

**Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Klaus Toyka**

**Unterschiedliche Wirkungen der TNF α -Rezeptoren auf De- und
Regeneration peripherer Nerven**

**Eine Studie an TNF α -Rezeptor-Knockoutmäusen in zwei verschiedenen Tiermodellen für
Nervenläsionen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Sabine Stallforth
aus Augsburg**

Würzburg, Januar 2007

Referentin: Prof. Dr. C. Sommer
Koreferentin: Prof. Dr. A.-L. Sirén
Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2007

Die Promovendin ist Ärztin

FÜR MEINE FAMILIE

INSBESONDERE FÜR MEINE ELTERN UND GROSSELTERN

IN LIEBE UND DANKBARKEIT

Inhalt

INHALT

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	NERVENSCHÄDIGUNGEN UND KLINISCHE KONSEQUENZEN.....	1
1.2	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN NACH NERVENSCHÄDIGUNG.....	3
1.3	DIE ROLLE DER ZYTOKINE WÄHREND DER WALLER'SCHEN DEGENERATION .	4
1.4	DIE ROLLE VON TNFA WÄHREND DER WALLER'SCHEN DEGENERATION.....	5
1.5	STRUKTUR UND FUNKTION DER TNFA-REZEPTOREN	8
1.6	ZIEL DIESER STUDIE:.....	9
2	MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1	VERSUCHSAUFBAU	11
2.2	VERSUCHSTIERE	12
2.2.1	<i>Modell 1: Chronisch konstriktive Nervenläsion (CCI).....</i>	<i>12</i>
2.2.2	<i>Modell 2: Crush Verletzung</i>	<i>13</i>
2.3	HISTOLOGISCHE AUFBEREITUNG.....	13
2.3.1	<i>Semidünnschnitte</i>	<i>13</i>
2.3.2	<i>Cryostatschnitte:.....</i>	<i>15</i>
2.4	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG.....	17
2.4.1	<i>Semidünnschnitte:.....</i>	<i>17</i>
2.4.2	<i>Cryostatschnitte.....</i>	<i>18</i>
2.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG:.....	19

Inhalt

3	ERGEBNISSE	21
3.1	VERLAUFSBEOBACHTUNG.....	21
3.1.1	<i>Intakte Nervenfasern (N)</i>	21
3.1.2	<i>Degenerierende Nervenfasern (D)</i>	21
3.1.3	<i>Makrophagen (M)</i>	22
3.1.4	<i>Immunhistochemische Erfassung der Makrophagen</i>	23
3.1.5	<i>Blutgefäße (G)</i>	23
3.1.6	<i>Strukturloser Raum (SR)</i>	24
3.1.7	<i>Andere Zellen (AZ)</i>	24
3.2	BILDER:	33
3.2.1	<i>Kontrollen</i>	33
3.2.2	<i>Tag 3 CCI</i>	33
3.2.3	<i>Tag 7 CCI</i>	34
3.2.4	<i>Tag 7 Crush</i>	34
3.2.5	<i>Tag 36 CCI</i>	35
4	DISKUSSION	36
4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	36
4.2	METHODENDISKUSSION.....	36
4.2.1	<i>Beurteilung der Auswertungsmethode</i>	36
4.2.2	<i>Beurteilung der statistischen Auswertung</i>	37
4.2.3	<i>Vergleichbarkeit der Verletzungsmodelle</i>	37
4.2.4	<i>Beurteilung der Darstellung von Makrophagen</i>	38

Inhalt

4.3	VERGLEICH DER VERLETZUNGSMODELLE IM BEZUG AUF AXONALE DE- UND REGENERATION	39
4.4	UNTERSCHIEDLICHER EINFLUSS DER TNFA-REZEPTOREN AUF DIE AXONALE DEGENERATION	41
4.5	UNTERSCHIEDLICHER EINFLUSS DER TNFA-REZEPTOREN AUF DIE AXONALE REGENERATION	42
4.6	DER EINFLUSS DER TNFA-REZEPTOREN AUF MAKROPHAGEN WÄHREND DER WD	45
4.6.1	<i>Zusammenhang zwischen axonaler Schädigung und zellulären Reaktionen bei WD</i>	46
4.7	EINFLUSS DER TNFA-REZEPTOREN AUF DIE ÖDEMENTWICKLUNG.....	48
4.8	TNFA-REZEPTOREN UND ANGIOPROLIFERATIVE WIRKUNG.....	49
4.9	TNFA-REZEPTOREN UND 'ANDERE ZELLEN'	51
5	SCHLUSSFOLGERUNG	53
6	KLINISCHE RELEVANZ	55
7	ZUSAMMENFASSUNG	56
8	LITERATUR	58

Inhalt

ANHANG

ABKÜRZUNGEN

ABBILDUNGEN

TABELLEN

ROHDATEN

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

1 EINLEITUNG

1.1 Nervenschädigungen und klinische Konsequenzen

Periphere Nerven können durch zahlreiche, unterschiedliche Einwirkungen geschädigt werden. Die große Mehrheit isolierter Nervenschäden (Mononeuropathien) wird durch mechanische Noxen, die entweder von außerhalb des Körpers auf den Nerven einwirken, oder durch Strukturen in der Umgebung des Nervens hervorgerufen. Unfälle, bei welchen der Nerv akutem Druck und Scherkräften ausgeliefert ist, spielen dabei eine große Rolle. Ein weiterer Anteil ergibt sich aus zunächst unbemerkten Druckeinwirkungen an prädestinierten Körperregionen wie sie z.B. beim Karpaltunnelsyndrom (CTS) oder dem Tarsaltunnelsyndrom (TTS) vorkommen. So kann eine nicht selten beruflich bedingte, ungünstige Körperhaltung, zu einer permanenten Stresseinwirkung auf bestimmte Nerven führen, welche nicht ausreichend Zeit finden sich zwischen den einzelnen Stressereignissen zu erholen, was schließlich erhebliche Funktionseinbußen zur Folge haben kann. Auch hormonelle und metabolische Veränderungen, welche mit einer Anschwellung oder Vermehrung des umgebenden Gewebes in Verbindung stehen, können für mechanische Schäden des Nervens verantwortlich sein. Ein nicht unbeträchtlicher Anteil traumatisch bedingter Neuropathien wird iatrogen, durch Injektionen, zu enge Verbände oder falsche Lagerung während einer Operation verursacht. Ausschlag gebend für das Ausmaß der Nervenschädigung ist die Höhe des Drucks und die Dauer der Druckeinwirkung. Aber auch geringe Druckeinwirkungen können bei Menschen mit besonderer genetischer Disposition schon zu erheblichen Läsionen am Nerven führen. Bei entsprechend hoher Druckeinwirkung kommt es zur initialen Schädigung der Markscheide, welche bei ausbleibender Druckentlastung auch axonale Schädigungen, bindegewebige Veränderungen und Muskelatrophien nach sich

1. Einleitung

ziehen kann. Die metabolischen, morphologischen und pathophysiologischen Veränderungen die dabei im Nerven auftreten, können klinisch weitreichende Konsequenzen für die betroffenen Patienten haben. Je nach qualitativer Zusammensetzung des betroffenen Nerven können funktionelle Beeinträchtigungen (Paresen, Hypästhesien, vegetative Dysfunktionen) sowie unangenehme Missempfindungen und schmerzhaft Zustände (Hyperalgesien, Parästhesien) einen sinnvollen Gebrauch der betroffenen Körperteile unmöglich machen. Entsprechend bedeutungsvoll sind Behandlungsmethoden, welche dabei behilflich sind, die ursprüngliche Funktion wieder herzustellen bzw. schädigende Prozesse zu blockieren. Obwohl der periphere Nerv sich durch ein selbst heilendes Potential auszeichnet, führt dieses nicht in jedem Fall zur Regeneration des Nerven und zur Wiederherstellung seiner physiologischen Funktion. Oft kommt es nach Beseitigung der Druckbelastung durch eine operative Dekompression nur zu einer teilweisen Erholung mit unvollständiger Wiederherstellung der Empfindungsqualitäten. Auch wenn die pathologischen Veränderungen nach Nervenverletzungen schon seit längerer Zeit untersucht werden, ist eine therapeutische Steuerung regenerativer Prozesse zum aktuellen Zeitpunkt immer noch nicht möglich.

Charakteristischerweise führt eine akute Kompression ebenso wie eine chronische Einengung in anatomischen Engpässen zu typisch degenerativen Veränderungen im Nerven und dessen Umgebung. Untersuchungen, die bis auf die molekulare Ebene dieser Veränderungen vordringen, liefern Hinweise, dass die Steuerung dieser Prozesse auf bestimmte Proteine, so genannte Zytokine, zurückzuführen sind, die normalerweise mit entzündlichen Prozessen assoziiert werden. Für ein besseres Verständnis der pathologischen Veränderungen und die Möglichkeit einer effektiveren Therapie ist es deshalb unverzichtbar, diejenigen Mechanismen, welche eine erfolgreiche Regeneration ermöglichen bzw. degenerative Prozesse hemmen, weiter aufzudecken und zu konkretisieren.

1.2 Morphologische Veränderungen nach Nervenschädigung

Seit 1928 ist schon bekannt, dass der Nerv nach Verletzung bei erhaltener Markscheide nicht einfach zu Grunde geht, sondern einen systematischen Abbau- und Erholungsprozess durchläuft, die Waller'sche Degeneration (WD). Dabei kommt es zu einer Abräumreaktion des geschädigten Nervengewebes, welche von einer Entzündung begleitet wird (Ramon y Cajal 1928). Die WD stellt eine wichtige Voraussetzung für die Regenerationsfähigkeit des geschädigten Neurons dar [93, 94]. Durch die Verletzung der Nervenfasern kommt es sowohl zu Veränderungen innerhalb des Nervens, wie auch in der Umgebung des verletzten Nerven. Vorerst kommt es zur Ausbildung eines Wachstumskolbens am proximalen Nervenende an welchem sich Sprossen bilden, die dann dem distalen Ende entgegen wachsen. Der distale Anteil degeneriert einschließlich der Markscheide. Die anfallenden Myelinreste werden von angelockten Makrophagen und Schwannzellen phagozytiert. Gleichzeitig proliferieren letztere und bilden Wachstumsfaktoren sowie einen kompakten Strang (Bünger-Band), in welchen das auswachsende Axon eindringt. Idealerweise kommt es zur Überbrückung des Defekts durch die Sprossen und Anschluss an das ursprüngliche Erfolgsorgan. Die erfolgreiche Regeneration hängt dabei entscheidend von immunologischen Regulationsmechanismen während der WD ab [79]. Wie viele immunologische Vorgänge stellen sie ein wichtiges Instrument des Körpers dar, um nach einer Störung den gewohnten, physiologischen Zustand wieder herzustellen. Bei pathologischen Konstellationen allerdings kann es zu Fehlregulationen mit schwerwiegenden Konsequenzen kommen. In Studien an Mäusen- und Rattennerven, in denen morphologische Untersuchungen mit Beobachtung des Schmerzverhaltens gekoppelt wurden, konnte aufgedeckt werden, dass bestimmte morphologische Veränderungen (wie z.B. akuter Axonverlust, Ischämie, Ödembildung) während der WD von neuropathischen Schmerzen

1. Einleitung

begleitet waren [63, 86, 88]. Andererseits stellte sich heraus, dass das Auftreten dieser Schmerzen zeitlich eng an die Hochregulation pro-inflammatorischer Zytokine gebunden ist [30, 55]. Dabei scheinen sich diese Zytokine nicht nur an degenerativen Prozessen zu beteiligen, sondern auch regenerationsfördernde Eigenschaften zu besitzen. Aktuelle Studien konzentrieren sich deshalb vor allem auf die Untersuchung dieser Zytokine, da man hier, durch die Möglichkeit einer direkten Manipulation degenerativer bzw. regenerationsfördernder Mechanismen einen erfolgsversprechenden therapeutischen Angriffspunkt vermutet.

1.3 Die Rolle der Zytokine während der Waller'schen Degeneration

Bei erwähnten Zytokinen handelt es sich um eine Gruppe heterogener Polypeptide die von immunologischen Zellen freigesetzt werden, um Verhalten oder Eigenschaften derselben oder anderer Zellen zu beeinflussen. Sie können ihre Wirkung sowohl lokal (Zell-Zell-Kontakte) als auch in weiterer Entfernung über die Bindung an spezifische Rezeptoren entfalten [42]. Funktionell werden sie in zwei große Gruppen unterteilt, abhängig von ihrer Wirkung auf Immunzellen:

Einerseits in pro-inflammatorische Zytokine (Interferon- γ , Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 1 α (IL-1 α) und andere Interleukine) und andererseits in anti-inflammatorische Zytokine (transforming growth factor (TGF) und z.B. die Interleukine 4, 5 und 10). Sie besitzen ein sehr breitgefächertes Wirkungsspektrum, welches durch das organisierte Zusammenwirken der Zytokine als großes Netzwerk zustande kommt [79]. In der klassischen Sichtweise geht man davon aus, dass die pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-1 α bei Entzündungen akut hochreguliert werden und anschließend weitere inflammatorische Zytokine aktivieren, erst darauf folgt dann die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine,

1. Einleitung

welche für die Rückregulierung der Zytokine zur Beendigung der Entzündungsreaktion verantwortlich gemacht werden [65]. Bemerkenswert ist, dass diese Zytokine im menschlichen Körper neben vielen positiven Effekten wie z.B. der Steuerung von Wachstumsvorgängen, der Apoptose von Tumorzellen und Mikroorganismen sowie auch der Beendigung einer erfolgreichen Immunabwehr, zusätzlich viele unerwünschte Wirkungen entwickeln können [1, 94]. So spielen sie ebenso eine Rolle beim Toxic Shock Syndrome wie auch in autoimmunologischen Reaktionen und chronisch entzündlichen Krankheitsbildern wie der Polyarthrit und Morbus Crohn. Auch im peripheren Nervensystem lässt sich während der WD ein funktionell wichtiger Zusammenhang zwischen den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF α , Interleukin 6 und Interferon γ und neuropathischen Veränderungen nachweisen [18]. Es wird vermutet, dass diese für die Initiation, Organisation und Regulation der WD verantwortlich sind [79]. Durch ihre Zunahme im Gewebe kommt es sowohl zur Anreicherung entzündungsfördernder Substanzen, zur Koordination zellulärer Mechanismen als auch zum Anstieg wachstumsfördernden Substanzen im geschädigten Nervenabschnitt [38, 79]. Von den genannten Zytokinen wird insbesondere TNF α eine Schlüsselrolle zugewiesen. Im peripheren Nervengewebe kann TNF α Schmerzen induzieren [89], zu neuronalen und bindegewebigen Wachstumsvorgängen, zum Zusammenbruch der Blut-Nerven-Schranke, Demyelinisierungsprozessen und neuronalem Zelltod führen [46, 70].

1.4 Die Rolle von TNF α während der Waller'schen Degeneration

TNF α ist eines von bisher 19 Mitgliedern einer TNF-Liganden Superfamilie welche alle an immunmodulatorischen Vorgängen beteiligt sind [1]. Es handelt sich dabei um ein pleiotropes Zytokin, welches hauptsächlich in Makrophagen und Monozyten gebildet wird und das an der Vermittlung einer Vielzahl verschiedener immunologischer Antworten beteiligt ist [42]. Für TNF α sind 2

1. Einleitung

verschiedene bioaktive Formen beschrieben worden: eine membranständige und eine lösliche, die durch die Abspaltung aus der membranständigen Form durch Metalloproteasen hervorgeht. Beide können an dazugehörige Rezeptoren binden [33]. Durch die Rezeptor- Liganden- Interaktion kommt es zur Aufteilung des Signals auf verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege (NF κ b, JNK, MAPK) mit unterschiedlichen Konsequenzen [1, 39, 107]. So vermittelt das TNF α -Signal entweder überwiegend die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine oder Wachstum und Differenzierung durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, oder vermittelt apoptotische Vorgänge der Zelle. Die einzelnen molekularen Schritte der Signalverarbeitung und ihre Steuerungsmechanismen sind jedoch erst teilweise entschlüsselt. Sowohl der Gewebetyp wie auch der präzise zelluläre Kontext, die TNF α -Rezeptor-Zusammensetzung auf der Zelloberfläche, als auch der Zeitpunkt und die Dauer der TNF α -Aktivierung scheinen wichtige Faktoren darzustellen, welche die Bevorzugung einer bestimmten Zellantwort mitbestimmen [107].

Zur Funktion von TNF α während der WD ist folgendes bekannt:

Nach einer Verletzung des peripheren Nervens wird TNF α im Endoneurium innerhalb von 12 Stunden hochreguliert und hält sich danach noch auf einem niedrigeren Niveau bis zu Tag 7 nach der Operation [30, 47].

Zu Beginn der WD erfolgt die Produktion von TNF α in Schwannzellen, welche sich räumlich am nächsten zum geschädigten Axon befinden. Später stellen ortständige und eingewanderte Makrophagen die Hauptquelle der TNF α -Produktion dar [79]. Der steigende Gehalt an TNF α im Nervengewebe induziert die Produktion von Adhäsionsmolekülen und Matrix -Metalloproteasen [77] in Schwannzellen und ortständigen Makrophagen [79] und es folgt die Immigration ortsfremder Makrophagen aus der Blutbahn. Die angelockten Makrophagen sind ebenso an der Nervendegeneration beteiligt [83] wie auch später am Erholungsprozess des Nervengewebes, indem sie durch die Ausschüttung

1. Einleitung

weiterer Zytokine das Wachstum von Schwannzellen und die Remyelinisierung des Nervens unterstützen [46].

Der Verlust der Nervenfasern tritt zeitlich eng mit der Aktivierung der Makrophagen durch $\text{TNF}\alpha$ auf und führt zur Entfernung des zerstörten Materials durch Phagozytose [54]. Des Weiteren sind diese im aktivierten Zustand verantwortlich für die Produktion des NGF (neuronal growth factor) [38], welcher zur Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen führt. Die Beobachtungen an neuropathischen Tiermodellen zeigten, dass die Stimulation der Endothelzellen durch $\text{TNF}\alpha$ zu einer Wandverdickung der Gefäße führt, durch die Proliferation von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten [88].

Die direkte Injektion von $\text{TNF}\alpha$ in den Nerven deckte ein von Makrophagen unabhängiges destruierendes Potential durch $\text{TNF}\alpha$ auf [70].

Mehrere Untersuchungen konnten bisher einen positiven Einfluss auf das Schmerzverhalten durch Blockade von $\text{TNF}\alpha$ nachweisen, entweder durch Blockade der $\text{TNF}\alpha$ -Synthese oder durch Antikörper gegen $\text{TNF}\alpha$ selbst [38, 55, 87, 91, 106]. Im Bezug auf strukturelle Veränderungen konnten Versuche mit $\text{TNF}\alpha$ -Knockoutmäusen einen protektiven Effekt durch Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ auf den akuten Neuronenverlust zeigen [54, 83].

Andererseits wurden in einem Experiment mit Ratten, die vor einer Nervenquetsch-Verletzung mit $\text{TNF}\alpha$ behandelt wurden, ein protektiver Effekt auf die Regeneration von motorischen und sensorischen Funktionen beobachtet [14].

Es ist bekannt, dass $\text{TNF}\alpha$ alle diese Wirkungen über zwei verschiedene Rezeptoren vermittelt [104], welche vermutlich unterschiedliche Signaltransduktionswege [1, 39] einleiten. Unklar ist bisher, ob die beiden Rezeptorsubtypen in neuronalem Gewebe konträre Antworten hervorrufen können, die regenerationsfördernde von destruktiven Effekten abgrenzen. Hinweise darauf ergeben sich aus einem Experiment an einem Modell für

1. Einleitung

retinale Ischämie bei TNF α -Rezeptor-Knockoutmäusen (TNFR $^{-/-}$), in welchem die Anwesenheit von TNF-R1 zu einer vermehrten Destruktion führte, im Gegensatz zu TNF-R2, welcher protektive Eigenschaften aufwies [24].

1.5 Struktur und Funktion der TNF α -Rezeptoren

Die Signale, welche TNF α vermittelt, werden durch die Rezeptoren TNF-R1 (TNFR 55, p55) u. TNF-R2 (TNFR 75, p75) an die Zellen weitergegeben [104]. Bei TNF-R1, welcher ständig exprimiert wird, handelt es sich um nahezu alle Zellen des Körpers, auch Zellen des Nervengewebes wie Schwannzellen und Nervenzellen der Spinalganglien [8]. Im Gegensatz dazu wird TNF-R2 erst bei entsprechenden Signalen induziert und befindet sich ansonsten hauptsächlich auf lymphozytären Zellen [33]. Die Rezeptoren unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch ihren Affinitätseigenschaften zum TNF α -Liganden. Ein weiteres Merkmal von TNFR1 ist, dass er sowohl membranständiges TNF als auch lösliches binden kann, anders als TNFR2, welcher nur mit membranständigem TNF α interagiert [34]. Strukturell handelt es sich bei den Rezeptoren um zunächst einzelne transmembrane Glykoproteine der Tyrosinkinase-abhängigen Rezeptorfamilie, welche erst durch die Aktivierung von TNF α trimerisieren. Obwohl sich ihre extrazelluläre, cysteinreiche Domäne ähnelt unterscheidet sich ihr intrazellulärer Anteil [52]: charakteristischerweise besitzt TNF-R2 keine Todes -Domäne, welche für die Vermittlung der Apoptose über Caspasen bedeutsam ist [78]. Allerdings besitzt TNF-R2 eine cytosolische Domäne, an welche die Adaptermoleküle TRAF 1 und 2, die mit der Vermittlung protektiver Eigenschaften durch Genexpression in Verbindung gebracht werden [39], direkt binden können, was bei TNF-R1 nur indirekt geschieht. Bei beiden Rezeptoren kommt es durch die Bindung von TNF α an den Rezeptor zur Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden in welchen Kinasen die Anlagerung von verschiedenen Adaptermolekülen ermöglichen. Aufgrund der differentiellen zytosolischen Architektur und der divergierenden Signalweiterleitung

1. Einleitung

vermutet man unterschiedliche Effekte der beiden Rezeptorsubtypen. Bisherige Erkenntnisse über die spezifischen Antworten der Rezeptoren im peripheren Nervensystem wurden hauptsächlich über TNF-R1 gewonnen. So konnte man z.B. durch Versuche mit Rezeptorantikörpern auf eine dominante Rolle von TNF-R1 bei der Entwicklung von Schmerzen schließen [90], im Gegensatz zu TNF-R2, welchem lediglich eine den TNF-R1 unterstützende Funktion zugewiesen wird. Zu möglichen differenten Einflüssen auf ihr regenerationsförderndes bzw. –hemmendes Potential im peripheren Nervensystem sind bisher erst wenige Daten verfügbar. So wird TNF-R1 eine wichtige Rolle in der Makrophagenaktivierung über Adhäsionsmoleküle [77] und der konsekutiven axonalen Degeneration [54, 83] zugeschrieben, während die Rolle von TNF-R2 noch weitgehend ungeklärt ist.

1.6 Ziel dieser Studie:

Diese Arbeit konzentriert sich darauf, den unterschiedlichen Einfluss der TNF-Rezeptoren auf Degeneration und Regeneration während der WD nachzuweisen.

Hierzu sollte nach einer modellhaften Verletzung des N. ischiadicus der Prozess der WD in drei verschiedenen Mäusegruppen beobachtet werden. Bei den ersten zwei Gruppen handelt es sich um genetisch manipulierte Tiere, denen jeweils einer der beiden TNF α -Rezeptoren fehlt (TNF-R1/TNF-R2-Knockoutmäuse), die dritte Gruppe besteht aus Wildtypmäusen (WT). Es wurden Zeitpunkte gewählt, an welchen degenerative und regenerative Prozesse eine bedeutsame Rolle spielen. Als Verletzungs-Modelle wurde einerseits das CCI-Modell (Chronic constriction injury nach Bennett und Xie 1988, [6]) als bereits gut etabliertes Tiermodell gewählt, welches die Auswirkungen von Trauma und Entzündung kombiniert und zusätzlicher mit einer ischämischen Komponente durch bleibende Einengung des Nerven ausgestattet ist. Parallel dazu wurden die Tiere im Nervenquetsch -Modell

1. Einleitung

(Crush) beobachtet, in welchem der Nerv zwar kurz gequetscht wird, aber nicht wie im CCI-Modell eingengt bleibt, und somit regenerative Prozesse zulässt. An diesen Modellen sollte die Frage geklärt werden, ob der Mangel an einem der TNF α -Rezeptoren zu einem veränderten Ablauf der De- und Regeneration des N. ischiadicus führt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsaufbau

Um die unterschiedlichen Wirkungen der TNF α -Rezeptoren zu untersuchen, wurde bei Mäusen der N. ischiadicus frei präpariert und an definierter Stelle eine modellhafte Verletzung zugefügt (s. 2.2). Nach Überlebenszeiten, welche in den Zeitraum von De- und Regeneration fallen, von 3, 7, 15 und 36 Tagen im CCI-Modell und 3, 7 und 28 Tagen im Crush-Modell wurde der N. ischiadicus entnommen, histologisch präpariert (siehe 2.3.) und anschließend mikroskopiert. Dabei wurde jeweils ein ganzer Nervenfaszikel in einer 1750-fachen Vergrößerung (Semidünnschnitte) und 700-fachen Vergrößerung (Cryostatschnitte) unter dem Mikroskop (Axiophot 2, Zeiss), welches mit einem vollautomatischen Suchtisch (Märzhäuser, Wetzlar, Germany) und einer Sony CCD-Kamera ausgestattet ist, zunächst digitalisiert dargestellt und die relevanten Strukturen dann computergestützt (Image Pro Plus 4.0, Mediacybernetics, Leiden, Niederlande) ausgezählt (Siehe 2.4. und Abbildung 1). Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft SPSS 10.0.

Wegen der besonderen Bedeutung der Makrophagen während der WD wurden zusätzlich Cryostatschnitte mit immunhistochemischer Färbung der Makrophagen angefertigt. Zur Markierung der Makrophagen wurde ein monoklonaler Ratte-anti-Maus-Antikörper verwendet. Als chromogenes Substrat DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid). Mit Hilfe einer densitometrischen Computerauswertung (Image Pro Plus 4.0, Mediacybernetics, Leiden, Niederlande) wurden diese in der weiter unten beschriebenen Weise erfasst (siehe 2.4. und Abbildung 2). Sämtliche Auswertungen wurden verblindet, also ohne Kenntnis des Genotyps der Mäuse durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.2 Versuchstiere

Die Experimente wurden an 126 ausgewachsenen weiblichen und männlichen C57BL/6J Mäusen (17,9 – 38 g Körpergewicht) durchgeführt. Die Tiere wurden, wie in den Tabellen 1 (CCI) und 2 (Crush) aufgelistet, auf die unterschiedlichen Gruppen nach jeweiligem Genotyp und Operationstag aufgeteilt. Die Brutpaare stammen von H. Bluethmann, Hoffmann La Roche (Basel, Schweiz). Die Tiere wurden bei einem hell- dunkel- Zyklus von 14:10 Stunden gehalten mit Standardfutter für Nagetiere und Wasser ad libitum. Alle Experimente wurden vom Staat Bayern genehmigt und sind im Einklang mit dem Beschluss vom 24. November 1986 (86/609/EEC) der Europäischen Vereinigung für die Haltung und Verwendung von Labortieren.

2.2.1 Modell 1: Chronisch konstriktive Nervenläsion (CCI)

Die Mäuse wurden mit Pentobarbital (Narcoren, Rhone-Merieux Laupheim) in einer Dosierung von 50 mg/kg durch intraperitoneale Injektion anästhesiert. Anschließend wurde der Nervus ischiadicus auf einer Seite mittels stumpfer Durchtrennung des M. gluteus maximus oberhalb der Trifurkation freigelegt, und drei Ligaturen (Prolene 7, Ethicon) wurden im Abstand von 1mm angelegt. Die Ligaturen wurden so fest angezogen, dass der Nerv gerade leicht eingeschnürt wurde und ein kurzes Zucken der Extremität erkennbar war [6]. Die Muskelnahrt erfolgte mit Silcam 6 (Braun), die Haut wurde mit Klammern (Aesculap 7,5 mm, Braun) verschlossen.

Tabelle 1: Anzahl der CCI-operierten Tiere, aufgeteilt nach Genotyp und Zeitpunkt der Gewebeentnahme nach Operation.

Tiere	Anzahl				
	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 15	Tag 36
CCI Wildtyp	4	4	4	4	8
TNF-R1 ^{-/-}	4	4	4	4	8
TNF-R2 ^{-/-}	4	4	4	4	8

2. Material und Methoden

2.2.2 Modell 2: Crush Verletzung

Der N. ischiadicus wurde zunächst wie bei der CCI-Methode freigelegt. Anschließend wurde der Nerv in 3 Serien für jeweils 10 Sekunden mit einer Juwelliert-Pinzette Nr. 5 gequetscht und anschließend wie bei den CCI-operierten Tieren beschrieben vernäht.

Tabelle 2: Anzahl der Crush-operierten Mäuse, aufgeteilt nach Genotyp und Zeitpunkt der Gewebeentnahme nach Operation.

Tiere	Anzahl			
	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 28
Crush				
Wildtyp	3	4	5	5
TNFR-1-/-	4	4	5	5
TNFR-2-/-	4	4	6	5

2.3 Histologische Aufbereitung

Nach in Tabelle 1 und 2 definierten Zeiten wurde der präparierte Nervenabschnitt zur histologischen Aufbereitung entnommen. Dabei wurde das entnommene Präparat in zwei Segmente aufgeteilt. Der 3 mm distal der Läsionsstelle gelegene Abschnitt wurde für die Cryostatschnitte verwendet (siehe 2.3.2); weitere 2 mm Nerv wurden direkt distal des ersten Segments für die Präparation der Semidünnschnitte gewonnen.

2.3.1 Semidünnschnitte

2.3.1.1 Konservierung des Materials:

Das weiter distal gelegene Nervenstück wurde direkt nach der Entnahme in Glutaraldehyd über Nacht fixiert (9 ml 0,15 M Phosphatpuffer, Fa. Merck und 1 ml 25% Glutaraldehyd pH 7,4, Fa. Merck). Die Prozedur der Kunstharzeinbettung dauerte insgesamt 3 Tage. Zunächst erfolgte das Auswaschen des Gewebestücks mit 0,15 M Phosphatpuffer 3x hintereinander für jeweils 10 min. Anschließend wurde es mit einem Gemisch aus 4% Osmium

2. Material und Methoden

(wässrig, Fa. Chempur) und Daltonpuffer (Fa. Merck, Verdünnung 1:1) 90 min lang nachfixiert. Das Osmium wurde danach wieder mit 0,15 M Phosphatpuffer ausgewaschen (3x 15 min). Die Nervenpräparate blieben dann über Nacht in der Pufferlösung bei 4 °C. Am 2. Tag erfolgte dann die Dehydrierung in aufsteigender Acetonreihe (zuerst 30%-60%, jeweils 15 Minuten). Diese wurde dann für 90 min unterbrochen, um das Gewebe in einer 70%igen Acetonlösung mit Phosphorwolframsäure (Fa. Chroma) und Uranylacetat (Fa. Merck) vorzukontrastieren.

Im Anschluss daran wurde die Acetonreihe bis 100% fortgeführt. Die Einbettung vollzog sich in einem langsamen Übergang bei dem der Acetonanteil verringert und der Anteil der Einbettungslösung bis 100% erhöht wurde. (1:1, 1:3 und 0:1 jeweils 2x 30 min). Über Nacht verblieb die Lösung wieder bei 4 °C im Kühlschrank. Am nächsten Morgen wurde das Einbettungsgemisch noch einmal gewechselt und die Nerven in geeignete Formen gegossen. Zur Polymerisation wurden die Präparate dann für 8 h in den Wärmeschrank (70 °C) gelegt.

2.3.1.2 Herstellen der Kunstharzschnitte

Um das in Kunstharz fixierte Nervenpräparat richtig schneiden zu können musste der Block zunächst auf eine geeignete Größe getrimmt werden, damit letztendlich nur der fixierte Nerv übrig blieb. Dafür wurde der Block in eine Trimmmaschine gespannt, mit der man zunächst die Kunstharzüberstände entfernte und anschließend die Kanten abschliff. Zum Herstellen der Semidünnschnitte (1 µm) wurde der Nerv dann in einer zusätzlichen Schneidevorrichtung weiterverarbeitet, die mit speziellen Glasmessern versehen ist. Der Block wurde solange mit einer Mikrometerschraube immer um 0,5 µm nach vorne verlagert, bis dieser vom einem mit Aqua dest. benetzten Glasmesser angeschnitten wurde. Die einzelnen Schnitte wurden dann mit einer Pipette aus dem Aqua dest. aufgenommen und auf einen Objektträger

2. Material und Methoden

übertragen (ca. 10 Schnitte pro Objektträger), welche zum Trocknen danach auf eine 80°C heiße Platte gelegt wurden.

2.3.1.3 Färbung

Nach dem Trocknen wurde gefiltertes 0,2%iges Methylenblau (Fa. Baker) auf die Schnitte aufgetragen und nach 1 min wieder mit Aqua dest. abgewaschen. Danach erfolgt eine Fixierung in Xylol und abschließend das Eindecken in Nitroclond.

2.3.2 Cryostatschnitte:

2.3.2.1 Konservierung des Materials

Das Material der Cryostatschnitte entstammt dem weiter proximal gelegenen Nervenabschnitt desselben Nerven der auch für die Semidünnschnitte präpariert wurde. Das entnommene Gewebe wurde direkt danach in Tissue Tek (Polyvinylalkohol und Carbowax, Sakura 4583) fixiert und in einem stickstoffgekühlten N-Methylbutan-Bad eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung, wurde das Gewebe bei –80°C gelagert.

2.3.2.2 Herstellung der Cryostatschnitte

Zur immunhistochemischen Aufarbeitung wurden 10 µm Cryostatschnitte angefertigt. Dazu wurde der noch gefrorene Tissue-Tek-Block in eine Schnitthalterung gespannt und in einer Kammer bei –20°C geschnitten. Die Schnitte wurden dann bei Raumtemperatur auf Poly-L-beschichtete Objektträger aufgezogen (2 Schnitte pro Objektträger) und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Fixiert wurden die Präparate 10 min in 100% Aceton bei –20°C und danach für 5 min auf einer Heizplatte (42-45°C) getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei –20°C bis zur Weiterverarbeitung.

2. Material und Methoden

2.3.2.3 Immunhistochemische Färbung:

Nach Umrandung der Schnitte mit dem Pap Pen wurden sie bei Raumtemperatur mit 10% Albumin Fraktion V (BSA, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) für 30 min inkubiert. Nach dem entfernen des BSA wurde ein monoklonaler Ratte-anti-Maus-Makrophagen-Antikörper (CD 11b, Serotec) aufgetragen. Mit diesem wurde das Gewebe über Nacht bei 4°C oder bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde 5x mit Tris (Trishydroxymethylaminomethan)-Waschpuffer (100 ml Tris-Stammlösung aus 60,5 g Tris + 500 ml Aqua dest. + 400 ml 1 M HCl; pH 7,35 +40 g NaCl in 2 l Aqua dest.; pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde für 20 min Methanol + 30% H₂O₂ aufgetragen. Erneut wurde 5x gewaschen und der 2. Antikörper (biothenyliertes Anti-Ratten IgG, Vektor) aufgetragen: Erst für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und nochmals für 10 Minuten bei 37°C. Im Anschluss daran wurde wieder 5x gewaschen. Zur Darstellung der Immunreaktivität wurde ein Vectastain ABC-Peroxidase-Kit (Camon; Wiesbaden) verwendet. Das Mischungsverhältnis der Reagenzien betrug: 1 ml 1% BSA + 10 µl Reagenz B. Diese Lösung wurde aufgetragen und 30 min bei Raumtemperatur bzw. 10 min bei 37°C inkubiert. Abermals wurde 5x gewaschen. Abschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid) als chromogenes Substrat. Dieses wurde in folgendem Mischungsverhältnis vorbereitet: 5 ml DAB-Stammlösung (24,1 g Tris in 1 l Aqua dest.) + 7,7 ml 0,1 M HCl + 7,3 ml Aqua dest.; pH 7,6 + 2 Stück 10 mg-DAB-Tabletten (Kem en Tec; Dänemark) + 15 µl 30% H₂O₂. Die Färbung wurde durch Zugabe von Aqua dest. abgestoppt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zum Abschluss verblieben die Objektträger 2x 5 min in Xylol und wurden mit Eukitt eingedeckt.

2.4 Mikroskopische Auswertung

2.4.1 Semidünnschnitte:

Die Semidünnschnitte des Nervus ischiadicus wurden lichtmikroskopisch ausgewertet (Axiophot 2, Zeiss). Dafür wurden die Nervenfaszikel jeweils in mehreren Teilbildern (ca. 20-30 pro Nerv) in 1750-facher Vergrößerung aufgenommen. Die morphometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Image pro plus 4.0 Computerprogramms (Media Cybernetics, Leiden, Niederlande) und eines quadratischen Rasters (Abstand 50 µm), welches auf die Teilbilder projiziert wurde. Auf den Schnittpunkten des Rasters wurden die einzelnen Strukturen mit entsprechenden Symbolen markiert und ausgezählt (siehe Abbildung 1).

Bei der Auszählung wurden folgende Strukturkategorien berücksichtigt:

N = intakte markhaltige Nervenfasern

D = degenerierte markhaltige Nervenfasern

M = Makrophagen

G = Gefäße

SR = strukturloser Raum (als Marker für Ödembildung)

AZ = andere Zellen (entspricht Zellkernen und Zytoplasma der Schwannzellen und Zytoplasmaresten, welche nicht eindeutig Makrophagen zugeordnet werden können, Fibroblasten und weiteren Entzündungszellen wie Mastzellen und Lymphozyten).

Pro Nerv wurden 300-400 Strukturen gezählt. Die Anzahl der insgesamt gezählten Strukturen bildet den Bezugspunkt für die Prozentangaben (Anzahl der gezählten Strukturen insgesamt = 100% der Rasterkreuzungspunkte im Nerven).

2. Material und Methoden

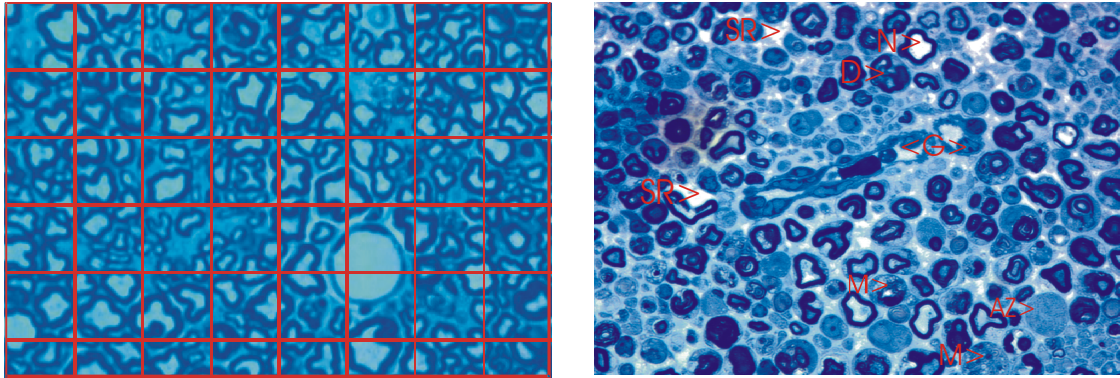


Abbildung 1: Beispiel für die computergestützte Auswertung unter dem Lichtmikroskop aufgenommener Semidünnschnitte, x1750. Links: normaler Nerv mit Raster, Rechts: Nerv 3 Tage nach Crush-Läsion. Die Pfeile zeigen Strukturen, welche bei der Auswertung berücksichtigt wurden. N = intakte Nervenfasern, D = degenerierte Nervenfasern, M = Makrophage, G = Gefäß, SR = strukturloser Raum (Ödem), AZ = andere, nicht neuronale Zellen.

2.4.2 Cryostatschnitte

Die Cryostatschnitte wurden lichtmikroskopisch in 700-facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop aufgenommen und computergestützt ausgewertet. Auch hier wurden die Schnitte in mehreren Teilbildern aufgenommen und anschließend einzeln ausgewertet. Dabei wurde der Ausschnitt des Axons unterhalb des Endoneuriums als „area of interest“ (AOI) eingegrenzt. Anschließend wurde manuell eine Referenzstruktur (gut angefarbter Makrophage) gewählt, welche durch die automatische Messung der Farbdichte vom Computer erkannt wird. Danach waren noch manuelle Korrekturen (z.B. vom Computer fälschlich markierter Strukturen) möglich. So konnte die Gesamtfläche der angefarbten Makrophagen erfasst und in Prozent der gesamten Nervenfläche wiedergegeben werden (siehe Abbildung 2).

2. Material und Methoden

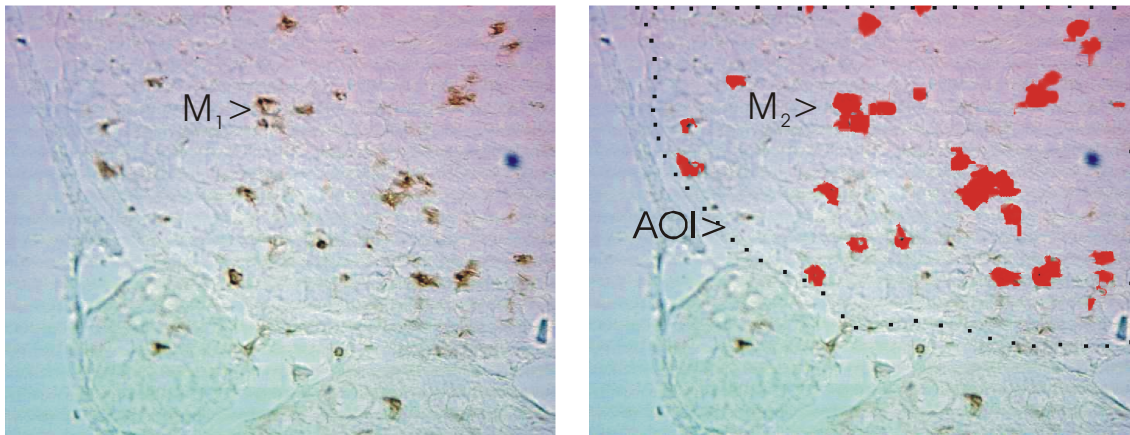


Abbildung 2: Beispiel für die computergestützte densitometrische Auswertung der Cryostatschnitte des N. ischiadicus zur Erfassung der Gesamtfläche an Makrophagen pro Nerv. Links: Lichtmikroskopisches Bild eines Nerven 3 Tage nach Crush-Läsion, M_1 = immunhistochemisch markierter Makrophage. Rechts: gleiches lichtmikroskopisches Bild mit densitometrischer Maske, AOI= area of interest, M_2 = maskierter Makrophage, gestrichelte Linie= Begrenzung der AOI. x700

2.5 Statistische Auswertung:

Um eine große Varianz innerhalb der Tiergruppen zu vermeiden, wurden nur Nervenpräparate mit guter Mikroskopierqualität berücksichtigt (keine Verzerrung, möglichst gleichmäßige Schichtdicke) und solche, die in einem definierten Schnittniveau des Nerven gewonnen wurden (mindestens 3, höchstens 5 Faszikel; siehe Abbildung 3). Die ursprüngliche Gruppengröße wurde deshalb auf die in den Tabellen 3-6 angegebenen n-Zahlen reduziert.

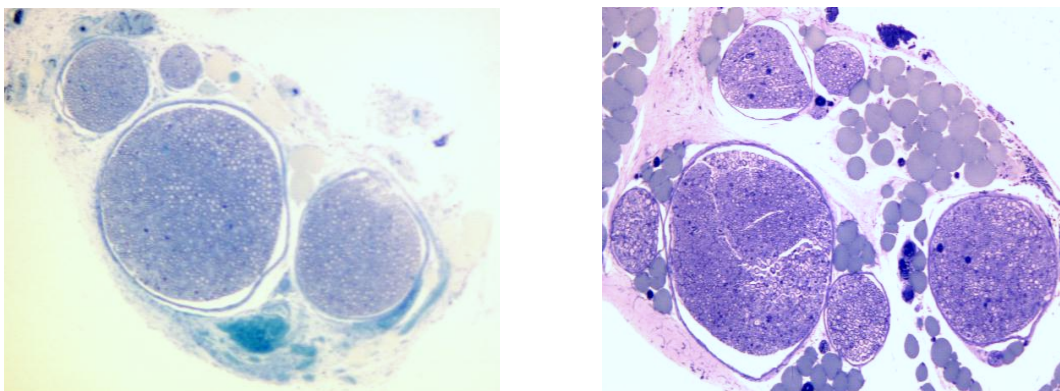


Abbildung 3: Darstellung der Auswahlkriterien für die Präparatqualität. Linkes Bild: idealer Schnitt, unverzerrt und Faszikelanzahl zwischen 3-5. Rechtes Bild: ungeeignetes Schnittniveau, Faszikelanzahl > 5. Nur Präparate im geeigneten Schnittniveau wurden für die statistische Auswertung berücksichtigt. x175

2. Material und Methoden

Tabelle 3: Anzahl der CCI-operierten Tiere (Semidünnschnitte = SD), die in die Statistik aufgenommen wurden, aufgeteilt nach Genotyp und morphologisch relevanten Operationszeitpunkten

Tiere	Anzahl				
	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 15	Tag 36
CCI (SD)					
Wildtyp	3	3	3	3	5
TNF-R1-/-	3	3	3	3	4
TNF-R2-/-	3	3	1	5	4

Tabelle 4: Anzahl der CCI-operierten Tiere (Cryostatschnitte = IH), die in die Statistik aufgenommen wurden, aufgeteilt nach Genotyp und morphologisch relevanten Operationszeitpunkten

Tiere	Anzahl			
	Tag 3	Tag 7	Tag 15	Tag 36
CCI (IHC)				
Wildtyp	3	3	3	3
TNFR-1-/-	3	2	3	4
TNFR-2-/-	3	1	5	3

Tabelle 5: Anzahl der Crush-operierten Tiere, welche in die Statistik aufgenommen wurden, aufgeteilt nach Genotyp und morphologisch relevanten Operationszeitpunkten

Tiere	Anzahl			
	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 28
Crush				
Wildtyp	3	2	3	4
TNF-R1-/-	3	3	4	3
TNF-R2-/-	3	2	4	5

Tabelle 6: Anzahl der Crush-operierten Tiere (IH), welche in die Statistik aufgenommen wurden, aufgeteilt nach Genotyp und morphologisch relevanten Operationszeitpunkten

Tiere	Anzahl		
	Tag 3	Tag 7	Tag 28
Crush			
Wildtyp	2	2	2
TNF-R1-/-	3	3	3
TNF-R2-/-	2	3	3

Die Berechnung der gemittelten Rohdaten erfolgte mit Microsoft Excel, die statistische Mittelwertanalyse anhand des Man-Whitney-U-Test in SPSS 10.0. Für alle Untersuchungen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ gewählt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Verlaufsbeobachtung

3.1.1 Intakte Nervenfasern (N)

Die intakten Nervenfasern nahmen vor der jeweiligen Operation einen Anteil von ca. 80% aller Rasterkreuzungspunkte ein. Nach der Läsion nahm der Anteil intakter Nervenfasern in beiden Modellen kontinuierlich ab und erreichte bei den Knockout-Mäusen ebenso wie beim Wildtyp den niedrigsten Wert (zwischen 5-26% aller Rasterkreuzungspunkte) an Tag 7 nach der Operation. In beiden Läsionsmodellen hatten die intakten Axone am Ende der Versuchsreihe noch nicht wieder das Niveau der Ausgangssituation erreicht (zwischen 26-30%).

Im CCI-Modell tendierten die TNF-R2-/- Mäuse an Tag 3 im Vergleich zu den Wildtypen zu einer stärkeren Degeneration (43,3% vs. 38,1%; $p=0,05$). Die TNF-R1-/- Mäuse wiesen an Tag 36 eine signifikant höhere Regenerationsrate auf (56,7%) als WT- und TNF-R2-/- Mäuse (29,6% und 26,5%; $p=0,021$, siehe auch Abbildung 4 und Tabelle 7).

Im Crush-Modell hatten TNF-R1-/- Mäuse an Tag 7 einen signifikant größeren Verlust an intakten Axonen im Vergleich zu WT-Mäusen (12,6% +/- 2,3% vs. 26,1% +/- 0,3%) ($p=0,034$, siehe Abbildung 4 und Tabelle 8).

3.1.2 Degenerierende Nervenfasern (D)

In Gewebeschnitten nicht operierter Mäuse fanden sich erwartungsgemäß nur wenig degenerierte Nervenfasern. Bei den Läsionsmodellen sah man entsprechend dem Abfall intakter Axone schon ab Tag 3 einen deutlichen Anstieg degenerierender Nervenfasern (von 0,2% - 0,5% auf ca. 7-10%), der bei allen Mäusetypen an Tag 7 ein Maximum (10% - 21%) erreichte. Der Anteil

3. Ergebnisse

der geschädigten Fasern bildete sich bei allen drei Gruppen und beiden Modellen nach dem 7. postoperativen Tag bis zum jeweils letzten Beobachtungstag nahezu vollständig zurück. Im Crush-Modell waren an Tag 3 weniger degenerierte Nervenfasern sichtbar (maximal 2% - 6%) als im CCI-Modell (7%-10%). An Tag 7 kehrte sich das Verhältnis um und Crush-operierte Mäuse wiesen mehr degenerierte Nervenfasern (13% - 23%) auf als CCI-operierte (10%). Für das CCI Modell konnte zwischen Wildtypmäusen und Knockoutmäusen kein statistisch signifikanter Unterschied während des beobachteten Zeitraumes nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 5 und Tabelle 9). Im Crush-Modell waren an Tag 7 deutlich mehr degenerierte Nervenfasern bei den TNF-R1-/- Mäusen (21,0% +/- 2,2%) sichtbar als bei den anderen Genotypen (WT 9,7 +/- 0,9%; $p=0,034$ und TNF-R2-/- 12,8 +/- 1,8%; $p=0,021$). Im Vergleich zum Wildtyp wiesen die TNF-R2-/- Mäuse am letzten Untersuchungstag weniger degenerierte Nervenfasern auf (0,6% +/- 0,3% vs. 2,6% +/- 0,97%; $p=0,025$, siehe Abbildung 5, Tabelle 10).

3.1.3 Makrophagen (M)

In den unbehandelten Nerven konnten lichtmikroskopisch nur beim Wildtyp vereinzelt Makrophagen erfasst werden. Im CCI-Modell sah man ab Tag 3 schon bei allen Mäusetypen eine Zunahme der Makrophagen, wobei die TNF-R1-/- Mäuse zu höheren Werten tendierten (6,3% +/- 1%) als die Wildtypmäuse (2,2% +/- 0,3%; $p=0,05$) und TNF-R2-/- Mäuse (1,8% +/- 0,6%; $p=0,05$). Das Maximum für Makrophagen war an Tag 7 erreicht und es war weiterhin eine Tendenz der TNF-R1-/- Mäuse zu höheren Makrophagenzahlen erkennbar (WT 30,0% +/- 1,6%, TNF-R1-/- 46,0% +/- 3,6%; $p=0,05$). Bis zu Tag 36 verringerte sich der Makrophagenanteil im Nerven bei den CCI-operierten Tieren wieder (5% - 10% an Tag 36 im Vergleich zu 30% - 45% an Tag 7) wobei die TNF-R1-/- Mäuse zu diesem Zeitpunkt deutlich weniger Makrophagen zeigten als die

3. Ergebnisse

TNF-R2^{-/-} Mäuse (4,7% +/- 2,5% vs. 10,4% +/- 0,7%; p=0,043; siehe auch Abbildung 6 und Tabelle 11).

Nach Crush-Läsion stieg der Anteil der Makrophagen bei WT-Mäusen erst ab Tag 7 an, bei den Knockoutmäusen bereits ab Tag 3. An Tag 7 nach Crush fand sich zudem eine signifikant höhere Anzahl an Makrophagen bei TNF-R1^{-/-} Mäusen (19,3% +/- 1,5%) im Vergleich zu den WT-Mäusen (8,4% +/- 0,4%; p = 0,034) und TNF-R2^{-/-} Mäusen (8,5% +/- 0,3%; p = 0,021). Das Maximum innerhalb des beobachteten Zeitraums lag bei Tag 28 (15% - 30%; vgl. Abbildung 6 und Tabelle 12).

3.1.4 Immunhistochemische Erfassung der Makrophagen

In unbehandelten Nerven stellten sich mit der immunhistochemischen Färbung keine Makrophagen dar. Nach CCI war eine deutliche Makrophagenfärbung zu erkennen, mit Maximum an Tag 7 und einem 2. Höhepunkt an Tag 36. Die Knockoutmäuse zeigten an Tag 3 zunächst einen etwas geringeren Anstieg der Mac-1⁺ Makrophagen als die WT-Mäuse. Während die Immunoreaktivität bei den TNF-R1^{-/-} Mäusen keine weitere Veränderung aufwies, stieg die Anzahl der Mac-1⁺ Zellen bei den TNF-R2^{-/-} Mäusen noch weiter an (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 13). Nach Crush lag das Maximum für WT-Mäuse an Tag 7, für die TNF-R2^{-/-} Mäuse bereits an Tag 3. Auch hier zeigten die TNF-R1^{-/-} Mäuse insgesamt nur einen geringen Anstieg der Immunreaktivität für Makrophagen (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 14).

3.1.5 Blutgefäße (G)

Der Gefäßanteil betrug bei den Kontrolltieren zwischen 0,6% und 0,9%. Im Verlauf ergab sich bei CCI keine signifikante Änderung dieses Anteils, mit leichtem Trend zu höheren Werten postoperativ (vgl. Abbildung 8 und Tabelle 15). Nach Crush waren bei den TNF-R1^{-/-} Mäusen an Tag 7 im Vergleich zu

3. Ergebnisse

WT-Mäusen signifikant weniger Gefäße nachweisbar (0,8% +/- vs. 1,3% +/- p=0,034; siehe auch Abbildung 8 und Tabelle 16).

3.1.6 Strukturloser Raum (SR)

Bei unbehandelten Nerven betrug der Anteil an strukturlosem Raum, der als Maß für die Ödementwicklung galt, bei allen drei Mäusetypen weniger als 1% des Nervens. Das Ödem entwickelte sich parallel zu den degenerativen Veränderungen. Die beiden Modelle unterscheiden sich in der Dauer der Ödemausbildung und der maximalen Ausprägung des Ödems. Während im Crush-Modell der Anteil an SR an Tag 3 sein Maximum und an Tag 7 bereits wieder sein Ausgangsniveau erreichte, stieg er im CCI-Modell bis zu Tag 7 an und hatte sich bis zu Tag 36 noch nicht wieder zurückgebildet. Im CCI-Modell zeigte sich an Tag 3 und 7 im Gegensatz zum Wildtyp (16,0 % +/- 0,1%) und an Tag 3 auch zu den TNF-R1-/- Tieren ein grenzwertig stärkerer (p = 0,05) Anteil an SR bei TNFR-2-/- Mäusen (28,0% +/- 1,5%). An Tag 36 war der Ödemanteil bei den TNF-R2-/- Mäusen signifikant niedriger als bei TNF-R1-/- Mäusen (0,2% +/- 0,1% vs. 4,63% +/- 2,12%; p=0,021; siehe auch Abbildung 9 und Tabelle 17). Im Crush-Modell war der Anteil von SR insgesamt kleiner, ohne Unterschiede zwischen den Genotypen (vgl. Abbildung 9 und Tabelle 18).

3.1.7 Andere Zellen (AZ)

Zelluläre Strukturen, die nicht in die oben ausgeführten Kategorien eingeordnet werden konnten, wurden als ‚andere Zellen‘ (AZ) bezeichnet. Diese setzen sich größtenteils aus Schwannzellen und aus Fibroblasten zusammen. Präoperativ fielen bis 15% aller Rasterkreuzungspunkte auf AZ. Dieser Anteil stieg postoperativ bei beiden Läsionsmodellen an. Im CCI-Modell hatten die TNF-R2-/- Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen und TNF-R1-/- Mäusen noch einen größeren Anteil nicht neuronaler Zellen (62,0% +/- 3,1% vs. 25,0% +/- 13,0%; p=0,05 und 48,7% +/- 6,4% p=0,05; siehe auch Abbildung 10 und Tabelle 19).

3. Ergebnisse

Nach Crush waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar (vgl. Abbildung 10 und Tabelle 20).

3. Ergebnisse

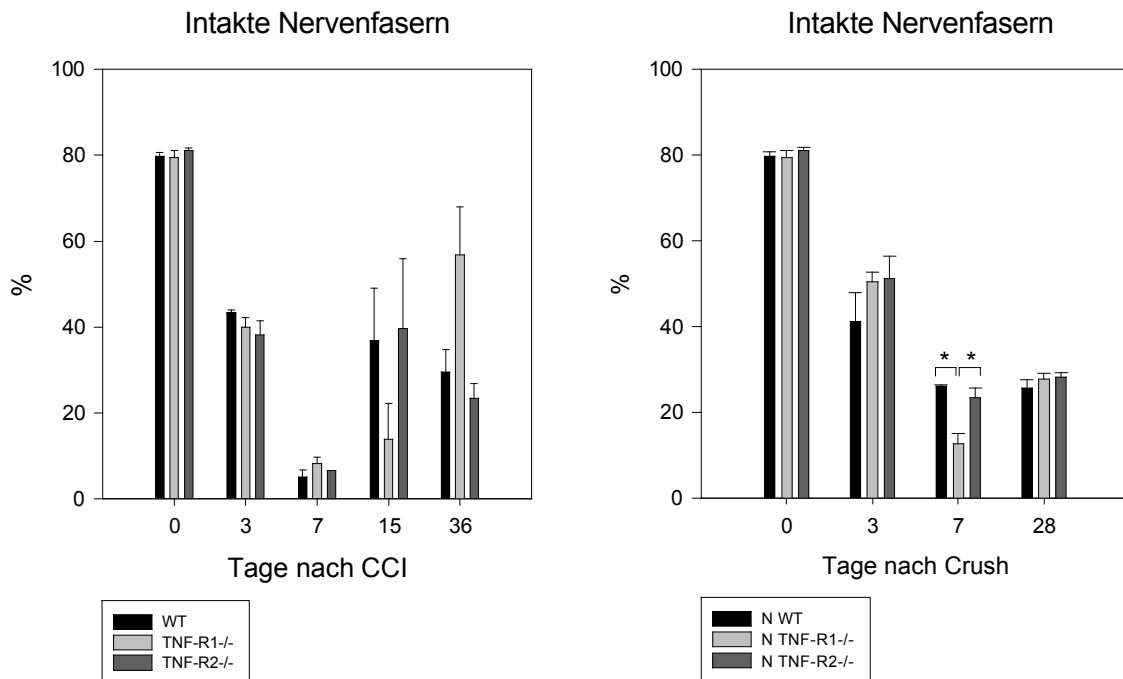


Abbildung 4: Histogramm mit Darstellung des Anteils intakter Nervenfasern (N) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE)). * symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$).

Tabelle 7: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils intakter Nervenfasern (N) in % aller Rasterkreuzungspunkte bei CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

CCI Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 15		Tag 36	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%										
WT	79,71	0,97	43,34	0,69	5,07	1,61	36,76	12,29	29,56	5,13
TNFR 1-/-	79,39	1,68	39,94	2,20	8,22	1,53	13,81	8,45	56,71	11,23
TNFR 2-/-	81,08	0,65	38,11	3,24	6,55	-	39,60	16,28	26,47	3,52

Tabelle 8: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils intakter Nervenfasern (N) in % aller Rasterkreuzungspunkte bei Crush-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

Crush Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 28	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%								
WT	79,71	0,97	41,11	6,72	26,10	0,31	25,60	1,98
TNF-R1-/-	79,39	1,68	50,38	2,24	12,68	2,39	27,71	1,41
TNF-R2-/-	81,08	0,65	51,20	5,18	23,43	2,24	29,10	0,99

3. Ergebnisse

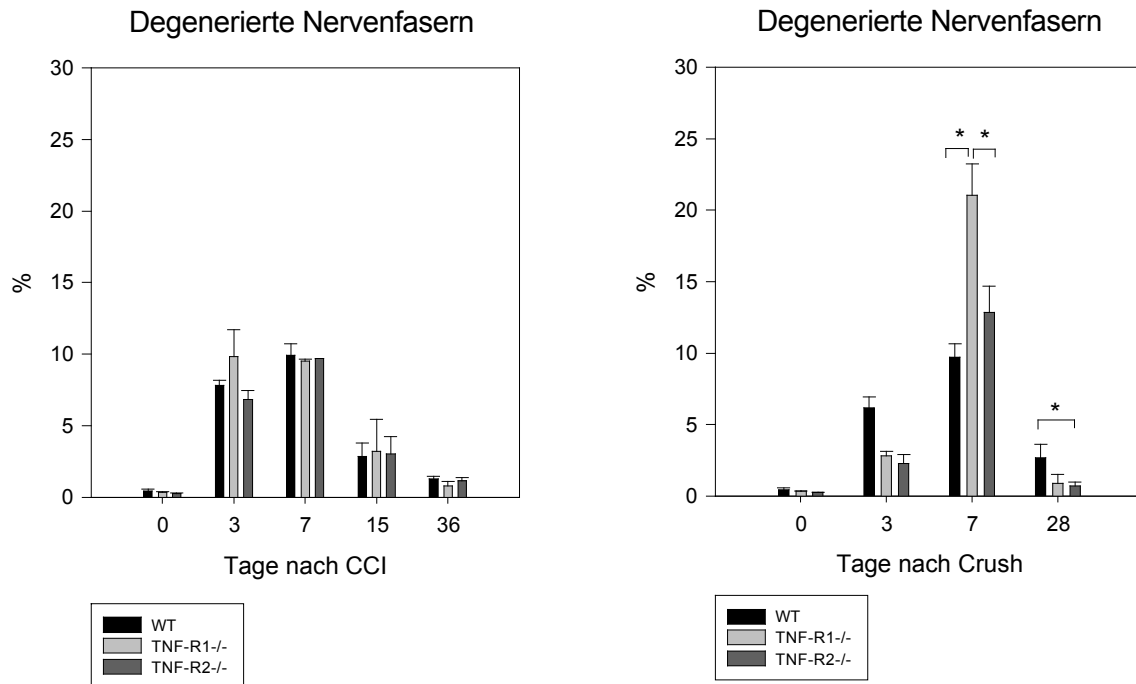


Abbildung 5: Histogramm mit Darstellung des Anteils degenerierter Nervenfasern (D) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE). * symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$).

Tabelle 9: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils degenerierter Nervenfasern (D) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt

CCI Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 15		Tag 36	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%										
WT	0,45	0,11	7,78	0,40	9,91	0,82	2,83	0,95	1,27	0,19
TNFR 1-/-	0,33	0,03	9,83	1,89	9,50	0,12	3,22	2,24	0,79	0,30
TNFR 2-/-	0,26	0,02	6,81	0,64	9,68	-	3,00	1,22	1,19	0,22

Tabelle 10: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils degenerierter Nervenfasern (D) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei Crush-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

Crush Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 28	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%								
WT	0,45	0,11	6,16	0,78	9,72	0,91	2,67	0,97
TNF-R1-/-	0,33	0,03	2,81	0,30	21,02	2,20	0,88	0,62
TNF-R2-/-	0,26	0,02	2,25	0,65	12,85	1,84	0,60	0,27

3. Ergebnisse

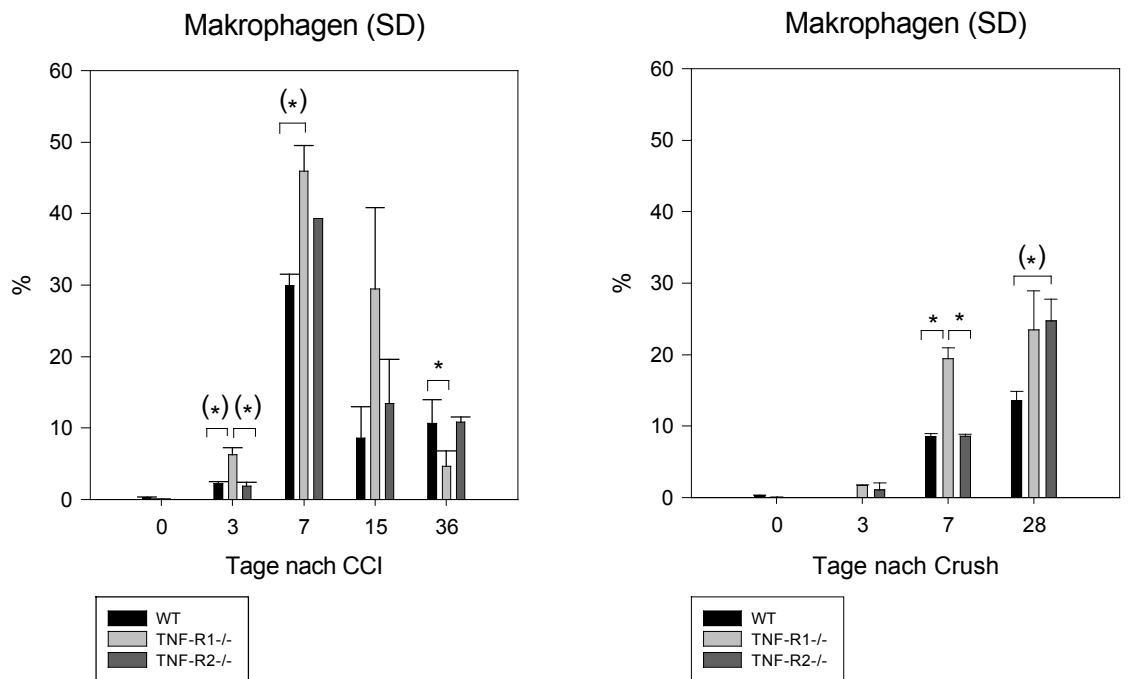


Abbildung 6: Histogramm mit Darstellung des Anteils an Makrophagen (M) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE)). * symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$).

Tabelle 11: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils von Makrophagen (M) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten von CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

CCI Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 15		Tag 36	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%										
WT	0,22	0,13	2,22	0,26	29,91	1,59	8,55	4,42	10,67	3,28
TNFR 1-/-	0,06	0,06	6,26	0,94	45,97	3,58	29,43	11,38	4,66	2,15
TNFR 2-/-	0,00	0,00	1,82	0,58	39,33	-	13,37	6,18	10,36	0,72

Tabelle 12: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an Makrophagen (M) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei Crush-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

Crush Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 28	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%								
WT	0,22	0,13	0,00	0,00	8,49	0,43	13,55	1,34
TNF-R1-/-	0,06	0,06	1,68	0,12	19,38	1,56	23,43	5,53
TNF-R2-/-	0,00	0,00	1,08	1,00	8,56	0,30	23,68	3,07

3. Ergebnisse

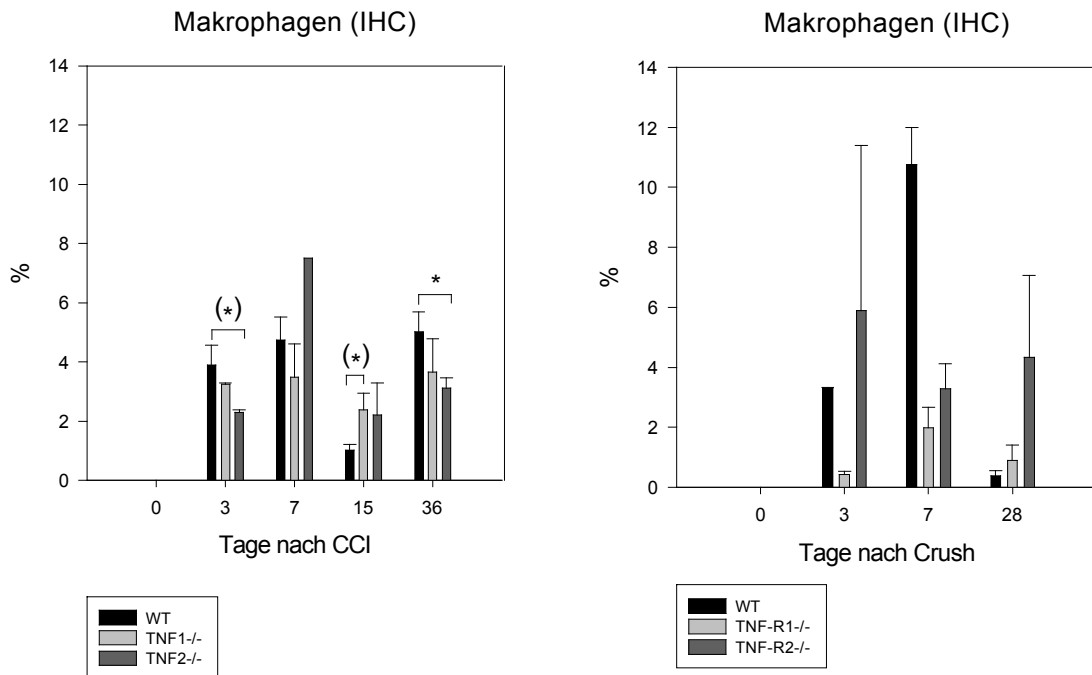


Abbildung 7: Graphische Darstellung des Anteils an immunhistochemisch markierten Makrophagen in % an der Gesamtfläche des Nerven Links: nach CCI an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: nach Crush an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwert \pm SE). * symbolisiert signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), (*) symbolisiert grenzwertig signifikante Unterschiede ($p=0,05$).

Tabelle 13: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an immunhistochemisch (IHC) markierten Makrophagen bei den CCI-operierten Mäusen an der Gesamtfläche, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

CCI Genotyp	Tag 3		Tag 7		Tag 15		Tag 36	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%								
WT	3,90	0,66	4,74	0,77	1,02	0,18	6,27	0,66
TNF-R1-/-	3,24	0,04	3,49	0,90	2,80	0,52	3,66	1,02
TNF-R2-/-	2,30	0,09	7,50	0,00	2,21	1,08	3,11	0,35

Tabelle 14: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an immunhistochemisch (IHC) markierten Makrophagen bei den Crush-operierten Mäusen an der Gesamtfläche, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

Crush Genotyp	Tag 3		Tag 7		Tag 28	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%						
WT	3,31	0,02	10,74	1,25	0,39	0,15
TNF-R1-/-	0,44	0,09	1,99	0,68	0,89	0,53
TNF-R2-/-	7,72	4,51	3,28	0,84	4,32	2,73

3. Ergebnisse

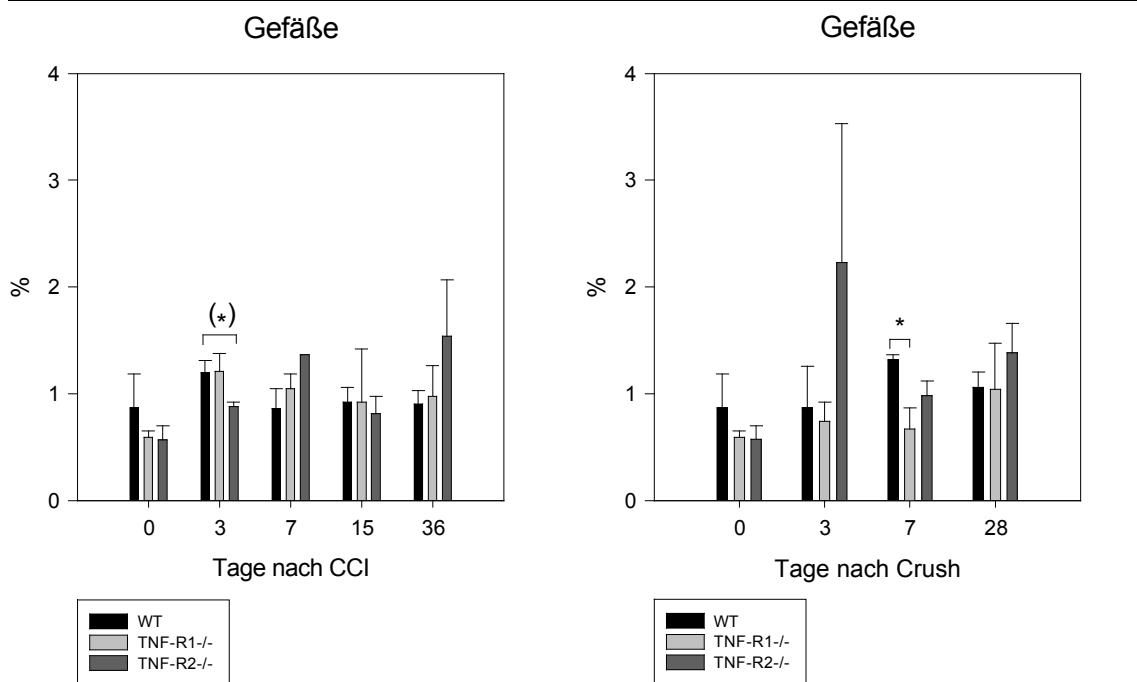


Abbildung 8: Histogramm mit Darstellung des Anteils an Gefäßen (G) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE)). * symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$), (*) symbolisiert grenzwertig signifikante Unterschiede ($p=0,05$).

Tabelle 15: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an Gefäßen (G) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

CCI Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 15		Tag 36	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%										
WT	0,87	0,32	1,20	0,11	0,86	0,18	0,92	0,13	0,91	0,12
TNFR 1-/-	0,59	0,06	1,21	0,17	1,04	0,14	0,92	0,50	0,98	0,29
TNFR 2-/-	0,57	0,13	0,88	0,05	1,37	-	0,82	0,16	1,54	0,52

Tabelle 16: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an Gefäßen (G) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei Crush-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt

Crush Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 28	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%								
WT	0,87	0,32	0,87	0,39	1,32	0,05	1,07	0,14
TNF-R1-/-	0,59	0,06	0,74	0,18	0,67	0,20	1,04	0,44
TNF-R2-/-	0,57	0,13	2,23	1,30	0,98	0,13	1,38	0,27

3. Ergebnisse

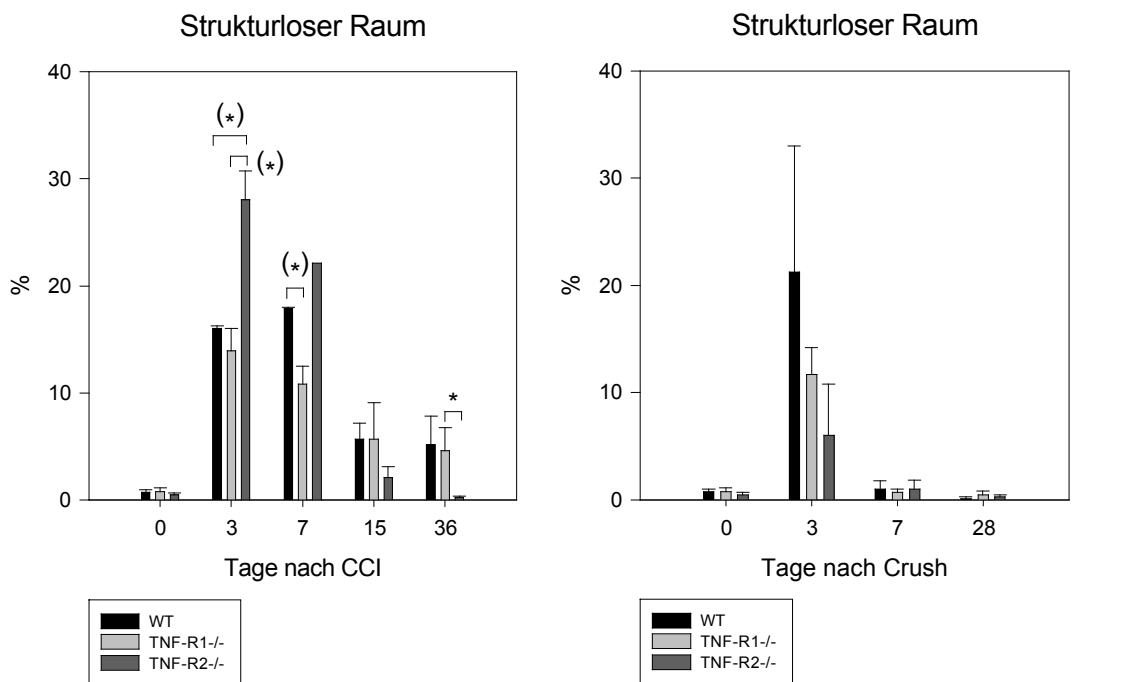


Abbildung 9: Histogramm mit Darstellung des Anteils an strukturlosem Raum (SR) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE)). * symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$), (*) symbolisiert grenzwertig signifikante Unterschiede ($p=0,05$).

Tabelle 17: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an strukturlosem Raum (SR) aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

CCI Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 15		Tag 36		
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	
	%										
WT	0,76	0,21	16,01	0,28	17,91	0,11	5,68	1,52	5,15	2,73	
TNFR 1-/-	0,79	0,36	13,91	2,12	10,81	1,67	5,72	3,37	4,63	2,12	
TNFR 2-/-	0,57	0,15	28,05	2,66	22,10	-	13,07	1,04	0,23	0,12	

Tabelle 18: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an strukturlosem Raum (SR) aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei Crush-operierten Mäusen aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

Crush Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 28	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
	%							
WT	0,76	0,22	21,23	11,78	1,02	0,73	0,13	0,13
TNF-R1-/-	0,79	0,36	11,71	2,47	0,70	0,29	0,48	0,34
TNF-R2-/-	0,57	0,15	6,02	4,78	0,99	0,85	0,35	0,20

3. Ergebnisse

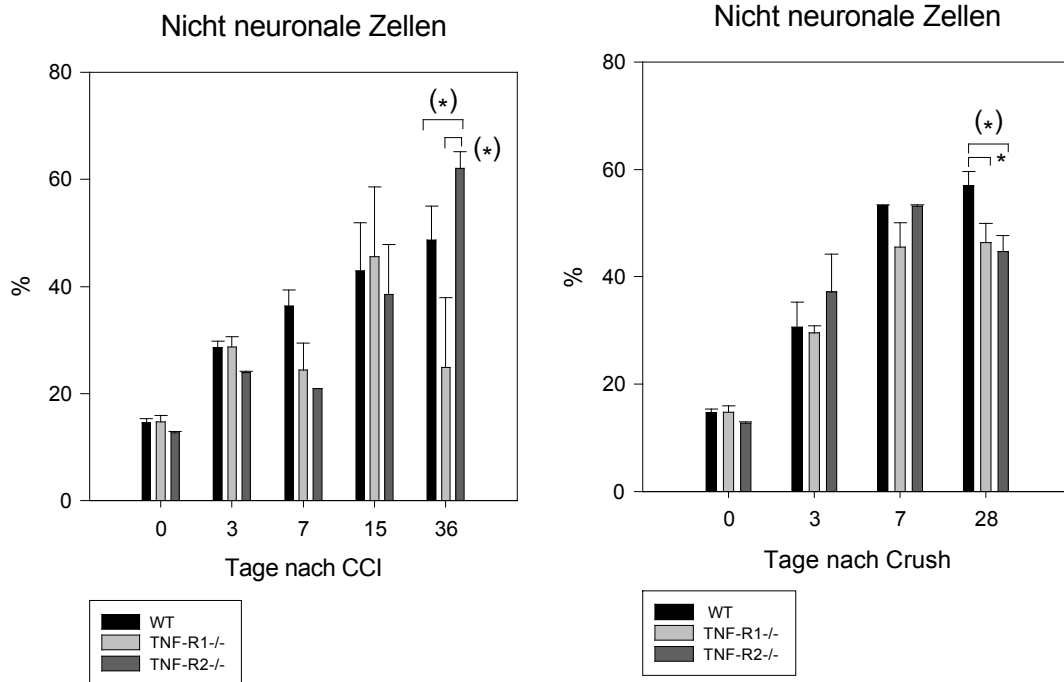


Abbildung 10: Histogramm mit Darstellung des Anteils an strukturlosem Raum (SR) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE)). * symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$), (*) symbolisiert grenzwertig signifikante Unterschiede ($p = 0,05$).

Tabelle 19: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an anderen Zellen (AZ) in den Semidünnschnitten (SD) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

CCI Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 15		Tag 36	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%										
WT	14,58	0,80	28,59	1,22	36,34	3,01	42,97	8,94	48,65	6,41
TNFR 1-/-	14,74	1,23	28,78	1,90	24,44	4,95	45,55	13,01	24,93	13,01
TNFR 2-/-	12,76	0,18	23,93	0,29	20,96	-	38,46	9,34	62,04	3,08

Tabelle 20: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an 'anderen Zellen' (AZ in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei Crush-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.

Crush Genotyp	Kontrollen		Tag 3		Tag 7		Tag 28	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
%								
WT	14,58	0,80	30,63	4,67	53,29	0,06	56,98	2,61
TNF-R1-/-	14,74	1,23	29,50	1,42	45,54	4,52	46,36	3,52
TNF-R2-/-	12,76	0,18	37,17	7,05	53,19	0,15	44,67	3,01

3. Ergebnisse

3.2 Bilder:

3.2.1 Kontrollen

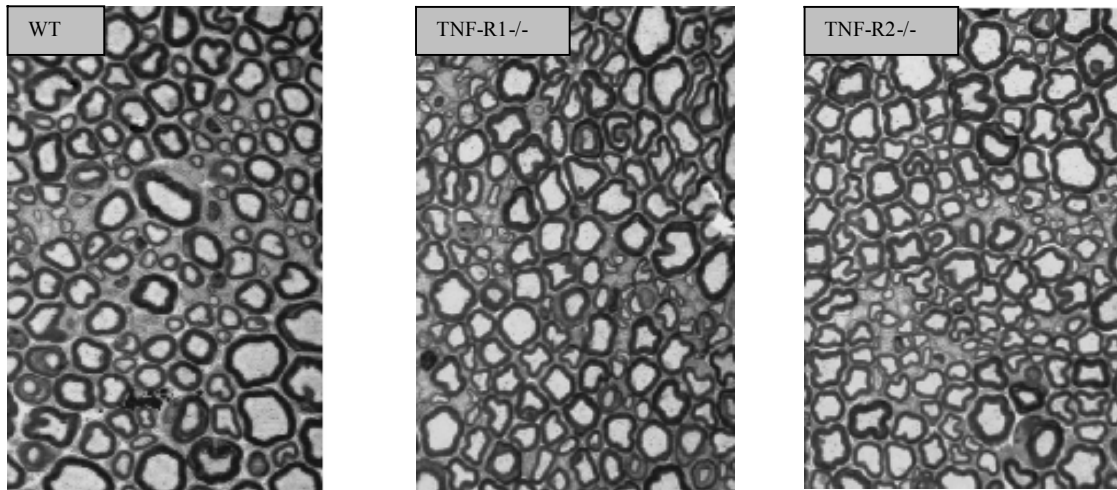


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Methyleneblau gefärbten Semidünnschnitte (hier schwarz-weiß dargestellt) aus dem N. ischiadicus der Maus, x1750, an Tag 0 (keine Operation). Die Bilder zeigen die gleichen Ausgangsbedingungen bei den unterschiedlichen Mäusetypen: Wildtyp (links), TNF-R1-/- (Mitte), TNF-R2-/- (rechts).

3.2.2 Tag 3 CCI

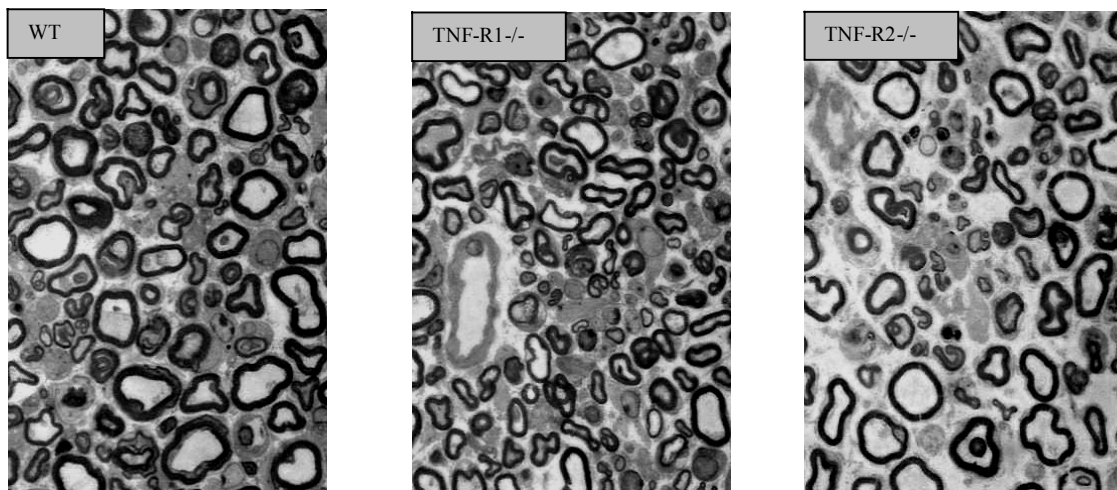


Abbildung 12 : Lichtmikroskopische Aufnahmen der Methyleneblau gefärbten Semidünnschnitte (hier schwarz-weiß dargestellt) aus dem N. ischiadicus der Maus, x1750, an Tag 3 nach CCI-Operation. Die TNF-R2-/- Mäuse (rechts) zeigen eine stärkere Ödementwicklung im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen WT (links) und TNF-R1-/- (Mitte).

3. Ergebnisse

3.2.3 Tag 7 CCI

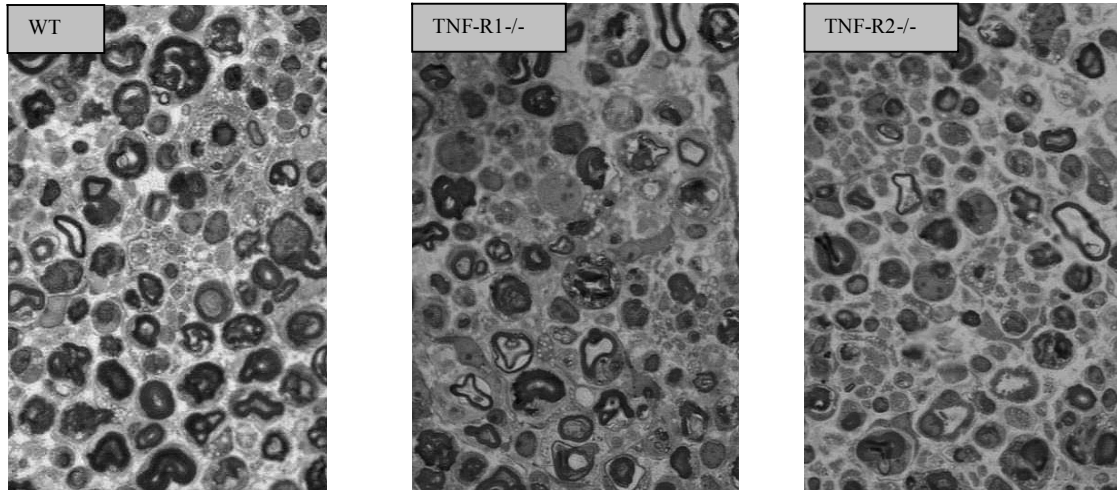


Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Methyleneblau gefärbten Semidünnschnitte (hier schwarz-weiß dargestellt) aus dem N. ischiadicus der Maus, x1750x, an Tag 7 nach CCI-Operation: das Ödem ist bei den TNF-R2-/- Mäusen (rechts) noch immer deutlich erkennbar, im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen WT (links) und TNF-R1-/- (Mitte).

3.2.4 Tag 7 Crush

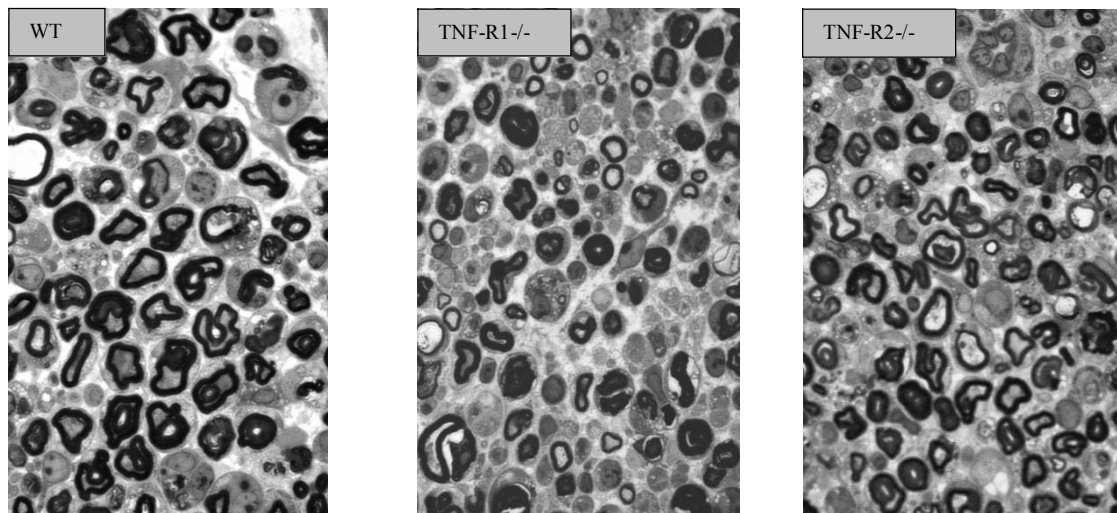


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Methyleneblau gefärbten Semidünnschnitte (hier schwarz-weiß dargestellt) aus dem N. ischiadicus Nerv der Maus, x1750x an Tag 7 nach Crush-Operation. Bei den TNF-R1-/- (Mitte) sind weniger intakte Nervenfasern und mehr Makrophagen als bei den Vergleichsgruppen WT (links) und TNF-R2-/- Mäusen (rechts) zu finden. Im Vergleich zu den CCI-operierten Tieren ist die Läsion insgesamt weniger ausgeprägt.

3. Ergebnisse

3.2.5 Tag 36 CCI

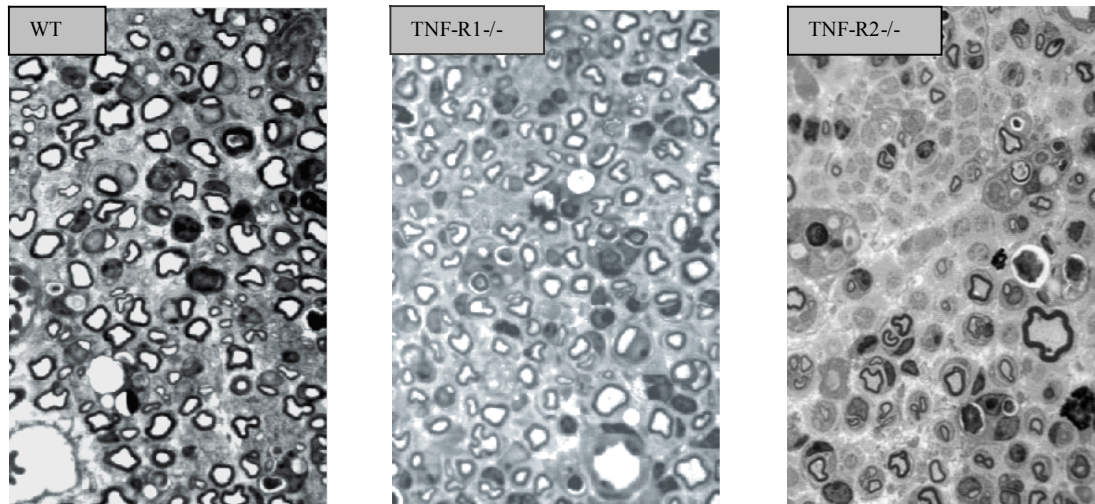


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Methylenblau gefärbten Semidünnschnitte (hier schwarz-weiß dargestellt) aus dem N. ischiadicus Nerv der Maus, x1750, an Tag 36 nach CCI-Operation: Bei den TNF-R2-/- Mäusen (rechts) sind im Vergleich zu den Knockoutmäusen TNF-R1-/- (Mitte) und Wildtypen noch ein größerer Anteil an ‚anderen Zellen‘ (AZ) vorhanden. TNF-R1-/- Mäuse (Mitte) und Wildtypmäuse (links) zeigen deutlich regenerative Prozesse wie die dünne Remyelinisierung der Axone.

4 DISKUSSION

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie wurde an zwei unterschiedlichen Nervenverletzungsmodellen untersucht, ob sich Mäuse mit Defizienz für einen der TNF α -Rezeptoren in der De- bzw. Regeneration eines verletzten peripheren Nervens unterscheiden. Es konnte nachgewiesen werden, dass beide Rezeptorsubtypen voneinander abweichende Effekte auf degenerative und regenerative Prozesse haben. Anders als zunächst vermutet, hatte die Abwesenheit von TNF-R1 keinen positiven Effekt auf den Erhalt der Nervenfasern. Dabei zeichnete sich für TNF-R1-/- Mäuse eine zunächst verzögerte, dann aber beschleunigte Regeneration ab. Die degenerative Phase war im Vergleich zu den anderen Genotypen sehr ausgeprägt und von einer vermehrten Anzahl von Makrophagen begleitet. Der Verlust von TNF-R2 äußerte sich nach CCI in einer stärker ausgeprägten Störung der Blut-Nerven-Schranke (BNS) mit intensiver Ödembildung.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Beurteilung der Auswertungsmethode

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde versucht, durch die Wahl einer geeigneten Quantifizierungsmethode, durch vorherige Definition von Auswahlkriterien der Präparate, Auswertung durch einen verblindeten Untersucher und durch die Wahl geeigneter Zeitpunkte für die Materialgewinnung ein größtmögliches Maß an Validität zu erzielen. Bei der verwendeten Auszählungsmethode handelt es sich um eine etablierte Methode, welche eine ganzflächige Beurteilung des Nervenquerschnitts zulässt [86]. Diese ist anderen Methoden, bei welchen nur ein kleiner Ausschnitt beurteilt wird, überlegen, weil dadurch Fehler, die durch die Auswahl eines Ausschnitts

4. Diskussion

entstehen können, vermieden werden. Weiter außen gelegene Fasern werden z.B. im CCI Modell stärker verletzt als Fasern im Inneren des Bündels. Die im Folgenden aufgelisteten methodischen Schwierigkeiten könnten allerdings dennoch zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse beitragen.

4.2.2 Beurteilung der statistischen Auswertung

Der auf einen Nerven ausgeübte Druck und die resultierende Nervenschädigung stehen in einer engen Beziehung zueinander [21]. Optimaler Weise sollte deshalb die CCI- und Crush-Operation immer vom gleichen Untersucher durchgeführt werden, um Abweichungen durch eine unterschiedlich starke Kompression des Nervens bei der Operation zu vermeiden. In der vorliegenden Studie führte die CCI-Verletzung an Tag 15 durch zwei unterschiedliche Operateure zu sehr unterschiedlichen Schädigungsgraden innerhalb der Tiergruppen. Weiterhin war es durch die Bindung an die vorher definierten Ausschlusskriterien (siehe 2.5.) schwierig, eine ausreichend hohe n-Zahl mit gleichzeitig guter Präparatqualität zu vereinbaren. Zu Gunsten der Qualität war es deshalb in manchen Fällen nicht möglich, genügend Nervenpräparate aus einer Tiergruppe zu gewinnen, so dass an Tag 7 im CCI-Modell letztendlich nur ein Tier beurteilt werden konnte. Aus diesen Gründen ist die statistische Beurteilung von Tag 7 und 15 im CCI-Modell eingeschränkt.

4.2.3 Vergleichbarkeit der Verletzungsmodelle

Die Operationszeitpunkte der beiden Verletzungsmodelle wurden so gewählt, dass sie repräsentativ gegenüber Zeitpunkten sind, die degenerative und regenerative Prozesse innerhalb des jeweiligen Modells widerspiegeln [27-30, 86, 88, 93, 94]. Da sich die Nervenfasern im Crush-Modell schneller wieder erholen, wurde ein anderer Zeitpunkt gewählt als im CCI-Modell, in welchem regenerative Prozesse etwas verzögert stattfinden. Das hat den Nachteil, dass

4. Diskussion

die beiden Modelle während der regenerativen Phase nicht direkt vergleichbar sind und nur eine unabhängige Beurteilung beider Modelle zu diesen Zeitpunkten möglich ist.

4.2.4 Beurteilung der Darstellung von Makrophagen

Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Färbemethoden (morphologische Darstellung an SD- und immunhistochemische Färbung an Gefrierschnitten) sollte die Rekrutierung der Makrophagen in das verletzte Nervenareal genauer charakterisiert werden. Die Ergebnisse der beiden Methoden unterscheiden sich und sind aus mehreren Gründen nicht direkt vergleichbar. Die Schnitte für die histologische und die immunhistochemische Färbung konnten nicht aus exakt dem gleichen Schnittniveau entnommen werden (siehe 2.3). Beide Präparate entstammen zwar einem Nervenanteil distal der Verletzung und sind von den Prozessen der WD betroffen. Während für die Schnitte der IHC Färbungen aber ein weiter proximal gelegener Abschnitt konserviert wurde, entstammen die SD dem am weitesten distal gelegenen Nervenanteil. Man kann daher nicht sicher ausschließen, dass Unterschiede in den Ergebnissen durch diesen Unterschied in der Lokalisation bei einer evtl. ungleichmäßigen Verteilung von Makrophagen [5] in den beiden entnommenen Gebieten bedingt sind.

Mit der Immunhistochemie sollten speziell Makrophagen hämatogenen Ursprungs dargestellt werden, zumal TNF-R1 wahrscheinlich in die Rekrutierung der hämatogenen Makrophagen involviert ist [77], während TNF-R2 diesbezüglich nur eine geringe Rolle spielt. Die immunologische Unterscheidung zwischen rekrutierten Makrophagen und residenten Makrophagen ist allerdings schwierig, da sich das jeweilige Rezeptorprofil der Makrophagen dynamisch an verschiedene immunologische Anforderungen der WD anpassen kann [3, 61] und bisher kein Marker gefunden wurde, welcher beide Populationen im Verlauf der WD sicher voneinander abgrenzt [61].

4. Diskussion

Gängige Marker für Makrophagen sind Mac-1, Mac-2, ED-1, ED-2 und F4/80 [79]. Diese kennzeichnen jeweils Makrophagen in unterschiedlichen funktionellen Zuständen, was bedeutet, dass man mit einem einzigen Marker jeweils nur eine bestimmte Teilpopulation der Makrophagen kennzeichnen kann. In dieser Studie wurde Mac-1 (CR 3, CD11b, Ox42) als Marker für hämatogen rekrutierte Makrophagen gewählt. Mac-1 befindet sich zunächst auf zirkulierenden Makrophagen und Monozyten und interagiert mit ICAM auf Endothelzellen um diese in das verletzte Areal zu lotsen [95]. Die über Mac-1/ICAM vermittelte Immigration wird als wichtigster Mechanismus angesehen um zu Beginn der WD hämatogene Makrophagen aus der Blutbahn zu rekrutieren [10, 57]. Es ist daher anzunehmen, dass die Mac-1+ Makrophagen einen Grossteil der hämatogen angelockten Makrophagenpopulation repräsentieren. Ein quantitativer Vergleich der Makrophagenanteile zwischen Studien, welche unterschiedliche Marker benutzen, ist allerdings nur eingeschränkt möglich [3, 61, 105].

4.3 Vergleich der Verletzungsmodelle im Bezug auf axonale De- und Regeneration

In der Literatur werden Unterschiede in Bezug auf die morphologischen Veränderungen während der WD zwischen Crush und CCI beschrieben. Sie unterscheiden sich vor allem im Ausmaß der Nervenverletzung und in der Regenerationsdauer [53]. Nach Crush sind alle Axone distal der Verletzung von der WD betroffen, können aber ungehindert regenerieren. Im Gegensatz dazu werden nach CCI initial nur ungefähr 70% der Fasern verletzt [4, 86]. Die Regeneration ist auf Grund der anhaltenden Kompression des Nervens durch die Ligaturen behindert und läuft im Vergleich zu Crush verzögert ab [53, 86, 88]. Die Einengung ist nicht nur für die starke Anschwellung des Nervens im CCI-Modell verantwortlich, welche durch die erhöhte Druckeinwirkung eine

4. Diskussion

zusätzliche Komponente der axonalen Schädigung darstellt [21, 63], sondern wirkt sich auch behindernd auf regenerative Prozesse aus [63]. Durch den erhöhten Druck kommt es zu einer Komprimierung der endoneuralen Gefäße [62], und zu proliferationsfördernden Effekten auf Endothelzellen und nicht neuronale Bindegewebszellen [63]. Eine Studie von Kleinschnitz et al. demonstrierte Unterschiede in der Produktion von TNF α und anderen Zytokinen zwischen den beiden Verletzungsmodellen [47].

In der vorliegenden Studie zeigten die Wildtypen in beiden Modellen den bekannten Verlauf der WD [40, 53, 63, 68, 77, 86, 88, 89, 93, 95]. Dabei war das Ausmaß der Nervenschädigung nach CCI größer als nach Crush und von einer höheren Makrophagenanzahl in den SD-Schnitten, sowie einer stärkeren und länger andauernden Schwellung des Nervens begleitet.

Der Regenerationserfolg korrelierte in dieser Arbeit nach CCI negativ mit der Anzahl nicht neuronaler Zellen und dem Ausmaß der Schrankenstörung (vgl. Abbildung 4, Abbildung 9; Abbildung 10). Letztere kann durch die Erhöhung des endoneuralen Drucks zur Beeinträchtigung der Blutversorgung führen [62].

Diese Befunde sind vereinbar mit einer schlechteren Erholung des Nervens durch einen ischämisch bedingten Proliferationsreiz auf nicht neuronale Zellen [75]. Neben der Drosselung der Blutversorgung kann die endoneurale Druckerhöhung bei einer stark ausgeprägten Ödembildung zusätzlich aber auch zu einer Verletzung des Perineuriums führen [86]. Damit besteht neben dem Austritt von diversen Plasmakomponenten auch eine akzessorische Zugangsmöglichkeit für nicht residente Zellen in das Nervengewebe, die weniger selektiv ist als die gezielte Rekrutierung von Makrophagen aus endoneuralen Gefäßen, die durch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen gesteuert werden kann [77]. Entsprechend wahrscheinlich ist es, dass der Verlauf der WD in anderer Weise beeinflusst wird, als ohne Verletzung des Perineuriums.

4. Diskussion

Der Vergleich beider Verletzungsmodelle in dieser Studie demonstriert, dass die größere Schädigung nach CCI im Vergleich zu Crush auch mit einer entsprechend größeren Anzahl Makrophagen im Endoneurium verbunden ist. Die stärkere Schädigung korreliert mit der initial höheren Zytokinproduktion im CCI Modell [47], und ist wahrscheinlich auf die persistierende mechanische Einengung durch die Ligaturen, welche eine schnelle Rückbildung des Ödems behindern, zurückzuführen. Die dadurch entstehende Druckerhöhung provoziert im CCI ischämische Zustände, die ohne Rückbildung in einem adäquaten Zeitfenster regenerative Prozesse behindern.

4.4 Unterschiedlicher Einfluss der TNF α -Rezeptoren auf die axonale Degeneration

Eine wichtige Frage, die in dieser Untersuchung beantwortet werden sollte, war, ob sich die Blockade einer der beiden TNF α -Rezeptoren protektiv auf die axonale Degeneration auswirkt, wie es in einem Modell für retinale Ischämie der Fall war [24] und auch in einer Studie mit TNF α -Knockoutmäusen nachgewiesen werden konnte [83].

Im Gegensatz zu den oben genannten Studien sprechen die vorliegenden Studienergebnisse eindeutig gegen einen protektiven Effekt bei den Knockouttieren, insbesondere bei den TNF-R1-/- Tieren, bei welchen eine stärkere bzw. verlängerte Phase der Degeneration beobachtet werden konnte. Auch eine Studie von Schäfers et al. konnte keine Dominanz der Rezeptoren hinsichtlich einer neuroprotektiven Wirkung zeigen [77]. Ebenso wie bei den vorliegenden Daten war dort eine verlängerte Phase der Degeneration bei TNF-R1-/- Mäusen nach CCI sichtbar [77].

Eine erfolgreiche Regeneration setzt voraus, dass proximale Nervenanteile während des Abbaus distaler Nervenanteile geschützt werden um überleben zu können. Das hier beobachtete bessere Regenerationsverhalten der TNF-R1-/-

4. Diskussion

Mäuse an Tag 36 (bis zu 60%; siehe Abbildung 4) spricht dafür, dass dieser Schutz möglicherweise in Abwesenheit von TNF-R1 verbessert ist. Es ist auch möglich, dass die Abwesenheit von TNF-R1 die Rückbildung von Entzündungsvorgängen und somit das Aussprossen der Axone erleichtert. Der von Siebert et al. beobachtete deutliche protektive Effekt bei den TNF α -Knockoutmäusen [83] lässt sich damit erklären, dass in Abwesenheit von TNF α keiner der beiden TNF α -Rezeptoren stimuliert wurde, anders als bei den TNF α -Rezeptor-Knockoutmäusen, in welchem ein funktionstüchtiger Rezeptor jeweils die Wirkung des anderen kompensieren könnte. Im Einklang mit der Vermutung von George et al. [27] sprechen auch die vorliegenden Ergebnisse für eine wichtige Rolle beider Rezeptoren während der axonalen Degeneration. Die verstärkte Schädigung der Nervenfasern in Abwesenheit von TNF-R1 7 Tage nach Crush (siehe Abbildung 4) lässt vermuten, dass entweder hemmende Einflüsse von TNF-R1 fehlen, oder TNF-R2 selbst schädigende Wirkungen besitzt.

Da TNF-R2 bevorzugt mit membrangebundenem TNF α interagiert [34], sind Einflüsse auf weitere Zellen wahrscheinlich. Insbesondere Makrophagen werden unter dem Einfluss von TNF α für eine sekundäre Schädigung der Fasern verantwortlich gemacht [9, 46].

4.5 Unterschiedlicher Einfluss der TNF α -Rezeptoren auf die axonale Regeneration

Neben der Frage nach protektiven Eigenschaften der Rezeptoren sollte auch geklärt werden, ob regenerative Prozesse durch einen der beiden Rezeptorsubtypen gefördert werden können. Hinweise darauf ergaben sich aus einer Studie von Chen et al., in der die vorherige Applikation von TNF α zu einer verbesserten Regeneration von Motoneuronen nach Crush führte [14]. Eine verbesserte Regeneration der TNF-R1-/- Mäuse war in der oben genannten

4. Diskussion

Studie von Schäfers et al. am letzten Untersuchungstag (Tag 15 nach CCI) noch nicht sichtbar [77], kam allerdings in der vorliegenden Studie ab Tag 36 nach CCI zur Geltung (siehe Abbildung 4). Die verzögert einsetzende Erholung des Nervens in der vorliegenden Studie, bzw. die verlängerte degenerative Phase bei Schäfers et al. [77], könnte auf eine Rolle des TNF-R1 bei der Initiierung regenerativer Prozesse hinweisen.

Eine wichtige Voraussetzung für die Einleitung regenerativer Vorgänge ist die Beseitigung der anfallenden Myelinreste durch Makrophagen und Schwannzellen, da diese hemmend auf die Erholung der Nervenfasern wirken [76]. In diesem Zusammenhang scheinen Makrophagen hämatogenen Ursprungs eine entscheidende Rolle zu spielen [9, 11, 12]: Einerseits besitzen diese den Mac-1 Rezeptor, welcher neben der Interaktion mit ICAM auf Endothelzellen die Phagozytose von CR3-markierten Myelinresten vermittelt [9]. Andererseits sind die angelockten Makrophagen auch die Hauptquelle weiterer Zytokine, welche die Beseitigung von Myelinresten zusätzlich fördern. IL- β z.B., das von hämatogenen Makrophagen produziert wird, veranlasst Fibroblasten zur Produktion von GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), welcher wiederum die Expression von Mac-2 sowohl auf Makrophagen als auch Schwannzellen fördert und diese dadurch neben der über CR3-vermittelten Phagozytose zur lektinspezifischen Phagozytose befähigt [71, 74]. D.h., TNF-R1 wäre durch die Rekrutierung hämatogener Makrophagen für eine verstärkte und effizientere Phagozytoseaktivität verantwortlich, welche durch die schnelle Beseitigung der Myelinreste frühzeitig regenerative Prozesse ermöglicht. Dafür sprechen in der vorliegenden Studie auch die hohen Anteile degenerierender Nervenfasern bei den TNF-R1^{-/-} Mäusen nach Crush in Kombination mit der geringeren Anzahl Mac-1⁺ Makrophagen in den IHC-Schnitten der TNF-R1^{-/-} Mäuse.

Obwohl die Regeneration verzögert einsetzte, kam es hier bei den TNF-R1^{-/-} Mäusen sowohl nach CCI als auch nach Crush insgesamt zu einer schnelleren

4. Diskussion

Erholung der Nervenfasern (siehe Abbildung 4). Möglicherweise deutet diese, konform zu der Vermutung von George et al., auf eine regenerationsfördernde Wirkung von TNF-R2 hin [27]. Die Nervenregeneration hängt sowohl von neuronalen als auch glialen Wachstumsfaktoren ab [100]. Einerseits kommt es durch IL-1 [17] aus hämatogenen Makrophagen [46] zur direkten Stimulation von Schwannzellen und Fibroblasten, die dadurch zur Produktion von Wachstumsfaktoren angeregt werden [100]. In der Folge werden Bindegewebszellen andererseits auch durch gliale Wachstumsfaktoren wie TGF- β (transforming growth factor β) [73] PDGF (platelet-derived growth factor) und FGF (fibroblast growth factor) [73] oder CGRP (calcitonin gene-related peptide) [15] gezielt zur Zellteilung angeregt. Erst kürzlich konnte FGF2 als ein bedeutsamer Faktor für die Regeneration nach peripheren Nervenverletzungen bestätigt werden [45]. Dabei wurde die schnellere Regeneration im PNS mit einer stärkeren Schwannzellproliferation assoziiert [45]. Schwannzellen haben neben Fibroblasten großen Einfluss auf das Nervenwachstum und die Reifungsprozesse der Myelinscheide durch die Produktion von neurotrophen Faktoren wie GDNF (glial-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor) und BDNF (brain-derived neurotrophic factor) sowie auch durch die Bereitstellung von Adhäsionsmolekülen wie NCAM (Neuronal cell adhesion molecule) und L1 (Laminin 1), welche für die Leitung des Nervens in das Zielgewebe eine wichtige Rolle spielen [100]. Die Stimulation von Wachstumsprozessen gehört zu den vermuteten Signalen, die durch TNF-R2 vermittelt werden [97, 99], und die Ergebnisse der vorliegenden Studie befürworten einen regenerationsfördernden Effekt von TNF-R2 während der WD.

4.6 Der Einfluss der TNF α -Rezeptoren auf Makrophagen während der WD

Makrophagen übernehmen ein weites Spektrum an Aufgaben im Verlauf der gesamten WD. Diese beinhalten u.a. die Beseitigung und die intrazelluläre Metabolisierung von Myelinresten, Antigenrepräsentation, zytotoxische Aktivitäten, die Produktion pro-inflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine, sowie von Proteasen und Wachstumsfaktoren [9, 41, 46, 110]. Obwohl eine Beteiligung residenter Makrophagen nach Nervenverletzung beschrieben wurde [61, 80], deuten bisherige Untersuchungen darauf hin, dass die Haupteffekte während der degenerativen Phase der WD von hämatogenen Makrophagen abhängen [9, 46]. Bei TNF α -Knockoutmäusen wurde in einer vorausgehenden Untersuchung nach Axotomie des N. ischiadicus eine niedrigere Anzahl hämatogen rekrutierter Makrophagen beobachtet, die mit einem geringeren Schadensausmaß des Nervens einhergingen [54, 83]. Die bisherigen Erkenntnisse ließen vermuten, dass es unter Ausfall von TNF-R1 zu einer geringeren Schädigung des Nervens durch eine verminderte Anzahl an rekrutierten Makrophagen kommt [77, 83]. Dabei stützte sich die Vermutung auf zwei Beobachtungen: Einerseits beobachtete man sowohl bei TNF α -Knockoutmäusen als auch bei ICAM-Knockoutmäusen weniger Makrophagen und gleichzeitig einen geringeren Nervenschaden [83]. Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass TNF-R1 eine dominante Rolle bei der Hochregulation von ICAM zeigte [77]. Während die Ergebnisse der IHC in der vorliegenden Studie mit der oben genannten Erwartung über eine verminderte Rekrutierung bei Ausfall von TNF-R1 vereinbar sind (siehe Abbildung 7), zeigten die SD bei den TNF-R1 $^{-/-}$ Mäusen in beiden Verletzungsmodellen eine überraschend hohe Anzahl an Makrophagen. Auch in der Studie von Schäfers et al. war die Immunreaktivität für den Makrophagenmarker bei TNF-R1 $^{-/-}$ Mäusen reduziert, es zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den

4. Diskussion

Genotypen bezüglich der morphologisch identifizierten Makrophagen in SD-Schnitten [77].

Die beobachtete Diskrepanz zwischen den Makrophagenanzahlen kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass in den IHC-Färbungen nicht alle Makrophagen durch den verwendeten Antikörper markiert werden, sondern lediglich der Teil der Makrophagenpopulation, welcher den Mac-1 Rezeptor zum untersuchten Zeitpunkt exprimiert (siehe 4.2.4). Anders als in den immunhistochemisch gefärbten Schnitten setzt sich die gemessene Makrophagenanzahl der SD wahrscheinlich aus einer immunologisch inhomogenen Zellpopulation zusammen. Diese schließt sowohl hämatogene und proliferierte residente Makrophagen ein, als auch einen Anteil phagozytischer Schwannzellen, die in dieser Studie nicht weiter von phagozytierenden Makrophagen abgegrenzt werden konnten. Bei Nervenverletzung von Wildtypen spielen Schwannzellen zwar eine untergeordnete Rolle [9, 80, 95], jedoch kann in Abwesenheit eines TNF α -Rezeptors eine veränderte Regulation der Aktivierungszustände der verschiedenen Zelltypen nicht ausgeschlossen werden [96-98].

4.6.1 Zusammenhang zwischen axonaler Schädigung und zellulären Reaktionen bei WD

Es gibt Hinweise darauf, dass der Kontakt der residenten Zellpopulation mit hämatogenen Makrophagen eine wichtige Rolle spielt bei der Vermittlung proliferationshemmender Signale [25, 46] und dass diese im Zusammenhang mit TNF α aus hämatogenen Makrophagen stehen [75]. Isolierte Nervenpräparate, in welchen der Zutritt hämatogen angelockter Makrophagen ausgeschlossen ist, zeigten zudem eine vermehrte Proliferationsrate von nicht neuronalen Zellen im Vergleich zu Präparaten, in welchen der Zutritt von Makrophagen aus der Blutbahn möglich war [25, 80]. Es ist anzunehmen, dass hämatogene Makrophagen als Hauptquelle anti-inflammatorischer Zytokine

4. Diskussion

einen wichtigen Beitrag leisten in der Begrenzung pro-inflammatorischer Signale. Für IL-10 wurde z.B. nachgewiesen, dass es vornehmlich in hämatogenen Makrophagen produziert wird [29] und dass dieses sowohl pro-inflammatorische Zytokine aktivierter Makrophagen hemmt [7], als auch die Produktion von Zytokininhibitoren fördert [13, 44].

In der vorliegenden Untersuchung spricht eine fehlende Vermehrung von Mac1⁺ Makrophagen in Kombination mit einer geringeren Schrankenstörung und einer gleichzeitig vermehrten Anzahl von morphologisch identifizierten Makrophagen in den SD der TNF-R1^{-/-} Mäuse für die Vermutung, dass die stärkere Schädigung des Nervens und die erhöhten Zellzahlen der SD in dieser Untersuchung durch ein ausbleibendes Hemmsignal der hämatogenen Makrophagen in Abwesenheit von TNF-R1 entstehen können.

Untersuchungen von Einflüssen der TNF α -Rezeptoren auf die WD an Nerven des ZNS weisen in eine entsprechende Richtung:

Arnett et al. beobachteten an einem toxisch induzierten Nervenschaden eine starke Proliferationstendenz von Oligodendrozyten bei TNF-R1^{-/-} Mäusen und eine vermehrte Apoptose bei Wildtypen [2]. Diese Beobachtung passt zu Vermutungen, welche TNF-R1 die Vermittlung apoptotischer Signale und TNF-R2 die Förderung von Wachstumsprozessen zuschreiben [96-98]. Eine andere Beobachtung an einem Tiermodell für entzündliche autoimmunvermittelte Encephalomyelitis (EAE) deutet auf eine wichtige Rolle von TNF-R1 bei der Limitierung von T-Zell-vermittelten Immunreaktionen durch Apoptose hin [69]. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass T-Zellen und Makrophagen mit zytotoxischem T-Zell-Immunophänotyp auch nach peripherer Nervenverletzung eine wichtige Rolle spielen [41, 48, 60]. T-Zellen (Th-1 und CD8⁺T-Zellen) haben einerseits Einfluss auf die Aktivierung von Makrophagen durch die Produktion von Interferon- γ [48] andererseits sind CD8⁺T-Zellen synergistisch mit TNF-R1 an der gezielten Elimination anderer Zellen durch Apoptose beteiligt, wie von aktivierten Makrophagen [50], T-Zellen [46] oder

4. Diskussion

Schwanzzellen [85], welche andererseits durch eine anhaltende Zytokinproduktion inflammatorische Vorgänge aufrechterhalten würden. Für TNF-R2 wurde außerdem eine proliferative Wirkung auf zytotoxische T-Lymphozyten beschrieben [97], welche eine bestehende Entzündungsreaktion zusätzlich unterhalten würden, insbesondere dann, wenn durch Fehlen von TNF-R1 kein programmierter Zelltod entsprechender Effektorzellen stattfinden kann. Bei TNF-R1-/- Mäusen konnte entsprechend eine erhöhte Interferon- γ Konzentration nachgewiesen werden [108].

Somit wäre denkbar, dass TNF-R1 einerseits durch Rekrutierung hämatogener Makrophagen, welche anti-inflammatorische Zytokine produzieren und andererseits durch Eindämmung übermäßiger Wachstumsprozesse von Effektorzellen des PNS durch Apoptose regulierend auf destruiende Prozesse während der WD einwirkt.

Eine sich daraus ergebende überschießende Proliferation der nicht neuronalen Zellen im Nerven könnte je nach Zellart einerseits für eine stärkere Schädigung der Nerven verantwortlich sein (T-Zellen, aktivierte Makrophagen) und andererseits aber für eine beschleunigte Regeneration (Schwanzzellen), wie die Ergebnisse von Jungnickel et al zeigten [45] und wie es in der vorliegenden Untersuchung beobachtet werden konnte.

4.7 Einfluss der TNF α -Rezeptoren auf die Ödementwicklung:

Eine regelmäßige Beobachtung im Verlauf der WD ist die Veränderung der Blut-Nerven-Schranke (BNS) [40, 68, 86]. Unter physiologischen Bedingungen existiert eine endotheliale Barriere zwischen Gefäßlumen und Endoneurium, welche normalerweise nur einen streng kontrollierten Transport erlaubt. Parallel zu den degenerativen Vorgängen des Nervens kommt es einerseits zur Erweiterung der Gefäße und andererseits über die Kommunikation von Plasmakomponenten und Zytokinen mit Endothelzellen zum Verlust der Tight-Junctions zwischen Endothelzellen und gleichzeitig zu einem Umbau ihres

4. Diskussion

Zytoskeletts [67]. Letzterer verleiht ihnen eine ins Lumen vorgewölbte schmale Form, die eine Passage zellulärer Bestandteile an den Endothelzellen vorbei erlaubt. Neben NO [37] ist auch der Abbau der endothelialen Basalmembran durch Proteasen ein wichtiger Schritt bei der Öffnung der BNS [53, 84]. TNF α ist hieran beteiligt, da es die Induktion von Metalloproteasen beeinflussen kann [66, 81, 82]. Die Applikation von TNF α führte am Nerven zur Ödementwicklung [70, 103], der jeweilige Einfluss der beiden TNF α -Rezeptoren ist diesbezüglich jedoch noch nicht geklärt. Ferrero et al. konnten bei in-vitro Versuchen an HUVEC-Zellkulturen nachweisen, dass die Stimulation von TNF-R1 notwendig ist und auch ausreicht um die endotheliale Permeabilität zu erhöhen [23]. In-vivo Versuche an Lebergefäßen mit Antikörpern gegen die beiden TNF α -Rezeptoren bestätigten die Untersuchungen an den Zellkulturen für TNF-R1, zeigten allerdings auch eine partielle Minderung der Permeabilitätssteigerung bei Blockade von TNF-R2, was auch einen Beitrag des TNF-R2 impliziert [23]. Die stärkste Ödementwicklung war in der vorliegenden Arbeit nach CCI bei den TNF-R2-/- Mäusen sichtbar (siehe Abbildung 9), was die Ergebnisse von Ferrero et al. bezüglich einer entscheidenden Rolle von TNF-R1 bei der Ödementwicklung bestätigt. Nach Crush hingegen zeigten beide Knockoutmäuse eine verminderte Ausprägung des Ödems im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 9), was eher einen Beitrag beider Rezeptoren implizieren würde.

4.8 TNF α -Rezeptoren und angioproliferative Wirkung

Die Neubildung von Gefäßen geht von aktivierten Endothelzellen der bereits vorhandenen endoneuralen Kapillaren aus. Für den Vorgang der Angiogenese ist eine Reihe von Schritten notwendig, welche durch zahlreiche biologisch aktive Substanzen gesteuert werden. Dazu zählen der Abbau von extrazellulären Matrixbestandteilen, Auswanderung endothelialer Zellen, Proliferation endothelialer Zellen, die Organisation der ausgewanderten

4. Diskussion

Endothelzellen zu neuen Gefäßen, die Bildung einer Basalmembran um die entstandenen Gefäße sowie die Neuformation extrazellulärer Matrixbestandteile [64]. TNF α ist in einigen Tiermodellen in niedrigen Dosen ein starker Aktivator der Angiogenese, bei hohen Dosen wirkt es aber inhibitorisch [22]. Es bewirkt Veränderungen in Endothelzellen, welche dosisabhängig sind und biphasisch verlaufen [22].

Dabei wirkt TNF α wahrscheinlich hauptsächlich indirekt angioproliferativ, indem es die Produktion von angiogenetischen Faktoren in anderen Zellen stimuliert. Endothelzellen werden durch TNF α zur Synthese von FGF (basic fibroblast growth factor), PAF (platelet-activating factor), welche beide angiogen wirken, und Thromboplastin (tissue factor) angeregt. Letzterer wird für die Regulation der Ausbildung neuer Gefäße verantwortlich gemacht. Des Weiteren werden die Endothelzellen später auch zur Synthese von uPA (urokinase plasminogen activator) angeregt, welcher in der Phase der Neuformation von extrazellulären Matrixbestandteilen wichtig ist. Außerdem wurde berichtet, dass TNF α die Expression von Integrinen reguliert, die für die Adhäsion von Endothelzellen und extrazellulärer Matrix während der Angiogenese benötigt werden [32]. TNF α fördert zudem die Proliferation von Schwannzellen. Diese wiederum regulieren VEGF (vascular endothelial growth factor) [35]. VEGF ist ein potentes Mitogen, welches das Wachstum von Endothelzellen und die Ausbildung neuer Blutgefäße durch Interaktionen mit seinen endothelspezifischen Rezeptoren steuert [32].

Nach CCI konnten morphologische Veränderungen an endothelialen Gefäßen festgestellt werden, in frühen Stadien eine Gefäßerweiterung und ab dem 7. postoperativen Tag eine vermehrte Proliferation von Endothelzellen. Die Proliferation wurde dabei mit Zytokinen wie TNF α und IL-1 assoziiert [88]. Nach Crush konnte eine Erweiterung der Blutgefäße zu frühen Zeitpunkten nachgewiesen werden, vermehrt neu gebildete Gefäße allerdings erst nach 6 Wochen [68].

4. Diskussion

Die Daten aus der vorliegenden Arbeit zeigen an Tag 7 nach Crush bei den TNF-R1-/- Mäusen weniger Gefäße, bei den TNF-R2-/- Mäusen hingegen tendenziell mehr Gefäße (Abbildung 8) und weisen damit auf einen Einfluss von TNF-R1 auf Gefäße zu diesem Zeitpunkt hin. Die frühen Veränderungen wie die Erweiterung der Gefäße oder die Proliferation der Endothelzellen wurden in der vorliegenden Studie nicht genauer untersucht. Nach CCI ließ sich zu diesem Zeitpunkt hingegen kein eindeutiger Effekt auf angioproliferative Prozesse nachweisen (siehe Abbildung 8). Hier waren zu frühen Zeitpunkten bei den TNF-R2-/- Mäusen tendenziell weniger Gefäße detektierbar. Möglicherweise hängt diese Beobachtung mit der initial höheren TNF α -Konzentration zusammen, welche sich blockierend auf die Neubildung von Gefäßen auswirkt, so dass erst zu späteren Zeitpunkten niedrigere TNF α -Konzentrationen fördernd auf angioproliferative Prozesse wirken [22]. Des Weiteren sollte auch in Betracht gezogen werden, dass der gewählte Zeitraum dieser Studie eventuell nicht lang genug ist, um angioproliferative Prozesse aufdecken zu können [68].

4.9 TNF α -Rezeptoren und 'andere Zellen'

In der Kategorie 'andere Zellen' wurde sowohl eine inhomogene Gruppe von Zellen zusammengefasst als auch nicht weiter klassifizierte extrazelluläre Bindegewebsanteile. Neben vereinzelt vorkommenden anderen Zelltypen handelt es sich dabei wahrscheinlich hauptsächlich um Schwannzellen und Fibroblasten. Da die Zelltypen dieser Kategorie in der vorliegenden Studie nicht getrennt wurden und die Vielgestaltigkeit der Schwannzellphänotypen eine Zuordnung in die richtige Kategorie erschwerte, sind nur spekulative Überlegungen möglich.

Im Zuge der Demyelinisierung erfahren Schwannzellen einen ‚phänotypischen Switch‘, der es ihnen erlaubt, zahlreiche Funktionen aus früheren Entwicklungsstadien auszuüben, welche sie als reife, myelinisierende Zellen nicht mehr besitzen [26, 95]. Eine wichtige Eigenschaft dieser unreifen

4. Diskussion

Schwannzellen ist die Fähigkeit sowohl apoptotische, als auch proliferative Signale empfangen zu können [58]. Diese können durch die TNF α -Rezeptoren vermittelt werden [97-99]. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass der Verlust eines der Rezeptoren zur Fehlregulation bei der Steuerung dieser beiden Prozesse führt. In frühen Stadien der WD sind Schwannzellen die erste Quelle der Zytokinproduktion. Später wird die Zytokinproduktion von Makrophagen übernommen. Schwannzellen werden durch TGF- β zur Proliferation angeregt und übernehmen die Produktion von neuronalen Wachstumsfaktoren, welche die Nervenregeneration unterstützen. Des Weiteren übernehmen sie initial auch phagozytische Eigenschaften und unterstützen Makrophagen bei der Beseitigung von angefallenen Myelinresten [9, 80, 92]. Kommt es zur erfolgreichen Regeneration und zum Kontakt des Nervens mit dem Zielgewebe, erwerben die Schwannzellen wieder ihre ursprüngliche, reife Gestalt und proliferative Prozesse werden unterbunden [19, 51]. TNF α ist in diese Prozesse der De- und Remyelinisierung involviert [56, 102].

Fibroblasten werden während der WD durch IL-1 aus hämatogenen Makrophagen zur Proliferation angeregt [79]. Zur Wirkung der TNF α -Rezeptoren auf Fibroblasten wurden außerhalb des Nervensystems unterschiedliche Beobachtungen gemacht: Theiss et al. zeigten eine Stimulation von Fibroblasten durch TNF-R2 [101], andere Studien wiesen hingegen auf eine Beteiligung beider Rezeptoren hin [31, 66].

In frühen Stadien wurden nach Crush und CCI keine Unterschiede in der Schwannzellproliferation gesehen. Wahrscheinlich ist die Verwechslungsmöglichkeit mit phagozytierenden Makrophagen zu diesen Zeitpunkten am größten. Nach Crush wurden bei beiden Knockouttypen in der regenerativen Phase weniger nicht neuronale Zellen beobachtet als bei Wildtypen (siehe Abbildung 10). Eine beschleunigte Regeneration, welche die Ausbildung des reifen Schwannzellphänotyps fördern würde [19, 51], konnte

5. Schlussfolgerung

nur bei den TNF-R1^{-/-} Mäusen beobachtet werden. Möglicherweise besteht der gemessene Zellanteil hier vermehrt aus anderen Zellen wie Fibroblasten.

Nach CCI hingegen wurden an Tag 36 bei den TNF-R2^{-/-} Mäusen mehr ‚andere Zellen‘ beobachtet (siehe Abbildung 10) als bei WT- und TNF-R1^{-/-} Mäusen.

Ursächlich für den erhöhten Zellanteil bzw. Anteil extrazellulärer Matrix bei den TNF-R2^{-/-} Mäusen könnte ein zusätzlicher Reiz im CCI-Modell sein, welcher nach Crush entweder weniger ausgeprägt ist oder fehlt. Die beiden TNF-R2^{-/-} Gruppen der beiden Verletzungsarten unterscheiden sich vor allem im Ausprägungsgrad des Ödems (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10), so dass es plausibel erscheint, dass zwischen diesem und dem erhöhten Anteil nicht neuronaler Zellen nach CCI ein kausaler Zusammenhang besteht. Um zu klären, wie dieser genau aussieht und welche Zellarten dazu beitragen, sind weitere Studien erforderlich, in welchen eine genaue Zuordnung der Zelltypen und deren Abgrenzung von extrazellulären Matrixbestandteilen berücksichtigt werden.

5 SCHLUSSFOLGERUNG

Die durchgeführte Studie untersuchte an TNF α -Rezeptor-Knockoutmäusen zum ersten Mal über einen längeren Zeitraum, in welchem sowohl degenerative als auch regenerative Prozesse eine Rolle spielen, den Einfluss der beiden TNF α -Rezeptorsubtypen auf morphologische Veränderungen nach traumatisch bedingter Verletzung des N. ischiadicus. Die gewonnenen Ergebnisse bestätigen vorhergehende Verlaufsuntersuchungen der WD beim Wildtyp und stützen sowohl die Vermutung von abweichenden Verlaufsmustern in den beiden Verletzungsmodellen (Crush vs. CCI) als auch divergierende Funktionen der TNF α -Rezeptoren während der WD. Zusammen mit Erkenntnissen anderer Studien, kann eine neue Hypothese über die spezifischen

5. Schlussfolgerung

Wirkungsmechanismen beider Rezeptorsubtypen während der WD abgeleitet werden:

Die verminderte Anzahl Mac-1+ Makrophagen, sowie die verzögerte Regeneration bei Fehlen des TNF-R1 als auch die stärkere Ödembildung bei Fehlen von TNF-R2 sprechen dafür, dass TNF-R1 während der degenerativen Phase der WD einen starken Einfluss auf die Rekrutierung hämatogener Makrophagen und die Eröffnung der BNS hat. Damit schafft dieser während der degenerativen Phase, durch die schnelle und effiziente Beseitigung von Myelinresten, die vor allem durch die rekrutierten Zellen ermöglicht wird, die Voraussetzungen für regenerative Prozesse. Zusätzlich weist die starke Schädigung bei Ausfall von TNF-R1 auf einen weiteren wichtigen Beitrag von TNF-R1 hin, welcher vermutlich in der Limitierung von Entzündungsreaktionen besteht, einerseits wahrscheinlich über die Bereitstellung anti-inflammatorischer Zytokine aus rekrutierten hämatogenen Makrophagen und möglicherweise andererseits durch gezielte Apoptose von Effektorzellen wie aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten, welche inflammatorische Prozesse aufrechterhalten. Im CCI-Modell hat TNF-R1 zusätzlich einen hemmenden Einfluss auf die Regeneration, welcher vermutlich mit der ausgeprägten Ödembildung und der Proliferation nicht neuronaler Zellen in Zusammenhang steht.

Die beschleunigte Regeneration bei Wegfall von TNF-R1 sowie auch das schnellere Verschwinden nicht neuronaler Zellen spricht dafür, dass TNF-R2 insbesondere in regenerative Mechanismen involviert ist, wahrscheinlich vor allem durch die Proliferation von Schwannzellen, die durch die Produktion von Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen die notwendigen Voraussetzungen für das gerichtete Nervenwachstum schaffen. Andererseits benötigt TNF-R2 gleichzeitig das eindämmende Potential von TNF-R1 um überschießende Entzündungsreaktionen, die das Nervengewebe während der degenerativen Phase stark schädigen, zu verhindern.

6. klinische Relevanz

Die Verifizierung dieser Vermutungen erfordert allerdings noch weiterführende, auf Teilaspekte fokussierte, Experimente. Einerseits würden ergänzende Untersuchungen über das Verhalten von Schwannzellen und verschiedenen T-Zell-Klassen während der WD an TNF α -Rezeptor-Knockoutmäusen weitere Erkenntnisse über die Art der Entzündungsreaktionen und die Mechanismen einer verbesserten Regeneration liefern. Andererseits wäre eine Verlaufsuntersuchung pro-inflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine in TNF α -Rezeptor-Knockoutmäusen interessant, um oben genannte Einflüsse auf inflammatorische Prozesse genauer charakterisieren zu können.

6 KLINISCHE RELEVANZ

Die Blockade von TNF α mit Medikamenten wie Infliximab, Etanercept und Adalimumab hat sich erfolgreich für Behandlung der Rheumatoiden Arthritis etabliert [36]. Als Begleiterscheinung dieser Behandlung treten zum Teil schwerwiegende neurologische Nebenwirkungen auf [16, 20, 43, 72]. Auch der Einsatz von TNF α -Syntheseinhibitoren zeigte neuropathologische Nebenwirkungen [59, 109]. Durch eine gezielte Blockade könnten diese Komplikationen möglicherweise vermieden werden [49]. Beide Rezeptoren scheinen sich in physiologischen Immunreaktionen sinnvoll zu ergänzen. Je nachdem, welche Signalkaskaden in den jeweiligen pathologischen Konstellationen überwiegen, sind therapeutische Strategien notwendig, die einen Ausgleich schaffen können, ohne dabei intakte bzw. erwünschte Signalkaskaden zu unterbrechen. In den oben zitierten Studien scheint aber genau das der Fall zu sein. In der vorliegenden Studie wirkt sich die Abwesenheit von TNF-R1 in beiden Modellen günstig auf die Regeneration des Nervens nach Verletzungen aus, ohne dass sich dabei unerwünschte Effekte durch TNF-R2 beobachten lassen. Die Entzündungsreaktion die durch TNF-R2 stimuliert wird und zu einer starken axonalen Degeneration führt, scheint hier keine negativen Konsequenzen zu haben. Zusätzlich könnten Patienten nach

7. Zusammenfassung

Nervenverletzungen von der schmerzlindernden Wirkung durch Blockade von TNF-R1 profitieren [87, 90]. Alle genannten Beobachtungen weisen darauf hin, dass die weitere gewebespezifische Charakterisierung von erwünschten und unerwünschten Wirkungen durch selektive Blockade eines TNF α -Rezeptors sinnvoll und wichtig ist, um zukünftig gezielt in immunpathologische Krankheitsgeschehen eingreifen zu können.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Noch immer ist die Behandlung von Neuropathien mit den gängigen therapeutischen Mitteln für viele Patienten sehr unbefriedigend. Als erfolgsversprechender therapeutischer Ansatz werden zur Zeit Wege erforscht, welche direkt in die molekularen Entstehungsmechanismen pathologischer Veränderungen und regenerationsfördernder Mechanismen eingreifen, um dadurch eine Heilung von Nervenschäden zu ermöglichen. Bisher sind die Erkenntnisse über diese Mechanismen nicht vollständig genug, um daraus eine sichere Behandlungsmöglichkeit abzuleiten. Wegweisende Erkenntnisse deuten sich allerdings durch Studien von unterschiedlichen Vertretern des Zytokinnetzwerks an - darunter auch TNF α - welche als molekulare Ursache neuropathischer Veränderungen diskutiert werden. In dieser Studie wurde an Knockoutmäusen der Einfluss des jeweiligen TNF α -Rezeptors auf morphologische Veränderungen nach CCI und Crush-Verletzung des N. ischiadicus untersucht. Nach 3, 7, 15 und 36 Tagen (CCI) bzw. 3, 7 und 28 Tagen (Crush) wurden in Methylenblau gefärbten Semidünnschnitten intakte und degenerierte Nervenfasern, Makrophagen, Angioproliferation, Ödembildung und Veränderung des Anteils nicht neuronaler Zellen lichtmikroskopisch beurteilt. Zusätzlich wurden Mac-1+ Makrophagen immunzytochemisch erfasst. Die Ergebnisse zeigten in beiden Modellen und bei beiden Knockouttypen eine starke axonale Schädigung, die von einer großen endoneuralen Makrophagenansammlung begleitet war. Bei TNF-R1 $^{-/-}$ Mäusen war eine

7. Zusammenfassung

stärkere und verlängerte Degeneration mit entsprechend höheren Makrophagenzahlen sichtbar. In den immunzytochemischen Färbungen wiesen die TNF-R1-/- Mäuse hingegen den geringsten Makrophagenanteil auf. Trotz der starken Schädigung war die anschließende Regeneration im Gegensatz zu WT und TNF-R2-/- Mäusen besser. Die Ödembildung war bei den TNF-R2-/- Mäusen nach CCI besonders stark ausgeprägt und von einer schlechten Regeneration gefolgt. Während die gefundenen Daten auf eine Beteiligung beider Rezeptoren während degenerativer Prozesse nach Nervenläsion hindeuten, scheint insbesondere TNF-R2 regenerationsfördernde Effekte zu vermitteln.

8 LITERATUR

1. Aggarwal BB (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756
2. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4:1116-1122
3. Avellino AM, Dailey AT, Harlan JM, Sharar SR, Winn RK, McNutt LD, Kliot M (2004) Blocking of up-regulated ICAM-1 does not prevent macrophage infiltration during Wallerian degeneration of peripheral nerve. *Exp Neurol* 187:430-444
4. Basbaum AI, Gautron M, Jazat F, Mayes M, Guilbaud G (1991) The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain* 47:359-367
5. Bendszus M, Stoll G (2003) Caught in the act: in vivo mapping of macrophage infiltration in nerve injury by magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 23:10892-10896
6. Bennett GJ XY (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107
7. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C (1991) Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174:1549-1555
8. Bonetti B, Valdo P, Stegagno C, Tanel R, Zanusso GL, Ramarli D, Fiorini E, Turazzi S, Carner M, Moretto G (2000) Tumor necrosis factor alpha and human Schwann cells: signalling and phenotype modulation without cell death. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:74-84
9. Brück W (1997) The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol* 7:741-752
10. Brück W, Friede RL (1990) Anti-macrophage CR3 antibody blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *Acta Neuropathol (Berl)* 80:415-418
11. Brück W, Friede RL (1990) L-fucosidase treatment blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *J Neuroimmunol* 27:217-227
12. Brück W, Huitinga I, Dijkstra CD (1996) Liposome-mediated monocyte depletion during wallerian degeneration defines the role of hematogenous phagocytes in myelin removal. *J Neurosci Res* 46:477-484

8. Literatur

13. Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, Calzetti F, Bonora S (1994) Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med* 179:1695-1699
14. Chen LE, Seaber AV, Wong GH, Urbaniak JR (1996) Tumor necrosis factor promotes motor functional recovery in crushed peripheral nerve. *Neurochem Int* 29:197-203
15. Cheng L, Khan M, Mudge AW (1995) Calcitonin gene-related peptide promotes Schwann cell proliferation. *J Cell Biol* 129:789-796
16. Chung JH, Van Stavern GP, Frohman LP, Turbin RE (2006) Adalimumab-associated optic neuritis. *J Neurol Sci* 244:133-136
17. Conti G, De Pol A, Scarpini E, Vaccina F, De Riz M, Baron P, Tiriticco M, Scarlato G (2002) Interleukin-1 beta and interferon-gamma induce proliferation and apoptosis in cultured Schwann cells. *J Neuroimmunol* 124:29-35
18. Creange A, Barlovatz-Meimon G, Gherardi RK (1997) Cytokines and peripheral nerve disorders. *Eur Cytokine Netw* 8:145-151
19. Doyu M, Sobue G, Ken E, Kimata K, Shinomura T, Yamada Y, Mitsuma T, Takahashi A (1993) Laminin A, B1, and B2 chain gene expression in transected and regenerating nerves: regulation by axonal signals. *J Neurochem* 60:543-551
20. Dubcenco E, Ottaway CA, Chen DL, Baker JP (2006) Neurological symptoms suggestive of demyelination in Crohn's disease after infliximab therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18:565-566
21. Dyck PJ, Windebank AJ, Low PA, Baumann WJ (1980) Blood nerve barrier in rat and cellular mechanisms of lead-induced segmental demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 39:700-709
22. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC (1992) Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol* 140:539-544
23. Ferrero E, Zocchi MR, Magni E, Panzeri MC, Curnis F, Rugarli C, Ferrero ME, Corti A (2001) Roles of tumor necrosis factor p55 and p75 receptors in TNF-alpha-induced vascular permeability. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1173-1179
24. Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N, Fuchs C, Pfizenmaier K, Eisel U (2002) Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in

8. Literatur

- retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci* 22:RC216
25. Friede RL, Bruck W (1993) Macrophage functional properties during myelin degradation. *Adv Neurol* 59:327-336
26. Fu SY, Gordon T (1997) The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 14:67-116
27. George A, Buehl A, Sommer C (2005) Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. *Exp Neurol* 192:163-166
28. George A, Buehl A, Sommer C (2004) Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineurial tumor necrosis factor-alpha protein. *Neurosci Lett* 372:215-219
29. George A, Kleinschnitz C, Zelenka M, Brinkhoff J, Stoll G, Sommer C (2004) Wallerian degeneration after crush or chronic constriction injury of rodent sciatic nerve is associated with a depletion of endoneurial interleukin-10 protein. *Exp Neurol* 188:187-191
30. George A, Schmidt C, Weishaupt A, Toyka KV, Sommer C (1999) Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol* 160:124-132
31. Ghezzi P, Mennini T (2001) Tumor necrosis factor and motoneuronal degeneration: an open problem. *Neuroimmunomodulation* 9:178-182
32. Giraudo E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, Klagsbrun M, Ferrara N, Bussolino F (1998) Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273:22128-22135
33. Grell M (1995) Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm* 47:8-17
34. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793-802
35. Gupta K, Zhang J (2005) Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J* 81:236-242

8. Literatur

36. Haraoui B (2005) Differentiating the efficacy of the tumor necrosis factor inhibitors. *Semin Arthritis Rheum* 34:7-11
37. Hartung HP, Jung S, Stoll G, Zielasek J, Schmidt B, Archelos JJ, Toyka KV (1992) Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS. *J Neuroimmunol* 40:197-210
38. Hattori A, Iwasaki S, Murase K, Tsujimoto M, Sato M, Hayashi K, Kohno M (1994) Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *FEBS Lett* 340:177-180
39. Hehlgans T, Mannel DN (2002) The TNF-TNF receptor system. *Biol Chem* 383:1581-1585
40. Hoogeveen JF, Troost D, Wondergem J, van der Kracht AH, Haveman J (1992) Hyperthermic injury versus crush injury in the rat sciatic nerve: a comparative functional, histopathological and morphometrical study. *J Neurol Sci* 108:55-64
41. Jander S, Lausberg F, Stoll G (2001) Differential recruitment of CD8+ macrophages during Wallerian degeneration in the peripheral and central nervous system. *Brain Pathol* 11:27-38
42. Janeway CT, Paul Walport, Mark Capra, J.Donald (1999) *The immune system in health and disease*. Garland Publications fourth edition
43. Jarand J, Zochodne DW, Martin LO, Voll C (2006) Neurological complications of infliximab. *J Rheumatol* 33:1018-1020
44. Joyce DA, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M, Brennan FM (1994) Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* 24:2699-2705
45. Jungnickel J, Haase K, Konitzer J, Timmer M, Grothe C (2006) Faster nerve regeneration after sciatic nerve injury in mice over-expressing basic fibroblast growth factor. *J Neurobiol* 66:940-948
46. Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP (2001) The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 64:109-127
47. Kleinschnitz C, Brinkhoff J, Zelenka M, Sommer C, Stoll G (2004) The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. *J Neuroimmunol* 149:77-83

8. Literatur

48. Kleinschnitz C, Hofstetter HH, Meuth SG, Braeuninger S, Sommer C, Stoll G (2006) T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated with interleukin-17 expression. *Exp Neurol* 200:480-485
49. Kollias G, Kontoyiannis D (2002) Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:315-321
50. Kuhlmann T, Bitsch A, Stadelmann C, Siebert H, Bruck W (2001) Macrophages are eliminated from the injured peripheral nerve via local apoptosis and circulation to regional lymph nodes and the spleen. *J Neurosci* 21:3401-3408
51. LeBlanc AC, Poduslo JF (1990) Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve. *J Neurosci Res* 26:317-326
52. Ledgerwood EC, Pober JS, Bradley JR (1999) Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. *Lab Invest* 79:1041-1050
53. Levy D, Kuberski P, Zochodne DW (2001) Delayed peripheral nerve degeneration, regeneration, and pain in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:411-421
54. Liefner M, Siebert H, Sachse T, Michel U, Kollias G, Bruck W (2000) The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. *J Neuroimmunol* 108:147-152
55. Lindenlaub T, Teuteberg P, Hartung T, Sommer C (2000) Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. *Brain Res* 866:15-22
56. Lisak RP, Bealmear B, Benjamins JA, Skoff AM (2001) Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta inhibit cyclic AMP-induced Schwann cell differentiation. *Glia* 36:354-363
57. Lunn ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H, Gordon S (1989) Absence of Wallerian Degeneration does not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve. *Eur J Neurosci* 1:27-33
58. Mielke K, Herdegen T (2002) Fatal shift of signal transduction is an integral part of neuronal differentiation: JNKs realize TNFalpha-mediated apoptosis in neuronlike, but not naive, PC12 cells. *Mol Cell Neurosci* 20:211-224
59. Mileskin L, Stark R, Day B, Seymour JF, Zeldis JB, Prince HM (2006) Development of neuropathy in patients with myeloma treated with thalidomide: patterns of occurrence and

8. Literatur

- the role of electrophysiologic monitoring. *J Clin Oncol* 24:4507-4514
60. Moalem G, Xu K, Yu L (2004) T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience* 129:767-777
61. Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R (2001) Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *Am J Pathol* 159:2187-2197
62. Myers RR, Murakami H, Powell HC (1986) Reduced nerve blood flow in edematous neuropathies: a biomechanical mechanism. *Microvasc Res* 32:145-151
63. Myers RR, Yamamoto T, Yaksh TL, Powell HC (1993) The role of focal nerve ischemia and Wallerian degeneration in peripheral nerve injury producing hyperesthesia. *Anesthesiology* 78:308-316
64. Nienartowicz A, Sobaniec-Lotowska ME, Jarocka-Cyrta E, Lemancewicz D (2006) Mast cells in neoangiogenesis. *Med Sci Monit* 12:RA53-56
65. Oppenheim RW, Wiese S, Prevette D, Armanini M, Wang S, Houenou LJ, Holtmann B, Gotz R, Pennica D, Sendtner M (2001) Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *J Neurosci* 21:1283-1291
66. Ortiz LA, Lasky J, Gozal E, Ruiz V, Lungarella G, Cavarra E, Brody AR, Friedman M, Pardo A, Selman M (2001) Tumor necrosis factor receptor deficiency alters matrix metalloproteinase 13/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in murine silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163:244-252
67. Petrache I, Birukova A, Ramirez SI, Garcia JG, Verin AD (2003) The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:574-581
68. Podhajsky RJ, Myers RR (1993) The vascular response to nerve crush: relationship to Wallerian degeneration and regeneration. *Brain Res* 623:117-123
69. Probert L, Eugster HP, Akassoglou K, Bauer J, Frei K, Lassmann H, Fontana A (2000) TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease. *Brain* 123 (Pt 10):2005-2019

8. Literatur

70. Redford EJ, Hall SM, Smith KJ (1995) Vascular changes and demyelination induced by the intraneural injection of tumour necrosis factor. *Brain* 118 (Pt 4):869-878
71. Reichert F, Saada A, Rotshenker S (1994) Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *J Neurosci* 14:3231-3245
72. Richez C, Blanco P, Lagueny A, Schaeffer T, Dehais J (2005) Neuropathy resembling CIDP in patients receiving tumor necrosis factor-alpha blockers. *Neurology* 64:1468-1470
73. Ridley AJ, Davis JB, Stroobant P, Land H (1989) Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol* 109:3419-3424
74. Saada A, Reichert F, Rotshenker S (1996) Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. *J Cell Biol* 133:159-167
75. Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, Flanders KC, Okada Y, Miyamoto T, Kitano A, Ooshima A, Nakajima Y, Ohnishi Y, Kao WW (2006) Loss of tumor necrosis factor alpha potentiates transforming growth factor beta-mediated pathogenic tissue response during wound healing. *Am J Pathol* 168:1848-1860
76. Savio T, Schwab ME (1989) Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth. *J Neurosci* 9:1126-1133
77. Schäfers M, Schmidt C, Vogel C, Toyka KV, Sommer C (2002) Tumor necrosis factor-alpha (TNF) regulates the expression of ICAM-1 predominantly through TNF receptor 1 after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve. *Acta Neuropathol (Berl)* 104:197-205
78. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254:439-459
79. Shamash S, Reichert F, Rotshenker S (2002) The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* 22:3052-3060
80. Shen ZL, Lassner F, Bader A, Becker M, Walter GF, Berger A (2000) Cellular activity of resident macrophages during Wallerian degeneration. *Microsurgery* 20:255-261

8. Literatur

81. Shubayev VI, Myers RR (2002) Endoneurial remodeling by TNF α - and TNF α -releasing proteases. A spatial and temporal co-localization study in painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 7:28-36
82. Shubayev VI, Myers RR (2000) Upregulation and interaction of TNF α and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. *Brain Res* 855:83-89
83. Siebert H, Bruck W (2003) The role of cytokines and adhesion molecules in axon degeneration after peripheral nerve axotomy: a study in different knockout mice. *Brain Res* 960:152-156
84. Siebert H, Dippel N, Mader M, Weber F, Bruck W (2001) Matrix metalloproteinase expression and inhibition after sciatic nerve axotomy. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:85-93
85. Skoff AM, Lisak RP, Bealmear B, Benjamins JA (1998) TNF α and TGF β act synergistically to kill Schwann cells. *J Neurosci Res* 53:747-756
86. Sommer C, Galbraith JA, Heckman HM, Myers RR (1993) Pathology of experimental compression neuropathy producing hyperesthesia. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:223-233
87. Sommer C, Marziniak M, Myers RR (1998) The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve. *Pain* 74:83-91
88. Sommer C, Myers RR (1996) Vascular pathology in CCI neuropathy: a quantitative temporal study. *Exp Neurol* 141:113-119
89. Sommer C, Schafers M (1998) Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. *Brain Res* 784:154-162
90. Sommer C, Schmidt C, George A (1998) Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol* 151:138-142
91. Sommer C, Schmidt C, George A, Toyka KV (1997) A metalloprotease-inhibitor reduces pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. *Neurosci Lett* 237:45-48
92. Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58:233-247
93. Stoll G, Jander S, Myers RR (2002) Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus

8. Literatur

- Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst* 7:13-27
94. Stoll G, Jander S, Schroeter M (2002) Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 513:87-113
95. Stoll G, Muller HW (1999) Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9:313-325
96. Tartaglia LA, Goeddel DV (1992) Two TNF receptors. *Immunol Today* 13:151-153
97. Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, Figari IS, Weber RF, Fendly BM, Palladino MA, Jr. (1993) Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol* 151:4637-4641
98. Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV (1993) Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73:213-216
99. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Jr., Goeddel DV (1991) The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9292-9296
100. Terenghi G (1999) Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 194 (Pt 1):1-14
101. Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK (2005) Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem* 280:36099-36109
102. Tsukamoto T, Ishikawa M, Yamamoto T (1995) Suppressive effects of TNF-alpha on myelin formation in vitro. *Acta Neurol Scand* 91:71-75
103. Uncini A, Di Muzio A, Di Guglielmo G, De Angelis MV, De Luca G, Lugaresi A, Gambi D (1999) Effect of rhTNF-alpha injection into rat sciatic nerve. *J Neuroimmunol* 94:88-94
104. Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W (1995) Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 5:392-399
105. Vougioukas VI, Roeske S, Bruck W (2000) Involvement of intercellular adhesion molecule-1 in myelin recognition by macrophages. *Acta Neuropathol (Berl)* 99:673-679
106. Wagner R, Janjigian M, Myers RR (1998) Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal

8. Literatur

- hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. *Pain* 74:35-42
107. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65
108. Wheeler RD, Zehntner SP, Kelly LM, Bourbonniere L, Owens T (2006) Elevated interferon gamma expression in the central nervous system of tumour necrosis factor receptor 1-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology* 118:527-538
109. Witzens M, Moehler T, Neben K, Fruehauf S, Hartschuh W, Ho AD, Goldschmidt H (2004) Development of leukocytoclastic vasculitis in a patient with multiple myeloma during treatment with thalidomide. *Ann Hematol* 83:467-470
110. Ziegler-Heitbrock HW (1989) The biology of the monocyte system. *Eur J Cell Biol* 49:1-12

ANHANG

Abkürzungen

AZ = Andere, nicht neuronale Zellen

BDNF = Brain derived neurotrophic factor

CCI = Chronic constriction injury

CRGP = calcitonin gene-related peptide

D = degenerierende Nervenfasern

G = Gefäße

M = Makrophagen

N = Intakte Nervenfasern

NGF = nerve growth factor

PNS = peripheres Nervensystem

PDGF = platelet-derived neurotrophic factor

SR = Strukturloser Raum

TNF α = Tumor Nekrose Faktor alpha

TNF-R1 = Tumor nekrose Faktor Rezeptor 1

TNF-R1 $^{-/-}$ = Tumor nekrose Faktor Rezeptor 1 Knockout

TNF-R2 = Tumor nekrose Faktor Rezeptor 2

TNF-R2 $^{-/-}$ = Tumor nekrose Faktor Rezeptor 2 Knockout

VEGF = vascular endothelial growth factor

WD = Wallerdegeneration

Anhang

ZNS = zentrales Nervensystem

Abbildungen

Abbildung 1: Beispiel für die computergestützte Auswertung unter dem Lichtmikroskop aufgenommener Semidünnschnitte, x1750. Links: normaler Nerv mit Raster, Rechts: Nerv 3 Tage nach Crush-Läsion. Die Pfeile zeigen Strukturen, welche bei der Auswertung berücksichtigt wurden. N = intakte Nervenfasern, D = degenerierte Nervenfasern, M = Makrophage, G = Gefäß, SR = strukturloser Raum (Ödem), AZ = andere, nicht neuronale Zellen.... 18

Abbildung 2: Beispiel für die computergestützte densitometrische Auswertung der Cryostatschnitte des N. ischiadicus zur Erfassung der Gesamtfläche an Makrophagen pro Nerv. Links: Lichtmikroskopisches Bild eines Nerven 3 Tage nach Crush-Läsion, M_1 = immunhistochemisch markierter Makrophage. Rechts: gleiches lichtmikroskopisches Bild mit densitometrischer Maske, AOI = area of interest, M_2 = maskierter Makrophage, gestrichelte Linie = Begrenzung der AOI. x700..... 19

Abbildung 3: Darstellung der Auswahlkriterien für die Präparatqualität. Linkes Bild: idealer Schnitt, unverzerrt und Faszikelanzahl zwischen 3-5. Rechtes Bild: ungeeignetes Schnittniveau, Faszikelanzahl > 5. Nur Präparate im geeigneten Schnittniveau wurden für die statistische Auswertung berücksichtigt. x175 19

Abbildung 4: Histogramm mit Darstellung des Anteils intakter Nervenfasern (N) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE). * symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$). 26

Abbildung 5: Histogramm mit Darstellung des Anteils degenerierter Nervenfasern (D) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE). * symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$). 27

Abbildung 6: Histogramm mit Darstellung des Anteils an Makrophagen (M) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE). * symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$). 28

Abbildung 7: Graphische Darstellung des Anteils an immunhistochemisch markierten Makrophagen in % an der Gesamtfläche des Nerven Links: nach CCI an den postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: nach Crush an den postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwert +/- SE). * symbolisiert

Anhang

-
- signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), (*) symbolisiert grenzwertig
signifikante Unterschiede ($p=0,05$). 29
- Abbildung 8:** Histogramm mit Darstellung des Anteils an Gefäßen (G) in %
aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den postoperativen
Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den postoperativen Tagen
3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE). * symbolisiert signifikante
Werte ($p < 0,05$), (*) symbolisiert grenzwertig signifikante Unterschiede
($p=0,05$). 30
- Abbildung 9:** Histogramm mit Darstellung des Anteils an strukturlosem Raum
(SR) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den
postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den
postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE). *
symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$), (*) symbolisiert grenzwertig
signifikante Unterschiede ($p=0,05$). 31
- Abbildung 10:** Histogramm mit Darstellung des Anteils an strukturlosem Raum
(SR) in % aller Rasterkreuzungspunkte. Links: vor CCI und an den
postoperativen Tagen 3, 7, 15 und 36 Rechts: vor Crush und an den
postoperativen Tagen 3, 7 und 28 (Mittelwerte +/- Standardfehler (SE). *
symbolisiert signifikante Werte ($p < 0,05$), (*) symbolisiert grenzwertig
signifikante Unterschiede ($p=0,05$). 32
- Abbildung 11:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Methylenblau gefärbten
Semidünnschnitte (hier schwarz-weiß dargestellt) aus dem N. ischiadicus
der Maus, x1750, an Tag 0 (keine Operation). Die Bilder zeigen die
gleichen Ausgangsbedingungen bei den unterschiedlichen Mäusetypen:
Wildtyp (links), TNF-R1-/- (Mitte), TNF-R2-/- (rechts). 33
- Abbildung 12 :** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Methylenblau gefärbten
Semidünnschnitte (hier schwarz-weiß dargestellt) aus dem N. ischiadicus
der Maus, x1750, an Tag 3 nach CCI-Operation. Die TNF-R2-/- Mäuse
(rechts) zeigen eine stärkere Ödementwicklung im Vergleich zu den beiden
anderen Genotypen WT (links) und TNF-R1-/- (Mitte). 33
- Abbildung 13:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Methylenblau gefärbten
Semidünnschnitte (hier schwarz-weiß dargestellt) aus dem N. ischiadicus
der Maus, x1750x, an Tag 7 nach CCI-Operation: das Ödem ist bei den
TNF-R2-/- Mäusen (rechts) noch immer deutlich erkennbar, im Vergleich zu
den beiden anderen Gruppen WT (links) und TNF-R1-/- (Mitte). 34
- Abbildung 14:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Methylenblau gefärbten
Semidünnschnitte (hier schwarz-weiß dargestellt) aus dem N. ischiadicus
Nerv der Maus, x1750x an Tag 7 nach Crush-Operation. Bei den TNF-R1-/-
(Mitte) sind weniger intakte Nervenfasern und mehr Makrophagen als bei
den Vergleichsgruppen WT (links) und TNF-R2-/- Mäusen (rechts) zu

Anhang

finden. Im Vergleich zu den CCI-operierten Tieren ist die Läsion insgesamt weniger ausgeprägt. 34

Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Methylenblau gefärbten Semidünnschnitte (hier schwarz-weiß dargestellt) aus dem N. ischiadicus Nerv der Maus, x1750, an Tag 36 nach CCI-Operation: Bei den TNF-R2^{-/-} Mäusen (rechts) sind im Vergleich zu den Knockoutmäusen TNF-R1^{-/-} (Mitte) und Wildtypen noch ein größerer Anteil an ‚anderen Zellen‘ (AZ) vorhanden. TNF-R1^{-/-} Mäuse (Mitte) und Wildtypmäuse (links) zeigen deutlich regenerative Prozesse wie die dünne Remyelinisierung der Axone. 35

Anhang

Tabellen

- Tabelle 1:** Anzahl der CCI-operierten Tiere, aufgeteilt nach Genotyp und Zeitpunkt der Gewebeentnahme nach Operation. 12
- Tabelle 2:** Anzahl der Crush-operierten Mäuse, aufgeteilt nach Genotyp und Zeitpunkt der Gewebeentnahme nach Operation. 13
- Tabelle 3:** Anzahl der CCI-operierten Tiere (Semidünnschnitte = SD), die in die Statistik aufgenommen wurden, aufgeteilt nach Genotyp und morphologisch relevanten Operationszeitpunkten 20
- Tabelle 4:** Anzahl der CCI-operierten Tiere (Cryostatschnitte = IH), die in die Statistik aufgenommen wurden, aufgeteilt nach Genotyp und morphologisch relevanten Operationszeitpunkten 20
- Tabelle 5:** Anzahl der Crush-operierten Tiere, welche in die Statistik aufgenommen wurden, aufgeteilt nach Genotyp und morphologisch relevanten Operationszeitpunkten 20
- Tabelle 6:** Anzahl der Crush-operierten Tiere (IH), welche in die Statistik aufgenommen wurden, aufgeteilt nach Genotyp und morphologisch relevanten Operationszeitpunkten 20
- Tabelle 7:** Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils intakter Nervenfasern (N) in % aller Rasterkreuzungspunkte bei CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt. 26
- Tabelle 8:** Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils intakter Nervenfasern (N) in % aller Rasterkreuzungspunkte bei Crush-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt. 26
- Tabelle 9:** Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils degenerierter Nervenfasern (D) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt..... 27
- Tabelle 10:** Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils degenerierter Nervenfasern (D) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei Crush-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt..... 27
- Tabelle 11:** Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils von Makrophagen (M) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten von CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt..... 28
- Tabelle 12:** Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an Makrophagen (M) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten

Anhang

bei Crush-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.....	28
Tabelle 13: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an immunhistochemisch (IHC) markierten Makrophagen bei den CCI-operierten Mäusen an der Gesamtfläche, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.....	29
Tabelle 14: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an immunhistochemisch (IHC) markierten Makrophagen bei den Crush-operierten Mäusen an der Gesamtfläche, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.....	29
Tabelle 15: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an Gefäßen (G) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.....	30
Tabelle 16: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an Gefäßen (G) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei Crush-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.....	30
Tabelle 17: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an strukturlosem Raum (SR) aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.....	31
Tabelle 18: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an strukturlosem Raum (SR) aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei Crush-operierten Mäusen aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.....	31
Tabelle 19: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an anderen Zellen (AZ) in den Semidünnschnitten (SD) in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei CCI-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.....	32
Tabelle 20: Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) des Anteils an ‚anderen Zellen‘ (AZ in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei Crush-operierten Mäusen, aufgeteilt nach Genotyp und postoperativem Zeitpunkt.....	32

Anhang

Rohdaten

Semidünnschnitte CCI

Rohdaten 1: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten bei den Kontrollen, aufgeteilt nach Genotyp und Strukturkategorie.

Kontrollen		Morphologisch relevante Strukturen [%]					
Tier	Genotyp	N	D	M	G	SR	AZ
m 1100 R	WT	81,60	0,23	0,05	1,50	0,42	13,00
m 1101 R	WT	79,11	0,52	0,48	0,61	1,17	15,58
m 1102 R	WT	78,41	0,59	0,13	0,50	0,67	15,16
m 1107 R	TNF-R1-/-	78,82	0,33	0,17	0,58	0,79	16,04
m 1109 R	TNF-R1-/-	76,81	0,38	0,00	0,50	1,41	15,90
m 1110 R	TNF-R1-/-	82,55	0,27	0,00	0,70	0,16	12,29
m 1103 R	TNF-R2-/-	79,91	0,29	0,00	0,42	0,88	12,86
m 1104 R	TNF-R2-/-	82,16	0,26	0,00	0,47	0,45	12,40
m 1106 R	TNF-R2-/-	81,19	0,24	0,00	0,83	0,40	13,00

Rohdaten 2: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte aller ausgezählten Strukturen in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten an Tag 3 nach CCI-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp und Strukturkategorie.

CCI Tag 3		Morphologisch relevante Strukturen [%]					
Tier	Genotyp	N	D	M	G	SR	AZ
m 1800 R	WT	42,07	7,12	1,71	1,14	15,48	30,77
m 1801 R	WT	44,44	8,51	2,34	1,04	16,41	26,56
m 1802 R	WT	43,50	7,72	2,60	1,42	16,15	28,45
m 1804 R	TNF-R1-/-	35,59	10,52	6,77	1,15	13,69	32,28
m 1805 R	TNF-R1-/-	41,56	6,26	4,44	1,53	17,69	28,31
m 1806 R	TNF-R1-/-	42,69	12,70	7,56	0,96	10,35	25,75
m 1808 R	TNF-R2-/-	41,41	5,53	0,67	0,80	26,10	24,37
m 1809 R	TNF-R2-/-	41,29	7,48	2,23	0,88	24,74	23,39
m 1811 R	TNF-R2-/-	31,63	7,43	2,56	0,96	33,31	24,04

Anhang

Rohdaten 3: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte aller ausgezählten Strukturen in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten an Tag 7 nach CCI-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp und Strukturkategorie.

CCI Tag 7		Morphologisch relevante Strukturen [%]					
Tier	Genotyp	N	D	M	G	SR	AZ
m 1780 R	WT	3,93	9,20	26,88	0,54	18,04	41,43
m 1781 L	WT	3,04	9,00	32,24	1,17	17,99	36,57
m 1782 R	WT	8,24	11,55	30,61	0,89	17,69	31,02
m 1784 R	TNF-R1 ^{-/-}	8,35	9,74	38,98	0,93	8,24	33,76
m 1785 R	TNF-R1 ^{-/-}	5,51	9,40	50,81	1,33	10,26	22,70
m 1786 R	TNF-R1 ^{-/-}	10,81	9,35	48,14	0,88	13,95	16,87
m 1788 R	TNF-R2 ^{-/-}	6,55	9,68	39,33	1,37	22,10	20,96

Rohdaten 4: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte aller ausgezählten Strukturen in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten an Tag 15 nach CCI-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp und Strukturkategorie.

CCI Tag 15		Morphologisch relevante Strukturen [%]					
Tier	Genotyp	N	D	M	G	SR	AZ
m 1160 R	WT	52,27	1,20	3,97	0,74	7,15	32,11
m 1161 L	WT	45,51	2,81	4,28	0,84	7,26	36,10
m 1163 L	WT	12,50	4,47	17,39	1,19	2,64	60,70
m 1164 R	TNF-R1 ^{-/-}	10,63	1,85	51,52	0,27	11,71	21,59
m 1167 L	TNF-R1 ^{-/-}	1,02	7,59	23,13	1,90	0,05	66,33
m 1310 R	TNF-R1 ^{-/-}	29,78	0,21	13,63	0,60	5,41	48,73
m 1169 L	TNF-R2 ^{-/-}	75,26	0,68	1,20	0,52	2,30	15,50
m 1311 R	TNF-R2 ^{-/-}	63,32	1,07	4,51	0,81	0,11	24,97
m 1312 R	TNF-R2 ^{-/-}	58,88	2,05	4,33	0,41	0,10	30,75
m 1168 L	TNF-R2 ^{-/-}	0,13	3,88	29,68	1,10	5,78	59,43
m 1170 L	TNF-R2 ^{-/-}	0,42	7,33	27,12	1,25	2,26	61,62

Anhang

Rohdaten 5: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte aller ausgezählten Strukturen in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten an Tag 36 nach CCI-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp und Strukturkategorie.

CCI Tag 36		Morphologisch relevante Strukturen [%]					
Tier	Genotyp	N	D	M	G	SR	AZ
m 1075L	WT	39,89	0,61	5,41	0,96	2,69	50,44
m 1076R	WT	17,45	1,52	22,40	1,05	0,27	56,72
m 1077L	WT	16,70	1,31	13,42	1,12	0,15	67,30
m1031L	WT	37,22	1,17	6,15	0,98	8,27	34,69
m 1032R	WT	36,51	1,76	5,95	0,43	14,35	34,11
m1070R	TNF-R1 ^{-/-}	78,57	0,05	0,00	0,38	9,90	0,76
m1073L	TNF-R1 ^{-/-}	26,01	0,55	10,24	1,42	0,49	61,28
m1035L	TNF-R1 ^{-/-}	55,91	1,29	5,28	0,59	2,00	23,98
m1034R	TNF-R1 ^{-/-}	66,34	1,25	3,12	1,52	6,13	13,71
m 1078R	TNF-R2 ^{-/-}	24,96	1,20	11,52	0,74	0,06	60,18
m 1079L	TNF-R2 ^{-/-}	23,47	1,70	10,58	2,89	0,42	60,48
m 1080R	TNF-R2 ^{-/-}	30,98	0,69	8,97	0,69	0,45	56,61
m 1081 L	TNF-R2 ^{-/-}	13,96	0,95	12,34	1,85	0,00	70,90

Anhang

Cryostatschnitte CCI

Rohdaten 6: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte immunhistochemisch markierter Makrophagen in % des gesamten Nervenquerschnitts an Tag 3 nach CCI-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp.

CCI Tag 3 (IHC)		
Tier	Genotyp	M [%]
m 1800 Rd	WT	4,83
m 1801 Rd	WT	4,25
m 1802 Rd	WT	2,63
m 1804 Rd	TNF-R1-/-	3,30
m 1805 Rd	TNF-R1-/-	3,26
m 1806 Rd	TNF-R1-/-	3,17
m 1808 Rd	TNF-R2-/-	2,46
m 1809 Rd	TNF-R2-/-	2,15
m 1811 Rd	TNF-R2-/-	2,28

Rohdaten 7: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte immunhistochemisch markierter Makrophagen in % des gesamten Nervenquerschnitts an Tag 7 nach CCI-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp.

CCI Tag 7 (IHC)		
Tier	Genotyp	M [%]
m 1780 Rd	WT	4,56
m 1781 Rd	WT	6,15
m 1782 Rd	WT	3,49
m 1784 Rd	TNF-R1-/-	4,60
m 1785 Rd	TNF-R1-/-	2,38
m 1788 Rd	TNF-R2-/-	7,50

Rohdaten 8: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte immunhistochemisch markierter Makrophagen in % des gesamten Nervenquerschnitts an Tag 15 nach CCI-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp.

CCI Tag 15 (IHC)		
Tier	Genotyp	M [%]
m1160 Rd	WT	0,69
m1161 Ld	WT	1,05
m1163 Ld	WT	1,33
m 1164 Rd	TNF-R1-/-	2,88
m 1167 Ld	TNF-R1-/-	3,65
m 1310 Rd	TNF-R1-/-	1,86
m1169 Ld	TNF-R2-/-	1,02
m1311 Rd	TNF-R2-/-	0,91
m1312 Rd	TNF-R2-/-	1,97
m 1168 Rd	TNF-R2-/-	6,47
m1170 Rd	TNF-R2-/-	0,66

Rohdaten 9: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte immunhistochemisch markierter Makrophagen in % des gesamten Nervenquerschnitts an Tag 3 nach CCI-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp.

CCI Tag 36 (IHC)		
Tier	Genotyp	M [%]
m1031	WT	4,78
m1032	WT	4,00
m1075 Ld	WT	6,27
m 1034 Rd	TNF-R1-/-	1,11
m1035 Ld	TNF-R1-/-	4,80
m 1070 Rd	TNF-R1-/-	1,44
m 1073 Ld	TNF-R1-/-	4,75
m 1078 Rd	TNF-R2-/-	3,63
m1079 Ld	TNF-R2-/-	3,24
m1080 Rd	TNF-R2-/-	2,45

Anhang

Semidünnschnitte Crush

Rohdaten 10: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte aller ausgezählten Strukturen in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten an Tag 3 nach Crush-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp und Strukturkategorie.

crush Tag 3		Morphologisch relevante Strukturen [%]					
Tier	Genotyp	N	D	M	G	SR	AZ
m 1086 R	WT	34,40	5,38	0,00	1,26	33,00	25,96
m 1087 R	WT	47,83	6,94	0,00	0,48	9,45	35,29
m 1090 R	TNF-R1-/-	52,96	2,85	1,90	0,63	6,87	29,70
m 1091 R	TNF-R1-/-	52,26	2,26	1,49	1,10	13,31	26,94
m 1092 R	TNF-R1-/-	45,92	3,30	1,65	0,49	14,95	31,84
m 1095 R	TNF-R2-/-	56,37	1,60	0,08	0,93	10,80	30,13
m 1097 R	TNF-R2-/-	46,02	2,91	2,08	3,53	1,25	44,22

Rohdaten 11: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte aller ausgezählten Strukturen in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten an Tag 7 nach Crush-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp und Strukturkategorie.

Crush Tag 7		Morphologisch relevante Strukturen [%]					
Tier	Genotyp	N	D	M	G	SR	AZ
m 1200 R	WT	25,55	9,00	8,60	1,22	2,43	53,20
m 1202 R	WT	26,61	8,63	9,17	1,36	0,64	53,41
m 1203 R	WT	26,15	11,54	7,69	1,37	0,00	53,25
m 1212 R	TNF-R1-/-	12,81	27,28	18,91	0,68	0,23	40,09
m 1214 R	TNF-R1-/-	19,20	19,87	23,86	0,11	1,22	35,74
m 1215 R	TNF-R1-/-	7,92	20,00	16,72	0,88	0,16	54,32
m 1216 R	TNF-R1-/-	10,81	16,94	18,04	1,01	1,19	52,01
m 1205 R	TNF-R2-/-	26,15	11,54	7,69	1,37	0,00	53,25
m 1206 R	TNF-R2-/-	28,29	8,36	8,95	0,76	0,17	53,46
m 1207 R	TNF-R2-/-	19,39	14,83	8,65	0,86	3,52	52,76
m 1208 R	TNF-R2-/-	19,86	16,68	8,94	0,95	0,26	53,31

Anhang

Rohdaten 12: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte aller ausgezählten Strukturen in % aller Rasterkreuzungspunkte an Semidünnschnitten an Tag 28 nach Crush-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp und Strukturkategorie.

Crush Tag 28		Morphologisch relevante Strukturen [%]					
Tier	Genotyp	N	D	M	G	SR	AZ
m 1321 L	WT	29,45	5,53	9,93	0,86	0,52	53,71
m 1322 R	WT	25,95	1,76	15,20	1,20	0,00	55,89
m 1323 R	WT	26,94	2,09	15,90	1,39	0,00	53,68
m 1324 R	TNF-R1-/-	20,08	1,31	13,15	0,80	0,00	64,66
m 1325 R	TNF-R1-/-	25,40	0,34	29,80	0,23	1,13	43,12
m 1326 R	TNF-R1-/-	30,25	2,12	12,42	1,17	0,32	53,40
m 1328 R	TNF-R1-/-	27,47	0,17	28,07	1,72	0,00	42,58
m 1330 R	TNF-R2-/-	30,76	1,10	24,61	2,02	0,37	41,14
m 1331 R	TNF-R2-/-	27,92	1,20	13,36	1,81	0,00	55,72
m 1332 R	TNF-R2-/-	24,77	1,18	28,88	0,50	0,00	44,67
m 1333 R	TNF-R2-/-	28,44	0,00	31,13	1,51	1,05	37,88
m 1334 R	TNF-R2-/-	29,29	0,08	25,61	1,09	0,00	43,93

Anhang

Cryostatschnitte Crush

Rohdaten 13: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte immunhistochemisch markierter Makrophagen in % des gesamten Nervenquerschnitts an Tag 3 nach Crush-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp.

Crush crush Tag 3 (IHC)		
Tier	Genotyp	M [%]
m 1086	WT	3,33
m1087	WT	3,29
m1090 Rd	TNF-R1-/-	0,61
m1091 Ld	TNF-R1-/-	0,30
m1092 Rd	TNF-R1-/-	0,40
m 1095 Ld	TNF-R2-/-	0,36

Rohdaten 14: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte immunhistochemisch markierter Makrophagen in % des gesamten Nervenquerschnitts an Tag 3 nach Crush-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp.

Crush crush Tag 7 (IHC)		
Tier	Genotyp	M [%]
1200 Rd	WT	11,99
1203 Ld	WT	9,50
1212	TNF-R1-/-	2,75
1214	TNF-R1-/-	2,58
1215	TNF-R1-/-	0,63
m 1205 Ld	TNF-R2-/-	3,38
m1207	TNF-R2-/-	4,68
m1208	TNF-R2-/-	1,79

Rohdaten 15: Tabellarische Auflistung der Einzelwerte immunhistochemisch markierter Makrophagen in % des gesamten Nervenquerschnitts an Tag 15 nach Crush-Verletzung, aufgeteilt nach Genotyp.

Crush Tag 28 (IHC)		
Tier	Genotyp	M [%]
m1323 Ld	WT	0,24
m 1324 Rd	WT	0,55
m 1325 Ld	TNF-R1-/-	0,29
m 1326 Rd	TNF-R1-/-	0,44
m 1328 Rd	TNF-R1-/-	1,94
m 1331 Ld	TNF-R2-/-	9,79
m 1333 Ld	TNF-R2-/-	1,81
m 1334 Rd	TNF-R2-/-	1,37

Danksagung

Danksagung

Ich danke dem Direktor der Klinik Prof. Dr. med. K. Toyka für die Ermöglichung der Arbeit durch die Bereitstellung der Räume und des Arbeitmaterials. Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. C. Sommer für die Bereitstellung des Themas und ihre freundliche und kontinuierliche Betreuung. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen aus dem Labor bedanken, insbesondere Frau Biko und Frau Dekant für Ihre freundliche Unterstützung und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sabine Stallforth
Geburtsdatum: 11.05.1976
Geburtsort: Augsburg

Berufsausübung (07/05-dato):

07/05: Assistenzärztin an der O.-v.-G.-Universitätsklinik
Magdeburg
Forschungstätigkeit in der klinischen Forschergruppe
der Abteilung Neurologie II mit Schwerpunkt „Störung
höherer kognitiver Funktionen“ unter Leitung von
Prof. Dr. med. E. Düzel

Hochschulstudium (05/97- dato):

Studium der Neurowissenschaften:

04/05: Studium der Neurowissenschaften (Kurs für
Mediziner),
Otto-v.-Guericke Universität Magdeburg

Studium der Humanmedizin:

12/04: Approbation als Ärztin
11/04: Drittes Staatsexamen, Universität Würzburg
03/03: Zweites Staatsexamen, Universität Würzburg
08/00: Erstes Staatsexamen, Universität Würzburg
08/99: Physikum, Universität Regensburg
05/97: Teilstudienplatz für Sommersemester 97, LMU
München

Lebenslauf

Praktisches Jahr

10/03-10/04 Universität Würzburg, Wahlfach Neurologie

Famulaturen:

08/03 Gemeinschaftspraxis für ambulante Chirurgie,
Würzburg
08/01: Neurologie, Universitätsklinikum Würzburg
03/01: Neurochirurgie, Centre Hospitalier Universitaire
Rangueil, Toulouse
03/99: Inneren Medizin, Zentralklinikum Augsburg

Pflegepraktikum:

02/98: Chirurgie, Zentralklinikum Augsburg

Berufliche Orientierungsphase:

10/96-05/97: Berufsschule Augsburg: Ausbildung zur Arzthelferin,
bis Zulassung zum Studium der Humanmedizin
11/95-07/96: Praktika in Handwerksbetrieben

Schulbildung:

06/95: Allgemeine Hochschulreife
09/86-06/95: Justus von Liebig Gymnasium, Neusäß
09/82-08/86: Grundschulausbildung; Grundschule Neusäß am
Eichenwald

Wissenschaftliche Arbeiten:

Medizinische Dissertation

Seit 05/2001

Posterpräsentationen

“The structural and functional long-term consequences of medial temporal resections on the limbic and neocortical connections of the hippocampus and the parahippocampal region”; International Neuroscience Symposium of the DFG Transregional Research Consortium (SFB/TR 3) Bonn/Germany, February 16-18, 2006

“Modulatory effects of Levetiracetam and Carbamazepine during memory formation”; 2nd German All Investigator’s Meeting Levetiracetam 19./20. Oktober 2006 Epilepsiezentrum Bethel, Bielefeld/Germany

Veröffentlichte Artikel

“Altered Pain behavior and regeneration after nerve injury in TNF receptor deficient mice” Carola Vogel, Sabine Stallforth, and Claudia Sommer; Journal of the peripheral nervous system 11: 294-303 (2006)

“Mesolimbic novelty processing in elderly” Nico Bunzeck, Hartmut Schütze, Sabine Stallforth, Jörn Kaufmann, Sandra Düzel, Hans-Jochen Heinze, Emrah Düzel; Cerebral Cortex (2007)

Magdeburg, 29.10.2007