

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Leiter: Professor Dr. B. Bültmann

**Morphologische Untersuchungen
zu Veränderungen der
Blut-Rückenmark-Schranke
nach Rückenmarksläsionen bei der Ratte**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jürgen Paul Anders
aus Stuttgart

1996

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Leiter: Professor Dr. B. Bültmann

**Morphologische Untersuchungen
zu Veränderungen der
Blut-Rückenmark-Schranke
nach Rückenmarksläsionen bei der Ratte**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jürgen Paul Anders
aus Stuttgart

1996

Dekan:	Professor Dr. H. D. Becker
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Wolburg
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Harzer

MEINER MUTTER

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Präparation	13
2.1.1	<i>Versuchstiere</i>	13
2.1.2	<i>Anästhesie</i>	13
2.1.3	<i>Operation</i>	14
2.1.4	<i>Läsionstechnik</i>	15
2.1.5	<i>Perfusion mit Lanthan-Nitrat</i>	15
2.1.6	<i>Präparation des Rückenmarkes</i>	17
2.2	Gewebeaufarbeitung	18
2.2.1	<i>Einbettung</i>	18
2.2.2	<i>Bearbeitung der Präparate-Blöcke</i>	19
2.2.3	<i>Lichtmikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte</i>	19
2.2.4	<i>Elektronenmikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte</i>	20
2.3	Immuncytochemie des Glucose-Transporters GLUT-1 nach Kryo -Läsion	20
2.3.1	<i>Perfusion mit Paraformaldehyd</i>	20
2.3.2	<i>Präparation des Rückenmarks</i>	21
2.3.3	<i>Einbettung</i>	21
2.3.4	<i>Kryoschnitte</i>	22
2.3.5	<i>Immunfluoreszenzmarkierung</i>	22
2.4	Auswertung	23
2.5	Positronen-Emissionstomographie (PET)	23
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Kryoläsionstechnik	25
3.2	Lichtmikroskopische Auswertung	29
3.3	Elektronenmikroskopische Auswertung	30
3.3.1	<i>Sechs Stunden nach Kryoläsion</i>	31
3.3.2	<i>Einen Tag nach Kryoläsion</i>	32
3.3.3	<i>Drei Tage nach Kryoläsion</i>	33
3.3.4	<i>Sechs Tage nach Kryoläsion</i>	34
3.3.5	<i>Fünfzehn Tage nach Kryoläsion</i>	34
3.4	Immuncytochemischer Nachweis des Glucose-Transporter Isoform 1 (GLUT-1)	36
3.4.1	<i>Einen Tag nach Kryoläsion</i>	36
3.4.2	<i>Drei Tage nach Kryoläsion</i>	36
3.4.3	<i>Sechs Tage nach Kryo-Läsion</i>	36
3.4.4	<i>Fünfzehn Tage nach Kryo-Läsion</i>	36
3.5	Positronen-Emissionstomographische Untersuchung (PET)	37

4 DISKUSSION	39
4.1 Eigenschaften der Blut-Hirn-(Rückenmark-)Schranke	39
4.2 Tracer-Experimente	41
4.2.1. Meerrettich-Peroxidase	41
4.2.2. Lanthan-Nitrat	44
4.3 Neurotransmitter, Neuropeptide und Blut-Hirn-Schranke	47
4.4 Makrophagen und Blut-Hirn-Schranke	52
4.5 Der Glucose-Transporter GLUT-1	53
4.6 Der Glucose-Stoffwechsel in der medizinischen Diagnostik:	55
4.7 Die Blut-Rückenmark-Schranke unter klinischem Aspekt:	55
4.8 Wertigkeit der Tiermodelle für die menschliche Querschnittlähmung	57
4.9 Das Kryo-Läsionsmodell und Schlußfolgerungen für menschliche Rückenmarksverletzungen	57
5 ZUSAMMENFASSUNG	59
6 ABBILDUNGEN	61
7 LITERATUR	81

1 Einleitung

Verletzungen des Nervensystems bewirken eine Vielzahl von Folgereaktionen im Läsionsgebiet: Reaktionen der Neuroglia, insbesondere der Astrozyten, das Auftreten einer Entzündungsreaktion mit Aktivierung und Invasion von Makrophagen durch hämatogene, die Blut-Hirn-(Rückenmark-) Schranke passierende Mediator-Substanzen, sowie die Degeneration der distalen Axon-Anteile und weiterhin das Aussprossen eines Wachstumskegels im proximalen Axon-Bereich.

Während das Periphere Nervensystem eine gute Regenerationsfähigkeit nach Verletzung besitzt, trifft dies für den Bereich des Zentralnervensystems (ZNS) nicht zu (Ramòn y Cajal, 1928). Dies hat zur Folge, daß etwa bei Verletzung des Rückenmarks, abhängig von der Läsionshöhe, eine unterschiedlich stark ausgeprägte Lähmungssituation eintritt, die zwar durch frühzeitige rehabilitative Behandlungsmaßnahmen (Gerner, 1992) therapiert und oft auch entscheidend gebessert werden kann, deren völlige Heilung jedoch derzeit nicht erreicht werden kann. Welche Faktoren begrenzen nun die Regenerationsfähigkeit des ZNS? Der Kenntnisstand darüber ist noch sehr unvollständig, aber Eigenschaften und Reaktionen der verschiedenen Gliazell-Arten spielen sicher eine bedeutende Rolle.

Die Transplantation von glialen Vorläuferzellen in chemisch erzeugte Rückenmarksläsionen der weißen Substanz der adulten Ratte hatte eine Differenzierung der Vorläuferzellen zu Astrozyten und Oligodendrozyten im Läsionsbereich zur Folge (Franklin und Blakemore, 1995).

Frühere Arbeiten zeigten, daß in der Membran von Oligodendrozyten Proteine enthalten sind, denen eine ausgeprägte Hemmwirkung auf wachsende und insbesondere regenerierende Neuriten zukommt (Caroni und Schwab, 1988a, b; Schwab et al., 1993). Die Moleküle, die aus der Proteinfraction des ZNS-Myelins stammten, wurden nach Molekulargewichts-

kriterien neurite growth inhibitors NI-35 bzw. NI-250 genannt. Ihre Funktion kann durch die monoklonalen Antikörper IN-1 und IN-2 blockiert werden (Caroni und Schwab, 1988a, b), so daß nach Läsion im Cortico-Spinaltrakt der Ratte in Gegenwart der Antikörper ein Axonwachstum von mehr als 5 mm innerhalb von 2-3 Wochen, im Vergleich zu etwa 1 mm ohne die Antikörper, zu erzielen war (Schwab, 1990, 1991). Die Wirkung der regenerationshemmenden Faktoren der Oligodendrozyten (Eitan et al., 1994; Sivron und Schwartz, 1994; Sivron et al., 1994) hängt sicher mit der Regulation dieser Zellpopulation zusammen:

Ein großer Teil der Oligodendrozyten wird bereits unter physiologischen Bedingungen im Verlaufe der Entwicklung durch den programmierten Zelltod, unter dem Bild der Apoptose, abgebaut. Im Bereich des N. opticus der Ratte trifft dies etwa für die Hälfte aller aus den Vorläuferzellen gebildeten Oligodendrozyten zu (Yasuda et al., 1995). Die Apoptose folgt aus einem durch Gen-Aktivierung gesteuerten Vorgang (Übersicht siehe Garcia-Valenzuela et al., 1993), der bei traumatischen, ischämischen und durch ATP-Mangel bedingten Zell-Läsionen zusätzlich einsetzen kann, nachdem schon ein großer Anteil von Zellen durch Nekrose zugrunde gegangen ist (Raff et al., 1993). Apoptose-Prozesse können unter experimentellen Bedingungen durch Anwendung neurotropher Faktoren, z.B. nerve growth factor und einige andere, gehemmt werden (Qin-Wei et al., 1994).

Die Rolle der Astroglia bei der Regeneration ist sicher ebenfalls bedeutend, insbesondere durch die Beziehung der „Astrozytenfüße“ zu dem zentralnervösen Kapillar-Endothel und damit zur Blut-Hirn-(Rückenmark-)Schranke (siehe unten). Die Astrozyten, die in protoplasmatische und fibrilläre unterteilt werden, stellen den größten Zellanteil im ZNS der Wirbeltiere (French-Constant und Raff, 1986). Die fibrillären Astrozyten enthalten im Zytoplasma reichlich Intermediärfilamente, die aus saurem glialem Filamentprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) und aus Vimentin bestehen.

GFAP ist Hauptbestandteil der Intermediärfilamente reifer, Vimentin jedoch jener unreifer Astrozyten (Dahl und Bignami, 1985). Die protoplasmatischen Astrozyten haben im Vergleich zu den fibrillären Astrozyten zahlreiche verzweigte sowie dickere und kürzere Fortsätze. Die Zahl der Intermediärfilamente ist geringer.

Kommt es nach Läsionen im Bereich des ZNS der Säugetiere zu Vernarbungen, so überwiegen dort die fibrillären Astrozyten. Diesen Vernarbungsprozessen wird, sowohl im Sinne einer direkten physikalischen Barriere (Reier et al., 1983) als auch auf Grund des Einflusses von Inhibitions-Molekülen (Rudge und Silver, 1990), eine Bedeutung für die unzureichende Regenerationsfähigkeit der Axone im Bereich des ZNS beigemessen. In speziellen, dreidimensionalen Zellkulturen fanden Fawcett et al. (1989) eine besonders ausgeprägte Axon-Inhibition durch Astrozyten. Bei diesem Geschehen wirken offensichtlich von Astrozyten sezernierte Serin-Protease-Inhibitoren mit (Übersicht siehe Fawcett und Housden, 1990).

Unreife Astrozyten scheinen hingegen die axonale Regeneration zu fördern, wie Transplantationsexperimente im adulten Rattengehirn (Wunderlich et al., 1994) und thorakalen Rückenmark (Bernstein und Goldberg, 1989) zeigten. Kokulturen von Astrozyten aus den cerebralen Hemisphären junger Ratten mit hippocampalen, septalen und neocorticalen Neuronen führten zu Befunden, die auf eine Verlängerung der Lebensdauer der Neurone durch Membran-Moleküle und neurotrophe Faktoren der Astroglia, wie sie allerdings auch in ZNS-Neuronen selbst vorkommen, hinwiesen (Schmalenbach und Müller, 1993). Ein weiterer trophischer Faktor der Astrozyten ist Laminin. An der subpialen und perivaskulären Grenzfläche zum neuralen Gewebe kommt dieses Glykoprotein in der Basallamina vor, entsteht aber zunächst als Sekretionsprodukt der Astrozyten. Laminin fördert das Wachstum von Neuronen, und deren Differenzierung kann mit anderen Faktoren der Basalmembran und Zelloberfläche fortgesetzt werden (Übersicht siehe Gee et

al., 1993). Tatsächlich konnten Bernstein et al. (1985) 3-5 Tage nach Hemisektion des Rückenmarks der Ratte im Läsionsbereich immunhistochemisch eine Anreicherung von Laminin in den Astrozyten und deren Fortsätzen nachweisen.

Der dritte Typ glialer Zellen, die Mikroglia, dürfte ebenfalls regenerationsrelevant sein; wiederum spielt eine Gefäßbeziehung eine Rolle:

Vom Kapillar-Endothel sind die Mikrogliazellen nur durch die mit Perizyten interdigitierende Basallamina getrennt. Ferner leisten sie durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose insbesondere nach Verletzungen des ZNS einen Beitrag zur Wiederherstellung der Homöostase zwischen Blut und ZNS-Gewebe (Gehrmann et al., 1995). Darüberhinaus kann die Mikroglia im aktivierten Zustand Antigene präsentieren und Entzündungsreaktionen vermitteln, analog zu dem Monozyten-/ Makrophagensystem.

Zusammen mit dem Umfeld der glialen Zellen spielt die Pathophysiologie des Gefäßsystems, genauer der Kapillar-Endothelien mit besonderen Eigenschaften am Ort der Blut-Hirn-(Rückenmark-)Schranke (BHS), bei der Regeneration geschädigten ZNS-Gewebes - soweit sie möglich ist - sicher eine ganz wesentliche Rolle.

Die BHS, durch Paul Ehrlich (1885) erstmals beschrieben und von Lewandowski (1900) als Begriff eingeführt (Übersicht siehe Dermietzel und Krause, 1991), schützt normalerweise die zentralnervöse Substanz vor schwankenden Bluteinflüssen. Selbst in Endothelzellen, die nicht aus Nervengewebe stammen, können Astrozyten BHS-Eigenschaften induzieren (Janzer und Raff, 1987). Dies traf z.B. für Endothelzellen der Nabelvene zu, die mit fetalen menschlichen Astrozyten kokultiviert wurden (Hurwitz et al., 1993). Zu den BHS-Eigenschaften zählten z.B. die Expression spezifischer Proteine wie Glucose-Transporter GLUT-1 (s. unten) und die Gamma-Glutamyl-Transpeptidase.

Die wesentliche Struktur der BHS sind die Tight Junctions (Zonulae occludentes) des Kapillar-Endothels (Risau und Wolburg, 1990), die sich wie Diffusionsbarrieren verhalten. Tight Junctions konnten *in vitro* durch Kokultivierung mit Astrozyten induziert, bzw. moduliert werden (Arthur et al., 1987; Tao-Cheng et al., 1987; Wolburg et al., 1994; Wolburg, 1995). Die BHS darf ihrer Funktion gemäß nicht absolut dicht sein. Eine Transportmöglichkeit von Molekülen durch die BHS oder die Blut-Rückenmark-Schranke wird z.B. ubiquitären tubulovesikulären Strukturen, die auch im Kapillar-Endothel des ZNS vorhanden sind, zugeschrieben. Diese zur Pinozytose, d.h. zur unspezifischen Aufnahme von extrazellulären Molekülen und Partikeln fähigen Strukturen (nach membranöser Kompartimentierung spricht man von Pinozytose-Vesikeln) treten allerdings im Kapillar-Endothel schrankenfreier Blutgefäße (z.B. im Muskelgewebe und der Dura mater) in weit größerer Zahl auf als in Blutgefäßen mit Schrankenfunktion (Reese und Karnovsky, 1967; Broadwell, 1989), wo sie erst bei Schrankenstörung ihre Zahl vermehren.

Bis hierher wurde anhand der Literatur überlegt, wie die verschiedenen glialen Zelltypen und die Kapillar-Endothelien, insbesondere mit ihren Funktionen an der BHS, bei der nur eingeschränkt möglichen Regeneration des traumatisch geschädigten ZNS, insbesondere der Nervenzellfortsätze, zusammenspielen. Experimentelle Ansätze zur weiteren Erforschung der Regenerationsfähigkeit des ZNS und ihrer Beeinflussbarkeit haben bis heute verschiedene Läsionsmodelle am ZNS des Säugetiers benützt und werden diese Modelle auch weiterhin benötigen. Trotz der noch geringen Kenntnis der natürlichen Regenerationsprozesse wurden immer wieder Versuche unternommen, diese Prozesse im Tiermodell zu beeinflussen:

Wurde bei Katzen im Anschluß an eine experimentelle Rückenmarksläsion auf einem Laufband ein reflektorisches Bewegungsmuster generiert (Barbeau und Rossignol, 1987), so führte die i.v. oder intraperitoneale Gabe

von noradrenergen, serotoninerger und dopaminerger Substanzen zu deutlichen Verbesserungen der elektromyographisch abgeleiteten Muskelfunktionswerte (Barbeau und Rossignol, 1990; 1991; 1993). Es waren BHS-gängige Substanzen wie L-DOPA oder 5-Hydroxytryptophan zu verwenden, weil die Monoamine selbst nicht den Aminosäure-Transportweg durch die BHS nutzen können. Die Gabe von Clonidin i.v., einem α_2 -Sympathomimetikum, das als Antihypertonikum beim Menschen dient, ergab in einem anderen Modell von Rückenmarkläsion bei Katzen ebenfalls eine Verbesserung der Muskelfunktion (Forssberg und Grillner, 1973; Barbeau et al., 1987). Eine mögliche Erklärung für diese Verbesserung ist darin zu sehen, daß serotoninerge (aber auch nicht-serotoninerge) Neurone kollaterale Projektionen zu autonomen und somatischen Zellgruppen in die Medulla und in das Rückenmark entsenden (Allen und Cechetto, 1994), sowie auch zu den dorsalen Neuronen des Tractus spinocerebellaris (Jankowska et al., 1995a, 1995b).

Auch bei Vorliegen einiger empirischer Ergebnisse zur Beeinflussung der Regeneration des traumatisierten ZNS fehlt in den wenigen untersuchten Läsionsmodellen oft eine genaue Beschreibung der läsionsbedingten Veränderungen selbst und insbesondere der Läsionseffekte an der BHS über einen längeren Zeitraum hinweg als Basis für weitere Untersuchungen und für die Entwicklung therapeutischer Ansätze. Soweit Marker des strukturellen Zustands der BHS verwendet wurden, waren diese teils von fraglicher Aussagekraft und wurden nicht immer über genügend lange Zeiträume beobachtet. Folgende Arbeiten konnten jedoch herangezogen werden:

Durch immunhistochemische Darstellung der Penetration von Ratten-Immunglobulin ins umliegende ZNS-Gewebe konnten Dusart und Schwab (1993) zeigen, daß die Blut-Hirn-(Rückenmark)-Schranke bei Ratten nach experimenteller Teildurchschneidung des Rückenmarks großräumig zusammenbricht und erst nach zwei Wochen wieder vollständig geschlossen ist.

Koenig et al. (1989a) beschrieben nach Kälteläsion im Bereich des parietalen Gehirns von Sprague-Dawley-Ratten einen Ausfall der BHS. Als Tracer diente Natrium-Fluoreszein, das 5 min vor der versuchsbeendenden Perfusion den Tieren i.v. verabreicht worden war. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von 1 min über längstens 72 Stunden.

Noble und Wrathall (1989) konnten nach Kontusionsverletzung im Rückenmarksegment Th 8, ebenfalls an Sprague-Dawley-Ratten, eine Durchlässigkeit der Blut-Rückenmark-Schranke für mindestens 7 Tage beobachten. Als Tracer diente Meerrettich-Peroxidase (HRP), die 7-10 min vor der intrakardialen Perfusion durch die Jugular-Vene injiziert worden war. Auch bei diesen Versuchen war nach 14 Tagen die Blut-Rückenmark-Schranke wieder geschlossen.

Nach einer photochemisch ausgelösten Thrombose als Modell einer Gehirnläsion konnten Dietrich et al. (1987) nach 2-15 min elektronenmikroskopisch Veränderungen am Kapillar-Endothel im Sinne von Schwellungen der Mitochondrien und des granuläres Endoplasmatischen Retikulums nachweisen, ohne auf die Tight Junctions einzugehen.

Ein Läsionsmodell am Rückenmark von adulten Wistar-Ratten durch selektive Schädigung der Astroglia mittels systemischer Injektion des Antimetaboliten 6-Amino-Nikotinamid zwischen dem 1. und 5. Tag (Krum, 1994) zeigte vereinzelt Austritte von HRP und immunologisch nachgewiesenem Serumalbumin in das perikapilläre Gewebe. Dies deutete auf eine Undichtigkeit der Blut-Rückenmark-Schranke hin. Offenbar blieben jedoch Marker der Blut-Hirn-(Rückenmark)-Schranke wie Glucose-Transporter Isoform 1 (GLUT-1) (siehe unten), und Gamma-Glutamyl-Transpeptidase und das Endothelbarriere-Antigen EBA im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert.

Die vorliegende Studie versuchte nun beim Läsionsmodell des Säugetiers da anzusetzen, wo nach der Literatur Verbesserungen der Läsionstechnik,

genauere Beschreibungen der läsionsbedingten Veränderungen, der Einsatz eines gegenüber HRP vorteilhafteren Tracers (Lanthan, siehe unten) des strukturellen Zustands der BHS, sowie die Anwendung eines natürlichen biochemischen Markers der BHS möglich erschienen.

Der letztgenannte Marker, Glucose-Transporter 1 (GLUT-1), ist heute durch Antikörper immunzytochemisch zugänglich. Besonders die Frage, ob GLUT-1 tatsächlich ein zuverlässiger Marker des Funktionszustandes der BHS bzw. der analogen Blut-Rückenmark-Schranke ist, erschien für die weitere Untersuchung geeignet zu sein. Dies gab Veranlassung, hier in das neue Gebiet des Glucose-Transporters und seiner Isoformen zunächst näher einzuführen.

Mehr als 50% des Glucose-Gesamtvorrates eines im Ruhezustand befindlichen Menschen wird vom ZNS zur Aufrechterhaltung seiner Funktion benötigt (Zubay, 1993). Auf Grund der Undurchlässigkeit der Tight Junctions für wasserlösliche Substanzen wie Glucose verfügt das Kapillar-Endothel des ZNS über ein Transportsystem, das den energieunabhängigen Transport von Glucose in das eigentliche ZNS-Gewebe erleichtert, nämlich den Glucose-Transporter (Crone, 1965; Kalaria et al., 1988). Dieser hat verschiedene Isoformen, darunter GLUT-1 und GLUT-3, die bisher im Gehirn nachgewiesen werden konnten. GLUT-1 hat die Molekularmasse 55 kDa (Pardridge, 1990) und ist im Kapillar-Endothel der BHS, aber auch in den Erythrozyten und in fetalem Gewebe (Gould und Bell, 1990) lokalisiert. Sein Vorkommen in Neuronen und Gliazellen ist noch nicht sicher nachgewiesen (Übersicht siehe Vannucci, 1994), jedoch wird in diesen Zellen GLUT-3 als wesentlicher Glucose-Transporter angesehen (Maher et al., 1994). GLUT-3 findet sich darüber hinaus im fetalen Muskelgewebe, der Plazenta und der Niere.

Glucose-Transporter kommen in Membranen von allen Zellen vor, die Glucose verstoffwechseln. Man unterscheidet eine langsame Expression der Glucose-Transporter, die hormonell und nahrungsabhängig gesteuert ist, von einer schnellen Expression, die durch Insulin vermittelt wird (Slot et al., 1991). Abbildung 1 zeigt ein Schema von GLUT-1.

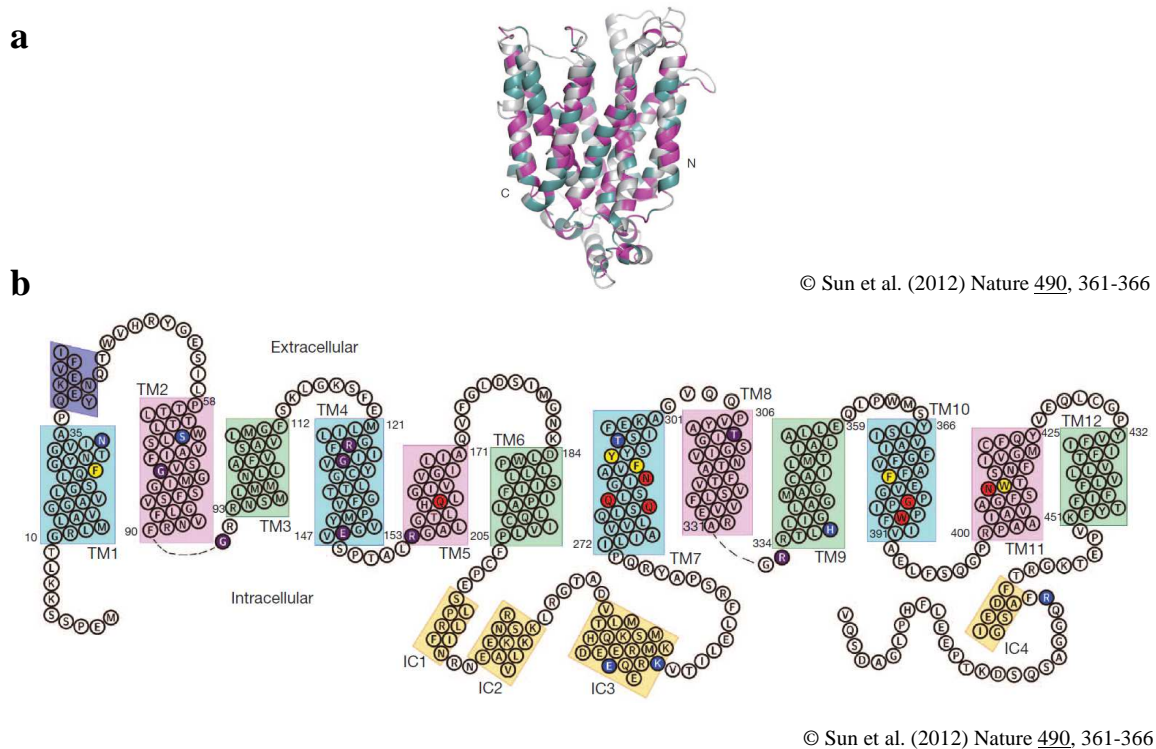


Abb.1: Strukturmodell, **a** und Modell für die Orientierung des Glucose Transporters GLUT-1 in der Plasma-Membran, **b**

(Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I, et al. (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. Science 229, 941-5)

Die Ziele der vorliegenden Studie konnten angesichts der geschilderten Eigenheiten und damit der schwierigen Analyse der Regenerationfähigkeit des Rückenmarks nur kurz gesteckt werden:

1. An einem Läsionsmodell der Ratte sollte eine neue Kälteläsionstechnik des Rückenmarks unter Anwendung einer selbstentwickelten Vorrichtung zu definierten, morphologisch denen einer Kontusionsverletzung des Rückenmarks vergleichbaren und artefaktarmen Läsionen führen.
2. Die morphologische, insbesondere ultrastrukturelle Untersuchung sollte die Läsion und ihre Heilungszeichen über einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen möglichst genau erfassen.

3. Im Mittelpunkt sollte die Untersuchung der Eröffnung, des Ausfalls und erneuten Aufbaus der Blut-Rückenmark-Schranke anhand verschiedener Parameter stehen. Dabei wurden einmal von Lanthan ($\text{La}^{3\oplus}$) als elektronendichtem Tracer mit niedriger Atommassenzahl (138,91) und geringem Atomradius (0,169 nm), damit hohem Eindringungsvermögen in Interzellularspalten, genaue zeitliche Kontrollen des Schrankenzustandes erwartet. Zum anderen sollte die Beobachtung der Pinozytose-Aktivität durch die elektronenmikroskopische Darstellung der mit Lanthan ebenfalls markierten Pinozytose-Vesikel im Kapillar-Endothel weiteren Aufschluß über den Schrankenzustand geben. Schließlich bestand Grund zu der Annahme, daß man über den Expressionsgrad von GLUT-1 in der immunzytochemischen Darstellung in den Endothelien Aussagen über die Kinetik der Öffnung und des erneuten Schließens der Blut-Rückenmark-Schranke unter Regenerationsbedingungen machen könnte, um z.B. einen Zeitpunkt zu bestimmen, zu dem künftig etwa regenerationsfördernde, jedoch nicht notwendigerweise schrankengängige Medikamente (denkbar wären z.B. Wachstumsfaktoren) anwendbar wären.

Das Erreichen dieser Ziele sollte zur Verbesserung der Voraussetzungen für eine noch am Anfang stehende Erforschung der Regenerationsfähigkeit des ZNS, insbesondere des Rückenmarks, beitragen. Viele Aspekte der traumatisch, z.B. durch Kontusion, ausgelösten Querschnittlähmung des Menschen dürften von dem gewählten Modell der inkompletten Querschnittlähmung am Rückenmark der Ratte durch Kryoläsion realitätsnah dargestellt werden.

Da gerade die Kontusion des Rückenmarks als bedeutende Ursache der Querschnittlähmung nicht mit entsprechenden kernspintomographischen Befunden belegt werden kann (Gerner, 1992), sollte in einer der vorliegenden Arbeit angeschlossenen Pilotstudie mit der Positronenemissions-

tomographie (PET) an einem rückenmarklädierten Tier eine Möglichkeit zum intravitalen Nachweis der Läsion aufgezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation

2.1.1 Versuchstiere

Fünfundzwanzig männliche Sprague-Dawley-Ratten (Max-Planck-Institut, Tübingen) mit einem Gewicht von 200 bis 510 Gramm wurden in dieser Studie eingesetzt. Sechzehn Tiere wurden elektronenmikroskopisch ausgewertet. Zu jedem Auswertungszeitpunkt wurde bei 2 bis 3 Tieren die Wirbelsäule freigelegt, laminotomiert und das Rückenmark, mittels einer für diesen Zweck speziell entwickelten Kryode (siehe Zeichnung 1, S. 28), durch Kälteapplikation lädiert. Als Kontrollen dienten ein ohne Kälteapplikation „sham“-operiertes und ein unbehandeltes Tier.

Neun Tiere, darunter das unbehandelte Kontrolltier, wurden für den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Glucose-Transporters GLUT-1 herangezogen.

2.1.2 Anästhesie

Die Ratten wurden zunächst durch kurzzeitige Inhalation von Diethylether in einem luftdicht abgeschlossenen Glasgefäß in das Exzitationsstadium versetzt. Unmittelbar darauf erfolgte die Gabe von Ketanest[®] (Parke-Davis, Berlin; 100 mg/kg Körpergewicht) und Rompun[®] (Bayer, Leverkusen; 15 mg/kg Körpergewicht) in einer Mischspritze intraperitoneal. Da keine Prämedikation stattfand, wurde in der Mischspritze zusätzlich Atropinsulfat (0,1 mg/kg Körpergewicht) verabreicht, um einer übermäßigen, das Tracheobronchialsystem beeinträchtigenden Sekretion der Speicheldrüsen, die bei Ketanest[®]-Narkose auftreten kann (Larsen, 1987), zuvorzukommen.

2.1.3 Operation

Nach ausreichender Narkosetiefe, die am Erlöschen des Schmerzreflexes im Plantar-Bereich geprüft wurde, erfolgte unter dem Operations-Mikroskop distal einer Linie durch den oberen Rand der Scapulae und nach Palpation der Processus spinosi eine dorsale Hautinzision zur Freilegung der tiefen Rückenmuskulatur. Nach Präparation der oberflächlichen und tiefen Schicht dieser Muskulatur wurde der rechte Arcus vertebrarum über Th 8 dargestellt und die Laminektomie, nach vorheriger Resektion des Processus spinosus mittels Luer-Knochenzange, unter Anwendung eines Zahnarzt-Bohrers (Kaltenbach & Voigt, Biberach/Riss) mit Rosenbohrkopf bei 12000 U/min durchgeführt. Der Plexus venosus vertebralis internus posterior wurde dabei weitestgehend geschont. Nach Ausführung der Kryoläsion, durch Aufbringen der Kryode auf die verbliebene Lamina und das Rückenmark für die Dauer von 90 Sekunden, erfolgte der schichtweise Wundverschluß durch Einzelknopfnähte mittels Dexon-Faden (Braun-Dexon GmbH, Spangenberg). Dabei wurde auf eine gute und dichte Auflage der tiefen Muskulatur auf der Läsionsstelle geachtet. Über der Läsionsstelle wurde ein Markierungsfaden eingebracht. Auf die Abdichtung mit körperfremdem Material wurde verzichtet, um eine durch dieses ausgelöste Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes zu vermeiden. Eine solche Reaktion hätte die durch die Läsion ausgelöste Reaktion verfälschen können.

Abschließend wurde die Hautnaht mit Einzelknopfnähten ausgeführt. Wegen der sehr straffen Hautverhältnisse bei der Ratte kam monofiler Faden mit schneidender Nadel zum Einsatz.

Bei dem „sham“-operierten Tier wurde analog vorgegangen; die Kryode wurde jedoch nicht gekühlt, sondern nur mit Kodan[®]-Spray desinfiziert.

Der operative Eingriff wurde auf Fujichrome Sensia, 100 ASA Diafilm (Fuji Photo Film Co, Ltd., Tokyo) dokumentiert (Abb.2-7).

2.1.4 Läsionstechnik

Da eine Kryoläsion morphologische Veränderungen hervorruft, die in ihrem Grad nicht über die bei stumpfen Verletzungen des ZNS bekannten hinausgehen (Løberg und Torvik, 1992), schien die Kryoläsionstechnik unserer Fragestellung entgegen zu kommen.

Nach operativer Freilegung der Wirbelsäule von dorsal und daran anschließender Laminektomie, wurde auf das Rückenmarksegment Th 8 die Kryode (siehe Zeichnung 1, S. 28) mit einer trapezförmigen Auflagefläche von $a = 6$ mm, $c = 5$ mm und $h = 4$ mm für die Dauer von 90 sec aufgesetzt. Das Flüssigstickstoff-Reservoir mit einem Fassungsvermögen von 1,6 ml Flüssigstickstoff bestand aus einem 4 cm langen Kupfer-Rohr mit einer Wanddicke von 1 mm, das von einer 5 mm dicken Teflon[®]-Isolierung umgeben war. Der Haltegriff der Kryode war zum Reservoir hin ebenfalls mit Teflon[®] isoliert.

2.1.5 Perfusion mit Lanthan-Nitrat

Für die elektronenmikroskopische Darstellung der permeablen Spalträume der Rückenmark-Kapillaren wurde $\text{La}^{3\oplus}$ in Form von Lanthan-Nitrat perfundiert.

Zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 1 Tag, 3 Tage, 6 Tage und 15 Tage nach der Kryoläsion wurden die Tiere unter Narkose intrakardial perfundiert. Das „sham“-operierte Tier wurde nach 3 Tagen perfundiert.

Zur Perfusion wurde dasselbe Anästhesie-Verfahren angewendet wie für die Operation, mit dem Unterschied, daß jeweils die doppelte Dosis Ketanest[®] und Rompun[®] eingesetzt wurde. Die Gabe erfolgte jedoch jeweils zur Hälfte intraperitoneal und intramuskulär. Nach Prüfung der Areflexie wurden die Tiere auf einer Styropor[®]-Unterlage fixiert, die in einer Kunststoffwanne zum Auffangen der Perfusionflüssigkeit lag. Unmittelbar darauf wurde mit der Perfusion begonnen.

Zunächst wurde durch einen medianen Hautschnitt vom Epigastrium bis zur Halsregion die äußere Brustwand freigelegt. Anschließend erfolgte die Querdurchtrennung des Sternum über der Synchondrosis xiphosternalis. Die benachbarten Rippen wurden ebenfalls quer und nach proximal beidseits entlang der Paramedianlinie durchtrennt. Dabei wurde die Pleura eröffnet. Im Anschluß daran wurde das Pericard an der Herzspitze vom Diaphragma gelöst und der Herzbeutel luxiert. Der Apex cordis des noch kontraktiven Herzens wurde reseziert und sofort eine Knopfkanüle in den linken Ventrikel bis hinauf zur Aorta ascendens unter Passage der Klappen-Ebene positioniert. Die Kanüle wurde proximal der Schnittebene des Apex mit einer Gefäßklemme fixiert. Nun wurde unmittelbar, bei Luftblasenfreiheit des Systems, die Perfusionspumpe (Heidolph Typ 52100) in Betrieb genommen, wobei gleichzeitig das rechte Atrium eröffnet wurde, um eine gründliche Durchspülung und anschließende Fixierung unter vollständigem Abfluß des Blutes, der Spüllösung und des Fixativs zu erreichen.

Die Durchspülung des Gefäßsystems erfolgte mit 200 ml Ringer-Lösung von pH 7,4 (Fresenius, Oberursel) bei einer Durchflußmenge von 20 ml/min. Unmittelbar darauf wurde Fixierlösung perfundiert.

Diese enthielt (% als Gewicht zu Volumen): 1% Lanthan-Nitrat (Serva, Heidelberg) in 20 mM HEPES-Puffer (Sigma, Deisenhofen) sowie 2% Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt) und 0,6% NaCl. Die Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert. Die Fixierung erfolgte ebenfalls bei einer Durchflußmenge von 20 ml/min. Es wurden 500 ml Fixierlösung innerhalb 25 min perfundiert, wodurch eine gute und vollständige Darstellung des Kapillar-Endothels und der Tight Junctions möglich war. Nach Abschluß der Perfusion wurde die Wirbelsäule von dorsal entnommen.

2.1.6 Präparation des Rückenmarkes

Nach Entnahme der Wirbelsäule erfolgte unter dem Auflichtmikroskop die Präparation des Rückenmarks. Zunächst wurden der Orientierungsfaden über der Läsionsstelle aufgesucht und die Rückenmuskulatur entfernt. Zur schonenden Freilegung des Rückenmarks wurden die Brustwirbel einzeln, nach dem Abpräparieren der Gelenkverbindungen, exartikuliert. Auf diese Weise konnten die vom Rückenmark abzweigenden Nervenabgänge erhalten werden. Anschließend erfolgte die Entnahme der Rückenmarksegmente Th 8 und weiter distal Th 10. Th 9 wurde nicht untersucht. Die Segmente wurden aus Gründen der Einbettungstechnik nach dorsal und ventral sowie nach Läsionsseite und nicht lädierter Seite in vier Quadranten unterteilt und entsprechend geschnitten. Zu Vergleichszwecken wurde noch das unmittelbar der Läsionsstelle benachbarte proximale Segment Th 7 entnommen.

Die Präparate wurden über Nacht in Karnovsky-Lösung (1% Glutaraldehyd + 4% Formaldehyd in PBS) in Schnappdeckelgläsern (4 ml) immersionsfixiert. Die Präparate wurden in Cacodylat-Puffer (Merck, Darmstadt) bei etwa 4°C aufbewahrt.

2.2 Gewebeaufarbeitung

2.2.1 Einbettung

Für die licht- und elektronenmikroskopische Auswertung wurden die Präparate in Araldit (Serva, Heidelberg), einem Polymer-Kunststoff, eingebettet. Dazu wurden die in Cacodylat-Puffer bei 4°C gelagerten Präparate zunächst für die Dauer von 2 Stunden in 1% Osmiumtetroxid (Polyscience Inc., Warrington) und 0,1 M Cacodylatpuffer im Mischungsverhältnis 1:1 auf einem Rotationsschüttler nachfixiert. Die größeren Präparate aus dem proximalen Rückenmark wurden in 2% Osmiumtetroxid nachfixiert.

Anschließend wurden die Präparate in 0,1 M Cacodylatpuffer für die Dauer von 45 min gewaschen, worauf schrittweise dehydriert wurde, zunächst mit 50% Alkohol für 45 min, dann mit 70% Alkohol für 45 min. Die Präparate wurden dann bei 4°C über Nacht in 70% Alkohol inkubiert, der mit Uranylacetat (Merck, Darmstadt) zur Verbesserung des elektronenmikroskopischen Kontrastes gesättigt war.

Am Folgetag wurde die Einbettung über folgende Lösungsmittelschritte, je 45 min vorgenommen: 80% Alkohol - 96% Alkohol - 100% Alkohol - 100% Alkohol - Propylenoxid (Merck, Darmstadt) - Propylenoxid - Propylenoxid / Araldit im Verhältnis 1 : 1. Es folgten noch Propylenoxid/ Araldit 1 : 3 für 60 min und schließlich Araldit (rein) für 60 min.

Anschließend wurden die Präparate in Silikon-Einbettungsformen der Schnittebene nach ausgerichtet, die Silikon-Einbettungsformen mit reinem Araldit aufgefüllt und bei Raumtemperatur ca. 1 Stunde zur Vermeidung von Luftblasen stehen gelassen. Danach wurden die Präparate im Brutschrank bei 60°C für die Dauer von 12 Std. auspolymerisiert und bei 90°C über 24 Std. nachgelagert. Nach dem Erkalten waren die Gewebeblöcke schneidefertig.

2.2.2 Bearbeitung der Präparate-Blöcke

Für die Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte wurden die in Araldit eingebetteten Präparate zunächst mit einer Fräse (Tm 60, C. Reichert, Wien) trapezförmig zurechtgefräst. Die Feintrimmung erfolgte durch Spezialklingen (Schick injector; Warner-Lambert Company, USA). Anschließend wurden zum Zwecke der lichtmikroskopischen Untersuchung Semidünnschnitte von 1 μm Schnittdicke mit Hilfe von Glasmessern hergestellt. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Pinsel aus Kunststoff-Wassertrögen, die an den Glasmessern angebracht waren, aufgefischt und auf Glas-Objektträger übertragen.

Die Objektträger wurden auf einer Wärmeplatte bei 65°C (H 22 electronic, Gerhardt, Bonn) getrocknet, mit Richardson-Lösung gefärbt und mit DePeX (Serva, Heidelberg) eingedeckelt.

Von den zur elektronenmikroskopischen Untersuchung vorgesehenen Blöcken wurden Ultradünnschnitte von ca. 50 nm Dicke mit einem Diamant-Messer (Diatome; Biel, Schweiz) mit einem Ultradünnschnittapparat (Typ Ultracut E, Reichert Jung) hergestellt. Die Ultradünnschnitte wurden auf Formvar (Merck, Darmstadt)-beschichtete Kupfer-Grids (Veco GmbH, Solingen) aufgezogen und vor dem Mikroskopieren in einer Trockenkammer ca. 5 min mit Bleicitrat kontrastiert. Unmittelbar darauf wurden die Präparate mit Reinstwasser (Ampuwa[®]) gespült und getrocknet.

2.2.3 Lichtmikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte

Die Semidünnschnitte wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Die fotografische Dokumentation erfolgte auf Fujichrome Professional 64 T Kunstlicht-Diafilm (Fuji Photo Film Co, Ltd., Tokyo), der wie ein 50 ASA Film belichtet wurde (Farbtemperatur 3400 K).

2.2.4 Elektronenmikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte

Die Ultradünnschnitte wurden unter dem Transmissions-Elektronenmikroskop (EM 10, Carl Zeiss, Oberkochen) mit 80 kV mikroskopiert und ausgewertet.

Die fotografische Dokumentation erfolgte auf Agfa Scientia Planfilm Negativmaterial (Agfa, Leverkusen). Die Negativ-Entwicklung wurde mit Agfa Metinol Entwickler durchgeführt. Anschließend wurden auf Agfa Rapitone Fotopapier P-3 Positiv-Abzüge mit einem Vergrößerungsfaktor von 1,8 hergestellt.

2.3 Immuncytochemie des Glucose-Transporters GLUT-1 nach Kryoläsion

Bei diesen Versuchen wurde, wie in 2.1.2 bis 2.1.4 beschrieben, jedoch mit folgenden Veränderungen vorgegangen.

2.3.1 Perfusion mit Paraformaldehyd

Abweichend von den vorangegangenen Versuchen mit Lanthan-Nitrat, erfolgte hier die Vorspülung des Gefäßsystems (siehe 2.1.5) mit auf 37°C vorgewärmter Ringer-Lösung. Damit sollten für die Fixierung des Glucose-Transporters möglichst physiologische Temperaturbedingungen geschaffen werden. Die Durchflußrate der Perfusionspumpe von 20 ml/min und das Perfusionsvolumen von 200 ml wurden beibehalten.

Der Fixierungsschritt wurde nunmehr mit ebenfalls auf 37°C vorgewärmter Lösung von 4% Paraformaldehyd in Hanks-Puffer mit je 1 mM CaCl₂ und MgCl₂ unternommen. Die Durchflußrate der Perfusionspumpe von 20 ml/min blieb unverändert, das Perfusionsvolumen wurde jedoch von 500 ml auf 250 ml reduziert, da diesmal die intensivere Fixierung entfiel, die in Abschnitt

2.1.5 als Voraussetzung zur Darstellung der Tight Junctions beschrieben wurde.

2.3.2 Präparation des Rückenmarks

Bei gegenüber Abschnitt 2.1.6 unveränderter Entnahme-Technik wurden die Rückenmarksegmente Th 8 und das übernächste Segment Th 10 als Ganzes entnommen und nicht in Quadranten unterteilt. Th 9 wurde nicht untersucht. Die Gewebeprobe wurden in der Fixierlösung (siehe 2.3.1) in Schnappdeckelgläsern über Nacht immersionsfixiert.

2.3.3 Einbettung

Die Gewebeprobe wurden anschließend zur Kryo-Protektion je 60 min in 12% und 15% Saccharose-Lösung eingelegt, die mit Hanks-Puffer sowie je 1 mM CaCl_2 und MgCl_2 versetzt war. Über Nacht erfolgte die Lagerung in einer 18%igen Saccharose-Lösung, jedoch sonst gleicher Zusammensetzung.

In aus Aluminiumfolie selbst hergestellte Formen von ca. 1,5 cm Durchmesser, die etwa zur Hälfte mit Tissue-Tek[®] (Miles Inc.; Elkhart, USA) gefüllt waren, wurden die Gewebeprobe mit axialer Ausrichtung eingelegt und die Formen mit Tissue-Tek[®] aufgefüllt.

Danach wurden die Einbettungsformen in eine ca. 5 mm hoch mit Flüssigstickstoff gefüllte Styropor-Wanne gestellt, um ein langsames Einfrieren der Proben zu ermöglichen. Die Proben wurden bis zum Schneiden bei -70°C in der Gefriertruhe gelagert.

2.3.4 Kryoschnitte

Von den eingefrorenen Gewebeproben wurden auf einem Reichert-Jung Mod. 2700 Frigocut Kryotom (Reichert, Wien) Kryoschnitte von 10-14 μm Schichtdicke angefertigt. Die Schnitte wurden unmittelbar nach dem Schneiden auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger übertragen und auf einer Wärmeplatte bei 65°C getrocknet.

2.3.5 Immunfluoreszenzmarkierung

Die immunzytochemische Darstellung des Glucose-Transporters wurde in den nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritten durchgeführt:

- 10 min Nachfixierung der Schnitte auf Eis in der Fixierlösung nach Abschnitt 2.3.1
- 3 Mal Waschen in 0,05 M TRIS-gepufferter Salzlösung (TBS, siehe unten)
- 20 Minuten Blockieren mit Block-Puffer (siehe unten)
- 45 min Inkubation mit dem ersten Antikörper: Polyklonaler Kaninchen-Anti-Ratte-Glucosetransporter: Nr.400055 (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden) in Block-Puffer 1 : 2000 verdünnt
- Bei den Kontroll-Darstellungen wurde anstelle des ersten Antikörpers Blockpuffer verwendet.
- 3 Mal Waschen in TBS für jeweils 5 min
- 45 Minuten Inkubation mit zweitem Antikörper: Ziege-Anti-Kaninchen (H&L) IgG FITC-Konjugat 1 : 100 (Dinova, Hamburg) in Block-Puffer verdünnt
- Waschen in TBS für 5 min
- 5-10 min Inkubation in Höchst 33258 Lösung (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in TBS; BASF Ludwigshafen) für die Kernfärbung
- 2 Mal Waschen in TBS für jeweils 5 min
- Eindeckeln der Objektträger unter Vermeidung von Luftblasen

Die verwendeten Lösungen im einzelnen:

- TBS 0,1 M (Merck, Darmstadt) mit je 1 mM CaCl_2 und 1 mM MgCl_2 , pH 7,6
- Magermilch-Block-Puffer: 5% Magermilch (Merck, Darmstadt) in TBS mit 0,3% Triton-X100 (Serva, Heidelberg) und 0,04% NaN_3 (Merck, Darmstadt)
- Eindeckellösung: 90% Glycerin in TBS mit 10% Phenylalanin (Merck, Darmstadt) als Antibleichmittel

2.4 Auswertung

Die Gewebeschnitte wurden auf einem Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen) des Max-Planck-Institutes, Tübingen, mit Fluoreszenzeinrichtung ausgewertet. Die fotografische Dokumentation erfolgte auf Fujichrome Provia 1600 Professional DX Diafilm (Fuji Photo Film Co, Ltd., Tokyo), der wie ein 3200 ASA Film belichtet worden war und im Umkehrprozeß P-3 pushentwickelt wurde.

2.5 Positronen-Emissionstomographie (PET)

Dieses Diagnose-Verfahren beruht auf der Tatsache, daß Elektronen und Positronen nicht als Teilchen und Anti-Teilchen nebeneinander existieren können. Beide Teilchen vereinigen sich und geben dabei ihre Energie in Form von zwei Gammaquanten der Energie von 0,511 MeV ab. Bei diesem Prozeß werden beide Teilchen vernichtet. Die für die Untersuchung benötigten Radionuklide, die die Positronen emittieren, werden mit einem Zyklotron hergestellt. Diese Tracer-Atome werden an Biomoleküle wie z. B. Glucose gebunden. Die lokale Konzentration dieser veränderten Glucose im ZNS kann über die Gammastrahlung gemessen und durch Computer in diagnostisch nutzbare Bildinformation umgewandelt werden. Die Konzentration korreliert mit der Stoffwechselaktivität für natürliche Glucose. Für die PET-Untersuchung wurde ein PET-Scanner (General Electric, Milwaukee,

Wisconsin, USA) eingesetzt und als Positronen emittierender Tracer 2ml einer Lösung von [^{18}F]-Desoxy-Glucose, also die veränderte Glucose, mit einer Aktivität von 30 MBq verabreicht. Die Bildverarbeitung geschah im High-Resolution-Modus.

3 Ergebnisse

3.1 Kryoläsionstechnik

Die von Løberg und Torvik (1991) beschriebene Kryoläsionstechnik, die Trockeneis (-79°C , bei 760 Torr) verwendet, erwies sich für Läsionen im Rückenmarksbereich als nicht ausreichend kontrolliert, da die erforderlichen Trockeneis-Stücke bereits innerhalb der Mindestanwendungszeit, z.B. 90 sec, weitgehend verdampfen.

Jedenfalls konnte in einem Vorversuch, in dem nach dem Kryoläsionsprotokoll von Torvik (1995, persönliche Mitteilung) vorgegangen und die knöchernen Struktur der Wirbelsäule unversehrt gelassen wurde, keine Gewebeschädigung erzielt werden.

Daher wurde versucht, von Trockeneis auf flüssigen Stickstoff (-196°C) überzugehen, um eine definitive Kälteläsion zu erreichen.

In einem Pilotversuch wurde ein Ratten-Thorakalwirbelknochen in eine Kreuz-Pinzette (Conrad-Electronic, Hirschau) eingespannt und diese mittels Klemm-Stativ fixiert. Der Spinalfortsatz war vorher entfernt worden. Sodann wurde die Außenseite des Arcus vertebrarum durch Abfräsen mit dem Rosenbohrer (siehe Material und Methoden 2.1.3.) in ihrer Schichtdicke gemindert, um den Wärmeleitwiderstand zu verringern.

Nun wurde zunächst ein etwa 3g schweres Stück Trockeneis analog der Methode von Løberg und Torvik (1991) auf den Vertebralbogen aufgebracht und die Temperaturentwicklung an der dem Spinalkanal zugewandten Seite des Vertebralbogens mit einem Temperaturmeßfühler, der mit Wärmeleitpaste (Wärmeleitfähigkeit ca. 0,001 cal./sec; Conrad-Electronic, Hirschau) versehen war, gemessen (Tabelle 1).

Anschließend wurde bei sonst gleichem Versuchsaufbau die selbst konstruierte, für 5 min in Flüssigstickstoff vorgekühlte Kryode (Zeichnung 1) auf

den Wirbelbogen aufgesetzt und der Temperaturverlauf erneut gemessen (Tabelle 2). Die als Hohlzylinder gebaute Kryode besaß neben einer Teflon[®]-Wärmeisolierung der Außenwand ein 1,6 ml fassendes Reservoir für Flüssigstickstoff. Durch das Eintauchen in den Flüssigstickstoff erfolgte gleichzeitig die Betankung des Reservoirs .

Als Temperatur-Meßgerät diente bei den vergleichenden Versuchsreihen ein Multimeter E 2377 A (Hewlett-Packard, Böblingen). Die Raumtemperatur betrug bei allen Versuchen 23°C.

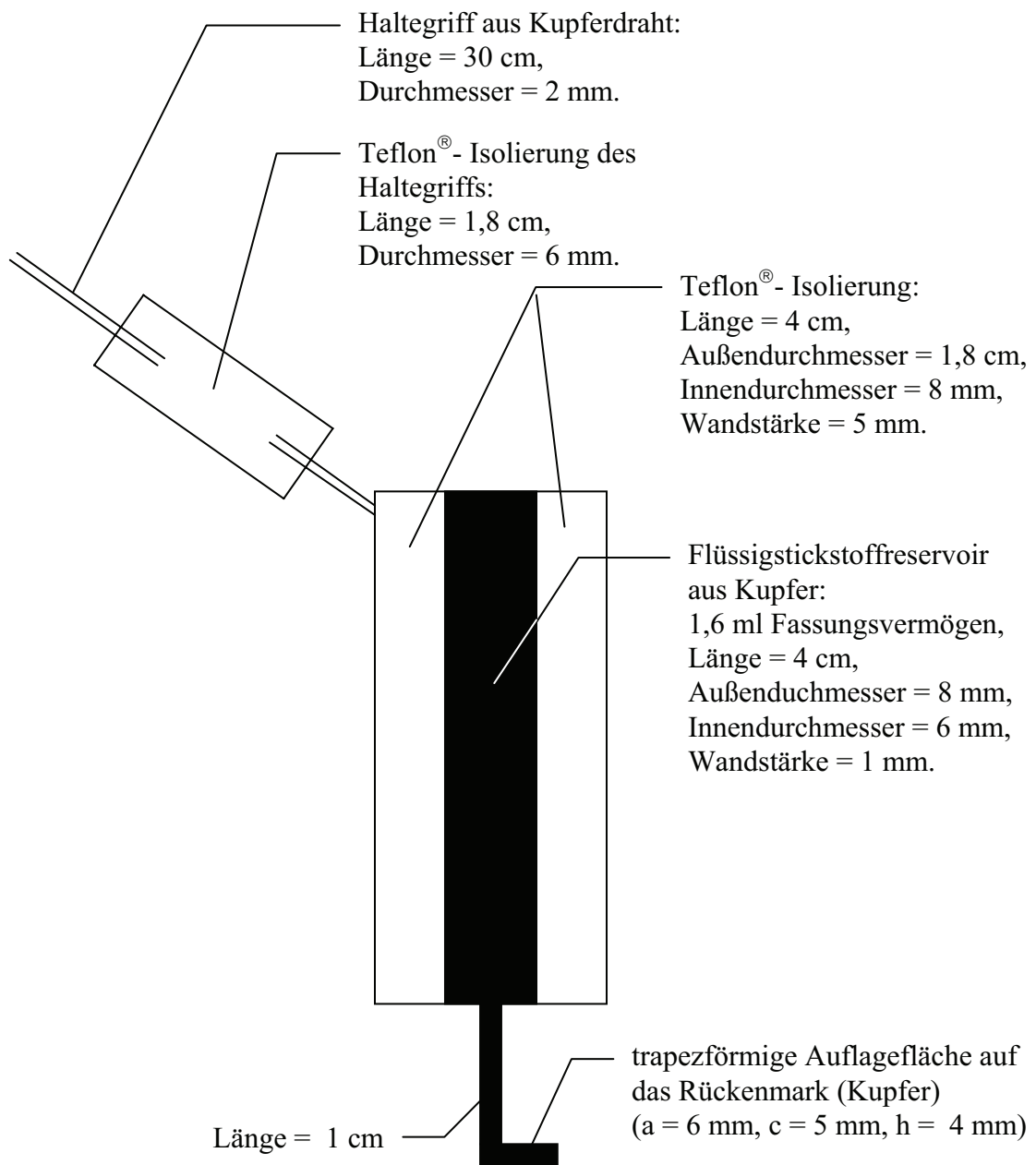
<i>Kühlzeit:</i> <i>Sekunden</i>	<i>Erreichte Temperatur an der Spinalkanalseite:</i> <i>Messung 1 (°C)</i>	<i>Erreichte Temperatur an der Spinalkanalseite:</i> <i>Messung 2 (°C)</i>	<i>Erreichte Temperatur an der Spinalkanalseite:</i> <i>Messung 3 (°C)</i>
15	15	16	15
30	7	8	7
45	2	1	2
60	-2	-4	-3
90	-8	-10	-9
120	-11	-14	-11

*Tab. 1: Darstellung des Temperaturverlaufs am Wirbelbogen
unter Einwirkung von Trockeneis (-79°C).*

<i>Kühlzeit:</i> <i>Sekunden</i>	<i>Erreichte Temperatur an der Spinalkanalseite:</i> <i>Messung 1 (°C)</i>	<i>Erreichte Temperatur an der Spinalkanalseite:</i> <i>Messung 2 (°C)</i>	<i>Erreichte Temperatur an der Spinalkanalseite:</i> <i>Messung 3 (°C)</i>
15	-40	-64	-66
30	-79	-74	-80
45	-71	-72	-70
60	-68	-70	-72
90	-56	-53	-58
120	-43	-48	-51

*Tab. 2: Darstellung des Temperaturverlaufs am Wirbelbogen
unter Einwirkung von Flüssigstickstoff (-196 °C).*

Der Vergleich der mit Trockeneis und Flüssigstickstoff erreichten Temperaturwerte ergab eine wesentlich stärkere lokale Temperaturerniedrigung durch Flüssigstickstoff. Diese kompensierte den Kälteverlust durch die Körpertemperatur des lebenden Organismus besser als Trockeneis. Außerdem war der Temperaturschluß durch die Kupferauflagefläche der Kryode enger. Schließlich bot die Kryode wegen ihres definierten Flüssigstickstoff-Volumens eine Gewähr für gute Standardisierbarkeit der Versuche. So bestand an den Vorteilen der Flüssigstickstoff-Kryode für die weiteren Versuche kein Zweifel.



Zeichnung 1: Flüssigstickstoff-Kryode

3.2 Lichtmikroskopische Auswertung

Weder das ohne Kälteanwendung „sham“-operierte Tier, noch das unbehandelte Kontrolltier zeigten lichtmikroskopisch Hinweise auf morphologische Veränderungen des Rückenmarks (Abb. 9).

Bei den kryolädierten Tieren waren in allen Fällen ausgeprägte morphologische Veränderungen des dorsolateralen Rückenmarksbereichs festzustellen, die distal des Läsionssegmentes noch im übernächsten Rückenmark-Segment, wenn auch in geringerem Grad nachweisbar waren (Abb.10). Die morphologischen Veränderungen konnten auch nach proximal in das läsionsanschließende Rückenmark-Segment verfolgt werden. In den untersuchten Gewebeproben waren, im Gegensatz zu Befunden nach anderen Läsionsverfahren (Bresnahan, 1987; Dusart und Schwab, 1993), nur sehr geringgradige, in vielen Fällen auch überhaupt keine Läsionen der grauen Substanz zu erkennen (Abb.11a, b; 12). Das in dieser Studie angewandte Läsionsverfahren ist in seiner Ausdehnung weitgehend auf die Axone der weißen Substanz limitiert. Bei einer guten Auswertemöglichkeit ohne Einblutungsartefakte bietet diese Methode der inkompletten Lähmung für das Tier einen relativ erträglichen Eingriff. Eine komplette Paraplegie wurde nicht beobachtet. Darüberhinaus waren Blasen- und Mastdarmlähmungen nicht zu verzeichnen.

Bereits 6 Stunden nach der Kryoläsion zeigte das Rückenmark der perfundierten Ratten im Bereich der myelinisierten Axone ausgeprägte ödematöse Veränderungen des Interstitial-Raumes. Die Axone selbst erschienen bereits zu diesem frühen Zeitpunkt geschrumpft, wohingegen die Myelinscheiden in ihrer Struktur noch weitgehend erhalten waren. Einen Tag nach Läsion war eine zunehmende Auflösung der verbliebenen Myelinscheiden zu beobachten, die, gegenüber dem Befund nach 6 Stunden, verschmälert imponierten.

Drei Tage nach Läsion zeigten sich noch stärker ausgeprägte Verschmälerungen der Myelinscheiden. Die Myelinfasern erschienen zentral größtenteils leer, d.h. sie wiesen offenbar nur noch vereinzelt Axone auf (Abb.13).

Nach 6 Tagen war die Struktur weitgehend zerfallen, so daß im Zentrum der Läsion Axone nicht mehr klar abgrenzbar waren.

Nach zwei Wochen war im Läsionszentrum keine axonale Struktur mehr zu erkennen.

Hinweise für massive Einblutungen fanden sich nicht. Desgleichen zeigten sich keine Petechien, wie sie im Zusammenhang mit Kontusionverletzungen vorkommen (Balentine, 1988).

3.3 Elektronenmikroskopische Auswertung

Im Mittelpunkt der elektronenmikroskopischen Auswertung stand die Untersuchung des Kapillar-Endothels als morphologischem Korrelat der Blut-Hirn-Schranke.

Das „sham“-operierte Tier wie auch das unbehandelte Kontrolltier hatten im untersuchten Rückenmark-Bereich eine unauffällige Struktur des Neuropils. Die myelinisierten Axone bildeten eine dichte Myelin-Struktur. Die von Noble und Wrathall (1987) beschriebenen Aufspaltungen der Myelinscheiden fanden sich allerdings auch bei dem in dieser Studie angewendeten Fixationsverfahren. Sie sind auf die Aldehyd-Empfindlichkeit der Myelinscheiden zurückzuführen. Hinweise auf eine Wallersche Degeneration fanden sich hingegen nicht.

Die das Kapillar-Endothel umgebenden Astrozyten-Endfüße der fibrillären Astrozyten waren in ihrer Struktur regelmäßig.

Im Kapillar-Endothel waren in der Regel keine, vereinzelt 1 bis maximal 3 mit Lanthan markierte Pinozytose-Vesikel nachweisbar. Das Kapillar-Lumen war in allen Fällen frei von Erythrozyten, was eine gründliche Durchspülung bewies. Im Interzellular-Spalt fanden sich vereinzelt Lanthan-Anreicherungen, die jedoch die Tight Junctions in keinem Fall passieren konnten. Die Basalmembran der nicht kryolädierten Tiere wurde, von der nachstehend beschriebenen Ausnahme abgesehen, in den untersuchten Rückenmark-Gewebeproben von Lanthan nicht erreicht (Abb.14). Bei dem „sham“-operierten Tier fanden sich in der Umgebung von lediglich zwei aller untersuchter Kapillar-Ausschnitte Lanthan-Anreicherungen. In diesen beiden Fällen konnte eine Passage des Lanthans durch die Tight Junctions nicht nachgewiesen werden (Abb.15). Deutlich erkennbar war jedoch eine von abluminaler Seite ausgehende retrograde Füllung des Interzellular-Spalt. Auch in diesem Falle war ein Hindurchtreten von Lanthan durch die Tight Junctions nicht nachweisbar. Gegen eine Schrankenstörung sprach die Tatsache, daß bei beiden Fällen mit Lanthan angereicherte Pinozytose-Vesikel nicht nachzuweisen waren. Vereinzelt fanden sich allerdings leer erscheinende Pinozytose-Vesikel. Die dem Kapillar-Endothel abluminal anliegende Basallamina war nur stellenweise mit Lanthan durchdrungen. Makrophagen waren bei den Gewebeproben der nicht kryolädierten Tiere nicht nachweisbar.

3.3.1 Sechs Stunden nach Kryoläsion

Bei den 6 Stunden nach der Kryoläsion perfundierten Tieren waren die Myelinscheiden in ihrer Lamellen-Struktur noch weitgehend intakt, wenngleich einzelne Fasern schon eine ausgeprägte Schrumpfung des Axoplasmas erkennen ließen. Ein vermehrtes Auftreten von Makrophagen war im Läsionsbereich nachweisbar, jedoch ohne Zeichen von Phagozytose.

Im Gegensatz zu den Befunden bei den Kontrolltieren war eine deutliche Größenzunahme der perikapillären Astrozytenfortsätze zu beobachten. Diese Größenzunahme deutete auf ein schon zu diesem Zeitpunkt bestehendes Rückenmark-Ödem hin. Eine Vermehrung Lanthan-gefüllter Pinozytose-Vesikel im Kapillar-Endothel war nunmehr ebenfalls zu beobachten (Abb.16). Die Basallamina wurde von Lanthan aus luminaler Richtung durch den Interzellular-Spalt erreicht. Ein Durchtreten des Lanthans durch die Basallamina in das umliegende Gewebe war jedoch nicht zu beobachten.

3.3.2 Einen Tag nach Kryoläsion

An dem auf die Läsion folgenden Tag war eine weitere Verschmälerung der Myelin-Lamellen zu verzeichnen. Zahlreiche Mitochondrien wurden interstitiell gesehen, konnten aber keiner Zellstruktur mehr zugeordnet werden. Die Mitochondrien-Ansammlungen waren nicht axonalen Ursprungs, sondern lagen außerhalb von geschädigten Myelin-Profilen. Wahrscheinlich handelte es sich um Reste zugrundegegangener Nerven- oder Gliazellen. Daneben waren eindeutige Schwellungen sowie auch weiterreichende Lyse-Prozesse der Astrozytenfortsätze zu beobachten, die auf eine deutliche Zunahme des Rückenmarködems hindeuteten. Die Markierung der Pinozytose-Vesikel mit Lanthan im Kapillar-Endothel nahm in dieser Phase ebenfalls erheblich zu. Neben den noch mit dem Kapillar-Lumen in Verbindung stehenden Pinozytose-Vesikeln waren zahlreiche, völlig vom Kapillar-Lumen abgeschnürte Pinozytose-Vesikel nachweisbar. Zu Kontrollzwecken wurde Rückenmuskulatur mituntersucht, da Muskel-Kapillaren keine dichte Barriere bilden. Die Auswirkungen der Lanthan-Perfusion in einem in diesem Sinne undichten Gefäßsystem sollten überprüft werden. Anzahl und Verteilungsmuster der Pinozytose-Vesikel waren nahezu gleich wie in den Rückenmark-Endothelien des ersten post-läsionalen Tages (Abb.17a, b).

Im Muskel war stellenweise ein massives Eindringen des Lanthans in die subendotheliale Basalmembran zu beobachten, wenn auch eine Weiterwanderung des Lanthans aus der Membran in das umliegende Gewebe nicht vorkam. Vielmehr erschien die Basallamina im Muskelgewebe als deutliche Abgrenzung gegenüber dem subendothelialen Gewebe.

3.3.3 Drei Tage nach Kryoläsion

Am dritten postläsionalen Tag war eine ausgeprägte Lyse der Myelinscheiden zu beobachten. Gleichzeitig trat eine beträchtliche Phagozytose-Aktivität der Makrophagen in Erscheinung. Einzelne Fasern waren zu diesem Zeitpunkt vollständig von Makrophagen umschlossen und schon sehr weitgehend lysiert (Abb.18).

Inzwischen hatte die Menge der Zell-Debris bedeutend zugenommen; es begann eine ausgedehnte Lyse insbesondere der Mitochondrien, die in ihrer Anzahl bereits vermindert waren. Erstmals traten in dieser Phase in unmittelbarer Nachbarschaft der in Auflösung befindlichen Myelinscheiden zahlreiche Lipid-Tröpfchen auf. Diese sind am ehesten als Abbauprodukte der lysierten Myelinscheiden zu deuten.

In dieser Phase war die Anzahl der mit Lanthan markierten Pinozytose-Vesikel des Kapillar-Endothels gegenüber dem Untersuchungszeitpunkt des ersten Tages unverändert. Wie bereits nach dem ersten Tag war durch den Interzellularspalt gedrungenes Lanthan an der Basallamina angesammelt, diese wirkte jedoch fortdauernd als Permeabilitätsgrenze. Zumindest war außerhalb der Basallamina kein Lanthan nachweisbar (Abb.19).

Die perikapillären Astrozyten-Endfüße waren nach wie vor geschwollen.

3.3.4 Sechs Tage nach Kryoläsion

Zu diesem Zeitpunkt waren die Degeneration der Myelinscheiden weiter voran geschritten und die Makrophagenaktivität unverändert hoch. Wiederum waren markierte Pinozytose-Vesikel und insbesondere ein ungehindertes Passieren des Lanthans durch den Interzellularspalt bis zur Basalmembran nachweisbar, ohne daß diese überschritten wurde. Das erneut zu Kontrollzwecken untersuchte Kapillar-Endothel der Rückenmuskulatur zeigte die erwartete, rege Pinozytose-Aktivität.

Zusätzlich zu den bisherigen Zielorten wurden die Kapillar-Endothelien der Pia Mater und der Arachnoidea untersucht, die den Ort der äußeren Blut-Liquor-Schranke darstellen. Hier konnte sowohl bei dem Kontrolltier als auch bei dem Tier nach Kryoläsion eine weit höhere Anzahl von Pinozytose-Vesikeln nachgewiesen werden als im Bereich des Nervengewebes nach erfolgter Kryoläsion (Abb.29). Die Anzahl der mit Lanthan gefüllten Pinozytose-Vesikel der Arachnoidea des Kontrolltieres war jedoch geringer als die des kryolädierten Tieres (vgl. Abb.21).

Im Bereich der Pia Mater des kryolädierten Tieres war ähnlich wie in jenem der Myelinfasern ein Eindringen von Lanthan in den endothelialen Interzellularspalt zu beobachten. Eine Ausbreitung in das umgebende Gewebe war auch hier nicht zu erkennen, in Übereinstimmung mit dem Kapillar-Endothel des Nervengewebes selbst.

3.3.5 Fünfzehn Tage nach Kryoläsion

Zu diesem Zeitpunkt waren Makrophagen dicht gedrängt im Läsionsbereich nachweisbar. In unmittelbarer Nachbarschaft fanden sich Hohlräume, die frei von Myelin und axonalem Plasma erschienen.

In dieser Zerfallsregion begegnete man zahlreichen Lipid-Einlagerungen im Neuropil (Abb.22).

Mehr als zwei Wochen nach der Läsion war jetzt noch immer eine Schwellung der Astrozyten-Endfüße zu erkennen (Abb.23). Außerdem bestand eine Markierung der Pinozytose-Vesikel fort. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Erkenntnissen drang Lanthan auch nach mehr als zwei Wochen durch den Interzellularspalt, machte aber an der Basallamina halt: Das umliegende Gewebe war frei von Lanthan (Abb.24).

Im distalen Läsionsbereich waren jedoch im Kapillar-Endothel keine Pinozytose-Vesikel mehr nachweisbar. Dies erlaubte die Annahme, daß die Blut-Rückenmark-Schranke nach zwei Wochen im distalen Bereich wieder geschlossen war.

Zu den früheren Terminen waren auch im distalen Läsionsbereich mit Lanthan markierte Pinozytose-Vesikel sowie Schwellungen der Astrozyten-Endfüße zu beobachten.

3.4 Immuncytochemischer Nachweis des Glucose-Transporters Isoform 1 (GLUT-1)

3.4.1 Einen Tag nach Kryoläsion

Einen Tag nach Kryoläsion zeigte GLUT-1 im Läsionsbereich eine von dorsal (Läsionsbereich) nach ventral zunehmende Expression im Kapillar-Endothel. Im Läsionsbereich, der durch die Nomarski-Filterung gut abgrenzbar war, blieb GLUT-1 gerade noch nachweisbar (Abb.25). Auch am distalen Ende des Läsionsbereichs war die Expression von GLUT-1 noch zu sehen. Die Kernfärbung mit dem DNA-Reagenz DAPI (Nr. D 9542, Sigma, Deisenhofen) zeigte den durch die Kryoläsion ausgelösten Zelluntergang. In der Pia Mater des Rückenmarks war GLUT-1 gut nachweisbar.

3.4.2 Drei Tage nach Kryoläsion

Drei Tage nach Kryoläsion war GLUT-1 im Läsionsbereich, der gut abgrenzbar erschien (Abb.11b), völlig verschwunden (Abb.26). Auch im distalen Läsionsbereich war die Expression von GLUT-1 nicht mehr nachweisbar. Die Kernfärbung mit DAPI zeigte den läsionsbedingten Zelluntergang.

3.4.3 Sechs Tage nach Kryoläsion

Inzwischen war GLUT-1 innerhalb des Läsionsgebietes nicht mehr nachweisbar (Abb.27a). Die Kernfärbung ergab im Läsionsbereich einen umfangreichen Zellverlust (Abb.27b).

3.4.4 Fünfzehn Tage nach Kryoläsion

Zu diesem Zeitpunkt war GLUT-1 im distalen Läsionsbereich wieder exprimiert (Abb.28). Im zentralen Läsionsgebiet war eine nur sehr schwache Expression zu erkennen (Abb.29), wie ein Vergleich mit

Rückenmarksschnitten des Kontroll-Tieres zeigte (Abb.30). Dies korreliert mit den elektronenmikroskopischen Beobachtungen, nach denen im distalen Läsionsgebiet keine Pinozytose-Vesikel mehr nachzuweisen waren. Beide Befunde sprachen für eine Schließung der Blut-Rückenmark-Schranke, beginnend im Kapillar-Endothel distal der Läsionsstelle.

3.5 Positronen-Emissionstomographische Untersuchung (PET)

Die angewandte PET-Technik (siehe 2.5) erlaubt es, Herde gesteigerter Glucose-Utilisation zu lokalisieren. Der Kryoläsionsbereich kam als solcher Herd infrage. Die erniedrigte Expression des Glucose-Transporters GLUT-1 im Bereich der geöffneten Kapillar-Schranke (siehe 3.3) konnte durchaus mit einem erhöhten, nicht mehr schrankenbegrenzten Glucose-Stoffwechsel konform gehen. Ein Pilot-Versuch einen Tag nach Kryoläsion an einem Tier ergab einen klaren Kontrast-Unterschied im Läsionsbereich der Rückenmarks (Abb.31), der postmortal in seiner Ausdehnung bestätigt wurde.

4 Diskussion

4.1 Eigenschaften der Blut-Hirn-(Rückenmark-)Schranke

Das Vorliegen einer Schranke zwischen Gefäßsystem und Hirngewebe wurde erstmals von Paul Ehrlich (1885) beschrieben. Lewandowski führte 1900 den Begriff „Blut-Hirn-Schranke“ ein. Die Tight Junctions (Zonulae occludentes) des Kapillar-Endothels bilden den wesentlichen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke (Risau und Wolburg, 1990). Sie wurden von Reese und Karnovski (1967) entdeckt. Die Tight Junctions können als Diffusionsbarrieren angesehen werden, die verhindern, daß mit dem Blut transportierte Stoffe wie z.B. Hormone, Aminosäuren, Neurotransmitter oder Entzündungsmediatoren das ZNS-Parenchym erreichen. Die Durchlässigkeit für von dem ZNS benötigte Substanzen wird durch Pinozytose-Vesikel und selektive Transportsysteme für Glucose (Glucose-Transporter), Aminosäuren und Keton-Körper bewirkt (Greenwood, 1991). Weiterhin ist das Kapillar-Endothel im Bereich der zirkumventrikulären Organe fenestriert (Bouchaud und Bosler, 1986) und gestattet auf diese Weise den Durchtritt neuroendokriner Hormone. Bei ZNS-Verletzung oder -Erkrankung bricht die Blut-Hirn-Schranke zusammen.

Die Tight Junctions können durch Tracer wie Meerrettich-Peroxidase oder Lanthannitrat dargestellt werden. Auf diese Weise ist es möglich, sowohl über die postnatale Entwicklung als auch über die Regeneration der Blut-Hirn-Schranke nach Läsion Aussagen zu machen.

Schulze und Firth (1992) untersuchten die Tight Junctions des cerebralen Cortex von embryonalen und jungadulten Ratten. Bei diesen Versuchen wurde jedoch kein Tracer eingesetzt, sondern es erfolgte die elektronenmikroskopische Auswertung jeweils des interendothelialen Spaltes und der Kontakte der Tight Junctions mittels Kippung des Präparates und anschließender goniometrischer Messung. Dabei zeigte sich, daß am

siebzehnten Embryonaltag (E17) punktuelle Kontakte innerhalb des interendothelialen Spaltes bestehen. Der interendotheliale Spalt war breiter als in den postnatalen Stadien. In den postnatalen Tagen D1, D8, D16 war eine zunehmende Verschmälerung des interendothelialen Spaltes zu beobachten. Beziehung zur Blut-Hirn-(Rückenmark-)Schranke hat auch die Basalmembran; diese ist vor Erreichen des sechzehnten postnatalen Tages noch nicht vollständig entwickelt. Die Einsprossung der Blutgefäße vollzieht sich bis zum Embryonaltag E11 (Risau und Wolburg, 1990).

Die für die niedrige Permeabilität von biologischen Schranken wichtigste Struktur sind die Tight Junctions. Diese entwickeln sich im Endothel erst allmählich während der embryonalen Reifung des Gehirns. Die Kapillar-Endothelien des reifen ZNS zeigen einen elektrischen Widerstand von bis zu $2000 \Omega/\text{cm}^2$ (Butt et al., 1990). Dieser hohe elektrische Widerstand korreliert gut einerseits mit einer hohen Komplexität der Tight Junctions (Wolburg, 1995), andererseits mit einer fast fehlenden Tracer-Permeabilität. Die Gültigkeit dieser Korrelation wird durch entsprechende Untersuchungen im peripheren Nervensystem unterstrichen. Nach Injektion von Lanthannitrat in das Perineurium des Nervus suralis fanden sich im endoneuralen Kapillar-Endothel zahlreiche Pinozytose-Vesikel (MacKenzie et al., 1987). Gleichzeitig war der elektrische Widerstand der Kapillaren des Endoneuriums wesentlich niedriger als im ZNS. Da die Tight Junctions dieser Kapillaren insgesamt wesentlich geringer ausgeprägt waren als im ZNS-Kapillar-Endothel, könnte ihr Feinbau mit dem niedrigeren elektrischen Widerstand in Zusammenhang stehen.

In der hier vorliegenden Kryoläsionsstudie ging der Zusammenbruch der Blut-Rückenmark-Schranke zu allen Beobachtungszeitpunkten mit deutlich sichtbaren Veränderungen der Breite interendothelialer Spalten einher, jedoch geschah dieses mit maximaler Ausdehnung auf der Lumenseite des Kapillar-Endothels.

4.2 Tracer-Experimente

Die Ergebnisse der Perfusion mit Lanthan als Tracer nach Kryoläsion, insbesondere die beobachtete Vermehrung der markierten Pinozytose-Vesikel, zeigten, daß die Blut-Rückenmark-Schranke bereits sechs Stunden nach dem Setzen einer Läsion im ZNS-Bereich zunehmend durchlässiger wird. Dies ist auch für Läsionen dokumentiert, die durch direkte Kontusionsläsionen des Rückenmarks herbeigeführt wurden (Noble und Wrathall, 1989).

4.2.1 Meerrettich-Peroxidase

Noble und Wrathall (1989) wiesen unter Verwendung von Meerrettich-Peroxidase (HRP; MG 40 000) als Tracer nach, daß die Blut-Rückenmark-Schranke innerhalb eines Zeitraumes von drei Stunden bis zu einem Tag nach Kontusionsläsion ein Maximum an Durchlässigkeit für HRP erreicht. Nach 14 Tagen war die Blut-Rückenmark-Schranke für Proteine wieder undurchlässig. Im Bereich des nicht durch Hämorrhagien geschädigten Kapillar-Endothels sowie der Venolen kam es zu keinem Gewebedurchtritt des Tracers. Im Kapillar-Endothel war jedoch eine vereinzelte Vesikel-Bildung erkennbar. Ein Durchtritt der HRP durch die Tight Junctions des Kapillar-Endothels des Rückenmarks konnte bei diesen Versuchen zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Hingegen fanden die Autoren im Bereich der Arteriolen Austritte des Tracers in die umgebende glatte Muskulatur, sowie den perivaskulären Raum. Perivaskulär wurde eine Vermehrung der Pinozytose-Vesikel beobachtet. Bei der angewandten Läsionstechnik kam es allerdings zu ausgedehnten Hämorrhagien, die durch Rupturen der Arteria spinalis anterior und ihrer Aufzweigungen verursacht worden waren. Die im Blut enthaltenen Metall-Ionen wie Eisen und Kupfer wirken als Katalysatoren für die Peroxidation durch freie Radikale, die

die Zellmembranen sowohl der Nerven als auch der Endothelzellen schädigen (Anderson und Means, 1983). Hingegen können Hämorrhagien und durch sie verursachte Sekundär-Schädigungen der Nerven- und Kapillar-Endothelzellen durch die in der vorliegenden Studie angewandte Kryoläsionstechnik weitgehend ausgeschlossen werden. Dusart und Schwab (1993) beschrieben einen Ausfall der Blut-Rückenmark-Schranke bereits eine Stunde nach Setzen einer bilateralen Transection des unteren thorakalen Rückenmarks der Ratte. Als Tracer für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde von diesen Autoren Anti-Ratten-Immunglobulin-Antikörper eingesetzt. Die Ultrastruktur des lädierten Gewebes mit dem Rückenmark-Kapillarendothel und den Tight Junctions als morphologischen Korrelaten der Blut-Hirn-(Rückenmark-) Schranke (Wolburg et al., 1994) wurde nicht untersucht. Lichtmikroskopisch war aber eine Zunahme der Durchlässigkeit der Blut-Rückenmark-Schranke innerhalb des zweiten Tages bis zum Ende der ersten Woche nachweisbar. Nach zwei Wochen wurde ähnlich wie in anderen Studien keine weitere Durchlässigkeit der Blut-Rückenmark-Schranke beobachtet. Bei der von Dusart und Schwab (1993) angewandten Läsionstechnik der partiellen Durchtrennung des Rückenmarks kam es allerdings zu ausgedehnten Hämorrhagien sowohl im Bereich der Läsionsstelle als auch der benachbarten Umgebung. Ein vergleichbarer Verletzungsmechanismus des Rückenmarks tritt in der klinischen Praxis der Querschnittlähmung vorwiegend nach Hieb-, Stich- und Schußverletzungen auf (Reifferscheid und Weller, 1989). Dieser Verletzungstyp ist jedoch wesentlich seltener zu beobachten als die vor allem im Sport- und zu Freizeitbereich zu verzeichnenden Luxationsfrakturen bzw. die Kompressions-Luxationsfrakturen (Gerner, 1992) der Wirbelsäule, die Kompressionsverletzungen und Kontusionen des Rückenmarks nach sich ziehen können. Bei Gefäßverletzungen macht eine erwartende Aktivierung der Gerinnungskaskade, die durch Mediatorsubstanzen und Induktion von

Fibroblastenwachstum die Wundheilung vorantreibt (Darnell et al., 1994), die Abgrenzung schwierig, ob ein nach zwei Wochen ausbleibender Übertritt von Immunglobulinen ein Schließen der Blut-Hirn-(Rückenmark)-Schranke oder einen Heilungsprozeß der Blutgefäße und des Gliagewebes bedeutet. Darüberhinaus wird durch die Durchtrennung von Gefäßen die Hämodynamik im Läsionsbereich verändert. Das Aufnahmevermögen für Stoffe, die innerhalb des Gefäßlumens transportiert werden, wird dadurch heraufgesetzt (Nag et al., 1979). Dies trifft auch für Tracer zu.

Trout et al. (1986) fanden 5 min nach Kryoläsion (längere Überlebenszeiten wurden nicht untersucht) im Bereich des rechten Lobus parietalis des Großhirns von jungadulten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten Veränderungen der Ultrastruktur, nämlich eine Vermehrung der Pinozytose-Vesikel des Kapillar-Endothels. Ein Durchtritt von HRP als Tracer durch die Tight Junctions wurde nicht beobachtet. Auch war der umliegende Bereich der Tight Junctions ebenso frei von Tracer wie der gesamte extravasale Raum. Beggs und Waggener (1976) fanden 90 sec und 15 min nach Kompressionsverletzungen des Rückenmarks von Katzen lichtmikroskopisch vor allem in der grauen Substanz Anreicherungen von HRP. Nach vier Stunden war im Läsionssegment des Rückenmarkes, mit Ausnahme eines schmalen Randes zum Rückenmarkaußenbereich hin, das gesamte Rückenmarkgewebe von HRP durchdrungen. Während im Kontrollsystem die Ultrastruktur sehr wenige markierte Pinozytose-Vesikel und keine HRP-Penetration zeigte, waren lichtmikroskopisch im Läsionsgebiet liegende Nervenzellkerngebiete stark geschädigt und mit dem Tracer infiltriert. Becker et al. (1968) und Noble und Maxwell (1983) beschrieben eine ähnliche Tracer-Infiltration neuralen und glialen Gewebes nach HRP-Perfusion.

4.2.2 Lanthan-Nitrat

In der hier vorliegenden Kryoläsionsstudie des Rückenmarks der Ratte, bei der $\text{La}^{3\oplus}$ als Tracer eingesetzt wurde, erfolgte gleichzeitig eine Kontrolle der Durchgängigkeit der Dura und der Muskel-Kapillaren der Rückenmuskulatur für $\text{La}^{3\oplus}$ als Tracer, da beide Gewebe keine Barriere-Eigenschaften besitzen. $\text{La}^{3\oplus}$ wurde gegenüber Protein-Tracern aufgrund der niedrigen Atommassenzahl sowie des geringen Atomradius der Vorzug gegeben. Abweichend von der Technik, bei der nach Nag (1989, 1991) das Lanthan vor der Perfusion intravenös verabreicht wird, wurde der Tracer in der vorliegenden Studie dem Fixans zugegeben und intrakardial perfundiert. Dieses Vorgehen stellte sicher, daß mit der Fixierung sofort die membrangebundenen Transportsysteme des Kapillar-Endothels für $\text{Ca}^{\oplus\oplus}$ blockiert wurden. Funktionierende Calcium-Transportsysteme würden nämlich Lanthan anstelle von Calcium kompetitiv über den $\text{Ca}^{\oplus\oplus}$ -Kanal in das Innere der Endothelzelle einströmen lassen. Darüberhinaus würde *in vivo* verabreichtes $\text{La}^{3\oplus}$ aufgrund seiner elektrischen Ladung die Eigenschaften der Blut-Hirn- (Rückenmark-) Schranke verändern (Übersicht siehe Sampaolo, 1991).

In der hier vorliegenden Kryoläsionsstudie des Rückenmarks konnte innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraumes die Passage von Lanthan-Tracer durch den Interzellularrspalt bis zur Basalmembran nachgewiesen werden. (Abb.16, 23, 24). Die Kippung der Ultradünnschnitt-Präparate durch eine Kipp-Patrone könnte hier unter Umständen weitere Hinweise erbringen, da sie eine Betrachtung in sämtlichen Raumebenen ermöglicht. Im Rahmen der Kryoläsionsstudie zeigte ein „sham“-operiertes Kontrolltier sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch keinerlei Verletzung des Rückenmark-Gewebes (Abb. 9). Dennoch traten bei zwei benachbarten Kapillarprofilen in der unmittelbaren Umgebung der Pia Mater Lanthan-

Markierungen im Neuropil auf, die sich bis in das Gebiet der Basalmembran erstreckten (Abb. 15). Die Tight Junctions erwiesen sich jedoch bei guter Darstellung als Passagehindernis des Tracers zur lumennahen Seite der Kapillare hin.

Eine Erklärung für das Zustandekommen dieser Neuropil-Markierung nahe der Pia Mater könnte darin bestehen, daß neben den Zirkumventrikulären Organen, die sich durch eine undichte Blut-Hirn-Schranke auszeichnen, nach Westergaard und Brightman (1973) auch Pia-nahe Arteriolen im Bereich des vorderen Teils der dorsalen Fissura sagittalis, der cerebellaren Sulci und im Sulcus zwischen dem Bulbus olfactorius und der cerebralen Hemisphäre einen transendothelialen Durchtritt gestatten. In der Maus fanden diese Autoren neben den pialen (extrinsischen) Arteriolen noch die parenchymalen (intrinsischen) Arteriolen. Letztere versorgen das Parenchym des ventralen Anteils des Diencephalon und des Mittelhirns. Diese Arteriolen reichen tief bis in das periventriculäre Gewebe hinein. Die cerebralen Arteriolen unterscheiden sich durch ihre sehr zahlreich vorhandenen Vesikel und ihre Einstülpungen im Plasmalemm der Endothelien grundlegend vom Kapillar-Endothel. Außer durch das fenestrierte Kapillar-Endothel des Plexus choroideus können intravenös verabreichte, selbst hochmolekulare Tracer auf einem vesikulären Transportweg, unter Umgehung der Tight Junctions, über das arteriolare Endothel den perivaskulären Raum, und damit das Neuropil, erreichen. Weil sowohl HRP (MG 40 000) als auch Ferritin (MG 900 000) dieses arterioläre Endothel passieren können (Westergaard und Brightman, 1973), ist davon auszugehen, daß dies auch für Serum-Albumin (MG 70 000) und Immunglobulin (MG 150 000) zutrifft. Ob der Einsatz von Immunglobulin als Tracer für den Zustand der Blut-Hirn-(Rückenmark-) Schranke geeignet ist, muß daher bezweifelt werden. Bestünde ein umgekehrter Weg der Freisetzung von Antigenen aus dem ZNS etwa bei neurodegenerativen

Erkrankungen und Autoimmun-Erkrankungen über die Arteriolen in das Blut, so könnte dies Auswirkungen auf das Entstehen von Antikörpern durch die immunkompetenten Zellen haben. Cutler et al. (1967) konnten zeigen, daß radioaktiv markiertes Gammaglobulin, das Meerschweinchen mit allergischer Encephalitis intravenös verabreicht worden war, durch die cerebralen Venolen nach außen in das Neuropil drang.

Obwohl die pialen und parenchymalen Arteriolen nur im Gehirn von Mäusen untersucht wurden, dürfte der Befund in ähnlicher Form auch für andere Nager in dieser Form zutreffen (Westergaard und Brightman, 1973). Ob der Befund auch auf das Rückenmark speziell des Menschen zutrifft, ist noch nicht untersucht, kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden. Jedenfalls ist der Befund in Abb. 15 am ehesten auf der Basis undichter pialer Arteriolen zu interpretieren, aus denen der Tracer in das Neuropil und an die abluminale Seite von Kapillaren gelangt sein könnte (zum Vergleich siehe Abb. 21).

Xu und Ling (1994) untersuchten die Gefäßpermeabilität des Kapillar-Endothels des Corpus Callosum von postnatalen Ratten. In der Altersgruppe von 1 bis 7 Tagen war eine ausgeprägtere Lanthan-Markierung von Pinozytose-Vesikeln zu beobachten als bei den 14 Tage alten Tieren. Gleichzeitig war in der jüngeren Altersgruppe eine erhöhte Mikroglia-Aktivität zu beobachten. Die Aufgabe der Mikroglia zu diesem Zeitpunkt besteht offenbar in einer Ersatzfunktion, solange die Blut-Hirn-Schranke noch nicht vollständig entwickelt ist. Eine ungehinderte Passage von Lanthan durch die Tight Junctions konnten die Autoren nicht beobachten.

4.3 Neurotransmitter, Neuropeptide und Blut-Hirn-Schranke

Bei Rückenmarkverletzungen kommt es zur Protein-Extravasation (Hsu et al., 1985). Løberg und Torvik (1991, 1992) konnten zeigen, daß bei Kontusionsverletzungen des Gehirns Plasmaproteine durch die offene Blut-Hirn-Schranke gelangen und von Neuronen aufgenommen werden. Hierzu gehören Albumin, Fibrinogen und Fibronectin. Neben Proteinen werden bei Kontusionsverletzungen des Rückenmarks auch Glutamat, Aspartat, Gutaminsäure und Asparaginsäure in das Parenchym freigesetzt. Sie können dabei zelltoxisch wirken. Proteine bewirken nach Aufnahme in die Nervenzelle eine Erhöhung des osmotischen Druckes. Entsprechende Veränderungen können schon zwei Stunden nach Eintritt der Läsion vorliegen (Liu et al., 1991; Noble und Wrathall, 1987). Iizuka et al. (1987) fanden bereits eine Stunde nach Läsionseintritt Membranschädigungen der Neurone, die sich in einer erhöhten Albumin-Immunoreaktivität äußerten. Serotonin und Noradrenalin wurden bei Rückenmarkläsionen ebenfalls massiv vermehrt freigesetzt (Übersicht siehe Liu et al., 1991).

Bei Studien, die von Olsson et al. (1990) durchgeführt wurden, erhielten Sprague-Dawley-Ratten an drei aufeinander folgenden Tagen vor Durchführung einer Rückenmarkläsion durch Inzision des Hinterhornes, intraperitoneal den Serotonin-Synthese-Inhibitor p-Chlorophenylalanin (p-CPA) verabreicht. Als Tracer diente bei diesen Versuchen neben ^{131}I -Natrium auch Lanthan-Nitrat, das ebenfalls mit dem Fixans intrakardial perfundiert worden war. Die Perfusionszeitpunkte erstreckten sich von 1 bis 5 Stunden, so daß im Gegensatz zu der hier vorgelegten Studie nur ein relativ kurzes Zeitintervall des Ausfalls der Blut-Rückenmark-Schranke ausgewertet werden konnte. Nach den Beobachtungen von Olsson et al. (1990) zeigten die mit p-CPA behandelten Tiere eine signifikante Abnahme der mit Lanthan markierten Vesikel, nicht jedoch die Kontrolltiere und die Tiere

mit Rückenmarkläsion, aber ohne p-CPA-Behandlung. Die Anzahl der endothelialen Vesikel in den mit p-CPA behandelten Tieren war der bei nicht behandelten und nicht operierten Kontrolltiere vergleichbar. Weder bei den mit p-CPA behandelten Tieren, noch bei den unbehandelten Tieren konnte eine Durchgängigkeit der Tight Junctions beobachtet werden. Hingegen waren bei nicht mit p-CPA behandelten Tieren, die eine Rückenmarksläsion erhielten, das Cytoplasma und die Basalmembran zum Teil mit Tracer markiert. Diese Markierung fehlte bei den mit p-CPA behandelten Tieren mit Rückenmarksläsion, sowie bei den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von Serotonin an der Vesikelbildung und damit am Durchlässigwerden der Blut-Rückenmark-Schranke nach Rückenmarksläsion. Sherma und Olsson (1990) fanden nach einseitiger Durchtrennung des Rückenmarks von Sprague-Dawley-Ratten bereits 5 Stunden nach der Läsion makroskopisch sichtbare Schwellungen, die sich sowohl nach distal als auch nach proximal ausbreiteten. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung waren bereits zu dieser Zeit Astrozytenschwellungen nachweisbar. Der gesamte Beobachtungszeitraum erstreckte sich lediglich über 5 Stunden nach Durchführung der Läsion.

In der eigenen hier vorliegenden Kryoläsionsstudie waren 6 Stunden nach Durchführung der Läsion die Astrozytenendfüße geschwollen. Dies war auch noch 15 Tage nach der Läsion der Fall, ein Ergebnis, das mit den Erkenntnissen von Trout et al. (1995) übereinstimmt. Der Untersuchungszeitbereich belief sich in der letzteren Studie auf 4 bis 24 Stunden. Sharma und Olsson (1990) konnten zeigen, daß durch die Gabe von p-CPA die Ödembildung im Vergleich zu nicht mit p-CPA vorbehandelten Tieren signifikant gesenkt werden konnte. Dies erlaubt den Schluß, daß Serotonin an der Ödembildung bei ZNS-Verletzungen beteiligt ist.

Trout et al. (1995) fanden bei Astrozytenschwellung im Bereich des cerebralen Cortex eine Erhöhung der Ornithin-Decarboxylase-Aktivität und des

Polyamin-Spiegels. Wurden vor der Läsion 1. der Ornithin-Decarboxylase Inhibitor α -Difluoromethylornithin, 2. das den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor von Polyaminen blockierende Ifenprodil und 3. der NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801, intraperitoneal verabreicht, so wurde die Astrozytenschwellung auf nahezu gleiches Niveau wie bei den Kontrolltieren gesenkt. NMDA-Rezeptoren befinden sich in ZNS-Neuronen und Kapillar-Endothel (Koenig et al., 1992). Wurde die Rezeptor-Blockade durch Putrescin wieder aufgehoben, kam es zu einer erneuten Astrozyten-Schwellung im perikapillaren Raum. Es ist offensichtlich, daß die NMDA-Rezeptoren an dem pathophysiologischen Geschehen bei der perikapillären Astrozytenschwellung maßgeblich beteiligt sind. Koenig et al. (1989b) konnten eine reversible Öffnung der Blut-Hirn-Schranke auch durch die Infusion von hyperosmolaler Mannitol-Lösung erreichen. Auch dabei konnte eine durch Ornithin-Decarboxylase geregelte Synthese von mikrovaskulären Polyaminen nachgewiesen werden. Der Anstieg der Ornithin-Decarboxylase-Aktivität verläuft bei ZNS-Läsion in zwei Phasen: Einem Anstieg innerhalb von 1 min, bei dem das Basisniveau innerhalb von 10 min wieder erreicht wird, folgt erst nach 2-6 Stunden eine zweite Anstiegsphase, die innerhalb von 48 Stunden ihren Gipfel erreicht.

Medikamentös kann sowohl die Ornithin-Decarboxylase-Aktivität als auch die Synthese von Polyaminen durch Acetylsalicylsäure, Verapamil (einen $\text{Ca}^{\oplus\oplus}$ -Antagonisten) und Dexamethason (Fluormethylprednisolon) gehemmt werden (Koenig et al., 1989b). Werden innerhalb der ersten 8 Stunden nach Rückenmarkverletzung 30 mg/kg KG Methylprednisolon als Bolusgabe innerhalb 15 min und, 45 min später beginnend, 5,4 mg/kg KG kontinuierlich über 23 Stunden infundiert, so können zumindest teilweise neurologische Verbesserungen bei inkompletten, ja selbst primär kompletten Lähmungen erzielt werden (Übersicht siehe Gerner, 1992).

Bei einer Rückenmarkverletzung werden Proteine und Aminosäuren vermehrt freigesetzt, aber auch Calcium aus dem Plasma tritt vermehrt in das Gewebe über. Hsu et al. (1985) konnten zeigen, daß die Calcium-Anreicherung im Nervengewebe nach einer Rückenmarkverletzung proportional der Erhöhung der Gefäßpermeabilität ist. Die pathogenetische Rolle von Calcium konnte geprüft werden: Durch experimentelle *in vivo*-Gabe von Calcium traten am Rückenmark pathologische Veränderungen auf, die denen bei einer Rückenmarkverletzung entsprachen (Übersicht siehe Noble und Wrathall, 1989). Bandtlow et al. (1993) fanden außerdem Hinweise dafür, daß $\text{Ca}^{\oplus\oplus}$ als Second Messenger für die von Caroni und Schwab (1988b, 1989) auf den Myelinscheiden der Oligodendroglia beschriebenen Inhibitionsproteine NI-35 der Nervenwachstumskegel (growth cones) wirksam ist. Durch Einsatz von Dantrolene, einem $\text{Ca}^{\oplus\oplus}$ -Inhibitor, konnte nämlich der durch NI-35 hervorgerufene Schwund von Nervenwachstumskegeln der dorsalen Nervenwurzelganglienzellen in Zellkulturexperimenten verhindert werden. Der vesikuläre Transport und die Pinozytose von Meerrettich-Peroxidase durch das Kapillar-Endothel der Blut-Hirn-(Rückenmark-) Schranke wird nicht nur durch Serotonin, sondern auch durch Noradrenalin, Adenyl-Cyclase und zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (Westergaard, 1975) sowie Histamin (Joó, 1994) gesteigert. Dux und Joó (1982) konnten zeigen, daß nach Infusion von 60 $\mu\text{g/ml}$ Histamin in Krebs-Ringer-Lösung durch die Arteria carotis communis die Anzahl von Pinozytose-Vesikeln im cerebralen Kapillar-Endothel beträchtlich gesteigert wurde. Die perikapillären Astrozyten-Endfüße waren ödematös angeschwollen. Mit weiterer Steigerung der Histaminkonzentration über 200 $\mu\text{g/ml}$ bis auf 500 $\mu\text{g/ml}$ war ferner eine zunehmende Schwellung der Mitochondrien und der Kapillar-Endothelzellen zu beobachten. Außerdem zeigte sich eine verstärkte Durchlässigkeit des Kapillar-Endothels für Albumin im immunhistochemischen Nachweis. Diese Ergebnisse lassen die

Gabe von Blockern des Histamin-H₂-Rezeptors, z.B. Ranitidin, zur Ödem-Prophylaxe und Therapie sinnvoll erscheinen.

Eine Öffnung der Tight Junctions als dem Hauptsubstrat der Blut-Hirn-(Rückenmark-) Schranke war jedoch im Kapillar-Endothel des ZNS unter Histamin nicht zu beobachten (Joó, 1994). Im Vergleich dazu sind endoneurale Gefäße der peripheren Nerven aufgrund des Gehalts kontraktile Proteine in der Gefäßwand unter dem Einfluß von Histamin und Serotonin in ihrer Durchgängigkeit viel variabler als das Kapillar-Endothel des ZNS. Als Hawkins et al. (1992) Meerschweinchen mit einem subkutan angewandten Gemisch aus homogenisiertem Rückenmark und komplettem Freund's Adjuvans, das abgetötetes *Mycobacterium tuberculosis* enthält, immunisierten und dabei die allergische Encephalomyelitis – ein Modell autoimmun vermittelter Entmarkungskrankheit, wie sie für die Multiple Sklerose angenommen wird – auslösten, eröffneten sie gleichzeitig die Blut-Hirn-Schranke. Sie zeigten auch, daß durch die Perfusion des Rückenmarks mit 2,4-Dinitrophenol, einem fettlöslichen und damit die Blut-Hirn-(Rückenmark-) Schranke passierenden Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, die Vesikelbildung (Pinozytose) unterdrückt wurde. In nicht-neuralen, sondern epithelialen MDCK-Zellen wiesen Mandel et al. (1993) eine Abhängigkeit der transepithelialen Permeabilität vom ATP-Gehalt nach und fanden als morphologisches Korrelat eine Veränderung der Tight Junctions. Ähnliche Befunde am Blut-Hirn-Schranken-Endothel sind zwar nicht bekannt, wären aber zu erwarten oder zumindest plausibel. Immunologische, aber auch die als energieabhängig erkannten Prozesse der Pinozytose und Aufrechterhaltung der Tight Junctions, scheinen also die Schrankenfunktionen negativ oder positiv zu beeinflussen.

4.4 Makrophagen und Blut-Hirn-Schranke

Bereits sechs Stunden nach dem Setzen der Kryoläsion war in der vorliegenden Studie eine Zunahme der Zahl der Makrophagen im Läsionsbereich zu beobachten. Aufgrund der angewandten Perfusionstechnik, die vor der Fixierung eine Vorspülung mit Ringer-Lösung beinhaltete, waren in den Gefäßen keine neutrophilen Granulozyten zu finden. Die Makrophagenaktivität und die Resorption der Zelldebris, insbesondere der Myelinscheiden der durch die Kryoläsion geschädigten Axone, erreichten am dritten postläsionalen Tag einen ersten Höhepunkt (Abb.8). Dieser Zeitpunkt wurde auch bei der von Dusart und Schwab (1993) angewandten Läsionstechnik der Transection des Rückenmarks beschrieben. Die Makrophagen waren während der gesamten ersten Woche nach der Kryoläsion in großer Anzahl im Läsionsbereich nachweisbar; sie waren hier noch 15 Tage nach der Kryoläsion deutlich nachweisbar (Abb.22).

Im Gegensatz zu anderen Körpergeweben, wie etwa der Haut, fehlt sowohl im Zentralen als auch Peripheren Nervensystem eine akute Entzündungsreaktion. Dies äußert sich im ZNS in einem um mehrere Tage verzögerten Auftreten von Monozyten nach einer ZNS-Läsion im Vergleich zu Läsionen außerhalb des ZNS (Perry et al., 1993). Daher werden die Myelin-Debris im ZNS nur sehr langsam phagozytiert. Im Peripheren Nervensystem ist die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen schon deutlich höher (Perry et al., 1987). Gerade der langsame Stoffwechsel des ZNS-Myelins wird jedoch als sehr wesentlich für die fehlenden Regenerationsfähigkeit des ZNS angesehen (Schwab und Caroni, 1988). Unter physiologischen Bedingungen besteht der Hauptanteil Makrophagenartiger Zellen im ZNS aus Mikroglia. Deren Zell-Oberfläche läßt sich durch den Antikörper F4/80 markieren. In den ZNS-Regionen, in denen die Blut-Hirn-Schranke für Plasma-Proteine durchlässig ist, ähneln die F4/80-positiven Zellen in ihrer Morphologie hämatogenen Makrophagen (Perry et

al., 1992). Dies läßt vermuten, daß die Mikroglia unter Einfluß von Plasmaproteinen nicht nur in ihrer Morphologie sondern evtl. auch in ihrer Funktion verändert werden kann. Nach ZNS-Verletzung könnten die im Gefolge der Schrankenstörung eingedrungenen Plasma-proteine die Phagozytose z. B. durch Mikroglia-Aktivierung entscheidend mitbeeinflussen.

4.5 Der Glucose-Transporter GLUT-1

Da für D-Glucose die Passage durch die geschlossene, intakte Blut-Hirn-(Rückenmark-)Schranke nicht möglich ist, erfolgt der Eintritt von Glucose in das ZNS-Parenchym durch den Glucose-Transporter. Die Isoform GLUT-1 ist besonders typisch für das Blut-Hirn-(Rückenmark-) Endothel, sie transportiert nur D-Glucose.

In der vorliegenden Kryoläsionsstudie des Rückenmarks wurde die Expression des Glucose-Transporters unter der Vorstellung untersucht, daß eine pathologisch geöffnete Blut-Hirn-(Rückenmark-) Schranke, wenn sie Proteine passieren läßt, auch für Glucose-Moleküle durchgängig ist, wodurch dann die Expression des Glucose-Transporters zurückgehen müßte (Rosenstein und More, 1994; Harik et al., 1990).

Verschiedene Veränderungen im Bereich des Kapillar-Endothels können eine Änderung der Expression des Glucose-Transporter bedingen. Loike et al. (1992) konnten zeigen, daß bei experimentell erzeugten hypoxischen Gewebezuständen von Kapillar-Endothelien sowohl der bovinen Aorta als auch der Umbilikalvene des Menschen die Expression von GLUT-1 erhöht ist. Diese Endothelien weisen jedoch keine Barriere-Funktion auf. Für cerebrale Kapillar-Endothelien nach Läsion fanden Rosenstein und More (1994) jedoch Gegenteiliges: GLUT-1 war an jungadulten Ratten nach experimenteller Stichverletzung des Gehirns nach anfänglicher Nachweis-Negativität im Läsionsbereich erst eine Woche später wieder schwach

positiv. Nach 3 Wochen war GLUT-1 deutlicher, nach 6 Wochen auch im umgebenden Narbengewebe nachweisbar.

In der vorliegenden Kryoläsionsstudie wurde GLUT-1 am experimentell geschädigten Rückenmark erstmalig untersucht. Mit der immunfluoreszenzmikroskopischen Technik war GLUT-1 am ersten postläsionalen Tag noch nachweisbar (Abb.25). Am 3. und 6. Folgetag war dies im Läsionsbereich und distal davon nicht mehr der Fall (Abb.26, 27). Nach 15 Tagen war GLUT-1 im Rückenmarkssegment distal der Läsion wieder exprimiert (Abb.28). Im Läsionsbereich selbst war eine noch sehr schwache, beginnende Expression nachweisbar (Abb.29). Die distale Normalisierung von GLUT-1 korrelierte mit dem Fehlen der Lanthan-gefüllten Vesikel im distalen Rückenmarkssegment am 15. postläsionalen Tag, nachdem sie am 1., 3. und 6. Tag nach der Läsion vorhanden waren. Somit scheint die Regeneration der Blut-Rückenmark-Schranke von distal her um den 15. Tag zu erfolgen, auch wenn die Interendothelialspalten nach den vorgelegten Ergebnissen (siehe 3.3.5) für Lanthan noch zugänglich waren. Nach den Ergebnissen von Dusart und Schwab (1993) ist die Blut-Rückenmark-Schranke zwei Wochen nach Läsion zwar schon ganz geschlossen, jedoch verwendeten diese Untersucher keinen metabolischen Marker wie GLUT-1, und außerdem einen weniger als Lanthan geeigneten räumlichen Tracer (Immunglobulin). Abgesehen davon prüfen räumliche Tracer im wesentlichen den Anteil der Tight Junctions an der Blut-Hirn- (Rückenmark-) Schranke, GLUT-1 aber deren metabolischen Zustand. Die geprüften, unterschiedlichen Funktionen könnten nach einem Ausfall der Schranke mit unterschiedlicher Kinetik regenerieren.

4.6 Der Glucose-Stoffwechsel in der medizinischen Diagnostik:

Der Glucose-Stoffwechsel des ZNS eignet sich als Parameter für die klinische Diagnostik. Durch Gabe von speziell radioaktiv markierter Desoxy-Glucose (Herholz et al., 1990) ist es möglich, pathologische Stoffwechselherde im ZNS darzustellen. Das Verfahren heißt Positronen-Emissions-Tomographie (PET, siehe Abschnitt 3.4). Die als Pilot-Versuch bei der vorliegenden Kryoläsionsstudie durchgeführte PET-Untersuchung ergab im Läsionsbereich des thorakalen Rückenmarks eine Aufhellung, die in ihrer Ausdehnung mit der Kryoläsion des Rückenmarks korrelierte. Unter klinischen Aspekten könnte die gezielte PET tatsächlich Herde von Undichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke aufspüren, in denen hämatogen transportierte Substanzen wie Entzündungsmediatoren, Neurotransmitter und Hormone das neurale Parenchym ungehindert erreichen und schädigen (Engelhard et al., 1994; Fawcett et al., 1989; Logan et al., 1994; Perry et al., 1993). Eine andere, schon der klinischen Praxis nähere Einsatzmöglichkeit hat die PET-Technik dadurch, daß sie bei Kontusionsverletzungen des Rückenmarks den kernspintomographischen Techniken diagnostisch überlegen zu sein scheint.

4.7 Die Blut-Rückenmark-Schranke unter klinischem Aspekt:

Durch rechtzeitige Gabe von Steroid-Hormonen (Gerner, 1992) ist es möglich, das Ausmaß eines Hirn- oder Rückenmark-Ödems zu begrenzen, wenn nicht gar ganz zu verhindern. Für den Wirkmechanismus wird u.a. das Abfangen freier Radikale als Ödem-Prophylaxe diskutiert. Auch weibliche Steroide scheinen wirksam zu sein, denn Roof et al. (1994) beschrieben, daß weibliche Ratten, die eine experimentelle Kontusion der Hirnrinde erhalten hatten, eine geringere Ödem-Neigung als männliche Ratten mit ähnlichem Verletzungsmechanismus entwickelten. Umgekehrt führten

Versuche mit männlichen Ratten, die unter experimentellen Bedingungen Progesteron erhalten hatten, wiederum zu einer Reduzierung des Hirnödems. Die Steroid- Hormone sind unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (Übersicht siehe Risau und Wolburg, 1990).

Eine therapeutische Öffnung der Blut-Hirn-(Rückenmark-) Schranke könnte z.B. für den künftigen Einsatz von neurotrophen Wachstumsfaktoren diskutiert werden. Diese Substanzen könnten das ZNS-Gewebe direkt erreichen und dann bei offener Blut-Hirn-Schranke, ähnlich wie im peripheren Nervensystem, in das Läsionsgebiet eindringen und regenerativ wirksam werden. Der Ciliary Neurotrophic Factor (Sendtner et al., 1990, 1994), der sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Wirkung auf das Überleben von Motoneuronen ausübt (Thoenen et al., 1993; Oppenheim et al., 1991), sowie Nerve Growth Factor (De Kosky, 1994) wären mögliche Kandidaten für therapeutische Versuche. Ciliary Neurotrophic Factor ist kürzlich durch Röntgen-Struktur-Analyse (McDonald et al., 1995) in seiner Kristall-Struktur aufgeklärt worden. Diese Kenntnis könnte dazu beitragen, die Wirkung des Proteinfaktors durch gezielte Veränderung seiner molekularen Struktur zu verbessern.

Für diagnostische Zwecke dürfte das Wissen um die Art und den zeitlichen Ablauf der Veränderungen der Blut-Hirn-(Rückenmark-) Schranke nach Läsionen hilfreich sein, um die Registrierung sowohl der traumatischen als auch der neurodegenerativen und der regenerativen Veränderungen des ZNS zu optimieren.

Die oben beschriebene PET-Untersuchung kann dazu dienen, Verletzungen des Rückenmarks durch Kontusion oder durch Luxation der Halswirbelsäule ohne knöcherne Begleitverletzungen besser und schneller zu diagnostizieren.

4.8 Wertigkeit der Tiermodelle für die menschliche Querschnittlähmung

Bei den Läsionsmodellen der Ratte ist zu berücksichtigen, daß der Anteil sensibler Nervenfasern denjenigen motorischer Fasern in der Pyramidenbahn, dem Hauptziel der Läsion, offensichtlich überwiegt. Dies trifft für die Verhältnisse in der Pyramidenbahn des Menschen nicht in gleicher Weise zu (Iizuka et al., 1986; Brown, 1971) und stellt die Aussagekraft von Läsionsversuchen bei Ratten etwas infrage. Ähnliches gilt für Versuche mit Katzen: Blight (1983) konnte zeigen, daß nach Kontusionsläsion des Rückenmarks nicht mehr als 5-10% morphologisch intakte Axone ausreichen, um eine effektive Fortbewegung der Katze zu ermöglichen.

Wie bei den meisten Tiermodellen, muß der Beitrag zum besseren Verständnis oder gar zu Therapie-Ansätzen der entsprechenden menschlichen Erkrankungen stets kritisch abgewogen werden.

4.9 Das Kryoläsionsmodell und mögliche Schlußfolgerungen für menschliche Rückenmarksverletzungen

Mit der entwickelten Kryoläsionstechnik konnte an der Ratte erstmalig ein weitgehend artefaktfreies Modell der segmentalen Rückenmarksschädigung entworfen werden. Im Vergleich zu anderen Läsionstechniken konnten Einblutungen in das Gewebe sowie Zerstörungen der grauen Substanz vermieden werden. Die Läsion betraf im wesentlichen die Axone und Leitungsbahnen der weißen Substanz. Die morphologisch übersichtlichen Verhältnisse im Läsionsgebiet erlaubten es, die Blut-Rückenmark-Schranke, deren Ausfall und Regeneration pathophysiologisch bedeutsam sind, mit ultrastrukturellen und immunocytochemischen

Methoden zu untersuchen. Mit dem räumlichen Tracer der Schranke, Lanthan-Nitrat, mit dem auch die Pinozytose-Aktivität bei Ausfall der Schranke erfaßt werden konnte, sowie dem Marker einer biochemischen Eigenschaft der intakten Schranke, Glucose-Transporter Isoform 1 (GLUT-1), der bisher noch nicht am Rückenmark untersucht wurde, ergaben sich folgende wahrscheinliche Zusammenhänge:

Wenige Stunden nach der Läsion fällt die Schranke aus, bleibt längere Zeit offen und regeneriert sich dann von distal der Läsionsstelle her, wobei ab dem 15. postläsionalen Tag die Regeneration distal abgeschlossen ist und nun in Richtung der Läsionsstelle fortschreitet.

Der übereinstimmende Gang des physikalischen Tracers und des biochemischen Markers wurde, insbesondere am Rückenmark, erstmalig dokumentiert. Von klinisch-neuroradiologischer Seite ergänzend, wurde am Tiermodell die läsionsbedingte Öffnung der Blut-Rückenmark-Schranke durch Darstellung des lokal gesteigerten Glucose-Stoffwechsels mittels der PET-Technik zum ersten Mal markiert.

Die erzielten Ergebnisse stellen einen technischen Fortschritt bei der Analyse der segmentalen Rückenmarksschädigung und der begleitenden Schrankenstörung dar. Die bisher noch wenig geprüfte Hypothese, daß die Schrankenstörung am Rückgang der Expression des Glucose-Transporters 1 verfolgt werden kann, wurde bestätigt.

Für segmentale Rückenmarksverletzungen des Menschen kann man folgern, daß der Zeitraum der Schrankenöffnung eine kritische, aber möglicherweise therapeutisch nutzbare Phase darstellt, die z.B. mit der PET-Technik adäquat zu registrieren wäre, um Therapie-Ansätze mit Medikamenten oder neurotrophen Substanzen, deren Anflutung eine offene Schranke erfordert, genau zu terminieren.

5 Zusammenfassung

Fünfundzwanzig männlichen Sprague-Dawley Ratten wurden Kryoläsionen am Rückenmark gesetzt und die Reaktionen dieses ZNS-Gewebes unter besonderer Berücksichtigung der Blut-Rückenmark-Schranke histologisch, immunzytochemisch und ultrastrukturell untersucht. Zwei nichtoperierte Tiere und ein kältefrei „sham“-operiertes Tier dienten als Kontrollen. Die Kryoläsion wurde mit einer neu entwickelten Operationstechnik durch Aufsetzen eines mit Flüssigstickstoff gekühlten Metallzylinders im Bereich des Rückenmarksegment Th 8 erzeugt. Zu den Zeitpunkten: 6 Std, 1 Tag, 3 Tage, 6 Tage und 15 Tage nach Operation wurden insgesamt 16 Tiere geopfert und intrakardial mit Lanthan-Nitrat perfundiert. Dieser elektronendichte Tracer ermöglichte es, die Permeabilität des Kapillar-Endothels und seiner Tight Junctions, die als morphologisches Korrelat der Blut-ZNS-Schranke angesehen werden, ultrastrukturell zu überprüfen.

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung wurden sowohl im Bereich der Kryoläsion, als auch distal davon gut abgrenzbare Veränderungen der Axone und der Myelinscheiden der weißen Substanz sichtbar. Die benutzte Läsionstechnik erlaubte eine weitgehende Schonung der grauen Substanz, die bei anderen Techniken zum großen Teil zerstört oder stark geschädigt wird. Elektronenmikroskopisch konnte bereits 6 Std nach der Operation eine Vermehrung der Pinozytose-Vesikel in den Endothel-Zellen als Zeichen des Ausfalls der Blut-Rückenmark-Schranke nachgewiesen werden. Noch bis zum 15. Tag hin war dieses Zeichen der offenen Schranke positiv.

Neun weitere Tiere wurden 1 Tag, 3 Tage, 6 Tage und 15 Tage nach Kryoläsion (ein Tier ohne Läsion als Kontrolle) geopfert und mit Paraformaldehyd perfundiert. Nach dieser Fixierung konnte die Expression des Glucose-Transporters, Isoform 1 (GLUT-1), als Marker der Schranken-

funktion immunzytochemisch dargestellt werden. GLUT-1 kontrolliert den Glucose-Transport durch die physiologische Blut-ZNS-Schranke. Solange diese pathologisch geöffnet ist, bleibt jedoch der Nachweis von GLUT-1 weitgehend negativ. Zum Nachweis wurden ein polyklonaler Kaninchen-Anti-GLUT-1-Antikörper verwendet und die Präparate immunfluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Es zeigte sich, daß GLUT-1 im Kapillar-Endothel des Kryoläsionsbereichs in seiner Reaktivität herunter geregelt wird, jedoch nach etwa 15 Tagen, also der gleichen Zeit, nach der die vermehrten Pinozytose-Vesikel noch auf eine Öffnung der Blut-Rückenmark-Schranke hindeuten, im Kapillar-Endothel des distalen Läsionsbereichs wieder exprimiert wird. Ergänzend wurde bei einem Tier eine nuklearmedizinische bildgebende Untersuchung (PET) vorgenommen, bei der die Läsionsregion mittels ihres erhöhten Glucose-Umsatzes dargestellt wurde.

Die Untersuchungen sollten einen Beitrag zu der Frage leisten, ob aus einem verbesserten Tiermodell von Rückenmarksverletzungen weitere Rückschlüsse auf Mechanismen und Behandlung der menschlichen Querschnittlähmung gezogen werden können. Die aufgezeigten Phasen des Öffnens und Schließens der Blut-Rückenmark-Schranke mit den zugehörigen zellulären Veränderungen könnten einige Hinweise für klinisch-diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte geben.

6 Abbildungen

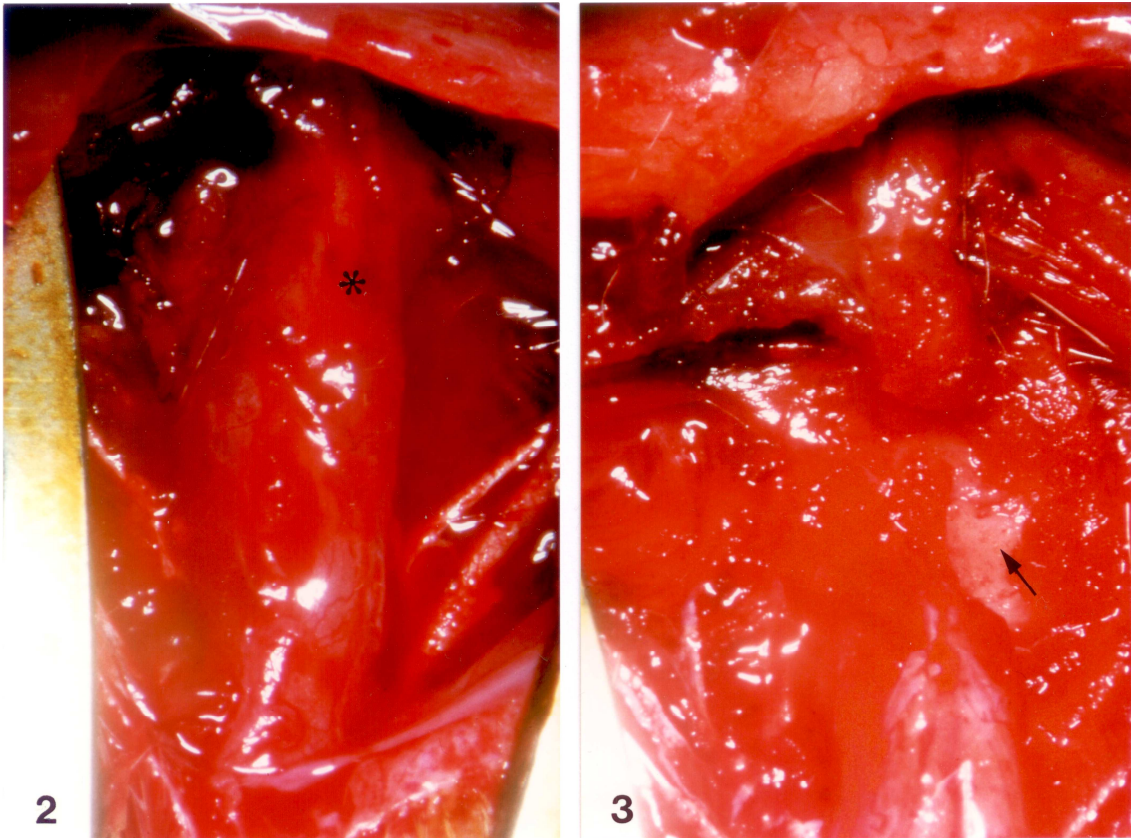


Abb. 2: Operationssitus: Tiefe Rückenmuskulatur (Stern), x25.

Abb. 3: Lamina arcus vertebrae nach Abtragung des Proc. spin. vertebrae (Pfeil), x25.

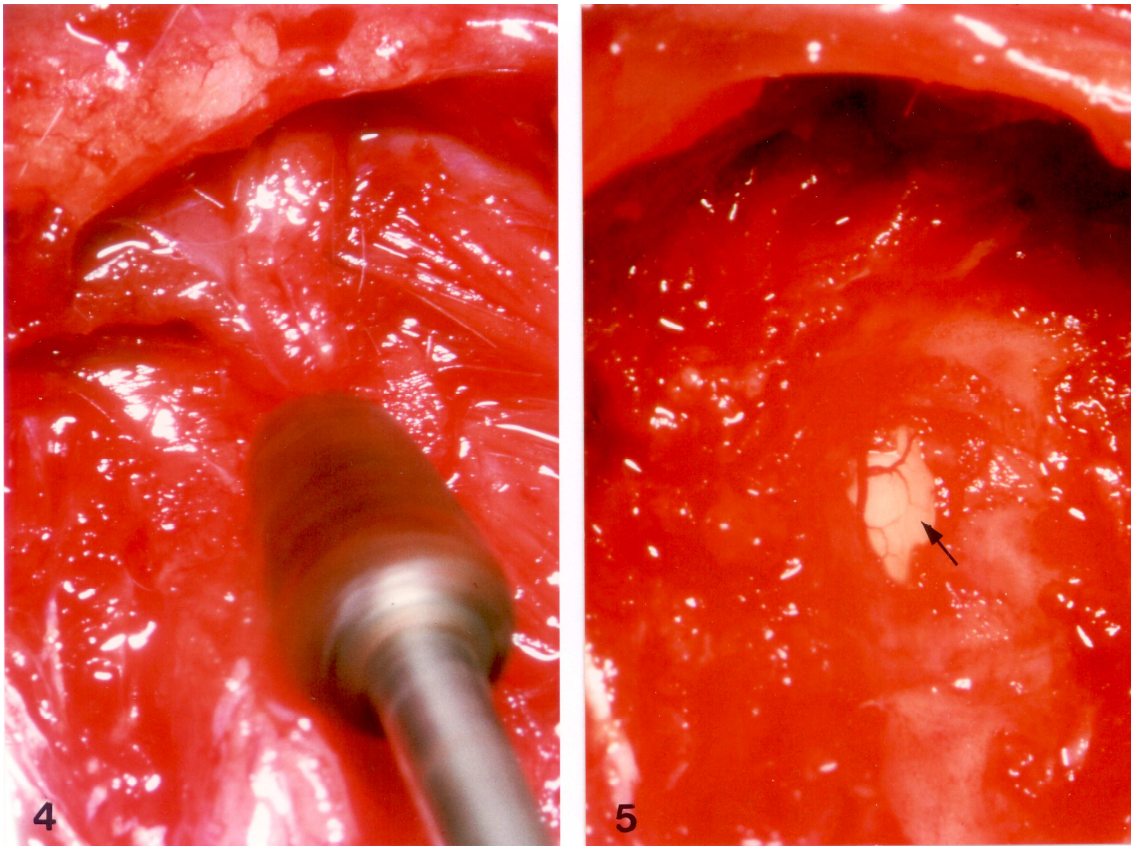


Abb. 4: Laminektomie durch Abfräsen der Lamina, x25.

Abb. 5: Darstellung des Rückenmarks (Pfeil) nach Laminektomie.
Die Rückenmark Gefäße sind vollständig erhalten, x40.

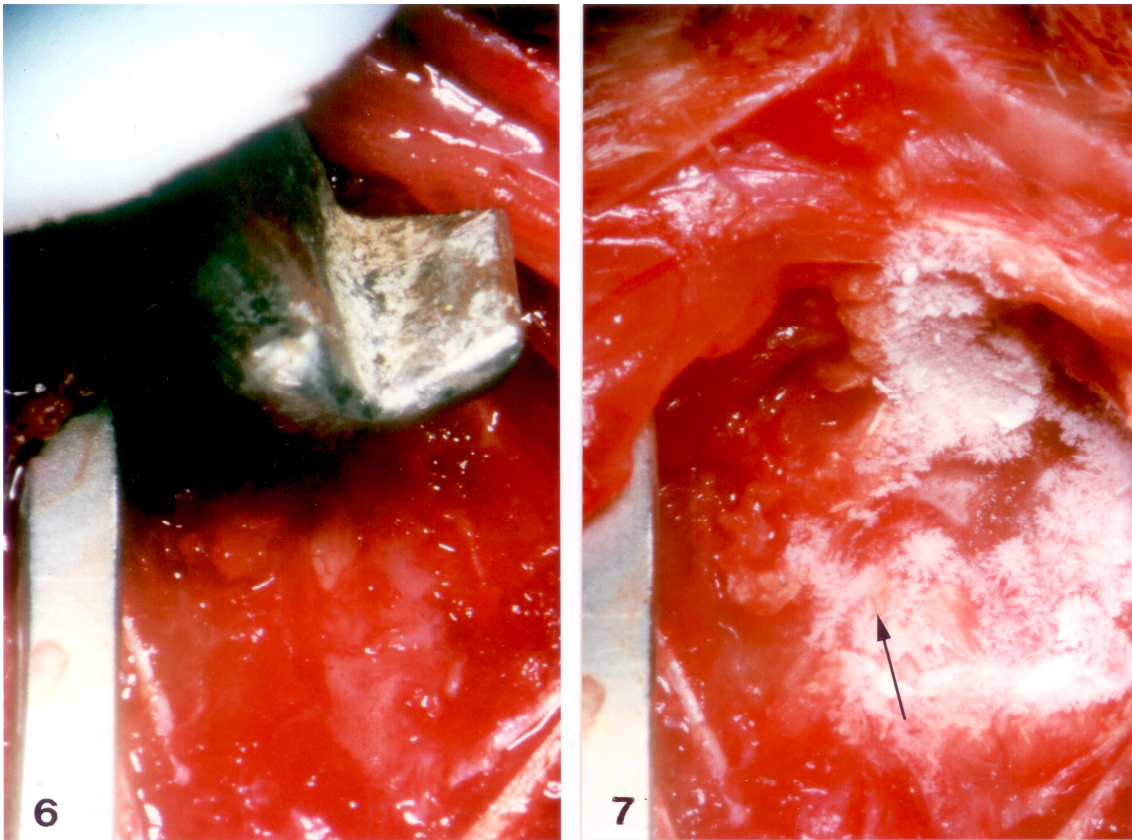


Abb. 6: Aufsetzen der Kryode (der Übersichtlichkeit halber hier ungekühlt), x25.

Abb. 7: Rückenmark (Pfeil) nach Kryoläsion (hell), x25.

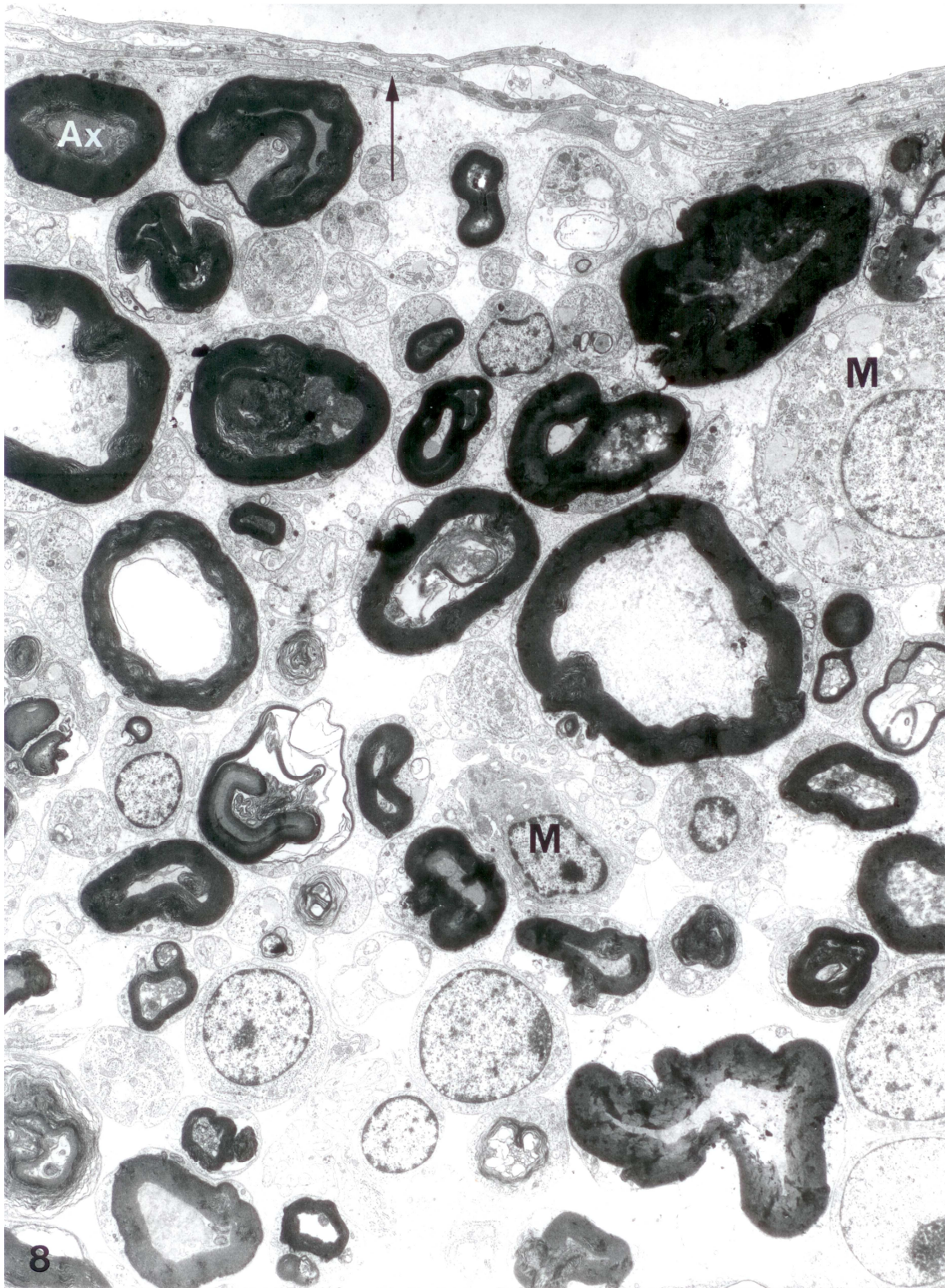


Abb. 8: Proximaler Läsionsbereich, 3 Tage nach Läsion.
Makrophagen (M), Pia mater (Pfeil),
Waller-Degeneration eines Axons (Ax), x4000.

Abb. 9: Kontrolltier, „sham“-OP: dorsales Rückenmark, Hinterhorn (H), Dura (D), Arachnoidea (Pfeil), Zentralkanal (Z), dorsaler Funiculus (Stern). x60.

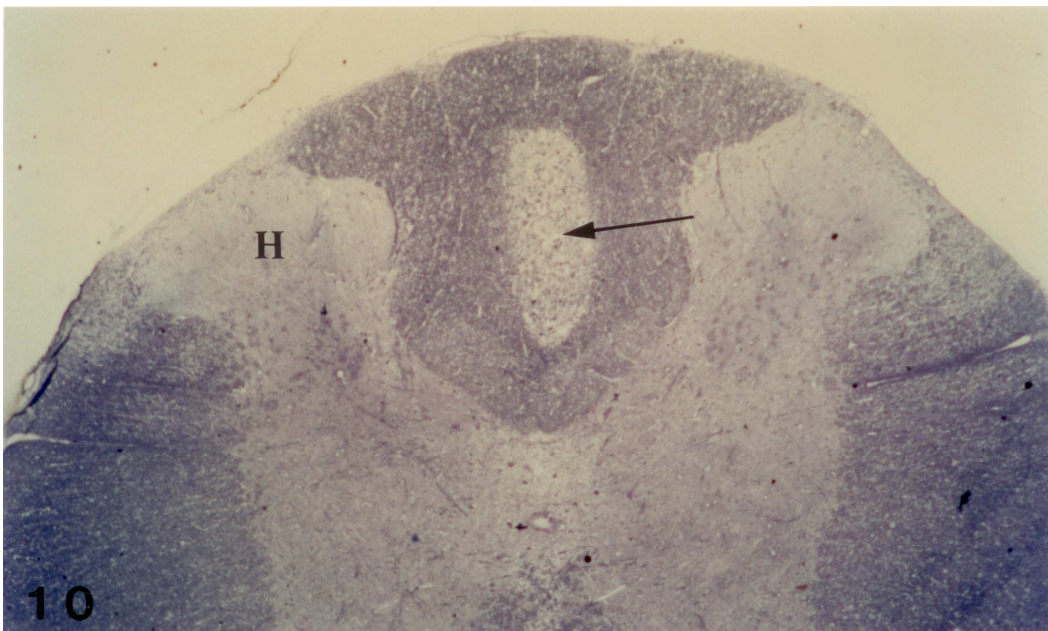
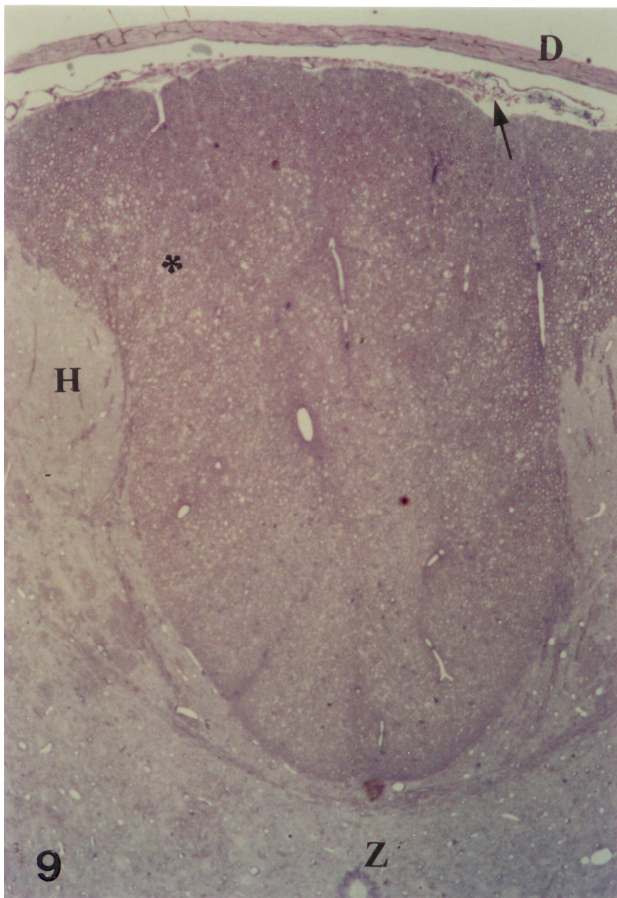


Abb. 10: Rückenmark des distalen Läsionsbereiches, 1 Tag nach Kryoläsion. Läsion (hell), (Pfeil), Hinterhorn (H), x33.

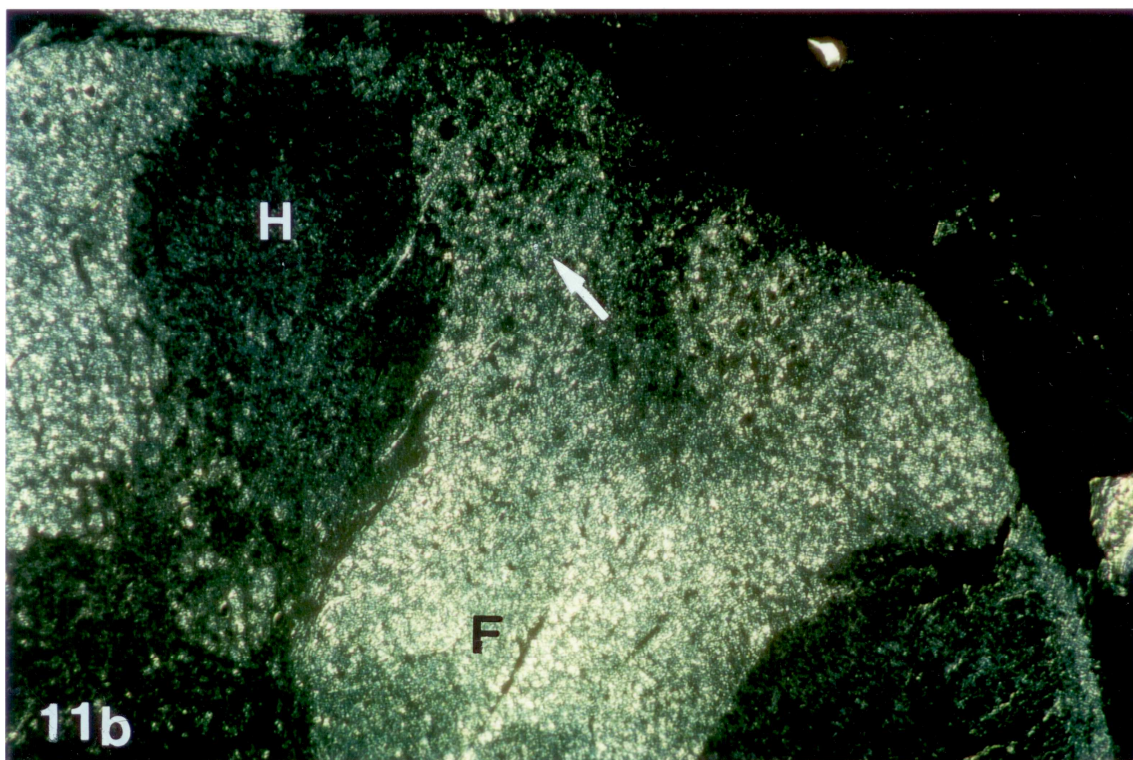
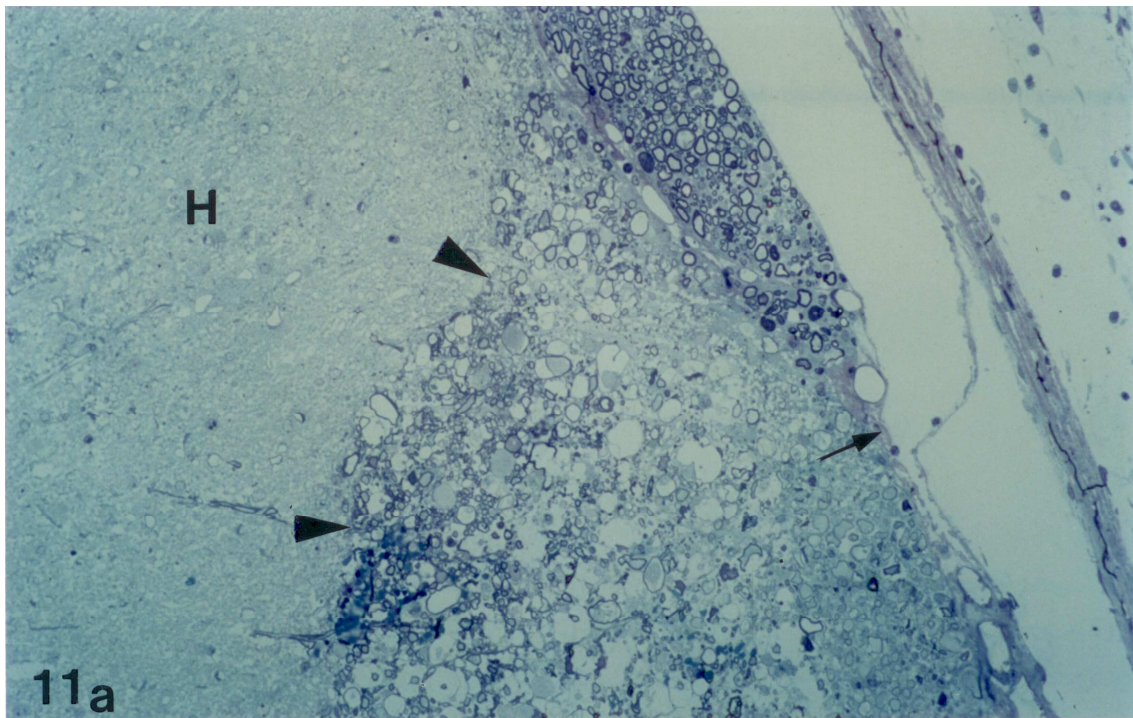


Abb. 11a: Läsionszone, 1 Tag nach Kryoläsion, Hinterhorn (H), Läsionszone (Pfeilspitzen), Pia Mater (Pfeil), x132

Abb. 11b: Läsionszone, 3 Tage nach Kryoläsion, Fluoreszenzaufnahme: Weiße Substanz (Nomarski), x66. Läsionszone (Pfeil), Fissura mediana dorsalis (F), Hinterhorn (H).

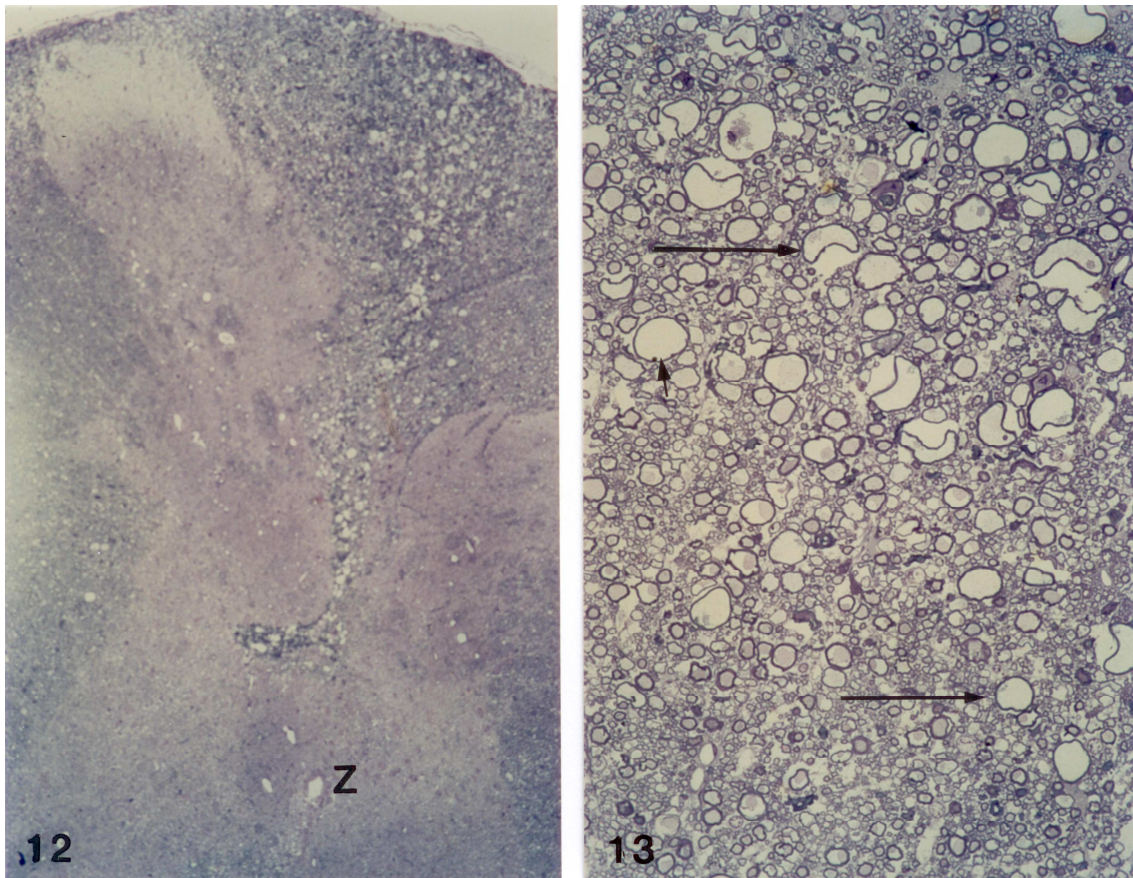


Abb. 12: Läsionszone (rechts und über Bildmitte), 15 Tage nach Kryoläsion des Rückenmarks. Zentralkanal (Z), x66. Die graue Substanz (links und unter der Mitte) ist gut erhalten.

Abb. 13: Läsionszone, 3 Tage nach Kryoläsion (Pfeile), x264. Die Myelinscheiden sind teilweise frei von Axonen.

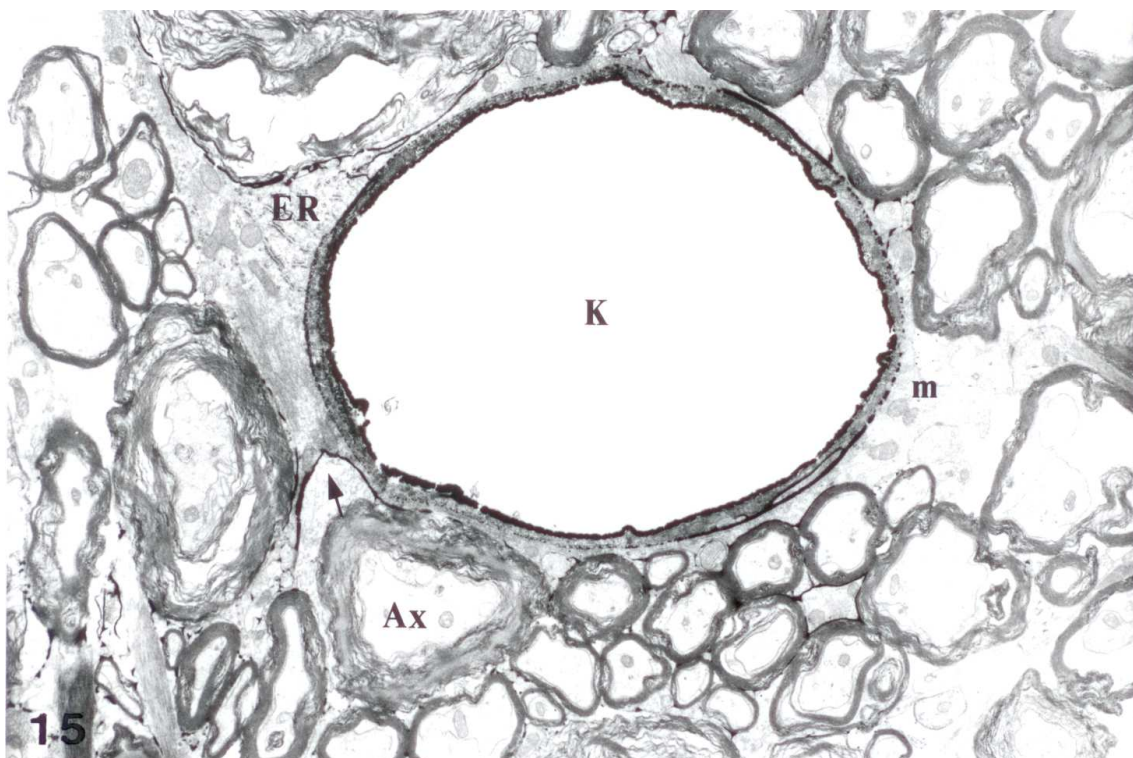
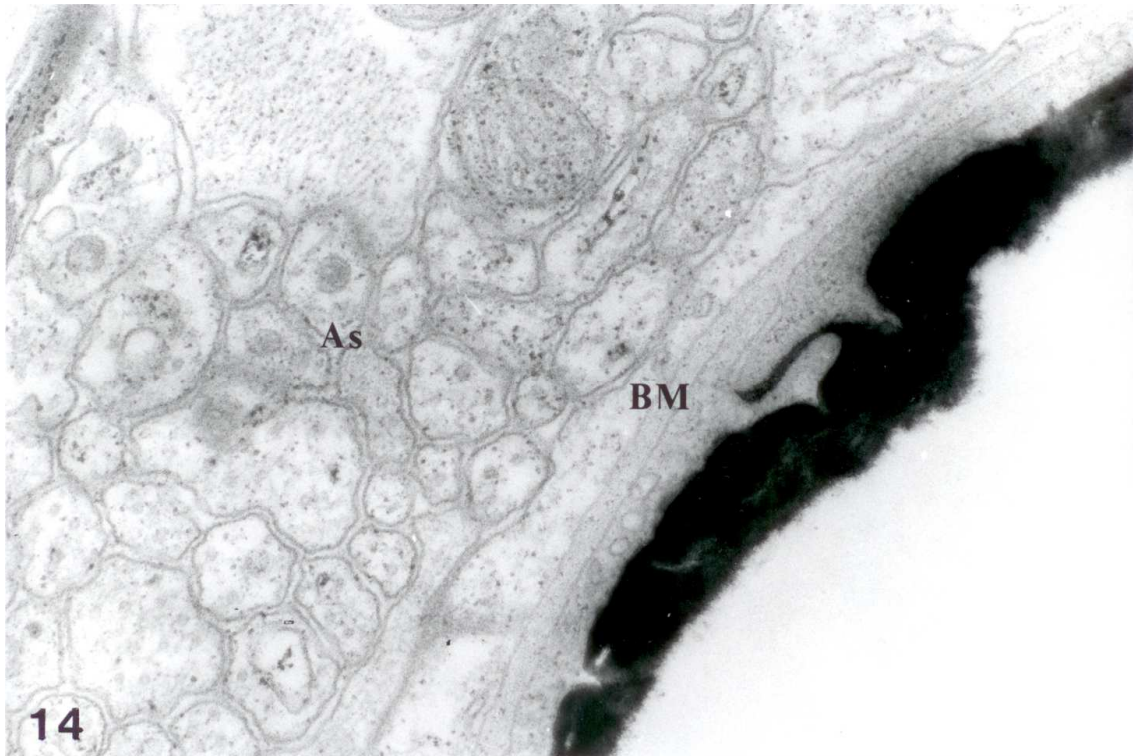


Abb. 14: Kontrolltier: Lanthan dringt in den Interzellularrspalt der Endothelien (dunkel). Basalmembran (BM), Astrozytenfortsätze (As), x72000.

Abb. 15: Kontrolltier, „sham-OP“: Lanthan (Pfeil) im perikapillären Raum. Axone (Ax), Kapillare (K), Endoplasmatisches Reticulum (ER), Mitochondrien (m), x7200.

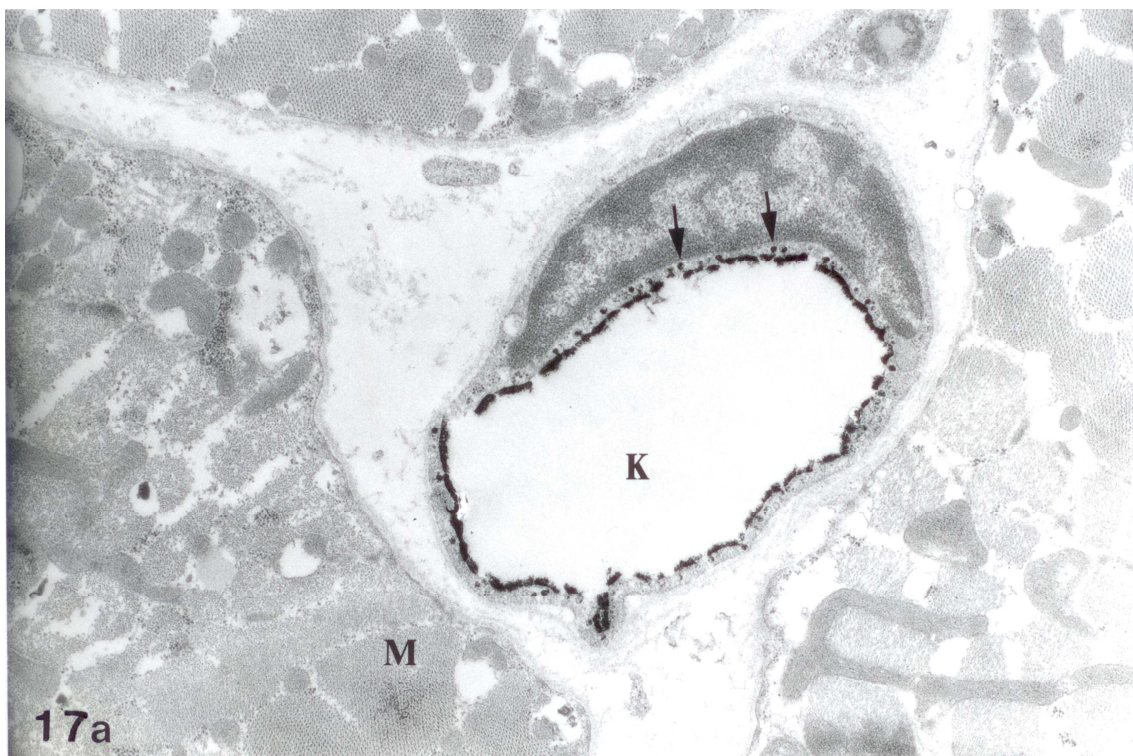
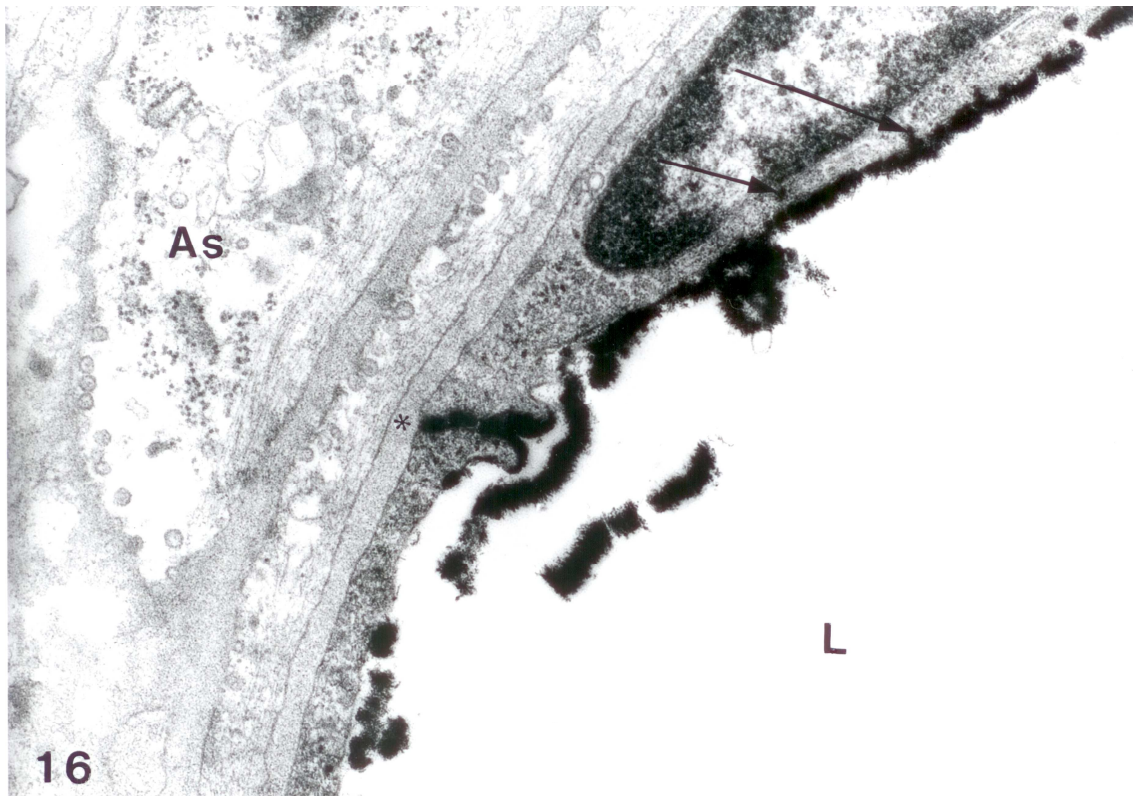


Abb. 16: 6 Std nach Kryoläsion des Rückenmarks: Kapillarlumen (L), Lanthan dringt im Interzellularrspalt bis zur Basalmembran (Stern), Pinozytosevesikel (Pfeile), Astrozytenfortsatz (As), x36000.

Abb. 17a: Muskelkapillare (K) 6 Tage nach Kryoläsion, Muskelfibrillen (M), Pinozytosevesikel mit La (Pfeile), x18000.

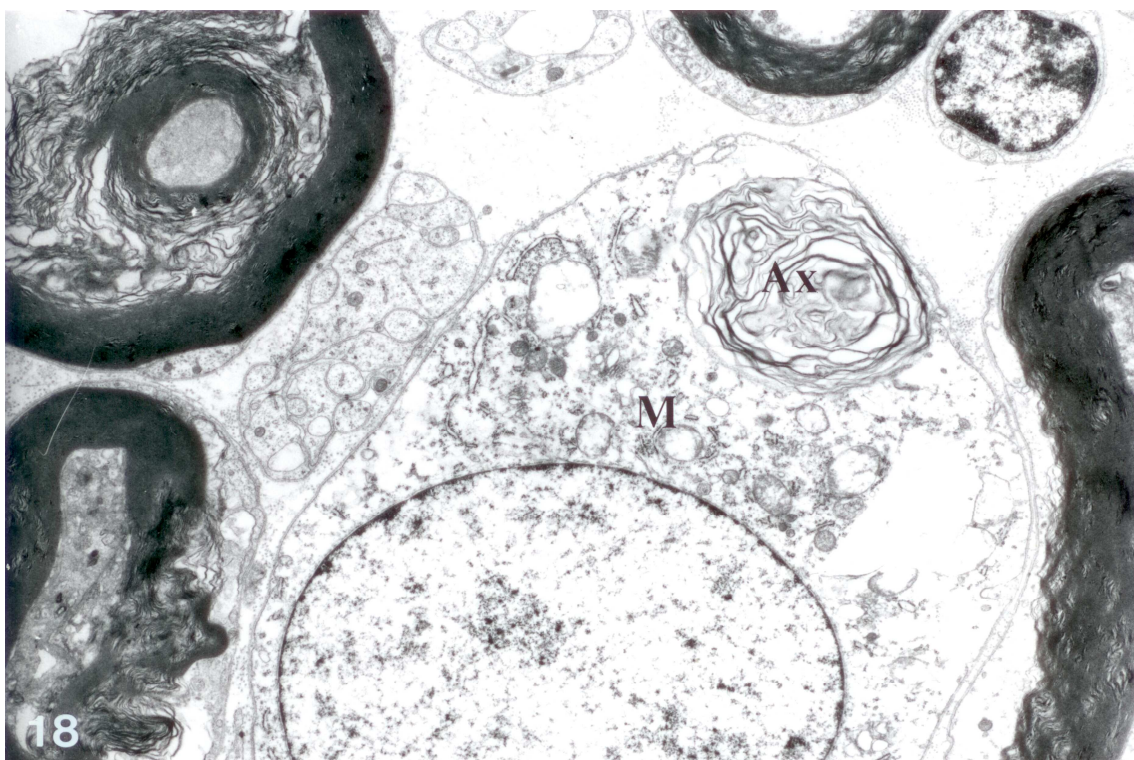
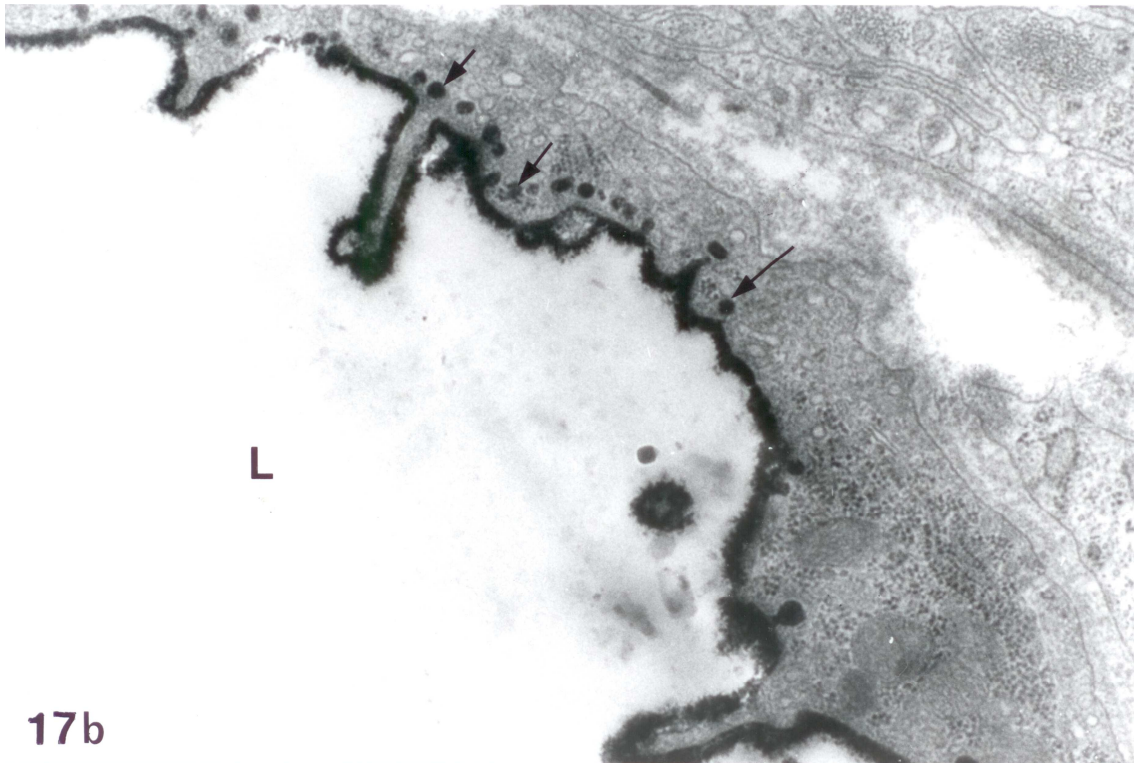


Abb. 17b: 1 Tag nach Kryoläsion im Rückenmarksbereich: zahlreiche Pinozytosevesikel mit Lanthan (Pfeile), Lumen einer Kapillare (L), x36000.

Abb. 18: 3 Tage nach Läsion: Phagozytose eines myelinisierten Axons (Ax) durch Makrophagen (M), x7200.

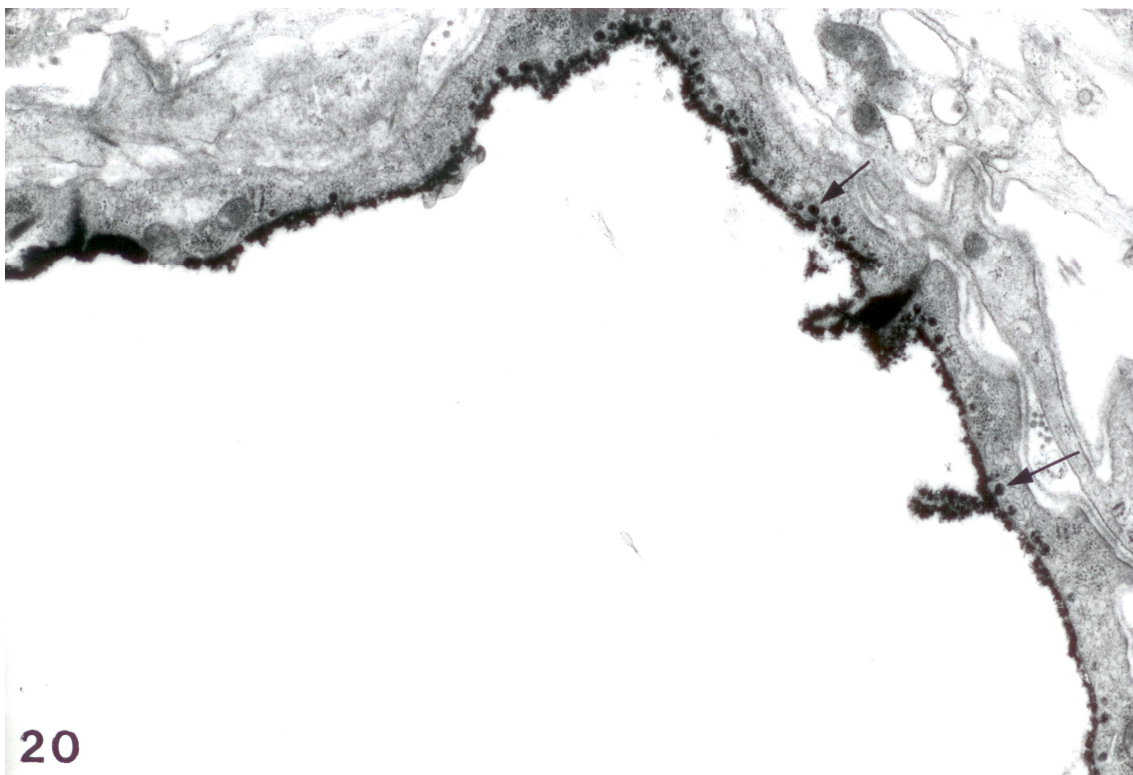
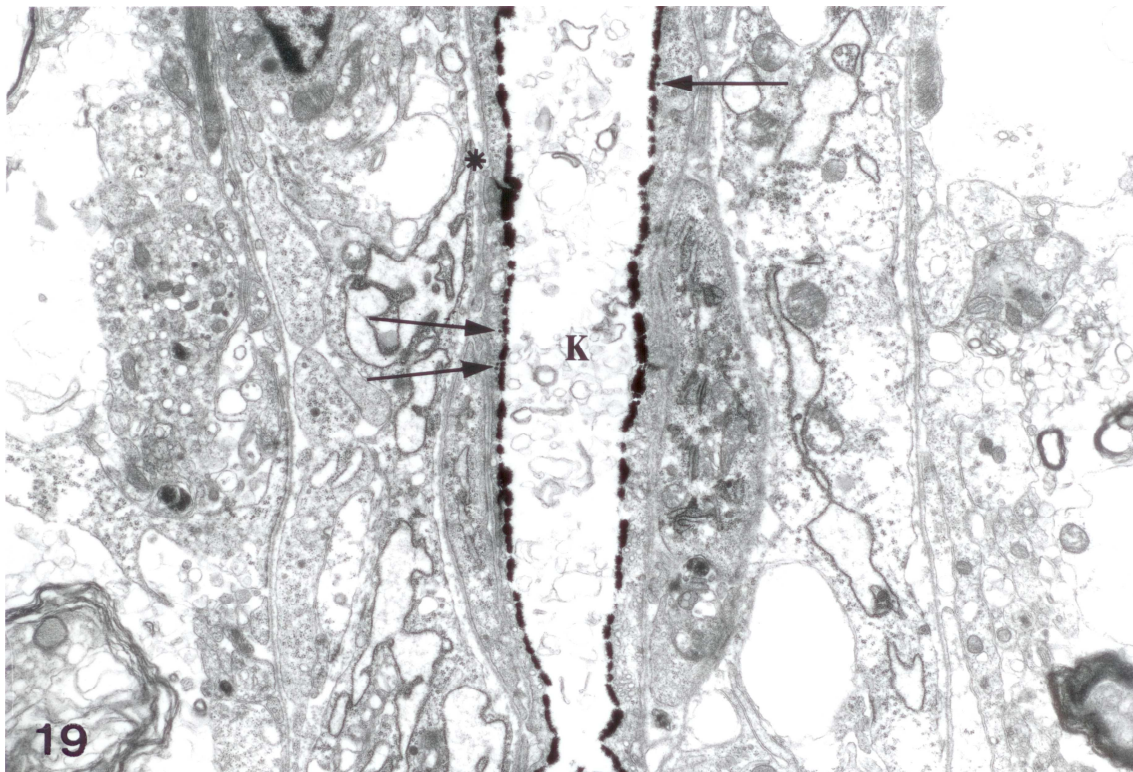


Abb. 19: 3 Tage nach Kryoläsion: distale Läsionsregion, Kapillare (K), Pinozytosevesikel (Pfeile), Lanthan im Interzellularrspalt (Stern), x9000.

Abb. 20: Kapillare der Pia Mater: 6 Tage nach Läsion, Pinozytosevesikel (Pfeile) zeigen hohe Durchlässigkeit, x18000.

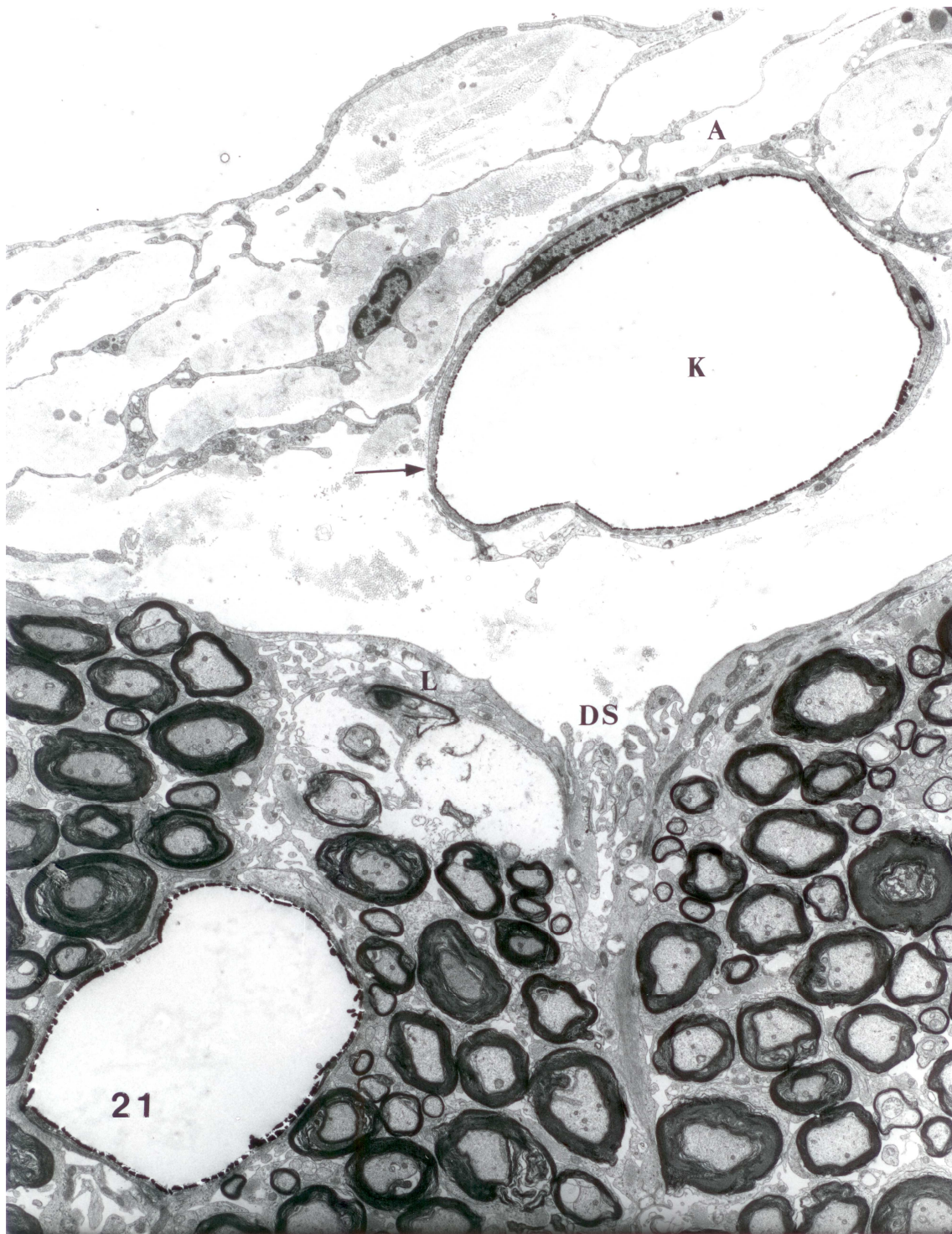


Abb. 21: Kontrolltier, "sham"-OP: dorsomediales Septum (DS) des Rückenmarks, vereinzelt Pinozytosevesikel (Pfeile), Kapillare (K) der Arachnoidea (A), Lanthan im Bereich der Pia mater (L), x4000.

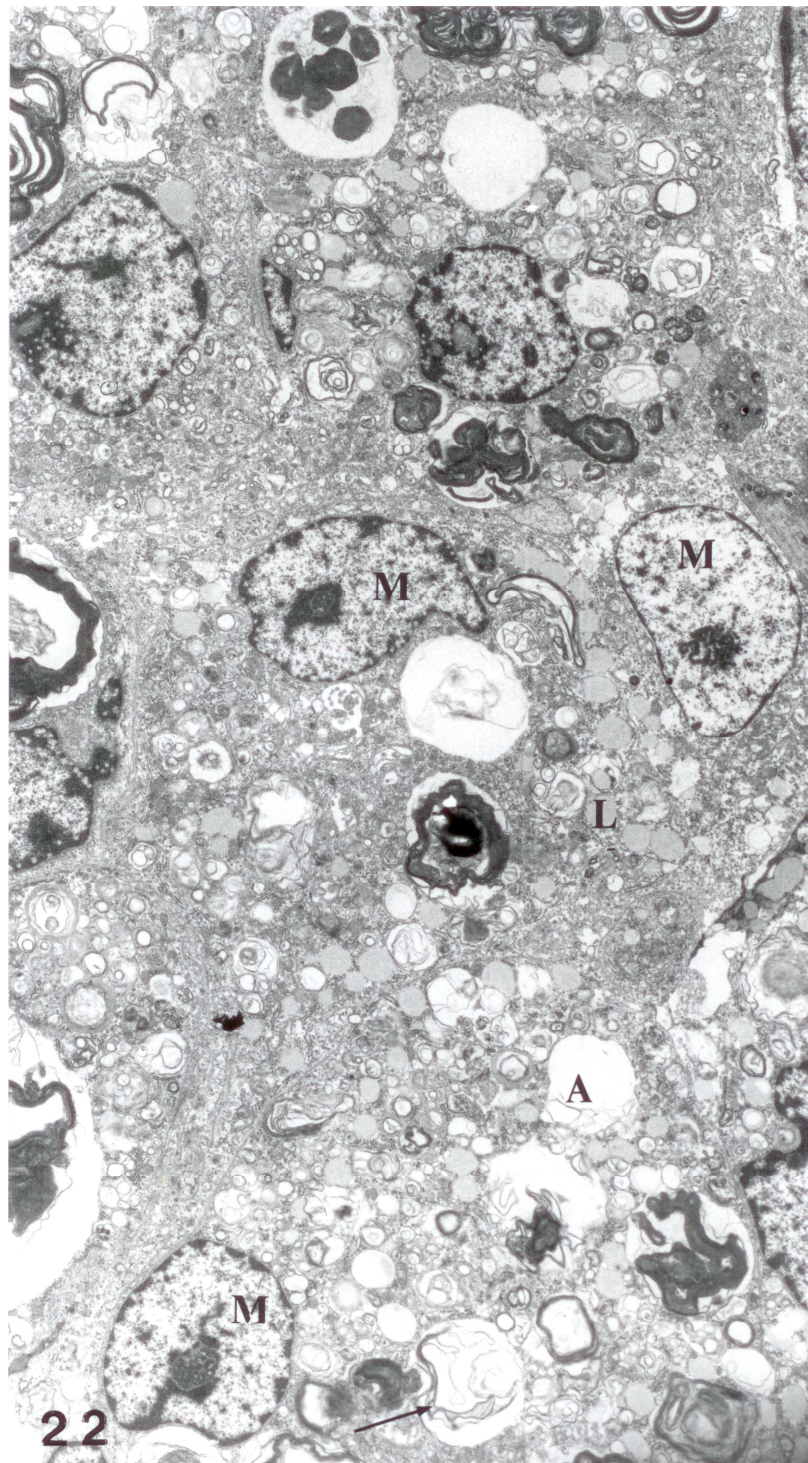


Abb. 22: 15 Tage nach Läsion: große Zahl von Makrophagen (M), Residuen von untergegangenen Axonen (A) und Myelinscheiden (Pfeil), Lipidanreicherungen im Neuropil (L), x4000.

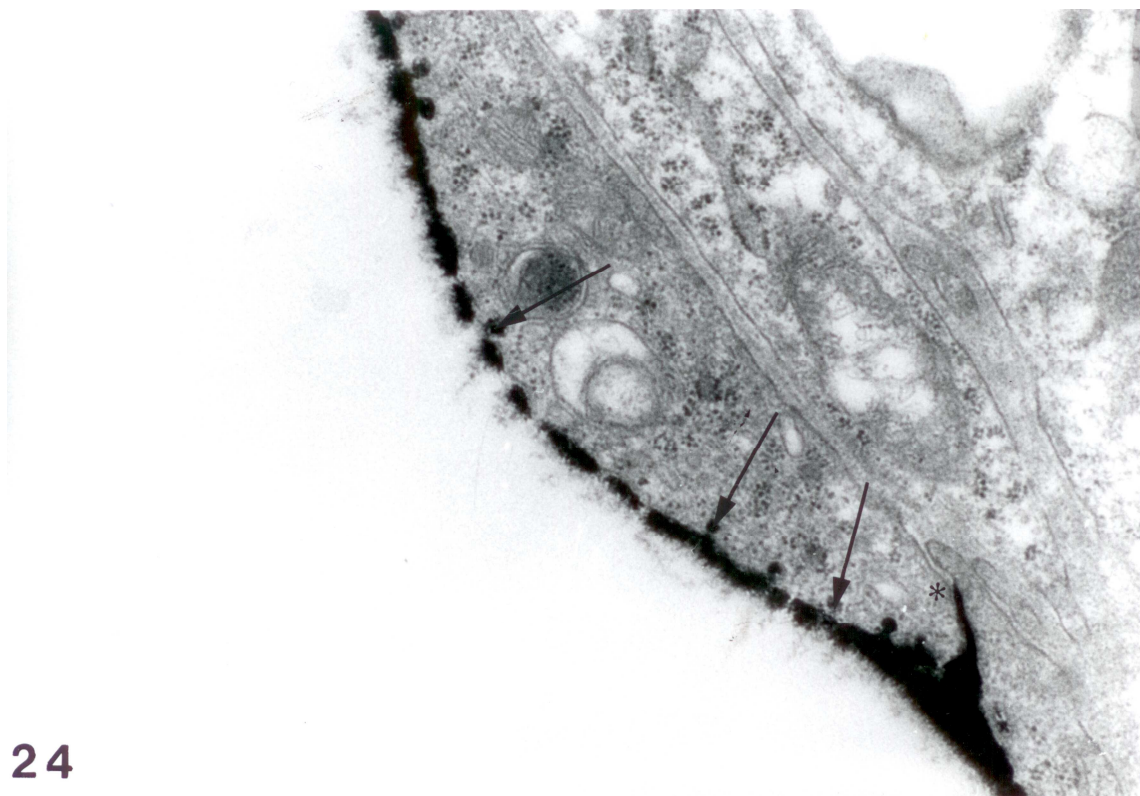
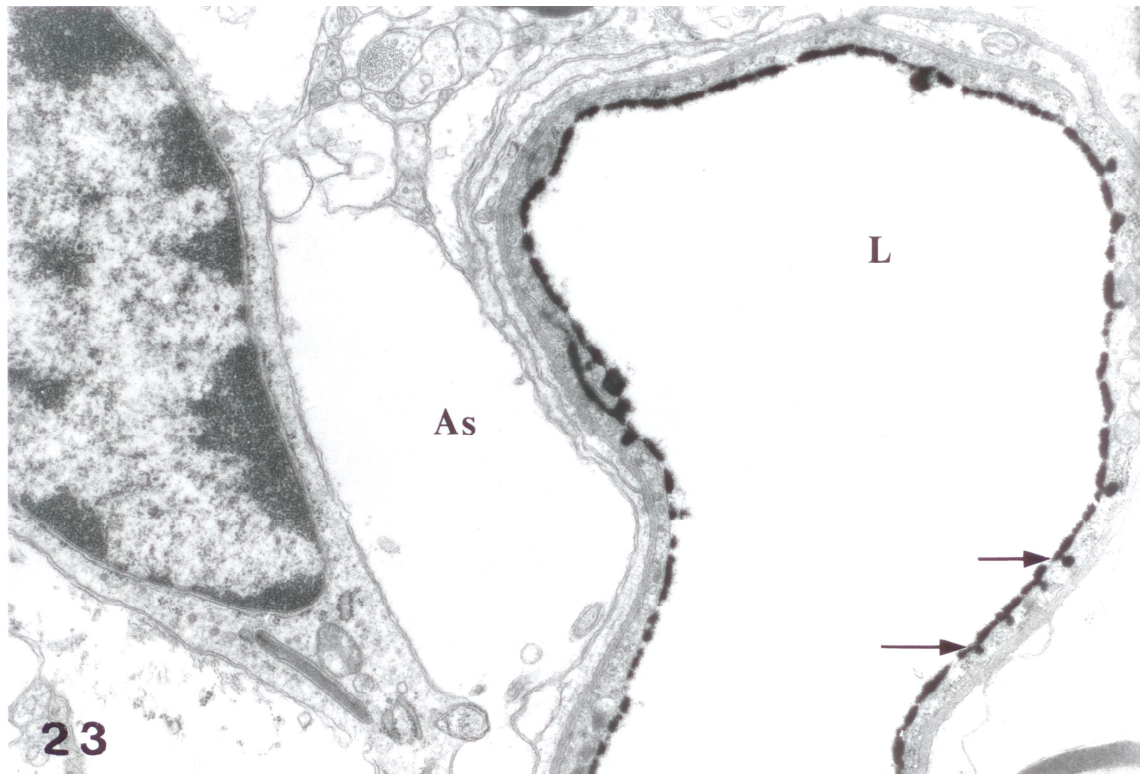


Abb. 23: Astrozytenschwellung (As) neben dem Kapillarlumen (L) 15 Tage nach Kryoläsion des Rückenmarks. Zahlreiche Pinozytosevesikel (Pfeile), x1800.

Abb. 24: Pinozytosevesikel (Pfeile) fünfzehn Tage nach Kryoläsion. Lanthan ist tief im Interzellular-Spalt (Stern), x36000.

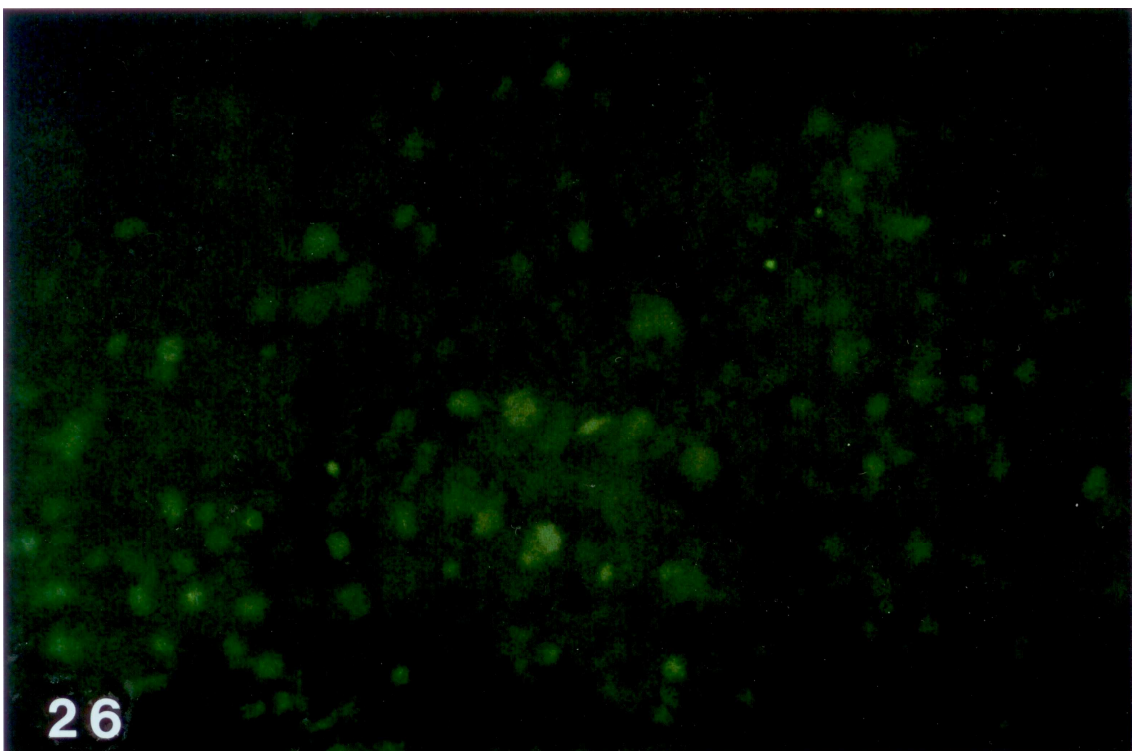
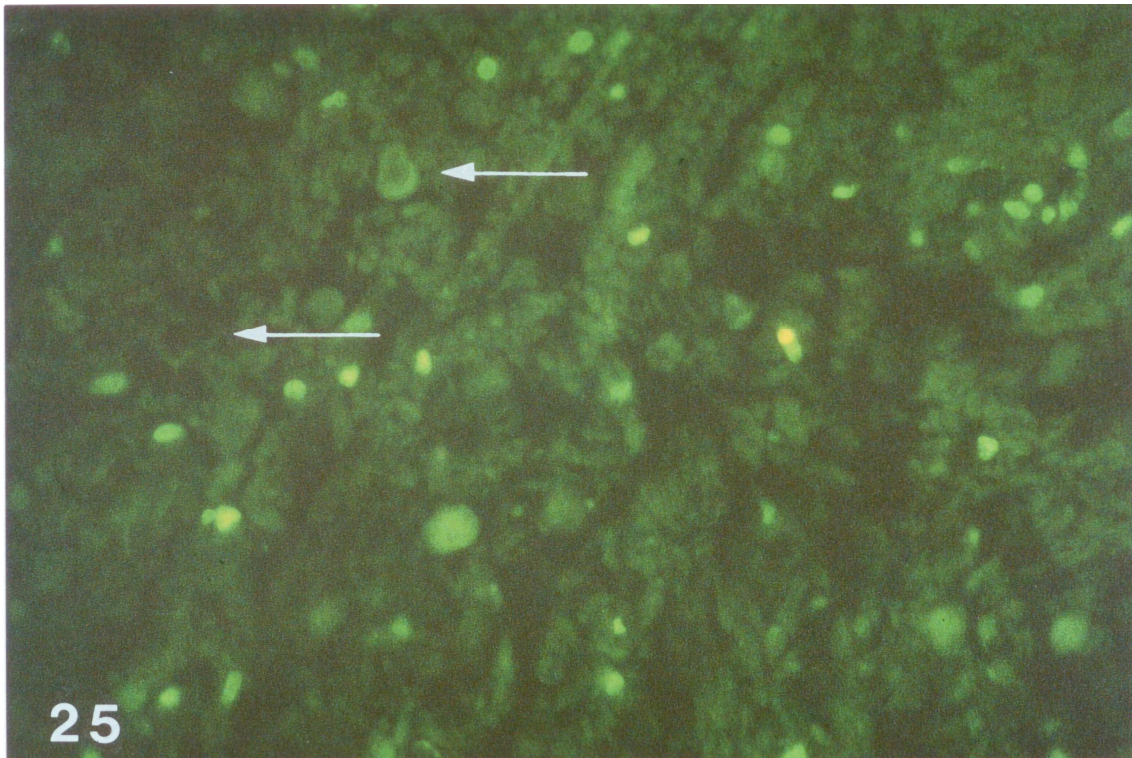


Abb. 25: Einen Tag nach Läsion ist der Glucose-Transporter GLUT-1 im Kapillar-Endothel des Läsionsbereichs noch schwach nachweisbar (Pfeile). Immunfluoreszenznachweis, x264.

Abb.26: Drei Tage nach Läsion ist GLUT-1 im Kapillar-Endothel völlig verschwunden. Immunfluoreszenznachweis, x264.

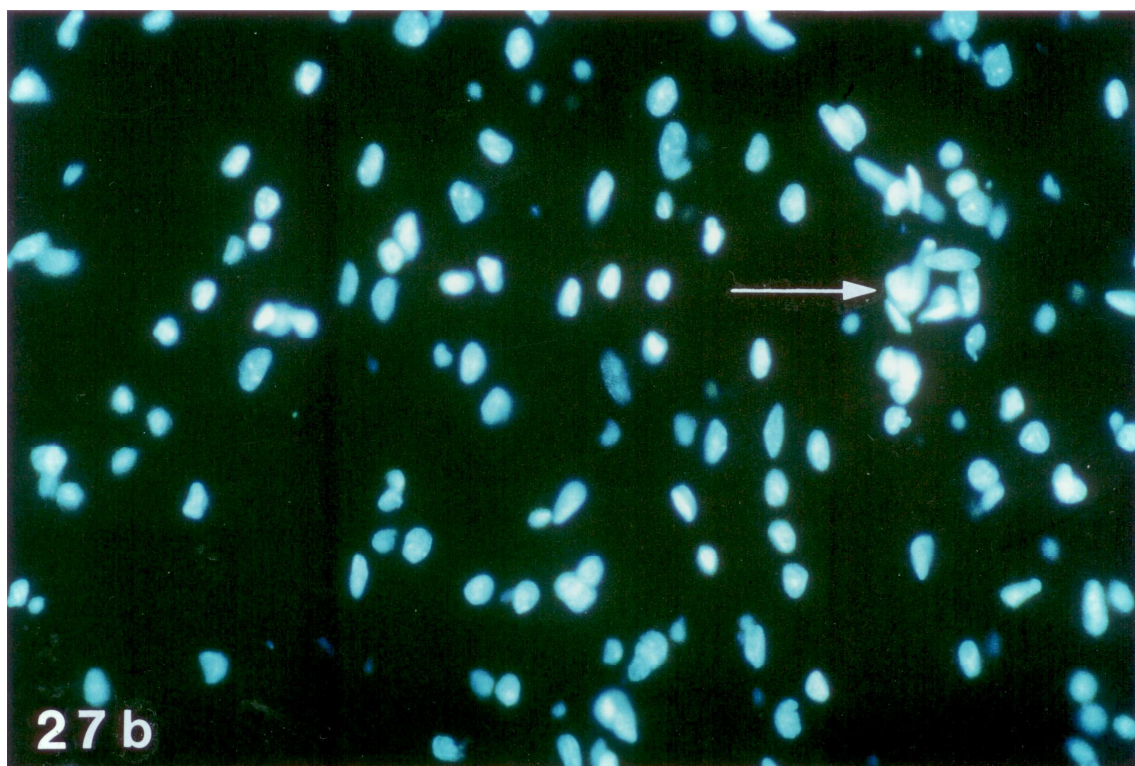
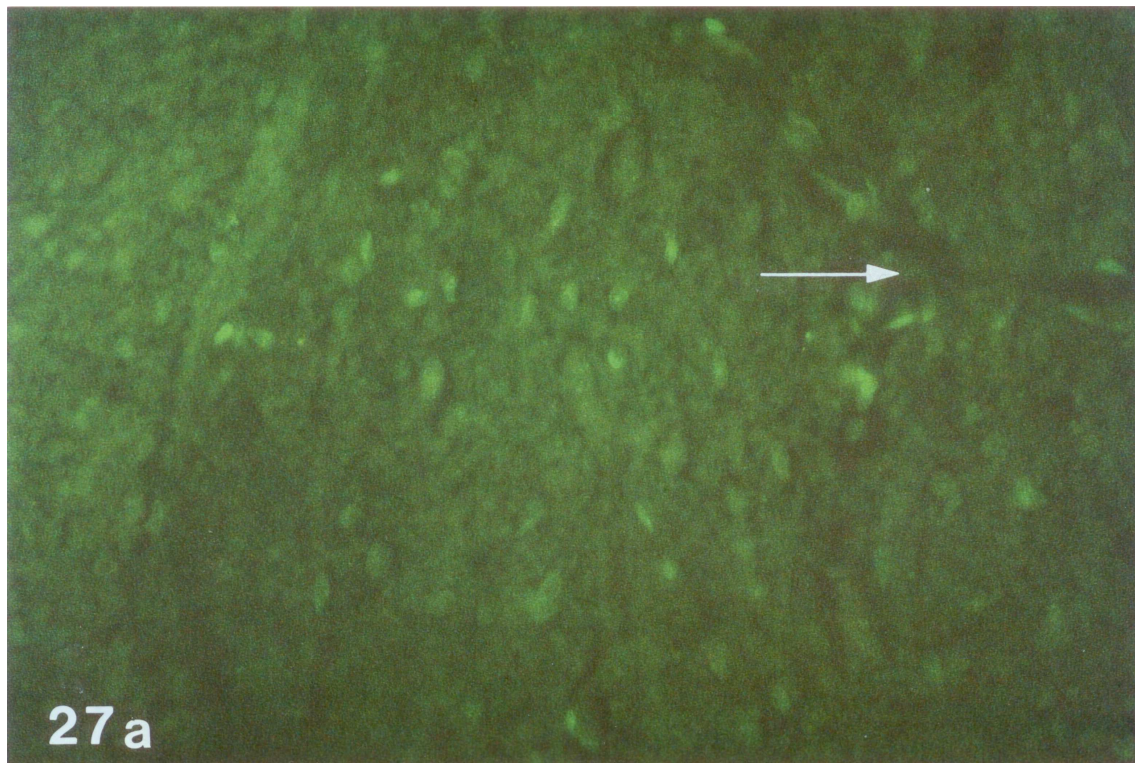


Abb. 27a: Sechs Tage nach Kryoläsion ist die mit Pfeil bezeichnete Kapillare GLUT-1 negativ, Immunfluoreszenz, x264

Abb. 27b: Das gleiche Gewebe-Präparat, die Endothelien der Kapillaren von Abb.27a, sind jetzt mit Kernfärbung (Höchst) dargestellt (Pfeil), x264.

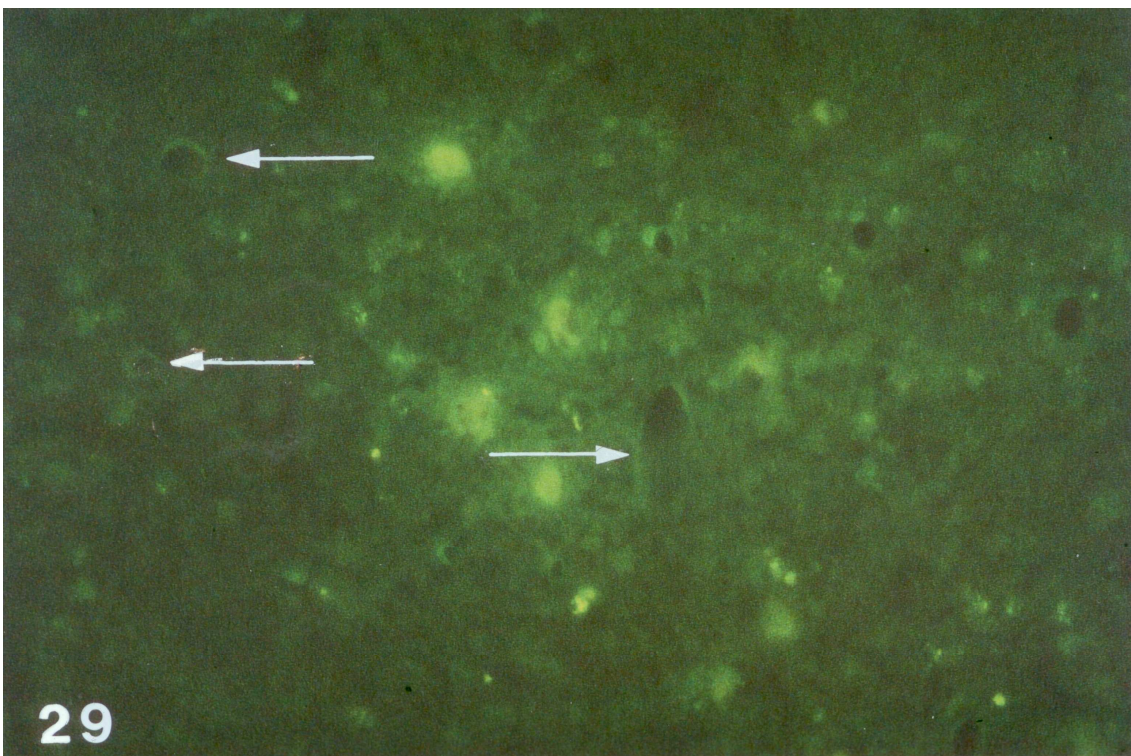
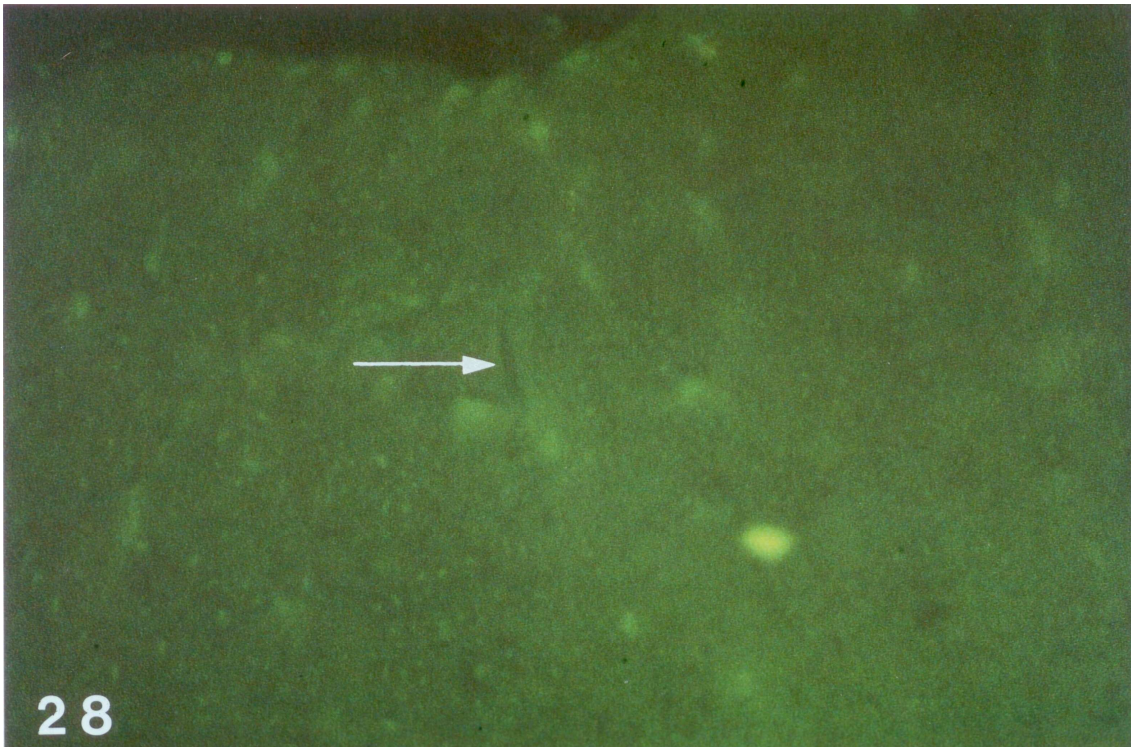


Abb. 28: 15 Tage nach Läsion wird GLUT-1 von distal der Läsion (Segment Th 10) wieder exprimiert (Pfeil). Immunfluoreszenz-Nachweis, x 264.

Abb. 29: 15 Tage nach Läsion wird GLUT-1 auch in der Läsions-Region (Th 8) wieder schwach exprimiert (Pfeile) Immunfluoreszenz-Nachweis, x264

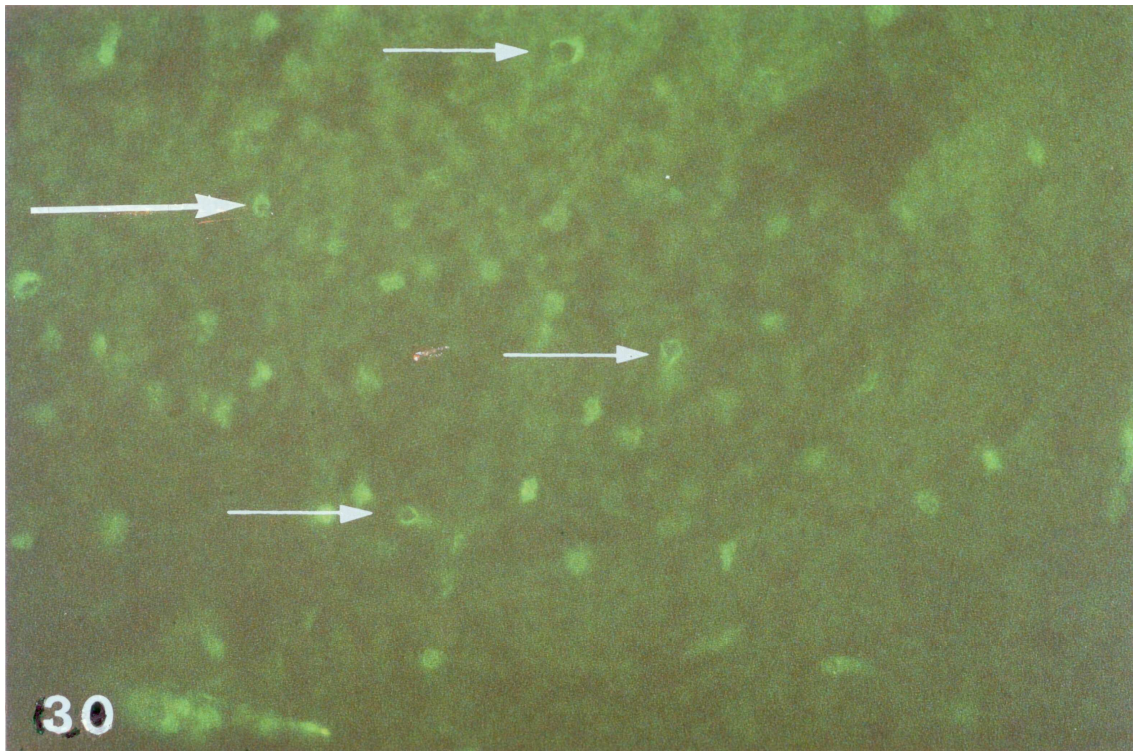


Abb. 30: Kontrolltier: Deutliche Expression des Glucose-Transporters GLUT-1 im Rückenmark, Immunfluoreszenz-Nachweis, x264. Die Pfeile weisen auf Kapillarquerschnitte mit positiv reagierenden Endothelien hin.

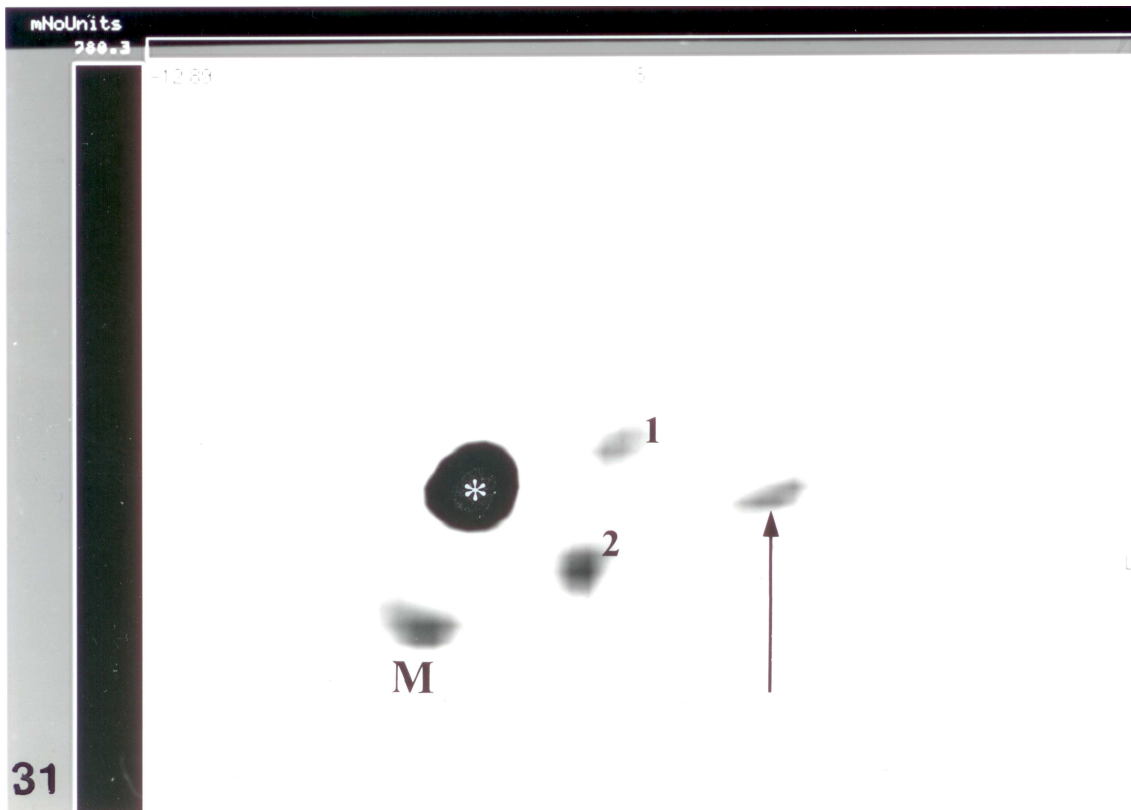


Abb. 31: Stoffwechselaktivität in der PET-Untersuchung einer Ratte (Kopf rechts) 24 h nach Kryoläsion des Rückenmarks. Das Signal (in der Positiv-Aufnahme geschwärzt) des Läsionsbereiches (Pfeil) ist gut zu erkennen. Als Nebenbefund ist eine Kontrastanreicherung der Blase (Stern) zu erkennen. Die Kontrastanreicherung im Bereich des Oberschenkels ist auf eine verstärkte Stoffwechselaktivität durch die in dieser Region erfolgte i. m. Injektion zurückzuführen. (1 und 2 zeigen die Nieren).

7 Literatur

- Allen, G.V., Cechetto, D.F. (1994) Serotonergic and Nonserotonergic Neurons in the Medullary Raphe System Have Axon Collateral Projections to Autonomic and Somatic Cell Groups in the Medulla and Spinal Cord. *J. Comp. Neurology.* 350, 357-366
- Anderson, D., Means, E. (1983) Free Radical-Induced Lipid Peroxidation in Spinal Cord: FeC12 Induction and Protection with Antioxidans. *Neurochem. Pathol.* 1, 249-264
- Arthur, F.E., Shivers, R.R., Bowman, P.D. (1987) Astrocyte-mediated Induction of Tight Junctions in Brain Capillary Endothelium: an Efficient *in vitro* Model. *Dev. Brain Res.* 36, 155-159
- Balentine, D. (1988) Impact Injuries of the Spine and Spinal Cord, 254 - 275 in: Leestma, J.E., Kirkpatrick, J.B. (Hrsg.): *Forensic Neuropathology.* Raven Press, New York
- Bandtlow, C.E., Schmidt, M.F., Hassinger, T.D., Schwab, M.E., Kater, S.B. (1993) Role of Intracellular Calcium in NI-35-Evoked Collapse of Neuronal Growth Cones. *Science* 259, 80-83
- Barbeau, H., Julien, C., Rossignol, S. (1987) The Effects of Clonidine and Yohimbine on Locomotion and Cutaneous Reflexes in the Adult Chronic Spinal Cat. *Brain Research* 437, 83-96
- Barbeau, H., Rossignol, S. (1987) Recovery of Locomotion After Chronic Spinalization in the Adult Cat. *Brain Research* 412, 84-95
- Barbeau, H., Rossignol, S. (1990) The Effects of Serotonergic Drugs on the Locomotor Pattern and on Cutaneous Reflexes of the Adult Chronic Spinal Cat. *Brain Research* 514, 55-67
- Barbeau, H., Rossignol, S. (1991) Initiation and Modulation of the Locomotor Pattern in the Adult Chronic Spinal Cat by Noradrenergic, Serotonergic and Dopaminergic Drugs. *Brain Research* 546, 250-260.
- Barbeau, H., Chau, C., Rossignol, S. (1993) Noradrenergic Agonists and Locomotor Training Affect Locomotor Recovery After Cord Transection in Adult Cats. *Brain Res. Bulletin* 30, 387-393
- Becker, N.H., Hirano, A., Zimmermann, H.M. (1968) Observations of the Distribution of Exogenous Peroxidase in the Cat Cerebrum. *J. Neuro-path. Exp. Neurol.* 27, 439-452
- Beggs, J.L., Waggener, J.D. (1976) Transendothelial Vesicular Transport of Protein following Compression Injury to the Spinal Cord. *Lab. Invest.* 34, (4) 428-439
- Bernstein, J.J., Getz, R., Jefferson, M., Kelemen, M. (1985) Astrocytes Secrete Basal Lamina after Hemisection of Rat Spinal Cord. *Brain Res.* 327, 135-141

- Bernstein, J.J., Goldberg, W.J. (1989) Rapid Migration of Grafted Cortical Astrocytes from Suspension Grafts Placed in Host Thoracic Spinal Cord. *Brain Res.* 491, 205-211
- Blight, A. (1983) Cellular Morphology of Chronic Spinal Cord Injury in the Cat: Analysis of Myelinated Axons by Line-sampling. *Neuroscience* 10, 521-543
- Bouchaud, C., Bosler, O. (1986) The Circumventricular Organs of the Mammalian Brain with Special Reference to Monoaminergic Innervation. *Int. Rev. Cytol.* 105, 283-327
- Bresnahan, J.C., Beattie, M.S., Todd III, F.D., Noyes, D.H. (1987) A Behavioral and Anatomical Analysis of Spinal Cord Injury Produced by a Feedback-Controlled Impaction Device. *Experimental Neurology* 95, 548-570
- Broadwell, R.D. (1989) Transcytosis of Macromolecules through the Blood-Brain Barrier: A Cell Biological Perspective and Critical Appraisal. *Acta Neuropathol.* 79, 117-128
- Brown, Jr. L. (1971) Projections and Termination of the Corticospinal Tract in Rodents. *Exp. Brain Res.* 13, 432-450.
- Butt, A.M., Jones, H.C., Abbott, N.J. (1990) Electrical Resistance Across the Blood-Brain Barrier in Anaesthetized Rats: A Developmental Study. *J. Physiol.* 429, 47-62
- Caroni, P., Schwab, M.E. (1988a) Antibody against Myelin-Associated Inhibitor of Neurite Growth Neutralizes Nonpermissive Substrate Properties of CNS White Matter. *Neuron* 1, 85-96
- Caroni, P., Schwab, M.E. (1988b) Two Membrane Protein Fractions from Rat Central Myelin with Inhibitory Properties for Neurite Growth and Fibroblast Spreading. *J. Cell Biology* 106, 1281-1288
- Caroni, P., Schwab, M.E. (1989) Codistribution of Neurite Growth Inhibitors and Oligodendrocytes in Rat CNS: Appearance Follows Nerve Fiber Growth and Precedes Myelination. *Dev. Biology* 136, 287-295
- Crone, C. (1965) Facilitated Transfer of Glucose from Blood into Brain Tissue. *J. Physiol.* 181, 103-113
- Cutler, R.W.P., Deuel, R.K., Barlow, C.F. (1967) Albumin Exchange between Plasma and Cerebrospinal Fluid. *Arch. Neurol.* 17, 261-270
- Dahl, D., Bignami, A. (1985) Intermediate Filaments in Nervous Tissue, 75-79 in: J.W. Shay (Ed.) 6: Cell and Muscle Motility; Plenum Press, New York
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1994) *Molekulare Zellbiologie*. Walter de Gruyter, Berlin
- DeKosky, S.T., Goss, J.R., Miller, P.D., Styren, S.D., Kochanek, P.M., Marion, D. (1994) Upregulation of Nerve Growth Factor. *Experimental Neurology* 130, 173-177

- Dermietzel, R., Krause, D. (1991) Molecular Anatomy of the Blood-Brain Barrier as defined by Immunocytochemistry. *Internat. Rev. Cytol.* 127, 57-109
- Dietrich, W.D., Watson, B.D., Busto, R., Ginsberg, M.D., Bethea, J.R. (1987) Photochemically Induced Cerebral Infarction. I. Early Microvascular Alterations. *Acta Neuropathol.* 72, 315-325
- Dusart, I., Schwab, M.E. (1993) Secondary Cell Death and the Inflammatory Reaction After Dorsal Hemisection of the Rat Spinal Cord. *Europ. J. Neurosci.* 6, 712-724
- Dux, E., Joó, F. (1982) Effects of Histamine on Brain Capillaries: Fine Structural and Immunohistochemical Studies After Intracarotid Infusion. *Exp. Brain Res.* 47, 252-258
- Ehrlich, P. (1885) *Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus, eine farbenanalytische Studie (Habilitationsschrift)*. Hirschwald, Berlin
- Eitan, S., Solomon, A., Lavie, V., Yoles, E., Hirschberg, D.L., Belkin, M. (1994) Recovery of Visual Response of Injured Adult Rat Optic Nerves Treated with Transglutaminase. *Science* 264, 1764-1768
- Engelhardt, B., Conley, F.K., Butcher, E.C. (1994) Cell Adhesion Molecules on Vessels During Inflammation in the Mouse Central Nervous System. *J. Neuroimmunol.* 51, 199-208
- Fawcett, J.W., Housden, E. (1990) The Effects of Protease Inhibitors on Axon Growth Through Astrocytes. *Development* 109, 59-66
- Fawcett, J.W., Housden, E., Smith-Thomas, L., Meyer, R.L. (1989) The Growth of Axons in Three-Dimensional Astrocyte Cultures. *Dev. Biol.* 135, 449-458
- Ffrench-Constant, C., Raff, M.C. (1986) The Oligodendrocyte-Type-2 Astrocyte Cell Lineage is Specialized for Myelination. *Nature* 323, 335-338
- Forssberg, H., Grillner, S. (1972) The Locomotion of the Acute Spinal Cat Injected with Clonidine i.v. *Brain Research* 50, 184-186
- Franklin, R.J.M., Blakemore, W.F. (1995) Glial-cell Transplantation and Plasticity in the O-2A Lineage-Implications for CNS Repair. *TINS* 18, 151-156
- Garcia-Valenzuela, E., Gorczyca, W., Darzynkiewicz, Z., Sharma, S.C. (1993) Apoptosis in Adult Retinal Ganglion Cells after Axotomy. *J. Neurobiology* 25, (4) 431-438
- Gee, S.H., Blacher, R.W., Douville, P.J., Provost, P.R., Yurchenco, P.D., Carbonetto, S. (1993) Laminin-binding Protein 120 from Brain Is Closely Related to the Dystrophin-associated Glycoprotein, Dystroglycan, and Binds with High Affinity to the Major Heparin Binding Domain of Laminin. *J. Biol. Chem.* 268, (20), 14972-14980
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W. (1995) Microglia: Intrinsic Immune Effector Cell of the Brain. *Brain Res. Rev.* 20, 269-287

- Gerner, H.J. (1992) Die Querschnittlähmung: Erstversorgung, Behandlungsstrategie, Rehabilitation. Blackwell Wiss., Berlin
- Goldstein, G.W., Betz, A.L. (1986) The Blood-Brain Barrier. *Sci. Am.* 255, 70-79
- Gould, G.W., Bell, G.I. (1990) Facilitative Glucose Transporters: An Expanding Family. *TIBS*, 15, 18-23
- Greenwood, J. (1991) Mechanisms of Blood-Brain Barrier Breakdown. *Neuroradiology* 33, 95-100
- Harik, S.I., Kalaria, R.N., Whitney, P.M., Andersson, L., Lundahl, P., Ledbetter, S.R., Perry, G. (1990) Glucose Transporters Are Abundant in Cells with "Occluding" Junctions at the Blood-Eye Barriers. *Cell Biology* 88, 4261-4264
- Hawkins, C.P., Munro, P.M.G., Landon, D.N., McDonald, W.I. (1992) Metabolically Dependent Blood-Brain Barrier Breakdown in Chronic Relapsing Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 83, 630-635
- Herholz, K., Wienhard, K., Heiss, W.D. (1990) Validity of PET Studies in Brain Tumors. *Cerebrovasc.-Brain-Metab-Rev.* 2, (3) 240-265
- Hsu, C., Hogan, E., Gadsden, R., Spicer, K., Shi, M., Cox, R. (1985) Vascular Permeability in Experimental Spinal Cord Injury. *J. Neurol. Sci.* 70, 275-282
- Hurwitz, A.A., Berman, J.W., Rashbaum, W.K., Lyman, W.D. (1993) Human Fetal Astrocytes Induce the Expression of Blood-Brain Barrier Specific Proteins by Autologous Endothelial Cells. *Brain Res.* 625, 238-243
- Iizuka, H., Yamamoto, T., Iwasaki, Y., Konno, H., Kadoya, S. (1986) Experimental Spinal Cord Injury: Quantitation of Axonal Damage by Automated Image Analysis. *J. Neurosurg.* 64, 304-308
- Iizuka, H., Yamamoto, H., Iwasaki, Y., Yamamoto, T., Konno, H. (1987) Evolution of Tissue Damage in Compressive Spinal Cord Injury in Rats. *J. Neurosurg.* 66, 595-603
- Jankowska, E., Maxwell, D.J., Dolk, S., Krutki, P., Belichenko, P.V., Dahlström, A. (1995a) Contacts Between Serotonergic Fibres and Dorsal Horn Spinocerebellar Tract Neurons in the Cat and Rat: A Confocal Microscopic Study. *Neuroscience* 67, (2) 477-487
- Jankowska, E., Krutki, P., Läckberg, S., Hammar, I. (1995b) Effects of Serotonin on Dorsal Horn Dorsal Spinocerebellar Tract Neurons. *Neuroscience* 67, (2) 489-495
- Janzer, R.C., Raff, M.C. (1987) Astrocytes Induce Blood-Brain Barrier Properties in Endothelial Cells. *Nature* 325, 253-257
- Joó, F. (1994) Insight Into the Regulation by Second Messenger Molecules of the Permeability of the Blood-Brain Barrier. *Microscopy Res. and Tech.* 27, 507-515

- Kalaria, R.N., Gravina, S.A., Schmidley, J.W., Perry, G., Harik, S.I. (1988) The Glucose Transporter of the Human Brain and Blood-Brain Barrier. *Ann. Neurol.* 24, 757-764
- Koenig, H., Goldstone, A.D., Chung, Y.L. (1989a) Blood-Brain Barrier Breakdown in Cold-Injured Brain Is Linked to a Biphasic Stimulation of Ornithine Decarboxylase Activity and Polyamine Synthesis: Both Are Coordinately Inhibited by Verapamil, Dexamethasone, and Aspirin. *J. Neurochem.* 52, (1) 101-109
- Koenig, H., Goldstone, A.D., Lu, C.Y. (1989b) Polyamines Mediate the Reversible Opening of the Blood-Brain Barrier by the Intracarotid Infusion of Hyperosmolar Mannitol. *Brain Res.* 483, 110-116
- Koenig, H., Trout, J.J., Goldstone, A.D., Lu, C.Y. (1992) Capillary NMDA Receptors Regulate Blood-Brain Barrier Function and Breakdown. *Brain Res.* 588, 297-303
- Krum, J.M. (1994) Experimental Gliopathy in the Adult Rat CNS: Effect on the Blood-Spinal Cord Barrier. *Glia* 11, 354-366
- Løberg, E.M., Torvik, A. (1991) Uptake of Plasma Proteins Into Damaged Neurons. *Acta Neuropath.* 81, 479-485
- Løberg, E.M., Torvik, A. (1992) Neuronal Uptake of Plasma Proteins in Brain Contusions. An Immunohistochemical Study. *Acta Neuropath.* 84, 234-237
- Larsen, R. (1987) *Anästhesie*, 2. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore
- Lewandowsky, M. (1900) Zur Lehre der Cerebrospinalflüssigkeit. *Z. klin. Med.* 40, 480-494
- Liu, D., Thangnipon, W., McAdoo, D.J. (1991) Excitatory Amino Acids Rise to Toxic Levels Upon Impact Injury to the Rat Spinal Cord. *Brain Res.* 547, 344-348
- Logan, A., Berry, M., Gonzalez, A.M., Frautschy, S.A., Sporn, M.B., Baird, A. (1994) Effects of Transforming Growth Factor β 1 on Scar Production in the Injured Central Nervous System of the Rat. *European J. Neurosci.* 6, 355-363
- Loike, J.D., Cao, L., Brett, J., Ogawa, S., Silverstein, S.C., Stern, D. (1992) Hypoxia Induces Glucose Transporter Expression in Endothelial Cells. *Am. J. Physiol.* 263, C 326-C 333
- MacKenzie, M.L., Ghabriel, M.N., Allt, G. (1987) The Blood-Nerve Barrier: An *In Vitro* Lanthanum Tracer Study. *J. Anat.* 154, 27-37
- Maher, F., Vannucci, S.J., Simpson, I.A. (1994) Glucose Transporter Proteins in Brain. *FASEB J.* 8, 1003-1011
- Mandel, L.J., Bacallao, R., Zampighi, G. (1993) Uncoupling of the Molecular „Fence“ and Paracellular „Gate“ Functions in Epithelial Tight Junctions. *Nature* 361, 552-555

- McDonald, N.Q., Panayotatos, N., Hendrickson, W.A. (1995) Crystal Structure of Dimeric Human Ciliary Neurotrophic Factor Determined by MAD Phasing. *EMBO* 14, (12) 2689-2699
- Nag, B., Robertson, D.M., Dinsdale, H.B. (1979) Quantitative Estimate of Pinocytosis in Experimental Acute Hypertension. *Acta Neuropathol.* (Berlin) 46, 107-116
- Nag, S. (1991) Effect of Atrial Natriuretic Factor on Permeability of the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *Acta Neuropathol.* 82, 274-279
- Nag, S., Pang, S.C. (1989) Effect of Atrial Natriuretic Factor on Blood-Brain Barrier Permeability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 637-640
- Noble, L.J., Maxwell, D.S., (1983) Blood-Spinal Cord Barrier Response to Transection. *Experimental Neurology* 79, 188-199
- Noble, L.J., Wrathall, J.R., (1987) The Blood-Spinal Cord Barrier after Injury: Pattern of Vascular Events Proximal and Distal to a Transection in the Rat. *Brain Res.* 424, 177-188
- Noble, L.J., Wrathall, J.R. (1989) Distribution and Time Course of Protein Extravasation in the Rat Spinal Cord after Contusive Injury. *Brain Res.* 482, 57-66
- Olsson, Y., Sharma, H.S., Pettersson, C.A.V. (1990) Effects of p-Chlorophenylalanine on Microvascular Permeability Changes in Spinal Cord Trauma: An Experimental Study in the Rat Using ¹³¹I-Sodium and Lanthanum Tracers. *Acta Neuropathol.* 79, 595-603.
- Oppenheim, R.W., Prevet, D., Qin-Wei, Y., Collins, F., MacDonald, J. (1991) Control of Embryonic Motoneuron Survival in Vivo by Ciliary Neurotrophic Factor. *Science* 251, 1616-1681
- Pardridge, W.M., Boado, R.J., Farrell, C.R. (1990) Brain-type Glucose Transporter (GLUT-1) Is Selectively Localized to the Blood-Brain Barrier. *J. Biol. Chem.* 265, (29) 18035-18040
- Perry, V.H., Andersson, P.-B., Gordon, S. (1993) Macrophages and Inflammation in the Central Nervous System. *TINS* 16, 268-273
- Perry, V.H., Brown, M.C., Gordon, S. (1987) The Macrophage Response to Central and Peripheral Nerve Injury. *J. Exp. Med.* 165, 1218-1223
- Perry, V.H., Crocker, P.R., Gordon, S. (1992) The Blood-Brain Barrier Regulates the Expression of a Macrophage Sialic Acid-Binding Receptor on Microglia. *J. Cell Science* 101, 201-207
- Qin-Wei, Y., Johnson, J., Prevet, D., Oppenheim, R.W. (1994) Cell Death of Spinal Motorneurons in the Chick Embryo following Deafferentation: Rescue Effects of Tissue Extracts, Soluble Proteins, and Neurotrophic Agents. *J Neurosci.* 14, (12) 7629-7640
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., Jacobson, M.D. (1993) Programmed Cell Death and the Control of Cell Survival: Lessons from the Nervous System. *Science* 262, 695-700

- Ramón y Cajal, S. (1928) Degeneration and Regeneration of the Nervous System. Engl. Transl. and Reprint, Hafner, New York, 1959.
- Reese, T.S., Karnovsky, M.J. (1967) Fine Structural Localization of a Blood-Brain Barrier to Exogenous Peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207-217
- Reier, P.J., Stensaas, L.J., Guth, L. (1983) The Astroglial Scar As an Impediment to Regeneration in the Central Nervous System, 163-195 in: Kao, C.C., Bunge, R.P., and Reier, P.J. (Hrsg.): *Spinal Cord Reconstruction*; Raven Press, New York
- Reifferscheid, M., Weller, S. (1989) Chirurgie. Thieme Verlag, Stuttgart
- Risau, W., Wolburg, H. (1990) Development of the Blood-Brain Barrier. *TINS* 13, (5) 174-178
- Roof, R.L., Duvdevani, R., Braswell, L., Stein, D.G. (1994) Progesterone Facilitates Cognitive Recovery and Reduces Secondary Neuronal Loss Caused by Cortical Contusion Injury in Male Rats. *Experimental Neurology* 129, 64-69
- Rosenstein, J.M., More, N.S. (1994) Immunocytochemical Expression of the Blood-Brain Barrier Glucose Transporter (Glut-1) in Neural Transplants and Brain Wounds. *J. Comp. Neurology* 350, 229-240
- Rudge, J.S., Silver, J. (1990) Inhibition of Neurite Outgrowth on Astroglial Scars *in vitro*. *J. Neurosci.* 10, (11) 3594-3603
- Sampaolo, S., Nakagawa, Y., Iannotti, F., Cervos-Navarro, J., Bonavita, V. (1991) Blood-Brain Barrier Permeability to Micromolecules and Edema Formation in the Early Phase of Incomplete Continuous Ischemia. *Acta Neuropathol.* 82, 107-111
- Schmalenbach, C., Müller, H.W. (1993) Astroglia-Neuron Interactions that Promote Long-term Neuronal Survival. *J. Chem. Neuroanat.* 6, 229-237
- Schulze, C., Firth, J.A. (1992) Interendothelial Junctions During Blood-Brain Barrier Development in the Rat: Morphological Changes at the Level of Individual Tight Junctional Contacts. *Dev. Brain Res.* 69, 85-95
- Schwab, M.E. (1990) Myelin-Associated Inhibitors of Neurite Growth. (Review) *Experimental Neurology* 109, 2-5
- Schwab, M.E. (1991) Regeneration of Lesioned CNS Axons by Neutralisation of Neurite Growth Inhibitors: A Short Review. *Paraplegia* 29, 294-298
- Schwab, M.E., Caroni, P. (1988) Oligodendrocytes and CNS Myelin Are Nonpermissive Substrates for Neurite Growth and Fibroblast Spreading *in vitro*. *J. Neurosci.* 8, 2381-2393
- Schwab, M.E., Kapfhammer, J.P., Bandtlow, C.E. (1993) Inhibitors of Neurite Growth. *Ann. Rev. Neurosci.* 16, 565-595
- Sendtner, M., Carroll, P., Holtmann, B., Hughes, R.A., Thoenen, H. (1994) Ciliary Neurotrophic Factor. *J. Neurobiology* 25, (11) 1436-1453
- Sendtner, M., Kreutzberg, G.W., Thoenen, H. (1990) Ciliary Neurotrophic Factor Prevents the Degeneration of Motor Neurons After Axotomy. *Nature* 345, 440-441

- Sharma, H.S., Olsson, Y. (1990) Edema Formation and Cellular Alterations Following Spinal Cord Injury in the Rat and Their Modification with p-Chlorophenylalanine. *Acta Neuropathol.* 79, 604-610
- Sivron, T., Schwab, M.E., Schwartz, M. (1994) Presence of Growth Inhibitors in Fish Optic Nerve Myelin: Postinjury Changes. *J. Comp. Neurology* 343, 237-246
- Sivron, T., Schwartz, M. (1994) The Enigma of Myelin-associated Growth Inhibitors in Spontaneously Regenerating Nervous System. *TINS* 17, (7) 277-281
- Slot, J.W., Geuze, H.J., Gigengack, S., Lienhard, G.E., James, D.E. (1991) Immuno-localization of the Insulin Regulatable Glucose Transporter in Brown Adipose Tissue of the Rat. *J. Cell Biol.* 113, (1) 123-135
- Tao-Cheng, J.-H., Nagy, Z., Brightman, M.W. (1987) Tight Junctions of Brain Endothelium *in vitro* Are Enhanced by Astroglia. *J. Neuroscience* 7, (10) 3293-3299
- Thoenen, H., Hughes, R.A., Sendtner, M. (1993) Trophic Support of Motoneurons: Physiological, Pathophysiological, and Therapeutic Implications. *Experimental Neurology* 124, 47-55
- Trout, J.J., Koenig, H., Goldstone, A.D., Lu, C.Y. (1986) Blood-Brain Barrier Breakdown by Cold Injury. *Lab. Invest.* 55, (6) 622-630
- Trout, J.J., Lu, C.Y., Goldstone, A.D., Sahgal, S. (1995) Polyamines and NMDA Receptors Modulate Pericapillary Astrocyte Swelling Following Cerebral Cryo-Injury in the Rat. *J. Neurocytology* 24, 341-346
- Vannucci, S.J. (1994) Developmental Expression of GLUT1 and GLUT3 Glucose Transporters in Rat Brain. *J. Neurochem.* 62, (1) 240-246
- Westergaard, E. (1975) Enhanced Vesicular Transport of Exogenous Peroxidase Across Cerebral Vessels Induced by Serotonin. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 32, 27-42
- Westergaard, E., Brightman, M.W. (1973) Transport of Proteins across Normal Cerebral Arterioles. *J. Comp. Neurol.* 152, 17-44
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauß, B., Schmid, E.-M., Öcalan, M., Farrell, C.L., Risau, W. (1994) Modulation of Tight Junction Structure in Blood-Brain-Barrier Endothelial Cells: Effects of Tissue Culture, Second Messengers and Cocultured Astrocytes. *J. Cell Sci.* 107, 1347-1357
- Wolburg, H. (1995) Glia-Neuronal and Glia-Vascular Interrelations in Blood-Brain-Barrier Formation and Axon Regeneration in Vertebrates, 479-510 in: Vernadakis, A and Roots, B. (eds.) *Neuron-Glia Interrelations during Phylogeny: II. Plasticity and Regeneration*; Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Wunderlich, G., Stichel, C.C., Schroeder, W.O., Müller, H.W. (1994) Transplants of Immature Astrocytes Promote Axonal Regeneration in the Adult Rat Brain. *Glia* 10, 49-58

- Xu, J., Ling, E-A. (1994) Studies of the Ultrastructure and Permeability of the Blood-Brain Barrier in the Developing Corpus Callosum in Postnatal Rat Brain Using Electron Dense Tracers. *J. Anat.* 184, 227-237
- Yasuda, T., Grinspan, J., Stern, J., Franceschini, B., Bannerman, P., Pleasure, D. (1995) Apoptosis Occurs in the Oligodendroglial Lineage, and Is Prevented by Basic Fibroblast Growth Factor. *J. Neurosci. Res.* 40, 306-317
- Zubay, G (1993) *Biochemistry*, 3 rd. ed.; Wm. C. Bown, Dubuque, IA, USA

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Wolburg möchte ich mich ganz besonders herzlich für das große Engagement bedanken, mit dem er mir bei der Bearbeitung des Themas jederzeit hilfsbereit zur Seite stand, für die vielen engagierten Diskussionen, bei denen ich mir seines fachlich kompetenten Rates stets sicher sein konnte.

Herrn Dr. med. vet. Rau schulde ich großen Dank für seine freundliche und stete Hilfsbereitschaft, mit der er mir bei der Lösung so mancher Probleme während der tierexperimentellen Phase meiner Arbeit ein geduldiger und kompetenter Ansprechpartner war.

Frau Tilda Cseri und Frau Suse Renkhold möchte ich meinen allerherzlichsten Dank für ihre engagierte und freundliche Hilfsbereitschaft und so manchen guten fachlichen Rat abstaten, den sie mir zuteil werden ließen.

Herrn Prof. Dr. M. E. Schwab (Institut für Hirnforschung der Universität Zürich) danke ich für seine Bereitschaft, mir zu ermöglichen, in seinem Labor erste Einblicke in die experimentellen Grundlagen der Erforschung der Querschnittlähmung zu nehmen.

Herrn Prof. Dr. Kissling (Physiologisches Institut der Universität Tübingen) möchte ich meinen Dank für die Überlassung von Räumlichkeiten während der experimentellen Phase meiner Arbeit aussprechen.

Bei Herrn Elektromechaniker-Meister Karl Schöntag möchte ich mich für seine bereitwillige Unterstützung beim Bau der Kryode bestens bedanken.

Für seine freundliche und fachlich kompetente Hilfe bei der Durchführung der Immunfluoreszenz-Markierung des Glucose-Transporters danke ich Herrn Dipl. Biol. H. Gerhardt sehr herzlich.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Müller-Schauenburg (Nuklearmedizin) für die freundliche Anfertigung der PET-Aufnahmen bedanken.

Meinen herzlichen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Harzer (Institut für Hirnforschung, Sektion Neurochemie, der Universität Tübingen) für die Übernahme der Zweitberichterstattung meiner Arbeit aussprechen.

