-Hopfe H, Malbranc M, Hartung HD, Hellweg R et al. Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging* 2007;28(9):1436-45.

**Zhu** J, Zhou L, XingWuF. Tracking neural stem cells in patients with brain trauma. *N Engl J Med*. 2006;355(22):2376-2378.



## **Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.





## **Publikationsverzeichnis**

Teile der Arbeit wurden im Journal of Neuroscience veröffentlicht:

Moldenhauer S, Burgauner M, Hellweg R. et al. Mobilization of CD133(+)CD34(-) cells in healthy individuals following whole-body acupuncture for spinal cord injuries. J Neurosci 2010;88(8):1645-50.



## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Miriam Burgauner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Einfluss der Akupunktur auf die Mobilisation von Stammzellen" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, 21.02.2015

Miriam Burgauner

### **Anteilerklärung an erfolgter Publikation**

Miriam Burgauner hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Moldenhauer S, Burgauner M, Hellweg R. et al. Mobilization of CD133(+)CD34(-) cells in healthy individuals following whole-body acupuncture for spinal cord injuries. J Neurosci 2010;88(8):1645-50.

Beitrag im Einzelnen: Rekrutierung der Probanden, Blutabahmen, Unternehmen der Durchflusszytometrien und ELISAS sowie das Sammeln der gesamten Daten.

Miriam Burgauner