Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

Die zelluläre hämatologische Immunantwort nach einer Rückenmarksverletzung beim Patienten und im Tiermodell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Tino Riegger

aus

Stuttgart

2005

Dekan:	Professor Dr. C.D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. J. Schlüsener
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H.-P. Kaps

meinen Eltern

1 Einleitung

		Seite
1.1	**Allgemeines**	
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Überblick über die Anatomie und Funktion des Rückenmarks	2
1.2	**Die Rückenmarksverletzung**	
1.2.1	Der primäre Verletzungsmechanismus	3
1.2.2	Der sekundäre Verletzungsmechanismus	5
1.3	**Die Entzündung**	
1.3.1	Die allgemeine Entzündungsantwort	7
1.3.2	Die zellulären Elemente der Entzündungsantwort	8
1.4	**Die Zellphysiologie des angeborenen Immunsystems**	
1.4.1	Die Granulozyten	9
1.4.2	Die läsional parenchymale Granulozytenantwort nach einer Rückenmarksverletzung	10
1.4.3	Die Monozyten	10
1.4.4	Die läsional parenchymale Monozytenantwort nach einer Rückenmarksverletzung	12
1.5	**Die Zellphysiologie des adaptiven Immunsystems**	
1.5.1	Die B-Lymphozyten	13
1.5.2	Die läsional parenchymale B-Lymphozytenantwort nach einer Rückenmarksverletzung	14
1.5.3	Die T-Lymphozyten	14
1.5.4	Die läsional parenchymale T-Lymphozytenantwort nach einer Rückenmarksverletzung	15
1.6	**Die Zellphysiologie der Antigen präsentierenden Zellen**	
1.6.1	Der MHC-Komplex	16
1.6.2	Die läsional parenchymale Antwort der MHC II^+-Population nach einer Rückenmarksverletzung	17
1.6.3	Die dendritischen Zellen	18
1.6.4	Die läsional parenchymale Antwort der dendritischen Zellen nach einer Rückenmarksverletzung	18

1.7 Die Zellphysiologie der Semaphorine
1.7.1 Das Semaphorin 4D 18

1.8 Das Studienziel 20

2 Material

2.1 Material für die klinische Studie der zellulären Entzündungsantwort im Blut des Patienten nach einer Rückenmarksverletzung
2.1.1 Einmalartikel 22
2.1.2 Reagenzien 22
2.1.3 Geräte 22
2.1.4 FITC konjugierte spezifische Antikörper zur Detektion der hämatogenen Leukozytensubpopulationen des Patienten 23
2.1.5 FITC konjugierte spezifische Antikörper der Isotyp-Kontrolle 23
2.1.6 Patienten 24

2.2 Material für die tierexperimentelle Studie der zellulären Entzündungsantwort im Blut der Ratte nach einer Rückenmarksverletzung
2.2.1 Medikamente und Reagenzien für die operative Hemitranssektion des Rückenmarks der Tiere 25
2.2.2 Einmalartikel 26
2.2.3 Reagenzien 26
2.2.4 Geräte 26
2.2.5 FITC konjugierte spezifische Antikörper zur Detektion der hämatogenen Leukozytensubpopulationen der Ratte 27
2.2.6 FITC konjugierte spezifische Antikörper der Isotyp- Kontrolle 27
2.2.7 Tiere 28

3 Methoden

3.1 Zeitpunkte der Blutabnahme beim Patienten und bei den Tieren 28

3.2 Probengewinnung und Verarbeitung des Patientenvollblutes
3.2.1 Blutentnahme beim Patienten 29
3.2.2 Isolierung der humanen Leukozyten und Inkubation mit dem zellspezifischen Antikörper 29

3.3 Probengewinnung und Verarbeitung des Rattenvollblutes
3.3.1 Rückenmarksverletzung bei der Ratte 30
3.3.2 Pflege der Tiere 31
3.3.3 Blutentnahme bei der Ratte 31
3.3.4 Isolierung der Leukozyten der Ratte und Inkubation mit dem zellspezifischen Antikörper 32

3.4 Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie
3.4.1 Die Funktionsweise des FACScan 33

3.5 FACS-Analyse von lysiertem humanem Vollblut 37
3.5.1 Qualitative Darstellung der Leukozytensubpopulationen beim Patienten 37
3.5.2 Isotyp-Kontrollen in der klinische Studie 39

3.6 FACS-Analyse von lysiertem Vollblut der Ratte 40
3.6.1 Qualitative Darstellung der Leukozytensubpopulationen im Tiermodell 40
3.6.2 Isotyp-Kontrollen in der tierexperimentellen Studie 42

3.7 Quantitative Darstellung des Zellimmunphänotyps in der klinischen und der tierexperimentellen Studie 43
3.7.1 Beispielhafte Darstellung eines Histogramms für die klinische und tierexperimentelle Studie 43

3.8 Statistische Auswertung der einzelnen Leukozytensub-populationen für die klinische und tierexperimentelle Studie 44

4 Ergebnisse

4.1 Die Zeitkinetik der zellulären Immunantwort im Blut der Patienten nach einer Rückenmarksverletzung

4.1.1 Die zelluläre angeborene Immunantwort der humanen $CD15^+$-Granulozyten im Patientenblut 45

4.1.2 Die zelluläre angeborene Immunantwort der humanen $CD14^+$-Monozyten im Patientenblut 46

4.1.3 Die zelluläre adaptive Immunantwort der humanen $CD19^+$-B-Lymphozyten im Patientenblut 47

4.1.4 Die zelluläre adaptive Immunantwort der humanen $CD3^+$-T-Lymphozyten im Patientenblut 49

4.1.5 Die zelluläre Immunantwort der humanen $MHC\ II^+$-Population im Patientenblut 50

4.1.6 Die zelluläre Immunantwort der humanen $CD100^+$-Population im Patientenblut 51

4.1.7 Die zelluläre Immunantwortt der humanen $CD45^+$-Gesamtleukozyten im Patientenblut 52

4.2 Die Zeitkinetik der zellulären Immunantwort im Blut der Ratte nach einer Rückenmarksverletzung

4.2.1 Die zelluläre angeborene Immunantwort der $HIS\ 48^+$-Granulozyten im Rattenblut 54

4.2.2 Die zelluläre angeborene Immunantwort der $ED1^+$- Monozyten im Rattenblut 55

4.2.3 Die zelluläre adaptive Immunantwort der $CD45\ RA^+$-B-Lymphozyten im Rattenblut 56

4.2.4 Die zelluläre adaptive Immunantwort der $CD3^+$-T-Lymphozyten im Rattenblut 57

4.2.5 Die zelluläre Immunantwort der $MHC\ II^+$-Population im Rattenblut 58

4.2.6 Die zelluläre Immunantwort der $OX\text{-}62^+$-dendritischen Zellen im Rattenblut 59

4.2.7 Die zelluläre Immunantwort der $CD45^+$-Gesamtleukozyten im Rattenblut 60

5 Diskussion 61

5.1 Die klinische Studie am Patienten 61

5.1.1 Die zelluläre hämatologische angeborene Immunantwort des Patienten 62

5.1.2 Die zelluläre hämatologische adaptive Immunantwort und seinen Korezeptoren des Patienten 63

5.2 Die tierexperimentelle Studie an Ratten 66
5.2.1 Die zelluläre hämatologische angeborene Immunantwort der Ratte 67
5.2.2 Die zelluläre hämatologische adaptive Immunantwort und seinen Korezeptoren der Ratte 68
5.2.3 Die zelluläre hämatologische Immunantwort der $CD45^+$-Gesamtleukozyten der Ratte 70

5.3 Schlussfolgerung 71

6 Zusammenfassung 73

7 Anhang

7.1 Verletzungsspektrum der rückenmarksverletzten Patienten 74

7.2 Kontrollpatienten 75

8 Literaturverzeichnis 76

9 Danksagung 83

10 Lebenslauf 85

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

1.1.1 Epidemiologie[7,21,66]

In den vergangenen 20 Jahren ist die Anzahl der rückenmarksverletzten Patienten leicht angestiegen. Erlitten in Deutschland im Jahr 1980 rund 1000 Patienten eine Rückenmarksverletzung, so geht eine Statistik aus dem Jahr 2000 von mindestens 1500 überwiegend männlichen (70%) querschnittsgelähmten Patienten im Jahr aus. Der Altersgipfel für eine Querschnittsverletzung liegt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr.

In einer zehnjährigen Studie über die Ursachen einer Rückenmarksverletzung nehmen die Verkehrsunfälle in den Jahren 1976 bis 1986 mit 40% den ersten Rang ein. Sportunfälle (4%) und Gewaltverbrechen (1%) sind in diesem Zeitraum auf den letzten Plätzen zu finden. In aktualisierten Statistiken von 2000 und 2001 führen die Verkehrsunfälle mit 50% weiterhin die Ursachenliste an, jedoch haben sportbedingte Unfälle und Gewaltverbrechen mit Anteilen bis zu 25% deutlich zugenommen.

Unter anderem lässt sich diese Entwicklung mit der zunehmenden Motorisierung der Gesellschaft erklären. Darüber hinaus ist zu beobachten, dass immer mehr junge Menschen unfallträchtige Freizeit- und Sportaktivitäten wie beispielsweise Gleitschirmfliegen oder Skifahren betreiben, die im Falle eines Unfalls zu einer Rückenmarksverletzung führen können. Die querschnittsgelähmten Patienten sind insbesondere nach ihrem langen Krankenhausaufenthalt in der Regel auf Medikamente, pflegerische und ärztliche Überwachung sowie therapiebegleitenden Maßnahmen dauerhaft angewiesen. Die kostenintensive rückenmarksverletzte Patientengruppe nimmt, wegen ihrem progressiv wachsenden Anteil am gesamten Patientenkollektiv, auch in finanzpolitischen Fragestellungen eine immer größer werdende Rolle ein.

1.1.2 Überblick über die Anatomie und Funktion des Rückenmarks

Das Rückenmark, das eingeschlossen in seinem knöchernen Wirbelkanal vom Gehirn bis zur Höhe des ersten Lendenwirbelkörpers verläuft, stellt die informative Verbindung zwischen dem Gehirn (Kortex) und dem Körper dar. Es wird zusammen mit dem Kortex als das Zentrale Nervensystem (ZNS) bezeichnet. Das Rückenmark gliedert sich in eine graue, innenliegende, schmetterlingsförmige Substanz und eine sie umgebende weiße Substanz. In der weißen Substanz verlaufen die myelinisierten Nervenfasern, so genannte Axone (Fortsätze einer Nervenzelle) als afferente (zum Kortex aufsteigende) wie auch efferente (vom Kortex absteigende) Leitungsbahnen (Tractus, Fasciculus). Die Ummantelung der Axone mit Myelin dient der schnelleren Übertragung der Nervenimpulse. Die Nervenzellen mit ihrem Zellkern liegen hingegen innerhalb der grauen Schmetterlingsfigur, bei der das „sensible“ Hinterhorn vom „motorischen“ Vorderhorn unterschieden wird. Am Hinterhorn wird die Mehrzahl der aus der Peripherie kommenden ersten sensiblen Neurone auf das zweite sensible Neuron, das in Richtung Kortex zieht weitergeschaltet. Das erste Motoneuron entspringt im Kortex und verläuft als Tractus corticospinalis, bevor es auf der entsprechenden Segmenthöhe im Vorderhorn auf das zweite Motoneuron zur Muskelinnervation verschaltet wird.

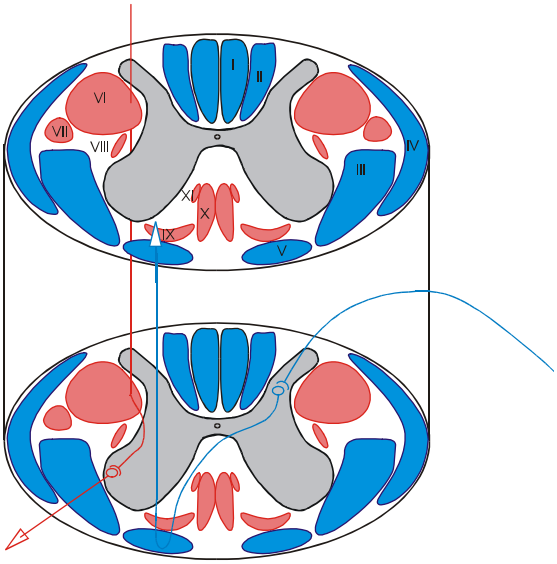

Abbildung 1: schematische Darstellung des Rückenmarks; Gliederung am Beispiel eines Motoneurons (rot) und einer sensiblen Nervenbahn (blau)

Afferente Bahnen:

I:	Fasciculus gracilis
II:	Fasciculus cuneatus
III:	Tractus spinothalamicus lateralis
IV:	Tractus spinocerebellaris
V:	Tractus spinothalamicus ventralis

Efferente Bahnen

VI:	Tractus corticospinalis ventralis
VII:	Tractus rubrospinalis
VIII:	Tractus reticulospinalis
IX:	Tractus vestibulospinalis
X:	Tractus corticospinalis anterior
XI:	Tractus tectospinalis

Zur Kommunikation zwischen dem Gehirn und seiner Peripherie verlassen 31 Nervenpaare das Rückenmark, mit deren Hilfe eine Vielzahl unserer Körperfunktionen gesteuert werden. Die Nervenbahnen dienen unter anderem der Übermittlung von Bewegungsimpulsen und der Steuerung innerer Organe, aber auch der Meldung von sensorischen Impulsen wie Schmerz oder Temperatur und sind maßgeblich am Reflexgeschehen beteiligt.

1.2 Die Rückenmarksverletzung

1.2.1 Der primäre Verletzungsmechanismus

Bei einer Rückenmarksverletzung, die in der Regel mit einer Traumatisierung des knöchernen Bewegungsapparats einhergeht, kommt es unmittelbar im Rahmen des Verletzungsmechanismus zu einem mechanischen Schaden des Rückenmarks. Als Verletzungsfolge ergibt sich je nach Gewalteinwirkung eine Rückenmarks -mazeration (Überdehnung), -lazeration (Schnittverletzung), -kontusion (Quetschung), oder es kommt zum Abriss des Rückenmarks[36].

Abbildung 2*: kernspintomographische Darstellung einer Rückenmarksverletzung mit Wirbelfraktur und bestehender Deformation der Halswirbelsäule

Je nach Schweregrad der Traumatisierung führt die initiale mechanische äußere Gewalteinwirkung zu einem inkompletten bis hin zum kompletten Verlust von Motorik und Sensorik unterhalb der Verletzungsebene. Im Rahmen dieses Verletzungsgeschehens werden die Neurone direkt geschädigt. In Folge dessen, da die verletzten Nervenzellen und Axone des Zentralen Nervensystems im adulten Rückenmark nicht mehr in der Lage sind, sich vollständig zu regenerieren, führt dies zu ihrem Untergang[7,36,63,66]. Ein Kennzeichen für den primären Verletzungsmechanismus ist die äußere Gewalteinwirkung mit ihren darauf häufig folgenden lokalen Deformierungen und einer daraus resultierenden Kompression des Rückenmarks. Um ein Ausdehnen der Rückenmarkschädigung durch die bestehende Kompression zu verringern und die Funktion nicht geschädigter Anteile zu erhalten, wird zum frühest möglichen Zeitpunkt die operative Stabilisierung zur Wiederherstellung der physiologischen anatomischen funktionellen Wirbelsäulenstatik angestrebt. Das operative Vorgehen führt zu einer Entlastung der geschädigten Strukturen, was die Erholung der Funktionen des Rückenmarks erleichtern soll. Ergänzend sollen Spätschäden durch bestehende Instabilitäten unterbunden werden, die zu einer fortschreitenden Beeinträchtigung des Krankheitsbildes führen können[21].

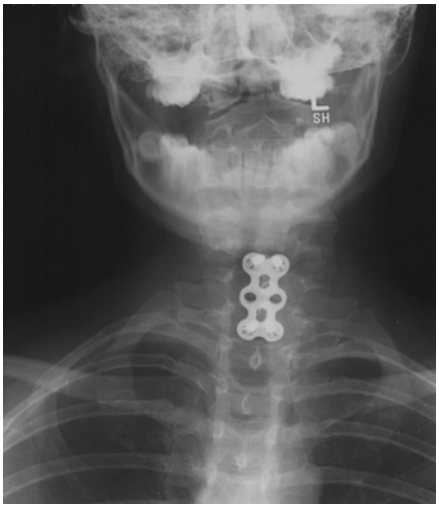

Abbildung 3*:

Abbildung 4*:

röntgenologische Darstellung der operativen Stabilisierung der Wirbelfraktur in zwei aufeinander senkrecht stehenden Abbildungsebenen

* Mein freundlicher Dank gilt Herrn Oberarzt Dr. A. Badke der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen, für die Überlassung des röntgenologischen und kernspintomographischen Bildmaterials.

1.2.2 Der sekundäre Verletzungsmechanismus

Bereits 1911 wurde ein Sekundärmechanismus infolge einer Rückenmarksverletzung, der zum Fortschreiten und zur Ausdehnung der Verletzung führt, beobachtet[66]. Diese Erkenntnis weckte zwangsläufig ein erhöhtes Interesse an der Identifikation dieses Zweitgeschehens nach einer Querschnittsverletzung. Über Jahre hinweg konnten bereits eine Vielzahl von pathophysiologischen Effekten nachgewiesen werden, die aufgrund ihrer engen Verknüpfung miteinander allesamt zur Progression der Verletzung führen. Die gegenwärtige Literatur zeigt deshalb bereits eine Vielzahl von Effekten und Mechanismen im Rahmen des sekundären Verletzungsmechanismus nach einer Rückenmarksverletzung auf. Charakterisiert und identifiziert wurden bisher unter anderem systemische Effekte mit kurzzeitigem Anstieg von Puls und Blutdruck mit anschließend lang anhaltender Depression ebenso ist eine Hypoxie und Hyperthermie zu beobachten[36,74]. Der Verlust der Autoregulation mit einer Reduzierung des Blutflusses und Vasospasmen mit Thrombenbildung, aber auch Blutungen in die graue Substanz des Rückenmarks konnten als lokale vaskuläre Effekte charakterisiert werden[36,74]. Die daraus resultierende Nährstoffminderversorgung des Gewebes trägt zusätzlich zu dessen Untergang bei. Eng mit diesem Geschehen verbunden ist die Entwicklung eines örtlichen Ödems[36,74]. Aufgrund der traumatischen und ischämisch bedingten Zellschädigung kommt es im Rahmen der Sekundärverletzung zu Elektrolytverschiebungen, die durch eine intrazelluläre Erhöhung von Natrium, Kalzium und Kalium gekennzeichnet sind[36,74]. Die massive Glutamatfreisetzung verletzter Neurone führt zur Überdosierung des exzitatorisch wirkenden Neurotransmitters an den noch intakten Synapsen[74,79]. Diese Übererregung führt über weitere Aktivierungskaskaden letztlich zum Zelltod und zum Untergang von primär unverletzten Neuronen[74,79]. Beobachtet wird darüber hinaus die vermehrte Freisetzung von Katecholaminen und Arachidonsäure sowie eine gesteigerte Produktion von Lipidperoxidase und Prostaglandinen[74].

Durch die Schädigung der Zelle können die mitochondrialen Elektronentransportwege beeinträchtigt werden, wodurch es zu einer unkontrollierten und gesteigerten Freisetzung von freien Radikalen kommt, die

die zelleigenen Fähigkeiten der Neutralisation (Superoxid Dismutase, Katalase, Peroxidase, Radikalfänger, Vitamin E und Ascorbin-Säure) übersteigt[66]. Diese hochreaktiven Moleküle tragen bevorzugt an der lipidhaltigen Zellmembran zur Lipidperoxidation mit subsequenter Radikalbildung bei. Dadurch wird die Zelle permeabler und in ihrer Integrität sowie Funktion so stark beeinträchtigt, dass dies zum Funktionsverlust und Absterben der Zelle führt[26,35,74,79]. Die Lipidperoxidation ist ein räumlich fortschreitender Prozess, der auch intakte Zellen ergreift und zerstört. Akut rückenmarksverletzte Patienten bekommen deshalb bis maximal acht Stunden nach dem Trauma eine immunmodulatorisch wirksame, standardisierte Glukokortikoid-Therapie (Methylprednisolon, Urbason®) über 24 Stunden verabreicht. Das hochdosierte (30 mg / kg / Körpergewicht in der ersten Stunde und anschließend 5,4 mg / kg Körpergewicht / Stunde über 23 Stunden hinweg) immunsuppressive Medikament verbessert die neurologische Regenerationsfähigkeit unter anderem durch die Hemmung der Lipidperoxidation, der Entzündung, der Ödembildung und der Ischämie[5,6,16]. Unter rein pathologischer Betrachtungsweise ist ein Abriss des Axolemms durch die Traumatisierung des Rückenmarks zu erkennen[74]. Durch diesen Vorgang schwellen die Axonstümpfe an und degenerieren[74]. Darüber hinaus wird die Myelin-Scheide traumatisiert, aufgrund dessen eine Demyelinisierung der betroffenen Strukturen zu beobachten ist. Dieser insbesondere in caudaler Richtung zu beobachtende Prozess im Rückenmark, lässt sich mit der Waller-Degeneration eines kontinuitätsverletzten peripheren, distalen Nervenstumpfes vergleichen[74]. Unabhängig von dem sich begleitend entwickelnden Sekundärschaden führt die Traumatisierung der empfindlichen Strukturen des Rückenmarks innerhalb weniger Stunden zu einer nekrotisierenden Erweichung mit resultierendem Zelltod des nervalen Gewebes am Läsionsort.

1.3 Die Entzündung

1.3.1 Die allgemeine Entzündungsantwort[12]

Als Reaktion des Organismus entwickelt sich in Folge einer initialen Verletzung eine Entzündung, welche der Beseitigung des auslösenden Reizes und der Wiederherstellung der Integrität der geschädigten Strukturen dient. Insbesondere die im Rahmen des Zweitgeschehens aufflammende Entzündungsantwort auf eine Rückenmarksverletzung spielt aufgrund ihrer differenten Funktionen und der Eigenschaften der beteiligten Zellpopulationen (besonders die der weißen Blutzellen, so genannte Leukozyten) eine entscheidende Rolle, die das neurologische Regenerationspotential, je nach vorherrschender entzündlicher Komponente, maßgeblich beeinflussen kann.

Eine Entzündung ist durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen gekennzeichnet und bedarf einer feinen Abstimmung von entzündungsfördernden und antiinflammatorischen Faktoren. Das komplexe Geschehen einer Entzündung besteht nicht nur aus einer lokalen Reaktion des beeinträchtigten Gewebes, sondern es lassen sich auch eine Vielzahl von systemischen Effekten wie beispielsweise veränderte Syntheseaktivitäten der Leber, plasmatische Veränderungen mit Elektrolytverschiebungen und vermehrter Eiweißkonzentration sowie zelluläre quantitative Veränderungen in Verbindung mit Fieber, Schmerzen und Schockzuständen erkennen. Eine Entzündung zeigt grundsätzlich denselben Ablauf, der sich aus drei ineinandergreifenden Teilprozessen, der Alteration, der Exsudation und der Proliferation, zusammensetzt.

Die Alteration bezeichnet die vaskulären Veränderungen im Laufe einer Entzündungsreaktion, die das Anfluten und eine Infiltration der Leukozyten (Gesamtheit aus Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) erlaubt. Die vermehrte Einschleusung der zellulären Komponenten der Entzündung wird als Exsudationsphase bezeichnet, an deren erster Stelle die Entzündungszellen (Granulozyten und Monozyten) gefolgt von den Effektorzellen (Lymphozyten) stehen.

Die abschließende Proliferationsphase geht dann mit weiterer Zellbesiedlung einher und führt schließlich zur Bildung von Narbengewebe.

1.3.2 Die zellulären Elemente der Entzündungsantwort[12,37]

Eine Vielzahl verschiedener Zellpopulationen wie Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten aber auch Plasmazellen, Fibroblasten und Endothelzellen beteiligen sich am reaktiven Geschehen einer Entzündung.

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der zellulären Reaktion des angeborenen und des erworbenen Immunsystems auf eine Rückenmarksverletzung im Blut, dem vorgeschalteten Kompartiment des Rückenmarks. Dieses Kompartiment stellt das Kontingent für die in die Läsion einwandernden Entzündungszellen dar.

Den angeborenen, entwicklungsgeschichtlich älteren, unspezifischen, primär aktivierten Teil des Immunsystems bilden die Granulozyten und die Monozyten / Makrophagen. Diese Zellen verfügen über die wichtige Funktion zur Aufnahme von Fremd- und Eigenmaterial und mittels lysosomaler Enzyme auch über die Fähigkeit zum Abbau derselben. Dieser Prozess wird als Phagozytose bezeichnet. Darüber hinaus sezernieren die überwiegend neutrophilen Granulozyten und Monozyten am lokalen Entzündungsherd in Folge ihrer Aktivierung so genannte Mediatorsubstanzen, die den weiteren Entzündungsprozess initiieren sowie die Kommunikation und Steuerung zwischen den Zellen gewährleisten.

Den erworbenen, historisch jüngeren adaptiven (spezifischen) Teil der Immunreaktion verkörpern die lymphozytären Zellpopulationen. Die Lymphozyten als die zweitstärkste Population mit nahezu 30% Anteil an den Leukozyten entwickeln sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, die sich dann in einen B-Lymphozyten oder T-Lmyphozyten ausdifferenziert. Die adulten Lymphozyten sind in der Lage, antigene Oberflächenstrukturen zu detektieren und zellspezifisch darauf zu reagieren.

1.4 Die Zellphysiologie des angeborenen Immunsystems

1.4.1 Die Granulozyten[12,37]

Zu Beginn der Entzündung bedarf es zunächst einer Permeabilitätssteigerung der Kapillarwände, um so eine Granulozyteninfiltration in das geschädigte Gewebe zu gewährleisten. Die Funktion der Granulozyten beschränkt sich hierbei nicht nur auf ihre phagozytierende Fähigkeit, sondern auch auf die Möglichkeit der extrazellulären Freisetzung proteolytischer Enzyme, sowie der Sekretion von Mediatoren. Die Granulozytensubpopulationen lassen sich anhand der unterschiedlichen histologischen Anfärbbarkeit ihrer Granula in neutrophile, eosionphile und basophile Zellen unterteilen.

Die Neutrophilen, als zahlenmäßig stärkste Fraktion innerhalb der Granulozytenpopulation, machen ca. 50 bis 70% der Gesamtleukozyten aus und stehen deshalb sofort in großer Zahl zur Verfügung. Sie erreichen bereits in der frühesten Phase der Entzündung als erste inflammatorische Zellen das läsionale Gewebe. Neutrophile setzen neben ihrer vordergründigen Phagozytoseleistung zusätzlich vorwiegend proinflammatorische Zytokine und bioaktive Lipide frei.

Der Anteil der eosinophilen Granulozyten innerhalb der gesamt granulozytären Population wird mit etwa 2% beziffert. Im Vergleich zu den Neutrophilen ist ihre Phagozytoseleistung geringer, dafür verfügen sie aber über eine deutlich ausgeprägtere Syntheseleistung von entzündungsbeeinflussenden Mediatoren. Die Eosinophilen haben eine große Bedeutung aufgrund ihrer Leukotrienproduktion besonders beim Asthma bronchiale als auch beim Schutz vor einer Infektion von nicht phagozytierbaren Mikroorganismen.

Die basophilen Granulozyten stellen mit etwa 0,5% den kleinsten Anteil unter den Granulozyten dar. In ihren Granula sind vorwiegend Histamin und Leukotriene gespeichert, weshalb sie eine zentrale Rolle bei Überempfindlichkeitsreaktionen wie beispielsweise bei der allergischen Rhinitis einnehmen.

Die aufgrund eines Reizes hervorgerufene physiologische Rekrutierung der vorwiegend neutrophilen Granulozyten dient zunächst der notwendigen

Entfernung von Zelltrümmern sowie der Säuberung der verletzten Region, das als Voraussetzung für die Wundheilung angesehen wird.

1.4.2 Die läsional parenchymale Granulozytenantwort nach einer Rückenmarksverletzung

Die Neutrophilen sind die Zellen, die am frühesten am Läsionsort anzutreffen sind. Sie beginnen nekrotisches Material abzubauen und die weiteren Entzündungsreaktionen zu initiieren. Die Freisetzung von Mediatoren bewirkt eine erhöhte Expression von endothelialen Adhäsionsmoleküle für Leukozyten. Die sich daraufhin anhaftenden neutrophilen Granulozyten können auf diese Weise zum progressiven Endothelschaden beitragen[73]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die neutrophilen Granulozyten im Rahmen ihres „respiratory burst“ freie Radikale ausschleusen, die unter dem Einfluss der Myeloperoxidase die Lipidperoxidation von neuronalen und glialen Zellmembranen sowie Myelin weiter vorantreiben[8,63].

Zusätzlich verfügen die Neutrophilen über zellschädigende Elastase, die zum Erweichen der umgebenden zellulären Strukturen führt[72].

Die Einschleusung der Granulozyten dient wie beschrieben anfänglich der physiologischen Reinigung der verletzten Strukturen. Fatalerweise führt die Anheftung, die Produktion der freien Radikale und Sekretion der Elastase von den Neutrophilen jedoch auch zu einer progressiven Verschlechterung und Ausdehnung der initialen Verletzungsfolge im Rahmen des Sekundärschadens nach einer Rückenmarksverletzung.

1.4.3 Die Monozyten[12,37]

Die Monozyten, aus derselben Vorläuferzelle wie die Granulozyten hervorgehend, stellen mit etwa 5% die drittgrößte Population der Leukozyten im Blut dar. Sie übertreffen die Phagozytoseleistung der oben beschriebenen neutrophilen Granulozyten um ein Vielfaches. Ist das zu phagozytierende Objekt zu groß, so können die Monozyten mittels zytotoxischer Substanzen das

Material zerkleinern und beseitigen. Die sich im Reifungsprozess befindlichen Monozyten gelangen nach ihrer Synthese aus dem Knochenmark ins Blut, wo sie für zwei bis drei Tage im Kreislauf zirkulieren. Nach ihrem Aufenthalt im hämatologischen Kompartiment wandern die Monozyten bevorzugt in geschädigtes Parenchym ein, um sich dort zum adulten ortsständigen Makrophagen auszudifferenzieren. Im ZNS werden sie dann als Mikroglia bezeichnet.

Die vielfältigen Eigenschaften der Monozyten / Makrophagen ergeben sich unter anderem aus der Antigenpräsentation auf ihrer Zelloberfläche, der Phagozytose und der weitläufigen Produktion und Sekretion einer hohen Anzahl von Mediatoren. Von den morphologisch größten Zellen werden beispielsweise Zytokine, Zytokininhibitoren, Enzyme, Koagulationsfaktoren, Komplementkomponenten, reaktive Sauerstoffmetaboliten, Arachidonsäure-Stoffwechselprodukte und Plasmaproteine freigesetzt.

Damit nehmen die Monozyten / Makrophagen direkten und indirekten Einfluss auf eine beachtliche Reihe von entzündungsmodulatorischen Faktoren. So wird auf Mikroorganismen durch Phagozytose und durch die Freisetzung von Mediatoren auf die Immunmodulation Einfluss genommen. Mit Hilfe der einsprossenden Revaskularisierung und Fibroblastenaktivierung vermitteln die Monozyten / Makrophagen die Gewebereparatur, sowie mit den von ihnen freigesetzten Sekreten die Wundheilung. Die Beeinflussung der Hämostase geschieht mittels der sezernierten Koagulationsfaktoren. Eine entscheidende Aufgabe übernimmt diese Entität durch Autoantigenpräsentation im Rahmen von Autoimmunprozessen.

Die Monozyten / Makrophagen mit ihrer hohen Phagozytose- und Sekretionskapazität sind deshalb unverzichtbar für die Wiederherstellung der Integrität von verletztem Gewebe. Sie stellen das Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort dar, da sie in der Lage sind, nicht nur über Mediatoren die Zellen der adaptiven Immunreaktion zu aktivieren, sondern ihnen gleich ein Antigen auf der Zelloberfläche zu präsentieren.

1.4.4 Die läsional parenchymale Monozytenantwort nach einer Rückenmarksverletzung

Die Monozyten lösen gemäß dem allgemeinen Entzündungsverlauf die Granulozyten in der Läsion ab, um dort für das weitere Abräumen von Zelltrümmern und die Reinigung der Läsion zu sorgen[4,8,15,61].

Ein Teil ihrer ausgeschleusten Sekrete, wie TNFα (Tumor Nekrose Faktor alpha) und IL-1 (Interleukin-1), die im Rahmen der Entzündung produziert und sezerniert werden, haben eine gewebsschädigende Wirkung auf Neurone, Glia und Myelin des Rückenmarks[1,4,23,52]. Dadurch ist ein weiterer Zelluntergang und eine fortschreitende Demyelinisierung zu beobachten, die die nekrotisierende Aushöhlung und fortschreitende Phagozytose von anfallendem Zellschrott weiter vorantreibt[18].

Eine bei den Granulozyten vorkommende Fähigkeit, hochreaktive Sauerstoffradikale freizusetzen, ist auch bei den Monozyten / Makrophagen bekannt[8,62]. Die freien Radikale treiben ihrerseits die Lipidperoxidation von Zellmembranen weiter voran. Mit diesen Eigenschaften beteiligen sich die am stärksten phagozytierenden Zellen am progressiv destruierenden Sekundärprozess nach einer Rückenmarksverletzung[52].

Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungsergebnisse, die besagen, dass aktivierte Monozyten / Makrophagen einen Beitrag zur Regeneration von verletzten Strukturen des Rückenmarks leisten können[50,63,65]. Beispielsweise das von aktivierter Mikroglia freigesetzte Plasminogen und TGF-β1 (Transforming Growth Factor β1) können dem Überleben von neuronalem Gewebe dienen[11].

Zusätzlich sind Makrophagen in der Lage, eine Vielzahl von Mitgliedern der NGF (Nerve Growth Factor) Familie selbst zu sezernieren und überdies nicht neuronale Zellen zur Produktion derer anzuregen[63].

Die physiologische Rekrutierung der stark phagozytierenden Monozyten ist für die Reinigung des Entzündungsherdes als Vorbereitung zur Wundheilung unerlässlich[22]. Unglücklicherweise üben manche Sekrete eine zelltoxische Wirkung auf die nervalen Strukturen aus, weshalb es zur Vergrößerung des ursprünglichen Schadens kommt.

Aufgrund der Mediatorenfreisetzung und der Antigenpräsentation durch die Zellen des unspezifisch phagozytierenden Systems kommt es im Verlauf der Entzündung unvermeidbar zur Aktivierung der adaptiven lymphozytären Immunantwort.

1.5 Die Zellphysiologie des adaptiven Immunsystems

1.5.1 Die B-Lymphozyten[37]

Die B-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet und reifen nach Stimulation durch Zytokine zur adulten, antikörperproduzierenden und immunkompetenten Zellpopulation heran.

Die B-Zellen erkennen Antigene durch deren Bindung an die Oberflächenimmunglobuline. Die Detektion eines Antigens veranlasst den B-Lymphozyten zur Proliferation und zur Produktion des Antikörpers und zu dessen Freisetzung (humorale Antwort).

Der sezernierte spezifische Antikörper bindet sich daraufhin an sein entsprechendes Antigen, um mit Hilfe des Komplementsystems den Antigen-Antikörper-Komplex zu eliminieren.

Die B-Lymphozyten produzieren durch somatische Hypermutation eine enorm große Vielfalt an Antikörpern gegen körperfremdes und autologes Gewebe, wobei fünf Klassen von Antikörpern, so genannte Immunglobuline (Ig), unterschieden werden: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE.

Alle diese Immunglobuline setzen sich aus vier Polypeptidketten zusammen, wobei man eine variable Region (spezifische Antigenbindungsstelle) von einer konstanten Region unterscheidet. Innerhalb der letzteren Domäne liegt das kristallisierbare Fragment, aufgrund dessen es zu einer unspezifischen Bindung des Antikörpers kommen kann.

1.5.2 Die läsional parenchymale B-Lymphozytenantwort nach einer Rückenmarksverletzung

Mit der Infiltration der B- und T-Lymphozyten in die verletzte Region des Rückenmarks werden antigenwirksame Myelinstrukturen von den B-Zellen erkannt, was mit der Aktivierung der Zelle einhergeht. Die B-Lymphozyten werden gemeinsam mit den T-Lymphozyten aktiviert, da die T-Zellen auf die Antigenpräsentation durch die B-Zellen angewiesen sind. Nach einer Rückenmarksverletzung produzieren und sezernieren die B-Lymphozyten Autoantikörper beispielsweise gegen Myelin-assoziiertes-Glykoprotein (anti-MAG) oder gegen Ganglioside (anti-GM1)[32]. Durch zusätzliche Antigenpräsentation auf ihrer Oberfläche kommt es zur verstärkten Aktivierung der T-Lymphozyten, welche wiederum die B-Zellen zur weiteren Antikörperproduktion stimulieren. Autoantikörper gegen das Glykoprotein führen zur fortschreitenden Demyelinisierung, wie sie aus Multiple-Sklerose-Studien bekannt ist[19,20,67,75]. Das autoreaktive Immunglobulin gegen das Gangliosid führt zusätzlich zu einer Störung der Ionenleitfähigkeit der neuronalen Strukturen[33,60,71,77]. Aufgrund der Sezernierung von Autoantikörpern und der Präsentation von körpereigenen antigenen Strukturen können die B-Lymphozyten den Sekundärschaden weiter ausweiten.

1.5.2 Die T-Lymphozyten[37]

Die T-Zell-Populationen erfahren ihre Ausreifung im Thymusgewebe und dominieren mit etwa 70% den Lymphozytenpool. Sie sind zum einen für das Abtöten der antigenpräsentierenden Zellen, zum anderen für die Aktivierung weiterer Immunreaktionen verantwortlich.

Nach der Aktivierung der T-Lymphozyten durch antigene Strukturen erfahren diese eine weitere Differenzierung in zytotoxische T-Lymphozyten und in so genannte T-Helferzellen, aus denen sich T-Gedächtniszellen und je nach vorherrschendem Zytokinmillieu sich eine T_H1- oder T_H2- Zelle entwickelt (zelluläre Antwort).

Die zytotoxische Wirkung wird durch die Ausschüttung lytischer Granula erzielt, die in der Zielzelle den programmierten Zelltod auslöst.

Unter anderem zur Vermeidung der Eigenschädigung von gesundem autologem Gewebe erfahren die T-Lymphozyten im Verlauf ihrer Entwicklung die so genannte klonale Selektion. Dieser Prozess eliminiert die T-Zellen, die sich gegen die körpereigenen Strukturen richten.

Die T_H1-Zellen vermitteln über eine weitere Makrophagenaktivierung sowie durch die Sekretion zusätzlicher Mediatoren das Aufrechterhalten der Entzündungsreaktion.

Die T_H2-Zellen sind wichtig, weil sie die B-Lymphozyten zu weiterer Antikörperproduktion anregen und zusätzlich eine Vielzahl von Interleukinen produzieren, welche die proinflammatorische Wirkung der T_H1-Lymphozyten unterdrücken können.

Die gesamten T-Zell-Subpopulationen sind aufgrund der Ausschleusung ihrer Produkte in der Lage miteinander zu kommunizieren, um sich gegenseitig zu initiieren oder zu subprimieren.

Die T-Lymphozyten benötigen, um das Antigen zu erkennen, die Hilfe so genannter Antigen präsentierender Zellen. Diese Zellen bieten antigene Strukturen auf ihrer Zelloberfläche in Assoziation mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) dar. Aufgrund der zelldestruierenden Komponente und der Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren erfüllen die T-Lymphozyten sowohl Aufgaben der zellulären als auch der humoralen Immunantwort.

1.5.4 Die läsional parenchymale T-Lymphozytenantwort nach einer Rückenmarksverletzung

Gemäß dem zeitlichen Verlauf der Entzündungsreaktion wandern die Lymphozyten angelockt durch Monozyten / Makrophagen in den Verletzungsherd ein, wo sie akkumulieren, um ihre zytotoxischen und immunregulatorischen Aufgaben wahrzunehmen[34,57].

Nach einer Rückenmarksverletzung, die in der Mehrzahl der Fälle eine aseptische Verletzung darstellt, werden den Antigenrezeptoren der T-

Lymphozyten durch die MHC-Komplex tragende Zellpopulation körpereigene Zellfragmente präsentiert, weshalb autoaggressive T-Zellen aktiviert werden können. Darüber hinaus ist bekannt, dass nicht alle autoreaktiven T-Lymphozyten eliminiert werden, so dass ein kleiner Teil von ZNS reaktiven T-Lymphozyten sowie gegen basisches Myelin Protein (MBP) gerichtete reaktive T-Zellen auch im gesunden Organismus existieren[40,55]

Die aktivierten autoreaktiven T-Lymphozyten sind in der Lage, die Monozyten / Makrophagen direkt mit Hilfe sezernierter Zytokine zu beeinflussen, weshalb ihnen eine destruierende Komponente mit Axonschädigung, Demyelinisierung und folglich erweitertem Funktionsverlust nachgewiesen werden konnte[29,38,55]. Autoreaktive, läsionale T-Lymphozyten weisen zusätzlich eine neuroprotektive, jedoch insuffiziente Funktion auf, die den Sekundärschaden eindämmen können[28,45,64,78].

1.6 Die Zellphysiologie der Antigen präsentierenden Zellen

1.6.1 Der MHC-Komplex[37]

Sämtliche Reaktionen der T-Lymphozyten sind auf die Wechselwirkungen mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex der Zielzelle zurückzuführen. Die T-Zellen erkennen ihre Zielzelle nur durch die Präsentation von antigenen Peptidfragmenten, die in einem neusynthetisierten MHC-Molekül verankert und auf der Membranoberfläche von Antigen präsentierenden Zellen dargeboten werden. Das MHC-Molekül wird vorwiegend auf der Oberfläche von B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen zur Antigenpräsentation exprimiert. Nach der Detektion einer Antigen präsentierenden Zelle durch einen T-Lymphozyt wird dieser aktiviert, um seine biologische Funktion entfalten zu können.

Das MHC-Molekül ist in zwei unterschiedlichen Formen bekannt. Die zytotoxischen T-Lymphozyten gehen überwiegend mit dem MHC I-Komplex, auf dessen Oberfläche antigene Proteinfragmente aus dem Zytosol präsentiert werden, eine Bindung ein. Die Ausschüttung zelllytischer Substanzen der

zytotoxischen T-Zelle verursacht daraufhin eine Schädigung der Zellmembran, womit diese Zelle abgetötet wird.

Die T_H1- und T_H2- Zellen erkennen den aus intrazellulären Vesikeln stammenden Antigenfragmente präsentierenden MHC II-Komplex. Die Bindung der T_H1- und T_H2- Lymphozyten an den MHC II-Komplex bewirkt daraufhin eine zusätzliche Aktivierung von Makrophagen und B-Lymphozyten.

1.6.2 Die läsional parenchymale Antwort der MHC II^+-Population nach einer Rückenmarksverletzung

Nach einer Rückenmarksverletzung kommt es aufgrund des proinflammatorischen Mikromilieus zur vorwiegend in B-Lymphozyten, Makrophagen und Mikroglia vermehrten Neusynthese von MHC II-Molekülen und deren Verankerung auf der Zelloberfläche. Die erhöhte Expression der MHC-Moleküle dient als Aktivierungssignal für weitere Entzündungszellen und wird als Indikator für die Aktivität der zellulären immunologischen Kompetenz angesehen.

Aufgrund der Tatsache, dass Myelindebris und Makrophagen für lange Zeit am Verletzungsort persistieren[63], ist davon auszugehen, dass vergleichbar mit der autoreaktiven Multiplen-Sklerose, die erhöhte Expression der MHC II-Moleküle die progressive Demyelinisierung und Verletzungsausdehnung durch Aktivierung der Myelin reaktiven T-Lymphozyten weiter vorantreibt[55].

Die direkte Antigenpräsentation für naive und ZNS-Antigen-spezifische-T-Lymphozyten kann die Expansion der autoreaktiven T-Zellen veranlassen und somit den Beginn einer Autoimmunerkrankung charakterisieren[55]. Für die Entwicklung einer T-Zell vermittelten Autoimmunreaktion stellt somit die MHC-Komplex tragende Zellpopulation einen essentiellen Faktor dar.

1.6.3 Die dendritischen Zellen[37]

Die dendritischen Zellen gehen aus derselben Vorläuferzelle hervor wie die Monozyten, weshalb sie zum mononukleären Differenzierungszweig gerechnet werden. Die sich im Blut befindlichen dendritischen Zellen stellen, den Monozyten ähnlich, eine noch nicht voll ausdifferenzierte Population dar. Sie weisen eine hohe Motilität auf, und man findet sie nach dem Auswandern aus dem Gefäßsystem in allen Organen. Im ZNS sind sie phänotypisch mit der Mikroglia zu vergleichen[17].

Die dendritischen Zellen, mit ihrem 0,5% Anteil an den monozytären Populationen, können stärker als die Monozyten und B-Lymphozyten die naiven T-Lymphozyten zur Proliferation anregen.

1.6.4 Die läsional parenchymale Antwort der dendritischen Zellen nach einer Rückenmarksverletzung

Die dendritischen Zellen wandern angelockt durch die Entzündungsmediatoren in die verletzte Region ein. Insbesondere die noch unreifen dendritischen Zellen sind in hohem Maß zur Phagozytose befähigt. In Anwesenheit von Zytokinen und nekrotischem Gewebe differenziert sich die jugendliche dendritische Zelle zur adulten Zelle aus. Die reife dendritische Zelle erhöht sehr stark ihre Expression des MHC-Komplexes auf ihrer Zelloberfläche, so dass ihr eine potente Funktion bei der Antigenpräsentation zukommt.

Sie bieten naiven und bereits Antigen-spezifischen-T-Lymphozyten Autoantigene an, welche die T-Zell vermittelte Demyelinisierung weiter ausdehnt[10,48].

1.7 Die Zellphysiologie der Semaphorine

1.7.1 Das Semaphorin 4D

Zur Familie der Semaphorine werden Proteine gezählt, die an ihrem Aminoende eine konservierte Sequenz von 500 Aminosäuren (vorwiegend Cystein), der so

genannten Sema-Domäne, aufweisen. Durch die Identifikation zusätzlicher Aminosäuren innerhalb des Proteins teilen sich die Semaphorine in acht Klassen auf. Ihre Wirkung üben sie als transmembranöse Proteine vor Ort, beziehungsweise als lösliche sezernierte Moleküle über eine größere Entfernung, aus[39,43,46,49].

Die Semaphorine sind zur Axonlenkung befähigt und übernehmen als so genannte „Guidance“-Moleküle eine wesentliche Rolle bei der embryonalen Entwicklung neuronalen Gewebes. Sie üben ihre Wirkung einerseits über Axon anziehende, andererseits auch Axon abstoßende Effekte aus, um den embryonalen proliferativen Nervenstumpf in die entsprechende Richtung zu lenken[46,49]. Im erwachsenen Nervensystem werden die Guidance-aktiven Moleküle dann im Gleichgewicht zwischen wachstumshemmend und wachstumsfördernd gehalten[49].

Zusätzlich zur Aufgabe bei der neuronalen Embryogenese wird Semaphorinen eine Rolle bei der Angiogenese, Vaskularisation sowie beim Fortschreiten von Karzinomen zugeschrieben[39].

Darüber hinaus ist das Semaphorin 4D (Sema 4D), synonym zum humanen CD 100, als einziges bisher bekanntes humanes „Guidance“-Molekül in der Lage, das Immunsystem zu beeinflussen[13,39,43,69]. Der transmembranöse Oberflächenmarker (Sema 4D) wird innerhalb der hämatogenen Populationen überwiegend auf T-Lymphozyten, schwach auf B-Zellen, Monozyten und Granulozyten exprimiert[27,39,68,69].

1.8 Das Studienziel

Der wachsende Anteil rückenmarksverletzter Patienten sowie die Erforschung der vielfältigen, jedoch insuffizienten Reparationsprozesse im Rahmen der Zweitverletzung, weckt Interesse und Hoffnung auf eine mögliche neuroregenerative Therapie.

Insbesondere die Entzündung, die sich im Rahmen des Sekundärschadens aufgrund der mechanischen Traumatisierung mit ihrer angeborenen und adaptiven Immunantwort einstellt, dient in ihrem physiologischen Ursprung der Wiederherstellung der Integrität des Organismus. Im Gegensatz dazu können die bei einer Entzündung beteiligten Zellen, wie in den Kapiteln 1.4 bis 1.7 beschrieben, den entstandenen Schaden weiter ausdehnen. Aufgrund der proregenerativen Eigenschaften auf der einen Seite, aber auch der neurodegenerativen Komponente der Entzündung nach einer Rückenmarksverletzung, nimmt das inflammatorische Geschehen im Rückenmark eine Schlüsselrolle ein, die die neurologische Regenerationsfähigkeit maßgeblich beeinflussen kann.

Die Prozesse des Entzündungsgeschehens nach einem Rückenmarkstrauma wurden bisher stets im Parenchym identifiziert und charakterisiert, wohingegen Daten über das Immungeschehen, das dem Rückenmark vorgeschalteten Kompartiment, dem Blut, fehlen. Darüber hinaus konnte der Beitrag der involvierten Zellen in der inflammatorischen Pathophysiologie noch nicht vollständig identifiziert und charakterisiert werden.

Diese Studie dient deshalb der Erarbeitung einer pathophysiologischen Grundlage der zellulären, hämatologischen Entzündungsreaktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems nach einer Rückenmarksverletzung im Blut. Die Untersuchung ermittelt hierzu qualitativ und quantitativ die maßgeblich beteiligten Entzündungs- und Effektorzellen, welche zur Visualisierung ihrer Zeitkinetik als Longitudinaldiagramm aufgetragen wurden.

Zur Identifikation von spezifischen Unterschieden in der Immunreaktion sowie zur Ermittlung der unbeeinflussten, physiologisch ablaufenden Entzündungsantwort im Blut wurden die Untersuchungen mit dem Vollblut von rückenmarksverletzten Patienten und dem Vollblut des

interventionszugänglichen Tiermodells (Ratte) durchgeführt. Unser Studiendesign erlaubt es, mögliche Rückschlüsse und Vergleiche zwischen den Spezies verifizieren zu können.

Die vorliegende Arbeit soll damit zum verbesserten Verständnis der Immunreaktion und ihrer Pathophysiologie im Blut nach einer Rückenmarksverletzung beitragen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, aufgrund der pharmakologisch guten Modulierbarkeit der Leukozytenpopulationen, die gewonnen Daten als Grundlage für die Erarbeitung zukünftiger sicherer und effektiverer pharmakologischer Therapiedesigns zu verwenden.

2 Material

2.1 Material für die klinische Studie der zellulären Entzündungsantwort des Patienten nach einer Rückenmarksverletzung

2.1.1 Einmalartikel

5 ml FACS-Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson / Deutschland
9 ml NH_4-Heparin-Monovette	Sarstedt AG & G / Deutschland
Punktionssystem zur Blutentnahme:	
Microflex 246.08	Vygon / Frankreich
Monovettenmultiadapter	Sarstedt AG & G / Deutschland

2.1.2 Reagenzien

Optilyse B Lysing Solution	Immunotech / Frankreich
PBS Dulbecco`s w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} (phosphat bufferet saline)	Gibco / Frankreich
Histopaque-1077	Sigma Aldrich / Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck / Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco / Frankreich

2.1.3 Geräte

FACScan (Flow Cytometer)	Beckton Dickinson / Deutschland
Zentrifuge GR422	Jouan / USA

2.1.4 FITC konjugierte spezifische Antikörper zur Detektion der hämatogenen Leukozytensubpopulationen des Patienten

Antigen	Antikörper	Spezifität	Quelle
CD 3	SK7 IgG_1 Maus monoklonal	Reagiert mit der Epsilon-Kette des CD3-Antigenrezeptor-**T-Zellen**-Antigenrezeptor-(TCR-) Komplexes	BD* Biosciences / Deutschland
CD 14	MϕP9 IgG_{2b} Maus monoklonal	CD14-Antigen ist auf der Mehrzahl normaler **Monozyten** aus dem peripheren Blut vorhanden. Reagiert schwach mit Granulozyten aus dem peripheren Blut.	BD* Biosciences / Deutschland
CD 15	MMA IgM Maus monoklonal	CD15-Antigen ist auf 95% reifer **Neutrophile und Eosinophile** aus dem Blut und in niedriger Anzahl auf zirkulierenden Monozyten vertreten. Reagiert mit der Lakto-N-Fucopentose III des myelom-monozytären Antigens der Zellen	BD* Biosciences / Deutschland
CD 19	SJ25C1 IgG_1 Maus monoklonal	CD19-Antigen ist auf 7-23% aller Lymphozyten im peripheren Blut sowie auf Splenozyten vorhanden. Ist auf humanen **B-Lymphozyten** aller Reifestadien exprimiert, fehlt bei ausdifferenzierten Plasmazellen. Nicht vorhanden auf T-Lymphozyten, Granulozyten oder Monozyten	BD* Biosciences / Deutschland
CD 45	2D1 IgG_1 Maus monoklonal	Reagiert mit allen humanen **Leukozyten**	BD* Biosciences / Deutschland
CD 100	A8 IgG_1 Maus monoklonal	Reagiert schwach mit ruhenden **T-Zellen**, stark mit PHA-stimulierten T-Zellen, Natürlichen **Killerzellen**, EBV infizierten B-Zellen, **Monozyten** und Tumorassoziierten-T-Zell-Linien	BD* PharMingen / Deutschland
MHC II	EDU-1 IgG_{2b} Maus monoklonal	Reagiert vor allem mit **B-Zellen**, **Monozyten** und **Dendritischen Zellen**	Biosource International / Deutschland

Tabelle 1: *: BD = Becton Dickinson

2.1.5 FITC konjugierte spezifische Antikörper der Isotyp-Kontrolle

Isotyp	Antikörper (Klon)	Quelle
Mouse IgG_{2b}	MPC-11	Coulter Corporation / USA
Mouse IgG_1	2T8-2F5	Coulter Corporation / USA
Mouse IgM	R4A3-22-12	Coulter Corporation / USA

Tabelle 2:

Diese Isotyp-Antikörper wurden in der klinischen Studie, zur Detektion und Quantifizierung einer möglichen unspezifischen Bindung eingesetzt.

2.1.6 Patienten

Im Rahmen der von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen genehmigten Studie wurde von 16 rückenmarksverletzte (SCI = Spinal Cord Injury) Patienten (n=16) die auf das Trauma folgende Immunreaktion im Blut untersucht. Bei einer Studiendauer von mehr als einem Jahr betrug der maximale Beobachtungszeitraum eines Patienten 136 Tage. Das Verletzungsspektrum (s. Anhang 7.1) liegt bei einer Verletzungshöhe zwischen dem fünften Halswirbelkörper und dem ersten Lendenwirbelkörper. Zur Charakterisierung der angeborenen sowie der adaptiven Entzündungsantwort wurden pro Patient maximal fünf periphere Vollblutproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen. Patienten mit einem bevorstehenden elektiven Eingriff am Bewegungsapparat stellen die Kontrollgruppe (n=10) dar (s. Anhang 7.2). In dieser Gruppe erfolgte die Blutentnahme einmalig im Rahmen der operationsvorbereitenden anästhetischen Maßnahmen. Das gesamte Patientengut stellte uns die Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen zur Verfügung.

2.2 Material für die tierexperimentelle Studie der zellulären Entzündungsantwort im Blut der Ratte nach einer Rückenmarksverletzung

2.2.1 Medikamente und Reagenzien für die operative Hemitranssektion des Rückenmarks der Tiere

Amynin (Elektrolytlösung)	Merial GmbH / Deutschland
Oculotect Gel (Augengel)	Ciba Vision / Deutschland
Ethanol 70% (Desinfektion)	Merck / Deutschland
Diethyläther (Inhalationsnarkose)	Sigma/Aldrich / Deutschland
Ketanest 50 mg/ml (Ketaminhydrochlorid; Injektionsnarkotikum)	Parke Davis GmbH / Deutschland
NaCl 0,9% (Spülung, Verdünnung)	Fresenius / Deutschland
Ringer-Lactat-Infusionslösung (Volumensubstitution)	Braun / Deutschland
Rompun 2% (Xilacylhydrochlorid; Injektionsnarkotikum)	Bayer Vital / Deutschland
Temgesic 0,3 mg/ml (Buprenorphinhydrochlorid; Schmerzbehandlung)	Essex Pharma GmbH / Deutschland
ETHICON Vicryl 4,0 (Nahtmaterial)	Ethicon GmbH / Deutschland
SUGI-steril 31601 (sterile Saugkeile zur Blutstillung)	Keltenbach / Deutschland

2.2.2 Einmalartikel

5 ml FACS-Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson / Deutschland
9 ml NH_4-Heparin-Monovette	Sarstedt AG & G / Deutschland
Punktionssystem zur Blutentnahme:	
Braunüle 20 G	Braun AG / Deutschland
Monovettenmultiadapter	Sarstedt AG & G / Deutschland

2.2.3 Reagenzien

PBS Dulbecco`s w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} (phosphat bufferet saline)	Gibco / Frankreich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich / Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco / Frankreich
PharmLyse Ammonium Chloride Lysing Reagent	BD PharMingen / Deutschland
Substanz A & B der FIX & PERM-Lösung	An der Grub / Österreich
Histopaque-1077	Sigma Aldrich / Deutschland
Dimethylsufoxid (DMSO)	Merck / Deutschland
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Gibco / Frankreich

2.2.4 Geräte

FACScan (Flow Cytometer)	Beckton Dickinson / Deutschland
Zentrifuge GR422	Jouan / USA

2.2.5 FITC konjugierte spezifische Antikörper zur Detektion der hämatogenen Leukozytensubpopulationen der Ratte

Antigen	Antikörper	Spezifität	Quelle
CD 3	IF4 IgM Maus monoklonal	Reagiert mit reifen **T-Lymphozyten**	Serotec über BIOZOL / Deutschland
CD 45 RA	MRC OX-33 IgG_1 Maus monoklonal	Reagiert mit dem Leukozyten-Common-Antigen auf **B-Lymphozyten**	Serotec über BIOZOL / Deutschland
CD 45	MRC OX-1 IgG_1 Maus monoklonal	Reagiert mit dem Leukozyten-Common-Antigen der **Leukozyten**	Serotec über BIOZOL / Deutschland
HIS 48	HIS 48 IgM Maus monoklonal	Reagiert mit allen **Granulozyten**	BD* PharMingen / Deutschland
ED 1	ED1 IgG_1 Maus monoklonal	Reagiert mit der lysosomalen Membran von **Myeloid-Zellen**, sowie mit der Mehrzahl von Gewebemakrophagen und schwach mit Blut-Granulozyten	Serotec über BIOZOL / Deutschland
MHC I-A	OX-6 IgG_1 Maus monoklonal	Reagiert mit **B-Lymphozyten**, **Dendritischen Zellen** und **Makrophagen**	Serotec über BIOZOL / Deutschland
dendritische Zellen	OX-62 IgG_1 Maus monoklonal	Reagiert mit **dendritischen Zellen** und gamma deltaT-Zellen	Serotec über BIOZOL / Deutschland

Tabelle 3: *: BD = Becton Dickinson

2.2.6 FITC konjugierte spezifische Antikörper der Isotyp-Kontrolle

Isotyp	Antikörper (Klon)	Quelle
Mouse IgG_{2b}	MPC-11	Coulter Corporation / USA
Mouse IgG_1	2T8-2F5	Coulter Corporation / USA
Mouse IgM	R4A3-22-12	Coulter Corporation / USA

Tabelle 4:

Diese Isotyp-Antikörper wurden in der tierexperimentellen Untersuchung zur Detektion und Quantifizierung einer möglichen unspezifischen Bindung eingesetzt.

2.2.7 Tiere

Für den experimentellen Teil der Studie wurde das Blut von insgesamt 28 männlichen Lewis-Ratten der Firma Harlan / Niederlande mit einem Gewicht zwischen 230 bis 350 g und einem Alter von etwa acht bis zehn Wochen untersucht. Die manuelle Rückenmarksverletzung (SCI = Spinal Cord Injury) wurde bei den SCI-Tieren (n=23) nach Entfernung des dorsalen Wirbelbogens mittels Hemitranssektion durchgeführt. Bei den Kontrolltieren (n=5) wurde lediglich die hintere Laminektomie vollzogen. In beiden Gruppen erfolgte jeweils die Operation auf Höhe des 8. Brustwirbelkörpers. Von jedem Tier konnte daraufhin am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt eine Vollblutprobe mittels Herzbeutelpunktion entnommen werden.

3 Methoden

3.1 Zeitpunkte der Blutabnahme beim Patienten und bei den Tieren

Um den dynamischen Verlauf der angeborenen und adaptiven Immunantwort zu erfassen, wurde die Entzündung mit ihren unterschiedlichen Phasen zu den unten aufgeführten Untersuchungszeitpunkten erfasst.

	Mensch	**Ratte**
akute Phase der Entzündung	Unfalltag n_h=5 3-4 d. p. SCI n_h=8	1 d. p. SCI n_t=5 3 d. p. SCI n_t=5
subakute Phase der Entzündung	6-8 d. p. SCI n_h=10	7 d. p. SCI n_t=5
Chronische Phase der Entzündung	25-30 d. p. SCI n_h=8 105-126 d. p. SCI n_h=7	14 d. p. SCI n_t=7

Tabelle 5: n_h: Anzahl der untersuchten humanen Proben
n_t: Anzahl der untersuchten Tiere
d. p. SCI: days post Spinal Cord Injury

3.2 Probengewinnung und Verarbeitung des Patientenvollblutes

3.2.1 Blutentnahme beim Patienten

Die periphere Venenpunktion mit einer 9 ml NH_4-Heparin-Monovette zur Antikoagulation erfolgte bei rückenmarksverletzten Patienten sowie bei den Kontrollpatienten stets nach Rücksprache und Einwilligung des Patienten im Rahmen der anästhetischen Operationsvorbereitung, so dass keine zusätzliche Punktion erforderlich war. Zusätzlich erfolgte eine Blutabnahme bei den SCI-Patienten an den routinemäßig durchgeführten Laborkontrollen.

Das gewonnene Material wurde anschließend dem Institut für Hirnforschung, Tübingen, zur Bestimmung der zellulären Immunantwort zur Verfügung gestellt und dort weiterverarbeitet.

3.2.1 Isolierung der humanen Leukozyten und Inkubation mit dem zellspezifischen Antikörper

Das Vollblut wurde entsprechend der Anzahl der Antikörper zuzüglich der entsprechenden Kontrollen in Becton Dickinson Rundbodenröhrchen zu jeweils 100 µl je Probenröhrchen aufgeteilt. Anschließend erfolgte nach der Zugabe von jeweils 10 µl der unverdünnten Antikörperreagenzien eine 15-minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Für ein deutlicheres Analyseergebnis empfiehlt es sich, die Erythrozyten zu lysieren. Hierfür wurden zu jedem Probenansatz 100 µl Optilyse B Lysing Solution von Immunotech / Coulter hinzugegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Optilyse B zeigte gegenüber anderen Lyse-Verfahren die vollständigste Lysierung der Erythrozyten.

Nach Zugabe von 1 ml Aqua dest. und einer weiteren 15-minütigen Inkubation erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit 2 ml PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} und Zentrifugation bei 250 g für 10 Minuten. Für die FACS-Analyse wurde das Zellpellet anschließend in 500 µl PBS aufgenommen und resuspendiert. Für die

FACS-Analyse ist ein gründliches vortexen der hergestellten Zellsuspension direkt vor jeder Messung nötig.
Für mögliche weitere Fragestellungen konnten in der Mehrzahl der Blutproben das Serum (konserviert bei –20 °C) und die mononukleären Zellen (separiert mit Histopaque und durch Zugabe von FCS und DMSO im Verhältnis 1:9 in flüssigen Stickstoff konserviert) vom überschüssigen Vollblut gewonnen werden.

3.3 Probengewinnung und Verarbeitung des Rattenvollblutes

3.3.1 Rückenmarksverletzung bei der Ratte

Die SCI-Tiere wurden unter operativ semisterilen Bedingungen einer Hemitranssektion des Rückenmarks unterzogen[62]. Die Tiere der Kontrollgruppe erfuhren eine Entfernung des dorsalen Wirbelbogens ohne das Rückenmark zu verwunden. Den Ratten wurde hierzu am Vorabend der bevorstehenden Operation ohne anästhetische Intervention das Rückenfell mittels eines Elektrorasierers geschoren und ihr aktuelles Gewicht ermittelt. Am Tag der Operation erhielten die Tiere primär eine Diethylätherinhalationsnarkose, um das anschließende Injektionsnarkotikum gezielt intraperitoneal verabreichen zu können. Als Anästhetikum bekamen die Tiere eine Mischung aus Ketanest (Ketaminehydrochlorid 100 mg/kg) und Rompun (Xyalzinhydrochlorid 2,4 mg /kg) verabreicht. Diese Dosis erlaubt bei erhaltener Spontanatmung die vollständige Anästhesie der Ratten. Zur Kreislaufstabilisation unter der Narkose wurde präoperativ ein Depot von 4 ml NaCl 0,9% subkutan injiziert. Bei der Operation wird etwa 2/3 des Rückenmarks auf Höhe des 8. Brustwirbelkörpers durchtrennt (Hemitranssektion)[62].
Nach der Blutstillung unter zu Hilfenahme von SUGI steril 31601 und Spülung mit NaCl 0,9% wurde die Haut mit einem 4,0 Vicryl-Faden bei enger Stichfolge zugenäht. Die Ratten erhielten im Anschluss nach der Hautnaht jeweils

subkutan 0,3 ml Temgesic (Buprenorphinhydrochlorid), sowie eine Mischung von 4 ml Ringer-Lactat und 1 ml Amynin injiziert.
Um eine zu starke Auskühlung der Tiere zu vermeiden, wurden sie bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose auf Wärmekissen gehalten. Die Kontrolltiere erhielten gemäß diesem Protokoll dieselbe Behandlung jedoch ohne das Rückenmark zu beeinträchtigen.

3.3.2 Pflege der Tiere

Bis zum fünften Tag nach der Operation erhielten die Ratten einmal am Tag ein Gemisch aus 4 ml Ringer-Lactat und 1 ml Amynin subkutan zur Unterstützung der Kreislaufsituation sowie zur Ernährung verabreicht. Zusätzlich wurden innerhalb der ersten drei Tage nach dem Eingriff täglich 0,3 ml Temgesic (Buprenorphinhydrochlorid) als Schmerztherapeutikum subkutan injiziert.
Die manuelle Kompression von Blase und Mastdarm erfolgte morgens und abends. Um erfolgreich aufsteigende Infektionen über die ableitenden Harnwege zu verhindern, wurde im Rahmen dieses Geschehens die untere Körperhälfte der Ratten unter einem sanften Wasserstrahl gebadet.
Die Tiere wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien des Regierungspräsidiums Tübingen bei einer konstanten Temperatur von 22 ± 2 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 50-60 %, einem Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf Stunden sowie der stetigen Gewährleistung von freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten.

3.3.3 Blutentnahme bei der Ratte

Zur Darstellung des dynamischen Verlaufs der Immunreaktion auf eine Rückenmarksverletzung erfolgte die Blutentnahme an den definierten Abnahmezeitpunkten. Die Euthanasie der Tiere erfolgte am Untersuchungstag mit einer Diethylätherinhalationsnarkose, in deren unmittelbarer Fortsetzung sich die bauchseitige Hautinzision zur Präparation des Herzens anschloss. Aus der Punktion der rechten Herzkammer mit einer 9 ml NH_4-Heparin-Monovette

zur Antikoagulanz konnte ein ausreichend großes Blutvolumen gewonnen werden. Den Tieren wurden das Rückenmark und Gehirn, nach der Perfussion mit PFA 4 %, im Ganzen für die Klärung zukünftiger Fragestellungen entnommen. Das ausgelöste Gewebe wurde für die Weiterverarbeitung als Paraffin-Präparat für die Immunhistologie vorbereitet.
Das gewonnene Vollblut wurde anschließend im Institut für Hirnforschung, Tübingen, weiterverarbeitet.

3.3.4 Isolierung der Leukozyten der Ratte und Inkubation mit dem zellspezifischen Antikörper

Das erhaltene Vollblut wurde gemäß der Antikörperanzahl und entsprechenden Kontrollen zu jeweils 100 µl auf die FACS-Rundbodenröhrchen aufgeteilt. Für die Bindung des ED1-Antikörpers an das lysosomale Antigen bedarf es der Fixation und Permeabilisation der Zellen. Von der Substanz A der FIX & PERM Reagenz sind 200 µl zur Fixation ausreichend. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließendem Waschschritt mittels 5 ml PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} und Zentrifugation bei 300 g für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und es wurden 200 µl der zellpermeabilisierenden Substanz B der FIX & PERM Lösung hinzugefügt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 10 µl des unverdünnten ED1 Antikörpers. Nach einer weiteren Inkubation von 15 Minuten im Dunkeln mit anschließendem Waschschritt und Verwerfen des Überstandes wurden die Erythrozyten mit 2 ml 1X Lysing solution der PharmLyse Reagenz zum Lysieren gebracht. Von den Oberflächen-Antikörpern wurden jeweils 10 µl unverdünnt sowie 2 ml 1X Lysing solution zum in die FACS-Rundbodenröhrchen aufgeteilten Vollblut hinzupipetiert.
Ab diesem Zeitpunkt verläuft die Behandlung der Proben des lysosomalen ED1 und der Oberflächen-Marker identisch. Das Blut-Antikörper-Lysing-solution-Gemisch wurde stark gevortext und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Zentrifugation für 5 Minuten bei 200 g und dem Verwerfen des Überstandes wurde ein Waschschritt mit 2 ml 1X PBS-FCS (1%)

–EDTA (1mM) vorgenommen, um nach nochmaligem Zentrifugieren die Zellen in 500 µl 1X PBS-EDTA (1mM) in Suspension zu bringen. Hierdurch wurden die Voraussetzungen zur FACS-Analyse der Proben geschaffen. Die Schritte zur Lysierung der Erythrozyten wurden stets wiederholt, um ein möglichst vollständiges Auflösen der roten Blutkörperchen zu erzielen. Die PharmLyse-Lösung zeigte bei den Tieren die ausgeprägtesten Lyse-Resultate.

Aus dem überschüssigen Vollblut der Ratten konnten das Serum (konserviert bei –20 °C) und die mononukleären Zellen (separiert mit Histopaque-1077 und durch Zugabe von FCS und DMSO im Verhältnis 1:9 in flüssigem Stickstoff konserviert) gewonnen werden. Das konservierte Material von den Patienten und den Tieren dient dem Aufbau einer Bank von humoralem und zellulärem Material hämatologischer Herkunft nach einer Rückenmarksverletzung.

3.4 Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

3.4.1 Die Funktionsweise des FACScan

Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie mit einem FACS-Gerät (Fluorescence Activated Cell Sorting) ist in der hämatologischen Diagnostik eine gängige Methode zur Bestimmung und Differenzierung einzelner Zellen oder Partikel. Sie basiert auf dem Prinzip der Lichtstreuung sowie der Erfassung der Emission eines spezifischen zellphänotypischen, fluoreszierenden Antikörpers der zu charakterisierenden Zellsuspension. Das zu analysierende Material muss wegen technisch-mechanischer Erfordernisse in flüssiger Form vorliegen, weshalb sich Blut hierfür besonders gut eignet. Für die FACS-Analyse ist das Vorbeiführen einzelner Zellen an einem Laserstrahl nötig, um die zellspezifischen Lichtsignale zu erhalten.

Das Gerät ist in der Lage, die zu analysierenden Populationen anhand von drei zellspezifischen Eigenschaften - der Zellgröße, der Granularität und der Fluoreszensintensivität - zu differenzieren.

Das so genannte Vorwärtsstreulicht (FSC-Height = forward scatter) mit einer Wellenlänge von 488 nm erfasst die Zellgröße. Mit dem durch Lichtbeugung und Reflexion entstandenen Seitwärtsstreulicht von 488 nm Wellenlänge (SSC-Height = sideward scatter) wird die Granularität einer Zelle gemessen.

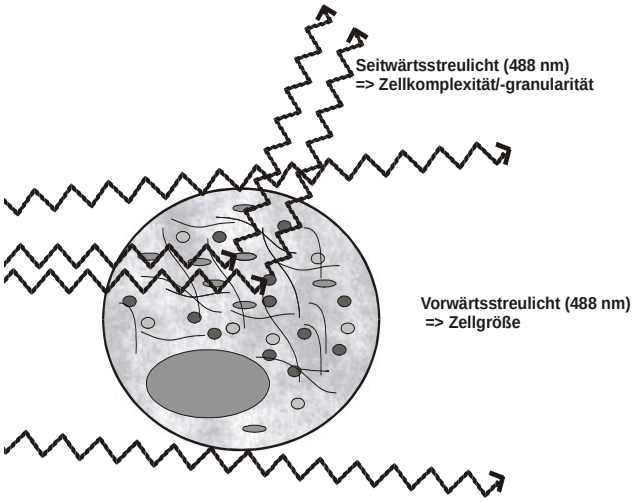

Abbildung 5: schematische, modifizierte Darstellung des Vorbeiführens und Emittierens der Lichtstrahlen, aus Betriebsanleitung des FACScan

Die registrierten Lichtstreuungen verhalten sich proportional zur Zellgröße und deren Granularität. Die Informationen des forward scatter und des sideward scatter reichen bereits aus, um die drei großen Leukozytenpopulationen im humanen Vollblut voneinander abzugrenzen. Für eine qualitativ und quantitativ präzisere Aussage über die Zelle und ihren Funktionszustand wird ein fluoreszierender, spezifischer Antikörper eingesetzt. Die spezifische Bindung des Antikörpers ermöglicht, die verschiedenen Zellpopulationen zu identifizieren und näher zu charakterisieren.

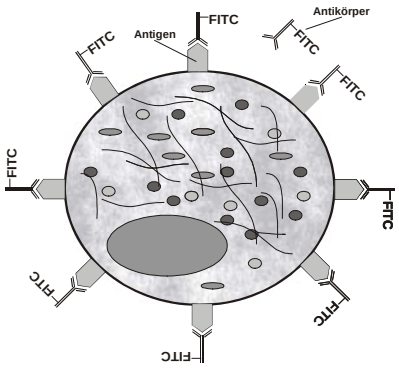

Abbildung 6: schematische Darstellung der spezifischen Bindung des FITC konjugierten Antikörpers

Für diese Studie wurden ausschließlich FITC (Fluorescinisothiocyanat) konjugierte Antikörper verwendet, wodurch die potentiell falsch positive Bindung durch den Zweitantikörper vermieden wird. Die Emission vom FITC liegt bei einer Wellenlänge von 585 nm nachdem der fluoreszierende Antikörper bei einem Laserlicht von 488 nm angeregt wurde.

Das gewonnene Probenmaterial ist nach der Inkubation mit seinem Antikörper, sowie der Erythrozyten-Lysierung mit anschließenden Waschschritten für die Analyse mit dem FACScan bereit.

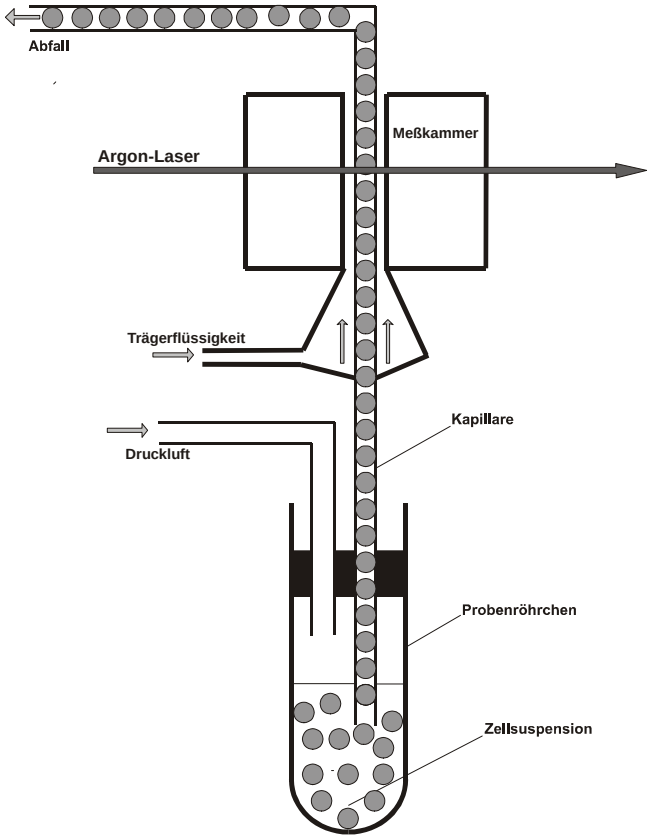

Abbildung 7: schematische, modifizierte Darstellung des Vorbeiführens einer einzelnen Zelle am Laserstrahl; FACScan aus dessen Betriebsanleitung

Zur Detektion der Zellen bedient sich das FACScan unter anderem einer dünnen Kapillare, Unterdruck, Trägerflüsssigkeit sowie eines blauen Argon-Lasers. Für die Messung reihen sich die Zellpopulationen aus der Suspension kettenartig aneinander und können so vom Laserstrahl einzeln erfasst werden.

In der Messkammer werden die Lichtbeugungen der einzeln erfassten Zellen sowie die Emission des angeregten Antikörpers über Filter und Reflektoren zu ihrem Detektor gelenkt.

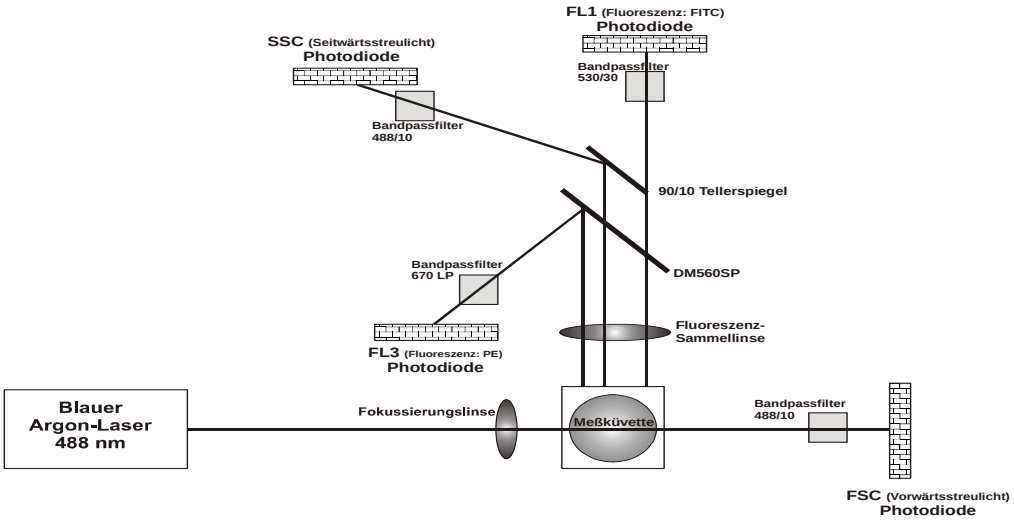

Abbildung 8: schematische, modifizierte Darstellung der Detektion der Lichtstreuung und Emission des FITC Farbstoffs

Die miteinander verschalteten Photodioden wandeln das registrierte Licht in einen elektrischen Impuls um. Das resultierende elektrische Signal entspricht einer Zelle. Dadurch kann diese aufgrund ihrer populationsspezifischen Lichtbeugungen und Antikörper spezifischen Zellphänotypisierungen einer Population zugeordnet werden.

3.5 FACS-Analyse von lysiertem humanem Vollblut

Lysiertes humanes Vollblut:

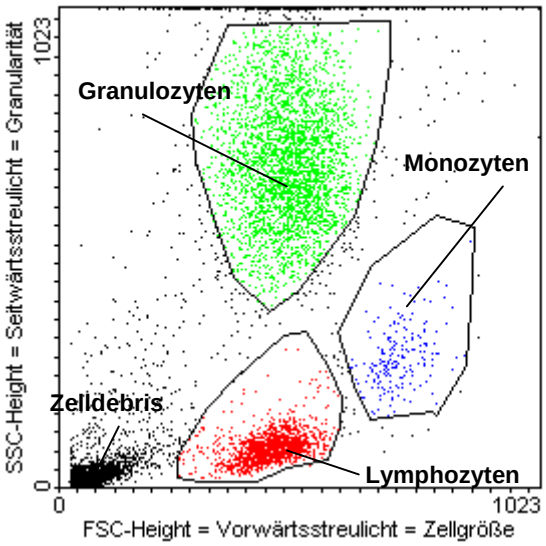

Abbildung 9: FACS-Schaubild von lysiertem Patientenblut mit Darstellung der 3 Hauptleukozytenpopulationen

Die Darstellung im zweiparameter Punktwolkendiagramm, sog. Dot plot (Vorwärtsstreulicht gegen Seitwärtsstreulicht), erlaubt beim Menschen bereits eine grobe Unterscheidung zwischen den Lymphozyten, Monozyten und den Granulozyten. Die Lymphozyten und die Granulozyten richten sich gemäß ihrer annähernd gleichen Zellgröße, aber unterschiedlichen Granulierung, übereinander an.

Die Monozyten positionieren sich wegen ihrem größten Zellkörper rechts von den beiden anderen Populationen. Zur Erleichterung der Unterscheidung der drei Hauptleukozytenpopulationen beim Patienten wurden diese gegatet und farbig visualisiert.

3.5.1 Qualitative Darstellung der Leukozytensubpopulationen beim Patienten

Die Projektion der Fluoreszenzintensität, logarithmisch auf der horizontalen Achse, und der Vorwärtslichtstreuung, linear auf der vertikalen Achse aufgetragen, ermöglicht die Detektion der Antikörper-spezifischen Populationen. Die zellspezifische Bindung des eingesetzten fluoreszierenden Antikörpers hebt sich durch eine ausgeprägtere zelluläre Fluoreszenzintensität gegenüber den nicht Antikörper markierten Zellpopulationen ab.

Exemplarische Darstellung der FACS-Schaubilder des Patienten

Das angeborene Immunsystem des Patienten

Lysiertes Vollblut
CD 15$^+$-Granulozyten

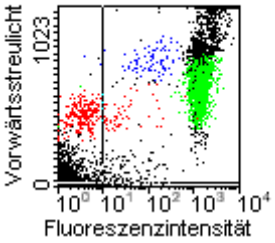

Abbildung 10:

Lysiertes Vollblut
CD 14$^+$-Monozyten

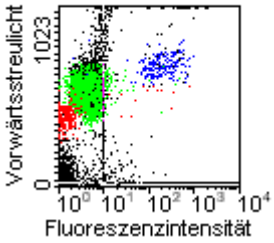

Abbildung 11:

Das adaptive Immunsystem mit der MHC II$^+$-Population des Patienten

Lysiertes Vollblut
CD 19$^+$-B-Lymphozyten

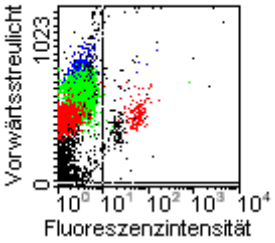

Abbildung 12:

Lysiertes Vollblut
CD 3$^+$-T-Lymphozyten

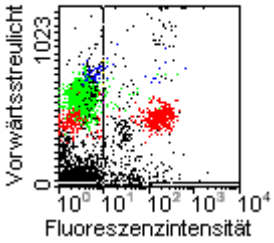

Abbildung 13:

Lysiertes Vollblut
MHC II$^+$-Population

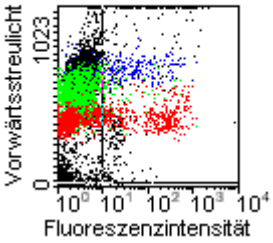

Abbildung 14:

Die CD 100$^+$-Population und die Gesamtleukozyten des Patienten

Lysiertes Vollblut
CD100$^+$-Population

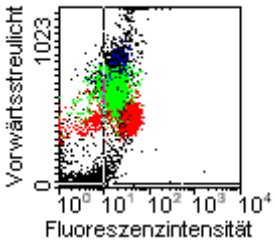

Abbildung 15:

Lysiertes Vollblut
CD 45$^+$-Leukozyten

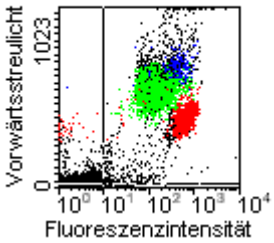

Abbildung 16:

Abbildung 10-16: Darstellung der ausgeprägteren Immunfluoreszenz des spezifischen Antikörpers

In diesen Schaubildern zeigt sich die natürlich vorkommende, unspezifische Hintergrundfluoreszenz im Intensitätsbereich unter 10^1.

3.5.2 Isotyp-Kontrollen in der klinischen Studie

Die Isotyp-Kontrolle lässt eine Aussage über das Ausmaß einer unspezifischen Bindung und somit eines falsch positiven Ergebnisses des eingesetzten Antikörpers zu.

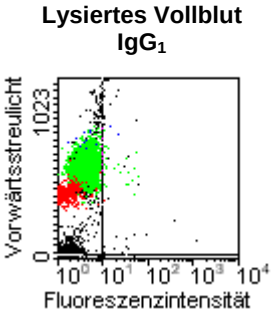

Abbildung 17:

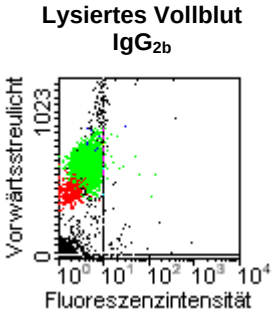

Abbildung 18:

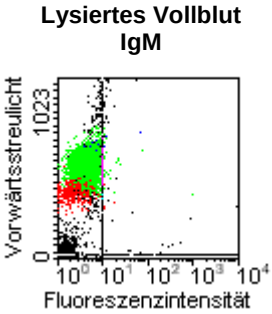

Abbildung 19:

Abbildung 17-19: Darstellung der physiologisch vorkommenden Hintergrundbindung in der klinischen Studie

Anmerkung:

Für den Umgang mit Vollblut, insbesondere Rattenblut, im Rahmen der zytometrischen Messungen lagen keine Erfahrungswerte vor. Im Vorfeld der Untersuchungen war deshalb ein umfangreiches Austesten der Lyseverfahren für die Erythrozyten, der verwendeten Antikörper sowie der Einstellungen des FACScan notwendig.

Die oben beschriebenen Materialien und Verfahrensweisen lieferten die aussagekräftigsten Ergebnisse.

3.6 FACS-Analyse von lysiertem Vollblut der Ratte

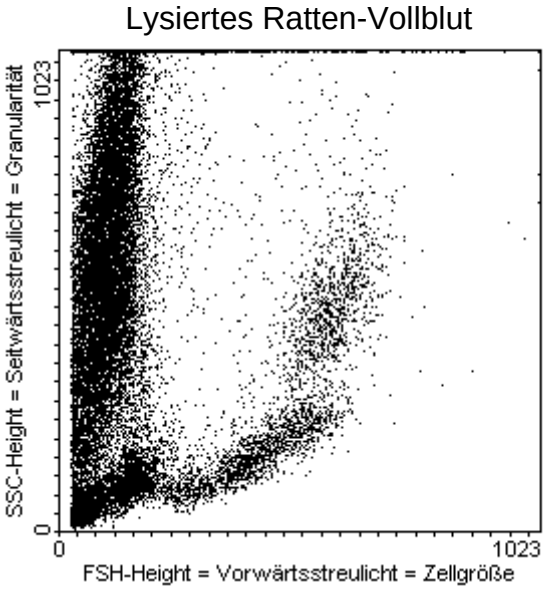

Abbildung 20: FACS-Schaubild von lysiertem Rattenblut als Vorwärtsstreulicht gegen Seitwärtsstreulicht aufgetragen

Bei der Dot plot Darstellung (Vorwärtstreulicht gegen Seitwärtsstreulicht) von lysiertem Rattenblut lassen sich die drei Leukozytenhauptpopulationen nicht eindeutig voneinander abgrenzen, weshalb die Kolorierung und Eingrenzung der distinkten leukozytären Populationen bei den Messungen nicht vorgenommen wurde.

Der dichte Streifen am linken Bildrand stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit die unvollständige Lysierung der Rattenerythrozyten dar.

3.6.1 Qualitative Darstellung der Leukozytensubpopulationen im Tiermodell

Analog zur Vorgehensweise in der klinischen Studie wurde auch im tierexperimentellen Teil die Fluoreszenzintensität logarithmisch auf der X-Achse, und die Vorwärtslichtstreuung linear auf der vertikalen Achse aufgetragen. Zur Detektion des lysosomalen ED1-Antigens war ein vorzeitiges Permeabilisieren der Zellmembran notwendig. Die zellspezifische Bindung der eingesetzten floureszierenden Antikörper hebt sich durch die ausgeprägtere zelluläre Fluoreszenzintensität gegenüber den nicht Antikörper markierten Zellpopulationen ab.

Exemplarische Darstellung der FACS-Schaubilder der Ratte

Das angeborene Immunsystem der Ratte

Lysiertes Vollblut
HIS 48$^+$-Granulozyten

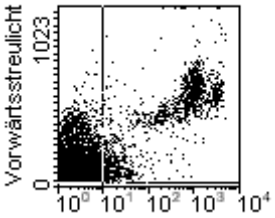

Abbildung 21:

Lysiertes + permeab. Vollblut
ED1$^+$-Population

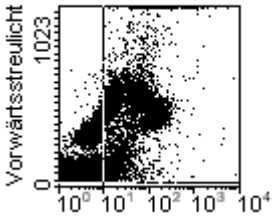

Abbildung 22:

Das adaptive Immunsystem mit der MHC II$^+$-Population der Ratte

Lysiertes Vollblut
CD 45 RA$^+$-B-Lymphozyten

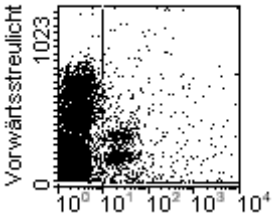

Abbildung 23:

Lysiertes Vollblut
CD 3$^+$-T-Lymphozyten

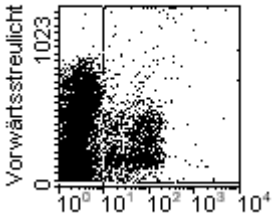

Abbildung 24:

Lysiertes Vollblut
OX-6$^+$-Population

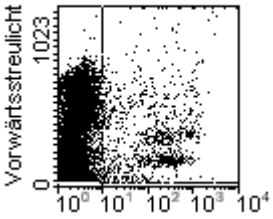

Abbildung 25:

Die dendritischen Zellen und die Gesamtleukozyten der Ratte

Lysiertes Vollblut
OX-62$^+$-Population

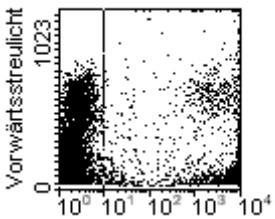

Abbildung 26:

Lysiertes Vollblut
CD 45$^+$-Leukozyten

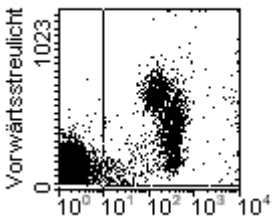

Abbildung 27:

Abbildung 21-27: Darstellung der ausgeprägteren Immunfluoreszenz des spezifischen Antikörpers

In diesen Schaubildern zeigt sich die natürlich vorkommende, unspezifische Hintergrundfluoreszenz in einem Intensitätsbereich unter 10^1.

3.6.2 Isotyp-Kontrollen in der tierexperimentellen Studie

Die mitgeführte Isotyp-Kontrolle lässt eine Aussage über das Ausmaß einer unspezifischen Bindung und somit falsch positives Ergebnis des eingesetzten Antikörpers zu.

Lysiertes Vollblut
IgG_1

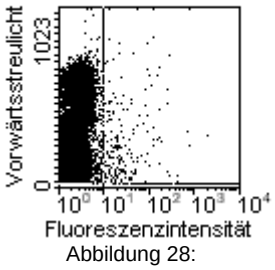

Abbildung 28:

Lysiertes Vollblut
IgM

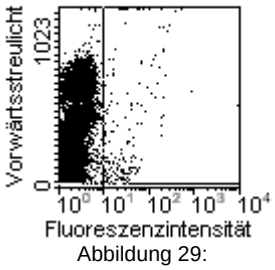

Abbildung 29:

Lysiertes und
permeabilisiertes Vollblut
IgG_1

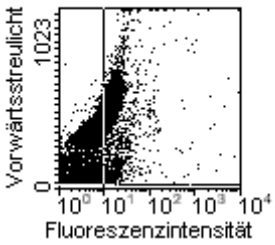

Abbildung 30:

Abbildung 28-30: Darstellung der physiologisch vorkommenden Hintergrundbindung in der tierexperimentellen Studie

Bei der Gegenüberstellung der visualisierten FACS-Ergebnisse der $ED1^+$-Monozyten mit der Isotyp-Kontrolle ist ein Überwiegen der Bindung des ED1-Antikörpers durch eine stärkere Fluoreszenzintensität zu erkennen.

3.7 Quantitative Darstellung des Zellimmunphänotyps in der klinischen und der tierexperimentellen Studie

Zur Quantifizierung der detektierten Leukozytensubpopulationen werden die Messdaten in einer einparameter Projektion dargestellt. Dieses so genannte Histogramm zeigt auf der X-Achse die logarithmisch aufgetragene Fluoreszenzintensität gegenüber der linearen Skala der ermittelten Events auf der vertikalen Achse. Die Transformation der gemessenen Zellimmunphänotypen in Kurvenwerte vom Menschen und Tier wurde unter Anwendung des Computerprogramms WIN MDI 2.8 vorgenommen.

3.7.1 Beispielhafte Darstellung eines Histogramms für die klinische und tierexperimentelle Studie

Lysiertes humanes Vollblut
CD 15$^+$-Granulozyten
als Dot-plot-Projektion

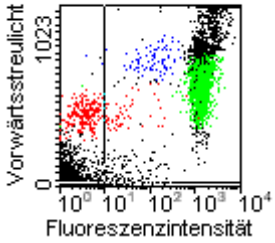

Abbildung 31:

Lysiertes humanes Vollblut
CD 15$^+$-Granulozyten
als Histogramm

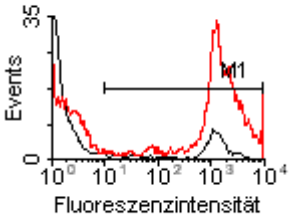

Abbildung 32:

SCI-Patient
Kontrollpatient

Lysiertes Vollblut der Ratte
OX-6$^+$-Population
als Dot-plot-Projektion

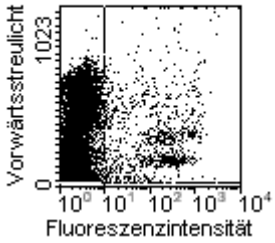

Abbildung 33:

Lysiertes Vollblut der Ratte
OX-6$^+$-Population
als Histogramm

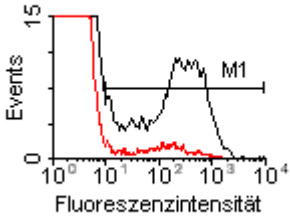

Abbildung 34:

SCI-Tier
Kontrolltier

Bei dieser Visualisierung, analog zur Dot-plot-Projektion, stellt der Wertebereich unterhalb von 10^1 die physiologisch vorkommende, unspezifische Hintergrundfluoreszenz dar. Die Auswertungssoftware ermöglicht die Ermittlung und Anzeige der Kurvenwerte, so dass die gezählten Ereignisse im

Wertebereich M1 (10^1 – 10^4) in die statistische Auswertung übernommen werden konnten. Ergänzend zeigen die dargestellten Histogramme beispielhaft die Differenz zwischen den rückenmarksverletzten Spezies und ihrer entsprechenden Kontrollgruppe.

3.8 Statistische Auswertung der einzelnen Leukozytensub-populationen für die klinische und tierexperimentelle Studie

Für die statistische Auswertung wurden die angezeigten Kurvenwerte aus dem Programm WIN MDI 2.8 unter Beratung von Herrn Professor Dietz, Institut für medizinische Biometrie, Tübingen in das Statistik-Programm JMP übernommen. Für die Berechnung einer statistischen Signifikanz wurden die ermittelten Zählereignisse in den natürlichen Logarithmus überführt. Mit Hilfe der Varianzanalyse nach ANOVA und einem Tukey-Test konnten bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von α=0,05 so genannt geschätzte Mittelwerte nach der Methode REML (restricted maximum likelyhood) berechnet werden. Die erhaltenen Mittelwerte (jeweils in Klammer angegeben) sind in den Grafiken als Querbalken am jeweiligen Untersuchungstermin eingezeichnet. Die erhaltenen unterschiedlichen Signifikanzniveaus beziehen sich auf diese Mittelwerte.
In dem nachfolgenden Kapitel 4 (Ergebnisse) werden alle Ergebnisse inklusive der nicht Signifikanten dargestellt. Im Folgenden werden die Leukozytenpopulationen in der klinischen Studie zusätzlich durch gekennzeichnet.
Die Leukozytenpopulationen in der tierexperimentellen Studie sind zusätzlich durch gekennzeichnet.
Für den Wertebereich < 10^{-4} werden die p-Werte in den folgenden Diagrammen als p < 0,0001, bei Werten > 10^{-4} als berechneter Wert, p = ... angebeben.

4 Ergebnisse

4.1 Die Zeitkinetik der zellulären Immunantwort im Blut der Patienten nach einer Rückenmarksverletzung

4.1.1 Die zelluläre angeborene Immunantwort der humanen CD15$^+$-Granulozyten im Patientenblut

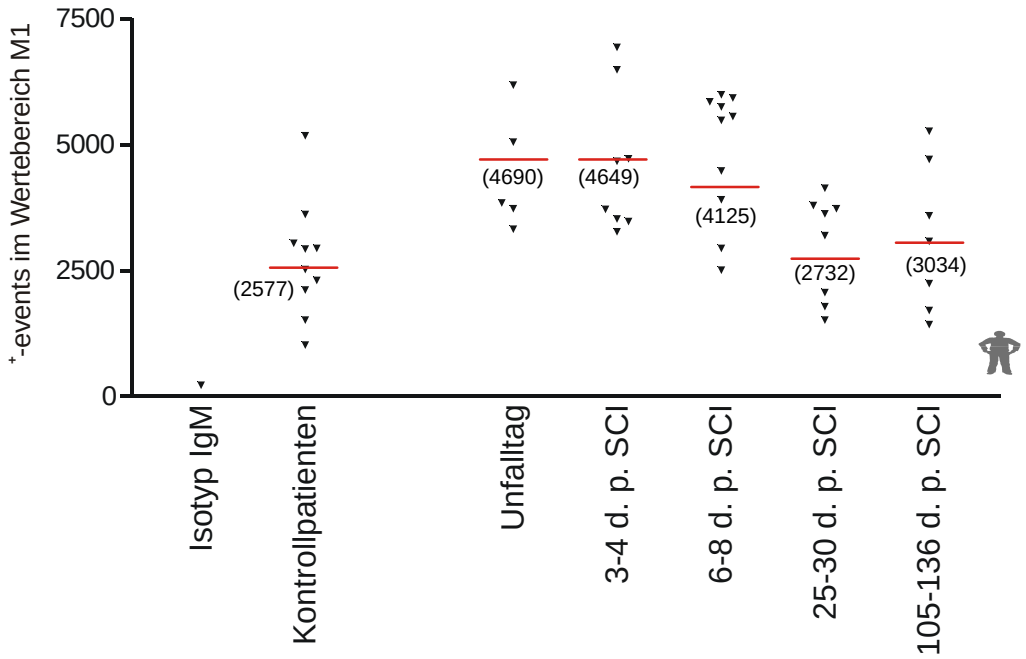

Abbildung 35: Zeitkinetik der CD15$^+$-Granulozyten im Patientenblut

Bei der CD 15$^+$-Granulozytenpopulation konnte zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied berechnet werden. Dennoch zeigen die CD 15$^+$-Granulozytenzahlen eine interessante Dynamik im Verlauf der Untersuchung. Die CD 15$^+$-Granulozytenzahlen scheinen bereits am Unfalltag einen Anstieg zu zeigen. Das erhöhte Zellzahlniveau wird bis zum darauffolgenden Untersuchungszeitpunkt (3-4 d. p. SCI) aufrecht erhalten. Ein Rückgang der CD15$^+$-Granulozytenzahlen ist dann zwischen dem 6.-8. Tag nach dem Trauma zu beobachten. Nach einem Monat

(25-30 d. p. SCI) sind die $CD15^+$-Granulozytenzahlen wieder bis auf die Referenzwerte der Kontrollpatienten abgesunken und verbleiben (105-136 d. p. SCI) nahezu auf diesem Niveau.

4.1.2 Die zelluläre angeborene Immunantwort der humanen $CD14^+$-Monozyten im Patientenblut

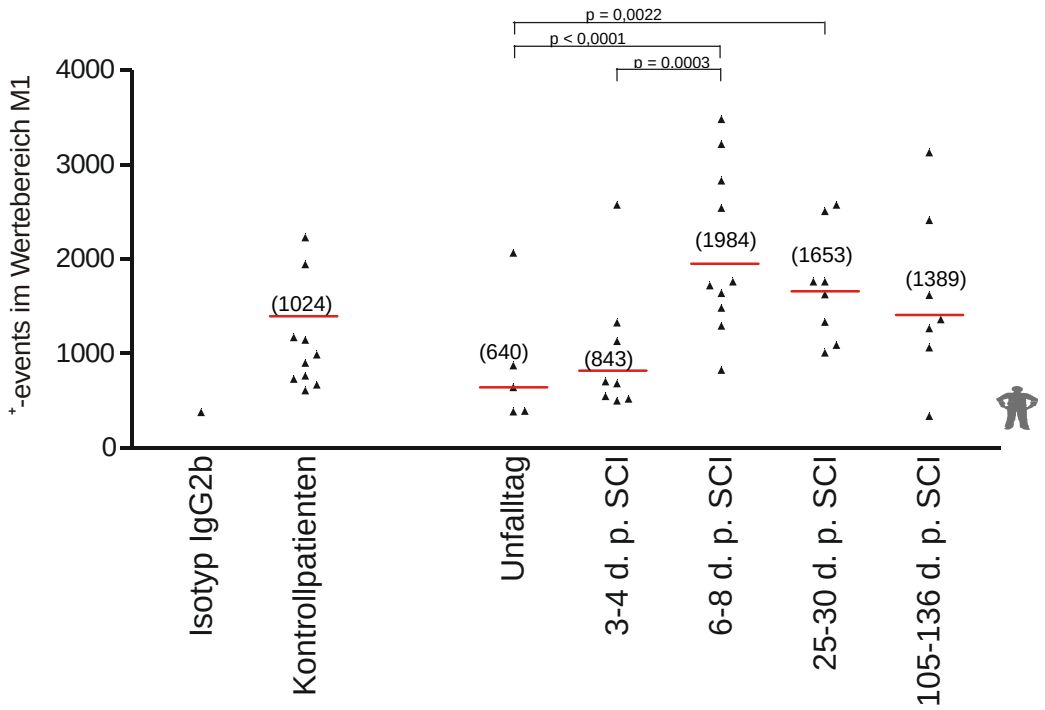

Abbildung 36: Zeitkinetik der $CD14^+$-Monozyten im Patientenblut

Die $CD14^+$-Monozytenanzahl zeigt zu Beginn der Untersuchungsreihe (Unfalltag und 3-4 d. p. SCI) eine deutliche Suppression gegenüber den Untersuchungszeitpunkten 6-8 und 25-30 d. p. SCI. Ihr Maximum erreichen die $CD14^+$-Monozyten nach einem sprunghaften Anstieg am Ende der ersten Woche (6-8 d. p. SCI). Nach einem Monat (25-30 d. p. SCI) kann ein erhöhtes Niveau der $CD14^+$-Monozytenzahlen gegenüber den vorausgegangenen Messungen noch immer detektiert werden.

Der Anstieg der $CD14^+$-Monozytenzahlen vom Unfalltag auf die Messzeitpunkte zwischen dem 6.-8. Tag sowie zwischen dem 25.-30. Tag post SCI unterscheidet sich signifikant mit p-Werten von < 0,0001 und p = 0,0022. Die Erhöhung der $CD14^+$-Zellzahlen vom 3.-4. Tag auf die Tage 6-8 post SCI unterscheidet sich signifikant mit einem p-Wert von 0,003.

4.1.3 Die zelluläre adaptive Immunantwort der humanen $CD19^+$-B-Lymphozyten im Patientenblut

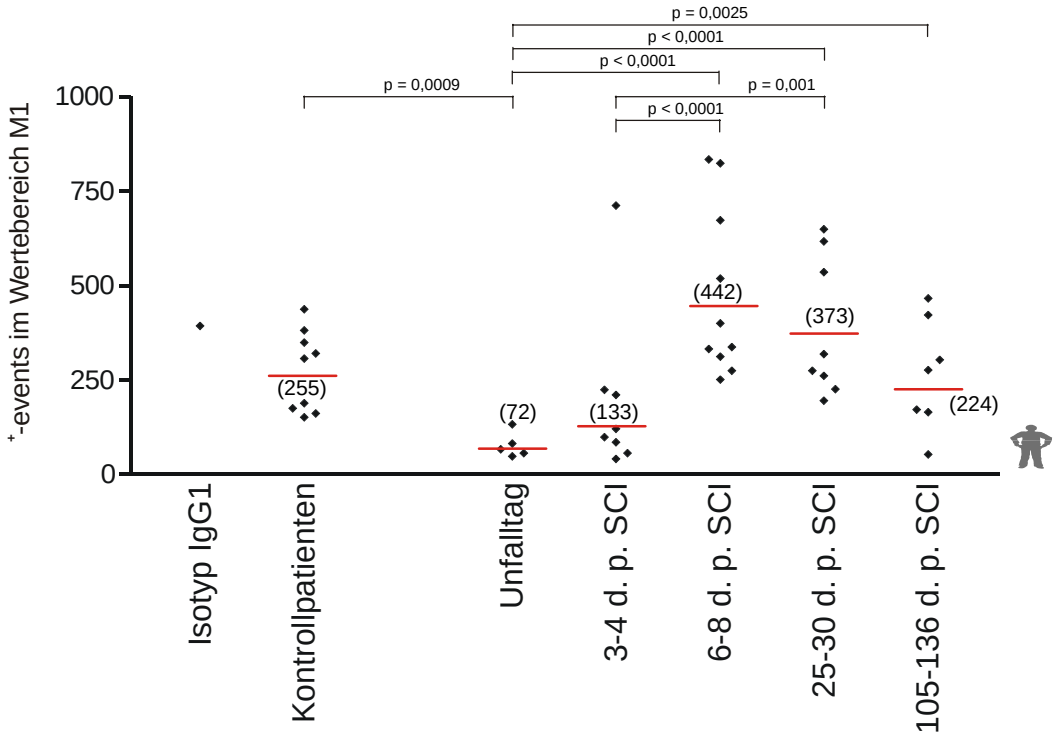

Abbildung 37: Zeitkinetik der $CD19^+$-B-Lymphozyten im Patientenblut

Die $CD19^+$-B-Lymphozytenzahlen zeigen bereits am Unfalltag einen starken Einbruch bis auf nahezu ein Drittel der Kontrollwerte. Am Untersuchungstermin zwischen dem 3.-4. Tag post SCI ist eine weiterhin bestehende Zellzahlsuppression zu messen. Das Maximum der $CD19^+$-B-Lymphozyten wird am Ende der ersten Woche (6-8 d. p. SCI) erreicht, wobei die Ausgangswerte

der Kontrollpatienten deutlich überschritten werden. Bis zu einem Monat (25-30 d. p. SCI) ist ein erhöhtes Niveau der $CD19^+$-B-Zellzahlen zu beobachten. Am letzten Beobachtungszeitpunkt (105-136 d. p. SCI) sind die erhöhten $CD19^+$-B-Lymphozytenzahlen wieder auf die Referenzwerte der Kontrollgruppe abgesunken.

Für die ermittelten Werte konnten unterschiedliche statistische Signifikanzen berechnet werden. So zeigen die Werte vom Unfalltag mit $p = 0{,}0009$ gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Zellzahlabnahme. Die Daten zwischen dem 6.-8. und 25.-30.Tag post SCI dokumentieren jeweils mit $p < 0{,}0001$ sowie einem $p = 0{,}0025$ zwischen dem 105.-136. Tag post SCI einen signifikanten Anstieg der $CD19^+$-B-Lymphozyten gegenüber den Werten vom Unfalltag. Darüber hinaus stellen die Werte vom 6.-8. und 25.-30. Tag post SCI mit $p < 0{,}0001$ und $p = 0{,}001$ einen signifikanten Unterschied zum 3.-4. Tag nach der Rückenmarksverletzung dar.

4.1.4 Die zelluläre adaptive Immunantwort der humanen CD3$^+$-Zellen im Patientenblut

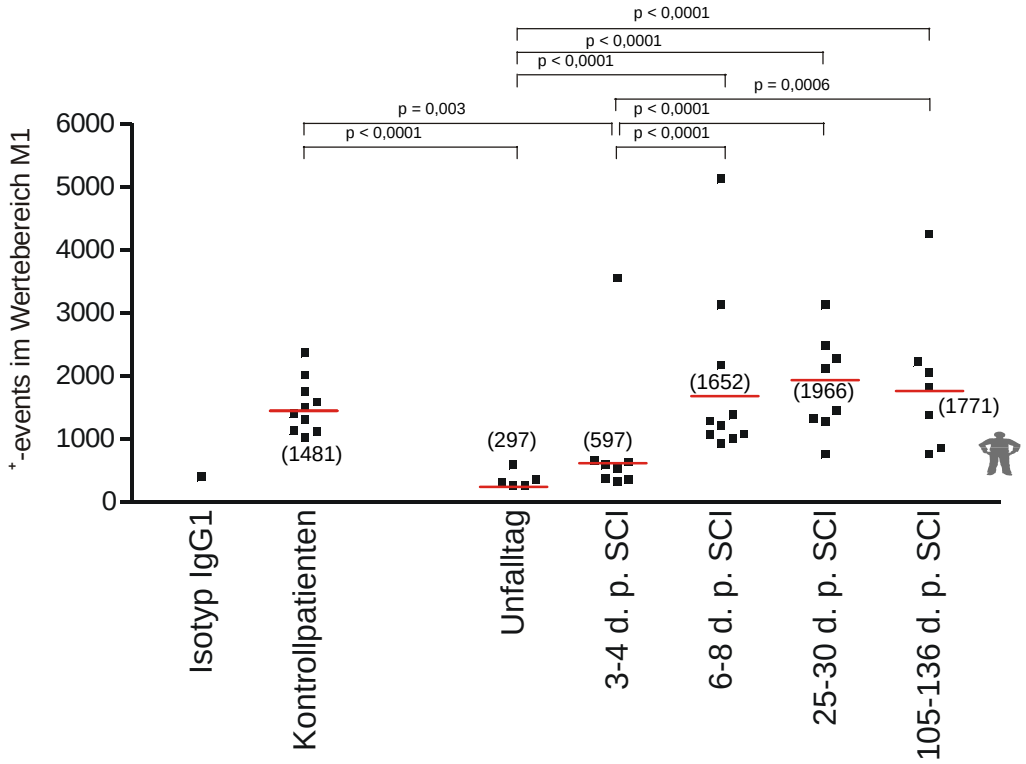

Abbildung 38: Zeitkinetik der CD3$^+$-T-Lymphozyten im Patientenblut

Die CD3$^+$-T-Lymphozytenzahlen zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die CD19$^+$-B-Lymphozyten. Die CD3$^+$-T-Zellanzahl fällt ebenso am Unfalltag auf etwa ein Drittel im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe ab. Am darauffolgenden Untersuchungstermin (3-4 d. p. SCI) kann eine weiterhin bestehende dezimierte CD3$^+$-T-Lymphozytenanzahl gemessen werden. Am Ende der ersten Woche (6-8 d. p. SCI) ist eine Erholung der T-Lymphozyten zu sehen, indem sie die Ausgangswerte leicht überschreiten. Die maximale Anzahl der CD3$^+$-T-Lymphozyten wird zwischen dem 25.-30. Tag nach der Rückenmarksverletzung beobachtet. Bis über drei Monate (105-136 d. p. SCI) kann ein persistent erhöhtes Zellzahlniveau der CD3$^+$-T-Zellen detektiert werden.

Die Werte des Unfalltags mit $p < 0,0001$ als auch die Resultate zwischen dem 3.-4. Tag p. SCI mit $p = 0,003$ unterscheiden sich signifikant von den ermittelten Kontrollwerten. Darüber hinaus steigen die CD3$^+$-T-Zellzahlen vom

6.-8. Tag, vom 25.-30. Tag sowie vom 105.-136. Tag post SCI mit jeweils $p < 0{,}0001$ signifikant gegenüber dem Unfalltag an. Ferner sind die Anstiege vom 3.-4. Tag nach dem Trauma zu den Zeitpunkten 6.-8. Tag und 25.-30. Tag jeweils mit $p < 0{,}0001$ als auch zwischen dem 105.-136. Tag post SCI mit $p = 0{,}0006$ als signifikant zu detektieren.

4.1.5 Die zelluläre Immunantwort der humanen MHC II$^+$-Population im Patientenblut

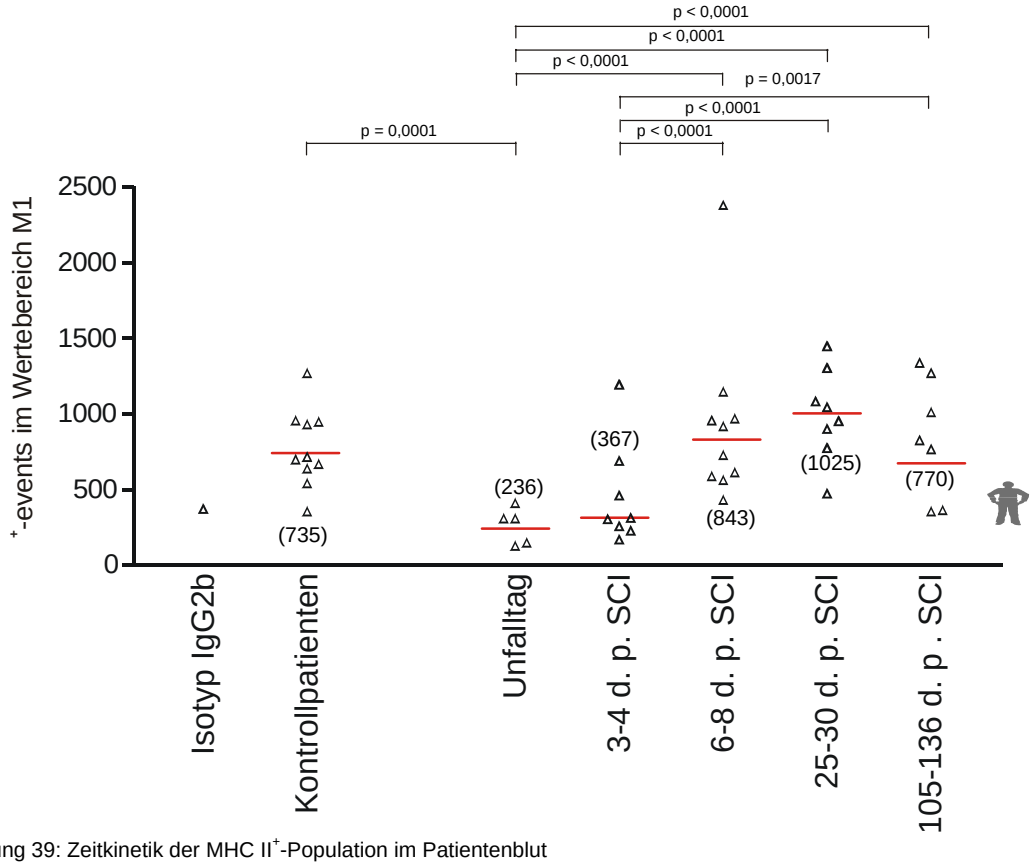

Abbildung 39: Zeitkinetik der MHC II$^+$-Population im Patientenblut

Die MHC II$^+$-Population zeigt einen annähernd parallelen Verlauf zu den lymphozytären Entitäten. Die MHC II$^+$-Zellzahlen fallen bereits am Unfalltag und zur Wochenmitte (3-4 d. p. SCI) um nahezu 50% gegenüber den Referenzwerten der Kontrollpatienten ab. Dann zeigt die MHC II$^+$-Population am Ende der ersten Woche (6-8 d. p. SCI) eine Erholung ihrer Zellzahlen. Der

Gipfel der MHC II$^+$-Zellzahlen wird nach einem Monat (25-30 d. p. SCI) erreicht. Wie die CD19$^+$-B-Lymphozyten sind die MHC II$^+$-Zellzahlen am letzten Untersuchungszeitpunkt wieder auf die Ausgangswerte der Kontrollgruppe zurückgekehrt.

Die MHC II$^+$-Zellzahlen am Unfalltag sind mit p = 0,0001 gegenüber den Werten der Kontrollpatienten signifikant reduziert. Ferner steigen die Zellzahlen der MHC II$^+$-Population nach dem Unfalltag bis zum 6.-8. Tag, 25.-30. Tag sowie 105.-136. Tag (jeweils mit p < 0,0001) post SCI signifikant an. Ein weiteres statistisch signifikantes Ergebnis liefert das Resultat des Anstiegs der MHC II$^+$-Zellanzahl vom 3.-4. Tag zu den Tagen 6-8 und 25-30 post SCI mit jeweils p < 0,0001 als auch zu den Tagen 105-136 post SCI mit p = 0,0017.

4.1.6 Die zelluläre Immunantwort der humanen CD100$^+$-Population im Patientenblut

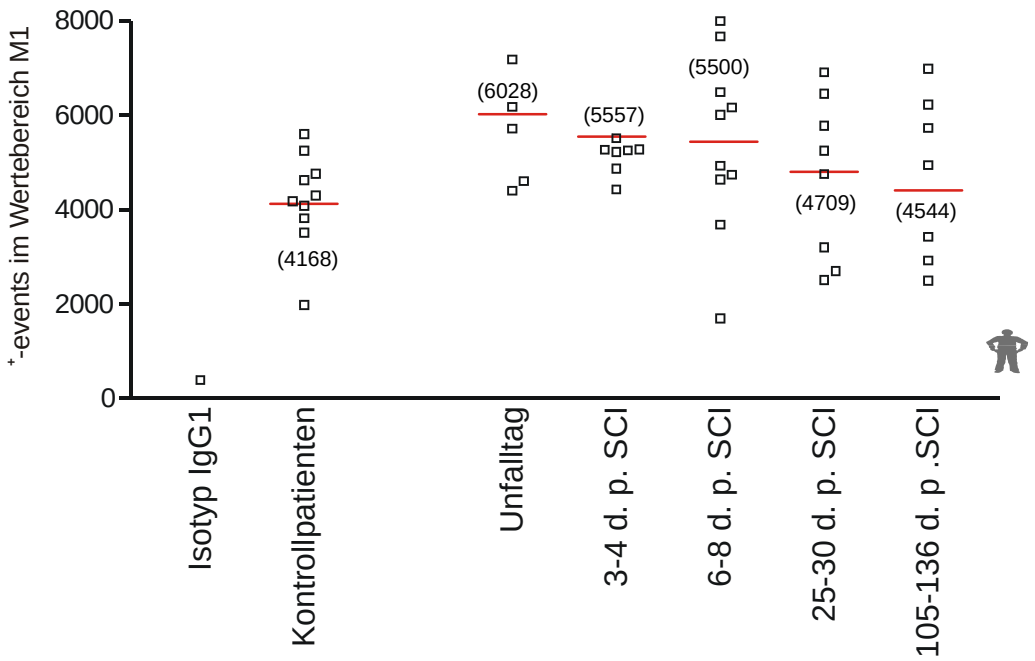

Abbildung 40: Zeitkinetik der CD100$^+$-Population im Patientenblut

Für die CD100$^+$-Population konnten keine Signifikanzen berechnet werden. Es scheint als würden die CD100$^+$-Zellzahlen gleich zu Beginn der Untersuchungsreihe (Unfalltag) ansteigen und ab diesem Zeitpunkt über den verbleibenden Beobachtungszeitraum langsam abfallen, wobei die Kontrollwerte im Verlauf der Studie stets überschritten werden.

4.1.7 Die zelluläre Immunantwort der humanen CD45$^+$-Gesamtleukozyten im Patientenblut

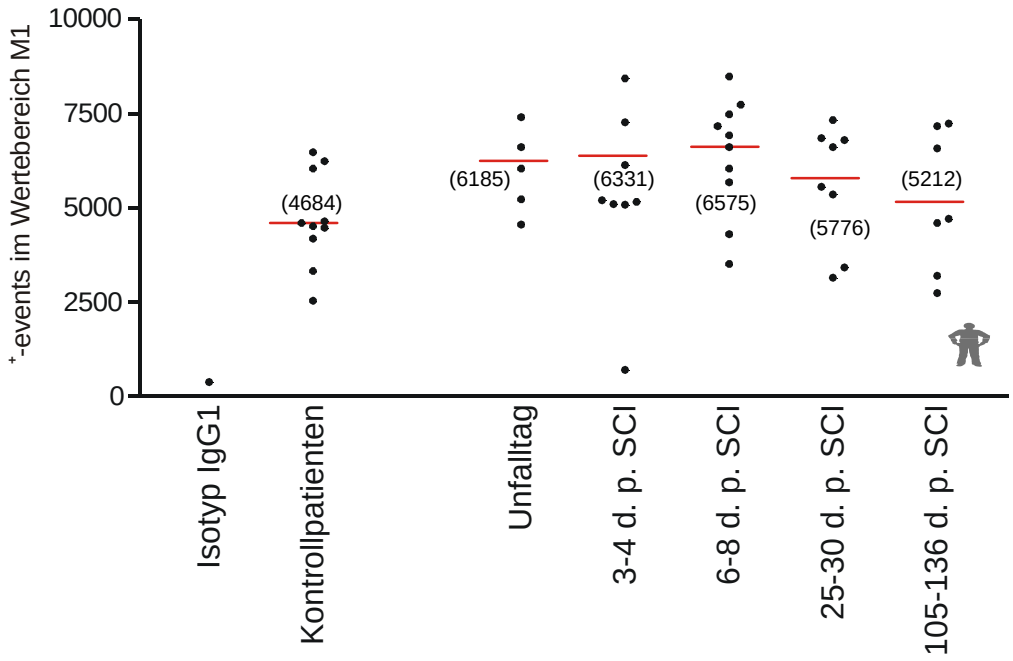

Abbildung 41: Zeitkinetik der CD45$^+$-Gesamtleukozyten im Patientenblut

Für die CD 45$^+$-Gesamtleukozyten konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede berechnet werden. Unsere Messergebnisse zugrundelegend scheint es dennoch dass die Anzahl der CD45$^+$-Gesamtleukozyten bereits am Unfalltag ansteigt und ihr Maximum nach einer Woche (6-8 d. p. SCI) erreicht. Einen Monat nach der Rückenmarksverletzung (25-30 d. p. SCI) kann möglicherweise ein Abfall der CD45$^+$-Leukozytenzahlen detektiert werden. Nochmals verringerte CD45$^+$-Zellzahlen werden am letzten

Untersuchungszeitpunkt gemessen. Über die gesamte Studiendauer werden jedoch die $CD45^+$-Gesamtleukozytenzahlen der Kontrollpatienten scheinbar überschritten.

4.2 Die Zeitkinetik der zellulären Immunantwort im Blut der Ratte nach einer Rückenmarksverletzung

4.2.1 Die zelluläre angeborene Immunantwort der HIS 48$^+$-Granulozyten im Rattenblut

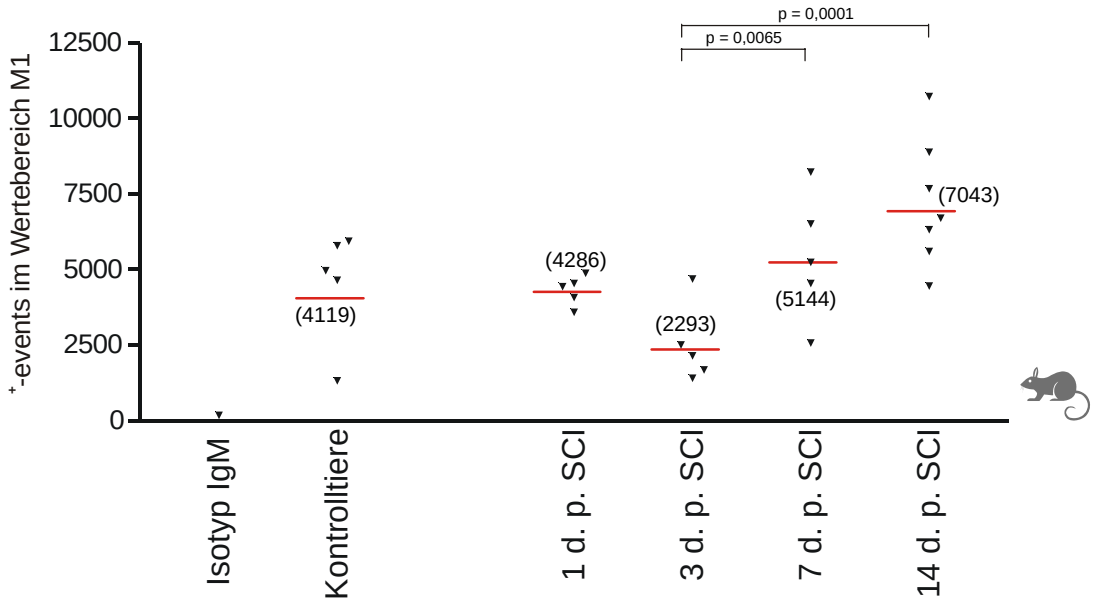

Abbildung 42: Zeitkinetik der HIS 48$^+$-Granulozyten im Rattenblut

Die HIS 48$^+$-Granulozytenzahlen scheinen einen Tag post SCI nahezu keinen Anstieg im Vergleich zu den Ausgangswerten der Kontrolltiere aufzuzeigen. Der Messzeitpunkt (3 d. p. SCI) ist durch ein Minimum der HIS 48$^+$-Zellzahlen gegenüber den nachfolgenden Messungen gekennzeichnet. Am Ende der ersten Woche (7 d. p. SCI) ist eine Erholung der HIS 48$^+$-Zellzahlen zu beobachten. Spät, nach 14 Tagen post SCI, erreichen die HIS 48$^+$-Granulozytenzahlen ihren Maximalwert.

Der Anstieg der HIS 48$^+$-Granulozytenzahlen vom 3. Tag auf den 7. und 14. Tag post SCI zeigt eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0065; und 0,0001.

4.2.2 Die zelluläre angeborene Immunantwort der ED1$^+$-Monozyten im Rattenblut

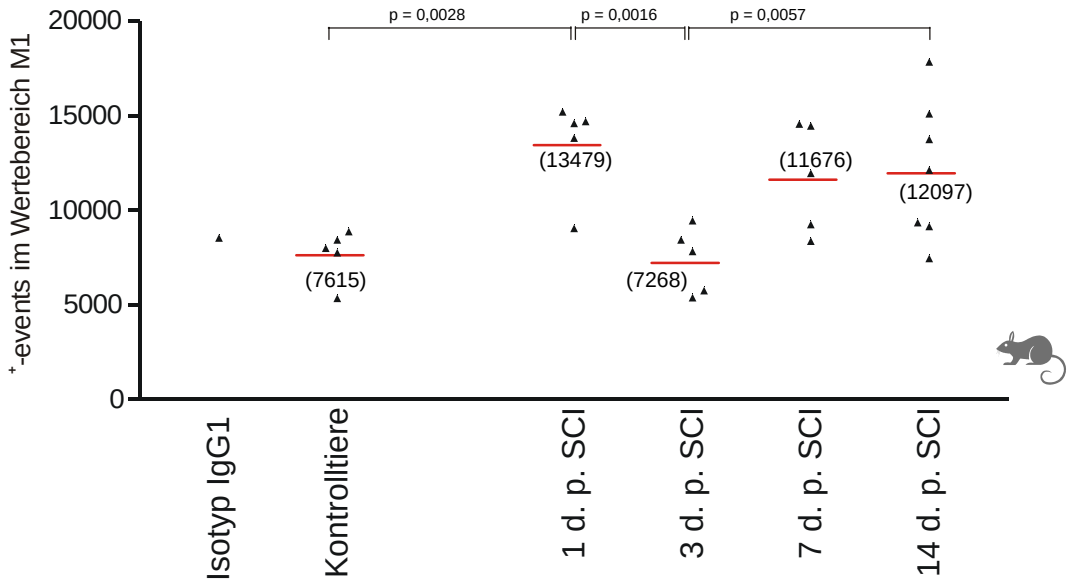

Abbildung 43: Zeitkinetik der ED1$^+$-Monozyten im Rattenblut

Die ED1$^+$-Monozytenzahlen reagieren bereits am 1. Tag post SCI mit einem deutlichen Anstieg auf ihr Maximum. Einen drastischen Einbruch erfahren die ED1$^+$-Monozytenzahlen daraufhin am Tag 3 nach der Rückenmarksverletzung. Ein erhöhtes Zellzahlniveau wird bis 14 Tage post SCI aufrechterhalten.

Der sprunghafte Anstieg der ED1$^+$-Monozytenzahlen am Tag 1 post SCI unterscheidet sich signifikant zur Kontrollgruppe mit einem p-Wert von 0,0028; der Abfall am 3. Tag gegenüber dem 1. Tag post SCI weist eine Signifikanz mit p = 0,0016 auf. Der erneute Anstieg der ED1$^+$-Monozytenzahlen vom 3. auf den 14. Tag post SCI ist mit einer statistischen Signifikanz von p = 0,0057 gekennzeichnet.

4.2.3 Die zelluläre adaptive Immunantwort der CD45 RA$^+$-B-Lymphozyten im Rattenblut

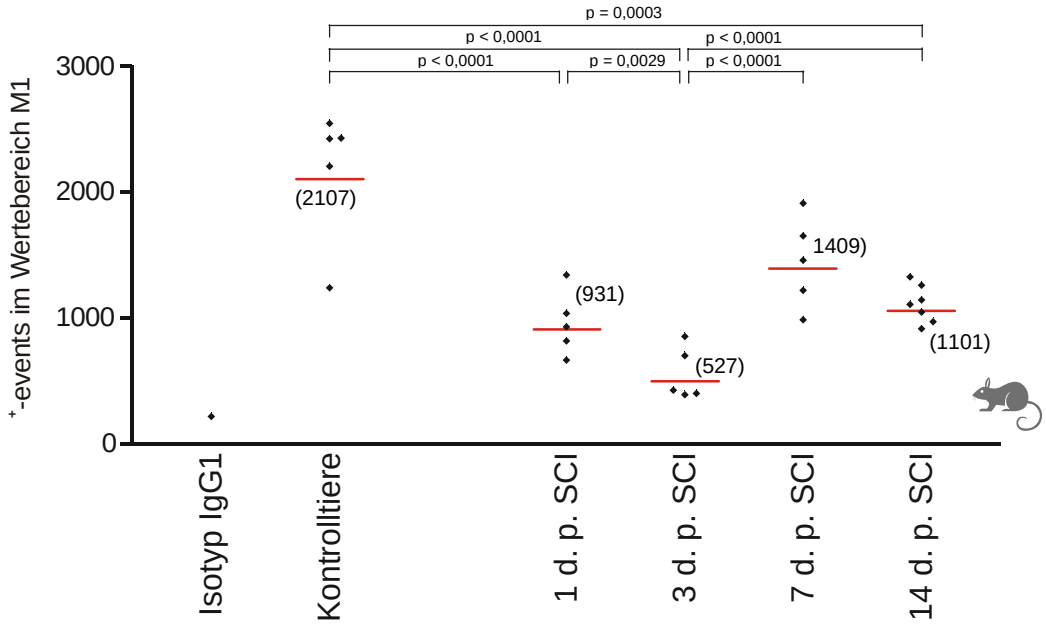

Abbildung 44: Zeitkinetik der CD45 RA$^+$-B-Lymphozyten im Rattenblut

Die CD45 RA$^+$-B-Lymphozytenzahlen der Kontrolltiere wurden von den SCI-Tieren bis zum Studienende stets unterschritten. Bis zum Tag 3 post SCI wird eine deutliche Zellzahlminderung der CD45 RA$^+$-Population bis auf weniger als ein Drittel der Ausgangswerte der Kontrolltiere beobachtet. Nach einer Woche (7 d. p. SCI) zeigen die CD45 RA$^+$-B-Zellen der SCI-Tiere ihre höchsten Zahlenwerte, die sich 14 Tage post SCI erneut stärker reduziert darstellen.

Als signifikant zu unterscheiden sind die CD45 RA$^+$-B-Lymphozytenzahlen des Tages 1 und 3 mit jeweils $p < 0,0001$ sowie des Tages 14 post SCI mit $p = 0,0003$ gegenüber den Referenzwerten der Kontrolltiere. Der weitere CD45 RA$^+$-B-Zellabfall am 3. Tag post SCI unterscheidet sich signifikant ($p = 0,0029$) zum vorangegangenen Untersuchungszeitpunkt (1 d. p. SCI). Darüber hinaus steigen die CD45 RA$^+$-B-Lymphozyten ab Tag 3 zu den Tagen 7 ($p < 0,0001$) und 14 ($p < 0,0001$) insgesamt signifikant an.

4.2.4 Die zelluläre adaptive Immunantwort der CD3$^+$-T-Lymphozyten im Rattenblut

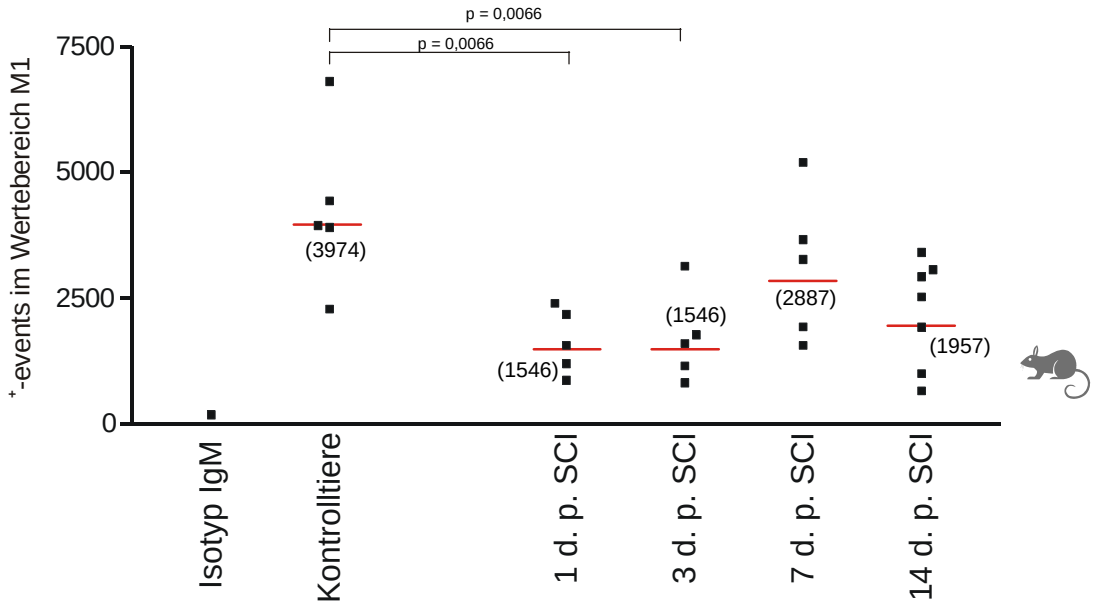

Abbildung 45: Zeitkinetik der CD3$^+$-T-Lymphozyten im Rattenblut

Die CD3$^+$-T-Lymphozytenzahlen unterschreiten ähnlich wie die CD45 RA$^+$-B-Lymphozytenzahlen an jedem Untersuchungszeitpunkt die Referenzwerte der Kontrolltiere. Die CD3$^+$-T-Lymphozytenzahlen fallen bereits am ersten Tag post SCI auf etwa ein Drittel ihrer Ausgangswerte ab. Dieser und der Tag 3 nach der Rückenmarksverletzung markieren das Minimum der CD3$^+$-T-Zellanzahl. Es scheint als steigen die CD3$^+$-T-Lymphozytenzahlen bis zum 7. Tag post SCI leicht an. 14 Tage nach der Rückenmarksverletzung ist scheinbar ein erneuter Zellzahleinbruch der CD3$^+$-T-Zellen zu detektieren.

Eine signifikante Reduktion der CD3$^+$-T-Lymphozytenzahlen gegenüber den Kontrolltieren ist am 1. und 3. Tag post SCI mit jeweils p = 0,0066 zu erkennen.

4.2.5 Die zelluläre Immunantwort der MHC II$^+$-Population im Rattenblut

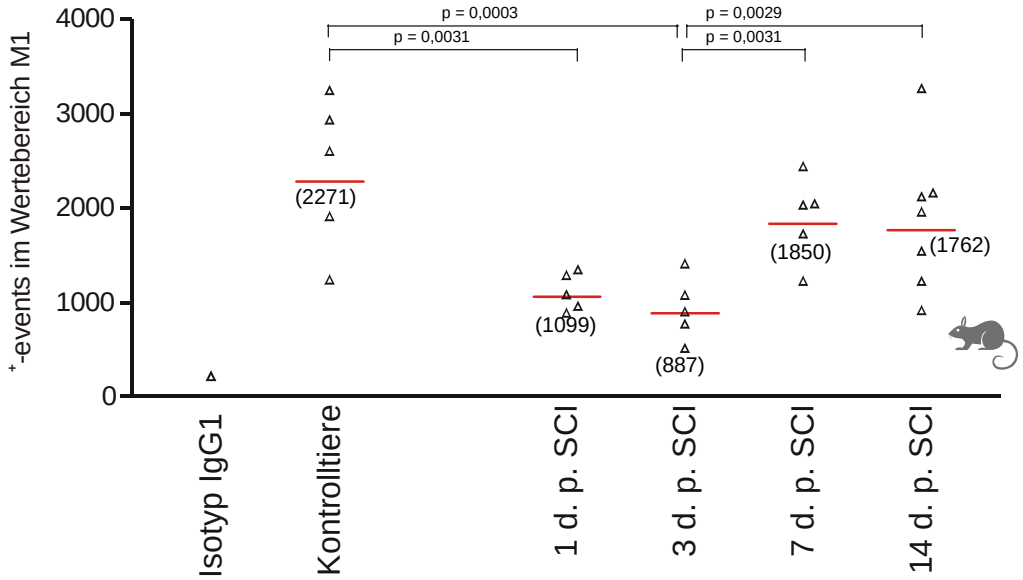

Abbildung 46: Zeitkinetik der MHC II$^+$-Population im Rattenblut

Die MHC II$^+$-Zellzahlen erreichen ähnlich wie die lymphozytären Populationen im Verlauf der Untersuchung die Ausgangswerte der Kontrolltiere nicht. Bereits am 1. Tag post SCI wird eine deutliche Abnahme der MHC II$^+$-Zellzahlen gemessen, die sich bis zum Minimum am 3. Tag post SCI fortsetzt. Am Ende der ersten Woche (7 d. p. SCI) ist ein Anstieg der MHC II$^+$-Zellzahl gegenüber der vorausgegangenen Messungen zu beobachten. Dieses Zellzahlniveau der MHC II$^+$-Population ist bis 14 Tage nach der Rückenmarksverletzung erhöht.

Die ermittelten Zellzahlen der MHC II$^+$-Population des 1. und des 3. Tages post SCI unterscheiden sich mit p = 0,0031 und p = 0,0003 signifikant von den gemessenen Zellzahlen der Kontrolltiere. Mit einem p-Wert von 0,0031 und 0,0029 unterscheidet sich der Anstieg der MHC II$^+$-Zellzahlen am 7. und 14. Tag post SCI signifikant von den Ergebnissen drei Tage post SCI.

4.2.6 Die zelluläre Immunantwort der OX-62$^+$-dendritischen Zellen im Rattenblut

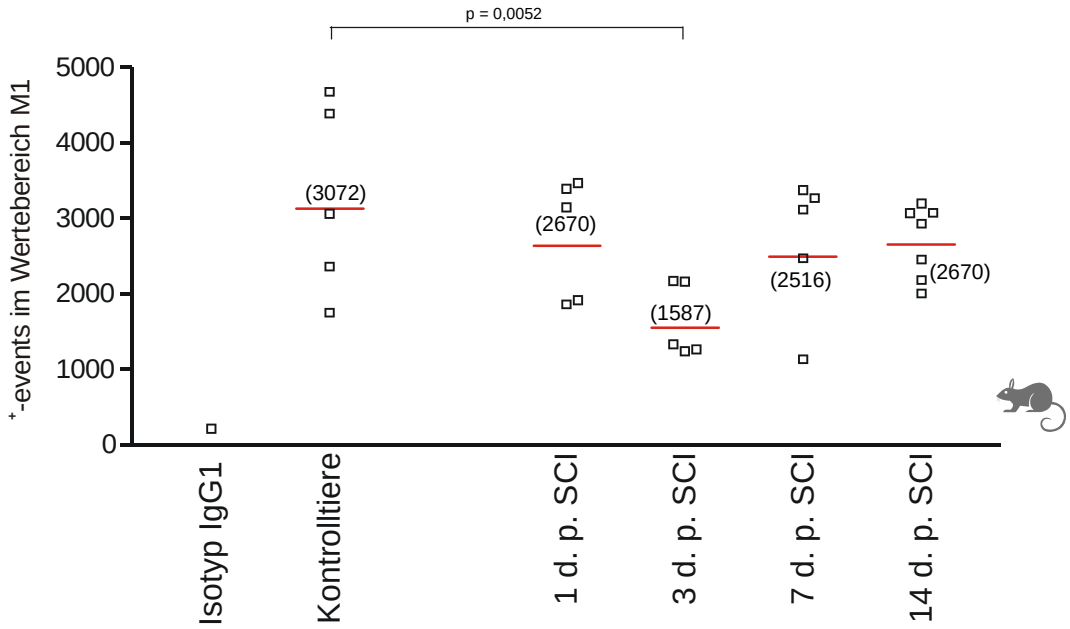

Abbildung 47: Zeitkinetik der OX-62$^+$-Dendritischen Zellen im Rattenblut

Die Zeitkinetik der OX-62$^+$-Population scheint über den gesamten Beobachtungszeitraum einen anhaltenden Abfall der OX-62$^+$-Zellzahlen zu zeigen. Mit Ausnahme des 3. Tages post SCI (Minimum) zeigt der zeitliche Verlauf der OX-62$^+$-Zellen nur geringe dynamische Schwankungen.

Die gemessene Anzahl der OX-62$^+$-dendritischen Zellen am 3. Tag post SCI unterscheidet sich signifikant von den Resultaten der Kontrolltiere mit $p = 0,0052$.

4.2.7 Die zelluläre Immunantwort der CD45$^+$-Gesamtleukozyten im Rattenblut

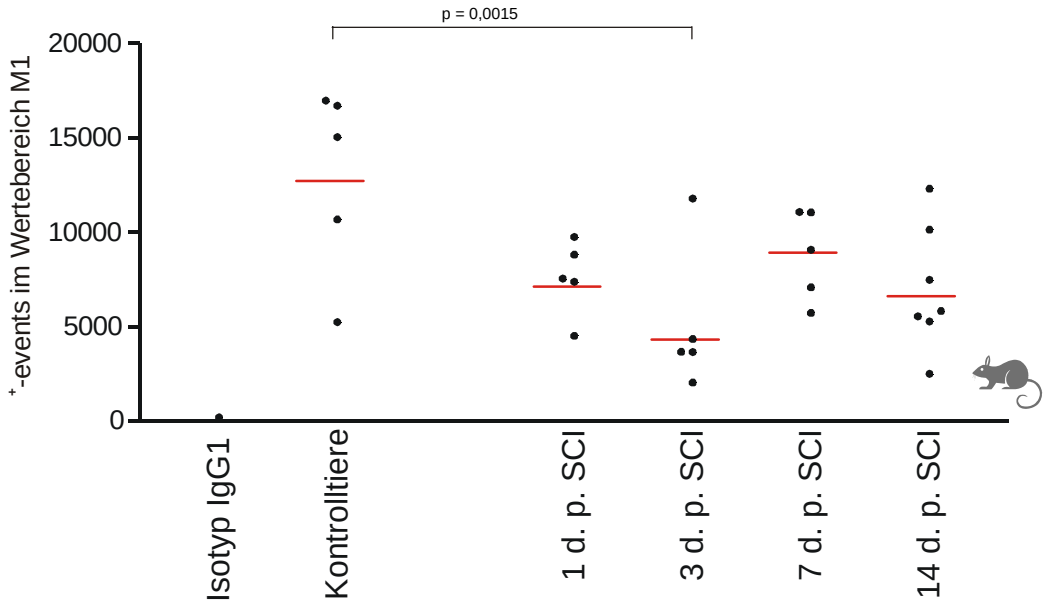

Abbildung 48: Zeitkinetik der CD45$^+$-Gesamtleukozyten im Rattenblut

Die CD45$^+$-Gesamtleukozytenzahlen der SCI-Tiere scheinen über den gesamten Untersuchungszeitraum gegenüber den Kontrolltieren geringere Zellzahlen aufzuweisen. Die CD45$^+$-Gesamtleukozytenzahlen der SCI-Tiere zeigen lediglich am 3. Tag eine signifikante Reduzierung post SCI mit p = 0,0015 gegenüber den Referenzwerten der Kontrolltiere. Die CD45$^+$-Gesamtleukozytenzahlen scheinen sich nach einer Woche (7 d. p. SCI) leicht erholt zu haben, ohne die Ausgangswerte der Kontrolltiere zu überschreiten.

5 Diskussion

Mit dieser Studie wurde die hämatologische zelluläre inflammatorische Immunreaktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems auf eine Rückenmarksverletzung zum einen mit einer klinischen Studie, zum anderen mit einer tierexperimentellen Studie dargestellt.

Zur Charakterisierung der distinkten Zellpopulationen haben wir uns der in der Hämatologie gebräuchlichen Methode der Fluoreszenzzytometrie (FACS) von Leukozyten bedient. In der gegenwärtigen Literatur liegen bislang keine vergleichbaren Daten vor, die das Immungeschehen nach einer Rückenmarksverletzung im Blut charakterisieren. Wir etablierten deshalb für eine Querschnittsverletzung die FACS-Analyse zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der hämatologischen, zellulären Immunreaktion im Blut. Die Mehrheit der Erkenntnisse über die Wirkung und Funktion der Entzündung nach der Traumatisierung des Rückenmarks geht aus experimentellen Untersuchungen an der Ratte hervor[42]. Die Ergebnisse aus diesen Studien wurden bislang noch nicht mit dem Geschehen beim Menschen verifiziert. Wir stellen deshalb den humanen Ergebnissen die Resultate des experimentellen Tiermodells gegenüber, das die Option einer entzündungsmodulierenden Intervention bietet. Die folgende Diskussion konzentriert sich auf die Zellpopulationen des angeborenen und adaptiven Immunsystems insbesondere die Ergebnisse, für die ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden konnte.

5.1 Die klinische Studie am Patienten

Das Ziel dieser Studie war nicht die singuläre Darstellung oder Differenzierung nach Verletzungsausmaß, Geschlecht oder Alter, sondern die Ermittlung der Zeitkinetik der gesamten zellulären Entzündungsreaktion im Blut nach einer Rückenmarksverletzung. Unsere Ergebnisse zeigen die tatsächliche stattfindende, inflammatorische Zeitkinetik nach einer Rückenmarksverletzung

im Blut des Patienten, einschließlich der immunmodulatorisch wirksamen Faktoren wie beispielsweise des operativen Eingriffs, der intensivmedizinischen Betreuung sowie der standardisiert hochdosierten, immunsuppressiven Methylprednisolon-Therapie.

5.1.1 Die zelluläre hämatologische angeborene Immunantwort in der klinischen Studie

Die Neutrophilen stellen die größte Subpopulation der Granulozytenspezies dar, die nach einer Rückenmarksverletzung als erste Entität des unspezifischen Immunsystems in die verletzte Region einwandern. Bereits am Unfalltag sind erhöhte $CD15^+$-Granulozytenzahlen zu messen, die auf einem erhöhten Niveau bis zu einer Woche verbleiben. Hingegen unter experimentellen Bedingungen eine erhöhte Granzulozytenanzahl, beschränkt auf die ersten drei bis vier Tage nach der Verletzung nachgewiesen werden konnte[15,61]. Eine granulozytäre Linksverschiebung, wie sie sich beispielsweise bei einer akuten Infektion einstellt, gilt für unsere gemessenen $CD15^+$-Granulozytenzahlen als nahezu ausgeschlossen, da Granulozytenvorläuferzellen keine CD15-Oberflächenepitope exprimieren.

Ebenfalls unterscheidet sich der zeitliche Verlauf der hämatogenen Monozyten in der akuten Phase von dem Auftreten der Monozyten / Makrophagen im Parenchym. Während die parenchymalen Monozyten / Makrophagen in der Läsion bereits ab dem zweiten Tag nach einer Rückenmarksverletzung deutlich ansteigen[8,15,57], zeigen unsere Messungen der hämatogenen $CD14^+$-Monozytenzahlen gar einen deutlichen Abfall (bis auf die Hälfte der Referenzwerte) zu den frühen Untersuchungszeitpunkten (Unfalltag, 3-4 d. p. SCI). Den Gipfel der $CD14^+$-Monozytenzahlen im Blut bildet der Messzeitpunkt zwischen dem sechsten bis achten Tag post SCI, wobei das Zellzahlniveau nach einem Monat gegenüber den Ausgangswerten der Kontrollpatienten noch erhöht ist. In Übereinstimmung dazu konnte im Jahr 2003, Popovich et al allerdings unter experimentellen Versuchsbedingungen das zahlenmäßige Überwiegen von aus dem Blut stammenden Monozyten am siebten Tag, nach

Rückenmarkskontusion gegenüber den ortsständigen parenchymalen monozytären Zellen im Entzündungsherd demonstrieren[53]. Demzufolge wird insbesondere am Ende der ersten Woche nach einer Querschnittsverletzung der Anteil parenchymaler monozytärer Populationen durch die Invasion aus dem Blut stammender Monozyten angereichert, was durch das erhöhte Angebot der hämatogenen $CD14^+$-Monozyten unterstützt werden könnte.

Eine erhöhte Anzahl $CD14^+$-Monozyten ist im Vollblut bis zu einem Monat nach dem Rückenmarkstrauma detektierbar. Die Rolle der infiltrierenden und ortsständigen monozytären Zellen wird bis heute kontrovers diskutiert. So steht einer toxischen Wirkung (Sezernierung von proinflammatorisch wirksamen Mediatoren) eine proregenerative Wirkung (Freisetzung von Wachstumsfaktoren) gegenüber. Insbesondere wird den hämatologischen Monozyten eine proentzündliche Wirkung zugeschrieben, weshalb bei ihrer Depletion eine abgeschwächte Demyelinisierung manifestiert werden kann[3,24,51]. Darüber hinaus konnte im Serum von Querschnittsgelähmten bis in das chronische Stadium (> zwölf Monate) ein persistent erhöhter Spiegel von TNFα nachgewiesen werden[32]. TNFα, das überwiegend von Monozyten / Makrophagen freigesetzt wird, gilt als Haupteffektor der stattfindenden Demyelinisierung. Im Gegensatz zu diesen Wirkungen steht der axonregenerative Effekt von in vitro aktivierten und anschließend autolog transplantierten Makrophagen[25,50,59,65] sowie eine Neuroprotektion des TNFα im subakuten Stadium nach einer Rückenmarksverletzung[1]. Unsere ermittelten $CD14^+$-Monozytenzahlen besonders im chronischen Zeitraum nach einer Rückenmarksverletzung deuten auf ein prolongiertes Entzündungsgeschehen unter Teilnahme der adaptiven zellulären Abwehr hin.

5.1.2 Die zelluläre hämatologische adaptive Immunantwort und seiner Korezeptoren in der klinischen Studie

Das adaptive Immunsystem zeigt ähnlich wie die $CD14^+$-Monozyten an den beiden ersten Untersuchungszeitpunkten (Unfalltag, 3-4 d. p. SCI) eine deutliche Zellzahlsubpression auf. Daraufhin erreichen die $CD19^+$-B-

Lymphozytenzahlen ihr Maximum bereits früh nach ihrer Subpression zwischen dem sechsten bis achten Tag nach einer Rückenmarksverletzung. Den Gipfel der $CD3^+$-T-Lymphozytenzahlen bilden erst die Tage 25-30 post Trauma.

Die Patienten unterliegen aufgrund ihrer Verletzungsschwere zumeist dem „Post-Aggressions-Syndrom“. Kennzeichnend für dieses Syndrom sind seine katabole Stoffwechsellage, Störungen des Zellstoffwechsels mit Azidose und Kaliumausscheidung sowie Durchblutungsstörungen und Blutgerinnungsstörungen. Dadurch werden aufgrund der reaktiv erhöhten Nebennierenrindenaktivität vermehrt Glukokortikoide ausgeschüttet. Die verstärkte Freisetzung des endogenen Kortisols und Kortisons kann deshalb zur Lymphozytopenie mit daraus folgender Immunsuppression beitragen. Mit tierexperimentellen Untersuchungen konnte eine bis zu 28 Tage bestehende Immunsuppression durch anhaltend erhöhte endogene Kortikosteroid-Spiegel nachgewiesen werden[56]. Unsere gemessene supprimierte Anzahl der $CD19^+$-B-Zellen und der $CD3^+$-T-Lymphozyten an den frühen Untersuchungszeitpunkten beim Patienten kann einen möglichen Hinweis auf eine transiente Immunsuppression nach einer Rückenmarksverletzung geben[76]. Vergleichbare Immunsuppressions-Effekte können auch durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems nach experimentellem Hirnarterienverschluss beobachtet werden[58]. Der supprimierende Prozess wird durch die standardisiert hochdosierte Gabe von Methylprednisolon (Glukokortikoid) unterstützt, das das neurologische Regenerationspotential durch Neuro- und Gliaprotektion verbessern soll. Dieses exogen zugeführte Medikament übt wie oben beschrieben seine Schutzfunktion unter anderem mittels Hemmung der Lipidperoxidation des Kalzium-Einstroms, der Ischämie, der Entzündung und des Ödems aus[5,6,16,36]. Unsere Resultate erlauben keine Unterscheidung der Effekte des endogenen oder exogenen Glukokortikoids. Zur Beantwortung dieses Aspekts wurden die tierexperimentellen Ansätze durchgeführt (s. Seite 54). Andere Gruppen beobachteten ebenfalls eine signifikante Abnahme der B-Zellen, hier aus dem Lymphknoten am Tag sieben nach einer experimentellen Kontusionsverletzung des Rückenmarks entnommen[56]. Die minimierten Zellzahlen im Lymphknoten könnten durch das Einwandern der Lymphozyten in

zentralnervöse Strukturen erklärt werden. Dadurch könnte das Maximum der $CD19^+$-B-Lymphozyten nach der ersten Woche, durch die sich auf dem Weg ins Gewebe befindlichen B-Lymphozyten erklären lassen.

Die T-Lymphozyten erreichen ihre maximalen Zellzahlen in der verletzten Rückenmarksregion bereits am siebten Tag nach experimenteller Kontusionsverletzung und verbleiben bis zu 28 Tage[57] auf einem erhöhten Zellzahlniveau. Die $CD3^+$-T-Lymphozyten im Blut erreichen dagegen ihr Maximum erst am Ende des ersten Monats (25-30 d. p. SCI) um daraufhin über mehrere Monate auf einem erhöhten Niveau zu verbleiben. Das ZNS zählt neben Augen, Hoden und Uterus zu den immunprivilegierten Organen, die unter physiologischen Bedingungen aufgrund dieser Eigenschaft nicht von Lymphozyten attackiert werden[37]. Im Rahmen eines ZNS-Traumas werden infolge der Gewalteinwirkung neuronale Gewebestrukturen sowie das basische Myelinprotein freigelegt und von Antigen präsentierenden Populationen, den Makrophagen, phagozytiert. Darüber hinaus kommt es zur Aufhebung der Blut-Hirn-Schranke (BHS)- Barriere-Funktion, wodurch es hämatogenen Leukozyten ermöglicht wird, in die geschädigte ZNS-Region einzudringen. Die Verletzung von zentralnervösen Strukturen gestattet es nun, dass aktivierte T-Lymphozyten am Läsionsort akkumulieren können und auf die ihnen von Mikroglia / Makrophagen präsentierten Autoantigene treffen[38,40,55] und daraufhin zu autoreaktiven T-Lymphozyten werden. Diese autoreaktiven T-Zellen können das ZNS direkt attackieren oder indirekt durch Monozyten- / Makrophagen-Stimulation schädigen, weshalb ihnen eine stark destruierende Komponente im Rahmen des Sekundärprozesses zugeschrieben wird[29,38,55]. Der Beitrag von autoreaktiven T-Lymphozyten zur Entwicklung des Sekundärschadens nach einer Querschnittsverletzung konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Man geht davon aus, dass autoreaktive, gegen MBP gerichtete T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-vermittelten Demyelinisierung spielen[44]. Im Gegensatz dazu belegen Studien über T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen, dass nur weniger als 5% der lymphozytären Zellen Myelin autoreaktiv sind[10] sowie diese neuroprotektive Eigenschaften tragen[46,63]. Überdies gelang es, die T-Zell vermittelte Immunantwort als eine nützliche,

jedoch insuffiziente, physiologisch vorkommende Autoimmunreaktion darzustellen, die im Stande ist, den Sekundärschaden einzudämmen[78].

Eine Option, den sekundären Schaden zu minimieren, um das neurologische Regenerationspotential zu verbessern, besteht durch eine aktive therapeutische Immunisierung mit MBP, die die neuroprotektive Eigenschaft der MBP-reaktiven-T-Lymphozyten propagiert[30,31]. Die über mehrere Monate im Patientenblut erhöhten $CD3^+$-T-Lymphozytenzahlen stellen eine persistierende Immunreaktion dar.

Die MHC II^+-Zellpopulation (Korezeptor des adaptiven Immunsystems) erfährt als Immunkompetenzindikator zunächst einen Zellzahlrückgang am Unfalltag und 3-4 d. post SCI. Nach der primären Subpression steigen die MHC^+-Zellzahlen daraufhin auf ein erhöhtes Zellzahlniveau an, welches bis zu einem Vierteljahr (105-136 d. p. SCI) nach der Verletzung aufrecht erhalten wird. Unser Ergebnis deutet auf die Möglichkeit hin, dass die anwesenden, gemessenen $CD14^+$-Monozyten, dendritischen Zellen sowie $CD19^+$-B-Lymphozyten eine über mehrere Monate persistierende Antigenpräsentation unterhalten können. Diese These unterstützen zudem erhöhte Neuroantikörpertiter (anti-MAG, anti-GM1) im Blut bis zu einem Jahr nach Rückenmarksverletzung[32].

5.2 Die tierexperimentelle Studie an Ratten

Experimentelle Tierstudien zeichnen sich durch ihre gute Reproduzierbarkeit, standardisierte Untersuchungsbedingungen sowie ihren vielfältigen Interventionsmöglichkeiten aus. Die genetische Identität der Tiere erlaubt es, homogene Ergebnisse zu erwarten, die den Einsatz einer kleineren Anzahl von Versuchstieren ermöglicht. Bereits geringe Differenzen der Messparameter können deshalb als signifikant detektiert werden. Im experimentellen Teil der Studie verzichteten wir auf die beim Patienten übliche hochdosierte, immunsupprimierende Glukokortikoid-Therapie. Die Tiere erhielten lediglich gegen Schmerzen (Temgesic) sowie zur Unterstützung ihrer Kreislaufsituation

(Plasmaexpander) und Ernährung (essentielle Vitamine und Aminosäuren) Medikamente, von denen keine immunologischen Nebenwirkungen bekannt sind.

Mit dieser Untersuchung stellen wir das natürlich ablaufende, unbeeinflusste, physiologische, zelluläre Entzündungsgeschehen des angeborenen und adaptiven Immunsystems nach einer Rückenmarksverletzung im Blut der Ratte komplementär zu der Untersuchung beim Menschen dar.

Der operative Eingriff bedeutet für die Tiere eine starke stressbedingte Belastung. Unter Berücksichtigung der tierexperimentellen Ergebnisse mit ihrer über den gesamten Beobachtungszeitraum ausgeprägten Leukopenie kann man eine Entwicklung vergleichbar mit der des „Systemischen Inflammatorischen Syndroms“ (engl. SIRS) annehmen. Dieses Syndrom kann beim Menschen nach schwerwiegenden Traumen oder Infektion mit Fieber oder Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe, Leukozytose oder Leukopenie auftreten. Als Ausdruck eines möglichen vorhandenen „Inflammatorischen Syndroms“ zeigen die Tiere unter unserer visuellen Kontrolle am dritten Tag nach der operativen Hemitranssektion des Rückenmarks noch bestehende Zeichen von Trägheit und einen zusätzlichen Zellzahleinbruch aller gemessenen Parameter an diesem Tag.

5.2.1 Die zelluläre hämatologische angeborene Immunantwort in der tierexperimentellen Studie

Die HIS48^{+}-Granulozytenzahlen zeigen einen Tag post SCI keine Veränderung. Das erst sehr späte HIS48^{+}-Granulozytenmaximum im Blut nach 14 Tagen ist überraschend, da deren Anstieg im läsionalen Gewebe bereits am Tag 1 stattfindet[15,61].

Monozyten sind in der Lage, neutrophile Granulozyten mittels sezernierter proinflammatorischer Mediatoren aus dem Knochenmark herauszutreiben[38]. Die ermittelte Zeitkinetik der ED1^{+}-Monozyten mit erhöhtem Zellzahlniveau zu den späten Untersuchungszeitpunkten könnte so zu dem späten Gipfel der HIS48^{+}-Granulozytenzahlen im Blut beitragen.

Die ED1$^+$-Monozytenzahlen weisen ein Maximum bereits einen Tag nach der Rückenmarkshemitranssektion auf. Am darauffolgenden Blutabnahmezeitpunkt fällt die Anzahl der ED1$^+$-Monozyten auf nahezu Ausgangswertniveau der Kontrolltiere, um bis am Tag 14 auf einem erhöhten Zellzahlniveau zu persistieren. Tierexperimentelle Studien konnten einen Anstieg der läsionalen parenchymalen Monozyten / Makrophagen erst ab dem 2. Tag nach Rückenmarksverletzung demonstrieren[8,15,57]. Im Blut hingegen wird bereits 1 d. p. SCI das ED1$^+$-Monozytenmaximum erreicht. Der anhaltend destruierende Sekundär-Prozess mit seiner progressiven Demyelinisierung, der vorwiegend von den parenchymalen Monozyten / Makrophagen des Entzündungsherdes verursacht wird, geht bereits aus zahlreichen experimentellen Beobachtungen hervor[4,23,52]. Insbesondere die persistent erhöhte Anzahl der ED1$^+$-Monozyten in der subakuten Entzündungsphase im Blut sind Kandidaten, die nach ZNS Besiedlung einen Beitrag zur Unterhaltung des progressiv schädigenden Sekundarschadens leisten können. Im Gegensatz dazu beweisen Studien, dass aktivierte Makrophagen neuroregenerative Effekte aufweisen können[50,59,63,65]. Die gemessenen ED1$^+$-Monozytenzahlen lassen wie in der klinischen Studie keine Aussage über ihre Aktivität oder einem Überwiegen der neuroprotektiven oder neurodegenerativen Komponente zu. Jedoch sollten entgegen bisherigen Untersuchungen pharmakologische tierexperimentelle Interventionsstudien das chronische Stadium nach einer Querschnittsverletzung in ihrem Therapieschema zukünftig berücksichtigen, da läsionsinduzierte pathopysiologische Veränderungen in diesem Zeitraum bislang keine Beachtung fanden.

5.2.2 Die zelluläre hämatologische adaptive Immunantwort und seinen Korezeptoren in der tierexperimentellen Studie

Das adaptive Immunsystem mit seinen Korezeptoren der Antigen präsentierenden Zellen der Ratte zeigt über den gesamten Beobachtungszeitraum eine Suppression der CD45 RA$^+$-B-Lymphozyten, CD3$^+$-T-Lymphozytenzahlen, MHC II$^+$-Zellen und der OX-62$^+$-dendritischen Zellen.

Bereits am ersten und dritten Tag nach der Rückenmarksverletzung fallen die Zellzahlen bis auf weniger als ein Drittel der Referenzwerte ab. Der Untersuchungszeitpunkt am Ende der ersten Woche (7 d. p. SCI) markiert für die CD45 RA^+-B-Zellzahlen, die $CD3^+$-T-Zellzahlen und die MHC II^+-Zellzahlen der SCI-Tiere das Maximum, in dem sie bis auf mehr als die Hälfte der Ausgangswerte der Kontrolltiere ansteigen.

Mit Hilfe tierexperimenteller Untersuchungen konnte bedingt durch vermehrte Freisetzung von Stresshormonen eine Immunsuppression bereits nachgewiesen werden[14,58]. Die Ratten mit einer operativen Hemitranssektion des Rückenmarks unterliegen demnach aufgrund des hohen Verletzungsausmaßes einer gesteigerten Ausschüttung von Stresshormonen und somit einer Immunsuppression. Die supprimierten Zellzahlen in unserer tierexperimentellen Studie insbesondere des spezifischen Immunsystems und der Antigen präsentierenden Populationen könnten demnach auf einen immunsupprimierenden Effekt nach einer Rückenmarksverletzung hindeuten. Zusätzlich wird die These der Immunsuppression durch die Beobachtung von bis zu vier Wochen erhöhtem endogenen Kortikosteroidspiegel im Serum von Ratten unterstützt[56]. Die im Blut supprimierten CD45 RA^+-B-Lymphozytenzahlen, $CD3^+$-T-Lymphozytenzahlen, MHC II^+-Zellzahlen und die OX-62^+-dendritischen Zellzahlen im Tiermodell geben entgegen der Studie am Patienten keinen Hinweis auf eine persistierende Entzündung. Beispielhaft lassen sich mit Hilfe der hämatologisch zellulären Immunantwort beträchtliche Unterschiede zwischen dem Nager und dem Menschen darstellen. Für den Fall einer überwiegend protektiven Rolle der Lymphozyten könnten besonders Tiere mit langzeitig ausgeprägter Immunsuppression durch die aktive therapeutische Immunisierung mit MBP profitieren. Es gilt daher, in weiterführenden Untersuchungen den protektiven Wirkungsmechanismus der MBP-reaktiven-T-Zellen aufzuschlüsseln. Als ein Effektormechanismus gilt die Ausschüttung von Neurothrophinen[2,47,70], die neuroregenerative Eigenschaften moderieren können.

Die hämatogenen MHC II^+-Zellzahlen zeigen nach einem anfänglichen Rückgang (1. und 3. Tag post SCI) zum Ende der ersten Woche (7 d. p. SCI) einen Anstieg bis auf ca. drei Viertel der Referenzwerte, ohne diese jedoch zu

überschreiten. Die MHC II^+-Population kann dieses Zellzahlniveau dann bis zum Studienende aufrecht erhalten. Die läsionale Akkumulation der MHC II^+-Population im Parenchym erreicht nach experimenteller Rückenmarksläsion am dritten Tag das Maximum und verbleibt auf diesem Niveau bis zu 14 Tage[57]. Im Gegensatz zu der ermittelten Zeitkinetik beim Patienten geben die Tierergebnisse mit der supprimierten MHC II^+- Zellzahl im Blut keinen Hinweis auf eine persistente Antigenpräsentation dieser Population.

Eine Zellzahlsuppression ist auch bei den OX-62^+-dendritischen Zellen im Blut der Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum zu detektieren, die am dritten Tag post SCI das Minimum erreicht. Unser Ergebnis der erniedrigten Anzahl hämatogener OX-62^+-dendritischer Zellen als potente Antigenpräsentatoren spricht deshalb nur für eine geringe Chance der Entwicklung einer autoreaktiven Erkrankung nach einer Rückenmarksverletzung[3,48].

5.2.3 Die zelluläre hämatologische Immunantwort der $CD45^+$-Gesamtleukozyten in der tierexperimentellen Studie

Die $CD45^+$-Gesamtleukozyten zeigen an jedem Untersuchungszeitpunkt verringerte Zellzahlen gegenüber den Kontrolltieren. Die Anzahl der $CD45^+$-Gesamtleukozyten fällt am 3. Tag post SCI auf das Minimum (bis auf 1/3 der Referenzwerte der Kontrolltiere), was als Ausdruck des oben beschriebenen inflammatorischen Syndroms angesehen werden kann. Die Immunreaktion der $CD45^+$-Gesamtleukozyten im tierexperimentellen Teil unserer Studie mit den supprimierten Zellzahlen im Blut zeigt im Vergleich zur Untersuchung am Patienten eine schwächere Ausprägung.

5.3 Schlussfolgerung

Bei akut rückenmarksverletzten Patienten und Tieren (Unfalltag bis Mitte der ersten Woche) im Besonderen ist die adaptive Immunreaktion mit ihren Korezeptoren supprimiert (selektive zelluläre Suppression des adaptiven Immunsystems durch die verminderte Anzahl von B- und T-Lymphozyten inklusive der MHC II^+-Population im Blut). Auf der einen Seite stellt die Immunsuppression eine Gefahr für eine schwere Infektion (Pneumonie, Zystitis) durch Mikroorganismen der Traumatisierten dar, auf der anderen Seite verringert sie die Chance einer Autoantigen gesteuerten Demyelinisierung. Unsere Daten geben möglicherweise einen Hinweis darauf, dass eine in der akuten Phase der Verletzung einsetzende, das adaptive Immunsystem stimulierende, insbesondere Monozyten / Makrophagen und T-Lymphozyten, Therapie einen Vorteil für den Patienten, haben könnte. Insbesondere durch aktivierte Monozyten / Makrophagen und T-Lymphozyten können neuroprotektive und neuroregenerative Effekte erzielt werden [11,45,63,64]. Unsere Daten deuten auf eine denkbare, frühzeitig einsetzende, prophylaktische Gabe von antibakteriell wirksamen Substanzen, die mögliche infektiöse Komplikationen eindämmen können. Die Vermeidung dieser Komplikationen würde unweigerlich zu einer Senkung der Hospitalisierung und damit Senkung der Kosten führen. Die Zellzahlen der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort im humanen Vollblut zeigen einen deutlichen Anstieg zwischen dem sechsten und achten Tag nach Rückenmarksverletzung. Ebenso kann nach einer experimentellen Rückenmarksläsion in Folge supprimierter Zellzahlen eine leichte Erholung der Zellzahlen des angeborenen und adaptiven Immunsystems im Blut sieben Tage nach der Operation beobachtet werden. Der dynamische Verlauf der Entzündungsreaktion im Blut eilt somit der im Parenchym nicht voraus (welcher in experimentellen Studien mit einem Maximum der Immunantwort zwischen dem dritten und siebten Tag nach der Querschnittsverletzung klassifiziert werden konnte), sondern eilt diesem gar hinterher[4,8,15].

Unsere Daten geben einen möglichen Hinweis auf die hierfür wesentliche Barriere-Funktion der BHS, da sie für die Passage aus dem Blut stammender, in das ZNS-Parenchym infiltrierender Zellen entscheidend ist. Die BHS, die im Rahmen des Verletzungsmechanismus stark geschädigt wird, weist am 3. und 28. Tag nach einer Kontusionsverletzung des Rückenmarks Permeabilitätsspitzen auf[54]. Demnach scheint das frühe Auftreten immunkompetenter Zellen im ZNS-Parenchym weitestgehend abgekoppelt vom hämatologischen Verlauf zu sein.

Der Anstieg der $CD100^{+}$-Population bereits am Unfalltag sowie deren persistierend erhöhtes Zellzahlniveau stellt somit einen Teil der gesamtzellulären Entzündungsantwort dar, die von den Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems moderiert wird. Die Hochregulation und Anwesenheit „Guidance“ aktiver Mitglieder der Semaphorin-Familie auf den Immunzellen im Blut kann damit nach einer Rückenmarksverletzung erstmals dargestellt werden.

Der Nachweis von erhöhten Autoantikörpern gegen Myelin und proinflammatorisch wirksamer Zytokine bei chronisch querschnittgelähmten Patienten führt zur Überlegung, ob eine Rückenmarksverletzung einen Auslösemechanismus einer späteren Autoantigen gesteuerten Demyelinisierung darstellt. Die anhaltend schwache Erhöhung der Gesamtleukozyten beim Menschen spricht für eine diskrete persistierende Entzündungsreaktion. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte jedoch noch keine Autoimmunerkrankung nach einer Rückenmarksverletzung diagnostiziert werden, was auf eine mögliche noch nicht näher identifizierte Resistenz-Entwicklung gegen eine Autoimmunerkrankung hindeuten könnte[41]. Die chronische Entzündungsreaktion im Besonderen ist dennoch putativ mit einer neurodegenerativen Wirkung vergesellschaftet. Die vorliegende Arbeit liefert daher erste grundlegende Daten über den wesentlichen Spezies spezifischen Unterschied der Immunreaktion im Blut nach einer Rückenmarksverletzung.

6 Zusammenfassung

Die Entzündungsantwort nach einer traumatischen Rückenmarksschädigung (SCI) kann das neurologische Regenerationspotenial maßgeblich beeinflussen. Unsere Studie untersucht die hämatologische, inflammatorische, zelluläre Immunreaktion nach einer Querschnittsverletzung.

Wir untersuchten qualitativ und quantitativ Zellzahlen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in einem Zeitraum zwischen 24 Stunden und 105-136 Tagen beim Patienten sowie zwischen 1 Tag und 14 Tagen nach einer Rückenmarksverletzung bei der Ratte. Patienten mit einem bevorstehenden elektiven Eingriff am Bewegungsapparat und scheinoperierte Tiere ohne Rückenmarksverletzung dienten als Kontrollgruppen. Mittels Fluoreszenzzytometrie wurden die distinkten Leukozytensubpopulationen identifiziert.

Die humane $CD15^+$-Granulozytenanzahl steigt als erste Zellpopulation an und erreicht ihr Maximum innerhalb der ersten drei bis vier Tage post SCI. Der Gipfel der $CD14^+$-Monozytenzahl wird eine Woche nach dem Trauma erreicht und verbleibt auf einem erhöhten Zellzahlniveau bis zu einem Monat. Die adaptive Immunreaktion des Patienten zeigt während der ersten Woche reduzierte $CD3^+$-T-Lymphozytenzahlen und $CD19^+$-B-Zellzahlen. Die adaptive Immunantwort der Tiere zeigt ähnlich wie des Menschen reduzierte Zellzahlen der $CD3^+$-T-Lymphozyten, CD45 RA^+-B-Lymphozyten, MHC II^+-Zellen in der akuten Phase nach der experimentellen Rückenmarksverletzung.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die hämatogene inflammatorische Reaktion, der im Parenchym nicht vorauseilt. Im Gegenteil, es kommt zu einer Suppression des adaptiven Immunsystems in der akuten Phase nach Rückenmarksverletzung. Unsere Studie stellt damit die Spezies spezifische Immunreaktion nach einer Rückenmarksverletzung im Blut dar.

7 Anhang

7.1 Verletzungsspektrum der rückenmarksverletzten Patienten

Patient	Alter in Jahren	Geschlecht	Verletzungs-höhe	Messzeitpunkte nach der Rückenmarks-verletzung	Nebendiagnose
Q1	29	Männlich	TH4	6-8 d. p. SCI 25-30 d. p. SCI 105-136 d. p. SCI	Klavikulafraktur li Rippenserienfraktur der 2.-6. Rippe re
Q2	51	Männlich	C5	105-136 d. p. SCI	
Q3	61	Weiblich	TH7	105-136 d. p. SCI	Schizzoaffektive Psychose
Q4	36	Männlich	TH4	105-136 d. p. SCI	Sternumfraktur Fraktur 3. Rippe li Karpaltunnel-Syndrom Posttraumatischer Diabetes mellitus
Q5	47	Männlich	L1	< 24 h. p. SCI 3-4 d. p. SCI 6-8 d. p. SCI 25-30 d. p. SCI	Posttraumatischer Diabetes mellitus
Q6	27	Männlich	TH12	25-30 d. p. SCI	Klavikulafraktur re Rippenserienfraktur der 9.-11. Rippe re Lungenkontusion
Q7	32	Männlich	C4	105-136 d. p. SCI	Pneumonie rechtsbasal
Q8	30	Weiblich	C7	3-4 d. p. SCI 6-8 d. p. SCI 25-30 d. p. SCI	Adipositas
Q9	32	Männlich	TH4	< 24 h. p. SCI 3-4 d. p. SCI 6-8 d. p. SCI 25-30 d. p. SCI 105-136 d. p. SCI	Klavikulafraktur re Skapulahalsfraktur re
Q10	69	Männlich	C7	6-8 d. p. SCI 25-30 d. p. SCI	Arterielle Hypertonie
Q11	22	Männlich	C6	3-4 d. p. SCI 6-8 d. p. SCI 25-30 d. p. SCI	
Q12	37	Männlich	TH10	<24 h p. SCI 3-4 d. p. SCI 6-8 d. p. SCI 25-30 d. p. SCI	Rippenserienfraktur der 5.-6. Rippe re und 6.-8. Rippe li Arterielle Hypertonie

Q13	22	Männlich	TH12	105-136 d. p. SCI	Oberarmkopffraktur
Q14	44	Männlich	L1	< 24 h. p. SCI 3-4 d. p. SCI 6-8 d. p. SCI	Rippenserienfraktur
Q15	30	Männlich	TH10	3-4 d. p. SCI 6-8 d. p. SCI	Lungenkontusion
Q16	37	Männlich	C6	< 24 h. p. SCI 3-4 d. p. SCI 6-8 d. p. SCI	

Tabelle 6:

C: cervical
TH: thorakal
L: lumbal
h. p. SCI: hours post Spinal Cord Injury
d. p. SCI: days post Spinal Cord Injury

7.2 Kontrollpatienten

Patient	Alter in Jahren	Geschlecht	Elektiveingriff	Neben-diagnose
K1	23	Männlich	Osteosynthese nach Sprunggelenksluxationsfraktur le	
K2	34	Männlich	Kniearthroskopie li	
K3	47	Männlich	Arthrodese des Sprunggelenks li	
K4	70	Weiblich	Kniearthroskopie re	
K5	41	Männlich	Innenmeniskusresektion Kniegelenk li	
K6	66	Weiblich	Metallentfernung li Tibia	Z. n. Herzinfarkt Osteoporose
K7	50	Männlich	Kniearthroskopie re	Penicillin-Allergie
K8	63	Weiblich	Osteotomie des Metatarsale 1	
K9	53	Männlich	Metallentfernung li Unterschenkel	Z. n. Koronar-Bypass
K10	69	Männlich	Spondylodese von Lendenwirbelkörper 1-Lendenwirbelkörper 3	Adipositas

Tabelle 7:

8 Literaturverzeichnis

1. Allan SM, Rothwell NJ, Cytokines and acute neurodegeneration. Nature Reviews 2001;2:734-744.

2. Allan SM, The role of pro- and antiinflammatory cytokines in neurodegeneration Ann N Y Acad Sci. 2000;917:84-93.

3. Blight AR, Effects of silica on the outcome from experimental spinal cord injury: implication of macrophages in secondary tissue damage. Neuroscience 1994;60:263-273.

4. Blight AR, Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. J. Neurotrauma 1992;9:83-91.

5. Bracken MB, Holford TR, Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. J. Neurosurg.1993;79:500-507.

6. Bracken MB, Methylprednisolone and acute spinal cord injury. Spine 2001;26:S47-S54.

7. Brösamle C, McDonald JW, Zukunftstherapien bei Rückenmarkverletzung. Spektrum der Wissenschaft 2000;2:26-35.

8. Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L, Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. Exp. Neurol.1998;151:77-88.

9. Cravens PD, Lipsky PE, Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. Immunology and Cell Biology 2002;80:497-505.

10. Cross AH, Cannella B, Brosnan CF, Raine CS, Homing to central nervous system vasculature by antigen specific lymphocytes. I. Localization of 140C-labeled cells during acute and chronic, and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Lab Invest 1990;63:162-170.

11. Danton GH, Dietrich WD; Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2003;62:127-136.

12. Dargel R, Entzündung: Grundlagen-Kinetik-Therapie, Ullstein Mosby; 1995.

13. Delaire S, Elhabazi A, Bensussan A, Boumsell L, CD100 is a leukocyte semaphorin. Cell. Mol. Life Sci. 1998;54:1265-1276.

14. Dhabhar FS, McEwen BS, Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999;96:1059-1064.

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

16. Fehlings MG, Editorial: Recommendations regarding the use of methylprednisolone in acute spinal cord injury. Spine 2001;26:S56-S57.

17. Fischer HG, Reichmann G, Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. J . Immunol. 2001;166:2717-2726.

18. Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J, Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. J. Neuroscience 1999;19:8182-8198.

19. Gabriel JM, Erne B, Miescher GC, Miller SL, Vital A, Steck AJ, Selective loss of Myelin-associated glycoprotein from myelin correlates with anti-MAG antibody titre in demyelination paraproteinaemic polyneuropathy. Brain 1996;119:775-787.

20. Genain CP, Cannella B, Hauser S, Raine CS, Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. Nature Medicine 1999;5:170-175.

21. Gerner HJ, Die Querschnittlähmung: Erstversorgung, Behandlungsstrategie, Rehabilitation Blackwell Wissenschaft, 1992.

22. Giulian D, Chen J, Ingeman JE, George JK, Noponen M, The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. J. Neuroscience 1989;9:4416-4429.

23. Giulian D, Corpuz M, Chapman S, Mansouri M, Robertson C, Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. J. Neurosci. Res. 1993;36:681-693.

24. Giulian D, Robertson C, Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. Ann. Neurol. 1990;27:33-42.

25. Guth L, Zhang Z, DiProspero N, Joubin K, Fitch MT, Spinal cord injury in the rat: treatment with bacterial lipopolysaccharide and Indomethacin enhances cellular repair and locomotor function. Experimental Neurology 1994;126:76-87.

26. Hall ED, Free radicals and lipid peroxidation, 1405-1419
In: Narayan RK, Wilberger jr JE, Povlishock JT, Neurotrauma
Mc Graw-Hill Companies, Inc; 1996.

27. Hall KT, Boumsell L, Schultze JL, Boussiotis VA, Dorfmann DM, Cardoso AA, Bensussan A, Nadler LM, Freeman GJ, Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996;93:11780-11785.

28. Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Linda H, van der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F, Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurothrophin production by CNS and Natural Killer cells. J. Neurosci. 2000;20:5283-5291.

29. Hartung HP, Immune-mediated demyelination. Ann. Neurol. 1993;33:563-567.

30. Hauben E, Agranov E, Gothilf A, Nevo U, Cohen A, Smirnov I, Steinman L, Schwartz M, Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. J. Clin. Invest. 2001;108:591-599.

31. Hauben E, Butovsky O, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Leibowitz-Amit R, Pevsner E, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, Schwartz M, Passive or Active Immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. J. Neurosci. 2000;20:6421-6430.

32. Hayes KC, Hull TLC, Delaney GA, Potter PJ, Sequeira KAJ, Campbell K, Popovich PG, Elevated serum titers of proinflammatory cytokines and CNS autoantibodies in patients with chronic spinal cord injury. J. Neurotrauma 2002;19:753-761.

33. Hirota N, Kaji R, Bostock H, Shindo K, Kawasaki T, Mizutani K, Oka N, Kohara N, Saida T, Kimura J, The physiological effect of anti-GM1 antibodies on saltatory conduction and transmembrane currents in single motor axons. Brain 1997;120:2159-2169.

34. Hirschberg DL, Moalem G, He J, Mor F, Cohen IR, Schwartz M, Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specifity following central nervous system trauma. J. Neuroimmunol. 1998;89:88-96.

35. Hsu CY, Hu ZY, Doster SK, Cell-mediated injury, 1433-1444
In: Narayan RK, Wilberger jr JE, Povlishock JT, Neurotrauma
Mc Graw-Hill Companies, Inc; 1996.

36. Hulsebosch CE, Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. Adv Physiol Educ 2002;26:238-255.

37. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, Immunologie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, 2002.

38. Jones TB, Basso DM, Sodhi A, Pan JZ, Hart RP, MacCallum RC, Lee S, Whitacre CC, Popovich PG, Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury for autoimmune vaccine therapy. J. Neurosci. 2002;22:2690-2700.

39. Kikutani H, Kumanogoh A, Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells. Nature Rewies Immunology 2003;3:159-167.

40. Kil K, Zang YCQ, Yang D, Markowski J, Fuoco GS, Vendetti GC, Rivera VM, Zhang JZ, T cell responses to myelin basic protein in patients with spinal cord injury and multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 1999;98:201-207.

41. Kipnis J, Yoles E, Schori H, Hauben E, Shaked I, Schwartz M, Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetic encoded autoimmune response. J. Neurosci. 2001:21:4564-4571.

42. Known BK, Tetzlaff W, Spinal cord regeneration. Spine 2001;26:S13-S22.

43. Kumanogoh A, Kikutani H, The CD100-CD72 interaction: a novel mechanism of immune regulation. Trends in Immunology 2001;22:670-676.

44. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE, Immunological aspects of demyelinating diseases. Annu. Rev. Immunol. 1992;10:153-187.

45. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M, Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. Nature Medicine 1999;5:49-55.

46. Nakamura F, Kalb RG, Strittmatter SM, Molecular Basis of Semaphorin-mediated axon guidance. J. Neurobiol. 2000;44:219-229.

47. Otten U, Marz P, Heese K, Hock C, Kunz D, Rose-John S, Cytokines and neurothropins interact in normal and diseased states. Ann N Y Acad Sci. 2000; 917:322-330.

48. Pashenkov M, Teleshova N, Link H, Inflammation in the central nervous system: the role for Dendritic Cells. Brain Pathol. 2003;12:23-33.

49. Pasterkamp RJ, Verhaagen J, Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. Brain Res. 2001;35:36-54.

50. Perry VH, Brown MC, Gordon S, The macrophage response to central and peripheral nerve injury. J. Exp. Med. 1987;165:1218-1223.

51. Popovich PG, Guan Z, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT, Depletion of haematogenous macrophages promote partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. Experimental Neurology 1999;158:351-365.

52. Popovich PG, Guan Z, McGaughy V, Fischer L, Hickey WF, Basso DM, The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglia/macrophage activation. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2002;61:623-633.

53. Popovich PG, Hickey WF, Bone marrow chimeric rats reveal the unique distribution of resident and recruited macrophages in the contused rat spinal cord. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2001;60:676-685.

54. Popovich PG, Horner PJ, Mullin BB, Stokes BT, A quantitative spatial analysis of the blood-spinal cord barrier. Experimental Neurology 1996;142:258-275.

55. Popovich PG, Stokes BT, Whitacre CC, Concept of autoimmunity following spinal cord injury possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. J. Neurosci. 1996;45:349-363.

56. Popovich PG, Stuckman S, Gienapp IE, Whitacre CC, Alterations in immune phenotype and function after experimental spinal cord injury. J. Neurotrauma 2001;18:957-966.

57. Popovich PG, Wei P, Stokes BT, Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis-rats. J. Comp. Neurol. 1997;377:443-464.

58. Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagel U, Volk HD, Meisel A, Stroke induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. J. Exp. Med. 2003;198:725-736.

59. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M, Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. Nature Medicine 1998;4:814-821.

60. Santoro M, Uncini A, Corbo M, Staugaitis SM, Thomas FP, Hays AP, Latov N, Experimental conduction block induced be serum from a patient with anti-GM1 antibodies. Ann. Neurol. 1992;31:385-390.

61. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH, Acute inflammatory response to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. Eur. J. Neurosci.1999;11:3648-3658.

62. Schwab JM, Frei E, Klusman I, Schnell L, Schwab ME, Schluesener HJ. AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglia/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats. J Neuroimmunol. 2001;119:214-22.

63. Schwab ME, Bartholdi D, Degeneration and regeneration of axons in the lesioned Spinal Cord. Physiol. Rev. 1996;76:319-370.

64. Schwartz M, Beneficial autoimmune T cells and posttraumatic neuroprotection. Ann N Y Acad Sci. 2000;917:341-347.

65. Schwartz M, Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful ? J. Cereb. Blood Flow Metab. 2003;23:385-394.

66. Sekhon LHS, Fehlings MG, Epidemiology, Demographics, and Pathophysiology of Acute Spinal Cord Injury. Spine 2001;26:S2-S12.

67. Sergott RC, Brown MJ, Lisak RP, Miller SL, Antibody to myelin-associated glycoprotein produces central nervous system demyelination. Neurology 1988;38:422-426.

68. Shi W, Kumanogoh A, Watanabe C, Uchida J, Wang X, Yasui T, Yukawa K, Ikawa M, Okabe M, Parnes JR, Yoshida K, Kikutani H, The class IV semaphorin CD100 plays nonredundant roles in the immune system: defective B and T cell activation in CD100-deficient mice. Immunity 2000;13:633-642.

69. Spriggs MK, Shared resources between the neural and immune systems: semaphorins join the ranks. Current Opinion in Immunology 1999;11:387-391.

70. Stanisz AM, Stanisz JA, Nerve growth factor and neuroimmune interactions in inflammatory diseases. Ann N Y Acad Sci. 2000;917:268-272.

71. Takigawa T, Yasuda H, Kikkawa R, Shigeta Y, Saida T, Kitasato H, Antibodies against GM1 ganglioside affect K^+ and Na^+ currents in isolated rats myelinated nerve fibers. Ann. Neurol. 1995;37:436-442.

72. Taoka Y, Okajima K, Murakami K, Johno M, Naruo M, Role of neutrophil elastase in compression-induced spinal cord injury in rats. Brain Res.1998;799:264-269.

73. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K, Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. Neuroscience 1997;79:1177-1182.

74. Tator CH, Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. Brain Pathology 1995;5:407-413.

75. Tatum AH, Experimental paraprotein neuropathy, demyelination by passive transfer of human IgM anti-Myelin-associated glycoprotein. Ann. Neurol. 1993;33:502-506.

76. Vega JL, Ganea D, Miller Jonakit G, Acute down-regulation of antibody production following spinal cord injury: role of systemic catecholamines. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2003;62 :848-854.

77. Weber F, Rüdel R, Aulkemeyer P, Brinkmeier H, Anti-GM1 antibodies can block neuronal voltage-gated sodium channels. Muscle Nerve 2000;23:1414-1420.

78. Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gothilf A, Cohen A, Kuchroo V, Cohen IR, Weiner H, Schwartz M, Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. J. Neurosci. 2001;21:3740-3748.

79. Young W, Spinal Cord Injury pathophysiology and therapy, 1075-1093 In: Narayan RK, Wilberger jr JE, Povlishock JT, Neurotrauma Mc Graw-Hill Companies, Inc; 1996.

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. Hermann J. Schlüsener (Leiter der Sektion für Immunpathologie des Nervensystems) am Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen angefertigt. Für die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei der Gestaltung des Studiendesigns sowie die Hilfestellung bei inhaltlichen Problemlösungen und die Bereitstellung der Ressourcen möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Professor Dr. med. H.-P. Kaps (Chefarzt der Abteilung für Querschnittgelähmte, Orthopädie und Rehabilitationsmedizin der BG-Unfallklinik, Tübingen) und seinem Team danke ich für die Betreuung bei der Erstellung des klinischen Teils des Studienprotokolls, dem Einreichen des Ethikvotums, Beantwortung klinischer Fragestellungen, der Unterstützung innerhalb der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik sowie der Information über verunfallte Patienten und die Bereitstellung von deren Vollblut.

Mein besonderer Dank gilt insbesondere Herrn PD Dr. med Dr. rer. nat. Jan Markus Schwab (wissenschaftlicher Mitarbeiter der Sektion Immunpathologie des Nervensystems) für die Bereitstellung der Materialien sowie für das hohe Engagement bei der Betreuung, Führung und Begleitung der Studie.

Frau Sabine Conrad (MTA) danke ich für die Betreuung der Labortätigkeiten, besonders der FACS-Analyse sowie für die erfahrene Hilfestellung im Umgang mit Ratten.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. M. Meyermann (Ärztlicher Direktor des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen) für die Bereitstellung der Ressourcen und die Unterstützung beim Ethikvotum.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Professor Dr. Klaus Dietz (Institut für Medizinische Biometrie, Tübingen) für die Beratung bei den statistischen Fragestellungen.

Danksagung

Frau Dr. Jutta Gerstein (Chefärztin der Abteilung für Anästhesie und Schmerztherapie der BG-Unfallklinik, Tübingen) und ihren Mitarbeitern danke ich für die Unterstützung beim Sammeln der Blutproben im Rahmen der operationsvorbereitenden Anästhesiemaßnahmen.

Der Belegschaft des hämatologischen Routinelabors der Medizinischen Klinik danke ich für die Vermittlung von Tipps im Umgang mit Patientenblut und dessen FACS-Analyse.

Mein Dank richtet sich ebenso an alle Institutsmitarbeiter des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen für ihre Kollegialität und Hilfsbereitschaft als auch für das angenehme Arbeitsklima.

Bedanken möchte ich mich für die Unterstützung bei meiner Freundin Pina.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten	Name	Tino Riegger
	Geburtstag	20.02 1974
	Geburtsort	Stuttgart
	Eltern	Karlheinz Riegger, Bankkaufmann; Ute Riegger, Technische Zeichnerin
Schulausbildung	1980 – 1984	Grundschule in Leinfelden-Echterdingen
	1984 – 1990	Realschule in Leinfelden-Echterdingen
	1990 – 1993	Wirtschaftsgymnasium in Stuttgart-West
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife	
Zivildienst	8/1993 – 10/1994	im OP des Olgahospitals in Stuttgart
Ausbildung	11/1994 – 10/1997	zum Physiotherapeut an der staatlich anerkannten Schule für Physiotherapie in Konstanz
Berufstätigkeit	1/1998 – 3/1998	Physiotherapiezentrum Würschum in Filderstadt-Bonlanden
Studium	4/1998 – 4/2005	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universtität, Tübingen
	4/2000	Ärztliche Vorprüfung
	4/2001	Ärztliche Prüfung: 1. Staatsexamen (Erster klinischer Abschnitt)
	4/2004	Ärztliche Prüfung: 2. Staatsexamen (Zweiter klinischer Abschnitt)
	26.04.2005	Ärztliche Prüfung: 3. Staatsexamen (Dritter klinischer Abschnitt)
	4/2004 – 5/2005	Praktisches Jahr
	I. Tertial:	Chirurgie Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
	II. Tertial:	Innere Medizin Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
	III. Tertial:	Orthopädie Orthopädische Universitätsklinik Tübingen