

Aus der Klinik für Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Charakteristika der Inflammations – und Resolutionskinetiken im  
Rückenmark in Abhängigkeit anatomischer Kompartimente nach  
Induktion einer sterilen Inflammation**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ramin Raul Ossami Saidy

aus Berlin

Datum der Promotion: 16. Juni 2018



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>I Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>I.I Zentrales Nervensystem</b>	<b>1</b>
I.I.I Nervensystem	1
I.I.II Zentrales Nervensystem	1
I.I.III Zellen des ZNS	1
I.I.IV Rückenmark	2
I.I.V Blut-Hirn-Schranke und Blut-Rückenmark-Schranke	4
<b>I.II Immunsystem</b>	<b>4</b>
I.II.I Angeborenes Immunsystem	4
I.II.II Erworbenes Immunsystem	5
I.II.III Organe des Immunsystems	5
I.II.IV Inflammation und Resolution	6
<b>I.III Interaktion zwischen ZNS und Immunsystem</b>	<b>8</b>
I.III.I Autonomes Nervensystem und direkte Innervation von Organen	9
I.III.II Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse	10
<b>I.IV Trauma, Inflammation und Resolution im ZNS</b>	<b>10</b>
I.IV.I Neuroinflammation	10
I.IV.II Inflammation nach traumatischer Hirnschädigung	11
I.IV.III Inflammation nach Schlaganfall	11
I.IV.IV Inflammation bei Encephalomyelitis Disseminata	11
I.IV.V Inflammation nach Rückenmarksverletzung	12
I.IV.VI Wallersche Degeneration	15
I.IV.VII Immunsuppressionssyndrom nach Verletzungen des ZNS	15
I.IV.VIII Resolutionsdefizit im ZNS	15
I.IV.IX Interventionsansätze zur Modulation inflammatorischer Vorgänge des ZNS	16
<b>I.V Experimentell induzierte Inflammations- und Schadensmodelle im Rückenmark</b>	<b>18</b>
I.V.I Traumatische Verletzungsmodelle	18
I.V.II Ischämie und Reperfusion	18
I.V.III Experimentelle Autoimmunenzephalitis	18
I.V.IV Lipopolysaccharide und Zymosan A	18
<b>I.VI Ziel der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>II Material und Methodik</b>	<b>21</b>
<b>II.I Tierexperimentelle Operationen</b>	<b>21</b>

II.I.i	Allgemeine Handhabung der Tiere	21
II.I.ii	Laminektomie und Injektion	22
II.I.iii	Gruppen	23
II.I.iv	Tötung der Tiere und Gewebepräparation	23
<b>II.ii</b>	<b>Histologische Präparation</b>	24
II.ii.i	Histologische Aufarbeitung	24
II.ii.ii	Immunhistochemische Einzelfärbung	25
<b>II.iii</b>	<b>Etablierung der Versuchsreihe</b>	26
II.iii.i	Induktion einer atraumatischen Läsion im Rückenmark	27
II.iii.ii	Injektionsvolumen	28
II.iii.iii	Koordinaten zur Injektion	28
II.iii.iv	Explantation des Rückenmarks	28
II.iii.v	Histologische Aufarbeitung	29
<b>II.iv</b>	<b>Einschlusskriterien</b>	29
<b>II.v</b>	<b>Quantifizierung und Analyse</b>	30
II.v.i	Motorische Abschätzung	30
II.v.ii	Morphometrie	31
II.v.iii	Zellzählung	31
II.v.iv	Allgemeine Zählkriterien	32
II.v.v	Spezielle Zählkriterien	32
II.v.vi	Statistische Analyse	33
<b>II.vi</b>	<b>Magnetresonanztomographie</b>	34
<b>II.vii</b>	<b>Bildmaterial</b>	34
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>III.i</b>	<b>Eingeschlossene Experimente und Konstitution der Gruppen für die immunhistochemische Auswertung</b>	35
<b>III.ii</b>	<b>Postoperative sensomotorische Funktion und Allgemeinzustand</b>	35
<b>III.iii</b>	<b>Magnetresonanztomografische Bildgebung des Läsionsbereiches</b>	36
<b>III.iv</b>	<b>Morphometrische Analyse der Läsion</b>	36
<b>III.v</b>	<b>Allgemeine Charakteristika der Zellpopulationen</b>	37
III.v.i	Neutrophile Granulozyten	37
III.v.ii	Makrophagen	37
III.v.iii	Lymphozyten	39
III.v.iv	Astrozyten	39
<b>III.vi</b>	<b>Kinetiken der Zellpopulationen in weißer und grauer Substanz auf Höhe Th9</b>	40
III.vi.i	Population der MPO <sup>+</sup> Zellen	40
III.vi.ii	Population der CD68 <sup>+</sup> Zellen	40
III.vi.iii	Population der CD43 <sup>+</sup> Zellen	41
III.vi.iv	Population der CD3 <sup>+</sup> Zellen	42
III.vi.v	Population der GFAP <sup>+</sup> Zellen	43

<b>III.vii Kinetiken der Zellpopulationen in weißer und grauer Substanz auf Höhe Th3</b>	<b>43</b>
III.vii.i Population der MPO <sup>+</sup> Zellen	43
III.vii.ii Population der CD68 <sup>+</sup> Zellen	43
III.vii.iii Population der CD43 <sup>+</sup> Zellen	46
III.vii.iv Population der CD3 <sup>+</sup> Zellen	47
III.vii.v Population der GFAP <sup>+</sup> Zellen	47
<b>III.viii Kinetiken der Zellpopulationen in weißer und grauer Substanz sowie im Vergleich zwischen Th9 und Th3</b>	<b>47</b>
III.viii.i Vergleich der Zellpopulationen in der weißen Substanz zwischen Th9 und Th3	47
III.viii.ii Vergleich der Zellpopulationen in der grauen Substanz zwischen Th9 und Th3	50
<b>III.ix. Kinetiken sowie Vergleich der Zellpopulationen in weißer und grauer Substanz unabhängig der Läsionshöhe</b>	<b>51</b>
III.ix.i Population der MPO <sup>+</sup> Zellen	51
III.ix.ii Population der CD68 <sup>+</sup> Zellen	51
III.ix.iii Population der CD43 <sup>+</sup> Zellen	51
III.ix.iv Population der CD3 <sup>+</sup> Zellen	51
III.ix.v Population der GFAP <sup>+</sup> Zellen	52
<b>III.x Resolutionskinetiken in weißer und grauer Substanz sowie im Vergleich zwischen Th9 und Th3</b>	<b>52</b>
III.x.i Umsetzung der Modellanalyse anhand der erhobenen Daten	52
III.x.ii Resolutionsindices für die Population der MPO <sup>+</sup> Zellen	53
III.x.iii Resolutionsindices für die Population der CD68 <sup>+</sup> Zellen	53
III.x.iv Resolutionsindices für die Population der CD3 <sup>+</sup> Zellen	53
<b>IV Diskussion</b>	<b>55</b>
<b>IV.i Überlegungen zur Methodik</b>	<b>55</b>
IV.i.i Modell der sterilen Inflammation in Kompartimente des Rückenmarks	55
IV.i.ii Stereotaktische Injektion in die weiße und graue Substanz	56
IV.i.iii Fallzahlen und Gruppen	56
IV.i.iv Einschlusskriterien und quantitative Analyse	57
<b>IV.ii Postoperative sensomotorische Funktion als Maß neurologischer Ausfälle</b>	<b>57</b>
<b>IV.iii Magnetresonanztomographie zur Läsionsdarstellung</b>	<b>58</b>
<b>IV.iv Aussagekraft der Morphometrie des Läsionsbereiches</b>	<b>58</b>
<b>IV.v Einordnung der allgemeinen Kinetiken der gefärbten Zellpopulationen</b>	<b>59</b>
IV.v.i Neutrophile Granulozyten	59
IV.v.ii Makrophagen	59
IV.v.iii Lymphozyten	60
IV.v.iv Astrozyten	60

<b>IV.vi Analyse des Vergleichs der Kinetiken von weißer und grauer Substanz und der Läsionshöhen Th9 und Th3</b>	<b>61</b>
IV.vi.i Neutrophile Granulozyten	61
IV.vi.ii Makrophagen	62
IV.vi.iii Lymphozyten	64
IV.vi.iv Astrozyten	65
IV.vi.v Hypothetische Konsequenzen aus Inflammation – und Resolutionsunterschieden zwischen weißer und grauer Substanz	66
<b>IV.vii Charakteristika der Neuroanatomie und Neurophysiologie des Rückenmarks als Grundlage beobachteter Unterschiede in Inflammation und Resolution</b>	<b>66</b>
IV.vii.i Vaskularisierung und Blut-Rückenmark-Schranke	66
IV.vii.ii Immundepressionssyndrom nach Rückenmarksverletzung	68
<b>IV.viii Inflammation und Resolutionsdefizit im Rückenmark</b>	<b>68</b>
<b>IV.ix Implikationen und Schlussfolgerung</b>	<b>70</b>
<b>IV.x Ausblick</b>	<b>70</b>
<b>V Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>VI Appendix</b>	<b>82</b>
VI.i Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	82
VI.ii Lebenslauf	83
VI.iii Publikationsliste	85
VI.iv Danksagung	86

## Zusammenfassung

**Einleitung** Andauernde Inflammation im Myelon nach Rückenmarkverletzung (spinal cord injury - SCI) trägt einen relevanten Anteil am Sekundärschaden des Gewebes jenseits des ursprünglichen Schadens. Experimentelle Studien beschrieben ein sog. Resolutionsdefizit nach SCI. Für die hieraus resultierenden Schadensprozesse sind zudem innerhalb des Rückenmarks entsprechend den in Vaskularisierung und Metabolismus verschiedenen anatomischen Kompartimenten unterschiedliche Verläufe anzunehmen. Darüber hinaus ist mit dem SCI-induced-Immune Deficiency Syndrom (SCI-IDS) ein Mechanismus der läsionshöhenabhängigen Auswirkung der SCI auf systemische und lokale inflammatorische Prozesse beschrieben worden.

**Methodik** Erwachsene Lewis Ratten wurden auf Wirbelkörper Th9 oder Th3 einer Laminektomie über ein Segment unterzogen. Stereotaktisch erfolgte dann die kalibrierte Injektion einer Zymosan A – Lösung über eine Mikropipette zur Inflammationsinduktion in entweder die weiße (AL) oder die graue Substanz (GR). Zu definierten Zeitpunkten, von 24 Stunden bis 12 Wochen nach der Injektion, erfolgte die Tötung und Gewebeentnahme zur histologischen Aufarbeitung. Neben einer Vermessung der Läsion wurden zur Analyse der wichtigsten Zellpopulationen der Inflammation immunhistochemische MPO, CD68, CD43, CD3 und GFAP – Färbungen an transversalen Schnitten durchgeführt und die Zellen quantitativ zur statistischen Analyse und der Berechnung von Resolutionsindices erfasst.

**Ergebnisse** Insgesamt wurden n=146 Tiere eingeschlossen. Ein Unterschied in der Läsionsgröße zwischen den Gruppen war nicht festzustellen. Auf Höhe Th9 und Th3 zeigte sich kein Unterschied der Kinetik der MPO<sup>+</sup> Zellen. Für die CD68<sup>+</sup> Zellen auf Höhe Th9 zeigte sich im Vergleich zwischen den Gruppen GR und AL ein signifikanter Unterschied 24h nach Injektion mit höheren Zellzahlen in der GR-Gruppe und zwölf Wochen nach der Injektion mit signifikant niedrigen Zahlen in der GR bei stark unterschiedlichen Resolutionsplateaus (AL: R<sub>P</sub>=58,9% / GR: R<sub>P</sub>=20,9%). CD43<sup>+</sup> Zellen sowie CD3<sup>+</sup> zeigten zwischen den Gruppen keine Unterschiede. GFAP<sup>+</sup> Zellen waren sieben Tage und 12 Wochen nach der Injektion in der GR- gegenüber der AL-Gruppe signifikant erhöht. Der Vergleich der Kinetiken zwischen Th9 und Th3 war aufgrund methodischer Einschränkungen nur unzureichend durchführbar.

**Diskussion** Zwischen grauer und weißer Substanz gibt es für Makrophagen/Mikroglia, und Astrozyten unterschiedliche Inflammations- bzw. Resolutionskinetiken mit deutlich effektiverer Resolution in der GR für Makrophagen. Dies könnte mit Unterschieden in

der Dichte der Vaskularisation, Zellinflux über den Zentralkanal und Charakteristika der Blut-Rückenmark-Schranke zu erklären sein. Astrozyten könnten in diesem Zusammenhang möglicherweise neuroprotektive Funktion besitzen.

**Schlussfolgerung** Neben einer sorgfältigen Aufschlüsselung der Inflammation im Zeitverlauf lässt sich aus der vorliegenden Arbeit ein Hinweis auf eine Differenzierung von Inflammation und Resolution in Abhängigkeit von anatomischen Kompartimenten sehen. Zellspezifische Subgruppen sollten identifiziert und das Resolutionsdefizit auf klinische Relevanz überprüft werden.



## Abstract

**Introduction** Ongoing Inflammation within the myelon after Spinal Cord Injury (SCI) contributes to secondary damage beyond initial injury. Experimental data suggest a resolution deficit of spinal cord inflammation, that may contribute to sustained injury progression and impede recovery. Additionally, different kinetics in secondary damage processes regarding anatomical locations have been described. Furthermore, the SCI-induced-Immune Deficiency Syndrome (SCI-IDS) suggests impact on inflammatory processes dependant on lesion height.

**Methods** Adult Lewis rats underwent single-level laminectomy and subsequently stereotactic intraspinal injection of zymosan via glass micropipettes into either white (AL) or grey (GR) matter at level th9 or th3. At pre-specified timepoints ranging from 24 hours to 12 weeks after injections, animals were sacrificed and spinal cords were fixed and embedded. Lesion diameter in serial coronar slices was identified and immunohistological staining of MPO, CD68, CD43, CD3 und GFAP representing dominant inflammatory cell populations was conducted. Statistical analysis was performed and calculation of indices of resolution was calculated assuming half-life kinetics.

**Results** n=146 animals were included in this study. Lesion size did not differ between groups. Kinetics of MPO<sup>+</sup> cells did not show major differences between AL and GR-groups at either th9 or th3. CD68<sup>+</sup> cells at level th9 showed significant differences in cell count at 24h post injection with higher numbers in GR-group and with significant lower numbers twelve weeks post injection, resulting in highly different resolution plateaus (AL: R<sub>P</sub>=58,9% / GR: R<sub>P</sub>=20,9%). No differences were observed in CD43<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells. GFAP<sup>+</sup> cells were significantly higher in GR lesions compared to AL at both seven days and twelve weeks post injection. Comparison between th9 and th3 proved to be difficult as included numbers at level th3 were low.

**Discussion** Differences between white and grey matter lesions regarding inflammation and resolution were observed for macrophages/microglia and astrocytes. The grey matter showed to resolve macrophages/microglia more effectively. Neuroanatomical properties like density of vascular structures, cell migration via the central canal, and differences in blood-spinal-cord barrier may contribute. Probably, also astrocytes might be associated with faster resolution. Subtle differences between th9 and th3 might as well be explained by the arterial watershed of the upper thoracic spine and BSCB-permeability.

**Conclusion** This study suggests, that precise understanding of inflammation and resolution might not only be necessary regarding time course, but also regarding its anatomical compartments. Still, subgroups of inflammatory cells need to be identified and the impact of the specific resolution deficit on clinical outcome should be measured.

## Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotropin-Hormon
AK	Antikörper
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
ASA	A. spinalis anterior
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSCB	Blut-Rückenmark-Schranke
CI	Konfidenzintervall
CIDS	ZNS injury-induced immune deficiency syndrom
CNS	zentrales Nervensystem
COX	Cyclooxygenase
CRH	Corticotropin-freisetzendes Hormon
d	Tag(e)
DAB	Diaminobenzidin
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalitis
EPO	Erythropoetin
GFAP	Saures Gliafaserprotein
h	Stunde(n)
HPA	Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere
IL	Interleukine
i.p.	intraperitoneal
LO	Lipoxygenase
M	Mittelwerte
MDSC	myeloisch abgeleitete Suppressorzelle
MRT	Magnetresonanztomographie
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NAWM	normal appearing white matter
NGS	normal goat serum
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphatpuffersalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PNM	neutrophiler Granulozyt
PN	Parasympathikus
PNS	peripheres Nervensystem
PSA	A. spinalis posterior
s.c.	subcutan
SCI	Rückenmarksverletzung
SCI-IDS	SCI-induced immune suppression syndrom
SD	Standardabweichung
SN	Sympathikus
SPM	spezialisierte pro-resolutive Mediatoren
TBI	traumatischer Hirnschaden
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
w	Woche(n)
WMD	white matter disease
ZNS	zentrales Nervensystem

# I Einleitung

## I.1 Zentrales Nervensystem

### I.1.1 Nervensystem

Das Nervensystem ist das wichtigste System zur Informationsübertragung und -auswertung in allen Wirbeltieren. Es ermöglicht dem Organismus sowohl die Kommunikation mit seiner Umwelt, als auch die Übermittlung von Zuständen bzw. Änderung von Zuständen innerhalb eines Individuums. Dabei wird zwischen dem peripheren Nervensystem (PNS) und dem zentralen Nervensystem (ZNS) unterschieden. Das PNS stellt primär die Verbindung zwischen dem ZNS und den peripheren Organen her: via *afferenten* Nervenbahnen leitet es Informationen bzw. Reize aus der Peripherie an das ZNS, via *efferenten* Nervensträngen werden die steuernden Signale des ZNS an die Endorgane übermittelt. Die direkt mit dem Gehirn verbundenen Nerven stellen die zwölf Hirnnerven dar. Die mit dem Rückenmark verbundenen Nerven sind die Spinalnerven. Sie sind jeweils die direkte Verbindung zwischen ZNS und PNS.

### I.1.11 Zentrales Nervensystem

Das ZNS, anatomisch grob unterteilt in Gehirn und Rückenmark, bildet das nervöse Steuerzentrum, das Signale aus Umwelt und Körper verarbeiten, Organfunktionen regulieren sowie alle höheren Geistesfunktionen leisten kann.

### I.1.111 Zellen des ZNS

Zu den ZNS-eigenen Zellen gehören neben den eigentlichen parenchymalen Zellen, den Neuronen, auch die Zellen der Glia und Mikroglia. Die Neuronen sind die spezialisierten Zellen, die der Erregungsleitung bzw. -bildung dienen. Bis auf bestimmte hippocampale Areale gilt das Neuron dabei als postmitotisch, d.h. zugrunde gegangene Zellen sind nicht durch gleichwertige Zellen zu ersetzen [1].

Das gliale Gewebe unterstützt und moduliert die Funktion der Neurone. Zu ihm gehören die Astrozyten, die an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind und für die Homöostase des ZNS mittels der Regulierung von Metaboliten, Nährstoffen, Transmittern u.a. Stoffen des Extrazellulärraums verantwortlich sind. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle in der Bildung der sog. glialen Narbe nach Schäden im ZNS. Die Oligodendrozyten sind im ZNS die elektrischen Isolatoren der Nervenzellen, indem sie deren Axone mit ihren Fortsätzen ummanteln und so die saltatorische Erregungsleitung

ermöglichen. Die Ependymalzellen sind die spezialisierten Zellen, die die Ventrikel auskleiden [2].

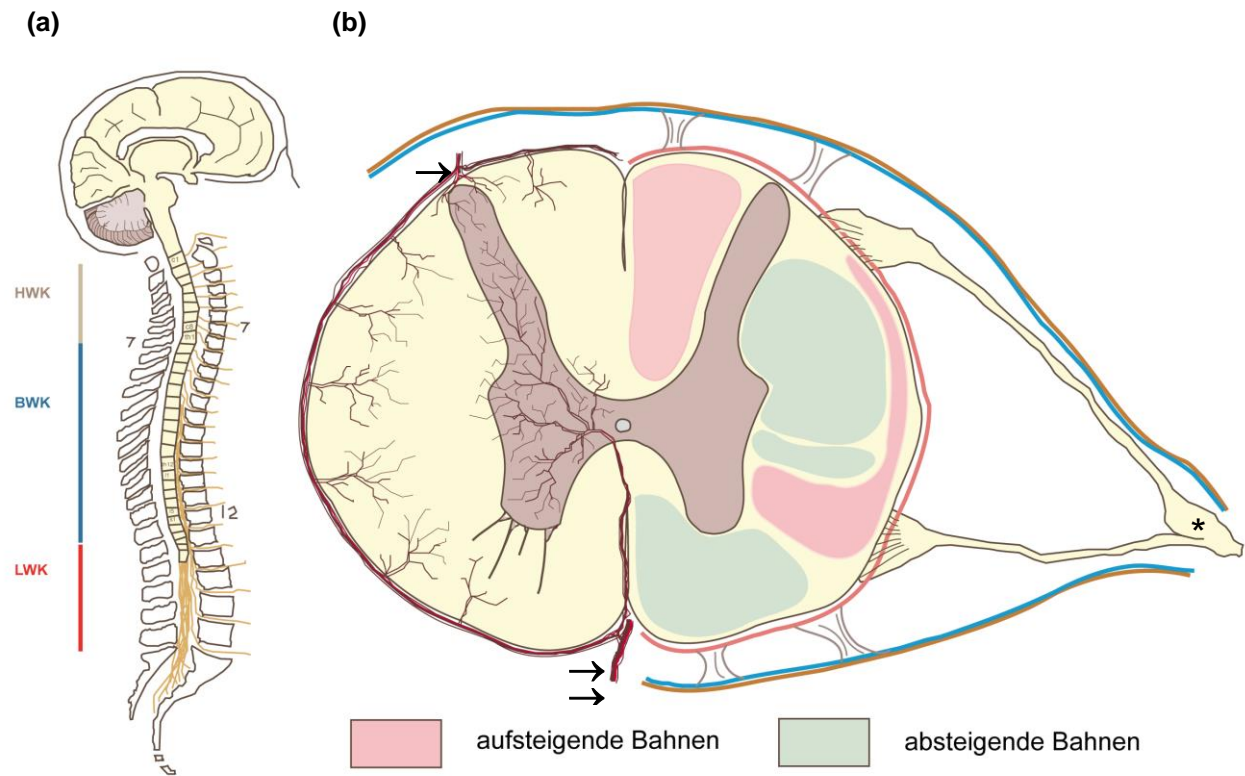
Die Mikroglia besteht aus Zellen, die dem Knochenmark entstammen. Sie sind die antigen-präsentierenden Zellen des ZNS und entsprechen damit den Monozyten/Makrophagen anderer Gewebe, gleichzeitig sind sie die einzigen residuellen Immunzellen des ZNS. Bei Trauma, Infektion oder anderen Pathologien des ZNS werden sie aktiviert [3].

### I.I.IV Rückenmark

Das Gehirn, dessen knöcherner Schutz die Schädelkalotte bildet, geht auf Höhe des *foramen magnum* über den Hirnstamm in das Rückenmark über, welches geschützt im *canalis vertebralis* der Wirbelsäule liegt. Diese besteht aus den einzelnen Wirbeln und den sie verbindenden Bändern, die segmental an den *foramina intervertebrales* Austritts- bzw. Eintrittspunkte für die Spinalnerven öffnen. Zwischen der knöchernen Hülle und den Nervenfasern liegen die *meninges*, die Hirn – und Rückenmarkshäute, bestehend aus *dura mater*, *arachnoidea* und *pia mater*. Im Subarachnoidalraum und im Zentralkanal des Rückenmarks, der eine Verjüngung des IV. Ventrikels des Gehirns darstellt, zirkuliert der *liquor cerebrospinalis*, welcher aus den *plexus choroidei* aller vier Ventrikel sezerniert wird.

Das Rückenmark füllt beim erwachsenen Menschen nicht den gesamten Wirbelkanal aus. Es endet im *conus medullaris* auf Höhe des 1. bis 2. Lendenwirbels. Seitlich nach vorn bzw. seitlich nach hinten gehen segmental paarweise in Form der *radix anterior* bzw. *radix posterior* Nervenstränge ab, die sich zum Spinalnerven vereinigen. Die paarigen Spinalnerven werden dementsprechend einem bestimmten Abschnitt zugeordnet, dem Rückenmarkssegment. Beim Menschen werden diese in acht zervikale (C1 - C8), zwölf thorakale (Th1 - 12), fünf lumbale (L1 - L5), fünf sakrale (S1 - S5) und ein bis drei kokzygeale (Co1 - Co3) Segmente unterteilt.

Im Querschnitt stellen sich im Rückenmark zwei schon makroskopisch voneinander abgrenzbare Strukturen dar: die schmetterlingsförmige graue und die sie umgebende weiße Substanz. In der weißen Substanz verlaufen gebündelt die an- und absteigenden Nervenfasern, welche entweder zum Gehirn oder von diesem in die Peripherie ziehen oder zum Eigenapparat des Rückenmarks gehören. Die Axone der Nerven sind hier von den lipidreichen Myelinscheiden umgeben, die auch die makroskopisch weiße Farbe der Substanz bedingen. Die graue Substanz ist vordergründig Sitz der Zellkörper der Nervenzellen, von denen die Axone ausgehen



**Abb. 1.1** schematische Übersicht der Wirbelsäule von lateral (a) und des Myelons in transversaler Schnittebene (b)

(a) Umhüllung des Rückenmarks durch die Wirbelkörper mit Einteilung der Wirbelsäule in ihre verschiedenen Abschnitten mit segmentaler Gliederung durch die Spinalnerven (b) linke Hälfte: die Vaskularisierung des Rückenmarks ist in der grauen Substanz deutlich dichter ausgeprägt als in der weißen und wird über die longitudinal verlaufenden Arterien gewährleistet (b) rechte Hälfte: Schema der Lokalisation der Bahnen im Rückenmark und Abgang einer Nervenwurzel

Legende: HWK - Halswirbelkörper, BWK - Brustwirbelkörper, LWK - Lendenwirbelkörper,  $\Rightarrow$  - A. spinalis anterior,  $\rightarrow$  - A. spinalis posterior, \* - Spinalnerv  
Abb. nach : s. Text

bzw. zu denen sie ziehen. Sie lässt sich weiter in das ventrale, stumpf abgerundete Vorderhorn, Sitz der Motoneurone, und das dorsale, schlankere Hinterhorn, in dem überwiegend die afferenten Leitungsbahnen eintreten, einteilen. Zwischen den beiden Hörnern liegt die *pars intermedia*, aus der vor allem im Bereich von C8 – L3 das Seitenhorn hervorgeht, das die Neurone des autonomen Nervensystems enthält.

Die arterielle Versorgung des Rückenmarks erfolgt über die segmentalen *aa. medullares segmentales*, die untereinander anastomosieren und so longitudinal drei Stämme ergeben: die unpaarige, ventral verlaufende *a. spinalis anterior* (ASA) und die paarigen dorsolateralen, weniger kaliberstarken *aa. spinales posteriores* (PSA). Oft sind zudem eine mediale dorsale Arterie sowie akzessorische weitere Längsstämme vorhanden [4, 5]. Dabei versorgt die ASA ca. 2/3 des Rückenmarks in einem zentrifugalen Arterienbaum [6], während die PSA zentripetal verlaufen [7]. Die Kapillaren der beiden Systeme anastomosieren [5]. Die Dichte der Vaskularisation ist dabei unterschiedlich zwischen der grauen und weißen Substanz: in der grauen Substanz bilden die Kapillaren ein sehr enges, dichtes Netz, das ein Abbild des

Schmetterlings ergibt, während in der weißen Substanz das Netz deutlich gröber ist [4]. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser Umstand vor allem mit der hohen Zahl an mitochondrienreichen Synapsen und dem höheren metabolischen Bedarf korreliert [8, 9]. Die venöse Drainage des Rückenmarks erfolgt weitestgehend analog der arteriellen Versorgung [10].

### I.1.v Blut-Hirn-Schranke und Blut-Rückenmark-Schranke

Die Austauschgrenze zwischen Gefäßsystem und ZNS bildet die sog. Blut-Hirn-Schranke (BHS), die deutliche Unterschiede in ihrem Aufbau verglichen mit der anderer Gewebe bzw. Organe aufweist. Gebildet wird sie von nicht-fenestriertem Endothel, den kapillaren Perizyten, der Basallamina und den Fortsätzen der Astrozyten. Ihre Aufgabe umfasst die Versorgung des ZNS mit Nährstoffen und Sauerstoff, den Abtransport von Stoffwechselprodukten sowie die Homöostase des nervalen Milieus, um die Sicherstellung der stetigen Funktion des ZNS zu gewähren. Da die BHS zudem eine wichtige und effektive Barriere für sowohl Pathogene, als auch körpereigene Antikörper und Leukozyten darstellt, wird das ZNS als immunprivilegiertes Organ bezeichnet [11], obschon neuere Erkenntnisse über eine Lymphdrainage des ZNS im Bereich der Meningen diese strikte Annahme aufweichen mögen [12].

Der allgemeine Aufbau der BHS gilt zwar für das ganze ZNS, für die Blut-Rückenmark-Schranke (BSCB) im speziellen wurden jedoch einige Eigenheiten beschrieben: so scheint diese sowohl für verschiedene Moleküle als auch Zytokine eine erhöhte Permeabilität verglichen mit der BHS zu besitzen [13, 14]. Für diese Zytokine konnte zudem ein Unterschied in der Permeabilität der BSCB entlang der Neuraxis festgestellt werden, mit einer erhöhten Permeabilität für das kaudale Rückenmark [14]. Abb. I.1 gibt einen Überblick über die Grundzüge der Anatomie des Rückenmarks.

## I.ii Immunsystem

Bei der Abwehr von pathogenen Organismen wird zwischen zwei Säulen unterschieden, die zwar getrennt funktionieren können, jedoch physiologisch eng miteinander im Austausch stehen.

### I.ii.i Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem gilt als das ältere, dessen Strukturen selbst bei einfachen Tieren zu finden sind und beim Menschen den von der Geburt an bestehenden Teil des Immunsystem bilden [15]. Hierzu gehören vor allem die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (PNM), Makrophagen, Mastzellen und



natürlichen Killerzellen (NK) auf zellulärer Ebene sowie die Komplementkaskade, Interleukine (IL) und direkt antimikrobielle Substanzen, die eine Aktivierung der Immunantwort zufolge haben. Die Aufgabe des angeborenen Immunsystems liegt dabei in einer raschen Antwort auf potentielle Pathogene via deren *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) über z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) und die nachfolgende Involvierung des erworbenen Immunsystems [16].

#### I.II.II Erworbenes Immunsystem

Das wichtigste Charakteristikum des erworbenen Immunsystems ist die antigen-spezifische Immunantwort via Rezeptoren auf B- und T-Zellen in zwei Schritten. Die Präsentation durch z.B. Makrophagen und Erkennung eines Antigens über einen antigen-spezifischen Rezeptor auf einer B- oder T-Zelle führt zu Aktivierung und Differenzierung dieser Zelle. Dies geschieht zumeist im lymphatischen Gewebe, das hierfür die nötigen Bedingungen herstellt: antigen-präsentierende Zellen transportieren Antigene in dieses spezielle Milieu und präsentieren diese den bis dahin naiven B- und T-Zellen. Im zweiten Schritt ist die B-Zelle nun als Plasmazelle zur Synthese und Ausschüttung spezifischer Antikörper befähigt, die Antigene markieren und deren Phagozytose beschleunigen sowie Moleküle direkt inaktivieren können. Die T-Zellen vermögen als CD4<sup>+</sup>-Helferzellen Makrophagen zu aktivieren, die Antikörper-vermittelte Immunantwort zu bestärken und zu modulieren und als CD8<sup>+</sup>-zytotoxische Zellen spezifisch andere Zellen in die Apoptose zu führen [17, 18].

#### I.II.III Organe des Immunsystems

Zur Bekämpfung von Pathogenen hat der menschliche Organismus verschiedene Methoden entwickelt. Haut und Schleimhäute verfügen über eine residente Flora von Mikroorganismen, die zur Homöostase beiträgt und bilden eine erste, quasi-mechanische Barriere gegenüber der Umwelt. Daneben bildet der pH-Wert des Magens einen ebensolchen Schutz, auch z.B. die Zilien des Bronchialsystems. Darüber hinaus jedoch besitzen bestimmte Organe in besonderer Weise Funktionen und Mechanismen, die der Funktion des Immunsystems dienen: das lymphatische System mit seinem eigenen Gefäßbaum und den Lymphknoten als lokale und überregionale Zwischenstationen, die Tonsillen, die Lymphfollikel des Darmes (GALT), das Knochenmark als Herkunftsort von Leukozyten und Makrophagen, der Thymus als Reifeort von T-Zellen und die Milz, in der sich Zellen des Immunsystems in großer Zahl befinden und bei Bedarf in den Organismus entlassen werden. Auch Organe wie die

Leber können über die Produktion von z.B. sog. akute-Phase-Proteinen und ILs in die Funktionsweise des Immunsystems eingreifen [18].

### I.II.IV Inflammation und Resolution

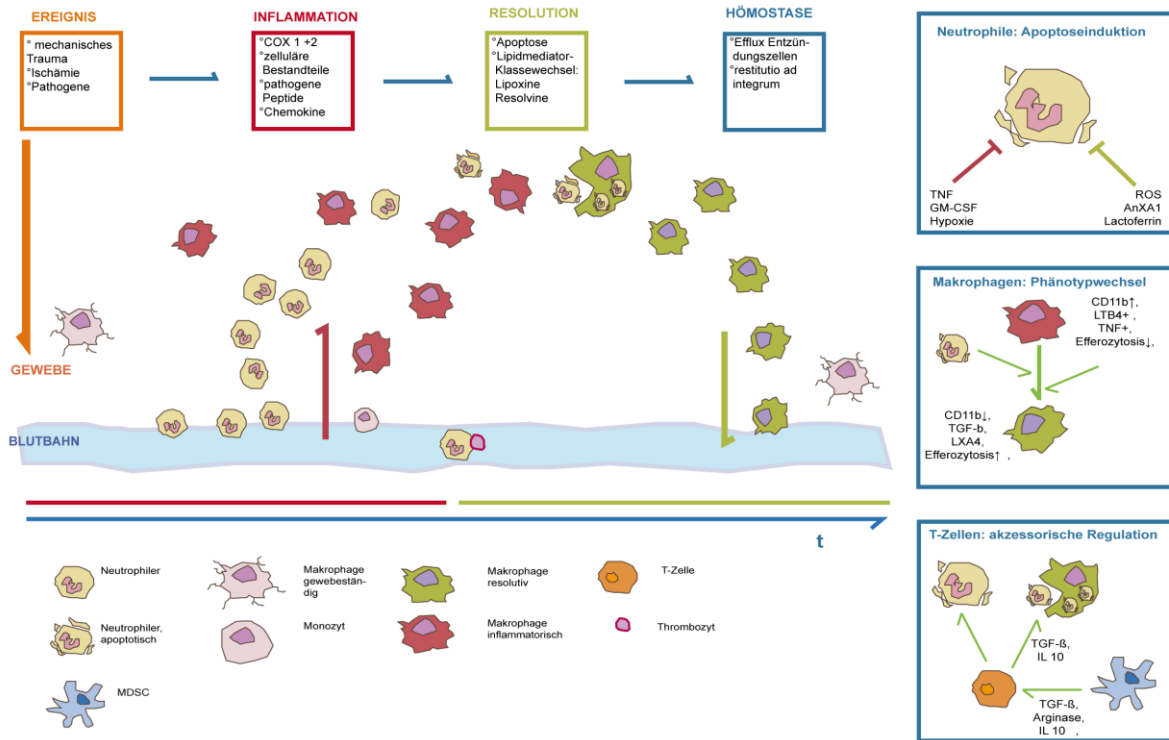
Die gesamte biologische Antwort auf einen schädigenden bzw. potentiell schädigenden Stimulus oder ein Pathogen wird als Inflammation zusammengefasst. Sowohl die Erkennung eines Mikroorganismus bzw. Bestandteile dessen als auch eine Reihe weiterer Auslöser wie der physikalisch provozierte Untergang einer Zelle und der nachfolgende Austritt von Zellmaterial, verschiedenste chemische Substanzen, sowie die Aktivierung von Immunzellen durch körpereigene Antigene sind in der Lage, einen Entzündungsreiz zu setzen [19].

Klinisch wird die akute Inflammation über die fünf Symptome *calor, rubor, dolor, tumor, functio laesa* erfasst, wobei die folgenden Mechanismen wichtige Merkmale darstellen: gewebständige Immunzellen, v.a. die residente Makrophagenpopulation, werden über einen Stimulus aktiviert und schütten Mediatoren aus, die die Permeabilität der Gefäße erhöht und damit Immunzellen der Blutbahn, v.a. PNMs, Eosinophile und Monozyten, in diese Region führt. Das inflammatorische Milieu stellt dabei ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Zellpopulationen und deren Chemokine dar. Zu Beginn des Entzündungsvorgangs erhalten pro-inflammatorische Mediatoren wie pathogene Peptide, Prostaglandine (PGs), Histamine, Cyclooxygenase (COX) 1 + 2 die Entzündung aufrecht. [20] Die Aufgabe der so rekrutierten Zellen besteht in der Beseitigung des initialen Stimulus, mit dem Ziel eine *restitutio ad integrum* des betroffenen Gewebes zu erreichen. Dafür stehen den verschiedenen Zelltypen bestimmte Mechanismen zur Verfügung. Makrophagen und Granulozyten, v.a. die PNMs, sind zur Phagozytose befähigt und produzieren antimikrobielle Peptide sowie Stickoxid (NO) und radikale Sauerstoffspezies (ROS), die Pathogenen aber auch dem betroffenen Gewebe direkt schaden können. Zu den Chemokinen, die von Makrophagen sezerniert werden, gehören auch Zytokine, die sowohl weitere Zellen des angeborenen Systems wie NK-Zellen als auch T-Zellen rekrutieren. Über eine Aktivierung von naiven T-Zellen via Antigenpräsentation und deren nachfolgende Ausreifung zu T-Effektor-Zellen wird so das adaptive Immunsystem involviert und damit die Immunantwort vervollständigt [18].

Während lange Zeit die Annahme galt, das Ende eines Entzündungsvorgangs resultiere aus den schwindenden pro-inflammatorischen Stimuli, wird dieses Ende inzwischen als eigener, aktiv orchestrierter Prozess verstanden. Die Resolution von Inflammation ist

dabei wie schon deren Beginn ein hochkoordiniertes Geschehen, das u.a. von der Produktion sog. pro-resolutiver Mediatoren wie Resolvine, Lipoxine und auch PGs initiiert wird [21].

Funktionell entscheidende Ereignisse für eine vollständige Resolution sind dabei der gezielte Abbau von Chemokinen, der den Influx von Entzündungszellen beendet und die Induktion der Apoptose von Neutrophilen [22]. Hierbei scheint der Zellpopulation der Makrophagen eine besondere Rolle zuzukommen: der zu Beginn der Inflammation vorherrschende sog. klassisch aktivierte Makrophage, auch M1-Typ genannt, der das pro-inflammatorische Milieu über Produktion von Stickoxid (NO), Interleukinen u.a. unterstützt, wechselt zum sog. alternativ-aktivierten Phänotyp des M2-Makrophagen. Diesem u.a. IL10, TGF- $\beta$  und Ornithin produzierendem M2-Typ werden inflammationsterminierende, pro-resolutive Eigenschaften zugeschrieben [23]. So exprimieren diese verstärkt Moleküle der Antigenprozessierung und -präsentation sowie Chemokine zur Rekrutierung von B- und T-Lymphozyten, welche selbst schützende Effekte in der post-resolutiven Phase auszuüben scheinen [24]. Zudem scheinen pro-resolutive Makrophagen effizienter untergegangene Granulozyten phagozytieren zu können und gleichzeitig weniger durch Liganden über den TLR4 stimulierbar zu sein. [25] Ungeklärt ist dabei, ob es sich hierbei um verschiedene Grundtypen einer Makrophagenpopulation handelt oder um distinkte Subtypen [26]. Für den Übergang von Inflammation zu Resolution spielt auch der Wechsel der dominierenden Lipidmediatoren, v.a. Derivate der Arachidonsäure, eine entscheidende Rolle. Die pro-inflammatorischen PG D2 und E2 werden von den resolutionsfördernden Lipoxinen und den Derivaten ungesättigter Fettsäuren, den Resolvinen, abgelöst, sog. spezialisierte pro-resolutive Mediatoren (SPM) [21]. Diese werden sowohl von der COX-2 als auch der Lipoxygenase (LO) gebildet. In Makrophagen der M1 bzw. M2 Polarisierung konnte dabei eine unterschiedliche Aktivierung der diese Mediatoren produzierenden Enzyme gezeigt werden [27]. Dabei stellen der M1 bzw. M2 Typ wohl jedoch eher maximale Ausprägungen einer Differenzierung innerhalb eines Spektrums dar [28]. Auch für eine Subgruppe von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und der Gruppe der myeloisch abgeleiteten Suppressorzellen (MDSC) wurden in verschiedenen Formen von inflammatorischen Krankheitsbildern regulierende, immunsupprimierende und pro-resolutive Eigenschaften beschrieben [29-34]. Für eine Subgruppe von T Helferzellen-Zellen selbst sind zudem Eigenschaften beschrieben worden, die zur Polarisierung von



**Abb. I.11 Synopsis der zellulären Aspekte von Inflammation und Resolution**

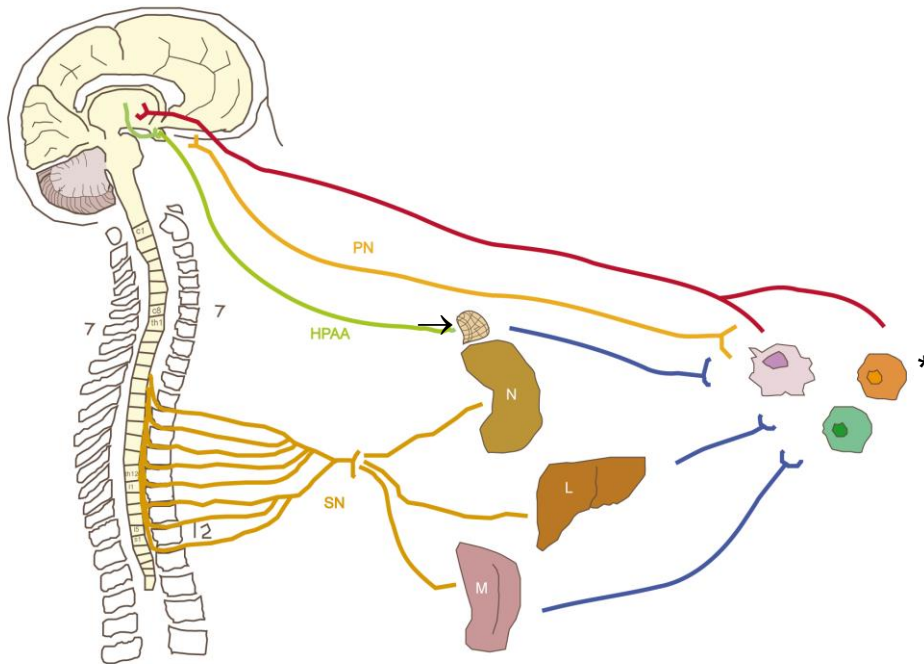
Ein initiales Ereignis führt zur Schädigung von Gewebe mit Freisetzung von Mediatoren oder intrazellulären Bestandteilen, die die Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut initiieren bzw. residente Zellen aktivieren. Die Aufgabe der inflammatorischen Antwort ist die Beseitigung untergegangenen Gewebes und evtl. des Auslösers sowie anschließend die Einleitung der resolutive Phase mit Selbstregulation der eigenen Aktivität und schlußendlichem Efflux. Deaktivierung oder Apoptose eingewanderter Zellen. Dabei ist die Interaktion der Zellen untereinander entscheidend für diesen Klassenwechsel v.a. von Makrophagen

Legende: TNF – Tumornekrosefaktor, GM-CSF – Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor, ROS – reaktive Sauerstoffradikale, TGF – Tumorstimulationsfaktor, LXA – Lipoxin A, LTB – Leukotrien B, IL – Interleukin, MDSC – myeloische abgeleitete Suppressorzelle  
 Abbildung nach: [20-22]

M2-Makrophagen in Mäusen [35] essentiell beitragen, gleichzeitig blockieren Lipoxine in humanen T-Zellen die Ausschüttung des pro-inflammatorischen Tumor-Nekrose-Faktors (TNF) [36]. Versagen die Mechanismen zur Resolution von Inflammation, können aktivierte Immunzellen im Gewebe verbleiben und somit zu einem Zustand chronischer Entzündung führen; Mögliche verbleibende Regenerationskapazitäten des betroffenen Gewebes werden überschritten, womit ein progredienter Untergang von Strukturen mit Verlusten von Funktion oder persistierende Schmerzen einhergehen können [21].

**I.111 Interaktion zwischen ZNS und Immunsystem**

Das ZNS und das Immunsystem stehen über verschiedene Wege in unmittelbarer Verbindung, sodass Kommunikation und Regulierung möglich sind. Fasern des Autonomen Nervensystem innervieren direkt Organe des Immunsystems, gleichzeitig exprimieren Immunzellen Rezeptoren für Neurotransmitter. Über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse wird die Ausschüttung der Glukortikoide



### **Abb. I.III Interaktion von ZNS und Immunsystem**

Das ZNS innerviert über Fasern des Sympathikus direkt immunologische Organe, die wiederum direkt oder indirekt Effekte auf Zellen des Immunsystems ausüben können. Diese Nerven entspringen dabei v.a. zwischen Th5 bis Th9. Auch für den Parasympathikus sind direkte Effekte auf Immunzellen beschrieben. Auch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse hat immunsupprimierende Kapazität. Zytokine und Mediatoren aus Immunzellen haben Auswirkungen auf Mikroglia und können ihrerseits im ZNS Pfade im Sinne eines negativen Feedbacks aktivieren

Legende: PN (orange) – Parasympathikus, HPAA (grün) - Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, SN (ocker) – Sympathikus, N – Niere mit → Nebenniere, L – Leber, M – Milz, \* - Zellen des Immunsystems: Makrophage (lila), T-Zelle (orange), B-Zelle (grün)  
Abb. nach: s. Text

gesteuert, die wiederum Effekte u.a. auf das Immunsystem haben. Demgegenüber setzen Immunzellen Zytokine frei, die von Neuronen des ZNS erkannt werden können.

#### **I.III.1 Autonomes Nervensystem und direkte Innervation von Organen**

Die Nervenbahnen des Sympathikus (SN) und des Parasympathikus (PN) bilden das Autonome Nervensystem. Sowohl Thymus und Knochenmark wie auch Milz, Lymphknoten und GALT werden von postganglionären sympathischen Fasern mittels des Transmitters Noradrenalin (NA) innerviert [37]. Die modulierenden Effekte des SN auf Zellen des Immunsystem sind vielfältig und komplex, wobei jedoch in der Gesamtbetrachtung die immunsupprimierende Wirkung zu überwiegen scheint [38, 39]. Direkte Effekte der acetylcholinergen (ACh) Neurone des PN auf das Immunsystem wie der anti-inflammatorische Pfad [40] sind umstritten, obschon die Aktivierung von ACh-Rezeptoren auf Makrophagen die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine vermindern kann [39]. Zusätzlich kann die Freisetzung von Il-1 aus Immunzellen zu einer Aktivierung afferenter Neurone des PN führen, sodass Informationen über Entzündungsgeschehen in der Peripherie direkt an das Gehirn übermittelt werden können [40].

### I.III.II Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse kann das ZNS systemische Wirkungen ausüben, da hierüber v.a. die Ausschüttung von Hormonen gesteuert wird; das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) des Hypothalamus führt in der Hypophyse zur Ausschüttung des Adrenocorticotropen-Hormons (ACTH), welches in der Nebenniere die Freisetzung von Glukokortikoiden bewirkt. Diese haben eine Vielzahl supprimierender Effekte auf Immunzellen, indem sie Proliferation, Differenzierung und Ausreifung unterdrücken [41]. Bei inflammatorischen Prozessen von Immunzellen abgegebenen Zytokine wie IL-1, Il-6 u.a. sind ihrerseits in der Lage, die HPA-Achse zu aktivieren [42].

### I.IV Trauma, Inflammation und Resolution im ZNS

#### I.IV.I Neuroinflammation

Verschiedene Pathomechanismen verursachen immunogene Prozesse im ZNS, die über ihre Charakteristika bestimmte Krankheiten definieren: traumatischer Hirnschaden (TBI), Rückenmarksverletzung (SCI), Schlaganfall, Enzephalitis, sowie die unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen verschiedener Genese wie Morbus Alzheimer (AD), Encephalomyelitis Disseminata (MS), Morbus Parkinson (PD) u.a. [43] Die Entzündungsvorgänge im ZNS, sog. Neuroinflammation, stellen dabei für das betroffene Gewebe eine besondere Herausforderung dar; zusätzlich zu dem möglichen Initialschaden und dem damit unmittelbar einhergehenden Untergang von Neuronen können die inflammatorischen Prozesse selbst weitere nachteilige Effekte auf das Parenchym und somit auf die neurologische Funktion ausüben [44]. Gleichzeitig sind diese jedoch notwendig, um Pathogene abzuwehren und Zellreste zu beseitigen. Zusätzlich scheint die Rekrutierung von Immunzellen aus der Blutbahn wie Monozyten [45] sogar begünstigende Auswirkungen zu haben. Das besondere Charakteristikum von Inflammation in Strukturen des Nervensystem ist durch die intrinsischen Eigenschaften von Entzündungsgeschehen einerseits und den Kapazitäten des Nervensystems andererseits begründet: inflammatorische Vorgänge schädigen immer auch zu einem bestimmten Grad gesundes Gewebe (s.o) und untergegangene Neurone des ZNS sind regelhaft nicht zu ersetzen, sodass diese intial nicht-geschädigten Zellen möglichst von den nachteilhaften Effekten der Inflammation bewahrt werden sollen, um eine weitere Verschlechterung neurologischer Funktionen zu verhindern [46, 47].

#### I.IV.II Inflammation nach traumatischer Hirnschädigung

Die Bezeichnung TBI umfasst eine heterogene Gruppe an Schäden des Hirnparenchyms bei verschiedenster Pathogenese, Schwere und auch klinischem Ergebnis. Die dadurch induzierten sterilen Inflammationsvorgänge scheinen für milde und schwere TBI ähnlich zu sein [48] und dabei sowohl reparative Funktionen auszuüben als auch nachteilige Effekte zu bewirken [47, 49]. Aus dem Blut eingewanderte Makrophagen, Neutrophile und T-Zellen sind hierbei wohl die wichtigsten Zellpopulationen, deren potentiell zellschädigende Eigenschaften wie z. B. die Freisetzung von ROS auch Ziel der Erforschung verschiedenster antioxidativer Therapien ist [50-52].

#### I.IV.III Inflammation nach Schlaganfall

Auch aus einer Ischämie des Hirnparenchyms, dem sog. Schlaganfall, resultiert eine Vielzahl von Prozessen, wie die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität, Depolarisation von Neuronen des perinfarzierten Gebietes, Apoptose und Inflammation [46] (s. Abb. I.IV). Diese verursachen ihrerseits einen nach dem Initialereignis mit Gewebeuntergang weiteren, folgenden Schaden, den Sekundärschaden. Er betrifft Zellen, deren Funktion und Haushalt zunächst nicht so betroffen sind, dass ihr Untergang unvermeidlich ist. Durch die o.g. Mechanismen im darauffolgenden Geschehen werden sie jedoch weiter so stark geschädigt, dass sie letztlich doch untergehen. Der Sekundärschaden beschreibt damit für das Gewebe nachteilige Prozesse, die potentiell aufgehalten werden können um damit neurologische Funktion zu bewahren [53].

#### I.IV.IV Inflammation bei Encephalomyelitis Disseminata

Die Multiple Sklerose (MS) beschreibt eine chronisch inflammatorische, demyelinisierende, heterogen verlaufende Erkrankung des ZNS, die heute am ehesten zu den Autoimmunerkrankungen gezählt werden muss, scheinen doch Myelin-spezifische CD4<sup>+</sup> sowie zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen maßgeblich an der Pathophysiologie beteiligt zu sein, die sich durch rekurrende fokale Störungen der BHS/BSCB mit lymphozytärer Infiltration und umschriebener Degradation von Myelinscheiden mit Verlust von Axonen und Formation von gliotischen Herden, sog. Plaques auszeichnet [54]. Neben den T- und auch B-Zellen wird der aktivierten Mikroglia sowohl in den Läsionen als auch perifokal eine kritische Rolle für die chronischen Aspekte der MS zugeschrieben [55]. Zwar zählt die MS klassischerweise

zu den Erkrankungen der weißen Substanz, doch gilt es inzwischen als anerkannt, dass die graue Substanz auf distinkte Weise ebenso Pathologien aufweist [55].

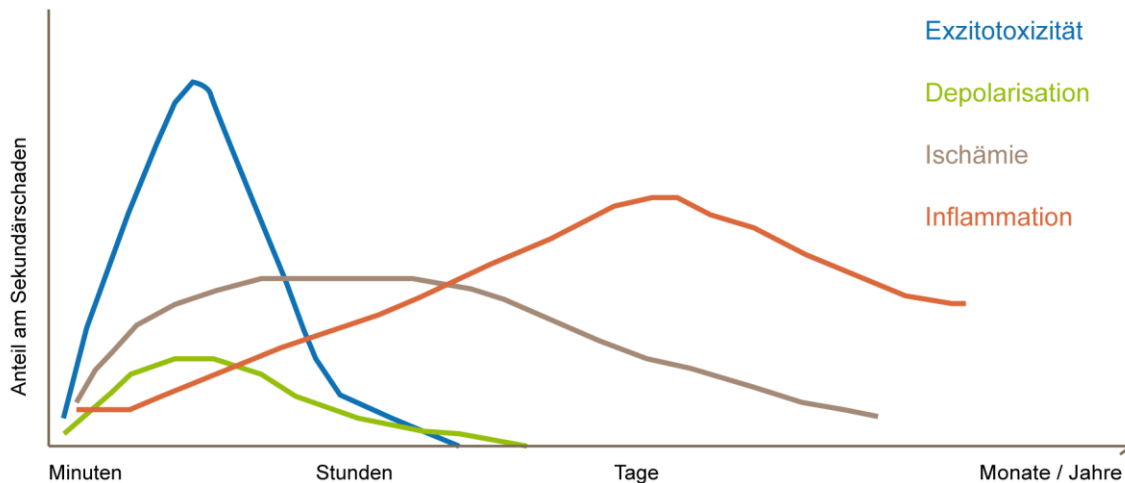
### I.IV.v Inflammation nach Rückenmarkverletzung

Unter dem Begriff SCI werden sämtliche Verletzungen des Rückenmarks zusammengefasst, die häufigste Ursache sind dabei akute Trauma, aber auch neurologische Erkrankungen, Infektionen oder Tumore [56]. Ähnlich wie bei der TBI und dem Schlaganfall werden auch nach SCI sekundäre Schadensprozesse initiiert, die direkt bzw. indirekt ihren Ursprung im Primärschaden haben und die zu weiterem Gewebeverlust führen (s.o.). Die resultierenden Entzündungsreaktionen stellen dabei ein besonderes Interesse der Forschung dar, da die inflammatorischen Vorgänge zu einem Zeitpunkt einsetzen, zu dem ein Eingriff in diese therapeutisch vielversprechend und klinisch möglich wäre (s. Abb I.IV), da Patienten mit akuter SCI oft initial komplexe medizinische Behandlungen im Rahmen der Traumaversorgung benötigen [57]. Zudem scheint das Rückenmark über ein höheres intrinsisches proinflammatorisches Potential verglichen mit den zentralnervösen Strukturen des Hirns zu verfügen [58-60], sodass das Wissen um die möglicherweise nachteiligen Aspekte von Inflammation in diesem Kompartiment zu besonders relevanten therapeutischen Interventionen führen könnte. Die Sekundärschadensprozesse sind dabei denen nach z.B. Schlaganfall ähnlich, weisen aber auch spezifische Charakteristika auf.

Im Gebiet des Primärschadens, häufig mechanischer Genese, sind vor allem nekrotischer Zelluntergang sowie Hämorrhagie vorzufinden. Konsekutiv bildet sich zumeist ein Hohlraum, ähnlich einer Zyste, der zunächst mit Zelldebris, einigen myelinisierten und unmyelinisierten Axonen und aktivierten bzw. immigrierenden inflammatorischen Zellen gefüllt ist und von Astrozyten begrenzt wird [61]. Der Zusammenbruch der BSCB ist ein nächster wichtiger Bestandteil des Sekundärschadens, ist er doch nicht auf die Läsionshöhe beschränkt [58, 62], erlaubt inflammatorischen Zellen wie neutrophilen Granulozyten und Makrophagen den Eintritt in das Gewebe und ist die Grundlage der Formation eines Ödems des Myelons. Zudem schütten aktivierte endotheliale und astrozytäre Zellen vasoaktive Faktoren aus, die die Perfusion des betroffenen Segments erhöhen und den Übertritt von aus dem Plasma stammenden Proteinen beschleunigen [58].

Die gleichzeitig stattfindende  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte, glutamatabhängige Exzitotoxizität durch eine dauerhafte Anhebung der extrazellulären Glutamatkonzentration auf neurotoxische Level ist aus der Schlaganfallforschung hinreichend bekannt und vermittelt weitere





#### **Abb. I.VI Sekundärschadensprozesse nach ZNS-Verletzungen**

Die Prozesse nach initialer Schädigung des ZNS haben verschiedene zeitliche Kinetiken sowie unterschiedlich großen Anteil am späteren sog. Sekundärschaden von zunächst nicht untergegangenen Gewebe. Vor allem Ischämie und die einsetzenden inflammatorischen Prozesse bieten dabei aufgrund ihrer prolongierten Kinetik größtes putatives Potential zur Verhinderung weiteren Schadens. Für die Inflammation wird dabei eine Chronifizierung angenommen, die die Resolution verhindert und weiter das neurologische Outcome verschlechtert.

Abb. nach: [46, 63]

Prozesse des Sekundärschades wie mitochondrialen Schaden mit Induktion von Apoptose oder die Bildung von ROS. Ein Überblick der Vorgänge einer inflammatorischen Antwort ist in I.II gezeichnet, die besondere Relevanz inflammatorischer Prozesse nach Verletzung des Rückenmarks soll hier skizziert werden: Die Fähigkeit einwandernder neutrophiler Granulozyten, Zelldebris zu phagozytieren, ist für die Wiederherstellung der Hömeostase essentiell, die dabei produzierten ROS können allerdings auch nicht betroffenem Gewebe schaden. Zudem scheinen Neutrophile entscheidend an einer weiteren Schädigung des Endothels mit daraus folgender Permeabilitätserhöhung und Hämorrhagie via Ausschüttung einer neutrophilen Elastase beteiligt zu sein [64].

Aktivierte Mikroglia sowie einwandernde Makrophagen stellen einen wesentlichen Aspekt der inflammatorischen Antwort des Rückenmarks dar. Auch für sie sind eine Vielzahl an Mediatoren und Zytokinen bekannt, die einen nachteiligen Effekt auf das umliegende neuronale und gliale Gewebe haben, zudem sind sie die wichtigsten phagozytierenden Zellen und verbleiben über weitaus längere Zeit im aktivierten Zustand an der Läsionstelle als in peripheren Geweben [65]. Ihre bekannten intrinsischen Eigenschaften, protektive und regenerative Mikromilieus für z.B. axonale Regeneration zu schaffen als auch ihre nachteiligen, entzündungserhaltenden Effekte scheinen stark von der exakten Komposition der inflammatorischen Umgebung

abzuhängen und von den daraus geprägten jeweiligen Subtypen von Makrophagen [66].

T-Zellen, die nach SCI in die Läsionsstelle migrieren, unterstützen als T-Helferzellen die Rekrutierung von Makrophagen und die Formation von B-Zellen, die Autoimmunantikörper gegen Proteine des ZNS bilden können [67]. Zudem sind autoimmune zytotoxische T-Zellen beschrieben, die Schäden in der weißen Substanz verursachen [68]. Gleichzeitig sind diese Zellen auch in der Lage, neuroprotektive Faktoren auszuschütten und Sekundärschaden mittels *protektiver Autoimmunität* zu verhindern [69, 70].

Astrozyten reagieren auf eine Schädigung des Rückenmarks mit Proliferation und Hypertrophie im Bereich der Läsion als sog. reaktive Astrozyten und sind maßgeblich an der Formierung der sog. *glialen Narbe* beteiligt. Diese stellt die prominenteste zytomolekulare Barriere für ein wiederaussprossendes Axon dar, deren inhibitorisches Milieu noch aus Fibroblasten, Perizyten und extrazelluläre Matrix aus z.B. Proteoglykanen wie Chondroitinsulfaten besteht [71]. Gleichzeitig wirkt diese Barriere als physikalischer Schutz vor einer weiteren Ausdehnung des Gewebeschadens. Die Astrozyten scheinen dabei, obschon sie diese Gliosis mitprägen, jedoch eher entzündungshemmende und neuroregenerative Mechanismen auszuüben [72].

Für das Rückenmark und das Hirn sind zudem weitere anatomische Eigenheiten bezüglich der Entwicklung von Schadensprozessen mit nachfolgendem Verlust von funktionalem Gewebe beschrieben worden: so scheinen sich weiße und graue Substanz in ihren zeitlichen Dynamiken stark zu unterscheiden, wobei der Untergang der Strukturen der grauen Substanz innerhalb von Stunden eintritt, jener der weißen Substanz morphologisch noch eine Woche nach initialem Schaden zu beobachten ist [73]. Die Schäden nach SCI sind darüber hinaus in der grauen Substanz mehrheitlich hämorrhagischer, die der weißen Substanz nicht-hämorrhagischer, degenerativer Genese bei ausgeprägter Ödembildung [74]. Darüber hinaus wird mit dem Begriff *white matter disease* (WMD) eine radiologisch diagnostizierbare Pathologie der weißen Substanz des ZNS bezeichnet, als deren Genese neben einer chronischen Schädigung kleiner Gefäße sowie Hypoperfusion [75-77] auch chronische inflammatorische Reize diskutiert werden [78]. Für das Krankheitsbild der MS (s. I.IV.iv) ist zudem eine weitere spezielle Pathologie, die sog. *normal appearing white matter* (NAWM) bekannt, die darüber charakterisiert ist, dass makroskopisch unauffällige, plaquefreie Areale mikroskopisch Zeichen einer axonalen Schwellung, niedrigschwelliger Inflammation und

Gliose ohne die MS definierenden eindeutigen Myelinschäden aufweisen [79, 80]. Zudem scheint die weiße Substanz bei den verschiedensten inflammatorischen Erkrankungen des ZNS häufiger und stärker betroffen zu sein als die graue Substanz [81].

#### I.IV.vi Wallersche Degeneration

Unter der Wallerschen Degeneration wird die Beobachtung beschrieben, dass der distal vom neuronalen Soma gelegene Anteil eines Axons, das geschädigt oder vollständig durchtrennt wurde, degeneriert. Während im PNS ein Wiedereinsprossen des proximalen Segments bei erhaltener Myelinscheide beobachtet werden kann, bleibt dieser Vorgang im ZNS von Vertebraten aus. Zudem erfolgt die Phagozytose von Myelindebris im ZNS langsamer und Oligodendrocyten eines betroffenen Segments vermindern ihre Aktivität [82].

#### I.IV.vii Immunsuppressionssyndrom nach Verletzungen des ZNS

Eine Verletzung des ZNS bewirkt eine Störung des fein modulierten Zusammenspiels zwischen ZNS und Immunsystem bis hin zum sog. *central nervous system injury-induced immune deficiency syndrom* (CIDS) [83], das eine erhöhte systemische Anfälligkeit des Organismus für Infektionen, wie Pneumonie oder Septikämie bedingt. Diese Beobachtung ist für verschiedene Entitäten wie TBI, Schlaganfall, und insbesondere auch SCI (SCI-induced-Immune Deficiency Syndrom) anerkannt. Beschrieben sind dabei Lymphopenie vor allem der T-Zellen mit z.B. Suppression der Interferon (IFN)  $\gamma$ -Produktion sowie die stressbedingte Freisetzung von CRH und der darauffolgenden vermehrten Bildung von immunsuppressorisch wirkenden Glukokortikoiden, zusätzlich eine Atrophie primärer und sekundärer lymphatischer Organe wie Thymus und Milz [84]. Für die SCI ist hierzu ein läsionabhängiger Mechanismus der Immunsuppression beschrieben worden [85], dessen pathophysiologische Grundlage die sympathische Innervation lymphatischer Organe sowie eine Erhöhung der systemischen Katecholaminkonzentration bei autonomer Dysreflexie darstellen könnte. Läsionen oberhalb Th3 unterbrechen demnach die Leitungsbahnen des SN, während nach Schädigungen auf Höhe Th9 diese nicht betroffen sind.

#### I.IV.viii Resolutionsdefizit im ZNS

Während die inflammatorischen Prozesse für verschiedene Erkrankungen des ZNS schon lange untersucht werden, ist über die Vorgänge von Resolution von Inflammation

in diesem Organsystem wenig bekannt. Für die AD sind erniedrigte Werte des pro-resolutiven Lipidmediators Lipoxin A4 in Liquor und Hippocampus beschrieben [86], in einer Pilotstudie mit MS-Patienten zeigten sich Hinweise auf verlangsamte resolute Prozesse bei Formen der hochaktiven MS [87]. Für ischämische Hirnläsionen sowie nach TBI sind zudem Jahre nach dem Erstereignis bei histopathologischen Untersuchungen lipid-beladene Makrophagen beschrieben, die ein andauerndes Entzündungsgeschehen verursachen können [88, 89]. Prüss et al. [90] präsentierten anhand eines Halbwertszeit-Modells Resolutionskinetiken für bestimmte Zellpopulationen nach experimenteller SCI (s. Abb I.V) und definierten das Resolutionsplateau als Marke einer chronischen Inflammation auf zellulärer Ebene.

#### I.IV.IX Interventionsansätze zur Modulation inflammatorischer Vorgänge des ZNS

Die vorteilhaften Effekte auf neuronale und gliale Strukturen der verschiedenen beteiligten Zellpopulationen zu stärken und gleichzeitig ihre nachteiligen Auswirkungen zu minimieren ist Basis für eventuelle therapeutische Interventionen, die in die inflammatorische Sekundärschadenskaskade eingreifen sollen. Eine stetig wachsende Zahl von Substanzen wird hierfür untersucht.

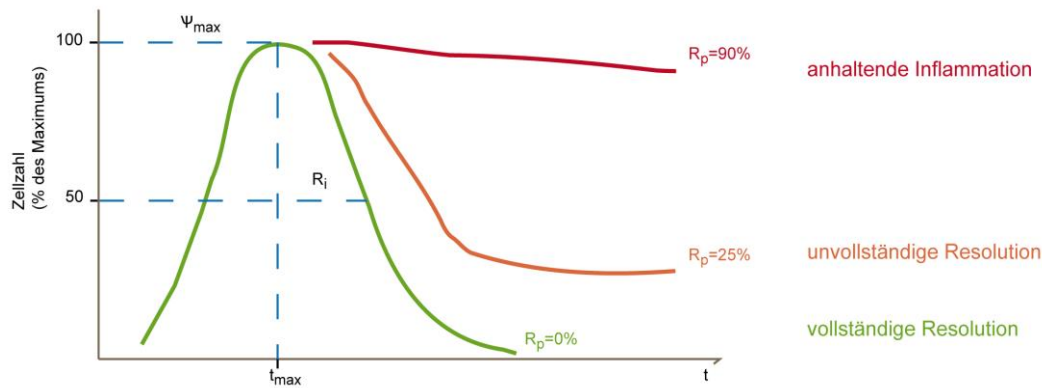
Für Minocyclin, einem Antibiotikum der Substanzklasse der Tetracykline, sind antiinflammatorische sowie direkt neuroprotektive Eigenschaften bei verschiedenen neuroinflammatorischen und –degenerativen Erkrankungen, Schlaganfall und SCI beschrieben, mit ersten vielversprechenden Ergebnissen auch aus klinischen Studien [91, 92].

Inhibitoren des RhoA/ROCK-Pfades, der axonale Regeneration blockiert und neuroprotektive Effekte unterdrücken kann, sind eine weitere Substanzklasse, die in verschiedensten experimentellen Modellen gute Ergebnisse zeigten. Ihre klinische Bedeutsamkeit ist jedoch Mangels Studien nicht geklärt [93].

Erythropoetin (EPO), ein vor allem erythropoese-regulierendes Hormon der Niere, wirkt im ZNS antiinflammatorisch und gefäßstabilisierend, bei einem deutlichen Nebenwirkungsspektrum. Klinische Studien sind auch hier nicht abgeschlossen [66].

Riluzol, ein Na<sup>+</sup>-Kanal Blocker mindert die Effekte von Exzitotoxizität und wirkt antiinflammatorisch und antiapoptotisch. Seine positiven Effekte wurden in ersten Pilotstudien beschrieben, u.a. bei amyotropher Lateralsklerose (ALS) und SCI.

Die Hemmung der COX als therapeutische Interventionsmöglichkeit bei TBI und SCI ist lange bekannt und in vielen experimentellen Studien beschrieben. Mit der Möglichkeit



#### **Abb. I.V** Resolutionsindex und Resolutionsplateau

Modell zur Beschreibung von Resolution bzw. unvollständiger Resolution anhand von quantitativen Analysen der beteiligten Zellpopulationen.  $\Psi_{max}$  beschreibt dabei das Maximum infiltrierender Zellen,  $t_{max}$  jenen Zeitpunkt, zu dem die Zellen ihr Maximum erreichen und  $R_i$  das Resolutionsintervall, welches dasjenige Zeitintervall beschreibt, an dem die Zellzahl auf 50% des Maximums gesunken ist. Das Resolutionsplateau  $R_p$  definiert eine Größe, die das Verweilen von Zellen im Gewebe auf unbestimmte Zeit angibt, unter Annahme einer ursprünglichen Abnahme entsprechend der Kinetik von Halbwertszeitmodellen.

Abb. nach:[90]

der selektiven COX-2 Hemmung wurde das Repertoire noch erweitert. Speziell Ibuprofen, dem eine RhoA- und COX-inhibitorische Wirkung zugeschrieben wird, gilt das besondere Interesse, hier gibt es erste Versuche des Transfers in die klinische Praxis [94]. Die langfristige Blockade der COX ist dabei unter Umständen differenziert zu betrachten, da sie im akuten Geschehen zwar als pro-inflammatorisches Enzym gilt, jedoch physiologisch den Mediatorwechsel zu einer Produktion resolutiver Substanzen vermag. Aspirin hat dabei als einziger bekannter COX-Inhibitor die Eigenschaft, die COX-2 aktiv selektiv auf diesen biochemischen Pfad zu lenken [95, 96].

Ein großes Feld umfasst und hohen Stellenwert in der Forschung hat die Zytotherapie, deren gemeinsame Idee die Transplantation verschiedenster, teils modulierter Zelllinien in das verletzte Gewebe ist. Gliale und mesenchymale Zellen, Stammzellen, Schwannzellen und andere periphere Immunzellen haben im experimentellen Umfeld bisweilen aufsehenerregende Resultate erzielt, deren Effekt sich bislang nicht ausreichend in klinischen Studien reproduzieren ließen [66, 97].

Resolutionsagonisten wie die spezialisierten pro-resolutiven Mediatoren (SPM) sind in verschiedenen Modellen der Inflammation vielfach untersucht und ihr Potential experimentell beschrieben [98]. Erste klinische Studien bei z.B. *keratokojunctivitis sicca*, und Gingivitis werden durchgeführt [99]. Auch im ZNS ist eine Vielzahl von experimentellen Studien bei vor allem neurodegenerativen Erkrankungen und Schlaganfall bekannt [100]. Nach SCI sind bislang keine derartigen Untersuchungen

auffindbar. Auch klinische Studien für Resolutionsagonisten bei Erkrankungen des ZNS sind dem Autor bis dato nicht bekannt.

## **I.v Experimentell induzierte Inflammations- und Schadensmodelle im Rückenmark**

### **I.v.i Traumatische Verletzungsmodelle**

Da in der Klinik die Inzidenz der traumatischen SCI am höchsten ist, ist das Ziel der meisten experimentellen Untersuchungen von Schadensprozessen im Rückenmark, ein diesen Umstand reflektierendes Schadensmodell zu verwenden. Dabei werden verschiedene Mechanismen angewandt. Bei der Transsektion wird das Myelon nach Laminektomie scharf bis zu einem bestimmten Grad durchtrennt, bei der Kontusionsverletzung wird ein Gewicht aus definierter Höhe in Abhängigkeit des zu erreichenden Schweregrades der Verletzung auf das ebenfalls freipräparierte Rückenmark fallen gelassen. Distaktionsmodelle versuchen die Spannungskräfte bei SCI zu simulieren, indem sie das Myelon kontrolliert strecken und Dislokationsmodelle versuchen, die häufig im klinischen Alltag zu beobachtende Dislokation eines Wirbelkörpers als Trauma für das Rückenmark zu erzeugen [101]. Die hierbei verursachten Schäden am Myelon sind oft ausgeprägt und lassen nur die Lokalisation entlang der Neuraxis zu.

### **I.v.ii Ischämie und Reperfusion**

Hierbei wird eine aortale Klemme für einen definierten Zeitraum eingebracht, die Verletzung ist dabei atraumatisch, da hypoxisch-ischämischer Genese, die initiale Verletzung aber schwer reproduzierbar und betrifft das ganze Segment [66].

### **I.v.iii Experimentelle Autoimmunenzephalitis**

Die Experimentelle Autoimmunenzephalitis (EAE) ist das klassische Modell der MS, deren Grundprinzip die Impfung der Tiere mit ZNS-Gewebe oder Myelinstrukturen ist. Aufgrund des Grundprinzips der Erkrankung ist eine Vorhersage, welche Strukturen des ZNS betroffen sein werden, nicht möglich, das Rückenmark aber regelhaft betroffen [102].

### **I.v.iv Lipopolysaccharide und Zymosan A**

Lipopolysaccharide (LPS) sind essentieller Bestandteil der Wand gramnegativer Bakterien und lösen direkt als Antigen via TLR eine Immunantwort v.a. durch

Monozyten/Makrophagen aus [18]. Sie sind vielfach genutzt als Modell zur Untersuchung von Inflammation, sowohl in der Peripherie als auch im ZNS.

Zymosan, ein Homoglykan aus der Zellwand von Hefezellen, ist ein ebenso weitverbreiteter Induktor steriler Entzündungen *in vivo* und *in vitro*, dessen inflammatorische Wirkung ebenso über einen TLR hauptsächlich via Monozyten/Makrophagen vermittelt wird, die dieses Partikel zusammen mit Neutrophilen auch phagozytieren [103]. Popovich et al. [104] präsentierten eine experimentelle Reihe, in der Zymosan gezielt stereotaktisch an bestimmte Lokalisationen in das Rückenmark von Ratten injiziert wurde und schlugen dieses "inflammatorische Skalpell" als Methode zur präzisen Axotomie vor. Über das totale Injektionsvolumen sowie die Konzentration konnte die Läsionsgröße dabei präzise variiert werden, ein Vorteil gegenüber anderen Schadensmodellen im Rückenmark.

#### **I.vi Ziel der Arbeit**

Der initiale Untergang von Gewebe des Rückenmarks nach Schädigung, vor allem bei traumatischer SCI, der sog. Primärschaden, ist heute therapeutischen Maßnahmen kaum zugänglich, da diese SCI-Patienten ähnlich wie TBI-Patienten oftmals zunächst grundlegender medizinischer, lebenserhaltender Maßnahmen bedürfen. Die durch den initialen Schaden ausgelösten Schadenskaskaden, die den sog. Sekundärschaden vermitteln, stehen daher am stärksten im Fokus wissenschaftlicher Forschung, mit dem Ziel, noch vitales Myelon zu erhalten und damit das neurologische Defizit zu minimieren. Der Sekundärschaden durch Inflammation ist dabei von besonderem Interesse, da diese Prozesse relativ spät (Tage nach dem Erstereignis) einzusetzen beginnen und lange Zeit (mindestens Wochen bis Monate) andauern. Für das Rückenmark ist dabei ein inflammatorisches Plateau, das sog. Resolutionsdefizit, beschrieben worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, basierend auf der Hypothese des Resolutionsdefizits des Rückenmarks, dieses Defizit bezogen auf intrinsische anatomisch-physiologische Eigenschaften dieses Gewebes sowie hypothetischer systemischer Auswirkungen im Sinne eines SCI-IDS weiter zu charakterisieren. In einem Versuchsmodell der Ratte, das eine präzise, umschriebene, sterile Induktion von Entzündung zulässt, soll geprüft werden, inwieweit das Resolutionsdefizit im Rückenmark abhängig ist von

(i) den unterschiedlichen Vaskularisierungsverhältnissen, unterschieden anhand der Inflammationskinetiken der wichtigsten Zellpopulationen bei Läsionen jeweils der grauen und weißen Substanz, sowie

(ii) den unterschiedlichen Eigenschaften der BSCB und möglicher Unterbrechungen sympathischer Bahnen mit Auswirkungen auf die Komponenten des Immunsystems, unterschieden anhand der Inflammationskinetiken der wichtigsten Zellpopulationen bei jeweils Läsionen auf Höhe Th3 und Th9.



## II Material und Methodik

### II.1 Tierexperimentelle Operationen

#### II.1.1 Allgemeine Handhabung der Tiere

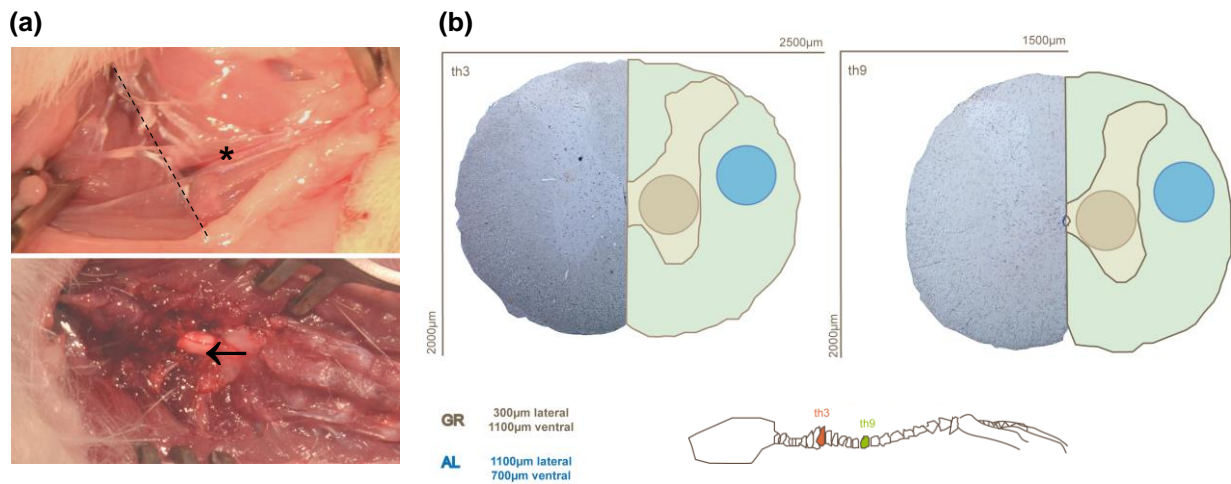
Erwachsene (9 Wochen alt; 250-300g), männliche Lewis Ratten (Charles River; Sulzfeld, Deutschland) wurden in Käfigen mit Zugang zu Nahrung und Wasser *ad libitum* bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h:12h in dem Tierstall der experimentellen Neurologie der Klinik für Neurologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin gehalten. Vor dem Einschluss in die Experimente wurde den Tieren eine Eingewöhnungszeit von zwei Wochen gewährt.

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte intraperitoneal (i.p.) mit 0,004ml/g Körpergewicht Ketamin (Pfizer; Berlin, Deutschland) und 0,00025ml/g Körpergewicht Xylazin (Bayer; Leverkusen, Deutschland). Zur Prävention einer *konjunctivitis sicca* durch den während der Narkose aufgehobenen Lidreflex wurde Retinolpalmitat (CibaVisions; Großostheim, Deutschland) auf die Augen aufgetragen. Perioperativ erfolgte eine kontinuierliche visuelle Überwachung der Atmung durch den Assistenten. Für die Aufwachphase nach der Operation wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte (Peco Services Ltd; Cumbria, England) zur Vermeidung einer Hypothermie gelegt, bis das vollständige Abklingen der Anästhesie gesichert war. Die postoperative Versorgung beinhaltete die Schmerzmedikation subcutan (s.c.) mit 0,000026mg/g Körpergewicht des Opioids Buprenorphin (Reckitt Benckiser Healthcare; Berkshire, England) alle 12h bis maximal zum dritten postoperativen Tag. Bis zu diesem wurde den Tieren zudem die Nahrung in aufgeweichter Form auf dem Käfigboden angeboten. Dreimal täglich wurde darüber hinaus die Blase kontrolliert und, sofern nötig, manuell entleert bis die spontane Miktion wieder einsetzte. Zur Erfassung des allgemeinen Gesundheitsstatus der Tiere wurden das Gewicht und die rektale Temperatur der Tiere erfasst, bis fünf Tage nach der Operation täglich, an Tag 10 sowie danach wöchentlich. Alle Versuche und Handhabungen an den Tieren fanden in Übereinstimmung und Absprache mit dem Landesamt für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin nach § 8 Tierschutzgesetz unter der Genehmigungsnummer für Tierversuchsvorhaben G0287/12 vom 17.10.2012 statt.

## II.1.ii Laminektomie und Injektion

Nach der Sicherung einer ausreichenden Narkosetiefe mittels Überprüfung von Schmerzreizreaktionen an Hinterlauf und Ohr wurde zunächst das Fell am Rücken über dem Operationsgebiet rasiert und die Haut desinfiziert (Bode Chemie GmbH; Hamburg, Deutschland). Ein longitudinaler Hautschnitt über 3-4 cm ermöglichte die Orientierung an einer prominenten Vene [105] bei Th4/5 (Abb. II.i) und damit die Festlegung der anatomischen Höhe entlang der Neuraxis. Darauffolgend wurde die Muskulatur an den Wirbelkörpern Th3/4 bzw. Th9/10 möglichst atraumatisch präpariert und gelöst. Mikrochirurgisch erfolgte nun ausgehend vom interlaminären Fenster eine Laminektomie über eine Höhe. Die hier jetzt freiliegende Dura wurde über eine Strecke von ca. 1mm geschlitzt.

Anschließend erfolgte die Fixierung der Tiere an Wirbelkörpern kaudal und kranial der Laminektomiestelle in einem Stereotaktor (Stoelting; Illinois, USA). Filamentierte, in 100%iger Ethanollösung für 5min desinfizierte Glaspipetten (Science Products; Hofheim, Deutschland) wurden mit einem Pipettenziehgerät (Sutter; Kalifornien, USA) auf einen Öffnungsdurchmesser von 70-100µm gezogen. Hierüber wurden 6,5mg/ml Zymosan gewonnen aus *saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland), in 0,9% steriler Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (Braun; Melsungen, Deutschland) in das Rückenmark der Tiere appliziert. Um eine vollständige Lösung des Zymosan zu gewährleisten, wurde die Lösung für die Operationsstage jeweils frisch angesetzt und in einem Ultraschallbad (Bandelin; Berlin, Deutschland) bis zur Injektion zwischengelagert. Sham-Tiere erhielten hier lediglich eine Injektion mit 0,9% steriler NaCl-Lösung. Das Zielvolumen betrug 150nl, injiziert durch einen Mikroinjektor (TSE; Bad Homburg, Deutschland). Die Navigation der Pipette in entweder graue oder weiße Substanz erfolgte ausgehend von der dorsalen Mittellinienarterie nach festgelegten Koordinaten: 300µm lateral und 1100µm ventral zur Injektion in die graue Substanz sowie 1100µm lateral und 700µm ventral zur Injektion in die weiße Substanz [59, 104] (Abb. II.i). Der Stereotaktor ermöglichte dabei die Justierung auf 100 µm genau. Nach der Applikation schloss sich eine Verweildauer der Pipette im Gewebe für 5 Minuten an, bevor jeweils der schichtweise Wundverschluss von Muskeln und Haut mit resorbierbaren, antibakteriellen Fäden, Vicryl 5-0, (Johnson & Johnson Medical; Norderstedt, Deutschland) erfolgte. Die Gesamtdauer des Eingriffs, von Beginn der Anästhesie bis zur letzten Naht betrug zwischen 30 bis 35 Minuten. Abb. II.ii gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau.



**Abb. II.1 Anatomische Landmarken (a) sowie Schema der Koordinaten zur Injektion von Zymosan (b)**

(a) oben: Präparation der prominenten Vene auf Höhe Th 4/5, die longitudinale Achse der Wirbelsäule ist mit markiert (a) unten: Laminektomie und Darstellung der dorsalen Mittellinienarterie über dem Myelon (b) schematische Darstellung von Koordinaten zur Injektion in weiße und graue Substanz sowie histologischem Korrelat (Hämalaun-Färbung, beachte den Volumenverlust von ca. 15% durch Deydratation) auf Höhe Th3 und Th9

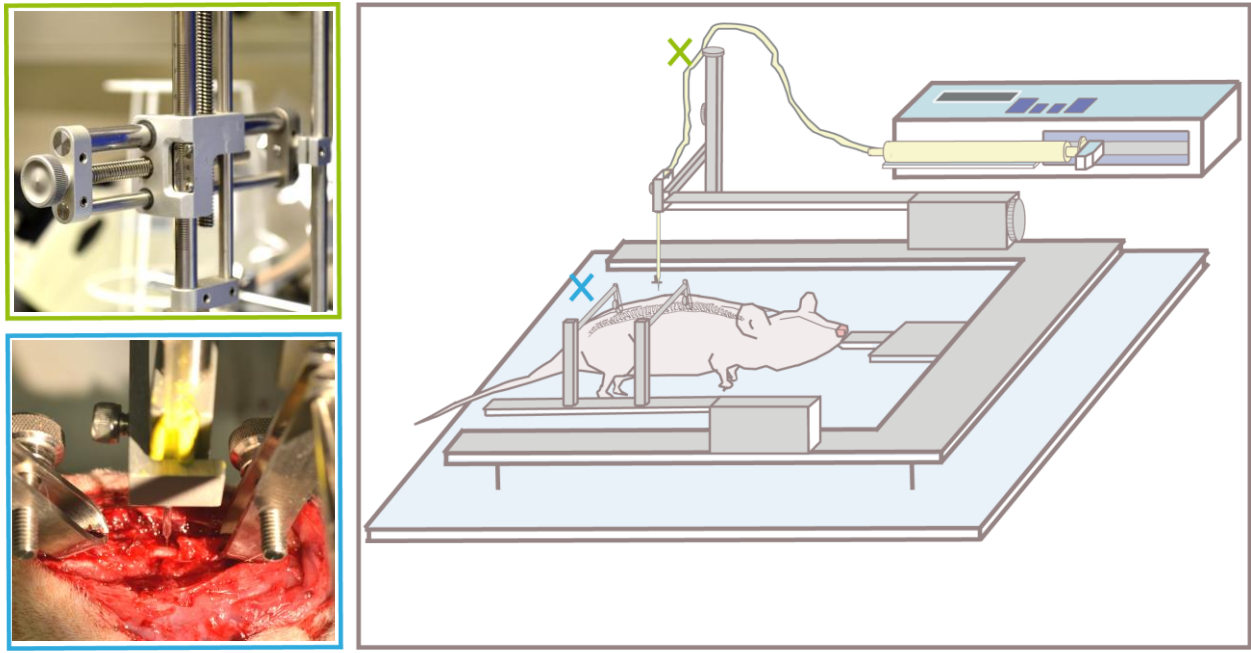
Legende: \* - Vene      ----- Wirbelsäule      ← Myelon und Mittellinienarterie      GR: graue Substanz      AL: weiße Substanz

### II.1.III Gruppen

Um den zeitlichen Verlauf von Inflammation und Resolution genau zu charakterisieren, wurden die auf Höhe Th9 injizierten Tiere an acht Zeitpunkten getötet: beginnend vom akuten Geschehen, 24h post-Injektion bis zum chronischen Stadium 12w post-Injektion. Auf Basis dieser Daten wurden die auf Höhe Th3 injizierten Tiere an prominenten Zeitpunkten getötet: 24h, 7d, 14d, 12w. Die Injektion erfolgte entweder in die weiße oder graue Substanz, wobei für jeden Zeitpunkt und Gruppe n=6 betrug. Die anspruchsvolle Methodik und die strengen Analysekriterien machten jedoch Revisionsexperimente nötig, sodass die endgültig eingeschlossene Zahl der Experimente für die verschiedenen Zeitpunkte und Ziellokalisierungen schwankt (s. III-Ergebnisse). Zusätzlich wurde zu allen Zeitpunkten je n=2 Sham-Tiere auf Höhe Th9 operiert, wobei jeweils eine Injektion in graue bzw. weiße Substanz erfolgte. Fünf Tiere verstarben während der Anästhesie vor dem operativen Eingriff. Insgesamt wurden 215 Tiere operiert. Tab. II.1 gibt eine detaillierte Übersicht über die Gruppen und Zeitpunkte.

### II.1.IV Tötung der Tiere und Gewebepreparation

An den definierten Zeitpunkten wurden die Tiere wie oben beschrieben narkotisiert und anschließend kardial erst mit 100ml auf 4°C gekühlter Phosphatpuffersalzlösung (PBS), dann mit 150ml bei 4°C gekühlter 4%iger Paraformaldehyd (PFA) - Lösung perfundiert. Dazu wurde der Thorax vollständig von ventral eröffnet und die Kanüle im linken Ventrikel am Übergang zu Aorta platziert. Darauf folgte die Präparation des ehemaligen



**Abb. II.11** Übersicht zum operativen Versuchsaufbau

Nach Laminektomie und Eröffnung der Dura wurden die Tiere kranial und kaudal an den Dornfortsätzen der Wirbelkörper und am Kiefer in einem Stereotaktor fixiert, sodass eine Justierung der Pipette zur Injektion unter Ausschaltung der Atemexkursion möglich war. Die Justierung erfolgte manuell unter Sichtkontrolle, Landmarke war die Mittellinienarterie. Die Eindringtiefe ins Myelon erfolgte ebenfalls unter Sichtkontrolle, nachdem Kontakt der Pipettenspitze mit der Oberfläche des Rückenmarks festgestellt wurde. Mittels eines Mikroinjektors wurde die Zymosanlösung dann kalibriert appliziert und die Pipette zunächst für 5 Min im Gewebe belassen, bevor die Fixation entfernt und die Wunde verschlossen wurde.

Laminektomiegebiets mit Darstellung des freigelegten Rückenmarks. Da die Zymosaninjektion keine makroskopisch sichtbare Läsion an der Oberfläche des Rückenmarks erzeugt, wurde die Laminektomiestelle nach kaudal und kranial erweitert, sodass sie *en bloc* entnommen werden konnte. Kohlemarkierungen grenzten dann den Bereich der Läsion ein. Das so markierte Rückenmark wurde entnommen, für 24h in 4%iger Lösung PFA bei 4°C post-fixiert, anschließend in PBS überführt und hierin bei 4°C gelagert bis zur histologischen Aufarbeitung.

## II.11 Histologische Präparation

### II.11.1 Histologische Aufarbeitung

Die Einbettung in Paraffin erfolgte nach einem etablierten internen Protokoll: Die fixierten Gewebe wurden zur Entwässerung zunächst in Lösungen mit aufsteigenden Ethanolgehalt gebadet, dann in Chloroform/Ethanol-Mischungen und anschließend reinen Chloroform-Lösungen auf die Infiltration mit Paraffin vorbereitet und nach Abschluss dieser ausgegossen, für Details siehe Tab. II.11. Zur histologischen Färbung wurden die Gewebe mit einem Mikrotom (Thermo Fisher Scientific Inc.; Massachusetts, USA) seriell auf eine Dicke von 4µm geschnitten und auf Objektträger

Zeitpunkt	h24	h72	d5	d7	d14	w4	w8	w12
spinale Höhe								
Th9	n <sub>ai</sub> =12 n <sub>gr</sub> =12	n <sub>ai</sub> =10 n <sub>gr</sub> =10	n <sub>ai</sub> =8 n <sub>gr</sub> =9	n <sub>ai</sub> =9 n <sub>gr</sub> =10	n <sub>ai</sub> =9 n <sub>gr</sub> =9	n <sub>ai</sub> =6 n <sub>gr</sub> =7	n <sub>ai</sub> =6 n <sub>gr</sub> =6	n <sub>ai</sub> =8 n <sub>gr</sub> =9
Th3	n <sub>ai</sub> =6 n <sub>gr</sub> =6	-*	-*	n <sub>ai</sub> =6 n <sub>gr</sub> =7	n <sub>ai</sub> =6 n <sub>gr</sub> =6	-*	-*	n <sub>ai</sub> =8 n <sub>gr</sub> =9
Th9-Sham	n <sub>ai</sub> =1 n <sub>gr</sub> =1	n <sub>ai</sub> =1 n <sub>gr</sub> =1	n <sub>ai</sub> =1 n <sub>gr</sub> =1	n <sub>ai</sub> =1 n <sub>gr</sub> =1	n <sub>ai</sub> =1 n <sub>gr</sub> =1	n <sub>ai</sub> =1 n <sub>gr</sub> =1	n <sub>ai</sub> =1 n <sub>gr</sub> =1	n <sub>ai</sub> =1 n <sub>gr</sub> =1

**Tab. II.1 Überblick der durchgeführten operativen Experimente und Zuweisung zu den Zeitpunkten**

Für jeden Zeitpunkt sowie graue und weiße Substanz wurde je ein Tier einer Laminektomie und Injektion von steriler Kochsalzlösung auf Höhe Th9 unterzogen. Um die Kinetik genau zu charakterisieren, wurden zunächst auf Höhe Th9 für alle Zeitpunkte Tiere operiert, bei aufwendiger Methodik mit strengen Einschlusskriterien gruppenabhängig mit variierenden Zahlen. Basierend auf einer Zwischenauswertung der Th9-Experimente wurden dann auf Höhe Th3 Gruppen für die wichtigsten Zeitpunkte gebildet.

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion

n<sub>ai/gr</sub>: Anzahl in weißer / grauer Substanz

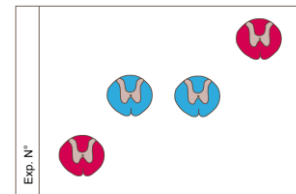
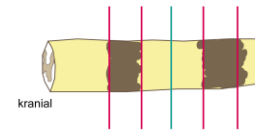
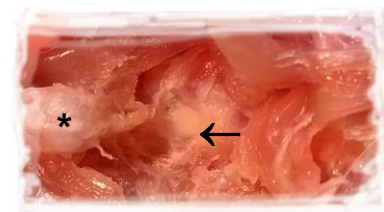
-\*: keine Versuche vorgesehen

(R.Langensbrinck; Emmendingen, Deutschland) gebracht. Dabei wurde der Läsionsbereich vollständig aufgearbeitet, um die induzierte Inflammationsreaktion in Gänze zu erfassen.

## II.II.11 Immunhistochemische Einzelfärbung

Für die immunhistochemische Analyse wurden die Schnitte zunächst in Roti-Histol (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert und für 30min in einem 600-Watt Dampfgarer (Braun; Schwalbach am Taunus, Deutschland) in 2.1g/L Citratpuffer, pH=6, gekocht. Die endogene Peroxidase wurde nach einem Abkühlen der Schnitte für 15min in PBS durch Gabe von 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *aqua destillata* geblockt. Um unspezifische Bindungen von Immunglobulinen zu verhindern, wurden die Schnitte mit 10% *normal-goat-serum* (NGS) (Biozol; Eching, Deutschland) und 0,1% Triton (Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland) in PBS vorbehandelt. Für die Markierung der zellspezifischen Antigene wurden die Primärantikörper in einer Verdünnungslösung von 1% NGS, 0,1% Triton und PBS appliziert und über Nacht bei 4°C gelagert. Die bei jeder Färbung angelegten Negativkontrollen erhielten in diesem Schritt lediglich die Verdünnungslösung ohne Primärantikörper. Zur Detektion neutrophiler Granulozyten wurde ein Myeloperoxidase (MPO)-Antikörper (AK) verwendet, die Markierung der Monozyten/Makrophagen-Population erfolgte mithilfe eines CD68-AK, als Marker aktivierter Lymphozyten diente ein CD43-AK, ein CD3-AK zur Bestimmung der T-Zellen, sowie ein AK gegen das Saure Gliafaserprotein (GFAP) für Astrozyten [90]. Nach Waschen der Schnitte in PBS erfolgte die Zugabe der Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur. Tab. II.III zeigt

Reagenz	Inkubationszeit	Temperatur
Ethanol 70%	4h	Raumtemperatur
Ethanol 80%	über Nacht	Raumtemperatur
Ethanol 96%	1h	Raumtemperatur
Ethanol 96%	1h	Raumtemperatur
Ethanol 100%	1h	Raumtemperatur
Ethanol 100%	1h	Raumtemperatur
Ethanol 100%	1h	Raumtemperatur
Ethanol 100% + Chloroform 2:1	30min	Raumtemperatur
Ethanol 100% + Chloroform 1:1	30min	Raumtemperatur
Ethanol 100% + Chloroform 1:2	30min	Raumtemperatur
Chloroform	1h	Raumtemperatur
Chloroform	40min	Raumtemperatur
Chloroform	20min	Raumtemperatur
flüssiges Paraffin	1h	58-60°C
flüssiges Paraffin	über Nacht	58-60°C



**Tab. II.II und Abb. II. III Protokoll zur Einbettung Gewebes in Paraffin und Einbettungsschema**

(Tab.) Die Einbettung in Paraffin erfordert zunächst eine Entwässerung, um dann die optimale Invasion des Paraffins zu ermöglichen. Dabei wurde für den letzten Inkubationsschritt mindestens 18h gewährt.

(Abb.) Nach der Fixation des Gewebes wurde die Laminektomiestelle präpariert (oben), die zu den späten Zeitpunkten narbig zugewachsen war. Die angrenzenden Laminae wurden zusätzlich entfernt, um das betroffene Segment vollständig darzustellen und mit Kohle zu markieren (mitte). Nach der Paraffinisierung wurde das Segment dann in Transversalblöcke geteilt und nach festem Schema eingebettet (unten, Aufsicht auf Paraffinblock)

Legende: \* : Dornfortsatz des angrenzenden Wirbelkörpers ← : Myelon

alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie die eingesetzte Verdünnung, eine Übersicht der für die jeweiligen Zeitpunkte gefärbten Populationen gibt Tab. II.IV. Die gebundenen Antikörper-Komplexe wurden visualisiert mittels eines peroxidase-konjugierten Streptavidin-Biotin-Komplexes (Vector Laboratories; Burlingame, Kalifornien, USA), als Substrat wurde Diaminobenzidin (DAB) (Vector Laboratories; Burlingame, Kalifornien, USA) verwendet. Die Gegenfärbung der Schnitte zur allgemeinen Färbung von Zellkernen fand durch Zugabe von Hämalaun nach Mayer (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland) statt. Zuletzt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkohollösung entwässert, in Roti-Histol gebracht und mittels Vitro-Clud (R. Langenbrinck; Emmendingen, Deutschland) eingedeckelt.

**II.III Etablierung der Versuchsreihe**

Die Etablierungsphase umfasste die Standardisierung der Methodik der Injektion von Zymosan A in das Rückenmark und soll an dieser Stelle umrissen werden. Die einzelnen Zwischenergebnisse aus diesem Prozess wurden nicht in die Endauswertung eingearbeitet, sondern dienten lediglich der Versuchsvorbereitung.

Bereits in der Arbeitsgruppe etabliert war die Laminektomie auf Höhe Th3 bzw. Th9 am Versuchstier Ratte. Festzulegen waren (i) die exakten Koordinaten für die weiße bzw.

graue Substanz, (ii) das Volumen der Injektion, sowie (iii) der Öffnungsdurchmesser der Glaspipetten. Nach der Tötung der Tiere mussten zudem (iv) die Explantation des Rückenmarks und (v) die histologische Aufarbeitung an das experimentelle Design angepasst werden.

#### II.III.1 Induktion einer atraumatischen Läsion im Rückenmark

Da die intrinsische Kapazität zur Auflösung eines induzierten Entzündungsprozesses erfasst werden sollte, sollte die Läsionsinduktion möglichst atraumatisch sein. Popovich et al. [104] beschrieben eine Methodik der intraspinalen Zymosaninjektion, bei der sie weder einen direkten Schaden am Gewebe durch die eingebrachte Glaspipette noch durch die Injektion selbst feststellen konnten. Auch Blutungen stellten sie in keinem relevanten Ausmaß fest und gingen entsprechend von einer Aktivierung von Immunzellen bei erhaltener BSCB aus. Ausgehend davon wurden auch für die vorliegende Arbeit zunächst Pipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von 30-50 µm verwendet. Dabei traten jedoch gehäuft Blutungen intraspinal auf, die, obschon sie zu keinen motorischen Funktionsverlusten bei den Tieren führten, makroskopisch in der histologischen Aufarbeitung sichtbar waren. Andererseits wiesen andere Tiere keinerlei Anzeichen einer induzierten Entzündungsläsion auf, d.h. keine aktivierten Makrophagen oder andere Immunzellen. Gleichzeitig verursachte die Glaspipette als penetrierendes Objekt offensichtlich keinen bzw. minimalen direkten Gewebeschaden. Daraus resultierte die Hypothese, dass bei gegebener Leistungsfähigkeit des Mikroinjektors der Öffnungsdurchmesser der Pipette bisweilen nicht zuverlässig ausreichte, um gegen den intraspinalen Gewebedruck eine konstante Applikation zu gewährleisten. Die Blutungen waren demnach eine Ursache der hohen Drücke, die sich in einer Glaskapillare durch einen etwaigen Aufstau bildeten und dann zu einer plötzlichen Injektion des gesamten Zielvolumens mit einhergehenden möglichen direkten Schäden im Gewebe wie z.B. auch Verletzung einer Vene führen könnten. Dafür sprach auch die hohe Quote von Experimenten ohne induzierte Läsion. Da die Glaskapillare augenscheinlich bei einem Durchmesser von 50 µm keine direkten Gewebeschaden bedingte, wurde der Öffnungsdurchmesser auf 70-100 µm erweitert. In den nachfolgenden Experimenten waren keine intraspinalen Hämatome sichtbar, ein höhergradiges Trauma durch die Glaspipette war nicht zu beobachten. Die theoretische Abnahme der Präzision der Läsionsinduktion in weißer oder grauer Substanz durch den größeren Durchmesser musste dabei akzeptiert werden.

### II.III.ii Injektionsvolumen

Das zu injizierende Volumen musste groß genug sein, um einen echten inflammatorischen Stimulus darzustellen, gleichzeitig durfte die initial gesetzte Läsion nicht zu ausgedehnt sein, da dies eine präzise Beschränkung auf die weiße bzw. graue Substanz erschwerte. Volumina unter 100nl zeigten dabei schwankende Läsionsgrößen und gehäuft nicht auffindbare Läsionen. Bei 150nl erwies sich sowohl die Applikationsdauer durch den Mikroinjektor als auch die initial aufzufindende Läsion im Rückenmark als akzeptabel. Zudem zeigten sich verschiedene Läsionen gut vergleichbar.

### II.III.iii Koordinaten zur Injektion

Die morphometrischen Koordinaten für die weiße bzw. graue Substanz für das Versuchstier Ratte waren beschrieben [59, 104]. Eine Orientierung an der regelhaften Mittellinienarterie erwies sich als zuverlässig, obschon die Induktion in der grauen Substanz sich als schwierig zeigte und gehäuft histologisch als Lokalisation in der weißen Substanz einzustufen war. Eine Anpassung der Koordinaten erfolgte daher, bei der die Distanz zur Mittellinie auf 300µm verringert wurde. Dies verbesserte die Zielgenauigkeit, eine weitere Präzisierung darüber hinaus gelang nicht.

### II.III.iv Explantation des Rückenmarks

Die Injektion von Zymosan A erforderte eine Eröffnung des Wirbelkanals über nur eine Wirbelkörperhöhe und induzierte gleichzeitig keine Veränderung an der Oberfläche des Rückenmarks. Das Fenster der Laminektomie war in den Tieren der chronischen Zeitpunkte zudem narbig zugewachsen. Diese Umstände machten es nötig, das Areal der induzierten Läsion zum Tötungszeitpunkt von kranial und kaudal über Anschlusslaminektomien nach der Perfusion einzugrenzen und noch im Wirbelkanal direkt an der Oberfläche des Myelons bzw. der Dura entsprechend zu markieren. Da nach der Perfusion die Dura nicht mehr geöffnet werden konnte, ohne das Rückenmark direkt mitzuschädigen, musste die Markierung auf der Dura erfolgen. Alle getesteten Farbstoffe wurden spätestens im Einbettungsprozess gelöst, sodass sich eine Markierung mit Kohle am geeignetsten erwies. Eine anfängliche direkte Markierung der Läsionsstelle noch im Wirbelkanal musste zugunsten einer Markierung kranial und kaudal des Läsionsgebiets verlassen werden, da erstere durch narbige Veränderungen im Bereich der Dura sowie des nur umschriebenen ehemaligen Präparationsbetts sich als unsicher erwies. Um eventuelle Fragestellungen hierzu später nachvollziehen zu



können, wurde das kraniale Ende des Präparats als solches gekennzeichnet. Ein so markiertes Rückenmarksexplantat musste dann vollständig histologisch aufgearbeitet werden.

#### II.III.v Histologische Aufarbeitung

Das AG-interne Einbettschema für Rückenmark sah eine Einbettung der Läsionsstelle in longitudinaler Ebene vor, sodass eine Erfassung der Ausdehnung eines Prozesses entlang der Neuraxis möglich sein sollte. Während dies für verschiedene Modelle einer experimentellen Rückenmarksverletzung eine etablierte Form darstellt, musste das Schema für die spezielle Fragestellung dieser Arbeit modifiziert werden. Um sicher eine Läsion in grauer und weißer Substanz sicher feststellen bzw. unterscheiden zu können, mussten transversale Schnitte analysiert werden. Da sich das eingegrenzte Läsionsgebiet über mehrere Millimeter erstreckte und für immunhistochemische Färbungen Schnitte von 4µm Dicke nötig sind, wurde das Präparat zur Einbettung in zwei bis vier Sektionen geteilt, die dann in einen Block gebracht wurden, sodass die Anzahl der anzufertigenden Schnitte zur Erfassung des gesamten Läsionsgebiets deutlich reduziert werden konnte.

#### II.vi Einschlusskriterien

Da in der vorliegenden Arbeit die intrinsischen Resolutionskapazitäten des Rückenmarks sowohl bezüglich der Unterschiede in der Läsionshöhe entlang der Neuraxis als auch hinsichtlich der Kompartimente *substantia grisea* und *substantia alba* bestimmt werden sollten, wurden Einschlusskriterien für die einzelnen Experimente entwickelt, die möglichst valide Ergebnisse gewähren sollten:

- (i) die Injektionshöhe entlang der Neuraxis war korrekt. Erfasst wurde dies über die Präparation der Wirbelsäule bis auf Wirbelkörper C1 bei der Tötung und anschließendem Abzählen der Wirbelkörper.
- (ii) es war mikroskopisch eine Läsion erkennbar, die mit einer Architekturveränderung (Parenchyndisruption, Ödem, Zellinflux) des Gewebes einherging, eine lediglich diffuse Aktivierung von Immunzellen wurde nicht als Läsion gewertet
- (iii) die Fläche der Läsion zu einem Zeitpunkt war vergleichbar. Hierzu wurden Ausreißer bei nicht symmetrischer Verteilung mittels der Definition nach Tukey (1,5fache des Interquartilsabstandes) nicht für die Analyse berücksichtigt
- (iv) die induzierte Läsion war auf graue oder weiße Substanz beschränkt, sodass die Kernzone der Inflammationsreaktion im betreffenden Kompartiment zu finden war bzw.

Zielzelle	neutrophiler Granulozyt	Makrophage/ Monozyt	aktivierter Lymphozyt	T-Zelle	Astrozyt
Antikörper					
Primärantikörper	Kaninchen polyklonal anti-MPO (abcam; Cambridge, UK)	Maus monoklonal anti-CD68 (Serotec; Düsseldorf, Deutschland)	Maus monoklonal anti-CD43 (Serotec; Düsseldorf, Deutschland)	Kaninchen monoklonal anti-CD3 (abcam; Cambridge, UK)	Kaninchen polyklonal anti-GFAP (Dako; Hamburg, Deutschland)
Verdünnung	1:50	1:100	1:100	1:75	1:500
Zielstruktur	Myeloperoxidase, Enzym der Oxidation in der Inflammation	Glykoprotein, endosomal/lysosomal assoziiert	Leukosialin, Glykoprotein mit Funktion in der Immunzell-interaktion	Proteinkomplex zur Aktivierung von T-Lymphozyten	Intermediärfilament von Astrozyten
Sekundärantikörper	Ziege-anti Kaninchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	Ziege-anti-Maus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	Ziege-anti-Maus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	Ziege-anti Kaninchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	Ziege-anti Kaninchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Verdünnung	1:200	1:300	1:300	1:200	1:300

**Tab. II.III Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach der Etablierung stets mit einer Negativkontrolle (nur Verdünnungslösung anstelle Primärantikörper) durchgeführt. Alle Antikörper gelten als Standardantikörper für die jeweilige Zellpopulation und sind in der Literatur vielfach als solche beschrieben, die die meisten jener Zellen färbt. Für die Analyse wurden zusätzlich immer noch morphologische Kriterien zur Identifikation der einzelnen Zellen herangezogen, da z.T. auch andere Zellen die jeweiligen Antigene exprimieren (s. Text).

die Läsion sicher in diesem induziert wurde, ein mögliches Ausbreiten der Läsion für die Zeitpunkte d5, d7, d14, w4, w8, w12 in transversaler und longitudinaler Ebene wurde einkalkuliert. (Abb. II.IV)

(v) die größte Ausdehnung der Läsion wurde über eine sequentielle Erst-Färbung von Makrophagen von Schnitten im Abstand von 100 µm bestimmt. Der Schnitt mit der morphometrisch größten Ausdehnung der Läsion wurde für die anschließende Quantifizierung der einzelnen Zellpopulationen herangezogen.

(vi) wurde mehr als eine Läsion in verschiedenen Lokalisationen im Transversalschnitt induziert, wurde nur die morphometrisch größte eines Kompartiments ausgewertet.

## II.v Quantifizierung und Analyse

### II.v.i Motorische Abschätzung

Postoperativ, 24h nach der Injektion wurden alle Tiere orientierend motorisch untersucht, nachdem zuvor ein Ausgangsscore 24h vor der OP erhoben wurde. Hierzu wurden sie zunächst mehrere Minuten in ihrem Käfig auf (i) spontane Aktivität beobachtet und dann in einen leeren Käfig gesetzt um gezielt die (ii) funktionelle motorische Funktion der Hinterbeine zu begutachten. Zuletzt wurde jedes Tier auf den Arm des Untersuchers gesetzt und die (iii) Kraft und Sensibilität in der unteren Extremität durch Standtest und Berührung geprüft. Als zusätzlicher Parameter von Funktionsausfall wurde eine (iv) prall gefüllte Blase, die manuell zu entleeren war, in die

Zeitpunkt	h24	h72	d5	d7	d14	w4	w8	w12
gefärbte Zellpopulation								
Granulozyten	x	x	x	x	x	o	o	x
Makrophagen	x	x	x	x	x	x	x	x
Lymphozyten	x	x	x	x	x	x	x	x
T-Zellen	x	x	x	x	x	x	x	x
Astrozyten	o	o	o	x	o	o	o	x

**Tab. II.IV Bestimmungen der Zellpopulationen zu den jeweiligen Zeitpunkten**

Makrophagen, Lymphozyten und T-Zellen wurden an allen gemessenen Zeitpunkten bestimmt. Für die Granulozyten wurde aufgrund ihrer bekannten Kinetik auf eine Bestimmung an den Zeitpunkten w4 und w8 verzichtet. Zum orientierenden Vergleich der astrozytären Aktivierung wurde hier nur ein Zeitpunkt der akuten Inflammation (d7) mit einem des chronischen Geschehens (w12) verglichen. Für die Kontrollgruppe der Sham-Tiere wurde lediglich die Makrophagen-Färbung durchgeführt, um allgemein ein Immungeschehen zu detektieren.

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion      x: Färbung      o: keine Färbung

Bewertung aufgenommen. Bei einem somit maximal erreichbaren Score von 4 Punkten stellte dabei die Maximalpunktzahl das Fehlen von Ausfällen dar.

#### II.v.ii Morphometrie

Die morphometrische Analyse erfolgte mit ImageJ Version 1.44 (National Institute of Health, USA). Von je drei im Abstand von 100µm CD68<sup>+</sup>/Hämalaun gefärbten Schnitten der Läsion der eingeschlossenen Experimente wurden zunächst Fotografien unter einem Mikroskop bei 50-facher Vergrößerung erstellt. Mit ImageJ erfolgte dann die Kalibrierung der Einheit über die in die Fotografien eingepprägten Maße, sodass eine Auswertung der Fläche in µm<sup>2</sup> mithilfe des polygonalen Werkzeugs möglich war. Zur Vermessung der Läsion wurde die maximale Ausdehnung der Läsion herangezogen, identifiziert anhand der mikroskopisch sichtbaren Architekturstörung durch die Zellpopulationen. Eventuelle, nicht sichtbare Veränderungen wie z.B. okkulte Demyelinisierungsareale wurden damit nicht einbezogen.

#### II.v.iii Zellzählung

Die immunhistochemisch markierten Zellen wurden in sechs Hauptgesichtsfeldern, insgesamt eine Fläche von 0,375mm<sup>2</sup> repräsentierend, unter einem Lichtmikroskop (Leica; Wetzlar, Deutschland) bei 400-facher Vergrößerung gezählt. Dabei wurden für die Experimente in entweder grauer oder weißer Substanz nur die Zellen im jeweiligen Kompartiment in und um das Läsionsgebiet gezählt. Eine etwaige *penumbra* der Läsion in der jeweilig anderen Substanz von bis maximal 0.0625 mm<sup>2</sup> wurde dabei mitgewertet. Für die Erfassung der Aktivierung der mikroglialen Immunzellen wurden

zudem CD68<sup>+</sup> Zellen auf der kontralateralen, nicht betroffenen Seite eines Schnittes in sechs Hauptgesichtsfeldern analog zur Zählung um das Läsionsgebiet erfasst, siehe auch Abb. II.IV.

#### II.V.IV Allgemeine Zählkriterien

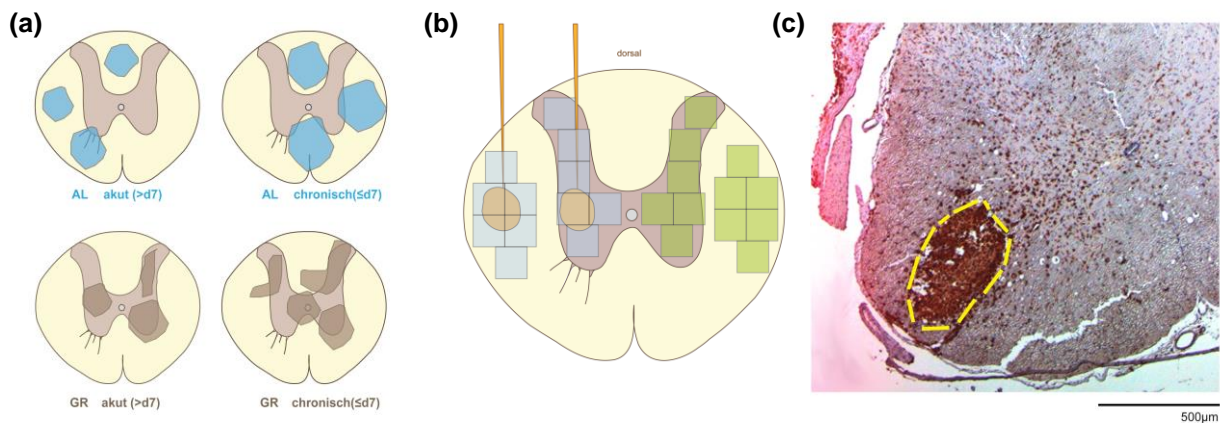
Die Quantifizierung der Zellzahlen erfolgte verblindet für (i) die Höhe entlang der Neuraxis sowie (ii) für die Zeitpunkte. Eine Verblindung für die Lokalisation der Läsion in graue bzw. weiße Substanz war nicht möglich, da diese in den Schnitten optisch leicht voneinander zu unterscheiden sind. Zudem erforderte auch die Zählmethodik eine Abgrenzung von weißer bzw. grauer Substanz (s. II.III). Alle Schnitte wurden jeweils zweimal gezählt, um die Zählergebnisse weiter zu validieren: wick diese Zellzahl um mehr als 15% von der Initialen ab, wurde eine dritte, endgültige Zellzählung durchgeführt, die endgültige Zellzahl wurde sodann aus dem arithmetischen Mittel der Zellzählungen bestimmt.

#### II.V.V Spezielle Zählkriterien

Auch aktivierte Makrophagen exprimieren MPO, daher wurden nur diejenigen MPO<sup>+</sup> Zellen als neutrophile Granulozyten gewertet, die zusätzlich den charakteristischen, lobulierten Zellkern aufwiesen. Nicht eindeutig abgrenzbare MPO<sup>+</sup> Zellen mit fragmentiertem Zellkern wurden als apoptotisch gewertet und nicht in die Zählung eingeschlossen.

Monozyten/Makrophagen im inflammatorischen Milieu ändern ihre Morphologie im Laufe der Zeit. Dies wurde bei der Zellzählung berücksichtigt: Jene CD68<sup>+</sup>Zellen, die eine starke Färbung aufwiesen, die eine Kernfärbung überdeckte, und die aktivierte CD68<sup>+</sup>Mikroglia, deren Soma sternförmige Ausläufer besaß wurden in die Zählung eingeschlossen. Der Phänotyp der CD68<sup>+</sup> phagozytierenden Makrophagen mit wolkigem Soma und schwächerer Färbung wurden nur bei gleichzeitig erkennbarem Zellkern gezählt. In den späten Zeitpunkten, entsprechend einer chronischen Läsion, wurden überdies nur die Zellen gezählt, die in den CD68<sup>+</sup> Verbänden selber eine eindeutige Färbung aufwiesen. CD43<sup>+</sup> Zellen mit lobuliertem Nukleus und reich an Zytoplasma und entsprechender Kern-Plasma-Relation wurden als neutrophile Granulozyten gewertet und daher nicht in die Zählung eingeschlossen.

Neben T-Zellen exprimieren auch Makrophagen schwach das CD3-Antigen. Daher wurden nur Zellen mit prominentem großem Zellkern und kräftiger Membranfärbung als T-Zellen gewertet.



#### **Abb. II.IV Einschluss- und Zählkriterien sowie Morphometrie der Läsion**

(a) Verschiedene Möglichkeiten der mikroskopisch sichtbaren Läsionslokalisation in transversaler Ebene, die entweder zum Einschluss in die Gruppe *substantia alba* (AL) bzw. *substantia grisea* (GR) führten. Vor allem zu den chronischen Zeitpunkten wurde eine Ausbreitung der Läsion berücksichtigt, wobei der Ort der Hauptreaktion festgestellt wurde. (b) Schema zur Zählung der Zellzahlen in weißer bzw. grauer Substanz im Bereich der Läsion (blau) oder kontralateral (grün). (c) Vermessung der Läsionsfläche am Beispiel einer Läsion der weißen Substanz an d5.

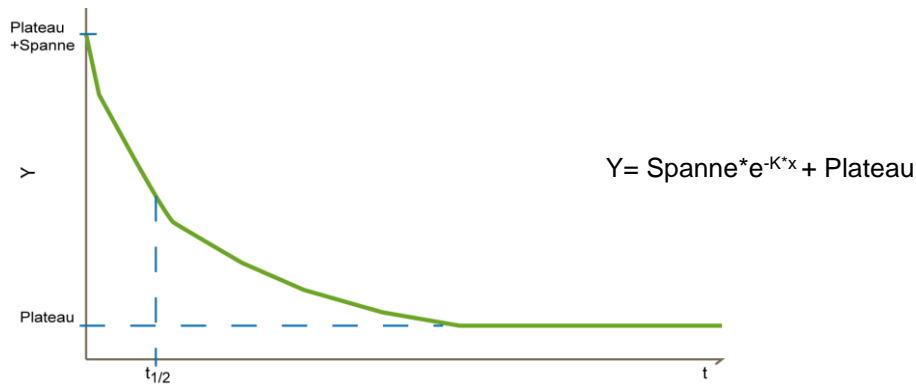
Legende: AL: weiße Substanz      GR: graue Substanz      d: Tage nach Injektion

Da Astrozyten GFAP vor allem in ihren zellulären Ausläufern und weniger um den Zellkern exprimieren, mussten Zellen einen klar erkennbaren Zellkern aufweisen, von dem GFAP<sup>+</sup> Fortsätze ausgingen, um als Astrozyten gewertet zu werden.

#### **II.V.vi Statistische Analyse**

Ergebnisse der deskriptiven statistischen Analyse erfolgten in absoluten (Anzahl, n) und relativen Angaben (%). Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der Exakte Test nach Fisher, zum Vergleich mehrerer Gruppen der Kruskal-Wallis Test bei unverbundenen Stichproben angewendet, als etwaiger Post-hoc-Test wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Dabei wurden Mittelwerte (M), Standardabweichung (SD) und Signifikanzwert (p) angegeben. Die Tests wurden zweiseitig durchgeführt, p-Werte von <0,05 wurden als signifikant und p<0,001 als hochsignifikant gewertet. Die statistischen Analysen erfolgten mit SPSS, Version 24.0, (IBM; Armonk, New York, USA).

Die Berechnung des Resolutionindex wurde mit GraphPad Prism, Version 5.0 (GraphPad Software; La Jolla, CA, USA) nach Prüss et al. [90] unter Annahme einer exponentiellen Abfalls mit nachfolgendem Plateau durchgeführt (Abb. II.v). Das Maximum infiltrierender Zellen  $\Psi_{\max}$  ließ sich dabei aus der deskriptiven Statistik herleiten, das Resolutionsplateau  $R_p$  sowie das Resolutionsintervall  $R_i$  konnten aus der



### Abb. II.V Berechnung des Resolutionindexes

Zur Berechnung der Charakterisierungswerte für Resolution wurde die Berechnung basierend auf der Annahme eines einphasischen-exponentiellen Abfalls durchgeführt, das ein typisches Modell zur Berechnung von radioaktivem Zerfall, Pharmakoelimination oder Rezeptor-Liganden-Dissoziation darstellt. X stellt dabei immer die Zeit dar, Y der zu messende Wert (hier: Zellzahl), wobei der Startwert über die Spanne addiert mit dem Plateau (hier: Maximum der infiltrierenden Zellen) definiert ist. Der Abfall zum Plateau geschieht dabei mit einer Konstante K. Das Maß der Aussagekraft der Kurven für die tatsächlichen Daten wurde über  $R^2$  beschrieben. Zum Vergleich der Kinetiken wurde der F-Test herangezogen.

Abb. GraphPad Prism, V. 5.0

Analyse hergeleitet werden. Als Maß der Validität der Berechnung der Kurvenanpassung auf Basis der Daten wurde das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  herangezogen, zum Vergleich der Kinetiken wurde das Konfidenzintervall (CI) betrachtet sowie der F-Test angewendet, p-Werte  $<0,05$  wurden als signifikant gewertet.

### II.vi Magnetresonanztomographie

In einer Subgruppe von Tieren ( $n=13$ ) wurde sieben Tage nach der Injektion mit einem 7-Tesla Kleintier-Magnetresonanztomographen (MRT) (Bruker; Billerica, Massachusetts, USA) nach einer Übersichtsaufnahme axiale Bilder des Bereichs der Läsionsstelle erstellt. Hierzu lagen die Tiere für die Dauer der Bildgebung in einer konstanten volatilen Anästhesie mit einem Sauerstoff-Isfluran-Gemisch.

### II.vii Bildmaterial

Alle Abbildungen wurden mittels Adobe Illustrator Creative Suite 4 (Adobe Systems Incorporated; San José, CA, USA) vom Autor dieser Arbeit erstellt, sofern nicht anders gekennzeichnet. Letzteres gilt auch für die mikroskopischen Fotografien unter einem inversen Mikroskop (Leica; Wetzlar, Deutschland) und alle anderen Fotografien. Etwaige Referenzen sind unter den jeweiligen Abbildungen zu finden. Kurven und Graphen entstammen GraphPad Prism.

### III Ergebnisse

#### III.I Eingeschlossene Experimente und Konstitution der Gruppen für die immunhistochemische Auswertung

Der endgültige Einschluss der einzelnen Experimente erfolgt gemäß den histologischen Einschlusskriterien (s. II.III), sodass insgesamt n=146 (67,8%) Tiere für die vorliegende Arbeit ausgewertet wurden. Dabei wurden n=81 (37,7%) in die Gruppe der Läsionen der weißen Substanz (AL) und n=49 (22,8%) in die Gruppe der Läsion der grauen Substanz (GR) zugeordnet, die Kontrollgruppe von n=16 wurde vollständig eingeschlossen. Auf Höhe Th9 wurden n=61 (28,4%) dabei der Gruppe AL bzw. n=34 (15,8%) der GR-Gruppe und auf Höhe Th3 n=19 (8,8%) sowie n=15 (7,0%) der AL- bzw. GR-Gruppe zugeordnet. Zu der genauen Aufteilung für die einzelnen Zeitpunkte s. Tab. III.I. Insgesamt n=64 (29,8%) Experimente waren gemäß der Einschlusskriterien nicht auswertbar und gingen damit nicht in die Analyse ein. Zudem verstarben n=5 Tiere (2,3%) während der Anästhesie vor Beginn des operativen Eingriffs.

#### III.II Postoperative sensomotorische Funktion und Allgemeinzustand

In der orientierenden Untersuchung von Spontanmotorik, grober Kraft und Sensibilität sowie Blasenfunktion wiesen n=140 (95,9%) 24h nach dem operativen Eingriff einen Score von 4/4 Punkten auf. Bei n=6 (4,1%) war ein Score von 3/4 Punkten zu erheben, dabei ausnahmslos aufgrund einer prall gefüllten Blase, die manuell zu entleeren war. Bei allen Tieren erholte sich die Blasenfunktion jedoch vollständig, sodass auch hier spätestens nach 48h hier ein Score von 4/4 Punkten zu verzeichnen war. Alle Tiere wiesen somit keine grobmotorischen Defizite auf. Zudem wurden keine pathologischen

Zeitpunkt	h24	h72	d5	d7	d14	w4	w8	w12
spinale Höhe								
Th9	n <sub>AL</sub> =11 n <sub>GR</sub> =7	n <sub>AL</sub> =6 n <sub>GR</sub> =8	n <sub>AL</sub> =7 n <sub>GR</sub> =2	n <sub>AL</sub> =6 n <sub>GR</sub> =4	n <sub>AL</sub> =8 n <sub>GR</sub> =4	n <sub>AL</sub> =7 n <sub>GR</sub> =2	n <sub>AL</sub> =8 n <sub>GR</sub> =2	n <sub>AL</sub> =8 n <sub>GR</sub> =5
Th3	n <sub>AL</sub> =4 n <sub>GR</sub> =4	-*	-*	n <sub>AL</sub> =6 n <sub>GR</sub> =4	n <sub>AL</sub> =6 n <sub>GR</sub> =0	-*	-*	n <sub>AL</sub> =4 n <sub>GR</sub> =7
Th9-Sham	n <sub>AL</sub> =1 n <sub>GR</sub> =1	n <sub>AL</sub> =1 n <sub>GR</sub> =1	n <sub>AL</sub> =1 n <sub>GR</sub> =1	n <sub>AL</sub> =1 n <sub>GR</sub> =1	n <sub>AL</sub> =1 n <sub>GR</sub> =1	n <sub>AL</sub> =1 n <sub>GR</sub> =1	n <sub>AL</sub> =1 n <sub>GR</sub> =1	n <sub>AL</sub> =1 n <sub>GR</sub> =1

**Tab. III.I Konstitution der endgültigen Gruppen in der Auswertung**

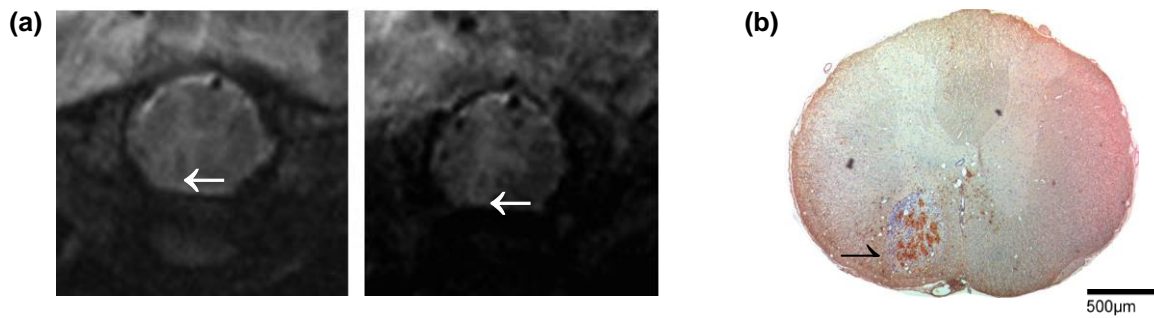
Die Einteilung in die Gruppen AL bzw. GR erfolgte nach mikroskopischer Beurteilung, sodass sich die ursprüngliche Gruppenkonstellation veränderte. Da vor allem eine intendierte Läsionsinduktion in der grauen Substanz in einigen Fällen eher zu einer Induktion in der weißen Substanz führte, verkleinerte sich hier die Anzahl der eingeschlossenen Experimente. Dies führte z.B. zum vollständigen Ausfall des Zeitpunktes d14 der GR-Gruppe auf Höhe Th3. Durch die vorgegebenen Einschlusskriterien verringerte sich zudem die gesamte Anzahl der auswertbaren Experimente.

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion

n<sub>AL</sub>/n<sub>GR</sub>: Gruppe weiße/grau Substanz

-\*: keine Versuche vorgesehen





**Abb. III.1** Darstellung der Läsion in der MRT und histologisches Korrelat

(a) In der MRT stellte sich die Läsion am siebten postoperativen Tag als Hypodensität (weiße Pfeile) mit umgebender Hyperdensität dar (links), die in mehreren Schnitten zu verfolgen war. (b) Das Rückenmark desselben Tieres nach immunhistochemischer Aufarbeitung zwölf Wochen nach Injektion (CD68/Hämalaun – Färbung). Die Läsion ist auch hier ventral des Vorderhorns zu finden (schwarzer Pfeil).

Temperaturerhöhungen, Infektionen oder Gewichtsverluste festgestellt.

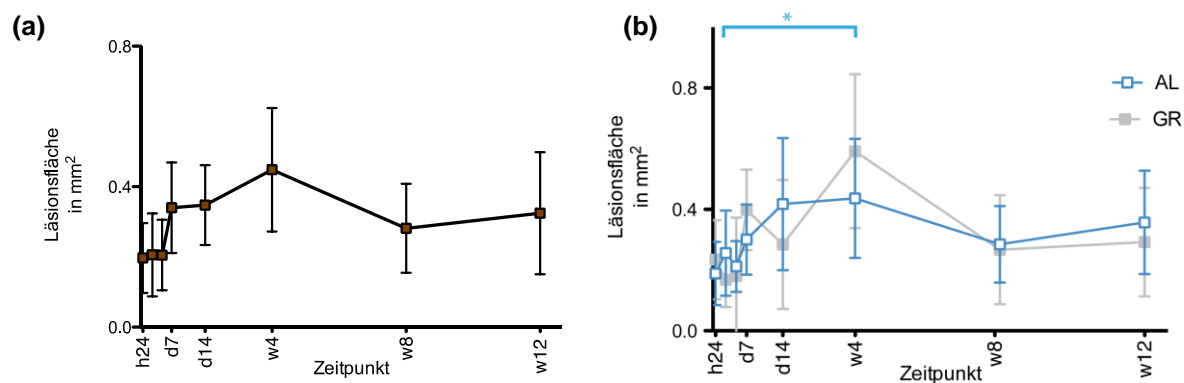
### III.III Magnetresonanztomografische Bildgebung des Läsionsbereiches

Bei n=4 (30,8%) von n=13 Tieren mit radiologischer Bildgebung konnte in der MRT im Myelon in transversaler Schichtung eine Hypodensität mit wallartiger Hyperdensität im Bereich der Laminektomiestelle nachgewiesen werden. Bei der späteren histologischen Auswertung korrelierten diese Lokalisationen. Bei n=5 (38,5%) der Tiere wurde auch nach der histologischen Begutachtung keine Läsion gefunden, sodass von insgesamt n=8 Tieren mit erfolgreich induzierter Läsion bei n=4 (50%) die Darstellung der Läsion in der MRT nicht gelang.

### III.IV Morphometrische Analyse der Läsion

Im Verlauf veränderte sich die gemessene Fläche der induzierten Läsion. Die initiale Läsion ( $M= 0,197\text{mm}^2$ ,  $SD= 0,099\text{mm}^2$ ) an Zeitpunkt h24 vergrößerte sich bis zu vier Wochen ( $M= 0,448\text{mm}^2$ ,  $SD= 0,176\text{mm}^2$ ) nach der Injektion und nahm dann wieder bis zum letzten Zeitpunkt w12 ( $M= 0,325\text{mm}^2$ ,  $SD= 0,174\text{mm}^2$ ) ab, wobei die Läsionsgröße ab w8 scheinbar eine Plateauphase erreichte. Die Unterschiede in der Läsionsfläche erwiesen sich dabei zwischen weißer und grauer Substanz sowie zwischen den Läsionshöhen Th9 und Th3 als statistisch nicht signifikant. In der AL - Gruppe zeigten sich Unterschiede der Läsionsfläche sowohl auf Höhe Th9 vom Zeitpunkt h24 zum Zeitpunkt w4 ( $p=0,05$ ), die auf Höhe Th3 zum Zeitpunkt d14 Signifikanz erreichten ( $p=0,002$ ). Für die Kontrollgruppe der Sham-Tiere konnte jeweils kein Läsionsbereich beobachtet werden, sodass diese auch nicht in die Morphometrie einbezogen wurden.





**Abb. III.ii Entwicklung der Läsionsfläche**

(a) Die Läsion veränderte sich über die Zeit mit einer Zunahme der Fläche bis vier Wochen nach der Injektion und nahm dann wieder ab, erreichte jedoch nicht vollständig das Ausgangsniveau, die Unterschiede zeigten sich jedoch nicht signifikant. (b) Auch zwischen den Gruppen AL und GR und zwischen Th9 und Th3 (nicht gezeigt) waren keine signifikanten Unterschiede zu finden. Lediglich die Zunahme der Läsionsfläche in der weißen Substanz auf Höhe Th9 von h24 zu d7/w4 zeigte sich signifikant ( $p=0,003/p=0,021$ ). Angaben der Mittelwerte (Boxen) und Standardabweichungen (Fehlerbalken).

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion AL: Läsion in der weißen Substanz GR: Läsion in der grauen Substanz

### III.v Allgemeine Charakteristika der Zellpopulationen

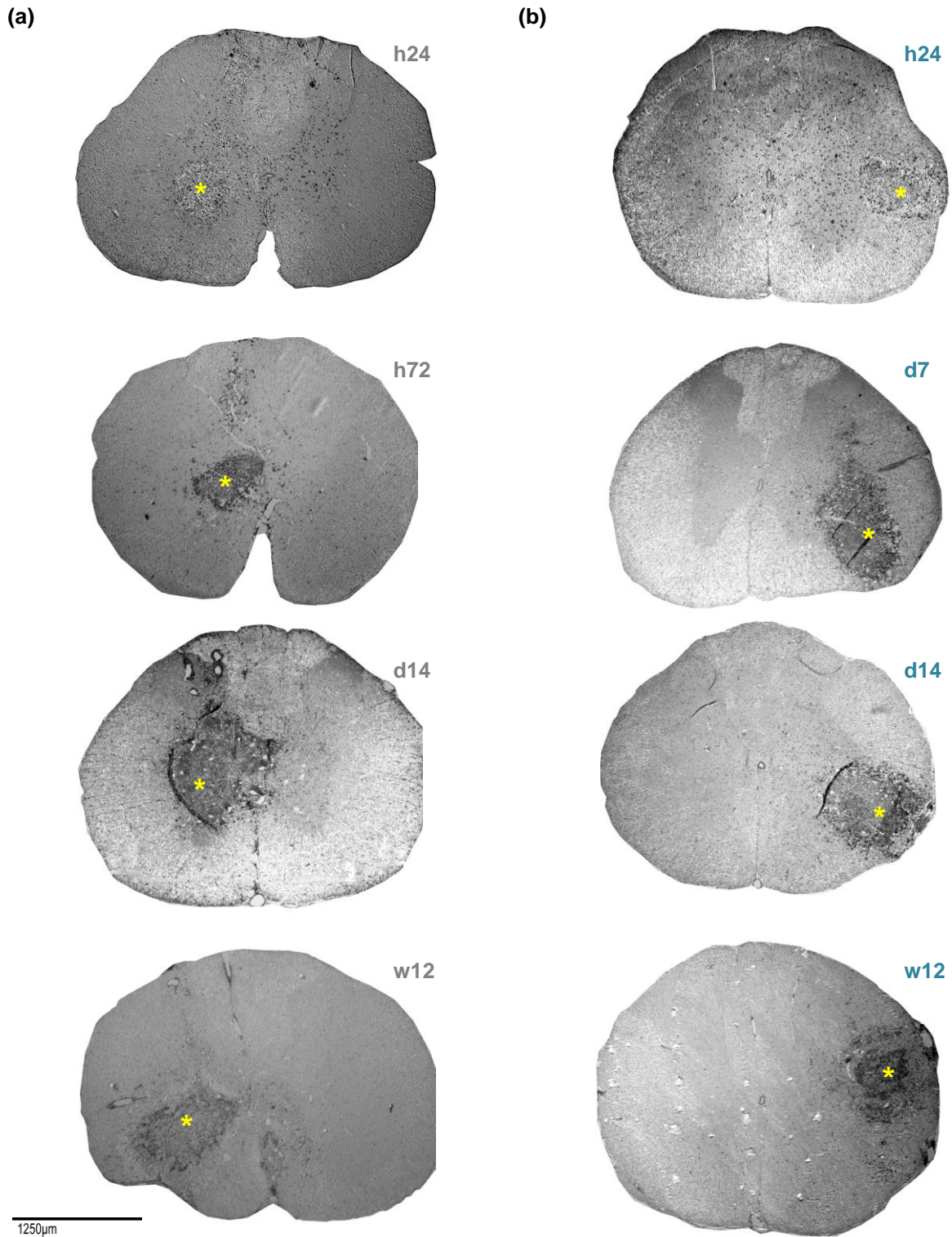
Die einzelnen analysierten Zellpopulation zeigten bei der histologischen Auswertung teilweise distinkte Merkmale in Lokalisation bezüglich der induzierten Läsion, Morphologie oder Aktivierungsmuster an einzelnen Zeitpunkten, die nicht näher quantifiziert wurden, an dieser Stelle jedoch allgemein deskriptiv vorgestellt werden sollen (s. auch Abb. III.iii).

#### III.v.i Neutrophile Granulozyten

MPO<sup>+</sup> Zellen füllten die Läsion an den frühen Zeitpunkten (h24, h72) fast vollständig aus. In Schnitten kaudal und kranial der Läsion war ein loses Aktivierungsmuster dieser Zellen vor allem in der grauen Substanz und nahe der Meningen zu beobachten. Pyknotische, zellkernfragmentierte und nur noch schwach MPO exprimierende Zellen füllten ab h72 bis d7 das innerste Zentrum der Läsion.

#### III.v.ii Makrophagen

Die Population der CD68<sup>+</sup> Zellen bestand zu den Zeitpunkten h24 und h72 aus runden kleinen Zellen und aktivierter dendritischer Mikroglia mit disseminierter Verteilung, hier vor allem in der grauen Substanz. Zu den Zeitpunkten d5 bis d14 füllten diese Zellen die Läsion nahezu vollständig aus und zeigten den Phänotyp der phagozytierenden Makrophagen mit großem, schaumigen Soma und randständigem Kern. Zu den späten Zeitpunkten bis w12 nahm diese CD68<sup>+</sup> Zellen in kleiner Anzahl das Zentrum der



**Abb. III.III Entwicklung der Läsion über die Zeit**

Darstellung exemplarischer Läsionen von CD68/Hämälun gefärbten Transversalschnitten des Rückenmarks nach stereotaktischer Zymosaninjektion in der grauen (a) und weißen (b) Substanz mit respektiver Zuordnung in die GR- bzw. AL-Gruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten auf Höhe Th9. Eine teilweise sehr heterogene Morphologie der Läsion war sowohl zu den Zeitpunkten innerhalb der Gruppen als auch zwischen den Gruppen sowie zwischen den Zeitpunkten zu beobachten. Ein Übertritt der Läsion im Laufe der Zeit auf die jeweils andere Substanz im Sinne eines Sekundärschadens wurde in der Zellzählung berücksichtigt. Aufnahmen bei 50facher Vergrößerung.

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion  
 \* : Läsion

AL: Läsion in der weißen Substanz GR: Läsion in der grauen Substanz

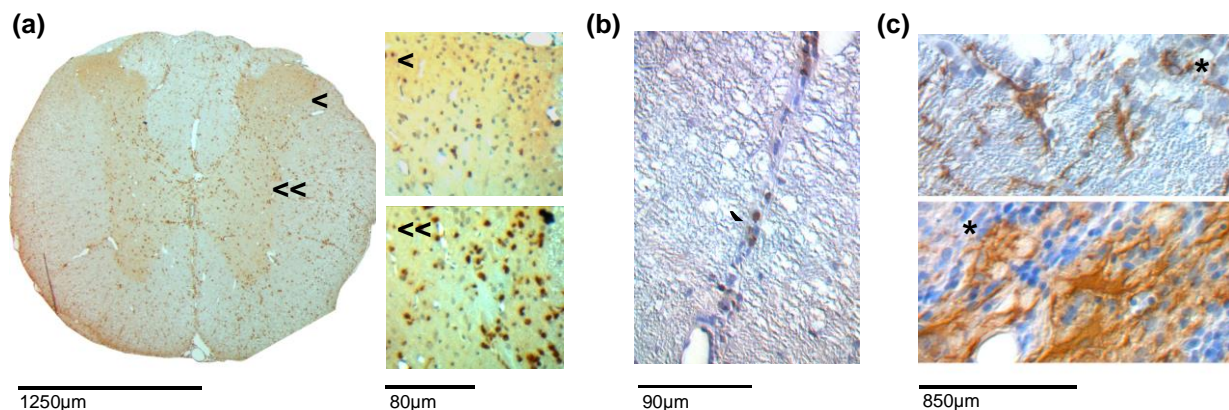
Läsion ein, aktivierte Mikroglia mit und ohne dendritischen Ausläufern gruppierten sich um und in den Außenbereichen der Läsion. Zudem zeigten sich zu den Zeitpunkten w8 und w12 vereinzelt morphologisch CD3<sup>+</sup> Makrophagen. Die Aktivierung der Makrophagen/Mikroglia war noch bis ein Millimeter kranial und kaudal der Läsion zu finden, hier vor allem in der grauen Substanz. Diese beinahe stereotypische Aktivierung der Mikroglia der ganzen grauen Substanz fand sich dabei nur wenig in den Hinterhörnern der grauen Substanz, hier waren jeweils nur wenige CD68<sup>+</sup> oder keine Zellen zu finden.

### III.V.III Lymphozyten

Die CD43<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen waren zu allen Zeitpunkten vor allem in der Peripherie der Läsion und zu den späten Zeitpunkten im Randwall zu finden. Die ersten CD3<sup>+</sup> Zellen waren an h24 vor allem in der *fissura mediana anterior* im Bereich der Meningen noch außerhalb des Parenchyms zu finden. CD3<sup>+</sup> Zellen waren zu den späten Zeitpunkten oft deutlich mit vaskulären Strukturen assoziiert.

### III.V.IV Astrozyten

Die GFAP<sup>+</sup> Zellen befanden sich vorrangig am Rand der Läsion, wobei sie an d7 schlanke Zellausläufer und nur einen schmalen Zytoplasmasaum aufwiesen. Zum



#### **Abb. III.IV Merkmale der verschiedenen Zellpopulationen**

(a) Die Aktivierung von CD68<sup>+</sup> Zellen mehrere hundert Mikrometer kranial/kaudal der Läsion zum Zeitpunkt h24. Dabei war vor allem die mikrogliale Aktivierung in der grauen Substanz (doppelte Pfeilköpfe) unabhängig von der Lokalisation der Läsion stark ausgeprägt. Die Hinterhörner (Pfeilkopf) waren dabei von dieser allgemeinen Aktivierung ausgenommen (50-/400-fache Vergrößerung) (b) CD3<sup>+</sup> Zellen (braun, 400-fache Vergrößerung) in der *fissura mediana anterior* 24 Stunden nach Läsionsinduktion: zu diesem Zeitpunkt waren in der Regel noch keine dieser Zellen im Parenchym der Rückenmarks zu finden. (c) GFAP<sup>+</sup> Astrozyten sieben Tage (oben) und zwölf Wochen (unten) nach der Zymosaninjektion. Mit schlanken und kurzen Ausläufern gruppierten sich die Gliazellen in der akuten Läsion noch kaum, während sie im chronischen Geschehen einen prominenten Zelleib und ausgedehnte dendritische Zellarme aufwiesen (1000-fache Vergrößerung).

Legende: →: T-Zellen \* : Läsion <<: graue Substanz, im Bereich des Seitenhorn <: graue Substanz, Hinterhorn —: Längenmaß

Zeitpunkt w12 waren sie die Zellgruppe, die mit kräftigen Ausläufern und prominentem Zellkörper einen Teil des Randwalls der Läsion bildeten.

### **III.vi Kinetiken der Zellpopulationen in weißer und grauer Substanz auf Höhe Th9**

#### III.vi.i Population der MPO<sup>+</sup> Zellen

Die Zahl der MPO<sup>+</sup> Zellen auf Höhe Th9 erreichte das Maximum sowohl in der AL-Gruppe (M=379,55 / SD=85,80) als auch in der GR-Gruppe (M=331,57 / SD=81,93) bereits zum Zeitpunkt h24 und fiel dann rasch ab, so dass an d7 sich nur noch ein kleiner Teil der Zellen MPO<sup>+</sup> zeigte (Gruppe AL: M=65,00 / SD=11,88; Gruppe GR: M=64,5 / SD=19,21). Zum letzten Zeitpunkt w12 waren dann nur noch vereinzelt Zellen zu finden (Gruppe AL: M=11,00 / SD=4,66; Gruppe GR: M=8,6 / SD=5,32). Der Abfall der Zellen vom Zeitpunkt h24 zu w12 zeigte sich dabei in beiden Gruppen als hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Zwischen den Gruppen der Läsion in weißer und grauer Substanz zeigten sich zudem signifikante Unterschiede drei Tage sowie vierzehn Tage nach Läsionsinduktion, wobei die Zahl der MPO<sup>+</sup> Zellen in der AL-Gruppe höher lag ( $p = 0,028$  bzw.  $p = 0,007$ ). Dieser Unterschied war zum letzten Zeitpunkt nicht mehr statistisch signifikant (Abb. III.v.a).

#### III.vi.ii Population der CD68<sup>+</sup> Zellen

Bereits zum Zeitpunkt h24 fanden sich auf Höhe Th9 CD68<sup>+</sup> Zellen in großer Zahl in und um den Läsionsbereich (Gruppe AL: M=248,73 / SD=41,30; Gruppe GR: M=345,00 / SD=47,57). In beiden Gruppen nahm die Zellzahl bis sieben Tage nach Injektion weiter zu und erreichte hier ihr Maximum sowohl in der AL-Gruppe (M=619,00 / SD=95,66) als auch der GR-Gruppe (M=670,75 / SD=23,68). CD68<sup>+</sup> Zellen waren zu diesem Zeitpunkt die dominante Zellpopulation und füllten den Läsionsbereich nahezu vollständig aus. Im Verlauf nahm die Zahl der Zellen zunächst langsam bis d14, nach vier Wochen schneller ab. Zum Zeitpunkt w12 waren dabei im Läsionsbereich in der weißen (AL: M=384,38 / SD=93,24) und grauen Substanz (GR: (M=238,40 / SD=55,56) noch viele CD68<sup>+</sup> Zellen nachweisbar.

Das Maximum an d7 zeigte sich dabei in beiden Gruppen signifikant größer als 24 Stunden nach der Injektion (AL-Gruppe  $p < 0,001$  bzw. GR-Gruppe  $p = 0,021$ ). Die Abnahme CD68<sup>+</sup> Zellen im Rückenmark von der maximalen Zellzahl stellte sich demgegenüber in der weißen Substanz nur gegenüber w8 nicht jedoch w12 als signifikant dar ( $p = 0,031$  und  $p = 0,054$ ), während sich der Unterschied in der Gruppe der

Läsion der grauen Substanz von d7 zu w8 als auch zu w12 signifikant zeigte ( $p=0,033$  und  $p=0,001$ ).

Der Vergleich zwischen der AL- und GR-Gruppe zeigte zudem statistisch signifikante Unterschiede der Anzahl CD68<sup>+</sup> Zellen im Bereich der jeweiligen Läsion zum ersten gemessenen Zeitpunkt, h24 ( $p=0,003$ ) mit einer höheren Zellzahl in der grauen Substanz gegenüber der weißen. Zum Maximum des Influx an d7 sowie in der Effluxphase vom akuten zum chronischen Geschehen waren zwischen der grauen und weißen Substanz keine signifikanten Unterschiede zu messen. Erst der spätest gemessenen Zeitpunkt, w12 zeigte erneut statistisch signifikant von einander unterschiedliche Zellzahlen ( $p=0,013$ ), wobei die GR-Gruppe jetzt unter der AL-Gruppe lag (Abb. III.v.b).

Die Analyse der CD68<sup>+</sup> Zellen kontralateral des geschädigten Myelons zeigte 24 Stunden nach Zymosaninjektion eine mäßige Aktivierung der weißen Substanz ( $M=30,10$  /  $SD=26,23$ ) und deutlich stärkere in der grauen Substanz ( $M=128,43$  /  $SD=33,73$ ), die im Verlauf in der AL-Gruppe bereits an d7 rasch auf vereinzelte Zellen absank ( $M=3,00$  /  $SD= 2,28$ ) und an den weiteren Messpunkten nicht mehr anstieg (w12:  $M=7,5$  /  $SD=3,16$ ). In der GR-Gruppe fiel die Zellzahl langsamer ab (d7:  $M=60,75$  /  $SD=13,81$ ), bis zum Zeitpunkt w12 auch hier nur noch einzelne Zellen CD68<sup>+</sup> waren ( $M=15,4$  /  $SD=11,80$ ). Der Abfall der kontralateral CD68<sup>+</sup> Zellen ab h24 zeigte sich dabei in der AL-Gruppe sowohl zu d7 als auch w8 signifikant ( $p=0,012$  und  $p=0,002$ ). Auch in der GR-Gruppe errechnete sich für die Abnahme der Zellen ab h24 in diesem Kompartiment ein statistisch relevanter Unterschied zum spätesten Messzeitpunkt w12 ( $p<0,001$ ).

Der Vergleich zwischen den Gruppen ergab zu allen Zeitpunkten bis auf w12 einen statistisch signifikanten Unterschied der Zellzahlen auf der kontralateralen Seite mit erhöhten Zellzahlen in der grauen Substanz (h24:  $p<0,001$  / h72:  $p=0,002$  / d5:  $p=0,04$  / d7:  $p=0,01$  / d14:  $p=0,01$  / w4:  $p=0,039$  / w8:  $p=0,033$ ).

Die Auszählung CD68<sup>+</sup> Zellen in der Sham-Kontrollgruppe zeigte sehr niedrige Zellzahlen ( $M=6,94$  /  $SD=5,27$ ) zu allen Zeitpunkten, wobei diese phänotypisch vor allem aktivierten Mikrogliazellen entsprachen. Hier wurde zudem nicht zwischen graue oder weißer Substanz unterschieden, da eine Läsion nicht zu beschreiben war (Abb. III.v.c).

### III.VI.III Population der CD43<sup>+</sup> Zellen

Zum Zeitpunkt h24 fanden sich auf Höhe Th9 sowohl in der AL- (M=11,73 / SD=5,04) als auch in der GR-Gruppe (M=15,29 / SD=9,96) nur wenig CD43<sup>+</sup> Zellen. Ein deutlicher Anstieg der Zellen war sieben Tage nach Läsionsinduktion zu beobachten (Gruppe AL: M=136,67 / SD=44,14; Gruppe GR: M=144,5 / SD=32,30), wobei dieser Zeitpunkt zugleich die maximale gemessene Zellzahl in der GR-Gruppe darstellte. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten war eine Plateauphase der CD43<sup>+</sup> Zellen festzustellen, an Messpunkt w4 zeigte die AL-Gruppe den gemessenen Höchstwert (M=147,29 / SD=37,51), die GR-Gruppe war hier jedoch ebenso noch vergleichbar erhöht (M=115,5 / SD=24,75). Erst zum spätest gemessenen Zeitpunkt, w12, war ein Rückgang der Anzahl erkennbar (Gruppe AL: M=117,88 / SD=35,84; Gruppe GR: M=82,2 / SD=15,62).

Der Vergleich der Zellzahlen über die Zeit beschrieb einen statistisch signifikanten Anstieg der Zellen von h24 zu ihrem Maximum an w4 für die AL-Gruppe ( $p < 0,001$ ) bzw. d7 für die GR-Gruppe ( $p = 0,003$ ), eine darauffolgende signifikante Abnahme CD43<sup>+</sup> Zellen zu späteren Zeitpunkten war jedoch nicht zu beobachten.

Ebenso zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl der CD43<sup>+</sup> Zellen zwischen den Läsionen in weißer und grauer Substanz (Abb. III.VI.a).

#### III.VI.IV Population der CD3<sup>+</sup> Zellen

Die Zahl der CD3<sup>+</sup> Zellen war zu den Zeitpunkten h24 bis d5 sowohl in der AL-Gruppe (h24: M=0,27 / SD=0,65 und d5: M=12,43 / SD=4,80) als auch der GR-Gruppe (h24: M=0,71 / SD=0,76 und d5: M=14,00 / SD=9,90) sehr gering, wobei regelhaft zu den ersten Zeitpunkten keine Zellen im Rückenmarksgewebe auf Höhe Th9 gefunden lokalisiert waren. Ab d7 stieg die Zellzahl an bis vier Wochen nach der Intervention das Maximum in beiden Gruppen gemessen wurde (Gruppe AL: M=198,86 / SD=42,93; Gruppe GR: M=222,00 / SD=36,80). Zum letzten gemessenen Zeitpunkt w12 war die Zahl der gezählten CD3<sup>+</sup> Zellen dabei in der AL moderat (M=142,63 / SD=23,38) und in der GR-Gruppe stärker auf ungefähr die Hälfte des Spitzenwerts abgefallen (M=97,60 / SD=38,68).

Der Unterschied vom frühest gemessenen Zeitpunkt zur Spitzenzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen an w4 erwies sich dabei für beide Gruppen statistisch signifikant (Gruppe AL:  $p < 0,001$  und Gruppe GR:  $p = 0,006$ ). Demgegenüber war die Abnahme der Zellzahl bis zum Zeitpunkt w12 verglichen mit dem Maximum in der AL-Gruppe und der GR-Gruppe nicht signifikant.



Unterschiede zwischen der AL- und GR-Gruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten erreichte ebenso keine statistische Signifikanz, ließ jedoch einen Trend mit niedrigeren CD3<sup>+</sup> Zellen an w12 in der grauen Substanz erkennen ( $p=0,057$ ) (Abb. III.vi.b).

### III.vi.v Population der GFAP<sup>+</sup> Zellen

Die Analyse dieser Zellpopulation beschränkte sich auf die zwei Zeitpunkte d7 und w12. Sieben Tage nach der Operation zeigten sich die GFAP<sup>+</sup> Zellen in der AL-Gruppe ( $M=31,00 / SD=7,01$ ) nur andeutungsweise um die Läsion gruppiert und waren verteilt im Gewebe zu finden, in der GR-Gruppe wurden mehr Zellen ( $M=70,00 / SD=14,90$ ) gemessen, die Dichte der GFAP<sup>+</sup> Zellen schien hier im gesamten Kompartiment höher. Zum Zeitpunkt w12 war die Zahl der Zellen in beiden Gruppen (Gruppe AL:  $M=83,38 / SD=17,78$ ; Gruppe GR:  $M=122,00 / SD=18,22$ ) gestiegen, wobei die Zellen nun deutlich den Randwall der Läsion bildeten.

Der Unterschied der Zellzahl zwischen den Zeitpunkten mit höheren Werten an w12 zeigte sich dabei in beiden Gruppen signifikant (Gruppe AL:  $p=0,002$  / Gruppe GR:  $p=0,014$ ).

Bei Vergleich der beiden Gruppen gegeneinander ergab sich sowohl für den Zeitpunkt d7 eine statistisch signifikant höhere Zellzahl in der grauen Substanz gegenüber der weißen Substanz ( $0,011$ ) als auch für jenen zwölf Wochen nach der Läsionsinduktion ( $p=0,005$ ) (Abb. III.vi.c).

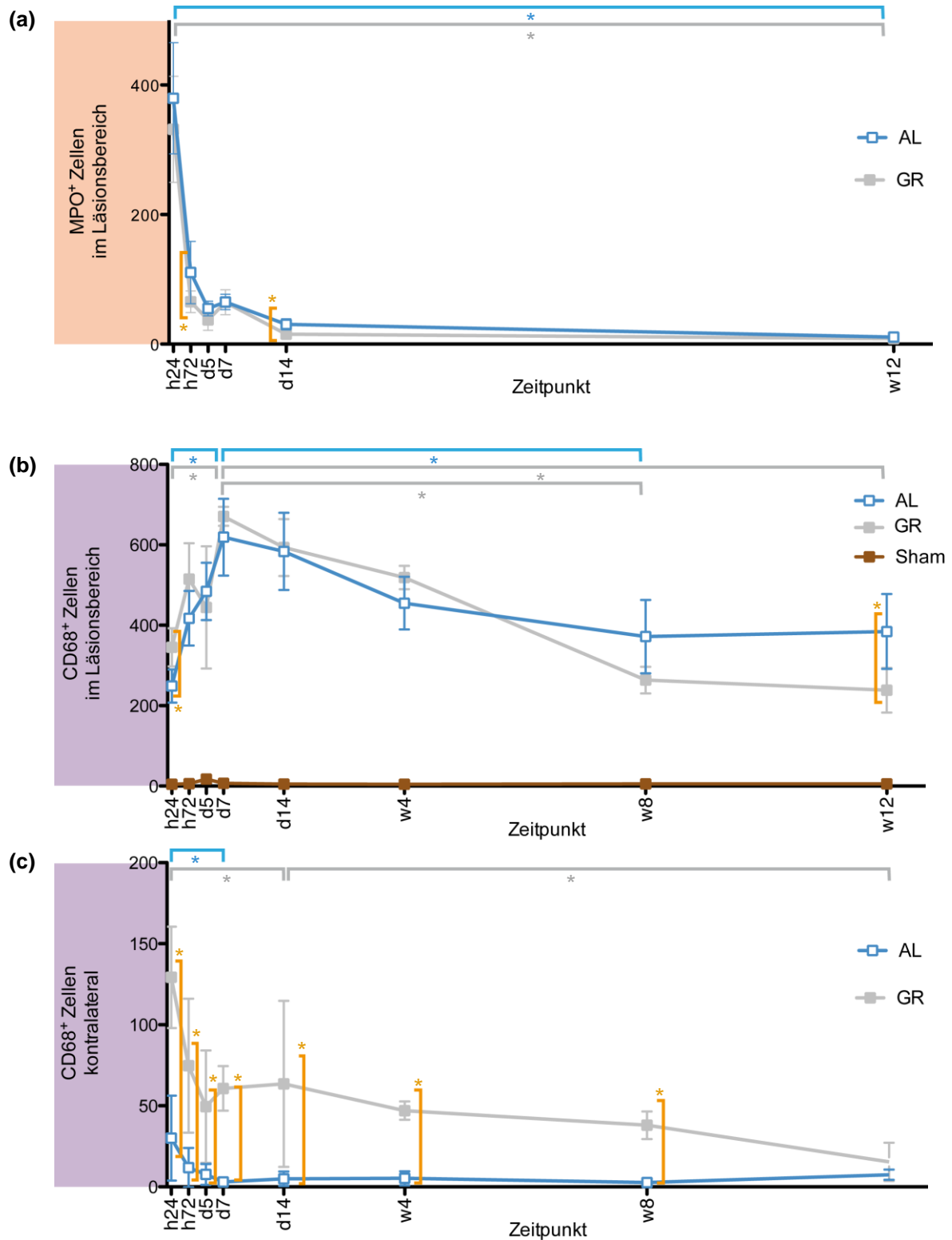
## III.vii Kinetiken der Zellpopulationen in weißer und grauer Substanz auf Höhe Th3

### III.vii.i Population der MPO<sup>+</sup> Zellen

Auch auf Höhe Th3 wurde das Maximum der im Rückenmark lokalisierten MPO<sup>+</sup> Zellen 24 Stunden nach der Zymosaninjektion beobachtet (Gruppe AL:  $M=370,75 / SD=135,69$  und Gruppe GR:  $M=371,75 / SD=151,00$ ) mit anschließendem Rückgang, bis an w12 nur noch vereinzelt Zellen im Gewebe zu finden waren (Gruppe AL:  $M=13,00 / SD=5,95$  und Gruppe GR:  $M=9,00 / SD=5,16$ ). Der Abfall der Zellzahlen vom Maximum an h24 zum Zeitpunkt w12 war dabei statistisch signifikant sowohl für die AL-Gruppe ( $p=0,001$ ) als auch die GR-Gruppe ( $p=0,002$ ). Im Vergleich zwischen den beiden Gruppen zeigten sich dagegen keine statistisch relevanten Unterschiede (Abb. III.vii.a).

### III.vii.ii Population der CD68<sup>+</sup> Zellen

Für die CD68<sup>+</sup> Zellen im Läsionsbereich auf Th3 zeigte sich ebenso an h24 eine niedrigere Messung in der AL-Gruppe ( $M=204,75 / SD=17,46$ ) als in der GR-Gruppe

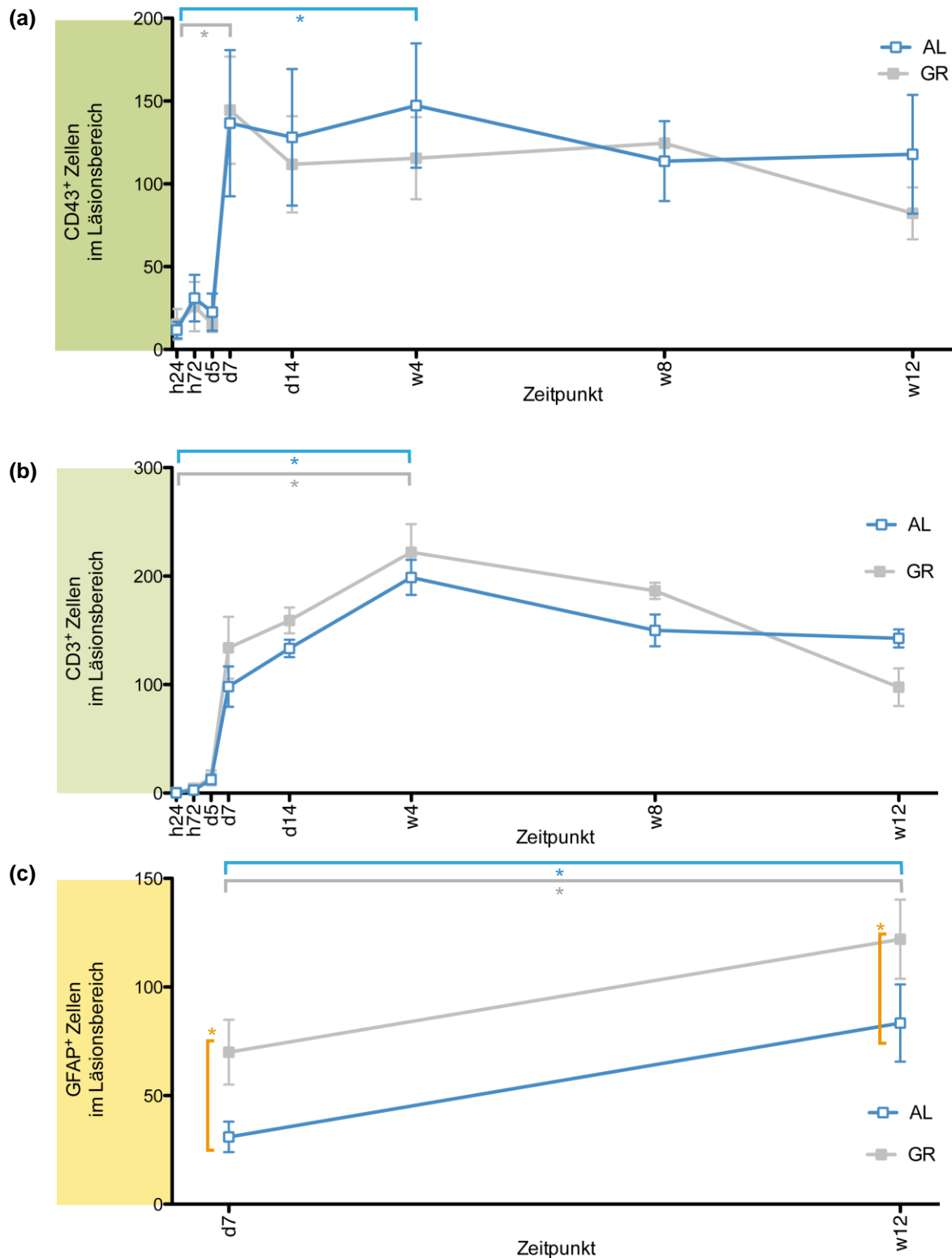


**Abb. III.V Kinetiken der MPO<sup>+</sup> und CD68<sup>+</sup> Zellen in weißer und grauer Substanz auf Höhe Th9**

(a) Bereits 24 Stunden nach der Zymosaninjektion erreichten die MPO<sup>+</sup> Zellen das Maximum und fielen rasch ab, sodass ab d14 nur noch vereinzelte Zellen gefunden wurden. (b) Die Population der CD68<sup>+</sup> Zellen im Läsionsbereich erreichte ihr Maximum in beiden Gruppen an d7 und fiel dann stetig ab, wobei in der AL-Gruppe sich eine Plateauphase abzubilden scheint. Zu den Zeitpunkten h24 war die Zahl der CD68<sup>+</sup> in der GR-Gruppe signifikant ( $p=0,003$ ) höher als in der AL-Gruppe, die Kinetiken glichen sich folgend an und erst zum Zeitpunkt w12 war wieder ein signifikanter Unterschied ( $p=0,013$ ) zu beobachten, dabei waren die Zellzahlen in der AL-Gruppe jetzt höher. Die Kontrollgruppe wies an allen Zeitpunkten geringe Zellzahlen auf. (c) Kontralateral lag die Zahl der CD68<sup>+</sup> Zellen beginnend ab h24 in der GR-Gruppe über der AL-Gruppe, wobei sich beide langsam angleichen.

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion AL: Läsion in der weißen Substanz GR: Läsion in der grauen Substanz Sham: Kontrollgruppe Quadrate stellen die Mittelwerte dar, die Fehlerbalken die Standardabweichungen. Horizontale Balken (blau: AL-Gruppe / grau: GR-Gruppe) über den Kurven zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen zwischen den Zeitpunkten an, vertikale Balken (orange) stellen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen dar





**Abb. III.VI Kinetiken der CD43<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> und GFAP<sup>+</sup> Zellen in weißer und grauer Substanz auf Höhe Th9**

(a) CD43<sup>+</sup> Zellen waren erst in größerer Zahl ab d7 zu finden, in der GR-Gruppe erreichten sie hier auch bereits ihre maximale Anzahl, während in der AL-Gruppe diese an w4 zu finden war. Für diese Zellpopulation war zudem kein klarer Trend in der Abnahme der Zellen zu zeigen. (b) Auch CD3<sup>+</sup> Zellen waren zu Beginn nur in geringer Anzahl zu finden, ab d7 stieg ihr Vorkommen im Läsionsbereich und erreichte vier Wochen nach der Zymosaninjektion ihren Spitzenwert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen fand sich nicht. (c) Die Zahl der GFAP<sup>+</sup> Zellen unterschied sich an beiden gemessenen Zeitpunkten signifikant zwischen den Gruppen und auch im Verlauf mit einer höheren Zellzahl an w12.

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion AL: Läsion in der weißen Substanz GR: Läsion in der grauen Substanz Quadrate stellen die Mittelwerte dar, die Fehlerbalken die Standardabweichungen. Horizontale Balken (blau: AL-Gruppe / grau: GR-Gruppe) über den Kurven zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen zwischen den Zeitpunkten an, vertikale Balken (orange) stellen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen dar

(M=376,00 / SD=29,26), wobei die Anzahl der Zellen noch weiter anstieg. An d14 konnte für die AL-Gruppe das Maximum (M=619,14 / SD=111,57) gemessen werden, das Maximum für die GR-Gruppe war demgegenüber an d7 (M=689,75 / SD=60,27). Dabei ist jedoch zu beachten, dass für den Zeitpunkt d14 keine Läsion für die Gruppe der grauen Substanz einzuschließen war (s. auch III.I). Zwölf Wochen nach der Injektion lag die Zahl der gezählten CD68<sup>+</sup> Zellen in der AL-Gruppe (M=409,00 / SD=71,34) höher als in der GR-Gruppe (M=337,71 / SD=49,05).

Der Anstieg von 24 Stunden nach der Läsionsinduktion zum Maximum zeigte sich dabei für die AL-Gruppe signifikant ( $p=0,004$ ), für die GR-Gruppe jedoch nicht ( $p=0,173$ ). Dagegen war der Abfall der Zellen von ihrem Maximum zum Zeitpunkt w12 für die AL-Gruppe nicht signifikant, für die GR-Gruppe jedoch schon ( $p=0,009$ ). Der Vergleich der Gruppen untereinander ergab ähnlich wie auf Höhe Th9 eine signifikant höhere Zellzahl in der GR-Gruppe ( $p=0,021$ ), wobei sich dieser Unterschied auch noch an d7 nachweisen ließ ( $p=0,019$ ), jedoch nicht zu den späteren Messpunkten (Abb. III.VII.b). Kontralateral der Läsion zeigte sich die Zahl der CD68<sup>+</sup> Zellen an h24 in der AL-Gruppe deutlich geringer (M=31,25 / SD=13,96) gegenüber der GR-Gruppe (M=123,5 / SD=37,33). Der Unterschied war noch zum letzten Zeitpunkt, w12 zu beobachten (Gruppe AL: M=3,75 / SD=1,50 und Gruppe GR: M=50,00 / SD=34,23). Die Abnahme der gezählten Zellen vom Zeitpunkt h24 zu w12 war dabei in beiden Gruppen signifikant (Gruppe AL:  $p=0,019$  / Gruppe GR:  $p=0,04$ ). Auch zwischen den Gruppen zeigte sich an den Zeitpunkten h24 ( $p=0,021$ ), d7 ( $p=0,033$ ) und w12 ( $p=0,046$ ) eine signifikant höhere Zellzahl in der GR-Gruppe gegenüber der AL-Gruppe (Abb. III.VII.c).

### III.VII.III Population der CD43<sup>+</sup> Zellen

CD43<sup>+</sup> Zellen im Läsionsbereich waren auch auf Höhe Th3 zum Zeitpunkt h24 nur in geringer Zahl sowohl in der AL-Gruppe (M=12,00 / SD=5,35) als auch der GR-Gruppe (M=12,25 / SD=5,74) zu detektieren. Die Zahl stieg bis zum Messpunkt d14 in der AL-Gruppe (M=134,83 / SD=25,50) und bis an w12 in der GR-Gruppe (M=151,29 / SD=42,36), bei fehlender GR-Gruppe an d14. In der AL-Gruppe konnte ein leichter Rückgang der Zellen zu w12 beobachtet werden (M=129,5 / SD=42,36). Der Anstieg der Zellen vom frühesten Messpunkt zum Maximum an d14 zeigte sich dabei statistisch signifikant in der AL-Gruppe ( $p=0,025$ ), der Abfall der Zellzahlen jedoch nicht. In der GR-Gruppe war der Unterschied zwischen h24 und w12 signifikant ( $p=0,004$ ). Ein relevanter Unterschied zwischen den Gruppen war dabei nicht nachweisbar (Abb. III.VIII.a).

### III.VII.IV Population der CD3<sup>+</sup> Zellen

Ähnlich zu Th9 waren die CD3<sup>+</sup> Zellen regelhaft nur in sehr geringer Zahl zum Zeitpunkt h24 nachweisbar (Gruppe AL: M=1,75 / SD=2,22 und Gruppe GR: M=2,00 / SD=0,82). Zum Zeitpunkt d14 erreichte sie das Maximum in der Gruppe der Läsionen der weißen Substanz (M=182,00 / SD=23,31) bzw. an d7 in der Gruppe der Läsionen der grauen Substanz (M=124,75 / SD=47,90) und fiel zum letzten Messpunkt in beiden Gruppen nur wenig ab (Gruppe AL: M=175,75 / SD=51,39 und Gruppe GR: M=124,57 / SD=70,23). Dabei war der allein der Anstieg vom ersten Zeitpunkt h24 zum Maximum sowohl in der AL-Gruppe (p=0,004) als auch der GR-Gruppe (p=0,026) von statistischer Signifikanz. Zwischen den Gruppen zeigten sich zu den jeweiligen Messzeiten jedoch keine statistisch relevanten Unterschiede (Abb. III.VIII.b).

### III.VII.V Population der GFAP<sup>+</sup> Zellen

Die Zahl der gezählten GFAP<sup>+</sup> Zellen im Läsionsbereich zeigte auch auf Höhe Th3 eine lose gruppierte Aktivierung der Zellen an h24 sowohl in der der AL- (M=50,50 / SD=11,98) als auch der GR-Gruppe (M=78,50 / SD=12,15), wobei in letzterer die Zahl höher lag. Zum Zeitpunkt w12 war in beiden Gruppen ähnlich Th9 die Zahl noch weiter gestiegen (Gruppe AL: M=82,25 / SD=10,97 und Gruppe GR: M=116,29 / SD=17,31). Dieser Anstieg über die Zeit erwies sich in der AL-Gruppe (p=0,014) und der GR-Gruppe (p=0,014) als statistisch signifikant. Ebenso erreichte der bei der Analyse des Unterschieds der Zellzahlen zwischen den Gruppen sowohl zum Zeitpunkt d7 (p=0,019) als auch zum Zeitpunkt w12 (p=0,023) dieser statistische Signifikanz, wobei die Läsionen in der grauen Substanz erhöhte Werte zeigten (Abb. III.VIII.c).

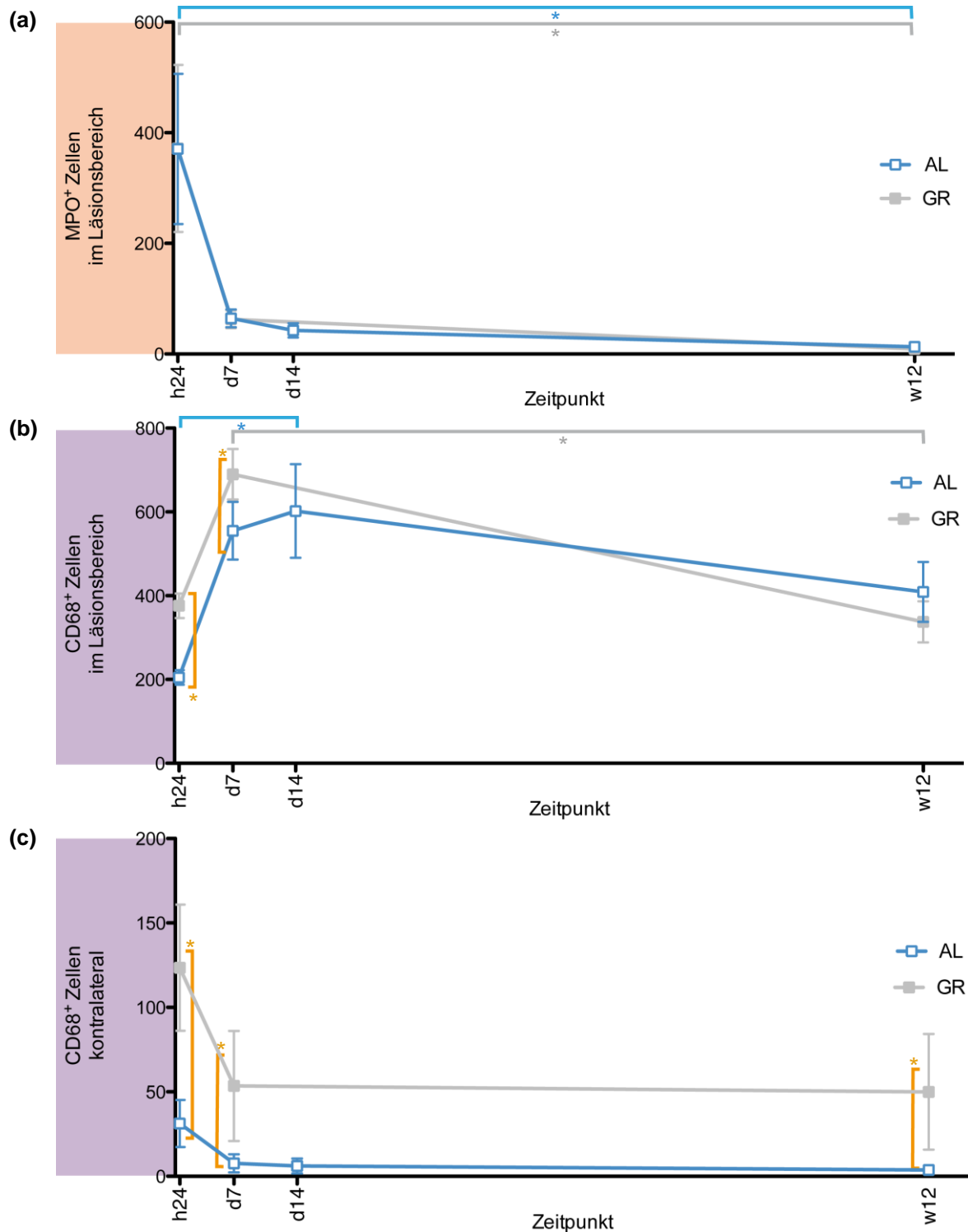
## III.VIII Kinetiken der Zellpopulationen in weißer und grauer Substanz sowie im Vergleich zwischen Th9 und Th3

### III.VIII.I Vergleich der Zellpopulationen in der weißen Substanz zwischen Th9 und Th3

Für die Population der MPO<sup>+</sup> Zellen zeigte sich zwischen den Läsionshöhen Th9 und Th3 kein signifikanter Unterschied in den jeweiligen Gruppen.

Die Anzahl der CD68<sup>+</sup> Zellen im Läsionsbereich zeigte sich dabei zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich in der AL-Gruppe auf Höhe Th9 zu jener auf Höhe Th3, obschon sich für d14 und w12 eine leicht erhöhte Anzahl für letztere beobachten ließ.

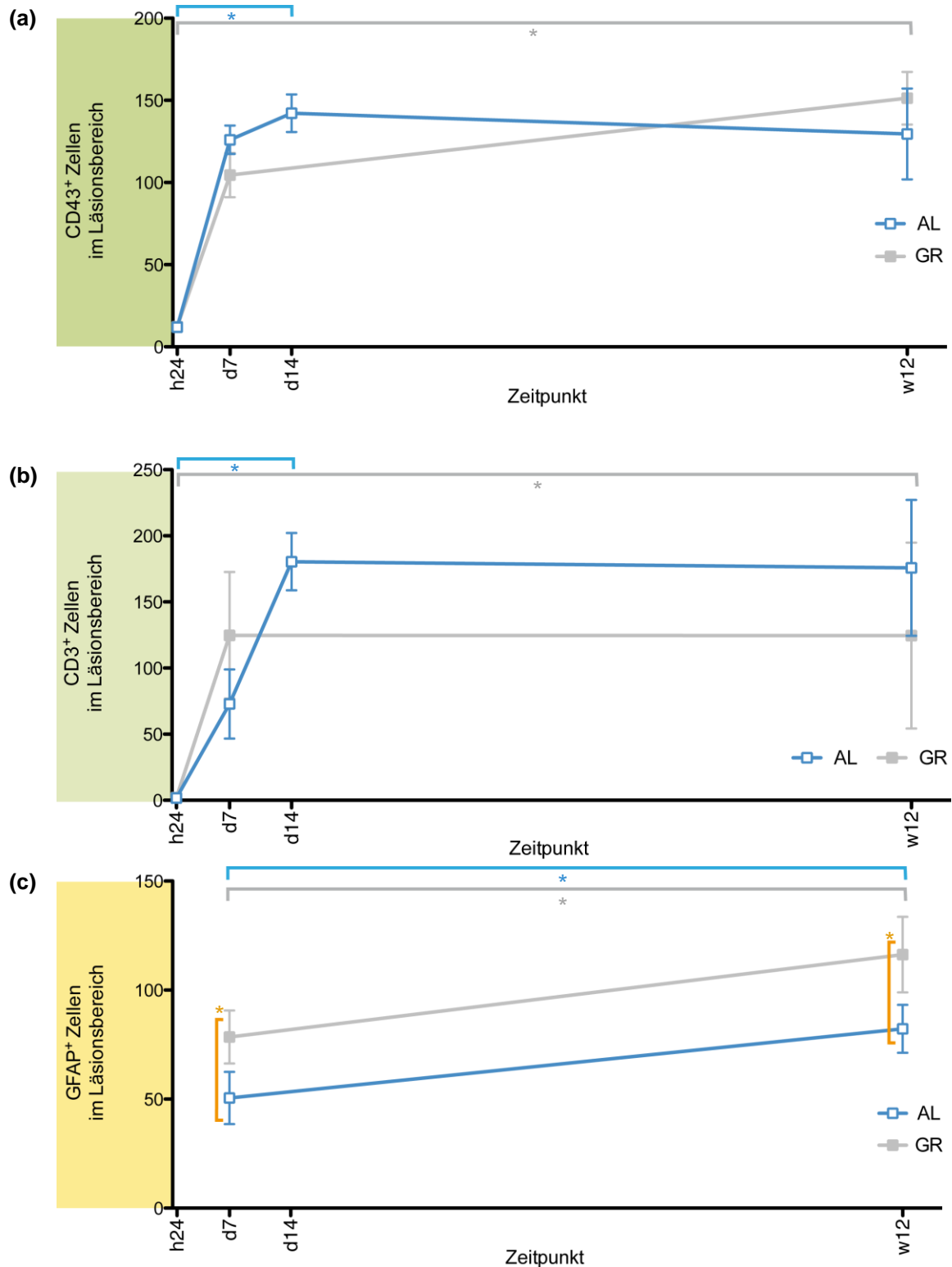
Im Vergleich der CD68<sup>+</sup> Zellen kontralateral der Läsion zeigte sich in der AL-Gruppe nur zum letzten Zeitpunkt w12 ein signifikanter Unterschied (p=0,026) zwischen den Läsionshöhen mit einer höheren Zellzahl auf Th9.



**Abb. III.VII Kinetiken der MPO<sup>+</sup> und CD68<sup>+</sup> Zellen in weißer und grauer Substanz auf Höhe Th3**

(a) Die Zahl der MPO<sup>+</sup> Zellen erreichte auch auf Höhe Th3 ihr Maximum zum Zeitpunkt h24, bis w12 waren nur noch sehr wenige Zellen detektierbar. (b) CD68<sup>+</sup> Zellen erreichten ihr Maximum an d7 (GR-Gruppe) bzw. d14 (AL-Gruppe), woraufhin bis zum letzten Messzeitpunkt der Ausstrom der Zellen langsam erfolgte. Zu den frühen Zeitpunkten zeigte sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. (c) Kontralateral der Läsion zeigte sich auch auf Höhe Th3 eine statistisch signifikant höhere Zahl CD68<sup>+</sup> Zellen in der GR gegenüber der AL-Gruppe zu den frühen Zeitpunkten, wobei dieser Umstand sich hier noch bis w12 beobachten ließ. (Beachte: fehlende Werte für die GR-Gruppe an d14)

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion AL: Läsion in der weißen Substanz GR: Läsion in der grauen Substanz Quadrate stellen die Mittelwerte dar, die Fehlerbalken die Standardabweichungen. Horizontale Balken (blau: AL-Gruppe / grau: GR-Gruppe) über den Kurven zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen zwischen den Zeitpunkten an, vertikale Balken (orange) stellen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen dar



**Abb. III.VIII Kinetiken der CD43<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> und GFAP<sup>+</sup> Zellen in weißer und grauer Substanz auf Höhe Th3**

(a) CD43<sup>+</sup> Zellen waren auch auf Höhe Th3 erst in größerer Zahl ab d7 zu finden und erreichte ihre maximale Anzahl, in der AL-Gruppe an d14, in der GR-Gruppe an w12. Für diese Zellpopulation war zudem kein klarer Trend im Ausstrom der Zellen zu zeigen. (b) Auch CD3<sup>+</sup> Zellen waren zu Beginn nur in geringer Anzahl zu finden, ab d7 stieg ihr Vorkommen im Läsionsbereich erreichte hier in der GR-Gruppe und an d14 in der AL-Gruppe ihren Spitzenwert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen fand sich nicht. (c) Analog zu den Beobachtungen auf Höhe Th9 waren die GFAP<sup>+</sup>-Zellen zum letzten Messzeitpunkt gegenüber signifikant h24 erhöht und zeigten zudem zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede. (Beachte: fehlende Werte für die GR-Gruppe an d14)

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion AL: Läsion in der weißen Substanz GR: Läsion in der grauen Substanz  
 Quadrate stellen die Mittelwerte dar, die Fehlerbalken die Standardabweichungen. Horizontale Balken (blau: AL-Gruppe / grau: GR-Gruppe) über den Kurven zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen zwischen den Zeitpunkten an, vertikale Balken (orange) stellen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen dar

Für die Population der CD43<sup>+</sup> Zellen erreichte der Unterschied zwischen Th9 und Th3 in der Gruppe der Läsionen der weißen Substanz für keinen Zeitpunkt eine Signifikanz. Die Anzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen unterschied sich hier auch nur zum Zeitpunkt d14 ( $p=0,005$ ) signifikant mit einem höheren Wert auf Höhe Th3. Für die Population der GFAP<sup>+</sup> Zellen zeigte sich die höhere Zahl auf Höhe Th3 zum Zeitpunkt d7 in der AL-Gruppe gegenüber jener auf Th9 als statistisch signifikant ( $p=0,02$ ).

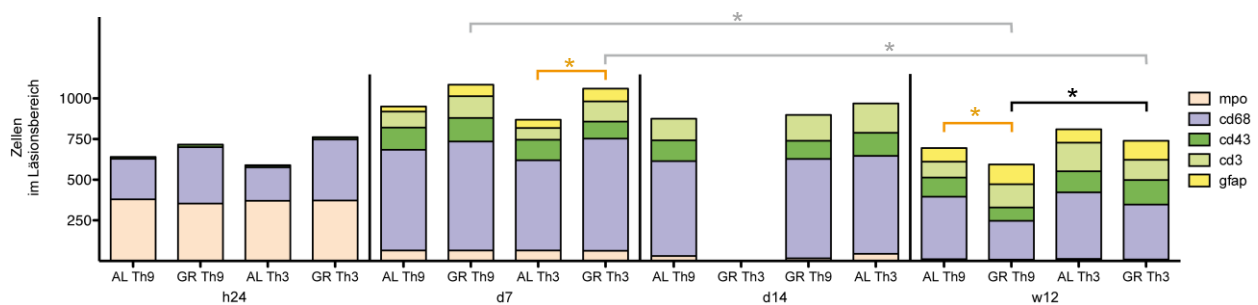
### III.VIII.II Vergleich der Zellpopulationen in der grauen Substanz zwischen Th9 und Th3

Für die Population der MPO<sup>+</sup> Zellen wurde in der GR-Gruppe zwischen Th9 und Th3 an den einzelnen Zeitpunkten kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet, die Kinetiken präsentierten sich annähernd deckungsgleich.

Die Zahl der CD68<sup>+</sup> Zellen zeigte sich zwischen den Läsionshöhen zwar zu allen zu vergleichenden Zeitpunkten auf Höhe Th3 erhöht, statistische Signifikanz erlangte diese Beobachtung jedoch erst an w12 ( $p=0,019$ ).

Für die gezählten CD68<sup>+</sup> Zellen kontralateral der Läsion war dagegen kein solcher Effekt zu messen, obschon auch hier die Zellzahl in der Th3-Gruppe höher lag.

Während der Unterschied der gezählten CD43<sup>+</sup> Zellen sich zum Zeitpunkt w12 statistisch unterschied ( $p=0,019$ ), zeigte sich die Population der CD3<sup>+</sup> Zellen nur zu Messzeitpunkt h24 relevant verschieden ( $p=0,027$ ).



### Abb. III.IX Überblick über die Zellpopulationen im Läsionsbereich

Läsionen in der grauen Substanz rekrutierten unabhängig von der Läsionshöhe im akuten Stadium eine stärkere inflammatorische Antwort verglichen mit Läsion der weißen Substanz, wobei sich dies jedoch nur auf Höhe Th3 zum Zeitpunkt d7 signifikant zeigte ( $p=0,033$ ). Der Abfall der Zellen im Läsionsbereich war zudem nur in der GR-Gruppe, hier sowohl auf Höhe Th9 als auch Höhe Th3 signifikant vom Maximum der Zellen an d7 zum letzten Messzeitpunkt an w12 ( $p=0,002$  und  $p=0,008$ ). An w12 war zudem der Unterschied zwischen der AL- und GR-Gruppe auf Höhe Th9 signifikant mit einer höheren Zellzahl in der weißen Substanz. Ein Unterschied zwischen den Höhen mit statistischer Signifikanz zeigte sich in dieser Analyse nur innerhalb der GR-Gruppe an w12 ( $p=0,004$ ).

(Beachte: Zur statistischen Analyse wurden nur die Populationen der MPO<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup> und GFAP<sup>+</sup> Zellen herangezogen, da der Pool der CD3<sup>+</sup> Zellen zu großem Anteil in der CD43<sup>+</sup> Population beschrieben ist. Zum Vergleich von Zeitpunkten mit und ohne Färbung der GFAP<sup>+</sup> Zellen wurde diese Population zusätzlich von der Analyse ausgenommen. Zudem das Fehlen der GR-Gruppe auf Höhe Th3 an d14)

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion AL: Läsion in der weißen Substanz GR: Läsion in der grauen Substanz Quadrate stellen die Mittelwerte dar, die Fehlerbalken die Standardabweichungen. Balken über den Gruppen zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen zwischen den Zeitpunkten an (blau: AL-Gruppe / grau: GR-Gruppe), innerhalb der Gruppen zwischen Th9 und Th3 (schwarz) sowie zwischen den Gruppen (orange) dar.

In den Läsionen der grauen Substanz war zudem kein läsionshöhenabhängiger signifikanter Unterschied für die Anzahl der GFAP<sup>+</sup> Zellen gegeben.

### **III.IX.i Kinetiken sowie Vergleich der Zellpopulationen in weißer und grauer Substanz unabhängig der Läsionshöhe**

Zur Beschreibung eines möglichen Unterschieds der Inflammations - und Resolutionskinetiken zwischen grauer und weißer Substanz erfolgte im Folgenden die statistische Analyse der Daten nur unter dem Gruppierungsaspekt der betroffenen Substanz in AL- bzw. GR-Gruppe, sodass in diesen beiden Gruppen sowohl auf Th3 als auch Th9 operierte Tiere zusammengefasst wurden.

#### **III.IX.i Population der MPO<sup>+</sup> Zellen**

Die Abnahme der Zahl MPO<sup>+</sup> Zellen zeigte sich auch in der läsionshöhenunabhängigen Analyse zwischen den Zeitpunkten h24 und w12 signifikant (AL-Gruppe:  $p < 0,001$  / GR-Gruppe:  $p < 0,001$ ). Der Vergleich zwischen den beiden Gruppe zeigte nun zu keinem der gemessenen Zeitpunkte signifikante Unterschiede.

#### **III.IX.ii Population der CD68<sup>+</sup> Zellen**

Der beobachtete Abfall der gezählten CD68<sup>+</sup> Zellen erreichte im Vergleich der Zeitpunkte des beobachteten Maximums der Zellen an d7 (Gruppe GR:  $M=680,25$  /  $SD=43,59$ ) bzw. d14 (Gruppe AL:  $M=592,2$  /  $SD=100,25$ ) und dem spätesten Zeitpunkt w12 nun in beiden Gruppen Signifikanz (AL-Gruppe:  $p=0,01$  / GR-Gruppe:  $p < 0,001$ ). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte sich in der läsionshöhenunabhängigen Analyse nun zum initialen Zeitpunkt h24 ( $p < 0,001$ ) statistisch signifikant mit einer höheren Zellzahl in der GR-Gruppe (AL:  $M=237,0$  /  $SD=41,1$  und GR:  $M=356,33$  /  $SD=41,11$ ) sowie zum Zeitpunkt d7 ( $p=0,002$ ) und erneut zwölf Wochen nach der Läsionsinduktion, hier lag die Zahl der CD68<sup>+</sup> Zellen in der GR-Gruppe nun unter derjenigen der AL-Gruppe ( $p=0,01$ ; AL:  $M=392,58$  /  $M=84,07$  und GR:  $M=296,33$  /  $SD=71,07$ ).

#### **III.IX.iii Population der CD43<sup>+</sup> Zellen**

Die Abnahme der CD43<sup>+</sup> Zellen von ihrem gemessenen Maximum erreichte auch unabhängig der Höhe der Läsion in beiden Gruppen keine statistische Signifikanz. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ließ sich zudem weiter nicht zeigen.

#### **III.IX.iv Population der CD3<sup>+</sup> Zellen**

Analog zu den Ergebnissen der CD43<sup>+</sup> Zellen war weder der Abfall der CD3<sup>+</sup> Zellen im Zeitverlauf von ihrem gemessenen Maximum noch der Unterschied zwischen den Gruppen AL und GR statistisch signifikant.

### III.IX.v Population der GFAP<sup>+</sup> Zellen

Die Zunahme der GFAP<sup>+</sup> Zellen von d7 auf w12 zeigte sich auch läsionshöhenunabhängig weiter hochsignifikant ( $p < 0,001$ ), ebenso der Unterschied zwischen den Gruppen mit an beiden Zeitpunkten höherer Zellzahl in der GR-Gruppe gegenüber der AL-Gruppe (jeweils ( $p < 0,001$ )).

## III.x Berechnung der Resolutionindices in weißer und grauer Substanz sowie auf Höhe Th9 und Th3

### III.x.i Umsetzung der Modellanalyse anhand der erhobenen Daten

Für die Berechnung der Resolutionsindices war die Identifizierung des Zeitpunktes des maximalen Zelleinstroms für die einzelnen Zellpopulationen notwendig um die nachfolgenden Zeitpunkte hierzu in Relation zu setzen. Für die MPO<sup>+</sup> Zellen war dies der Zeitpunkt h24 für beide Gruppen und beide Läsionshöhen, entsprechend für die zusammengefasste Analyse. Für die CD68<sup>+</sup> Zellen war dies auf Höhe Th9 der Messpunkt d7, sowie auf Höhe Th3 in der AL-Gruppe d14 und in der GR-Gruppe d7, zudem für die zusammenfassende läsionshöhenunabhängige Analyse an d14 für die AL und an d7 für die GR-Gruppe. Der Maximalwert der CD43<sup>+</sup> Zellen wurde auf Höhe Th9 in der AL-Gruppe an w4 und in der GR-Gruppe an d7 beobachtet sowie auf Höhe Th3 in der AL-Gruppe an d14 und in der GR-Gruppe w12. Für die Population der CD3<sup>+</sup> Zellen war das beobachtete Maximum auf Höhe Th9 in beiden Gruppen w4 und auf Höhe Th3 für die AL-Gruppe d14 und d7 für die GR-Gruppe.

Die Berechnung des Resolutionindexes war somit aufgrund der Gruppenkonstellation (s. auch III.i) und der gemessenen Zeitpunkte mit weniger Messpunkten auf Höhe Th3 mit dem verwendeten Modell nur für die Population der MPO<sup>+</sup> und CD68<sup>+</sup> Zellen auf Höhe Th9 und Th3 sowie der CD3<sup>+</sup> Zellen auf Höhe Th9 valide möglich. Zudem erfolgte die Berechnung unabhängig des Parameters Läsionshöhe für die CD68<sup>+</sup> Zellen.

### III.x.ii Resolutionsindices für die Population der MPO<sup>+</sup> Zellen

Auf Höhe Th9 errechnete sich für die Kinetik der MPO<sup>+</sup> Zellen in der AL-Gruppe ( $R^2=0,91$ ) ein Resolutionsplateau  $R_P$  von 8,1% der maximalen Zellinfiltration bei einem Resolutionsintervall  $R_i$  mit Ausstrom der Hälfte der Zellen des Maximums  $\Psi_{max}$  nach 2,1



Tagen (d). Die GR-Gruppe ( $R^2=0,90$ ) zeigte vergleichbare Werte mit einem Plateau bei 8,4% sowie  $R_i$  bei 1,7d Tagen. Ein relevanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte sich nicht bei überlappenden Konfidenzintervallen.

Für die Läsionshöhe Th3 ergab sich für die AL-Gruppe ( $R^2=0,85$ ) ein  $R_p$  von 7,5% und  $R_i$  von 3,126d sowie für die GR-Gruppe ( $R^2=0,84$ ) ein  $R_p$  von 2,4% und  $R_i=3,6d$ . Die Unterschiede zwischen diesen Gruppen zeigten sich ebenso nicht signifikant.

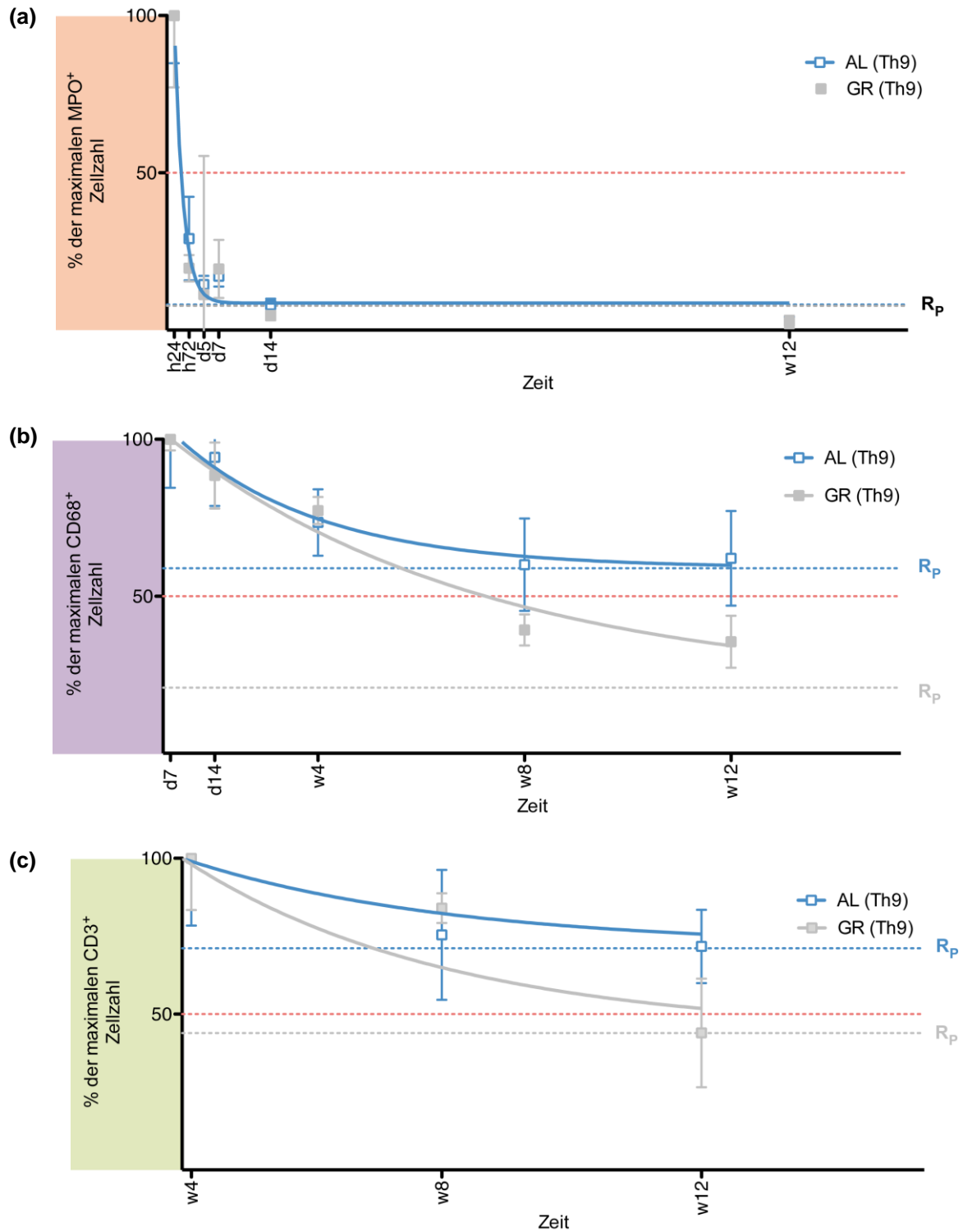
Der Vergleich der jeweiligen Gruppen anhand der Läsionshöhen zeigte sich dabei weder zwischen den Gruppen mit Läsionen in der weißen Substanz noch in denen mit Läsionen in der grauen Substanz statistisch signifikant unterschiedlich.

### III.X.III Resolutionsindices für die Population der CD68<sup>+</sup> Zellen

Auf Höhe Th9 war für die AL-Gruppe ( $R^2=0,58$ ) das Resolutionsplateau  $R_p$  bei 58,9% der Zellen des  $\Psi_{max}$  von d7. Das Resolutionsintervall  $R_i$  war hier somit nicht determinierbar, da nach diesem Modell kein Abfall der Zellen auf die Hälfte des Ausgangswertes zu erwarten war. Für die GR-Gruppe ( $R^2=0,93$ ) auf dieser Höhe ergab sich das  $R_p$  deutlich niedriger mit 20,9% des Maximalwertes und einen  $R_i$  von 44,7d. Auch zwischen diesen Gruppen zeigte sich der Unterschied allerdings nicht statistisch relevant bei konvergierenden Konfidenzintervallen. Für die Läsionshöhe auf Th3 ließen sich zudem für die AL-Gruppe ( $R^2=0,58$ ) das Resolutionsplateau mit  $R_p=63,7%$  sowie für die GR-Gruppe ( $R^2=0,93$ ) das  $R_p=46,6%$  berechnen, obschon hier nur sehr wenige Datenpunkte vorlagen, sodass der Unterschied statistisch nicht relevant war. Die Plateaus für die Läsionshöhen Th9 und Th3 scheinen hierbei jedoch innerhalb der Gruppen ähnlich. In der zusammenfassenden Analyse ohne Berücksichtigung der Läsionshöhe zeigte sich ein  $R_p$  für die AL-Gruppe ( $R^2=0,55$ ) von 64,6% gegenüber einem  $R_p=37,6%$  in der GR-Gruppe ( $R^2=0,89$ ). Dieser Unterschied zeigte sich signifikant.

### III.X.IV Resolutionsindices für die Population der CD3<sup>+</sup> Zellen

Für die Population der CD3<sup>+</sup> Zellen auf Höhe Th9 berechnete sich in der AL-Gruppe ( $R^2=0,34$ ) ein  $R_p$  von 71,1%. Damit war auch für diese Gruppe ein Resolutionsintervall nicht berechenbar. Die GR-Gruppe ( $R^2=0,75$ ) war hier mit einem  $R_p$  von 43,9% zu beschreiben sowie einem  $R_i$  von 63,3d. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ließ sich auch hier nicht zeigen.



**Abb. III.X Resolutionsindices**

Die Berechnung der Resolutionsindices  $R_P$  (Resolutionsplateau) und  $R_i$  (Resolutionsintervall) war aufgrund der erhobenen Daten nicht für alle gezählten Zellpopulationen möglich. (a) Für die  $MPO^+$  Zellen zeigte sich dabei sowohl auf Höhe Th9 als auch Th3 (nicht abgebildet) in je beiden Gruppen ein Plateau der im Gewebe verbliebenen Zellen von unter 10%. (b) Die  $CD68^+$  Zellen zeigten auf Höhe Th9 zwar graphisch deutlich unterschiedliche Kinetiken mit erheblich differierendem  $R_P$  (AL: 58,9% und GR: 19,3%), diese zeigten jedoch keine statistische Relevanz. (c) Die  $CD3^+$  Zellen auf Höhe Th3 ließen in diesem Modell ebenso ein in den Gruppen unterschiedliches  $R_P$  erahnen (AL: kein Abfall der Zellen auf 50% und GR: 43,9%), erreichten jedoch auch keine Signifikanz.

Legende: h / d / w: Stunden / Tage / Wochen nach Injektion AL: Läsion in der weißen Substanz GR: Läsion in der grauen Substanz Quadrate stellen die Mittelwerte dar, die Fehlerbalken die Konfidenzintervalle.  $R_P$ : Resolutionsplateau in AL/GR-Gruppe  $R_i$ : Schnittpunkt mit Graphen gibt Resolutionsintervall  $R_i$  (ablesbar auf der Zeitachse) an.

## IV Diskussion

### IV.1 Überlegungen zur Methodik

#### IV.1.1 Modell der sterilen Inflammation in Kompartimente des Rückenmarks

Zymosan A stellt ein hinlänglich beschriebenes Agens zur Induktion von Inflammation dar, sowohl in peripheren Geweben als auch im Rückenmark [103, 106-111]. Der Mechanismus zur Auslösung der inflammatorische Reaktion via TLR ist dabei einem autoimmunen Geschehen näher als einer traumatischen Verletzung mit einhergehenden starker Verletzung von vaskulären Strukturen und Gewebeerreißung. Zymosan induzierte Inflammationsvorgänge sind dabei für andere Gewebe mit deutlich höheren Konzentrationen (bis 30mg/ml) beschrieben, die hier zu einer Resolution der Entzündungsvorgänge führten [112]. Für die Untersuchung der inflammatorischen Vorgänge nach traumatischer SCI gibt es zudem andere Modelle, die ein Unfallgeschehen adäquater simulieren (s. auch I.v), dabei jedoch bislang keine genaue Schadensjustierung im Rückenmark nach z.B. anatomischem Kompartiment erlauben. Mittels z.B. Transsektionsmodellen sind dabei 4/5-Läsionen des Myelons möglich, die dabei jedoch ein wie in dieser Arbeit angestrebtes Kompartiment-Modell nicht zu unterscheiden vermögen.

Die Unterscheidung von inflammatorischen Vorgängen in weißer und grauer Substanz ist ein stark artifizielles Modell der Reaktion bzw. auch Genese von Entzündung. Besonders nach SCI ist ein ausschließliches Trauma von nur weißer oder grauer Substanz nicht beschrieben, da durch Hämatom-und Ödemformation sowie Schwellung der Schaden in transversaler Ebene das gesamte Myelon betrifft [113].

Die MS galt lange als eine Erkrankung ausschließlich der weißen Substanz, wobei hier inzwischen regelhaft ebenso mikroskopisch umschriebene pathologische Befunde in der grauen Substanz belegbar sind (s. auch I.IV.IV). Durch die anatomisch-funktionelle Verbindung der beiden Kompartimente ist eine strikte Trennung von weißer und grauer Substanz daher bezüglich Pathophysiologien in ein in hohem Maße künstliches Modell zur Klärung anatomischer Grundlagen, dessen direkte Relevanz für klinische Fragestellungen nicht geklärt sein kann.

Dennoch sind sowohl die unterschiedlichen zeitlichen Prozesse der Schädigung in weißer und grauer Substanz [73], wie auch erwähnte Unterschiede in inflammatorischen Charakteristika in Autoimmunprozessen neben den anatomischen Besonderheiten ein Hinweis auf strukturell-funktionelle Eigenheiten, für die klinische

Relevanz hinsichtlich immunmodulatorischer Therapien bestehen kann. Das hier angewandte Modell war somit weniger der Versuch eine möglichst reale Pathologie darzustellen als vielmehr als eine weitere Grundlage zum detailliertem Verständnis von Neuroanatomie und Physiologie des Myelons zu bieten.

### IV.1.ii Stereotaktische Injektion in die weiße und graue Substanz

Die Injektion von Zymosan A in die jeweiligen Kompartimente des Rückenmarks stellte sich als methodische Herausforderung dar. Trotz methodischer Optimierung führten Fehllokalisationen der Injektion zu einer hohen Varianz bezüglich der Zahl der in die einzelnen Gruppen eingeschlossenen Fälle. Vor allem für die Läsionsinduktion in die graue Substanz zeigte sich die Schwierigkeit der präzisen Navigation der Pipette. Mit Eintritt dieser in das Rückenmarksgewebe stellte jenes eine "BlackBox" dar, die Vorgänge hier konnten erst nach der histologischen Aufarbeitung nachvollzogen werden. Dies führte dazu, dass die definitive Gruppeneinteilung nur retrospektiv erfolgen konnte.

Eine standardisierte Bildgebung während der Injektion mit z.B. unmittelbarer sonografischer Kontrolle oder via MRT in engem zeitlichen Abstand zur Operation stellte eine denkbare Optimierung der Methodik dar, stand jedoch für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

### IV.1.iii Fallzahlen und Gruppen

Die Zielzahl für die einzelnen Gruppen pro Zeitpunkt war mindestens  $n=6$  geplant. Aufgrund der bereits beschriebenen methodischen Herausforderungen wich die tatsächliche Konstellation der Gruppen jedoch davon teils erheblich ab mit z.B. dem Ausfall der GR-Gruppe am Zeitpunkt d14. Dies schränkte die statistische Aussagekraft der vorliegenden Arbeit naturgemäß ein. Um die Zahl der tierexperimentellen Versuche zu senken, wurde zudem auf Höhe Th3 auf einige Messzeitpunkte verzichtet. Dies geschah auf Basis vorhandener Literatur zu Kinetiken der zu färbenden Zellpopulationen [90, 114-117] sowie einer Zwischenauswertung der bis dato erhobenen Daten. Dabei wurden jedoch nicht alle Färbungen durchgeführt, so dass für einige Zellpopulationen das  $\Psi_{\max}$  nicht bekannt war. Die erhobenen Daten für die Gruppen der Läsionshöhe Th3 weisen somit teilweise unvollständige Kinetiken auf, sodass eine deskriptive Analyse für die Läsionshöhe und ein Vergleich der Läsionshöhen auf Basis der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt möglich ist.

#### IV.I.IV Einschlusskriterien und quantitative Analyse

Die aufgestellten Einschlusskriterien sollten sicherstellen, dass eine valide Trennung von Läsionen in der weißen und grauen Substanz möglich war. Ein Übertritt des inflammatorischen Geschehens im Läsionsgebiet auf das jeweils andere Kompartiment war dabei jedoch vor allem zu den späten Zeitpunkten zu beobachten, sodass dieser Umstand berücksichtigt werden musste. Vor allem die graue Substanz stellt anatomisch ein kleineres Kompartiment dar, bei dem eine Ausbreitung des Prozesses eine Involvierung der weißen Substanz wahrscheinlich machte. Hier erfolgte daher eine Ausweitung der Zählung in die andere Substanz für eine festgelegte begrenzte Fläche. Dies war dementsprechend mit einer Lockerung einer strikten Trennung der beiden Läsionsbereiche verbunden. Die verwendete Methode zur Zellzählung könnte über diesen Aspekt zu einer Verfälschung der tatsächlich vorhandenen Werte geführt haben, wobei jedoch die nicht sicher ist, wie die inflammatorische Reaktion der Nachbarsubstanz zu werten wäre: sowohl eine Reaktion nach den intrinsischen Eigenschaften der ursprünglichen Substanz als auch denen der eigenen wäre denkbar, wobei am wahrscheinlichsten eine Kombination erscheint, sodass die Auflösung der strikten Trennung in diesen Grenzgebieten physiologisch legitimiert erscheint.

Zudem war eine Verblindung zur Zellzählung für die Kategorie der betroffenen Substanz nicht möglich, da zur Auswertung die anatomischen Grenzen betrachtet werden mussten. Eine Verblindung für die einzelnen Zeitpunkt und die Läsionshöhe erfolgte jedoch. Auch erfolgte die Auswertung nur durch den Autor dieser Arbeit, der sowohl den Hypothesen als auch dem histologischen Material nicht verblindet war. Zur Verbesserung der methodischen Qualität wurden dabei mehrere Zellzählungen durchgeführt.

#### **IV.II Postoperative sensomotorische Funktion als Maß neurologischer Ausfälle**

Analog zu dem bereits beschriebenen Einsatz der Zymosaninjektion im Rückenmark [104], waren keine grobmotorische Auffälligkeiten bei den operierten Tieren zu beobachten. Die histologisch zu erkennenden Architekturstörungen im Rückenmark legen jedoch sowohl motorische als auch sensible Ausfälle neurologischer Funktionen nahe, die mit dieser Methode der Beurteilung nicht erfasst wurden. Eine tierexperimentelle Ganganalyse, wie sie in der Rückenmarks – und Arthroseforschung vielfach beschrieben ist, wäre die geeignetere Herangehensweise zur Aufdeckung dieser Störungen, stellte jedoch nicht den Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

#### **IV.III Magnetresonanztomographie zur Läsionsdarstellung**

Die vorliegende Arbeit hatte bezüglich der MRT das Ziel, zu evaluieren, ob eine Darstellung der Läsion gelänge: dabei erwies sich die MRT als adäquate Bildgebung, um die Läsion darzustellen und auch eine Einteilung in die Gruppen bereits vor histologischer Betrachtung vorzunehmen. Die aufgrund eingeschränkter Sensitivität des gewählten Verfahrens falsch-negativen Befunde, würden sich bei dünnerer Schichtung höchstwahrscheinlich noch reduzieren lassen, obschon dies die Zeit des Verbleibs der Tiere im Tomografen verlängern würde. Zudem müssten die Tiere einer erneuten mit erhöhter Belastung einhergehender Kurznarkose unterzogen werden, die daher nicht zu unmittelbar an die Operationen anschließen dürfte. Insgesamt könnte die MRT damit zukünftig dennoch das Mittel für eine zeitnahe Bildgebung darstellen, welche das experimentelle Setup methodisch verbessern könnte.

#### **IV.IV Aussagekraft der Morphometrie des Läsionsbereiches**

Die Vermessung der Läsionsfläche zeigte, dass die Initiailläsion zwischen grauer und weißer Läsion nicht signifikant unterschiedlich war und somit ein Vergleich dieser Läsion zulässig ist. Gleichzeitig war jedoch eine teilweise erhebliche Schwankung der Läsionsgrößen an einzelnen Zeitpunkten zu beobachten. Im Zeitverlauf zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der Ausbreitung der Läsion zwischen den Gruppen. In der weißen Substanz war dabei jedoch die Ausdehnung der Läsion von h24 bis zum Zeitpunkt w4 auf Höhe Th9 bzw. d14 auf Th3 deutlich ausgeprägter gegenüber der induzierten Läsion in der grauen Substanz. Ähnliche Beobachtungen sind radiologisch berichtet, mit einem schnelleren, endgültigen Schadensprozess in der grauen Substanz und einem Nachhinken der weißen Substanz in einem Tierversuch mit Impaktor-Modell [73]. Vermessungen von geschädigten Arealen in grauer oder weißer Substanz nach Trauma in einer anderen Studie [116] zeigten überdies ebenso keine auffälligen Unterschiede in der Ausdehnung der Schädigung. Obschon die vermessene Fläche nicht als eindeutiger Parameter für das inflammatorische Geschehen gewertet werden kann, lässt die klare Zunahme der Läsionsfläche nach dem initialen Stimulus jedoch die Mechanismen des Sekundärschadens vermuten. Der Maximalausprägung der Läsion nach vier Wochen folgte eine deutliche Abnahme der gemessenen Fläche der Architekturstörung, die auch mit einer deutlichen Abnahme von Inflammationszellen im Gewebe einherging. Da die gemessene Fläche jedoch nicht dem tatsächlichen

Funktionsstörungen / - ausfällen von neuronalen Strukturen im Gewebe entsprechen muss, welche mikroskopisch nur mit z.B. Färbungen von Myelinstrukturen sichtbar wären, wird das Ausmaß der sekundären Schädigung der Strukturen besonders in der weißen Substanz wahrscheinlich unterschätzt worden sein. Als Parameter der Vergleichbarkeit der induzierten Läsionen sowie als Verlaufspareter der Entwicklung der Läsion zeigte sich die Vermessung der Läsionsfläche nahezu kongruent mit der allgemeinen Kinetik der gefärbten Zellpopulationen.

#### **IV.v Einordnung der allgemeinen Kinetiken der gefärbten Zellpopulationen**

##### **IV.v.i Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten waren nach 24 Stunden in großer Zahl im Läsionsbereich zu finden, wobei dieser Zeitpunkt auch das Maximum der Infiltration dieser Zellen darstellte und die Zahl nachfolgend rasch absank. Diese Beobachtung stimmt mit histopathologischen Analysen verschiedener Modelle der SCI in Nagetieren [115] und auch bei verunfallten Menschen [116] sehr stark überein. Obwohl in diesen Fällen der Mechanismus der Schädigung traumatischer Genese mit nachfolgender erheblicher Schädigung der BSCB und damit Blutungen war, während sich das Schadensmodell der vorliegende Arbeit in hohem Maß traumaunabhängig gestaltete, ist diese Kongruenz am ehesten damit zu erklären, dass die Invasion neutrophiler Granulozyten weniger über einen Zusammenbruch vaskulärer Strukturen als durch aktive Rekrutierung z.B. mikroglialer Strukturen gesteuert wird [118] und Zymosan A zudem direkt als Chemokin und Antigen zur Phagozytose durch Granulozyten dient [119]. Auch die beobachtete sehr geringe Zahl bis vollständige Abwesenheit neutrophiler Granulozyten im chronischen Geschehen ist ähnlich beschrieben [90, 115], sodass diese Population zwar eine wichtige Rolle im akuten Entzündungsgeschehen spielt, im chronischen Stadium der Neuroinflammation physiologisch jedoch kaum vorzufinden ist.

##### **IV.v.ii Makrophagen**

Aktiviert Mikrogliia und Makrophagen stellten die Zellpopulation dar, die in großer Zahl schon nach einem Tag das Gewebe infiltrierten und bis zum letzten Messpunkt nach 12 Wochen noch in relevantem Ausmaß vorzufinden war, wobei ihr Maximum zwischen 7 bis 14 Tage nach der Injektion zu beobachten war. Sowohl in tierexperimentellen Studien [90, 120] als auch humanen [116] sind ähnliche Ergebnisse beschrieben bei variierenden Zeitpunkten der maximalen Infiltration von ein bis zwei Wochen nach der

Verletzung im Tiermodell bis zu einem andauernden Anstieg der Zellen noch Monate nach der Verletzung in einer Studie mit Patienten nach SCI [116]. Makrophagen sind damit einer der wichtigsten Akteure der akuten und chronischen Neuroinflammation, deren Rolle vermutlich durch ihre jeweilige subpopulationsspezifische Polarisation definiert wird [121, 122].

### IV.V.III Lymphozyten

Die Zahl der Lymphozyten nahm wie in anderen Studien berichtet auch in der vorliegenden Arbeit erst langsam zu und erreichte ihren Maximalwert nach Wochen. Dabei blieb die Zahl der Zellen jedoch entgegen diesen Studien [90, 115] noch bis zum letzten Messzeitpunkt, d.h. im chronischen Stadium, sowohl für die CD43<sup>+</sup> Zellen (T-Zellen und Plasmazellen) als auch für die CD3<sup>+</sup> Zellen (selektiver pan-T-Zellmarker) deutlich erhöht. Für humane SCI ist dabei eine ähnlich andauernde Erhöhung bekannt [123]. In Tiermodellen sind dabei biphasische Kinetiken der T-Zellen mit einem Abfall nach sieben Tagen und einem erneuten Anstieg nach zwei Wochen beschrieben, wobei keine Zeitpunkte jenseits von sechs Wochen erfasst wurden [123]. Zudem gilt die Population der T-Zellen als die wichtigste in der Pathologie der MS und des Mechanismus von Autoimmunität im ZNS [124, 125], wobei beide durch chronische bzw. chronisch-intermittierende Inflammationsgeschehen charakterisiert sind.

### IV.V.IV Astrozyten

Die nach der Zymosaninjektion evozierte astrozytäre Aktivierung wurde zwar nur an zwei Zeitpunkten, dem akuten Geschehen an d7 und dem chronischen Geschehen zu w12, gemessen, dennoch zeigte sich hier ein Unterschied im Zeitverlauf mit deutlich erhöhten Zellzahlen nach 12 Wochen. Für das experimentelle Modell der SCI sind bei Ratten dabei verschiedene Kinetiken [123] beschrieben, die maximale Aktivierung lag demnach zwischen 7 Tagen und vier Wochen, wobei die Anzahl dieser Zellen auch im chronischen Geschehen nur langsam abnahm oder konstant erschien. Eine fehlende Erhebung der maximalen astrozytären Aktivierung in der vorliegenden Arbeit ist daher möglich, sodass statt der Implikation eines Anstiegs dieser Zellpopulation bis w12 vielmehr ein vorhergehender, nicht erfasster Abfall zu Grunde liegen könnte. Astrozyten sind dabei eng assoziiert mit neuroprotektiven Funktionen wie der Limitierung des Influx von peripheren Immunzellen [126], der T-Zell Aktivierung [127] sowie der Limitierung der Aktivierung von Mikroglia und Formierung der glialen Narbe und damit Eingrenzung der Schadensausbreitung [128].



## **IV.vi Analyse des Vergleichs der Kinetiken von weißer und grauer Substanz und der Läsionshöhen Th9 und Th3**

### **IV.vi.i Neutrophile Granulozyten**

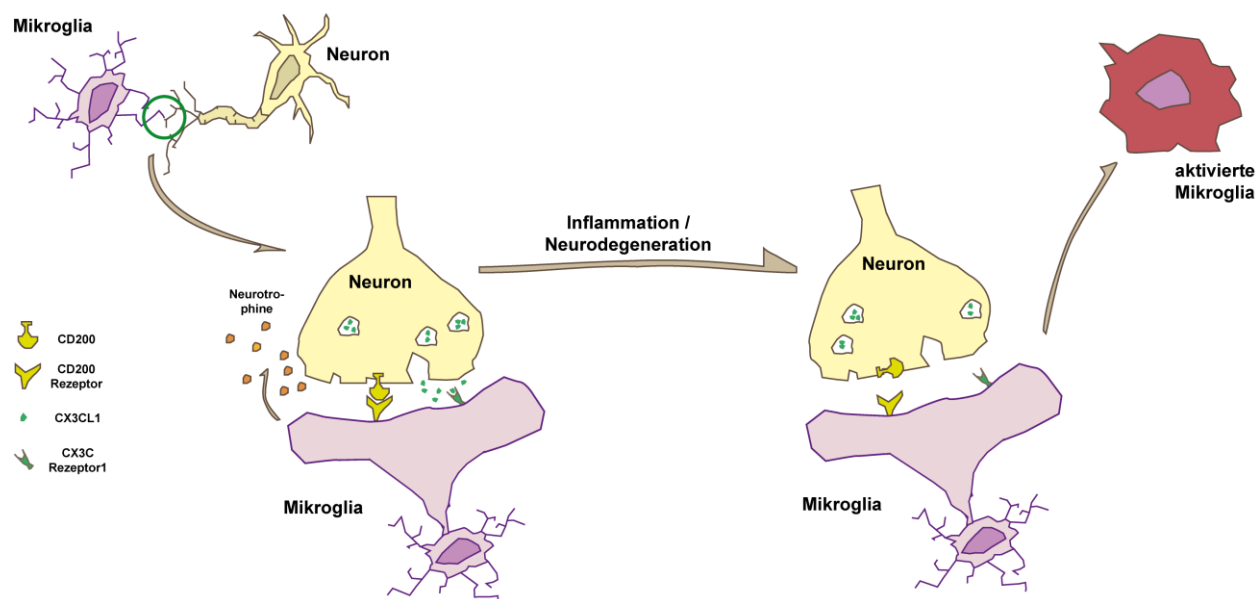
Neutrophile Granulozyten waren auf Höhe Th9 und Th3 die Zellpopulation mit dem schnellsten Anstieg in sowohl grauer als auch weißer Substanz, deren Maximalwert zum Zeitpunkt h24 sich nicht signifikant unterschied. Die Rekrutierung der Neutrophilen findet dabei vor allem über Zytokine der aktivierten Mikroglia statt, dem Zusammenbruch der BSCB und der Freisetzung von Zelldebris und beginnt Minuten bis Stunden nach einem initialen Stimulus [129]. Ein Unterschied in der Kinetik der Rekrutierung in weißer und grauer Substanz kann somit durch einen ersten Messzeitpunkt 24 Stunden nach der Injektion bereits übersehen worden sein. Ein Unterschied im Abfall der Zellen war zudem an einzelnen Zeitpunkten sichtbar, wobei an h72 und d14 signifikant höhere Zellzahlen in der weißen Substanz zu finden waren, die Unterschiede nach zwölf Wochen jedoch nicht länger relevant waren. Daher ist es möglich, dass bereits bei der Population der Zellen mit der geringsten Halbwertszeit im Gewebe leichte Unterschiede in der Inflammations- und Resolutionskinetik auf strukturelle Verschiedenheiten hindeuten, diese in dieser Zellpopulation in dem gewählten experimentellen Design jedoch nicht vollständig sichtbar gemacht werden konnten: Für die Mehrzahl der Granulozyten gilt als Effluxmechanismus aus dem inflammatorischen Milieu weniger eine aktive "umgedrehte Transmigration" als vielmehr die Apoptose und anschließende Phagozytose durch z.B. Makrophagen [129]. Da diese zu diesen Zeitpunkten in beiden Substanzen in großer Zahl vorhanden waren und neutrophile Granulozyten als Zellpopulation im chronisch verletzten Rückenmark kaum vorzufinden sind, liegt ihre Relevanz möglicherweise weniger in der absoluten Zellzahl als in dem Milieu aus Zytokinen (u.a. Azurocidin, LL37, Cathepsin G, IL-6) , das sie mitprägen [22, 129]. Zwischen den Läsionshöhen zeigte sich zudem ebenso kein relevanter Unterschied des Maximums oder des Abfalls, sodass für diese Zellgruppe insgesamt in Parametern der Resolution kein relevanter Unterschied angenommen werden kann. Inwiefern sie jedoch das Ausmaß eines Resolutionsdefizit jenseits ihrer eigenen Präsenz im Gewebe mitprägen, ist nicht geklärt.

### **IV.vi.ii Makrophagen**

Die Dynamik der Aktivierung der Mikroglia und die Rekrutierung von Makrophagen zeigte sich zwischen den Läsionen der weißen und grauen Substanz im akuten

Inflammationsstadium 24 Stunden nach der Injektion höchst unterschiedlich, mit einer signifikant höheren Zellzahl in der grauen Substanz auf sowohl Höhe Th9 als auch Th3 sowie läsionshöhenunabhängig. Ähnliche Beobachtungen sind beschrieben, wobei hier der Schaden nicht unter Beachtung der Kompartimente gesetzt wurde [130]. Im Verlauf bis zur maximalen Infiltration der Zellen an d7 verlor sich die Signifikanz des Unterschieds, obschon die GR-Gruppe weiter höhere Zellzahlen aufwies. Dies impliziert die Vergleichbarkeit des Entzündungspotentials des injizierten Zymosan-Volumens und eine inflammatorische Stereotypie zwischen den Kompartimenten bezogen auf einen vergleichbaren Stimulus im akuten Geschehen. Die Abnahme der Zellen zeigte sich in seiner Kinetik wieder unterschiedlich, bis am letzten Zeitpunkt auf Höhe Th9 nicht jedoch auf Th3 erneut ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen war, wobei die Anzahl der Makrophagen in der AL-Gruppe auch auf TH3 höher lag. Die Resolutionsplateaus auf Th9 unterschieden sich deutlich (AL-Gruppe:  $R_P=58,9\%$  / GR-Gruppe:  $R_P=19,3\%$ ).

Makrophagen und aktivierte Mikrogliazellen gelten als eine der wichtigsten Zellpopulationen im Rahmen der Neuroinflammation [66, 131] und für die Einleitung der resolutiven Phase nach Entzündung [23, 26]. Ob ihre proinflammatorischen oder ihre proresolutiven Kapazitäten überwiegen, kann anhand ihrer Polarisierung abgeschätzt werden. Dabei überwiegen jedoch während der akuten und den frühen Stadium der chronischen Inflammation im ZNS die proinflammatorisch geprägten Typen [132]. Da zudem anhaltende Inflammation die enge mikroglial-neuronale Interaktion unterbrechen (s. Abb. IV.1) und damit aktivierte, makrophagentypische Zellen im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus hervorbringen kann [132], wird bei einer stärkeren Anwesenheit dieser Zellpopulation vor allem von nachteiligen Effekten ausgegangen. Obschon in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, ob Unterschiede in Resolutionskinetiken zu progressiven Gewebeschäden oder Funktionsstörungen führen, lässt sich aus dem deutlich stärker ausgeprägtem Resolutionsdefizit auf Höhe Th9 der weißen Substanz dennoch zumindest die Überlegung ableiten, dass Entzündungsgeschehen wie sie z.B. in der MS beobachtet werden, zu einem Anteil an der verminderten Kapazität der Ausschleusung von Zellen verglichen mit peripheren Geweben bzw. Strukturen ausserhalb des Nervensystems liegen kann. Makrophagen und Mikroglia sind vielfach als Entzündungszellen in akuten als auch chronischen Pathologien der MS beschrieben [55, 133, 134]. Die nur geringe, lange Zeit unbekannte



#### **Abb. IV.1** Interaktion von Mikroglia und Neuron

In physiologisches Milieu wird über die neuronale Expression von Fraktalkin (CX3CL1) und CD200 und die mikrogliale Expression der entsprechenden Rezeptoren eine enge Interaktion dieser Zellen möglich. Durch die Ligand-Rezeptor Aktivierung werden im Folgenden in den Mikrogliazellen über Phosphatasen die Kaskaden zur Downregulation des Immunphänotyps aktiviert. Chronische Inflammation unterbricht die enge Interaktion der Zellen und die immunsupprimierenden Kaskaden, sodass die Mikroglia in den aktivierten Status übergehen kann.

Legende: Abb. nach [132]

Ausprägung der MS in der grauen Substanz könnte daher zumindest in Teilen durch die hier effektiver funktionierende Ausschleusung von Immunzellen erklärbar sein. Demgegenüber stünde die höhere Tendenz der Akkumulation von z.B. Makrophagen in der weißen Substanz.

Im Vergleich der Läsionshöhen Th9 und Th3 zeigten sich für die Makrophagenpopulation ansatzweise unterschiedliche Kinetiken: Das Maximum der Zellen war für die AL-Gruppe hier erst zum Zeitpunkt d14 zu beobachten, bei gleichzeitigem Ausfall der GR-Gruppe für diesen Messpunkt. Zwölf Wochen nach der Injektion lag die Zahl der Zellen noch höher als zum selben Zeitpunkt auf Höhe Th9, erreichte jedoch zu der jeweiligen Gruppen auf Höhe Th9 keine statistische Signifikanz. Die hier erhobenen Daten für Th3 mit der geringeren Zahl an Messzeitpunkten lassen insgesamt somit einen Vergleich der Läsionshöhen nur bedingt zu.

Die deutlich höhere Zahl von Makrophagen kontralateral der Läsionsstelle in der grauen Substanz ist in Teilaspekten sicherlich durch die räumlich engere Verbindung der beiden Hälften erklärbar. Da jedoch die Aktivierung auch kranial und kaudal der Läsion nach diesem Muster beobachtbar und zudem auch bei Läsionen der weißen Substanz vorhanden war, lässt sich die Vermutung stellen, dass dieses Kompartiment einen der Hauptpfade für die Immigration von Makrophagen in das Myelon bildet. Dies erklärte zum einen die raschere Kinetik der Makrophagen im Vergleich der Gruppen und auch

den vermeintlichen Ausstrom der Zellen im Zeitverlauf. Danach wären diese am ehesten zum eigentlichen Läsionsort migriert.

#### IV.VI.III Lymphozyten

Aktivierte Lymphozyten fanden sich im Läsionsbereich erst nach einer Woche in größerer Zahl. Dabei fanden sich kaum Unterschiede zwischen den Läsionen der weißen und grauen Substanz. Auf Höhe Th3 schien die Zahl zudem zu der auf Höhe Th9 zwölf Wochen nach der Injektion erhöht. Deutlich war das Verbleiben eines großen Anteils dieser Zellen auch zwölf Wochen nach der Läsion im Gewebe, wobei sie vor allem am Randwall zu finden waren. Da das CD43-Antigen von den meisten T-Zellen exprimiert, aber auch als Marker für Neutrophile Granulozyten benutzt wird [135], sowie auf aktivierten B-Zellen und Plasmazellen, NK-Zellen und einigen Makrophagen gefunden wird [136, 137], ist es anzunehmen, dass die quantitative Analyse der Population trotz Heranziehung morphologischer Kriterien zu heterogen war und der Zellpool zu groß, um an dieser Stelle eine Bewertung der Kinetik vorzunehmen.

CD3<sup>+</sup> T-Zellen waren sieben Tage nach der Läsion in der grauen Substanz stets in größerer Anzahl als in der weißen Substanz zu finden, sowohl auf Höhe Th9 als auch Th3. Erst zum letzten Messzeitpunkt lag die Zahl der T-Zellen in der weißen Substanz höher. Diese Beobachtung erreichte jedoch nie statistische Signifikanz. Zwischen Th9 und Th3 dagegen war kein Unterschied zu finden, obschon hier eine langsamere Kinetik ähnlich der Makrophagen nicht auszuschließen ist. Es ist denkbar, dass zur Analyse der Kinetik der T-Zellen ein Zeitpunkt später als w12 diese präziser entschlüsseln könnte, da 12 Wochen nach der Injektion die Zahl der T-Zellen in der AL-Gruppe erstmalig unter der GR-Gruppe lag. Basierend hierauf berechnete sich das Resolutionsplateau für die AL-Gruppe auch höher.

Die abschließende Beurteilung, inwiefern die Zahl der T-Zellen zwischen Läsionen der weißen und grauen Substanz entscheidend unterschiedlich ist, kann an dieser Stelle nicht gefällt werden, wobei sich der leichte Trend zu einer niedrigeren T-Zellzahl in der grauen Substanz in der chronischen Läsion feststellen lässt. Dementsprechend könnte dies analog zu den Makrophagen ein weniger ausgeprägtes Milieu zu andauernder Entzündung und mit Schwerpunkt Autoimmunität und Zytotoxizität für neuronales Gewebe darstellen[68]. Weiter ließe sich auch hier der Bogen zur MS schlagen, bei der T-Zellen in der Pathologie eine erhebliche Rolle spielen und bei der zwar

inflammatorische Vorgänge in der grauen Substanz bekannt sind [55], das klinische Bild jedoch durch Läsionen der weißen Substanz bestimmt wird. Da für die T-Zellen zudem mannigfaltige Subgruppen mit unterschiedlichen Effekten auf ZNS-Gewebe beschrieben sind [67-70, 123], wäre eine Aufschlüsselung der hier gewonnenen Daten nach ihren spezifischen Polarisierungen entscheidend.

#### IV.VI.IV Astrozyten

Zwischen Läsionen der grauen und weißen Substanz zeigte sich ein deutlicher Unterschied der astrozytären Aktivierung zu den Zeitpunkten d7 und w12 sowohl auf Höhe Th9 als auch Th3. Eine Studie beobachtete eine stärkere GFAP+ Aktivierung in der weißen Substanz gegenüber der grauen, allerdings in einem Modell der TBI mit Stichverletzung bei Ratten [138]. Bekannt sind morphologische Unterschiede [139] zwischen Astrozyten der grauen und weißen Substanz, zudem ist das Netzwerk kommunizierender Astrozyten in der grauen Substanz in Mäusen als deutlich dichter ausgeprägt beschrieben [140].

Astrozyten gelten als die wichtigste Population in der Formation der glialen Narbe [71], wobei sie über diese Funktion als wichtiges Hindernis eines axonalen Wiederaussprossens nach Schädigung gelten. Dennoch wurden ebenso neuroprotektive [72] Eigenschaften beschrieben, in denen reaktive Astrozyten zur Erholung neuronaler Funktion beitragen können [141]. Daher könnte eine erhöhte Zahl von Astrozyten begünstigend auf Entzündungsvorgänge wirken, in dem sie diese effektiver an ihrer Ausbreitung hindern würde. Da Astrozyten zudem über die Homöostase des Gewebes wachen, könnte dieser Mechanismus nicht nur auf zellulärer, sondern molekularer Ebene stattfinden. Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die Hinweise für die effektivere Resolution in der grauen Substanz: danach wäre denkbar, dass Astrozyten über eine Verhinderung der Rekrutierung neuer Immunzellen zum Läsionsort und die Schaffung eines weniger inflammatorischen Milieus proresolutiv wirken. Dafür spricht, dass für Astrozyten in der weißen Substanz und weniger in der grauen Substanz Schäden in der neurovaskulären Kommunikation in einer Studie experimenteller EAE beschrieben sind. Zusätzlich war hier eine erhöhte astrozytäre Aktivierung ohne MS-typische Läsionen in der grauen Substanz festgestellt worden, welche die Autoren als neuroprotektiv deuteten [142].

#### IV.VI.v Hypothetische Konsequenzen aus Inflammation – und Resolutionsunterschieden zwischen weißer und grauer Substanz

Im akuten Entzündungsgeschehen scheint die graue Substanz des Rückenmarks eine wichtige Eintrittspforte für Immunzellen zu sein, unabhängig davon, wo die Läsion lokalisiert ist. Demnach wäre es denkbar, dass Inflammation im Rückenmark stets beide Kompartimente betreffen würde, da auch eine isolierte Schädigung der weißen Substanz die andere zumindest aktivieren würde. Bei gegebenen Resolutionsdefizit und langandauernder Inflammation könnte dann die ursprünglich nicht betroffene graue Substanz in gewissem Ausmaß mitbetroffen sein. Dies wäre ein weiterer Aspekt der mikroskopischen Entzündungsvorgänge in der grauen Substanz bei der MS.

Zudem ist beschrieben, dass Schäden der weißen Substanz im Myelon für klinische Ausfallerscheinungen relevanter scheinen als jene der grauen Substanz [143]. Obschon es kaum gelingen kann, diese beiden Schäden unabhängig voneinander zu sehen, scheinen Läsionen der weißen Substanz bereits über die Mechanismen von axonalem Verlust zu ausgeprägten neurologisch relevanten Schäden zu führen. Nimmt man nun das verminderte Vermögen der effektiven Resolution an, könnte dies einen weiteren Ansatzpunkt darstellen, die Entzündungsvorgänge in der weißen Substanz gezielt lokal zu modulieren.

#### **IV.vii Charakteristika der Neuroanatomie und Neurophysiologie des Rückenmarks als Grundlage beobachteter Unterschiede in Inflammation und Resolution**

##### IV.vii.i Vaskularisierung und Blut-Rückenmark-Schranke

Die unterschiedliche Vaskularisierung des Rückenmarks ist beschrieben (s. I.I.IV). Die ausgeprägte Reaktion der grauen Substanz für die Makrophagenpopulation könnte dabei ein Hinweis sein, dass die Rekrutierung der Immunzellen durch die höhere Kapillardichte hier effektiver gelingt, da es bekannt ist, dass dem Blut entstammende Monozyten an Inflammationsgeschehen im Rückenmark beteiligt sind [144]. Auch neutrophile Granulozyten waren kranial und kaudal der Läsion vor allem in der grauen Substanz zu finden, wobei ihr Influx am Ort der Läsion bei einem frühesten Zeitpunkt 24h nach der Injektion am ehesten zeitlich nicht erfasst wurde. Die Beobachtung, dass vor allem die Hinterhörner der grauen Substanz an der allgemeinen Aktivierung jener am wenigstens Anteil nehmen, spräche ebenso für ein Konzept des starken Einflusses der Vaskularisierung, da diese hier als Areal einer Wasserscheide von *a spinalis posterior* und *a spinalis anterior* am wenigsten ausgeprägt sind [6, 145, 146]. Ein Areal

der Wasserscheide mit schlechtester Versorgung in der weißen Substanz ist zudem auch in einem der hier verwendeten Methodik ähnlichem Modell als Prädispositionareal für axonalen Verlust identifiziert worden [147].

Auch zwischen den Läsionshöhen könnten die ansatzweise sichtbaren Effekte von verlangsamter inflammatorischer Kinetik und höher ausgeprägten Resolutionsdefizit auf das Phänomen der Wasserscheide der arteriellen Blutversorgung des Myelons hinweisen, wonach das obere thorakale Rückenmark dasjenige Segment entlang der Neuraxis darstellt, dass die wenigste vaskuläre Versorgung aufweist [148]. Die Vaskularisierung könnte demnach ein zentrales anatomisches Korrelat für Resolution und gleichzeitig Voraussetzung sein. Dieses Konzept ergänzt sich zu dem, das ZNS-Verletzungen mit dem Milieu chronischer Wunden vergleicht [149], für die, u.a. eine inadäquate Vaskularisierung typisch ist.

Ein weiteres interessantes Konzept stellt die Beobachtung dar, dass nach SCI in Mäusen, antiinflammatorische, proresolutive Makrophagen mit der Kapazität einer messbaren Verbesserung neurologischer Funktion über den *plexus choroideus* des Gehirns und dann über den Zentralkanal des Rückenmarks in das geschädigte Areal einwandern. Da diese Struktur in der *substantia grisea* liegt, wäre eine bessere Resolutionskapazität unter Umständen auch hierüber zu erklären [44].

Die Beobachtung, dass die weiße Substanz nach SCI in Ratten über einen längeren Zeitraum eine gestörte BSCB-Integrität mit erhöhter Permeabilität aufweist als die korrespondierende graue Substanz [150] könnte zudem eine verlängerte Rekrutierung von Immunzellen implizieren.

Auch Unterschiede in der Kinetik der Inflammation zwischen Th9 und Th3 sind in der vorliegenden Arbeit beobachtet worden, mit einem Maximum der Makrophagenpopulation sieben bzw. vierzehn Tage nach Injektion sowie stets leicht erhöhten Zahlen von CD68<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> auf Th3 nach zwölf Wochen. Limitierungen in der Methodik lassen hierzu jedoch keine vollständige Bewertung zu. Dennoch könnten die Permeabilitätsunterschiede in der BSCB unter Umständen eine Erklärung für einen verspäteten Influx und Efflux von Zellen darstellen, da für das Rückenmark die Beobachtung beschrieben ist, dass die BSCB kranial weniger permeabel ist als kaudal [150]. Daher wären zeitliche Unterschiede in der Kinetik auch über diese physiologischen Unterschiede zu erklären. Für die EAE ist überdies eine erhöhte Auftretensfrequenz in den distalen Abschnitten des Myelons beschrieben

worden bei höherer BSCB-Permeabilität [11]. Diese könnte jedoch gleichzeitig ein besseres Gelingen des Abwanderns von Immunzellen bedeuten.

Inwieweit kürzlich für kraniale Anteile des ZNS beschriebene lymphatische Strukturen eine Rolle in Inflammation des Myelons spielen, ist zudem ein völlig offen.[12]

### IV.VII.ii Immundepressionssyndrom nach Rückenmarksverletzung

Der Mechanismus der Suppression des Immunsystems nach SCI beruht unter anderem auf einer gestörten Sympathikusregulierung immunrelevanter Organe und einer Störung der HPA-Achse. Angesichts der lokalen, umschriebenen Läsion, die in dieser Arbeit gesetzt wurde, mit keinerlei motorischen Einschränkungen oder Anzeichen für Infektionen muss davon ausgegangen werden, dass das SCI-IDS in dem vorliegenden Modell keine relevanten Auswirkungen auf Inflammation haben kann, da der gesetzte Schaden nicht in ausreichendem Ausmaß Fasern des SN affiziert haben kann. Eine Aussage zu diesem putativen Einflussfaktor auf lokale Inflammation im Rückenmark ist dementsprechend in keiner Weise auf der Basis der hier erhobenen Daten zu treffen.

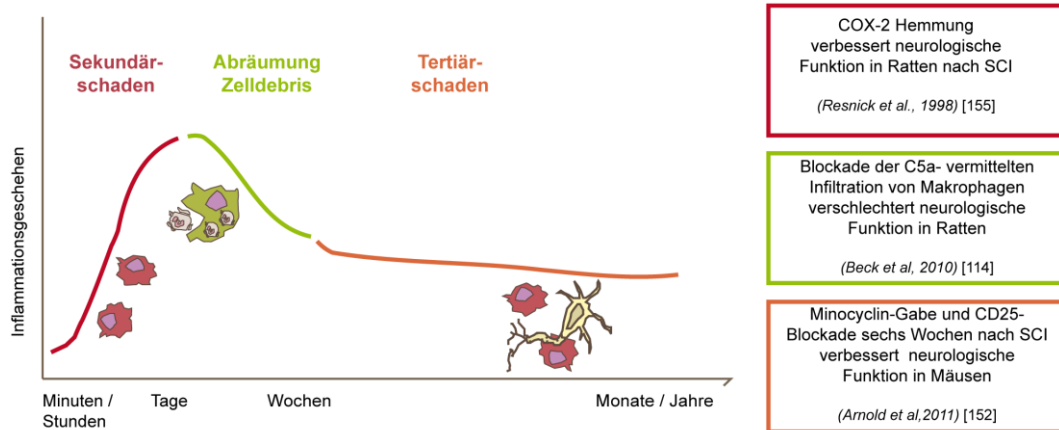
### IV.viii Inflammation und Resolutionsdefizit im Rückenmark

Die vorliegende Arbeit bestätigte die Persistenz von Immunzellen lange nach der initialen Schädigung im Rückenmark und das damit definierte Resolutionsdefizit. Vorangegangene Arbeiten wiesen schon auf dieses hin [90, 115] und verschiedene Strategien um Inflammation in Bahnen zu lenken und Resolution zu fördern existieren [151]. Ob die chronische Persistenz von inflammatorischen Prozessen im ZNS klinische Relevanz besitzt, ist dabei nicht vollständig geklärt, obschon einige Studien darauf hinweisen [152] und für SCI-Patienten eine Reihe chronischer Erkrankungen [153] und Dysfunktionen des Immunsystems bekannt sind [154].

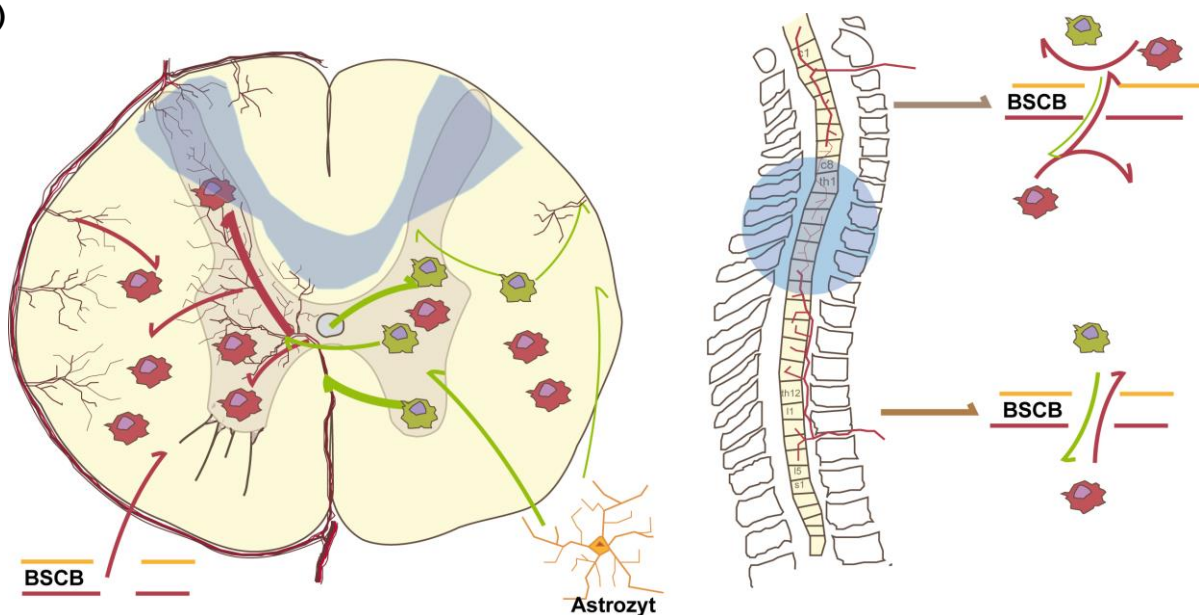
Dabei ist es durchaus zu vermuten, dass es verschiedene zeitliche Phasen des Immungeschehens nach SCI gibt (s. Abb. IV.ii) und dass die verschiedenen therapeutische Strategien zur Prävention des Sekundärschadens enge zeitliche Fenster besitzen. Möglicherweise sollte diese zeitliche Komponente [114] zudem um einen anatomischen Ansatz wie dem vorliegenden erweitert werden, in dem die Kompartimente des Myelons und ihre Physiologie und somit die *räumliche Aufschlüsselung* des Inflammationsprozesses in medikamentösen Interventionen oder auch Ansätzen wie Zelltransplantationen berücksichtigt wird.



(a)



(b)



#### Abb. IV.11 Inflammation und Resolution im Zeitverlauf und Anatomie

(a) Die inflammatorischen Geschehen können zeitabhängig aufgeschlüsselt positive und negative Effekte auf die neuronalen und glialen Strukturen des Rückenmarks besitzen, sodass Interventionen dahingehend berücksichtigt werden müssen. Lange ist bekannt, dass die rasche Gabe von antiinflammatorischen Substanzen kurz nach der Rückenmarksverletzung die Ausprägung von neuronalem Verlust reduzieren kann [155]. Die Blockade des Komplementfaktors C5a und damit die Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia bis vier Wochen nach Kontusion kann die Funktion wiederum verschlechtern [114]. Minocyclin (verhindert Aktivierung von Makrophagen/Mikroglia) und CD25 (verhindert Aktivierung von T-Zellen) verbesserten die Funktion, wenn erstmals nach sechs Wochen verabreicht [152].

(b, links) Übersicht zur Aufschlüsselung von Inflammation in neuroanatomische Kompartimente in transversaler Ebene. In der grauen Substanz könnte die dichtere Kapillarisation zu einem schnelleren Influx (rote Zellen, proinflammatorisch) von Immunzellen führen, die jedoch auch effektiver über diesen Mechanismus ausgeschleust werden könnten (grüne Zellen, proresolutiv). Eine längere Störung der Blut-Rückenmark-Schranke (BSCB) könnte zu einem prolongierten Einstrom von Entzündungszellen führen. Die höhere Zahl aktivierter Astrozyten in der grauen Substanz könnte überdies zudem proresolutiv wirken. Ein besonderes Areal mit putativ höchsten Anfälligkeit für Sekundärschaden und ineffektivster Resolution markiert die blaue Fläche, die die Endstromareale der arteriellen Versorgung darstellt. (b, rechts) Unterschiede entlang der spinalen Höhe in der allgemeinen, physiologischen Permeabilität der BSCB könnten im hochthorakalen und cervikalen Rückenmark eine Migration von Zellen aus der Blutbahn erschweren, sobald diese das Gewebe jedoch erreichen, ein Verlassen jedoch zusätzlich behindern. Auch entlang der Neuraxis ist ein Areal der Endstromgebiete der rückenmarksversorgenden Arterien bekannt (blaue Fläche).

Legende: BSCB: Blut-Rückenmarks-Schranke      rot: proinflammatorische Zellen / Zellen des akuten Entzündungsgeschehen  
grün: Zellen der Resolution      blaue Fläche markiert Areale arterieller Endstromgebiete

#### **IV.IX Implikationen und Schlussfolgerung**

Die vorliegende Arbeit untersuchte unter Anwendung eines artifiziellen Mechanismus der Entzündungsinduktion den Ansatz, inwieweit das Immungeschehen im Rückenmark nach Schädigung in verschiedene Kompartimente nach neuroanatomischen Korrelaten unterschieden werden kann. Dabei waren Unterschiede im akuten als auch im chronischen Inflammationsgeschehen mit variierender Ausprägung für verschiedene Zellpopulationen zu beobachten. Neutrophile Granulozyten schienen im chronischen Läsionen auf zellulärer Ebene keine relevante Rolle zu spielen, während Makrophagen auch zwölf Wochen nach der Injektion in der grauen Substanz in geringerer Zahl zu finden waren als in der weißen im Sinne einer effektiveren Resolution.

Auch T-Zellen verblieben in hoher Zahl in beiden Kompartimenten, mit jedoch Hinweisen auf effektivere Resolution in der grauen Substanz. Deutliche Unterschiede in der Zellzahl ließen sich zudem für die Population der Astrozyten mit höheren Zellzahlen in der grauen Substanz beobachten. Diese Ergebnisse weisen auf eine effektivere Resolution in der *substantia grisea* gegenüber der *substantia alba* hin und lassen die Abmilderung von Schaden in letzterer relevanter erscheinen. Die unterschiedliche Vaskularisierung könnte dabei ein sowohl für medikamentöse Ansätze oder zelluläre Interventionen entscheidend sein. Neuroanatomische Charakteristika können zudem zur Erklärung bestimmter klinischer Repräsentation andere Erkrankungen des ZNS wie die MS herangezogen werden. Unterschiede in der Kinetik von Inflammation und Resolution entlang der Neuraxis ließen sich in dieser Arbeit erahnen, jedoch nicht valide zeigen.

#### **IV.x Ausblick**

Aus den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit lassen sich Überlegungen zu weiterer grundlagenwissenschaftlicher Forschung ziehen: Hinweise auf Unterschiede in der allgemeinen Inflammations- und Resolutionskinetik zwischen Läsionen der weißen und grauen Substanz lassen sich ableiten. Hier sollte die Identifizierung relevanter Subgruppen von Zellen wie M1/M2 polarisierte Makrophagen, zytotoxische, regulatorische T-Zellen sowie T-Helferzellen erfolgen. Zudem könnte eine präzisere Darstellung von induziertem Schaden über z.B. Färbungen von Myelinstrukturen erfolgen. Eine genauere Untersuchung der höhenabhängigen Unterschiede scheint zudem vielversprechend.

Eine Bewertung, inwieweit Resolutionsdefizit und neurologische Funktion korrelieren wäre unbedingt nötig, um weitere Forschung auf diesem Gebiet zu rationalisieren. Dabei wären Resolutionsanaloga eine interessante Substanzklasse, wobei auch der differentielle Einsatz von selektiven COX-2 Hemmern mit ihrem putativ negativen Effekt auf Resolution untersuchungsrelevant sein könnte.

## V Literaturverzeichnis

1. Eriksson, P.S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A.M. Alborn, C. Nordborg, D.A. Peterson, and F.H. Gage, *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
2. Verkhratsky, A. and A. Butt, *Glial Neurobiology: A Textbook*. 2007, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Ltd.
3. Gehrman, J., Y. Matsumoto, and G.W. Kreutzberg, *Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain*. Brain Res Brain Res Rev, 1995. **20**(3): p. 269-87.
4. Benninghoff, A. and D. Drenckhahn, *Anatomie Band 2* Vol. 16. 2004, München, Deutschland: Urban & Fischer Verlag.
5. Watson, C., G. Paxinos, and G. Kayalioglu, *The Spinal Cord* 2009, Oxford, Großbritannien: Academic Press.
6. Tveten, L., *Spinal cord vascularity. III. The spinal cord arteries in man*. Acta Radiol Diagn (Stockh). 1976. **17**(3): p. 257-73.
7. Turnbull, I., *Blood supply of the spinal cord: normal and pathological considerations*. Clin Neurosurg. , 1973. **20**: p. 56-84.
8. Scharrer, E., *Capillaries and mitochondria in neurophil*. J Comp Neurol. , 1945. **83**: p. 237-43.
9. Brockstein, B., L. Johns, and B. Gewertz, *Blood supply to the spinal cord: anatomic and physiologic correlations*. Ann Vasc Surg., 1994. **8**(4): p. 394-9.
10. Griessenauer, C.J., J. Raborn, P. Foreman, M.M. Shoja, M. Loukas, and R.S. Tubbs, *Venous drainage of the spine and spinal cord: a comprehensive review of its history, embryology, anatomy, physiology, and pathology*. Clin Anat, 2015. **28**(1): p. 75-87.
11. Bartanusz, V., D. Jezova, B. Alajajian, and M. Digicaylioglu, *The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications*. Ann Neurol, 2011. **70**(2): p. 194-206.
12. Louveau, A., I. Smirnov, T.J. Keyes, J.D. Eccles, S.J. Rouhani, J.D. Peske, N.C. Derecki, D. Castle, J.W. Mandell, K.S. Lee, T.H. Harris, and J. Kipnis, *Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels*. Nature, 2015. **523**(7560): p. 337-41.
13. Prockop, L.D., K.A. Naidu, J.E. Binard, and J. Ransohoff, *Selective permeability of [3H]-D-mannitol and [14C]-carboxyl-inulin across the blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in the rabbit*. J Spinal Cord Med, 1995. **18**(4): p. 221-6.
14. Pan, W., W.A. Banks, and A.J. Kastin, *Permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to interferons*. J Neuroimmunol, 1997. **76**(1-2): p. 105-11.
15. Metchnikoff, E., *Sur la lutte des cellules de l'organisme centre l'invasion des microbes*. Annales Inst. Pasteur Paris, 1887. **1**: p. 321.
16. MacKay, I. and F. Rosen, *Innate Immunity*. New Engl J Med, 2000. **343**: p. 338-44.
17. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
18. Murphy, K., *Janeway's immunobiology*. Vol. 8th. 2012, New York, USA: Garland Science.
19. Rock, K.L., E. Latz, F. Ontiveros, and H. Kono, *The sterile inflammatory response*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 321-42.
20. Serhan, C. and J. Savill, *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. Nat Immunol., 2005. **6**(12): p. 1191-7.

21. Serhan, C., S. Brain, C. Buckley, D. Gilroy, C. Haslett, L. O'Neill, M. Perretti, A. Rossi, and J. Wallace, *Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms*. FASEB J., 2007. **21**.
22. Ortega-Gómez, A., M. Perretti, and O. Soehnlein, *Resolution of inflammation: an integrated view*. EMBO Mol Med, 2013.
23. Mills, C.D., L.L. Lenz, and K. Ley, *Macrophages at the fork in the road to health or disease*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 59.
24. Rajakariar, R., T. Lawrence, J. Bystrom, M. Hilliard, P. Colville-Nash, G. Bellingan, D. Fitzgerald, M.M. Yaqoob, and D.W. Gilroy, *Novel biphasic role for lymphocytes revealed during resolving inflammation*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4184-92.
25. Schif-Zuck, S., N. Gross, S. Assi, R. Rostoker, C.N. Serhan, and A. Ariel, *Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids*. Eur J Immunol, 2011. **41**(2): p. 366-79.
26. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 514.
27. Martinez, F.O., S. Gordon, M. Locati, and A. Mantovani, *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
28. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
29. Cao, D., V. Malmstrom, C. Baecher-Allan, D. Hafler, L. Klareskog, and C. Trollmo, *Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis*. Eur J Immunol, 2003. **33**(1): p. 215-23.
30. Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H.L. Weiner, and D.A. Hafler, *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 971-9.
31. Ait-Oufella, H., B.L. Salomon, S. Potteaux, A.K. Robertson, P. Gourdy, J. Zoll, R. Merval, B. Esposito, J.L. Cohen, S. Fisson, R.A. Flavell, G.K. Hansson, D. Klatzmann, A. Tedgui, and Z. Mallat, *Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 178-80.
32. Delano, M.J., P.O. Scumpia, J.S. Weinstein, D. Coco, S. Nagaraj, K.M. Kelly-Scumpia, K.A. O'Malley, J.L. Wynn, S. Antonenko, S.Z. Al-Quran, R. Swan, C.S. Chung, M.A. Atkinson, R. Ramphal, D.I. Gabrilovich, W.H. Reeves, A. Ayala, J. Phillips, D. Laface, P.G. Heyworth, M. Clare-Salzler, and L.L. Moldawer, *MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1463-74.
33. Haile, L.A., R. von Wasielowski, J. Gamrekashvili, C. Kruger, O. Bachmann, A.M. Westendorf, J. Buer, R. Liblau, M.P. Manns, F. Korangy, and T.F. Greten, *Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway*. Gastroenterology, 2008. **135**(3): p. 871-81, 881 e1-5.
34. Zhu, B., Y. Bando, S. Xiao, K. Yang, A.C. Anderson, V.K. Kuchroo, and S.J. Khoury, *CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5228-37.
35. Mathews, J.A., D.I. Kasahara, L. Ribeiro, A.P. Wurmbrand, F.M. Ninin, and S.A. Shore, *gammadelta T Cells Are Required for M2 Macrophage Polarization and*

- Resolution of Ozone-Induced Pulmonary Inflammation in Mice*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0131236.
36. Kowal-Bielecka, O., K. Kowal, O. Distler, and S. Gay, *Mechanisms of Disease: leukotrienes and lipoxins in scleroderma lung disease--insights and potential therapeutic implications*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. **3**(1): p. 43-51.
  37. Ader, R., D. Felten, and N. Cohen, *Interactions between the brain and the immune system*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1990. **30**: p. 561-602.
  38. Bellinger, D.L., B.A. Millar, S. Perez, J. Carter, C. Wood, S. ThyagaRajan, C. Molinaro, C. Lubahn, and D. Lorton, *Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease*. Cell Immunol, 2008. **252**(1-2): p. 27-56.
  39. Kenney, M.J. and C.K. Ganta, *Autonomic nervous system and immune system interactions*. Compr Physiol, 2014. **4**(3): p. 1177-200.
  40. Andersson, U. and K.J. Tracey, *Neural reflexes in inflammation and immunity*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1057-68.
  41. Sternberg, E.M., *Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 318-28.
  42. Silverman, M.N., B.D. Pearce, C.A. Biron, and A.H. Miller, *Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection*. Viral Immunol, 2005. **18**(1): p. 41-78.
  43. O'Callaghan, J.P., K. Sriram, and D.B. Miller, *Defining "neuroinflammation"*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 318-30.
  44. Schwartz, M. and K. Baruch, *The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus*. EMBO J, 2014. **33**(1): p. 7-22.
  45. Shechter, R., A. London, C. Varol, C. Raposo, M. Cusimano, G. Yovel, A. Rolls, M. Mack, S. Pluchino, G. Martino, S. Jung, and M. Schwartz, *Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice*. PLoS Med, 2009. **6**(7): p. e1000113.
  46. Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz, *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends Neurosci, 1999. **22**(9): p. 391-7.
  47. Finnie, J.W., *Neuroinflammation: beneficial and detrimental effects after traumatic brain injury*. Inflammopharmacology, 2013. **21**(4): p. 309-20.
  48. Lagraoui, M., J.R. Latoche, N.G. Cartwright, G. Sukumar, C.L. Dalgard, and B.C. Schaefer, *Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics*. Front Neurol, 2012. **3**: p. 155.
  49. Das, M., S. Mohapatra, and S.S. Mohapatra, *New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 236.
  50. Hoffer, M.E., C. Balaban, M.D. Slade, J.W. Tsao, and B. Hoffer, *Amelioration of acute sequelae of blast induced mild traumatic brain injury by N-acetyl cysteine: a double-blind, placebo controlled study*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54163.
  51. Choi, B.Y., B.G. Jang, J.H. Kim, B.E. Lee, M. Sohn, H.K. Song, and S.W. Suh, *Prevention of traumatic brain injury-induced neuronal death by inhibition of NADPH oxidase activation*. Brain Res, 2012. **1481**: p. 49-58.
  52. Wang, G.H., Z.L. Jiang, Y.C. Li, X. Li, H. Shi, Y.Q. Gao, P.S. Vosler, and J. Chen, *Free-radical scavenger edaravone treatment confers neuroprotection against traumatic brain injury in rats*. J Neurotrauma, 2011. **28**(10): p. 2123-34.
  53. Dirnagl, U., *Inflammation in stroke: the good, the bad, and the unknown*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2004(47): p. 87-99.

54. Leppert, D., R.L. Lindberg, L. Kappos, and S.L. Leib, *Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis*. Brain Res Brain Res Rev, 2001. **36**(2-3): p. 249-57.
55. Pérez-Cerdá, F., M.V. Sánchez-Gómez, and C. Matute, *The link of inflammation and neurodegeneration in progressive multiple sclerosis*. Multiple Sclerosis and Demyelinating Disorders, 2016. **1**(1): p. 1-8.
56. McKinley, W.O., R.T. Seel, and J.T. Hardman, *Nontraumatic spinal cord injury: incidence, epidemiology, and functional outcome*. Arch Phys Med Rehabil, 1999. **80**(6): p. 619-23.
57. Ackery, A., C. Tator, and A. Krassioukov, *A global perspective on spinal cord injury epidemiology*. J Neurotrauma, 2004. **21**(10): p. 1355-70.
58. Schnell, L., S. Fearn, H. Klassen, M.E. Schwab, and V.H. Perry, *Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(10): p. 3648-58.
59. Schnell, L., S. Fearn, M.E. Schwab, V.H. Perry, and D.C. Anthony, *Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(3): p. 245-54.
60. Batchelor, P.E., S. Tan, T.E. Wills, M.J. Porritt, and D.W. Howells, *Comparison of inflammation in the brain and spinal cord following mechanical injury*. J Neurotrauma, 2008. **25**(10): p. 1217-25.
61. Hausmann, O.N., *Post-traumatic inflammation following spinal cord injury*. Spinal Cord, 2003. **41**(7): p. 369-78.
62. Mauter, A.E., M.R. Weinzierl, F. Donovan, and L.J. Noble, *Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis*. Phys Ther, 2000. **80**(7): p. 673-87.
63. Schwab, J.M., K. Brechtel, C.A. Mueller, V. Failli, H.P. Kaps, S.K. Tuli, and H.J. Schluesener, *Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective*. Prog Neurobiol, 2006. **78**(2): p. 91-116.
64. Taoka, Y. and K. Okajima, *Role of leukocytes in spinal cord injury in rats*. J Neurotrauma, 2000. **17**(3): p. 219-29.
65. Shuman, S.L., J.C. Bresnahan, and M.S. Beattie, *Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats*. J Neurosci Res, 1997. **50**(5): p. 798-808.
66. Anwar, M.A., T.S. Al Shehabi, and A.H. Eid, *Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury*. Front Cell Neurosci, 2016. **10**: p. 98.
67. Ankeny, D.P., K.M. Lucin, V.M. Sanders, V.M. McGaughy, and P.G. Popovich, *Spinal cord injury triggers systemic autoimmunity: evidence for chronic B lymphocyte activation and lupus-like autoantibody synthesis*. J Neurochem, 2006. **99**(4): p. 1073-87.
68. Sun, D., J.N. Whitaker, Z. Huang, D. Liu, C. Coleclough, H. Wekerle, and C.S. Raine, *Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7579-87.
69. Ishii, H., X. Jin, M. Ueno, S. Tanabe, T. Kubo, S. Serada, T. Naka, and T. Yamashita, *Adoptive transfer of Th1-conditioned lymphocytes promotes axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e363.
70. Schwartz, M. and J. Kipnis, *Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries*. Trends Mol Med, 2001. **7**(6): p. 252-8.
71. Silver, J. and J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(2): p. 146-56.

72. Liddelow, S.A. and B.A. Barres, *Regeneration: Not everything is scary about a glial scar*. Nature, 2016. **532**(7598): p. 182-3.
73. Ek, C., M. Habgood, J. Callaway, R.D. Dennis, K.M. Johansson, P.A. , A. Potter, B. Wheaton, and N. Saunders, *Spatio-temporal progression of grey and white matter damage following contusion injury in rat spinal cord*. PLoS One. , 2010. **5**(8).
74. Tator, C.H. and I. Koyanagi, *Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury*. J Neurosurg, 1997. **86**(3): p. 483-92.
75. Rost, N.S., R. Rahman, S. Sonni, A. Kanakis, C. Butler, E. Massasa, L. Cloonan, A. Gilson, P. Delgado, Y. Chang, A. Biffi, J. Jimenez-Conde, A. Besanger, G. Silva, E.E. Smith, J. Rosand, and K.L. Furie, *Determinants of white matter hyperintensity volume in patients with acute ischemic stroke*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2010. **19**(3): p. 230-5.
76. Rost, N.S., R.M. Rahman, A. Biffi, E.E. Smith, A. Kanakis, K. Fitzpatrick, F. Lima, B.B. Worrall, J.F. Meschia, R.D. Brown, Jr., T.G. Brott, A.G. Sorensen, S.M. Greenberg, K.L. Furie, and J. Rosand, *White matter hyperintensity volume is increased in small vessel stroke subtypes*. Neurology, 2010. **75**(19): p. 1670-7.
77. Ryan, D.J., S. Byrne, R. Dunne, M. Harmon, and J. Harbison, *White matter disease and an incomplete circle of Willis*. Int J Stroke, 2015. **10**(4): p. 547-52.
78. Oliveira-Filho, J., A.C. Ornellas, C.R. Zhang, L.M. Oliveira, T. Araujo-Santos, V.M. Borges, L.M. Ventura, F.J. Reis, R. Aras, A.M. Fernandes, J. Rosand, S.M. Greenberg, K.L. Furie, and N.S. Rost, *COX-2 rs20417 Polymorphism Is Associated with Stroke and White Matter Disease*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015. **24**(8): p. 1817-22.
79. Ludwin, S.K., *The pathogenesis of multiple sclerosis: relating human pathology to experimental studies*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(4): p. 305-18.
80. Yu, C., F. Lin, K. Li, T. Jiang, W. Qin, H. Sun, and P. Chan, *Pathogenesis of normal-appearing white matter damage in neuromyelitis optica: diffusion-tensor MR imaging*. Radiology, 2008. **246**(1): p. 222-8.
81. Junker, A. and W. Bruck, *Autoinflammatory grey matter lesions in humans: cortical encephalitis, clinical disorders, experimental models*. Curr Opin Neurol, 2012. **25**(3): p. 349-57.
82. Ludwin, S.K., *Oligodendrocyte survival in Wallerian degeneration*. Acta Neuropathol, 1990. **80**(2): p. 184-91.
83. Meisel, C., J.M. Schwab, K. Prass, A. Meisel, and U. Dirnagl, *Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(10): p. 775-86.
84. Offner, H., S. Subramanian, S.M. Parker, C. Wang, M.E. Afentoulis, A. Lewis, A.A. Vandenberg, and P.D. Hurn, *Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6523-31.
85. Lucin, K., V. Sanders, T. Jones, W. Malarkey, and P. Popovich, *Impaired antibody synthesis after spinal cord injury is level dependent and is due to sympathetic nervous system dysregulation*. Exp Neurol., 2007. **207**(1): p. 75-84. .
86. Wang, X., M. Zhu, E. Hjorth, V. Cortes-Toro, H. Eyjolfsdottir, C. Graff, I. Nennesmo, J. Palmblad, M. Eriksdotter, K. Sambamurti, J.M. Fitzgerald, C.N. Serhan, A.C. Granholm, and M. Schultzberg, *Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2015. **11**(1): p. 40-50.e1-2.
87. Pruss, H., B. Rosche, A.B. Sullivan, B. Brommer, O. Wengert, K. Gronert, and J.M. Schwab, *Proresolution lipid mediators in multiple sclerosis - differential,*



- disease severity-dependent synthesis - a clinical pilot trial. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55859.
88. Beschorner, R., T.D. Nguyen, F. Gozalan, I. Pedal, R. Mattern, H.J. Schluesener, R. Meyermann, and J.M. Schwab, *CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury*. Acta Neuropathol, 2002. **103**(6): p. 541-9.
  89. Schwab, J.M., T.D. Nguyen, E. Postler, R. Meyermann, and H.J. Schluesener, *Selective accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells/macrophages in lesions of human focal cerebral ischemia*. Acta Neuropathol, 2000. **99**(6): p. 609-14.
  90. Prüss, H., M. Kopp, B. Brommer, N. Gatzemeier, I. Laginha, U. Dirnagl, and J. Schwab, *Non-resolving aspects of acute inflammation after spinal cord injury (SCI): indices and resolution plateau*. Brain Pathol., 2011. **21**(6): p. 652-60.
  91. Casha, S., D. Zygun, M.D. McGowan, I. Bains, V.W. Yong, and R.J. Hurlbert, *Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury*. Brain, 2012. **135**(Pt 4): p. 1224-36.
  92. Maier, K., D. Merkler, J. Gerber, N. Taheri, A.V. Kuhnert, S.K. Williams, C. Neusch, M. Bahr, and R. Diem, *Multiple neuroprotective mechanisms of minocycline in autoimmune CNS inflammation*. Neurobiol Dis, 2007. **25**(3): p. 514-25.
  93. Watzlawick, R., E.S. Sena, U. Dirnagl, B. Brommer, M.A. Kopp, M.R. Macleod, D.W. Howells, and J.M. Schwab, *Effect and reporting bias of RhoA/ROCK-blockade intervention on locomotor recovery after spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis*. JAMA Neurol, 2014. **71**(1): p. 91-9.
  94. Kopp, M.A., T. Liebscher, R. Watzlawick, P. Martus, S. Laufer, C. Blex, R. Schindler, G.J. Jungehulsing, S. Knuppel, M. Kreuztrager, A. Ekkernkamp, U. Dirnagl, S.M. Strittmatter, A. Niedeggen, and J.M. Schwab, *SCISSOR-Spinal Cord Injury Study on Small molecule-derived Rho inhibition: a clinical study protocol*. BMJ Open, 2016. **6**(7): p. e010651.
  95. Levy, B.D., C.B. Clish, B. Schmidt, K. Gronert, and C.N. Serhan, *Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 612-9.
  96. Groeger, A.L., C. Cipollina, M.P. Cole, S.R. Woodcock, G. Bonacci, T.K. Rudolph, V. Rudolph, B.A. Freeman, and F.J. Schopfer, *Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(6): p. 433-41.
  97. El-Kheir, W.A., H. Gabr, M.R. Awad, O. Ghannam, Y. Barakat, H.A. Farghali, Z.M. El Maadawi, I. Ewes, and H.E. Sabaawy, *Autologous bone marrow-derived cell therapy combined with physical therapy induces functional improvement in chronic spinal cord injury patients*. Cell Transplant, 2014. **23**(6): p. 729-45.
  98. Buckley, C.D., D.W. Gilroy, and C.N. Serhan, *Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation*. Immunity, 2014. **40**(3): p. 315-27.
  99. Perretti, M., X. Leroy, E.J. Bland, and T. Montero-Melendez, *Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(11): p. 737-55.
  100. Martini, A.C., S. Forner, A.F. Bento, and G.A. Rae, *Neuroprotective effects of lipoxin A4 in central nervous system pathologies*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 316204.

101. Cheriyan, T., D.J. Ryan, J.H. Weinreb, J. Cheriyan, J.C. Paul, V. Lafage, T. Kirsch, and T.J. Errico, *Spinal cord injury models: a review*. Spinal Cord, 2014. **52**(8): p. 588-95.
102. Constantinescu, C.S., N. Farooqi, K. O'Brien, and B. Gran, *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1079-106.
103. Underhill, D., *Macrophage recognition of zymosan particles*. J Endotoxin Res., 2003. **9**(3): p. 176-80.
104. Popovich, P., Z. Guan, V. McGaughy, L. Fisher, W. Hickey, and D. Basso, *The Neuropathological and Behavioral Consequences of Intraspinal Microglial/Macrophage Activation*. J Neuropathol Exp Neurol., 2002. **61**(7): p. 623-633.
105. de Medinaceli, L., *An anatomical landmark for procedures on rat thoracic spinal cord*. Exp Neurol, 1986. **91**(2): p. 404-8.
106. Baldwin, K.T., K.S. Carbajal, B.M. Segal, and R.J. Giger, *Neuroinflammation triggered by beta-glucan/dectin-1 signaling enables CNS axon regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(8): p. 2581-6.
107. Bastos-Pereira, A.L., D. Fraga, D. Ott, B. Simm, J. Murgott, J. Roth, and A.R. Zampronio, *Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response*. J Appl Physiol (1985), 2014. **116**(9): p. 1220-9.
108. Cash, J., G. White, and D. Greaves, *Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation*. Methods Enzymol., 2009. **461**: p. 379-96.
109. Harrigan, T.J., I.F. Abdullaev, D. Jourd'heuil, and A.A. Mongin, *Activation of microglia with zymosan promotes excitatory amino acid release via volume-regulated anion channels: the role of NADPH oxidases*. J Neurochem, 2008. **106**(6): p. 2449-62.
110. Jiang, L., P. Sternweis, and J. Wang, *Zymosan activates protein kinase A via adenylyl cyclase VII to modulate innate immune responses during inflammation*. Mol Immunol., 2013. **54**(1): p. 14-22.
111. Tarayre, J.P., A. Delhon, M. Aliaga, M. Barbara, F. Bruniquel, V. Caillol, L. Puech, N. Consul, and J. Tisne-Versailles, *Pharmacological studies on zymosan inflammation in rats and mice. 1: Zymosan-induced paw oedema in rats and mice*. Pharmacol Res, 1989. **21**(4): p. 375-84.
112. Bernotiene, E., G. Palmer, D. Talabot-Ayer, I. Szalay-Quinodoz, M.L. Aubert, and C. Gabay, *Delayed resolution of acute inflammation during zymosan-induced arthritis in leptin-deficient mice*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(3): p. R256-63.
113. van Middendorp, J.J., B. Goss, S. Urquhart, S. Atresh, R.P. Williams, and M. Schuetz, *Diagnosis and Prognosis of Traumatic Spinal Cord Injury*. Global Spine J, 2011. **1**(1): p. 1-8.
114. Beck, K.D., H.X. Nguyen, M.D. Galvan, D.L. Salazar, T.M. Woodruff, and A.J. Anderson, *Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment*. Brain, 2010. **133**(Pt 2): p. 433-47.
115. Donnelly, D.J. and P.G. Popovich, *Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury*. Exp Neurol, 2008. **209**(2): p. 378-88.
116. Fleming, J.C., M.D. Norenberg, D.A. Ramsay, G.A. Dekaban, A.E. Marcillo, A.D. Saenz, M. Pasquale-Styles, W.D. Dietrich, and L.C. Weaver, *The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury*. Brain, 2006. **129**(Pt 12): p. 3249-69.

117. Nguyen, H.X., K.D. Beck, and A.J. Anderson, *Quantitative assessment of immune cells in the injured spinal cord tissue by flow cytometry: a novel use for a cell purification method*. J Vis Exp, 2011(50).
118. David, S. and A. Kroner, *Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury*. Nat Rev Neurosci., 2011. **2**(7): p. 388-99.
119. Makni-Maalej, K., M. Chiandotto, M. Hurtado-Nedelec, S. Bedouhene, M.A. Gougerot-Pocidallo, P.M. Dang, and J. El-Benna, *Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase*. Biochem Pharmacol, 2013. **85**(1): p. 92-100.
120. Popovich, P.G., P. Wei, and B.T. Stokes, *Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats*. J Comp Neurol, 1997. **377**(3): p. 443-64.
121. Mietto, B.S., K. Mostacada, and A.M. Martinez, *Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 251204.
122. Cherry, J.D., J.A. Olschowka, and M.K. O'Banion, *Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed*. J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 98.
123. Bowes, A.L. and P.K. Yip, *Modulating inflammatory cell responses to spinal cord injury: all in good time*. J Neurotrauma, 2014. **31**(21): p. 1753-66.
124. Naegele, M. and R. Martin, *The good and the bad of neuroinflammation in multiple sclerosis*. Handb Clin Neurol, 2014. **122**: p. 59-87.
125. Goverman, J., *Autoimmune T cell responses in the central nervous system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(6): p. 393.
126. Bechmann, I., I. Galea, and V.H. Perry, *What is the blood-brain barrier (not)?* Trends Immunol, 2007. **28**(1): p. 5-11.
127. Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl, *Astrocytes are active players in cerebral innate immunity*. Trends Immunol, 2007. **28**(3): p. 138-45.
128. Nash, B., C.E. Thomson, C. Linington, A.T. Arthur, J.D. McClure, M.W. McBride, and S.C. Barnett, *Functional duality of astrocytes in myelination*. J Neurosci, 2011. **31**(37): p. 13028-38.
129. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
130. Carlson, S.L., M.E. Parrish, J.E. Springer, K. Doty, and L. Dossett, *Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury*. Exp Neurol, 1998. **151**(1): p. 77-88.
131. Zhou, X., X. He, and Y. Ren, *Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury*. Neural Regen Res, 2014. **9**(20): p. 1787-95.
132. Dey, A., J. Allen, and P.A. Hankey-Giblin, *Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 683.
133. Vogel, D.Y.S., E.J.F. Vereyken, J.E. Glim, P. Heijnen, M. Moeton, P. van der Valk, S. Amor, C.E. Teunissen, J. van Horssen, and C.D. Dijkstra, *Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 35.
134. Bogie, J.F., P. Stinissen, and J.J. Hendriks, *Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis*. Acta Neuropathol, 2014. **128**(2): p. 191-213.

135. Hooshmand, M.J., M.D. Galvan, E. Partida, and A.J. Anderson, *Characterization of recovery, repair, and inflammatory processes following contusion spinal cord injury in old female rats: is age a limitation?* Immun Ageing, 2014. **11**: p. 15.
136. Lee, P.S., D. Beneck, J. Weisberger, and W. Gorczyca, *Coexpression of CD43 by benign B cells in the terminal ileum.* Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2005. **13**(2): p. 138-41.
137. Bjorck, P., B. Axelsson, and S. Paulie, *Expression of CD40 and CD43 during activation of human B lymphocytes.* Scand J Immunol, 1991. **33**(2): p. 211-8.
138. Lee, H.H., S.C. Park, I.S. Choe, Y. Kim, and Y.S. Ha, *Time Course and Characteristics of Astrocyte Activation in the Rat Brain after Injury.* Korean J Neurotrauma, 2015. **11**(2): p. 44-51.
139. Emsley, J.G. and J.D. Macklis, *Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS.* Neuron Glia Biol, 2006. **2**(3): p. 175-86.
140. Haas, B., C.G. Schipke, O. Peters, G. Sohl, K. Willecke, and H. Kettenmann, *Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from astrocytic calcium waves.* Cereb Cortex, 2006. **16**(2): p. 237-46.
141. Faulkner, J.R., J.E. Herrmann, M.J. Woo, K.E. Tansey, N.B. Doan, and M.V. Sofroniew, *Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury.* J Neurosci, 2004. **24**(9): p. 2143-55.
142. Jukkola, P., T. Guerrero, V. Gray, and C. Gu, *Astrocytes differentially respond to inflammatory autoimmune insults and imbalances of neural activity.* Acta Neuropathol Commun, 2013. **1**: p. 70.
143. Magnuson, D.S., T.C. Trinder, Y.P. Zhang, D. Burke, D.J. Morassutti, and C.B. Shields, *Comparing deficits following excitotoxic and contusion injuries in the thoracic and lumbar spinal cord of the adult rat.* Exp Neurol, 1999. **156**(1): p. 191-204.
144. Gensel, J.C. and B. Zhang, *Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury.* Brain Res, 2015.
145. Tveten, L., *Spinal cord vascularity. IV. The spinal cord arteries in the rat.* Acta Radiol Diagn (Stockh), 1976. **17**(4): p. 385-98.
146. Ishizawa, K., T. Komori, T. Shimada, E. Arai, K. Imanaka, S. Kyo, and T. Hirose, *Hemodynamic infarction of the spinal cord: involvement of the gray matter plus the border-zone between the central and peripheral arteries.* Spinal Cord, 2005. **43**(5): p. 306-10.
147. Desai, R.A., A.L. Davies, M. Tachrount, M. Kastli, F. Laulund, X. Golay, and K.J. Smith, *Cause and prevention of demyelination in a model multiple sclerosis lesion.* Ann Neurol, 2016. **79**(4): p. 591-604.
148. Bosmia, A.N., E. Hogan, M. Loukas, R.S. Tubbs, and A.A. Cohen-Gadol, *Blood supply to the human spinal cord: part I. Anatomy and hemodynamics.* Clin Anat, 2015. **28**(1): p. 52-64.
149. Shechter, R. and M. Schwartz, *CNS sterile injury: just another wound healing?* Trends Mol Med, 2013. **19**(3): p. 135-43.
150. Popovich, P.G., P.J. Horner, B.B. Mullin, and B.T. Stokes, *A quantitative spatial analysis of the blood-spinal cord barrier. I. Permeability changes after experimental spinal contusion injury.* Exp Neurol, 1996. **142**(2): p. 258-75.
151. Singh, P.L., N. Agarwal, J.C. Barrese, and R.F. Heary, *Current therapeutic strategies for inflammation following traumatic spinal cord injury.* Neural Regen Res, 2012. **7**(23): p. 1812-21.

152. Arnold, S.A. and T. Hagg, *Anti-inflammatory treatments during the chronic phase of spinal cord injury improve locomotor function in adult mice*. J Neurotrauma, 2011. **28**(9): p. 1995-2002.
153. Sezer, N., S. Akkuş, and F. Uğurlu, *Chronic complications of spinal cord injury*. World J Orthop, 2015. **6**(1): p. 24-33.
154. Allison, D.J. and D.S. Ditor, *Immune dysfunction and chronic inflammation following spinal cord injury*. Spinal Cord, 2015. **53**(1): p. 14-8.
155. Resnick, D.K., S.H. Graham, C.E. Dixon, and D.W. Marion, *Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury*. J Neurotrauma, 1998. **15**(12): p. 1005-13.

## **VI Appendix**

### **VI.1 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung**

Ich, Ramin Raul Ossami Saidy, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema "Charakteristika der Inflammations – und Resolutionskinetiken im Rückenmark in Abhängigkeit anatomischer Kompartimente nach Induktion einer sterilen Inflammation" 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 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, den 28.11.2017

Ramin Raul Ossami Saidy

**VI.ii Lebenslauf**

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





---

**VI.III Publikationsliste**

(1) Kopp MA, Druschel C, Meisel C, Liebscher T, Prilipp E, Watzlawick R, Cinelli P, Niedeggen A, Schaser KD, Wanner GA, Curt A, Lindemann G, Nugaeva N, Fehlings MG, Vajkoczy P, Cabraja M, Dengler J, Ertel W, Ekkernkamp A, Martus P, Volk HD, Unterwalder N, Kölsch U, Brommer B, Hellmann RC, **Ossami Saidy RR**, Laginha I, Prüss H, Failli V, Dirnagl U, Schwab JM. *The SCIntinel study--prospective multicenter study to define the spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS)--study protocol and interim feasibility data*. BMC Neurol. 2013 Nov 9;13:168. doi: 10.1186/1471-2377-13-168.

(2) Laginha I, Kopp MA, Druschel C, Schaser KD, Brommer B, Hellmann RC, Watzlawick R, **Ossami Saidy RR**, Prüss H, Failli V, Meisel C, Liebscher T, Prilipp E, Niedeggen A, Ekkernkamp A, Grittner U, Piper SK, Dirnagl U, Killig M, Romagnani C, Schwab JM. *Natural Killer (NK) Cell Functionality after human Spinal Cord Injury (SCI): protocol of a prospective, longitudinal study*. BMC Neurol. 2016 Sep 13;16:170. doi: 10.1186/s12883-016-0681-5.

#### **VI.IV Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jan M. Schwab für die Überantwortung des Themas und der Projektbearbeitung. Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Claudia Druschel und Dr. med. Marcel A. Kopp für steten praktischen Rat und Tat und tolle Zusammenarbeit sowie allen Mitgliedern der AG Spinal Cord Injury. Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Mitgliedern der Experimentellen Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, im Besonderen bei Dipl. Ing. Ingo Przesdzing und Christa Josties für rasche Hilfestellungen.

Zudem möchte ich Dr. med. Anna M. B. Laube für die gründliche Revision des Manuskripts und meiner ganzen Familie für ihre Unterstützung bei dieser Arbeit danken.

Berlin, den 28.11.2017

Ramin Raul Ossami Saidy