

Aus der Klinik für Neurochirurgie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

**Die Auswirkung von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) auf
den Nervus cochlearis nach partieller Schädigung.
Eine experimentelle Studie an Ratten.**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016

vorgelegt von: Benjamin Schackmann
geb. am: 04.09.1990 in Völklingen

Für Juli

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	3
2. Einleitung	5
2.1 Nervus vestibulocochlearis und Hörbahn	5
2.2 Frühe akustisch evozierte Potentiale (FAEP) des Menschen	6
2.3 FAEP der Ratte	8
2.4 Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF)	10
2.5 Ziel der Studie	12
3. Material und Methoden	13
3.1 Tiere und Gruppeneinteilung	13
3.2 Wasserstrahldissektor	14
3.3 Messung der FAEP	14
3.4 Verabreichung von G-CSF und NaCl	16
3.5 Operation	16
3.5.1 Vorbereitung und Narkoseeinleitung	16
3.5.2 Zugang	17
3.5.3 Kraniektomie und Nervenläsion	18
3.5.4 Wundverschluss	20
3.6 Perfusion	21
3.7 Auswertung	22
3.7.1 Auswertung der FAEP	22
3.7.2 Auswertung der Histologie	22
3.7.3 Statistische Auswertung	25
4. Ergebnisse	26
4.1 Histologie	26

4.1.1	Einfluss von G-CSF auf die Anzahl der Nervenzellen	26
4.1.2	Einfluss von G-CSF auf die Größe des Kerngebiets	30
4.2	FAEP	33
4.2.1	Einfluss von G-CSF auf die Höhe der Amplituden	33
4.2.1.1	Amplitude II	33
4.2.1.2	Amplitude IV	38
4.2.2	Einfluss von G-CSF auf die Latenzen	42
5.	Diskussion	43
5.1	Diskussion der Methodik	44
5.1.1	G-CSF und Applikation der Lösungen	44
5.1.2	Kraniektomie und Nervenläsion	45
5.1.3	Messung und Auswertung der FAEP	46
5.1.4	Perfusion und histologische Auswertung	47
5.2	Diskussion der Ergebnisse	49
5.2.1	Wirkt sich G-CSF positiv auf die Anzahl der Nervenzellen innerhalb der Ncll. cochleares bei Ratten aus?	49
5.2.2	Wirkt sich G-CSF positiv auf den Erhalt der Kerngebietsfläche der Ncll. cochleares bei Ratten aus?	50
5.2.3	Wirkt sich G-CSF positiv auf die Höhe der Amplituden der FAEP bei Ratten aus?	50
5.2.4	Wirkt sich G-CSF positiv auf die Latenzen der FAEP bei Ratten aus?	51
5.3	Ausblick	52
6.	Literaturverzeichnis	53

Materialliste

Publikationen

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

ABR	auditory brainstem response
AEP	Akustisch evozierte Potentiale
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
BAEP	brainstem acoustic evoked potentials
Bad	Bcl-2-associated agonist of cell death
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BERA	brainstem evoked response audiometry
c-IAP-2	Cellular inhibitor of apoptosis protein-2
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FAEP	Frühe akustisch evozierte Potentiale
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
G-CSFR	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor Rezeptor
IFN- γ	Interferon-gamma
JAK	Januskinasen
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
M.	Morbus
MAEP	Mittlere akustisch evozierte Potentiale
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase
Mean	Mittelwert

N.	Nervus
Ncl.	Nucleus
Ncll.	Nuclei
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pim-1	Proto-oncogene-serine/threonine-protein kinase Pim-1
SAEP	Späte akustisch evozierte Potentiale
SAP	Summenaktionspotential
SD	Standardabweichung
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Titel:

Die Auswirkung von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) auf den Nervus cochlearis nach partieller Schädigung. Eine experimentelle Studie an Ratten.

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Studie wurde analysiert, inwiefern sich Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) auf die Regenerationsfähigkeit des zuvor geschädigten Nervus cochlearis bei Ratten auswirkt.

In verschiedenen Versuchsmodellen wurde gezeigt, dass G-CSF neuroprotektive Aktivität durch Inhibierung von Apoptose und Entzündung besitzt.

Nach lateraler suboccipitaler Kraniektomie und mikrochirurgischer Präparation wurde eine Läsion des rechten Nervus cochlearis von erwachsenen, männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Wasserstrahldissektor bei einem Wasserdruck von 8 bar durchgeführt.

Die Tiere wurden willkürlich drei verschiedenen Gruppen zugeteilt. Der Kontrollgruppe wurde an den Tagen 1, 3 und 5 nach der Operation NaCl appliziert. Der zweiten Gruppe (G-CSF post) wurde an den gleichen Tagen G-CSF verabreicht. Die letzte Gruppe (G-CSF pre & post) erhielt G-CSF zusätzlich zu den Tagen 1, 3 und 5 auch einen Tag vor der Operation.

Frühe akustisch evozierte Potentiale (FAEP) wurden unmittelbar postoperativ, sowie an den Tagen 1, 3 und 7 nach der Nervenläsion gemessen, um die Funktion des Nervus cochlearis zu erfassen.

Die Tiere wurden eine Woche nach der Operation perfundiert und das Hirngewebe mit Formalin fixiert. Danach wurde das Gehirn in Formalin eingelegt und eine Woche später in Paraffin eingebettet. Der Hirnstamm wurde im Bereich der Ncll. cochleares in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und in definiertem Abstand von jeweils 10 Schnitten mit der Nissl-Färbung (Kresylviolett) gefärbt.

Unter einem Lichtmikroskop wurden Fotos gemacht und diese mit Hilfe der Image J Software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) im Hinblick auf die Anzahl der Nervenzellen und die Größe des Kerngebiets ausgewertet.

Die Verabreichung von G-CSF liefert statistisch signifikante Ergebnisse, sowohl im Hinblick auf die Histologie, als auch im Hinblick auf die Elektrophysiologie. Es findet sich eine höhere Anzahl an Nervenzellen innerhalb der Ncll. cochleares bei den Gruppen, denen G-CSF verabreicht wurde ($p = 0,0086$). Darüber hinaus ist die durchschnittliche Fläche des Kerngebiets in den beiden G-CSF-Gruppen größer als die der Kontrollgruppe ($p = 0,0019$). In der Auswertung der elektrophysiologischen Ergebnisse zeigt sich eine geringere Depression der FAEP-Welle II nach G-CSF-Applikation ($p = 0,040$). Sowohl in Bezug auf die Histologie als auch auf die Elektrophysiologie ist keine Verbesserung der Werte durch eine zusätzliche präoperative Verabreichung von G-CSF gegenüber der reinen postoperativen Applikation zu erkennen.

Nach kontrollierter partieller Nervenschädigung verbessert die Verabreichung von G-CSF die Funktion des achten Hirnnerven und schützt Nervenzellen und Nervengewebe im Bereich der Ncll. cochleares vor dem Untergang.

Diese Beobachtung ist insbesondere im Hinblick auf Operationen von Kleinhirnbrückenwinkeltumoren interessant. Bei einigen Operationen am Kleinhirnbrückenwinkel besteht ein hohes Risiko für eine Schädigung des Hörnervs. Insbesondere bei Operationen von Akustikusneurinomen wird der achte Hirnnerv oft geschädigt. Deshalb ist die Bereitstellung und Weiterentwicklung wirksamer, neuroprotektiver Behandlungsmöglichkeiten von größter Wichtigkeit.

G-CSF könnte helfen, das postoperative Ergebnis von Patienten mit Läsionen im Bereich des Kleinhirnbrückenwinkels zu verbessern.

1.2 Abstract

Title:

The effect of Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) on the cochlear nerve after partial lesion. An experimental study on rats.

Abstract:

The purpose of the present study is to investigate the role of the neuroprotective effect of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) after cochlear nerve lesion in rats.

It has been shown that G-CSF has a neuroprotective activity by inhibition of apoptosis and inflammation in various experimental models.

After performing a lateral suboccipital craniectomy and microsurgical preparation, a lesion of the right cochlear nerve of adult male Sprague Dawley rats was conducted using a water-jet dissector with a pressure of 8 bar.

Animals were randomly assigned to three groups. Sodium chloride was applied on day 1, 3 and 5 after the operation to the control group. In a second group (G-CSF post) G-CSF was administrated on day 1, 3 and 5 after the operation. The last group (G-CSF pre & post) was treated with G-CSF on day 1, 3 and 5 and additionally one day before the operation.

Brainstem auditory evoked potentials (BAEP) were measured on day 1,3 and 7 after the lesion to evaluate the acoustic function of the cochlear nerve.

Animals were perfused one week after the operation, and brains were fixed with formalin. One week later the formalin fixed brains were embedded in paraffin. Histological sections of 5 μm of the cochlear nuclei were prepared and stained with Nissl (cresyl violet).

Pictures were made under light microscope and analyzed using an image-processing program (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). The number of neuronal cells and the size of the area of the cochlear nuclei were assessed.

The application of G-CSF leads to statistical significant histological and electrophysiological results. With regard to the histological evaluation the application of G-CSF leads to a preservation of neuronal cells in the nuclei cochleares ($p = 0,0086$). Moreover the average area of the nuclei in both G-CSF groups is bigger

than the area of the control group ($p = 0,0019$). By analyzing the electrophysiological results there was a significant lower depression of the BAEP wave II after G-CSF application ($p=0,040$). A benefit through an additional preoperative application of G-CSF compared to the application only after operation was histological as well as electrophysiological not identified.

The use of G-CSF improved the function of the eighth cranial nerve and protected nerve cells and nerve tissue of destruction on the cochlear nuclei after a controlled partial injury of the nerve.

These findings are relevant to the operation of cerebellopontine angle tumors. During some operations at the cerebellopontine angle there is a high risk of injury of the cochlear nerve. Especially during acoustic neuroma surgery the eighth cranial nerve often gets damaged. Therefore research of potential neuroprotective drugs is of great importance. The use of G-CSF in patients with lesions in the cerebellopontine angle could improve the postoperative outcome.

2. Einleitung

2.1 Nervus vestibulocochlearis und Hörbahn

Der Nervus vestibulocochlearis ist der achte Hirnnerv. Er setzt sich aus zwei Anteilen zusammen. Zum einen, aus dem für die Hörwahrnehmung zuständigen Nervus cochlearis und zum anderen aus dem für das Gleichgewichtsempfinden zuständigen Nervus vestibularis⁴⁵. Der N. vestibularis besteht wiederum aus einem oberen (Ramus superior) und einem unteren Anteil (Ramus inferior). Im oberen Anteil verlaufen die Fasern aus Utriculus und dem oberen und lateralen Bogengang. Der untere Anteil führt Fasern aus Sacculus und dem hinteren Bogengang. Der N. cochlearis wird aus der Vereinigung der zentralen Fortsätze der bipolaren Nervenzellen der Ganglia spiralia gebildet. Die peripheren Fortsätze der bipolaren Nervenzellen erhalten ihre Informationen von den inneren Haarzellen des Corti-Organ⁴⁵. Im inneren Gehörgang schließen sich N. vestibularis und N. cochlearis zusammen und bilden den N. vestibulocochlearis^{8,63}. Der Nerv mündet im sogenannten Kleinhirnbrückenwinkel in die dorsolaterale Medulla oblongata^{44,45}. Cochleäre und vestibuläre Fasern enden dort in ihren jeweiligen Kerngebieten. Das Kerngebiet des N. cochlearis setzt sich zusammen aus dem Nucleus cochlearis ventralis und dem Nucleus cochlearis dorsalis. Hier erfolgt die Umschaltung auf das zweite Neuron. Von hier aus ziehen manche Fasern direkt zum ipsilateralen Colliculus inferior, dem letzten infratentoriell gelegenen Bereich des Mittelhirns⁴⁴, andere Fasern kreuzen zur Gegenseite und ziehen (teilweise als Lemniscus lateralis) zum kontralateralen Colliculus inferior. Ein Teil dieser Fasern wird zuvor im Nucleus corporis trapezoidei und Nucleus olivaris superior umgeschaltet. Nach der Umschaltung in den Colliculi inferiores ziehen die Fasern zum Corpus geniculatum mediale des Thalamus. Hier erfolgt die letzte Umschaltung der Hörbahn und die afferenten Nervenfasern, zusammen als Radiatio acustica bezeichnet, enden im primär auditorischen Cortex im Temporallappen (Hechel'sche Querwindungen, Area 41 nach Brodmann)^{44,45}. Dem primär auditorischen Cortex sind sekundäre Rindenfelder im äußeren Gyrus temporalis superior nachgeschaltet⁴⁵. Um binaurales

Hören (Richtungshören) zu ermöglichen, kreuzen Fasern, ab Höhe des Nucleus olivaris superior, auf allen Ebenen der Hörbahn zur kontralateralen Seite^{44,63}.

2.2 Frühe akustisch evozierte Potentiale (FAEP) des Menschen

Die akustisch evozierten Potentiale (AEP) stellen die elektrische Antwort des Hörnervs und des ZNS auf eine Reizung der inneren Haarzellen dar. Unterschieden werden hier anhand ihres zeitlichen Auftretens sehr frühe (Elektrocochleographie), frühe (FAEP, 0-10 ms), mittlere (MAEP, 10-50 ms) und späte (SAEP, bis 1000 ms) akustisch evozierte Potentiale. Dabei stellen die FAEP, auch "brainstem acoustic evoked potentials" (BAEP), "brainstem evoked response audiometry" (BERA) oder "auditory brainstem response" (ABR) genannt, die für die klinische Diagnostik mit Abstand wichtigste Gruppe dar^{40,44,75}. Der folgende Text konzentriert sich auf die FAEP des Menschen. Die Unterschiede zu den FAEP der Ratte werden in 2.3 aufgezeigt.

Die FAEP umfassen das Summenaktionspotential des Hörnervs (erste Welle) sowie die sechs darauf folgenden Potentiale, die in den ersten 8-10 ms nach Reizbeginn auftreten^{15,45}. Die Potentialwellen werden entweder mit den römischen Buchstaben I-VII angegeben oder nach dem Erstbeschreiber Jewett (1970^{32,33}) mit J1-J7 bezeichnet^{34,45}. Über die genaue Herkunft der einzelnen Wellen findet sich in der Literatur keine absolute Übereinstimmung. Frühere Untersuchungen an Katzen schrieben jeder Welle eine bestimmte neuroanatomische Struktur zu. So stand Welle I über lange Zeit für den extrakraniell verlaufenden Teil des N. cochlearis und Welle II für den intrakraniell verlaufenden Teil des Hörnervs. Vereinfacht stand Welle III für die obere Olive, Welle IV für den Lemniscus lateralis, Welle V für den Colliculus inferior, Welle VI für das Corpus geniculatum mediale und Welle VII für die Radiatio acustica^{1,2,11}. Heute weiß man, dass die zentralen Wellen (III-VII) keinem alleinigen anatomischen Korrelat zugeordnet werden können, sondern vielmehr, insbesondere beim Menschen, durch komplexe Entstehungsmechanismen gebildet werden. Bei Darbietung eines Reizes werden gleich mehrere Strukturen und Kerngebiete sowohl auf der ipsilateralen als auch auf der kontralateralen Seite erregt, die eher diffuse

Bereiche im Hirnstamm repräsentieren^{40,44}. Eine ungefähre Zuordnung zu bestimmten Strukturen ist jedoch möglich. Einigkeit herrscht über die erste Welle, die das Summenaktionspotential des Nerven darstellt^{40,44,75}. Der heutzutage weitestgehend angenommene Entstehungsort der Wellen II und III ist der ipsilaterale Hörnerv beim Austritt aus dem Meatus acusticus internus bzw. der ipsilaterale ventrale Ncl. cochlearis. Die Wellen IV und V können nicht mehr eindeutig zugeordnet werden und entstehen durch Überlagerungen aus unterschiedlichen Neuronengruppen der ipsi- und kontralateralen Hörbahn im Hirnstamm. Die überwiegenden Anteile stammen wahrscheinlich aus der oberen Olive und dem ipsilateralen Lemniscus lateralis oder Colliculus inferior^{40,45}. Für die Wellen VI und VII findet sich bislang keine eindeutige neuroanatomische Struktur⁴⁴. Es wird vermutet, dass sie im Thalamus bzw. in der Radiatio acustica generiert werden⁷⁵. In der klinischen Diagnostik werden vorwiegend die Wellen I, III und V betrachtet, da die Wellen II, IV, VI und VII zu unsicher auftreten⁴⁰.

Das vollständige Wellenmuster der FAEP kann optimal mit Klickreizen erzeugt werden. Hierbei handelt es sich um akustische Reize mit breitem Frequenzspektrum. Durch Mittelwertbildung einer definierten Anzahl von Klickreizen erfolgt dann die charakteristische Darstellung der Wellen⁴⁰.

Die Ableitung erfolgt über Elektroden, die entweder auf die Haut aufgeklebt oder als Nadelelektroden im Subkutangewebe platziert werden. Der Vorteil der zweiten Methode liegt im geringeren Auftreten von Artefakten⁷⁵. Die positive Elektrode wird über dem Vertex angebracht, die negative Elektrode kann hinter dem Mastoid oder am Ohrläppchen positioniert werden. Mit der Vertexelektrode werden die Wellen III und V abgeleitet, am ipsilateralen Mastoid die Welle I (SAP). Diese Art der Ableitung wird als Fernfeldtechnik bezeichnet, da die Potentiale nicht direkt am Ort ihrer Entstehung abgeleitet werden. Während der Messung einer Seite ist auf eine Vertäubung der Gegenseite zu achten, um ein "Überhören" zu vermeiden. Ein Überhören mit der Überlagerung von Potentialen der Gegenseite tritt bei Ableitungen von Innenohr und Ncll. cochleares nicht auf, da hier noch keine Nervenfasern der kontralateralen Hörbahn kreuzen. Für die Ableitung aller weiteren Potentiale ist eine Vertäubung des anderen Ohres mit Breitbandrauschen ("white noise") notwendig^{40,44}.

Die Indikationen für die Ableitung von FAEP sind vielfältig. Hierzu gehören sämtliche Erkrankungen des N. cochlearis und des Hirnstamms, Neoplasien im

Kleinhirnbrückenwinkel, vaskuläre- und demyelinisierende Erkrankungen, das intraoperative Monitoring, die Überwachung komatöser Zustandsbilder sowie die objektive Audiometrie bei Kindern und Erwachsenen^{24,45,75}.

Eine Verlängerung der Latenzen bzw. eine Verkleinerung der Amplituden weist auf eine Schädigung des Nerven bzw. des Hirnstamms hin^{42,44}.

Bei Akustikusneurinomen finden sich ipsilaterale Latenzverzögerungen ab der ersten oder zweiten Welle sowie eine Amplitudenreduktion der darauffolgenden Wellen als Zeichen einer Verlängerung der neuronalen Laufzeit. Diese wird durch die kompressionsbedingte Schädigung der Myelinscheiden der Hörnervenfasern durch das Akustikusneurinom hervorgerufen^{40,75}.

2.3 FAEP der Ratte

Die FAEP-Wellen der Ratte unterscheiden sich in ihrer Nomenklatur von denen des Menschen. Weitgehende Einigkeit herrscht in der Literatur darüber, dass die FAEP bei Ratten, im Gegensatz zu denen des Menschen, nur aus vier gut reproduzierbaren Potentialwellen bestehen^{58,68,69} (Abb. 2.1, A). Hierfür finden sich in der Literatur unterschiedliche Erklärungsansätze. Zum einen wird spekuliert, dass es sich bei der Welle IV der Ratte um den menschlichen IV-V-Komplex handeln könnte^{58,69}. Zum anderen wird bei manchen Autoren eine Welle zwischen der ersten und zweiten FAEP-Welle der Ratte beschrieben⁵⁸ (Abb. 2.1, C), die der zweiten Welle beim Menschen entspricht⁶⁸. Da es sich bei dieser Welle jedoch um eine kleine Welle handelt, geht diese meistens in der viel größeren Welle II unter, ohne als eigenständige Welle erkannt zu werden^{58,68} (Abb. 2.1, B).

Auch wenn die Erklärungsansätze für die "fehlende Welle" unterschiedlich sind, herrscht weitgehend Einigkeit darüber, welchen menschlichen FAEP-Wellen die vier eindeutig erkennbaren FAEP-Wellen der Ratte entsprechen: die Welle II der Ratte entspricht der Welle III des Menschen, die Welle III der Ratte entspricht der Welle IV des Menschen und die Welle IV der Ratte entspricht der Welle V des Menschen^{58,68}.

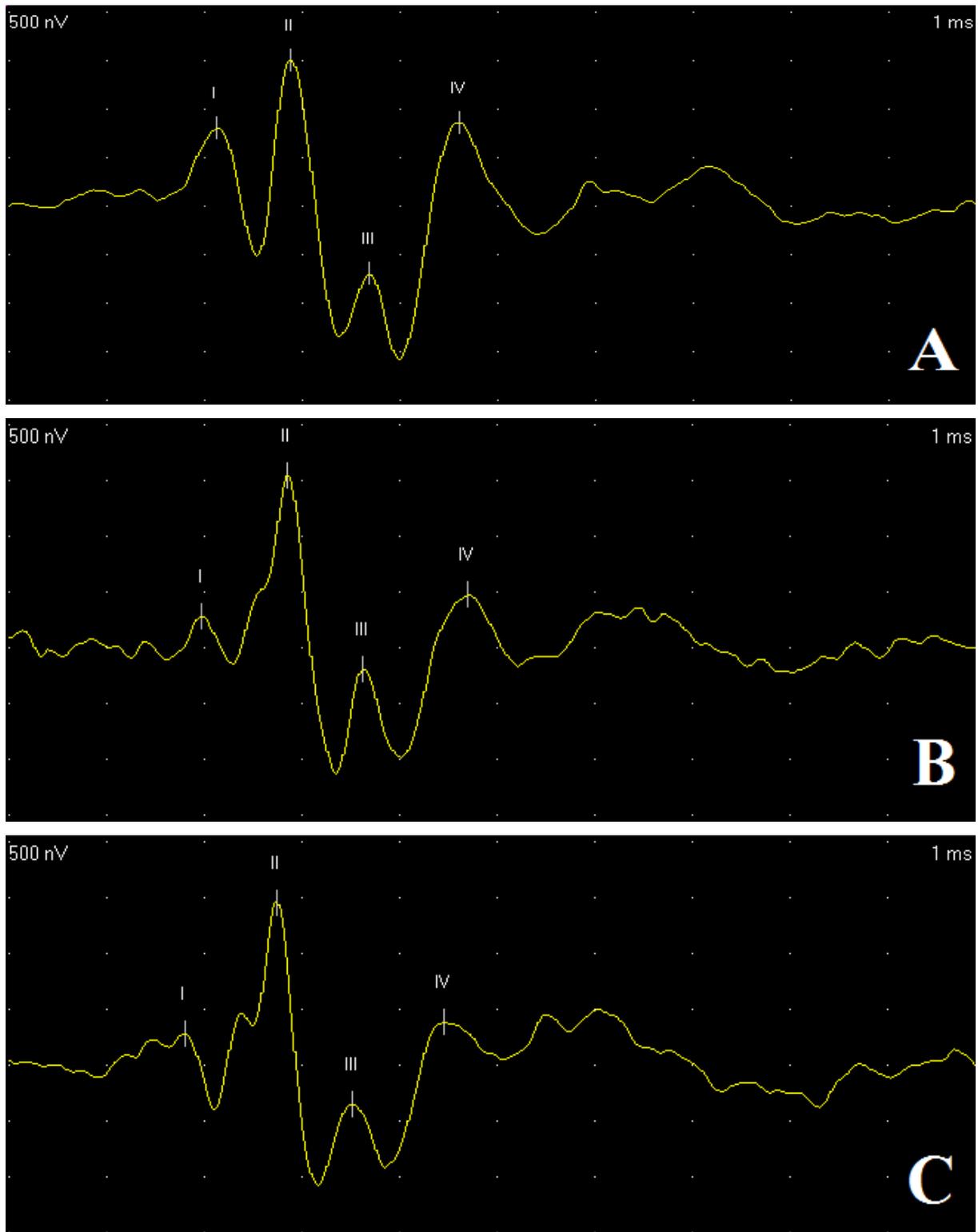


Abb. 2.1 Normvarianten der FAEP-Wellen der Ratte: A: Standardableitung mit den vier charakteristischen FAEP-Wellen der Ratte; B: Zwischen Welle I und II erkennt man die Ausstülpung einer weiteren FAEP-Welle, die fließend in die Welle II übergeht; C: Zwischen Welle I und II zeichnet sich eine weitere FAEP-Welle deutlich ab.

2.4 Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF)

G-CSF ist ein 19,6 kDa großes Glykoprotein aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren^{61,62}. Weltweit werden ca. 3 Mio. Menschen mit diesem Medikament behandelt⁶². Die Auswirkungen von G-CSF auf das hämatopoetische System wurden über Jahrzehnte eingehend erforscht. G-CSF fördert die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben von hämatopoetischen Vorläuferzellen (HSC) im Knochenmark^{16,17,71}, sowie deren Ausschüttung ins periphere Blut^{10,60,72,81}. Davon betroffen sind Vorläuferzellen der Granulopoese, Thrombopoese und Erythropoese^{7,9,13,72}. Aufgrund der starken Stimulation der Granulopoese ist das Haupteinsatzgebiet von G-CSF die Behandlung der Neutropenie^{16,43,71,72,74}. Besondere Bedeutung kommt hierbei der Behandlung der Neutropenie nach myeloablativer Chemotherapie zu^{62,71,72}. Bei der hierzu angewendeten Blutstammzelltransplantation wird den betroffenen Patienten G-CSF zur schnelleren Mobilisation von Vorläuferzellen der Hämatopoese ins periphere Blut verabreicht und die Vorläuferzellen anschließend durch Leukapherese gesammelt. Nach hochdosierter Chemotherapie werden den Patienten die zuvor aus dem Eigenblut gewonnenen Blutstammzellen oder die Stammzellen eines geeigneten Spenders zugeführt^{9,13,23,72}. Durch dieses Verfahren können die granulozytopenische und thrombozytopenische Phase nach Chemotherapie verkürzt werden^{9,13,72}.

Heutzutage gilt das wissenschaftliche Interesse eher den zell- und gewebeprotectiven Eigenschaften von G-CSF. Insbesondere die Auswirkungen von G-CSF auf das Nervengewebe stehen im Fokus der Forschung.

In einer Vielzahl von experimentellen Tiermodellen wurde gezeigt, dass sich G-CSF positiv auf das Outcome neurologischer Krankheitsbilder auswirkt.

So vermindert G-CSF den Untergang von Neuronen und die Destruktion von Nervengewebe nach ischämischem Hirninsult^{21,60,61,73,87} und senkt die Mortalität durch Minderung von Hirnschwellung und Einklemmungserscheinungen⁶⁰. G-CSF schützt dopaminerge Neurone der Substantia nigra vor dem Zelluntergang in einem Versuchsmodell bezüglich M. Parkinson⁴⁶. In einem Modell im Hinblick auf M. Alzheimer wurde gezeigt, dass G-CSF die Lern- und Erinnerungsfunktion von Mäusen nachhaltig verbessert⁸¹. G-CSF fördert das Überleben von α -Motoneuronen und wirkt dadurch der Muskelatrophie im ALS-Modell⁵³, sowie der Nervendegeneration im Ischiadikus-Modell entgegen³⁷. Neurologische Defekte nach

Rückenmarksischämie werden durch die Verabreichung von G-CSF minimiert¹⁴. Auch das Outcome nach Rückenmarksverletzung wird langfristig verbessert⁵⁴. Dieser Schutzeffekt von G-CSF beruht auf verschiedenen intrazellulären Wirkungsmechanismen, die im Folgenden erläutert werden.

G-CSF und sein Rezeptor (G-CSFR) werden weitgehend von Neuronen im ZNS exprimiert^{30,54,61,62}. Nach Schädigung von Nervengewebe z.B. durch Hypoxie oder Ischämie steigt die Expression von G-CSF und seinem Rezeptor in dem betroffenen Areal^{54,61,87}. Die Bindung von G-CSF an seinen Rezeptor löst verschiedene Mechanismen aus, die sich protektiv auf den Erhalt des Nervengewebes auswirken^{30,60}. So stimuliert G-CSF die Einwanderung neuronaler Progenitorzellen in das geschädigte Areal und induziert deren Differenzierung zu reifen Neuronen⁶¹.

G-CSF fördert das Wachstum von Neuronen^{17,54} und sorgt für eine Akkumulation von proliferierenden Nervenzellen um die geschädigten Hirnareale⁸¹.

Der größte neuroprotektive Effekt kommt jedoch durch die Hemmung von Entzündung und Apoptose zustande¹⁴.

G-CSF hemmt die Entzündungsreaktion, die nach Gewebeschädigung entsteht¹⁴ durch Supprimierung von Zytokinen, wie TNF- α ^{22,27,74}, IFN- γ ²⁷ und verschiedenen Interleukinen^{21,27}.

Durch Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege wirkt G-CSF hemmend auf die Apoptose der Nervenzellen^{14,30,54,61,62,87}. Zu diesen antiapoptotischen Signalwegen gehören der JAK/STAT-Signalweg^{26,60,61,87}, der PI3K/AKT-Signalweg^{14,18,43,50,53,61} und der MEK/ERK-Signalweg^{14,30,61}. Unter G-CSF-Einfluss kommt es (größtenteils über diese drei Signalwege) zur verstärkten Expressierung antiapoptotischer Mediatoren, wie Bcl-2^{7,26,87}, Bcl-xL^{7,26,30,54}, c-IAP-2⁷³ und Pim-1⁸⁷ und zur Supprimierung proapoptotischer Stoffe, wie Bax⁸⁷, Bad³⁰, Caspase 3^{30,53,61,73,87}, PARP⁶¹ und den MAP-Kinasen p38 und JNK¹⁴.

All diese Wirkungsmechanismen von G-CSF schützen das neuronale Gewebe vor Destruktion und Zelluntergang.

2.5 Ziel der Studie

Patienten mit Tumoren im Kleinhirnbrückenwinkel zeigen oft diverse neurologische Ausfallerscheinungen^{3,4,20,25,28,31,39,42,57,89}. Bei Akustikusneurinom-Operationen lässt sich eine Erhaltung des Gehörs nur in 54-77 % der Fälle (je nach Tumorgröße) realisieren^{49,51,86}. Selbst nach gelungener gehörerhaltender Operation ist das postoperative Hörvermögen oftmals stark eingeschränkt^{6,49,86}. Trotz verbesserter diagnostischer^{12,19,29,38,80} und therapeutischer^{5,47,48,52,56,85,88} Möglichkeiten bleibt die Bewahrung des Hörvermögens auch heutzutage ein Gebiet, auf dem bessere Ergebnisse dringend benötigt werden^{6,59}. Deshalb ist die Bereitstellung und Verbesserung von wirksamen neuroprotektiven Behandlungen in diesem Bereich von größter Wichtigkeit. Aufgrund der in Kapitel 2.4 angegebenen Informationen ist anzunehmen, dass sich die Behandlung mit G-CSF positiv auf die Regeneration des Nervus cochlearis und seiner Kerngebiete auswirken könnte. Die Untersuchung dieser Vermutung ist Gegenstand dieser Studie. Vorrangiges Ziel ist es hierbei nachzuweisen, ob und in welchem Maße G-CSF einen positiven Effekt auf den Nervus cochlearis und dessen Kerngebiete nach partieller, kontrollierter Schädigung hat. Im Falle eines besseren Ergebnisses könnte G-CSF in der Kleinhirnbrückenwinkelchirurgie und bei Patienten mit Akustikusneurinomen zu einem festen Bestandteil der Behandlung werden.

Folgende konkrete Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. Wirkt sich G-CSF positiv auf die Anzahl der Nervenzellen innerhalb der Ncll. cochleares bei Ratten aus?
2. Wirkt sich G-CSF positiv auf den Erhalt der Kerngebietsfläche der Ncll. cochleares bei Ratten aus?
3. Wirkt sich G-CSF positiv auf die Höhe der Amplituden der FAEP bei Ratten aus?
4. Wirkt sich G-CSF positiv auf die Latenzen der FAEP bei Ratten aus?

3. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die Methoden dieses Projekts und die verwendeten Materialien erläutert. Zunächst wird die Gruppenaufteilung der Versuchstiere beschrieben. Danach wird das Prinzip des Wasserstrahldissektors, die Durchführung der Potentialmessungen und die Methode zur Verabreichung der Injektionslösungen erörtert. Im Anschluss werden die Abläufe der Operation und Perfusion dargestellt. Zum Schluss dieses Kapitels wird genauer auf die Auswertung und Statistik eingegangen.

3.1 Tiere und Gruppenaufteilung

Für die Experimente wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 455 g verwendet.

Die Tiere wurden über das Institut der experimentellen Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes bezogen. Sie wurden dort in Käfigen zu ein bis drei Tieren in adäquater Umgebung untergebracht. Zu Versuchszwecken wurden die Tiere aus ihren Käfigen genommen.

Die Genehmigung der Experimente durch die zuständigen Behörden und die Ethikkommission lag vor.

Im Rahmen der Experimente wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip verschiedenen Gruppen zugeteilt, wobei jede Gruppe aus sechs Tieren bestand:

Gruppe	Beschreibung
Kontrollgruppe	Verabreichung von NaCl an den Tagen 1,3 und 5 postoperativ
G-CSF post	Verabreichung von G-CSF an den Tagen 1,3 und 5 postoperativ
G-CSF pre & post	Verabreichung von G-CSF an den Tagen 1,3 und 5 postoperativ und zusätzlich einen Tag vor der Operation

Tabelle 3.1 Gruppeneinteilung der Versuchstiere

3.2 Wasserstrahldissektor

Abbildung 3.1 zeigt den Wasserstrahl aus dem Wasserstrahldissektor (Erbejet 2, Erbe), mit welchem die Läsion am rechten Nervus vestibulocochlearis der Tiere durchgeführt wurde.

Das Gerät besteht aus einem Bedienfeld zum Einstellen der Wasserstrahlstärke, einer austauschbaren Wasserpumpe, die per Knopfdruck automatisch über eine NaCl-Infusionslösung befüllt wird und einem Handstück, durch das der Wasserstrahl nach außen geleitet wird.

Der Wasserfluss wird über ein Fußpedal gesteuert.

Die Läsion wurde bei einer Wasserstrahlstärke von 8 bar über einen Zeitraum von 1 Sekunde und im Abstand von 1 cm zum Nerv durchgeführt.

3.3 Messung der FAEP

Die Durchführung der Messung der frühen akustisch evozierten Potentiale erfolgte mit Hilfe des Inomed ND-Systems. Die Messungen wurden präoperativ, unmittelbar postoperativ und an den Tagen 1 und 7 nach der Operation durchgeführt. Die

präoperative Messung lieferte den Bezugswert. Durch die Messungen an Tag 1 und 7 nach der Operation wurde die Erholung des Nerven quantifiziert. Vor der FAEP-Messung an Tag 7 wurden die postoperativ für den Wundverschluss gesetzten Klammern der Ratte mit einem chirurgischen Enthefter (US Patent No. 4026520) entfernt.

Zur Durchführung der Messung wurden vier Elektroden im Subkutangewebe der zuvor narkotisierten Ratte fixiert. Eine Elektrode wurde über dem Schädel, im Bereich des Vertex (Anode) angebracht und jeweils eine Elektrode hinter jedem Ohr, mit Projektion der Metallspitze hinter dem Mastoid (Kathode). Die vierte Elektrode, die Ableitungselektrode, wurde im Nacken angebracht.

Danach wurde jeweils ein 26 cm langer Gummischlauch⁵⁸ in den äußeren Gehörgang des linken (blauer Schlauch) und rechten Ohres (roter Schlauch) eingeführt (Abb. 3.1).



Abb. 3.1 Ratte während FAEP-Messung: Tier in liegender Position mit Vertex-Elektrode (schwarz), zwei Mastoid-Elektroden (blau und schwarz) und grüner Erdungselektrode. Durch eine um die Schnauze liegende Röhre fließt das Narkosegas. Abgebildet ist hier eine FAEP-Messung 7 Tage nach der Operation.

Nach dem Start der Messung wurden der Ratte über einen der Schläuche vom Gerät erzeugte Klick-Geräusche ("Klicks") dargeboten. Diese Klicks wurden vom Hörsystem verarbeitet, was auf dem Bildschirm in Form der Potentialwellen (I-IV) sichtbar wurde. Bei jeder Messung wurden der Ratte 1000 Klicks, mit einem Schalldruckpegel von 40 dB und einem Frequenzspektrum zwischen 400 Hz und 3

kHz dargeboten. Das endgültige Kurvenbild entstand durch Mittelwertbildung der 1000 akustischen Reize. Während der Reizung des einen Ohres wurde das andere Ohr durch Breitbandrauschen ("white noise") vertäuscht, um ein Überhören der Gegenseite zu vermeiden⁵⁸. Dadurch wurden seitenspezifische Aussagen ermöglicht.

3.4 Verabreichung von G-CSF und NaCl

Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde G-CSF (G-CSF post) und NaCl (Kontrollgruppe) an den Tagen 1, 3, und 5 nach der Operation subkutan appliziert. Die Gruppe G-CSF pre & post erhielt G-CSF zusätzlich einen Tag vor der Operation. Die verwendete G-CSF-Dosis (Neupogen, Amgen) betrug pro Tag 30 µg/kg Körpergewicht. G-CSF wurde unmittelbar vor der Injektion mit NaCl auf 1 ml verdünnt. Die Kontrollgruppe erhielt 1 ml NaCl (Isotone Kochsalzlösung 0,9%, B/Braun) pro Tier und Tag.

Zur Verabreichung von G-CSF wurde eine Einweginsulinspritze (1 ml, B/Braun) und zur Verabreichung von NaCl eine Einwegspritze (InjektR 5ml, B/Braun) verwendet.

3.5 Operation

3.5.1 Vorbereitung und Narkoseeinleitung

Zur Narkoseeinleitung wurde die Ratte aus dem Käfig genommen und in ein zylindrisches Glasgefäß gesetzt. Ein Trichter wurde über das Tier gestülpt, durch dessen Öffnung ein Sauerstoff/Narkosegasgemisch (Isofluran, Baxter) eingeleitet werden konnte. Es wurde darauf geachtet, dass der Trichter die Ratte komplett einschloss und keine Luft zwischen Trichter und Glaszylinder nach außen gelangen konnte. Der Fluss wurde auf 1,5L O₂/min mit einem Isoflurananteil von 3% eingestellt. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde nach ca. zwei Minuten erreicht.

Nach der Sedierung wurde die Ratte mit einer speziellen Waage (P-1200, Mettler) gewogen. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug 455 g.

Danach wurde der Ratte eine Röhre über die Schnauze gestülpt, durch welche das Narkosegas bis zum Ende der Operation floss (Abb. 3.1).

Anschließend wurde das Tier im Nackenbereich rasiert (Aesculap Elektra II).

Um eine gute Analgesierung zu erreichen, wurden der Ratte vor Beginn der präoperativen Messung 30-50mg/kg Tramadol (Tramal®, 100mg, Grünenthal) subkutan appliziert. Nach der Analgesierung wurden die Augen der Ratte mit Bepanthenalbe bedeckt, um deren Austrocknung während der Operation zu verhindern.

Unmittelbar vor der Operation wurde die Ratte auf eine beheizbare Wärmeplatte (TCAT-2LV, Phystemp Instruments Inc.) gelegt, die an eine rektale Temperatursonde gekoppelt war. Die Zieltemperatur wurde auf 38°C eingestellt⁶⁴. Der Isoflurananteil im Narkosegasgemisch wurde auf 1,5% gesenkt, um eine Atemdepression zu verhindern⁷⁷.

Zur Verbesserung der Sicht wurde der Ratte eine Watterolle unter die Vorderbeine geklemmt und dadurch die Nackenregion hervorgehoben.

3.5.2 Zugang

Nach Desinfektion des zuvor rasierten Hautareals (SoftaseptR, B/Braun) wurde die Kopfhaut mit einem Skalpell (Aesculap BB73; Skalpellklinge: MartorR Nr. 10) auf der rechten Seite, 3 mm paramedian ein ca. 4 cm langer Schnitt inzidiert. Mit einer Präparierschere (Codman Classic-Plus 36-5015) wurde zwischen Haut und Muskulatur nach kaudal und kranial präpariert.

Anschließend wurden die beiden, durch die Präparation entstandenen, lockeren Hautfalten mit einem Wundspreizer (Aesculap BV002R) auseinandergehalten, sodass ein guter Blick auf den kraniozervikalen Übergang möglich wurde.

Der M. acromiotrapezius wurde in der Medianlinie eingeschnitten (Präparierschere), und die so entstandenen Muskelhälften wurden anschließend mit Hilfe eines Wundspreizers auseinandergedrückt. Danach wurde der darunter gelegene M. splenius in der Medianlinie durchtrennt und ebenfalls mittels Wundspreizer separiert.

Mit einem scharfen Schaber (Grieshaber 681.11) wurde der M. semispinalis capitis, der unmittelbar über dem Areal für die spätere Kraniektomie am rechten Os occipitale ansetzt, in einem Stück abgesetzt, sodass der Schädelknochen in diesem Bereich sichtbar wurde. Ein kleines Stück von ca. 30 mm³ des M. semispinalis capitis

wurde mit einer Mikro-Federschere (Aesculap FD 12 oder FD 13) gekappt. Das so gewonnene Muskelstück wurde in eine Nierenschale mit NaCl-Lösung gelegt.

3.5.3 Kraniektomie und Nervenläsion

Die Kraniektomie wurde unter Zuhilfenahme eines Mikroskops (Superlux 300, Zeiss) durchgeführt. Mit einem chirurgischen Mikro-Bohrer (MicroTRON, Aesculap) wurde ein Loch mit einem Durchmesser von 4 mm⁵⁸ in den an dieser Stelle freipräparierten Schädelknochen gefräst (Abb. 3.2, A). Dazu wurde zunächst zur gröberen Bearbeitung ein Rosettenkopfbohraufsatz (Durchmesser 2,3mm) eingesetzt. Die anschließende Feinbearbeitung erfolgte mit einem Diamantkopfbohraufsatz (GD 128, Durchmesser 2,7 mm).

Die Größe des Kraniektomieareals war entscheidend für den erfolgreichen Verlauf der weiteren Operation. Bei zu kleiner Kraniektomie konnte der Nerv nicht ausreichend gut dargestellt werden, bei zu großer Kraniektomie bestand dagegen die Gefahr, den unmittelbar angrenzenden Sinus transversus oder Sinus sigmoideus zu eröffnen. Die Perforation eines Sinus war selten, führte in diesen wenigen Fällen jedoch stets zu massiven Blutungen. Diese Massenblutungen konnten meist mit Tabotamp (Johnson & Johnson Medical) gestillt werden, sodass es nur in seltenen Fällen zum Exitus der Ratte kam.

Bei der Durchführung der Kraniektomie wurde darauf geachtet, dass die unter dem Knochen gelegene Dura mater bzw. das darunter liegende Kleinhirn nicht geschädigt wurde (Abb. 3.2, B).

Nach der Entfernung des Schädelknochens wurde die darunter liegende Dura mit einem Dura-Häkchen (FD376R, Aesculap) angehoben. Das Häkchen wurde nun leicht gedreht, bis die Dura an dieser Stelle einen kleinen Riss bekam (Abb. 3.2, C). Dieser Riss wurde mit einer Mikro-Federschere erweitert. Nach Eröffnung der Dura wurde das Kleinhirn mit einem Mikro-Dissektor (FF303R, Aesculap) leicht nach medial verlagert. Liquor aus der Cisterna cerebellomedullaris wurde mit Hilfe von Sugi (REF 31603, Kettenbach) abgesaugt (Abb. 3.2, D). Das Sugi wurde zuvor leicht in NaCl-Lösung getaucht, um die mechanische Traktion zu minimieren.

Nach Platzgewinnung durch die Absaugung von Liquor (Abb. 3.2, E) konnte der Nervus vestibulocochlearis rostral des Flocculus durch erneute Verlagerung des Kleinhirns nach medial (Abb. 3.2, F) dargestellt werden.

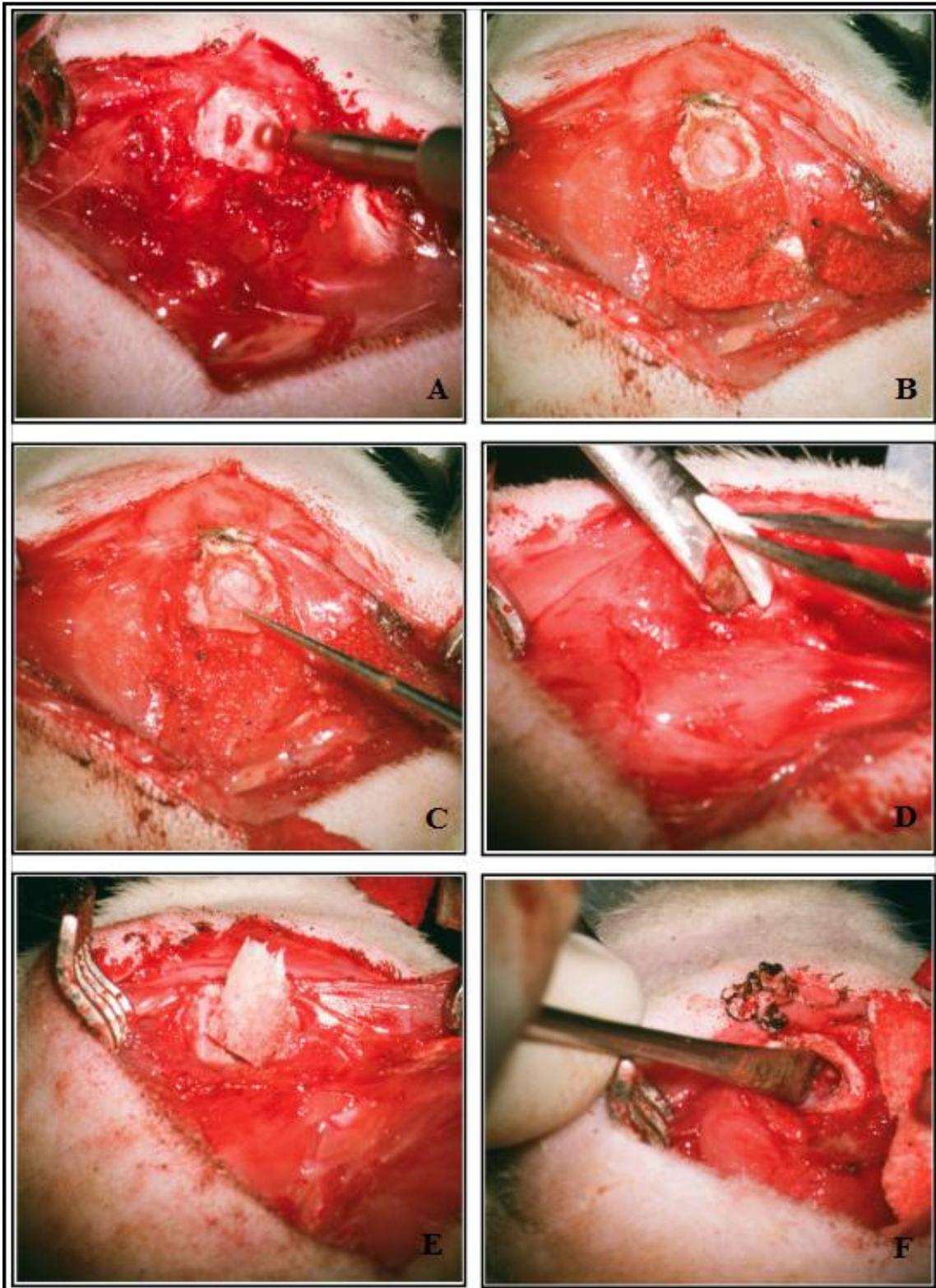


Abb. 3.2 Schritte der Kraniektomie: (A) Auffräsen des Os occipitale mit dem chirurgischen Bohrer. (B) Blick auf das Kleinhirn bei intakter Dura mater. (C) Eröffnung der Dura mit einem Durahäkchen. (D) Absaugen des Liquors nach Abtragung der Dura. (E) Unter Zuhilfenahme eines Dissektors werden kleine Dreiecke aus Watte (Sugi) zwischen Kleinhirn und Schädelknochen geschoben, die sich mit Liquor vollsaugen. (F) Nach Entnahme des Sugi wird das Kleinhirn beiseitegeschoben um die Nervenläsion durchzuführen.

Mit dem Wasserstrahldissektor wurde der Nerv im Abstand von 1 cm mit einer Wasserdruckstärke von 8 bar eine Sekunde lang in der Mitte zwischen dem inneren Gehörgang und seiner Eintrittsstelle in den Hirnstamm (Kleinhirnbrückenwinkel) beschossen und die Läsion herbeigeführt⁸³.

3.5.4 Wundverschluss

Das bei der Präparation des Zugangs gewonnene Muskelstück wurde über die Kraniektomiestelle gelegt, um eine postoperative Liquorfistel zu vermeiden. Anschließend wurden die Muskelschichten mit Einzelknopfnähten verschlossen und die Haut mit einer Subkutannaht vernäht.

Zum Nähen wurden Nadelhalter (Medica) und Nahtmaterial (SafilR HR 17 oder HR 26, 4 x 3-0, 45cm, Polyglykolsäure, B/Braun) verwendet.

Zusätzlich wurde die Wundnaht mit einem Einweg-Hautklammerer (35W Autosuture, Appose ULC) verschlossen.

Zum Schluss wurden die Ratten markiert, um mehrere Tiere innerhalb eines Käfigs unterscheiden zu können. Hierzu wurden mit einer Nagelschere (HF014R, Aesculap) kleine Kerben in die Ohren der Ratten geschnitten.

Tiere, welche nach der Operation durch stark ausgeprägte neurologische Symptome auffielen (z.B. übermäßigen Schwindel), wurden umgehend euthanasiert.

3.6 Perfusion

Die Perfusion der Tiere erfolgte sieben Tage nach dem operativen Eingriff. Zuerst wurde die Ratte mit Isofluran betäubt. Anschließend erfolgte die Analgesierung (intraperitoneal) mit 1ml Ketavet. Zur Perfusion wurde erst NaCl-Lösung (0,9%, B/Braun) und später Formalin (Roti-Histofix 4%, Roth) durch das Kreislaufsystem der Ratte geleitet^{46,83}. Mit einer chirurgischen Schere (ES106, Everhards) wurde die Bauchhöhle in der Medianlinie durch einen transversalen Schnitt eröffnet. Anschließend wurde die Bauchdecke in der Sagittalebene bis zum Diaphragma aufgeschnitten. Das Diaphragma wurde mit der Schere komplett abgesetzt und der Brustkorb mit einem Schnitt durch das Sternum gespalten. Um das Herz freizulegen wurde der Brustkorb am Übergang zur Bauchhöhle dreiecksförmig eingeschnitten. Die Enden wurden mit Klemmen (EK61, Everhards) nach außen fixiert.

Danach wurde die Infusionskanüle in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens eingeführt und darüber NaCl-Lösung ins Kreislaufsystem der Ratte geleitet. Anschließend wurde das rechte Herzohr eingeschnitten, damit das Blut abfließen konnte. In dieser Phase wies die Leber der Ratte noch einen blutroten Farbton auf. Nachdem das gesamte Blut der Ratte ausgespült war, nahm die zuvor blutrote Leber einen gelblich-braunen Farbton an. An dieser Stelle wurde mittels Dreiwegehahn von NaCl auf Formalin gewechselt, um das Gewebe zu fixieren.

Abschließend wurde das Gehirn freipräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung sieben Tage lang in Formalin aufbewahrt.

3.7 Auswertung

Die Anfertigung der histologischen Schnitte einschließlich Schneiden und Färben erfolgte durch Mitarbeiterinnen der experimentellen Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes.

3.7.1 Auswertung der FAEP

Zur Auswertung der akustisch evozierten Potentiale wurden die Latenzen und Amplituden der verschiedenen Gruppen miteinander verglichen.

Die Latenzen der vier Wellen wurden vom Messgerät automatisch berechnet und in Millisekunden angezeigt.

Zur Ermittlung der Amplituden wurde manuell unmittelbar vor dem Anstieg der Potentialwelle und an der höchsten Stelle der Potentialwelle jeweils ein Messpunkt gesetzt ("valley to peak"). Das Messgerät zeigte jetzt die Höhe der jeweiligen Amplitude in Mikrovolt an. Dies wurde für alle vier Potentialwellen wiederholt.

3.7.2 Auswertung der Histologie

Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurden die Gehirne der Ratten in Paraffin eingebettet und der Hirnstamm auf Höhe des Flocculus geschnitten.

Hierzu wurden mit einem Mikrotom 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, die einzelnen Schnitte auf Objektträger gezogen und entparaffiniert.

Anschließend wurde jeder zehnte Schnitt mit der Nissl-Färbung gefärbt⁷⁸ und unter einem Lichtmikroskop ausgewertet⁶⁴.

Hierzu wurde bei jedem Gehirn das Kerngebiet auf der geschädigten rechten Seite und das Kerngebiet auf der nicht geschädigten linken Seite betrachtet und miteinander verglichen.

Mit Hilfe eines Anatomieatlanten für Ratten (L.W. Swanson, Structure of the Rat Brain, Elsevier⁷⁶) wurde auf beiden Seiten die Mitte der Ncll. cochleares ausfindig gemacht⁷⁸.

Nun wurde jeweils der Nissl-gefärbte Schnitt, der sich genau in der Mitte des Kerngebiets befand, ausgewertet. Anschließend wurde der nächste gefärbte Schnitt 10 Schnitte kaudal und 10 Schnitte kranial der Mitte ausgewertet. Es wurden also pro

Gehirn sowohl auf der rechten, als auch auf der linken Seite jeweils die drei angefärbten Schnitte ausgewertet, die dem Zentrum des Kerngebiets am nächsten waren.

Aufgrund der charakteristischen Morphologie des Kerngebiets war unter Zuhilfenahme des Anatomieatlanten gewährleistet, dass es sich bei jedem Gehirn und auf beiden Seiten immer um die gleiche Stelle innerhalb der Kerngebiete handelte (Abb. 3.3).

Um zu erfassen, inwiefern sich G-CSF auf das Nervengewebe im Bereich der Ncll. cochleares auswirkt, wurde zum einen die Fläche des Kerngebiets auf beiden Seiten ausgemessen und zum anderen die Anzahl der Nervenzellen beider Seiten ausgezählt und verglichen.

Für die Berechnung der Fläche wurden mit einer Mikroskopkamera, die mit einem Computer verbunden war, Fotos in der 40er-Vergrößerung (40x) angefertigt und die Fläche mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) vermessen.

Zum Zählen der Nervenzellen wurden Fotos in der 100er-Vergrößerung (100x) geschossen.

Das Auszählen erfolgte durch Markierung der Nervenzellkörper ebenfalls mit ImageJ. Durch die Projektion des Mikroskopfensters auf den Computerbildschirm wurde die jeweils eingestellte Mikroskopvergrößerung auf dem Bildschirm nochmals vergrößert dargestellt.

Damit eine Nervenzelle eindeutig als solche identifiziert werden konnte, mussten folgende morphologische Kriterien erfüllt sein⁷⁸:

1. Ein einzelner, dunkler, gut abgrenzbarer Nucleolus musste vorhanden sein.
2. Eine gut definierbare Kernmembran musste vorhanden sein.
3. Eine gut definierbare Plasmamembran musste vorhanden sein.
4. Nissl-Substanz musste im Zytoplasma eindeutig erkennbar sein.

Nur wenn alle oben genannten Kriterien erfüllt waren, wurde eine Nervenzelle als solche gezählt (Abb. 3.4).

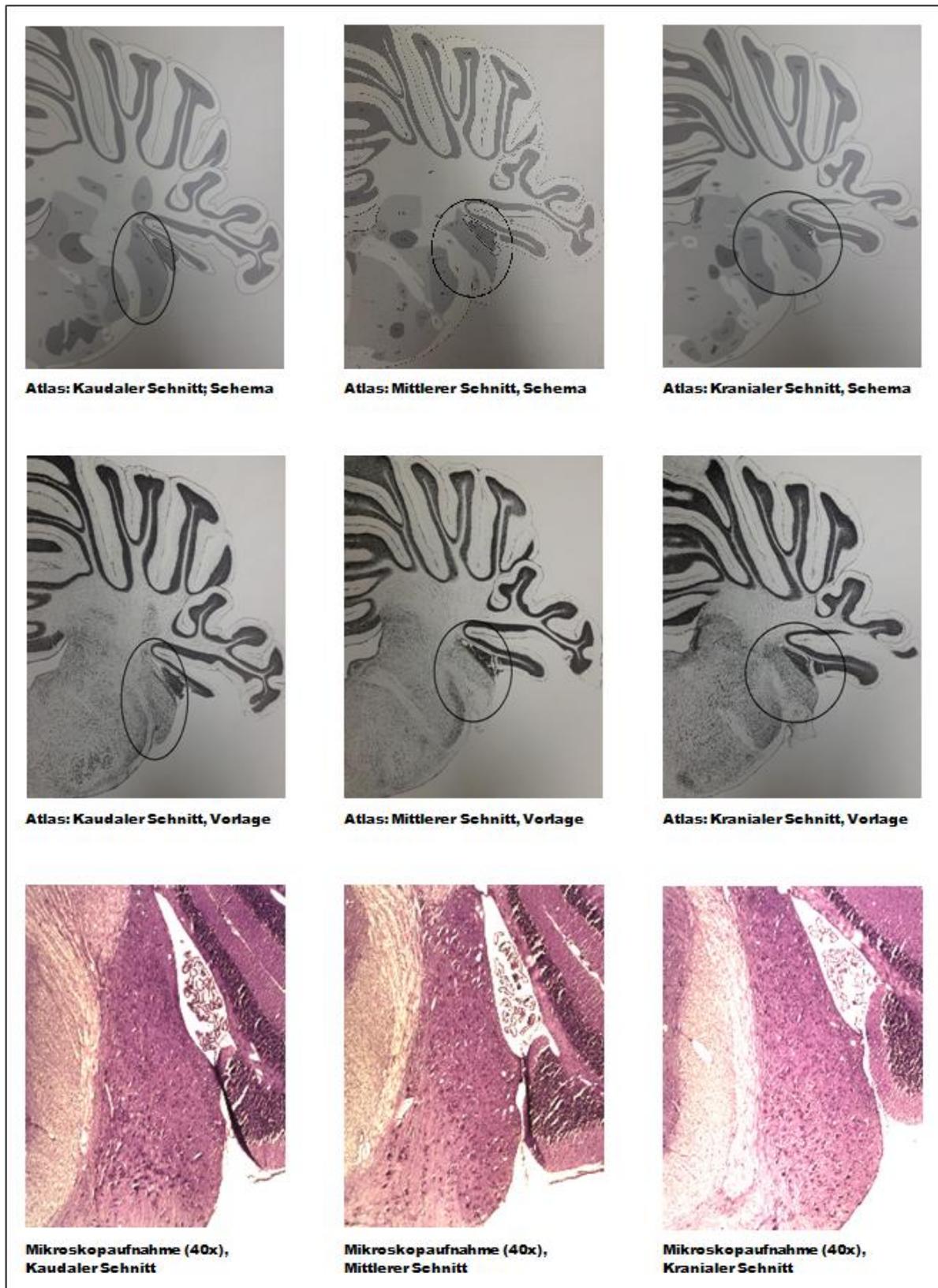


Abb. 3.3 Beispielhafte Darstellung des rechten Kerngebiets: Die obere Reihe stellt das Kerngebiet schematisch dar. Die mittlere Reihe diente als Atlasvorlage dazu, die drei abgebildeten Schnitte der unteren Reihe auffindig zu machen. Die untere Reihe zeigt die genauen Stellen des Kerngebiets, die zur Auswertung herangezogen wurden. (Obere zwei Reihen aus Swanson L.W., Brain Maps: Structure of the Rat Brain⁷⁶)

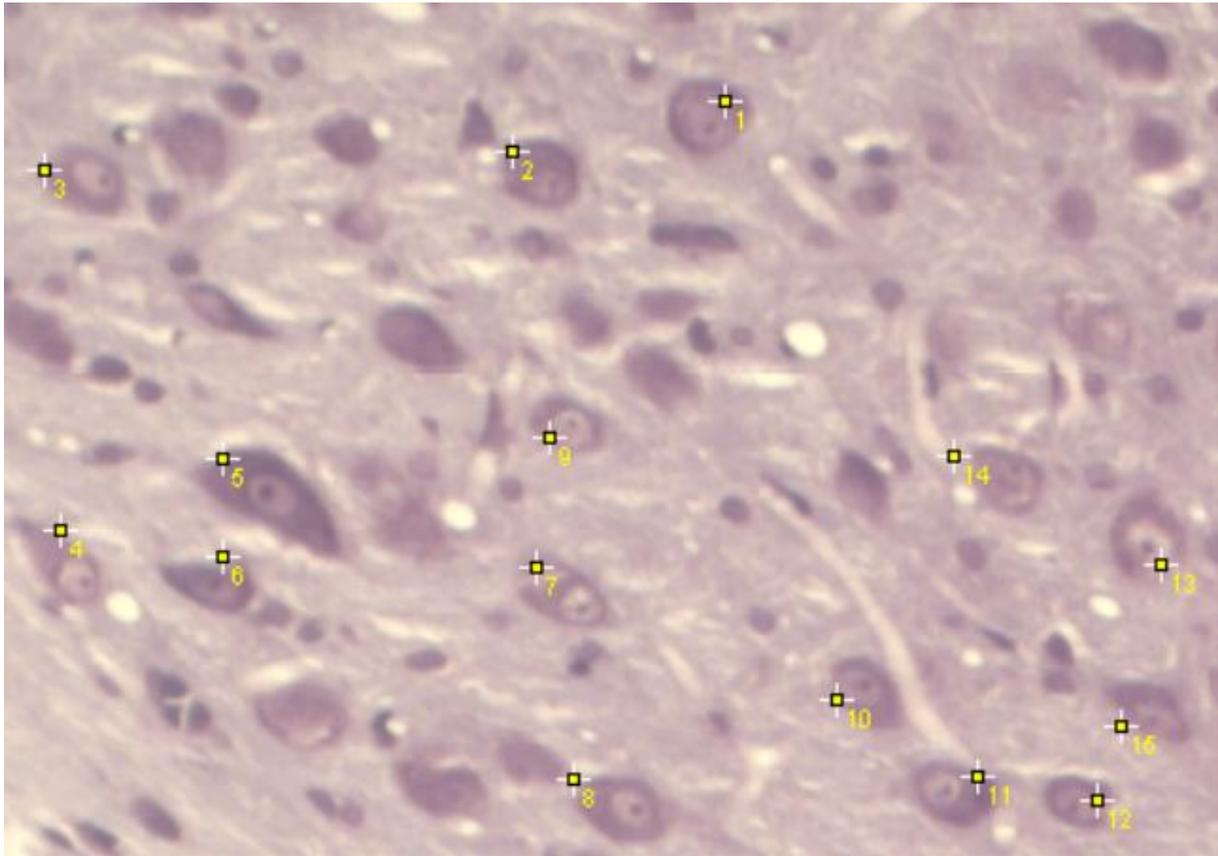


Abb. 3.4 Kriterienkonforme Nervenzellen markiert mit Image-J (1-15).

3.7.3 Statistische Auswertung

Die histologischen und elektrophysiologischen Daten dieses Projekts wurden mit GraphPad Prism (Version 5.01, 2007) ausgewertet. Für die Auswertung der Kerngebietsgröße wurde der one-way ANOVA Bonferroni-Test verwendet. Für die Anzahl der Nervenzellen innerhalb des Kerngebiets wurde der student's t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Die Auswertung der FAEP erfolgte mit two-way ANOVA.

4. Ergebnisse

Das folgende Kapitel enthält die Ergebnisse dieser Studie, welche sich aus den Untersuchungen der Histologie und Elektrophysiologie zusammensetzen. Zunächst werden die histologischen Ergebnisse dargestellt. Diese bestehen einerseits aus der Messung der Anzahl der Nervenzellen im Kerngebiet des N. cochlearis und andererseits aus der Bestimmung der Größe des Kerngebiets. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Elektrophysiologie besprochen, welche die Amplituden und Latenzen der Frühen akustisch evozierten Potentiale (FAEP) beinhalten.

4.1 Histologie

4.1.1 Einfluss von G-CSF auf die Anzahl der Nervenzellen

Für die Analyse der Wirkung von G-CSF auf die Anzahl der Nervenzellen wurde der student's t-Test für unverbundene Stichproben verwendet.

Im Folgenden sind die genauen Daten bezüglich des Einflusses von G-CSF auf die Anzahl der Nervenzellen aufgeführt:

Rechtes Kerngebiet:

Kontrollgruppe vs. G-CSF post: $p = 0,0086$

Kontrollgruppe (rechts): Mittelwert \pm SD = $167,0 \pm 31,47$ (n = 6)

G-CSF post (rechts): Mittelwert \pm SD = $223,0 \pm 27,91$ (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt $-56,00$, das 95%-Konfidenzintervall $-94,26$ zu $-17,17$.

Kontrollgruppe vs. G-CSF pre & post: p = 0,2168

Kontrollgruppe (rechts): Mittelwert \pm SD = 167,0 \pm 31,47 (n = 6)

G-CSF pre & post (rechts): Mittelwert \pm SD = 222,2 \pm 97,54 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt -55,17, das 95%-Konfidenzintervall -148,4 zu 38,06.

G-CSF post vs. G-CSF pre & post: p = 0,9843

G-CSF post (rechts): Mittelwert \pm SD = 223,0 \pm 27,91 (n = 6)

G-CSF pre & post (rechts): Mittelwert \pm SD = 222,2 \pm 97,54 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt 0,8333, das 95%-Konfidenzintervall -91,45 zu 93,12.

Linkes Kerngebiet:

Kontrollgruppe vs. G-CSF post: p = 0,5911

Kontrollgruppe (links): Mittelwert \pm SD = 198,8 \pm 33,81 (n = 6)

G-CSF post (links): Mittelwert \pm SD = 207,8 \pm 20,85 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt -9,0, das 95%-Konfidenzintervall -45,13 zu 27,13.

Kontrollgruppe vs. G-CSF pre & post: p = 0,7511

Kontrollgruppe (links): Mittelwert \pm SD = 198,8 \pm 33,81 (n = 6)

G-CSF pre & post (links): Mittelwert \pm SD = 210,7 \pm 82,22 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt hier -11,83 \pm 36,29, das 95%-Konfidenzintervall -92,69 zu 69,03.

G-CSF post vs. G-CSF pre & post: p = 0,9364

G-CSF post (links): Mittelwert \pm SD = 207,8 \pm 20,85 (n = 6)

G-CSF pre & post (links): Mittelwert \pm SD = 210,7 \pm 82,22 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt -2,833, das 95%-Konfidenzintervall -79,98 zu 74,31.

Im Bereich des rechten, geschädigten Kerngebiets ist die Anzahl der Nervenzellen innerhalb der G-CSF post-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant ($p = 0,0086$).

Zwischen der G-CSF pre & post-Gruppe und der Kontrollgruppe besteht bezüglich der Anzahl der Nervenzellen des rechten Kerngebiets kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,2168$). Grafisch zeigt sich jedoch ein Trend zugunsten der G-CSF pre & post-Gruppe.

Im Hinblick auf die Anzahl der Neurone besteht zwischen den beiden G-CSF-Gruppen keine statistische Signifikanz ($p = 0,9843$).

Im Bereich des linken, nicht geschädigten Kerngebiets besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der G-CSF post-Gruppe und der Kontrollgruppe ($p = 0,5911$). Der Vergleich der G-CSF pre & post-Gruppe mit der Kontrollgruppe liefert bezüglich der Anzahl der Nervenzellen des linken Kerngebiets kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p = 0,7511$).

Ebenso finden sich im Bereich des linken Kerngebiets keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden G-CSF-Gruppen ($p = 0,9364$).

Abbildung 4.1 stellt den Einfluss von G-CSF auf die Anzahl der Nervenzellen grafisch dar:

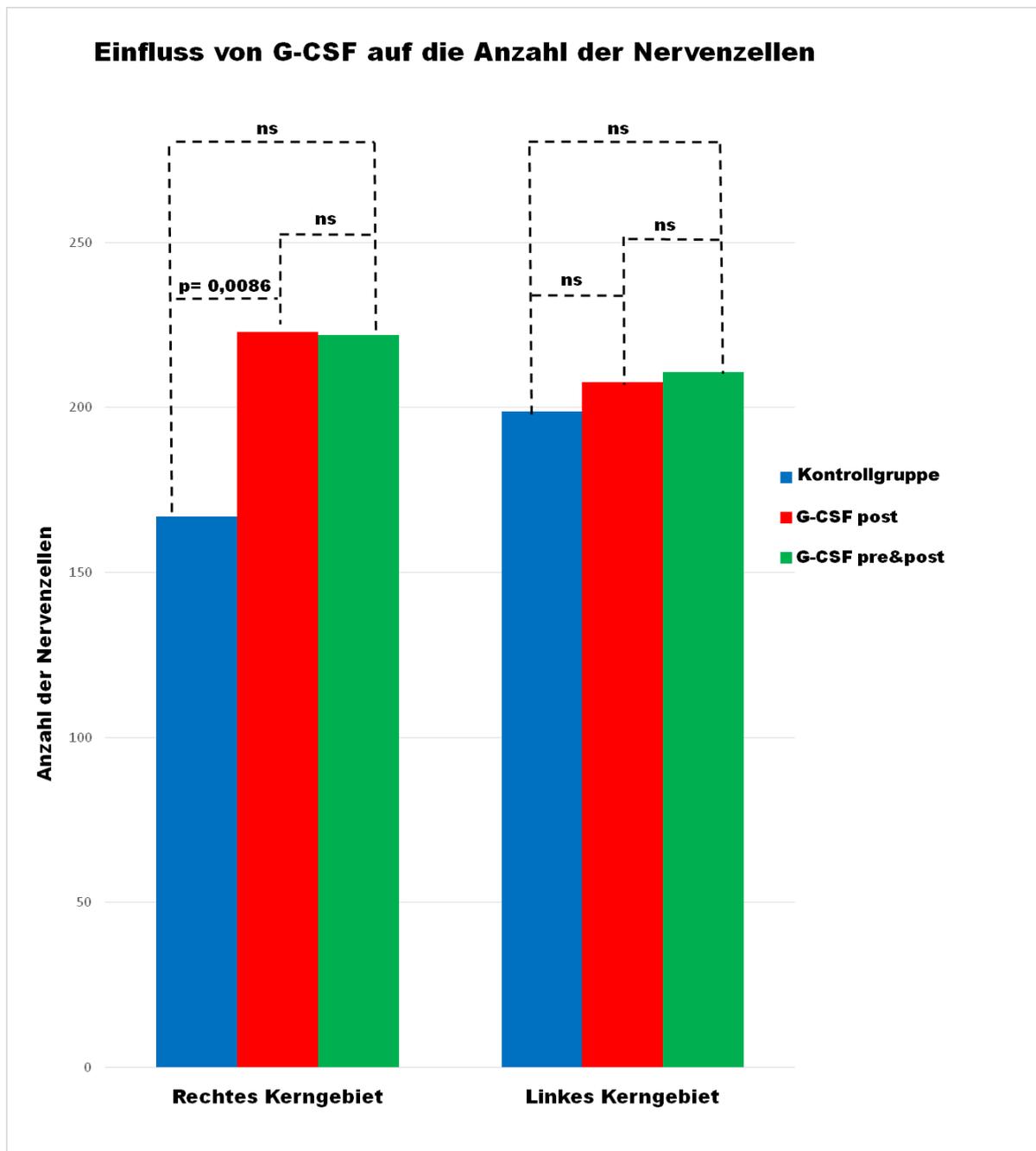


Abb. 4.1 Säulendiagramm: Grafisch dargestellt ist der Einfluss von G-CSF auf die Anzahl der Nervenzellen des rechten und linken Kerngebiets. Es handelt sich hierbei um ganzzahlige Werte. Die für jede der drei Gruppen (Kontrollgruppe, G-CSF post und G-CSF pre & post) abgebildete Säule entspricht dem Mittelwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.2 Einfluss von G-CSF auf die Größe des Kerngebiets

Zur Analyse der Größe des Kerngebiets wurde der one-way ANOVA Bonferroni-Test verwendet.

Im Folgenden sind die genauen Daten in Bezug auf den Einfluss von G-CSF auf die Größe des Kerngebiets aufgeführt:

Rechtes Kerngebiet:

Kontrollgruppe vs. G-CSF post: $p = 0,0019$

Kontrollgruppe (rechts): Mittelwert \pm SD = 862175 ± 100217 (n = 6)

G-CSF post (rechts): Mittelwert \pm SD = 1113016 ± 102697 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt -250841, das 95%-Konfidenzintervall -413700 zu -88020.

Kontrollgruppe vs. G-CSF pre & post: $p < 0,05$

Kontrollgruppe (rechts): Mittelwert \pm SD = 862175 ± 100217 (n = 6)

G-CSF pre & post (rechts): Mittelwert \pm SD = 1070125 ± 110857 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt -207950, das 95%-Konfidenzintervall -370800 zu -45130.

G-CSF post vs. G-CSF pre & post: $p > 0,05$

G-CSF post (rechts): Mittelwert \pm SD = 1113016 ± 102697 (n = 6)

G-CSF pre & post (rechts): Mittelwert \pm SD = 1070125 ± 110857 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt 42890, das 95%-Konfidenzintervall -119900 zu 205700.

Linkes Kerngebiet:

Kontrollgruppe (links) vs. G-CSF post (links): $p = 0,0242$

Kontrollgruppe (links): Mittelwert \pm SD = 922374 ± 112758 (n = 5)

G-CSF post (links): Mittelwert \pm SD = 1119287 ± 131303 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt -166913, das 95%-Konfidenzintervall -367800 zu -26050.

Kontrollgruppe (links) vs. G-CSF pre & post (links): $p > 0,05$

Kontrollgruppe (links): Mittelwert \pm SD = 922374 \pm 112758 (n = 5)

G-CSF pre & post (links): Mittelwert \pm SD = 1036937 \pm 52628 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt hier -114563, das 95%-Konfidenzintervall -285400 zu 56300.

G-CSF post (links) vs. G-CSF pre & post (links): $p > 0,05$

G-CSF post (links): Mittelwert \pm SD = 1119287 \pm 131303(n = 6)

G-CSF pre & post (links): Mittelwert \pm SD = 1036937 \pm 52628 (n = 6)

Die Differenz zwischen den Mittelwerten beträgt 82350, das 95%-Konfidenzintervall -80560 zu 245300.

Die Kerngebietsfläche der G-CSF post Gruppe im Bereich des rechten, geschädigten Kerngebiets ist größer als die der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant ($p = 0,0019$).

Das Kerngebiet der G-CSF pre & post-Gruppe ist auf der rechten Seite ebenfalls größer als das der Kontrollgruppe. Auch dieses Ergebnis ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Zwischen den beiden G-CSF- Gruppen besteht bezüglich der Größe des Kerngebiets kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Auch im Bereich des linken, nicht geschädigten Kerngebiets besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der G-CSF post-Gruppe und der Kontrollgruppe ($p = 0,0242$).

Der Vergleich der G-CSF pre & post-Gruppe mit der Kontrollgruppe liefert bezüglich der Größe des linken Kerngebiets kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$).

Bezüglich des linken Kerngebiets besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden G-CSF-Gruppen ($p > 0,05$).

Abbildung 4.2 zeigt den Einfluss von G-CSF auf die Größe des Kerngebietes:

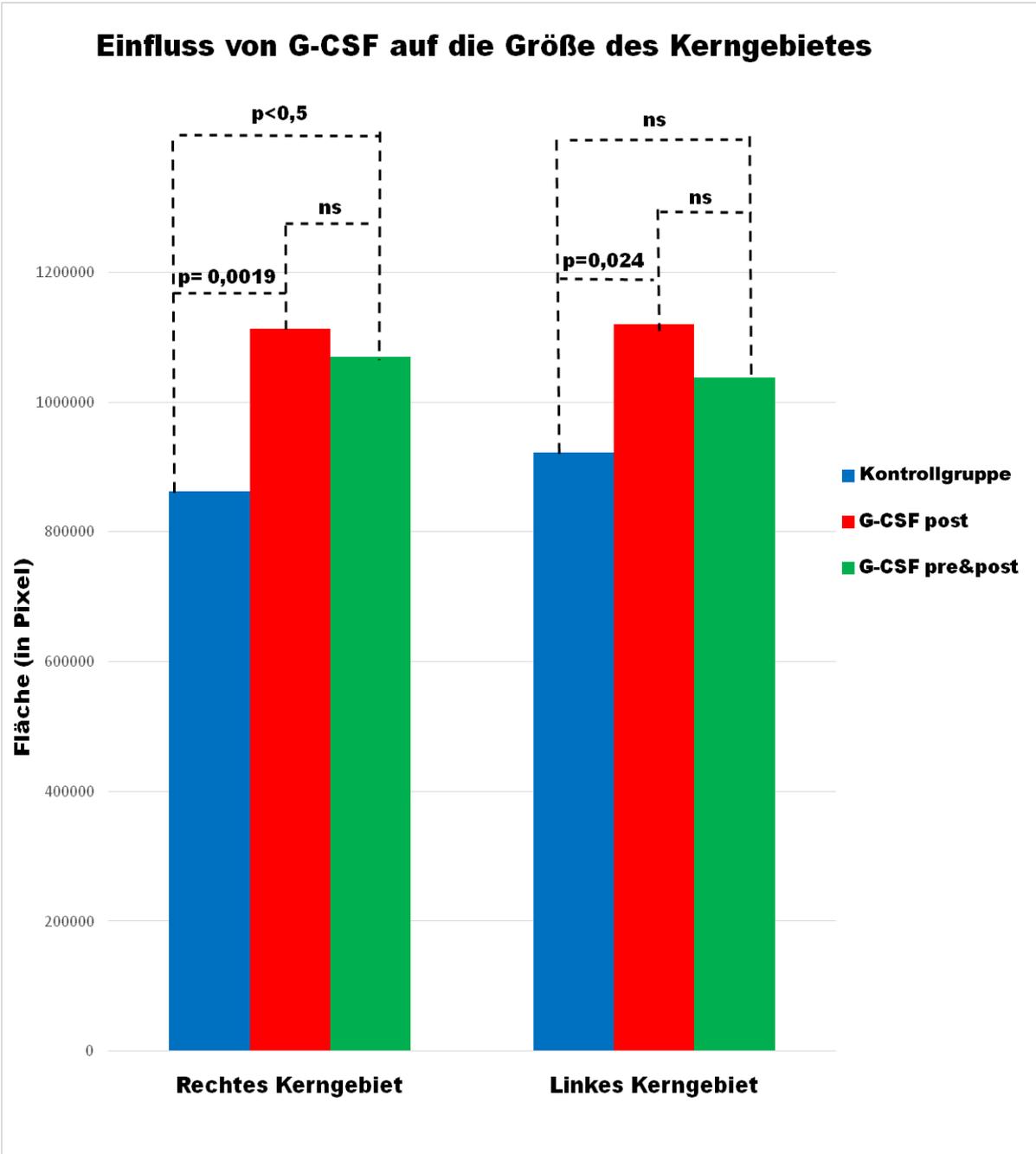


Abb. 4.2 Säulendiagramm: Die Grafik zeigt den Einfluss von G-CSF auf die Größe der beiden Kerngebiete. Die Maßeinheit ist Pixel (px). Die Säule jeder Gruppe (Kontrollgruppe, G-CSF post und G-CSF pre & post) entspricht dem jeweiligen Mittelwert (dies gilt ebenfalls für alle unter 4.2 aufgeführten Säulendiagramme).

4.2 FAEP

4.2.1 Einfluss von G-CSF auf die Höhe der Amplituden

Die Auswertung der Amplituden der FAEP erfolgte mit Hilfe von two-way ANOVA. Aufgrund der hohen Standardabweichung zeigten die einzelnen Messzeitpunkte untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede. Betrachtet man jedoch die verschiedenen Messzeitpunkte gemeinsam im Verlauf einer Woche, erkennt man sowohl bei der Amplitude II, als auch bei der Amplitude IV der Ratten einen deutlichen Anstieg durch die Applikation von G-CSF.

4.2.1.1 Amplitude II

Tabelle 4.1 enthält die genauen Daten der Messungen:

Rechte Seite:

Kontrollgruppe vs. G-CSF post; Amplitude II (μV):

Messzeitpunkt	Kontrollgruppe (n = 6)	G-CSF post (n = 6)	Differenz
pre OP	0,66(SD:0,197)	0,55(SD:0,430)	-0,11
post OP	0,26(SD:0,049)	0,12(SD:0,089)	-0,14
1 day	0,24(SD:0,194)	0,37(SD:0,221)	0,13
1 week	0,24(SD:0,164)	0,51(SD:0,362)	0,27

Kontrollgruppe vs. G-CSF pre & post; Amplitude II (μV):

Messzeitpunkt	Kontrollgruppe (n = 6)	G-CSF pre & post (n = 6)	Differenz
pre OP	0,66(SD:0,197)	0,56(SD:0,254)	-0,1
post OP	0,26(SD:0,049)	0,15(SD:0,104)	-0,11
1 day	0,24(SD:0,194)	0,38(SD:0,144)	0,14
1 week	0,24(SD:0,164)	0,41(SD:0,165)	0,17

Linke Seite:

Kontrollgruppe vs. G-CSF post; Amplitude II (μV):

Messzeitpunkt	Kontrollgruppe (n = 6)	G-CSF post (n = 6)	Differenz
pre OP	1(SD:0,205)	0,94(SD:0,469)	-0,06
post OP	0,67(SD:0,143)	0,5(SD:0,098)	-0,17
1 day	0,8(SD:0,181)	0,64(SD:0,187)	-0,16
1 week	1(SD:0,436)	1,01(SD:0,542)	0,01

Kontrollgruppe vs. G-CSF pre & post; Amplitude II (μV):

Messzeitpunkt	Kontrollgruppe (n = 6)	G-CSF pre & post (n = 6)	Differenz
pre OP	1(SD:0,205)	1,05(SD:0,335)	0,05
post OP	0,67(SD:0,143)	0,59(SD:0,243)	-0,08
1 day	0,8(SD:0,181)	0,64(SD:0,219)	-0,16
1 week	1(SD:0,436)	0,95(SD:0,444)	-0,05

Tabelle 4.1 Messwerte der FAEP-Amplitude II: Amplitudenwerte in Mikrovolt. Teiltabelle 1 und 2: rechte Seite. Teiltabelle 3 und 4: Linke Seite. Anzahl der Tiere pro Gruppe: 6 (n = 6). Messzeitpunkte: präoperativ (pre OP), postoperativ (post OP), 1-Tages-Messung (1 day), 7-Tages-Messung (1 week). Pro Teiltabelle werden jeweils zwei Gruppen miteinander verglichen (vs.): Mittelwerte (und Standardabweichungen (SD)) der Messzeitpunkte und Differenz zwischen den Mittelwerten.

Auf der rechten Seite wurde eine geringere Depression der FAEP-Amplitude II durch die Verabreichung von G-CSF beobachtet. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant ($p = 0,0401$).

Wie in Abb. 4.3 dargestellt, fallen die Werte der drei Gruppen in der postoperativen Messung stark ab. Im weiteren Verlauf steigen die Werte beider G-CSF-Gruppen. Der Wert der G-CSF post-Gruppe befindet sich nach einer Woche wieder auf Höhe des präoperativen Ausgangsniveaus. Die Werte der Kontrollgruppe verbessern sich im weiteren Verlauf hingegen nicht.

Auf der linken, nicht geschädigten Seite (Abb. 4.4) findet sich zwischen den verschiedenen Gruppen keine statistische Signifikanz ($p = 0,7522$). Postoperativ nehmen die Werte wahrscheinlich aufgrund der mechanischen Beeinträchtigung der hinteren Schädelgrube ab, jedoch weniger stark als auf der rechten Seite. In den beiden darauffolgenden Messungen verbessern sich die Werte aller Gruppen jeweils gegenüber der vorherigen Messung und befinden sich nach einer Woche wieder auf Höhe des Ausgangsniveaus. Über den gesamten Messzeitraum ist die Erholung der Nervenfunktion der drei Gruppen gleich.

Die folgenden beiden Abbildungen stellen den Einfluss von G-CSF auf die FAEP-Amplitude II grafisch dar:

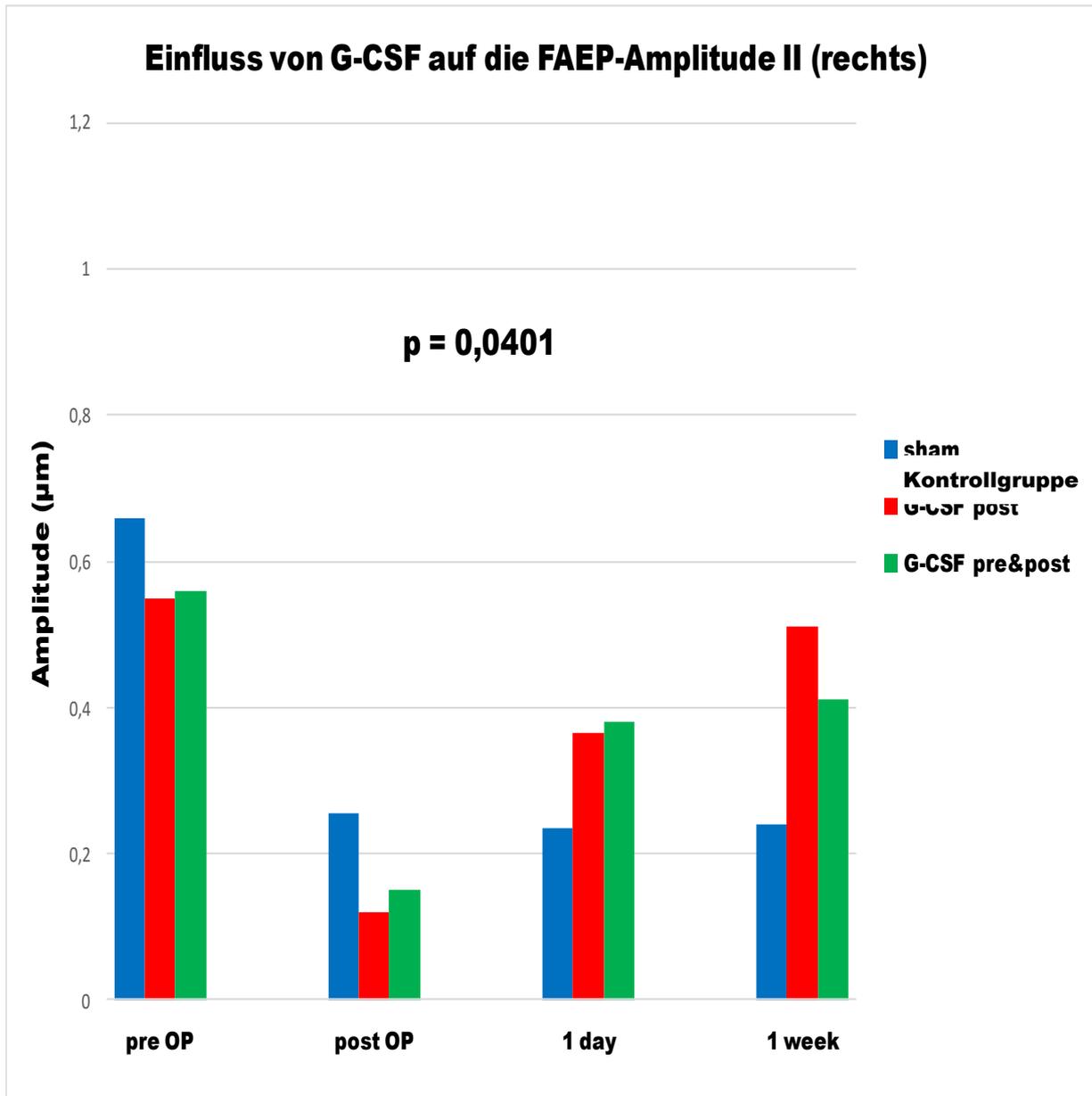


Abb. 4.3 Säulendiagramm: Einfluss von G-CSF auf die FAEP-Amplitude II der rechten Seite. Die Amplitudenwerte sind in der Einheit Mikrovolt angegeben. Die Messung erfolgte bei einem Schalldruckpegel von 40 dB. X-Achse mit den vier Messpunkten: präoperativ (pre OP), postoperativ (post OP), 1-Tages-Messung (1 day), 7-Tages-Messung (1 week).

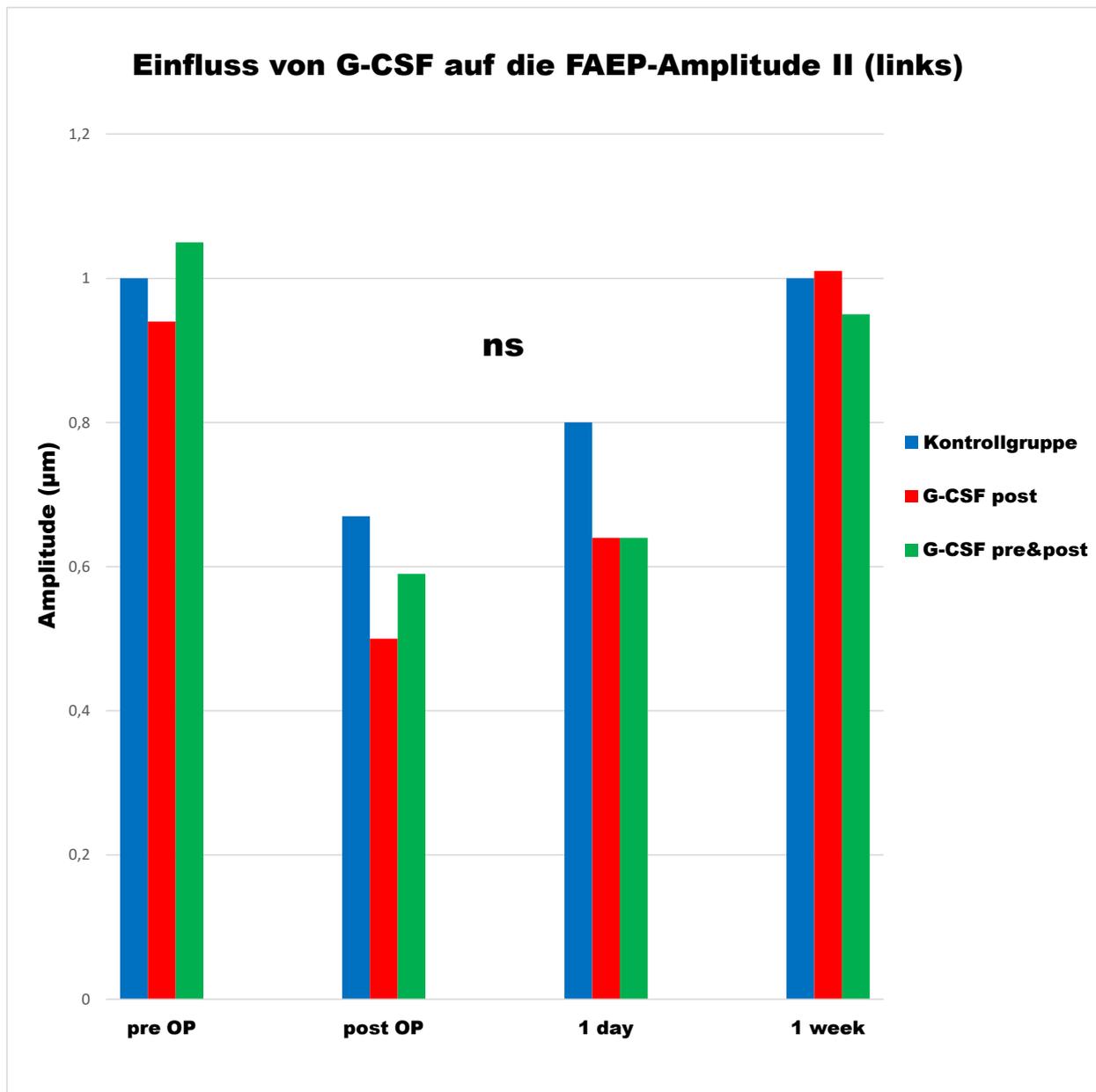


Abb. 4.4 Säulendiagramm: Einfluss von G-CSF auf die FAEP-Amplitude II der linken Seite. Amplitudenwerte in Mikrovolt. Schalldruckpegel: 40 dB. X-Achse mit den vier Messpunkten: präoperativ (pre OP), postoperativ (post OP), 1-Tages-Messung (1 day), 7-Tages-Messung (1 week).

4.2.1.2 Amplitude IV

Einen Überblick über die genauen Messwerte liefert Tabelle 4.2:

Rechte Seite:

Kontrollgruppe vs. G-CSF post; Amplitude IV (μV):

Messzeitpunkt	Kontrollgruppe (n = 6)	G-CSF post (n = 6)	Differenz
pre OP	0,63(SD:0,246)	0,9(SD:0,406)	0,27
post OP	0,42(SD:0,174)	0,47(SD:0,141)	0,05
1 day	0,34(SD:0,159)	0,58(SD:0,249)	0,24
1 week	0,45(SD:0,248)	0,74(SD:0,238)	0,29

Kontrollgruppe vs. G-CSF pre & post; Amplitude IV (μV):

Messzeitpunkt	Kontrollgruppe (n = 6)	G-CSF pre & post (n = 6)	Differenz
pre OP	0,63(SD:0,246)	0,69(SD:0,233)	0,06
post OP	0,42(SD:0,174)	0,3(SD:0,248)	-0,12
1 day	0,34(SD:0,159)	0,38(SD:0,082)	0,04
1 week	0,45(SD:0,248)	0,54(SD:0,221)	0,09

Linke Seite:

Kontrollgruppe vs. G-CSF post; Amplitude IV (μV):

Messzeitpunkt	Kontrollgruppe (n = 6)	G-CSF post (n = 6)	Differenz
pre OP	1,11(SD:0,205)	0,85(SD:0,184)	-0,26
post OP	0,69(SD:0,271)	0,58(SD:0,171)	-0,11
1 day	0,79(SD:0,184)	0,65(SD:0,294)	-0,14
1 week	0,98(SD:0,328)	1,08(SD:0,450)	0,1

Kontrollgruppe vs. G-CSF pre & post; Amplitude IV (μV):

Messzeitpunkt	Kontrollgruppe (n = 6)	G-CSF pre & post (n = 6)	Differenz
pre OP	1,11(SD:0,205)	1,08(SD:0,354)	-0,03
post OP	0,69(SD:0,271)	0,59(SD:0,382)	-0,1
1 day	0,79(SD:0,184)	0,58(SD:0,192)	-0,21
1 week	0,98(SD:0,328)	0,8(SD:0,296)	-0,18

Tabelle 4.2 Messwerte der FAEP-Amplitude IV: Amplitudenwerte in Mikrovolt. Teiltabelle 1 und 2: rechte Seite. Teiltabelle 3 und 4: Linke Seite. Anzahl der Tiere pro Gruppe: 6 (n = 6). Messzeitpunkte: präoperativ (pre OP), postoperativ (post OP), 1-Tages-Messung (1 day), 7-Tages-Messung (1 week). Pro Teiltabelle werden jeweils zwei Gruppen miteinander verglichen (vs.): Mittelwerte (und Standardabweichungen (SD)) der Messzeitpunkte und Differenz zwischen den Mittelwerten.

Die Auswertung der FAEP-Amplitude IV ergab auf der rechten Seite kein statistisch signifikantes Ergebnis. Es lässt sich jedoch, sowohl grafisch als auch rechnerisch, ein Trend zugunsten der G-CSF-Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe erkennen ($p = 0,2676$). Postoperativ fallen die Werte der FAEP-Amplitude IV in allen drei Gruppen ab.

Im weiteren Verlauf steigen die Werte der beiden G-CSF-Gruppen stetig an. Der Wert der Kontrollgruppe befindet sich einen Tag nach der Operation unter dem Wert der postoperativen Messung. Eine Woche nach der Operation haben die Werte der Kontrollgruppe die postoperativen Werte nur geringfügig überschritten.

Auf der linken Kontrollseite findet sich zwischen den verschiedenen Gruppen kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p = 0,9741$).

Nach der Operation fallen die Werte aller Gruppen ab. Die Werte der Kontrollgruppe und der G-CSF post-Gruppe steigen an den beiden darauffolgenden Messzeitpunkten stetig an. Bei der G-CSF pre & post-Gruppe findet sich einen Tag nach der Operation keine Verbesserung gegenüber dem postoperativen Messwert. Nach einer Woche lässt sich in allen drei Gruppen wieder eine deutliche Verbesserung der Werte gegenüber der postoperativen Messung erkennen.

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen den Einfluss von G-CSF auf die FAEP-Amplitude IV:

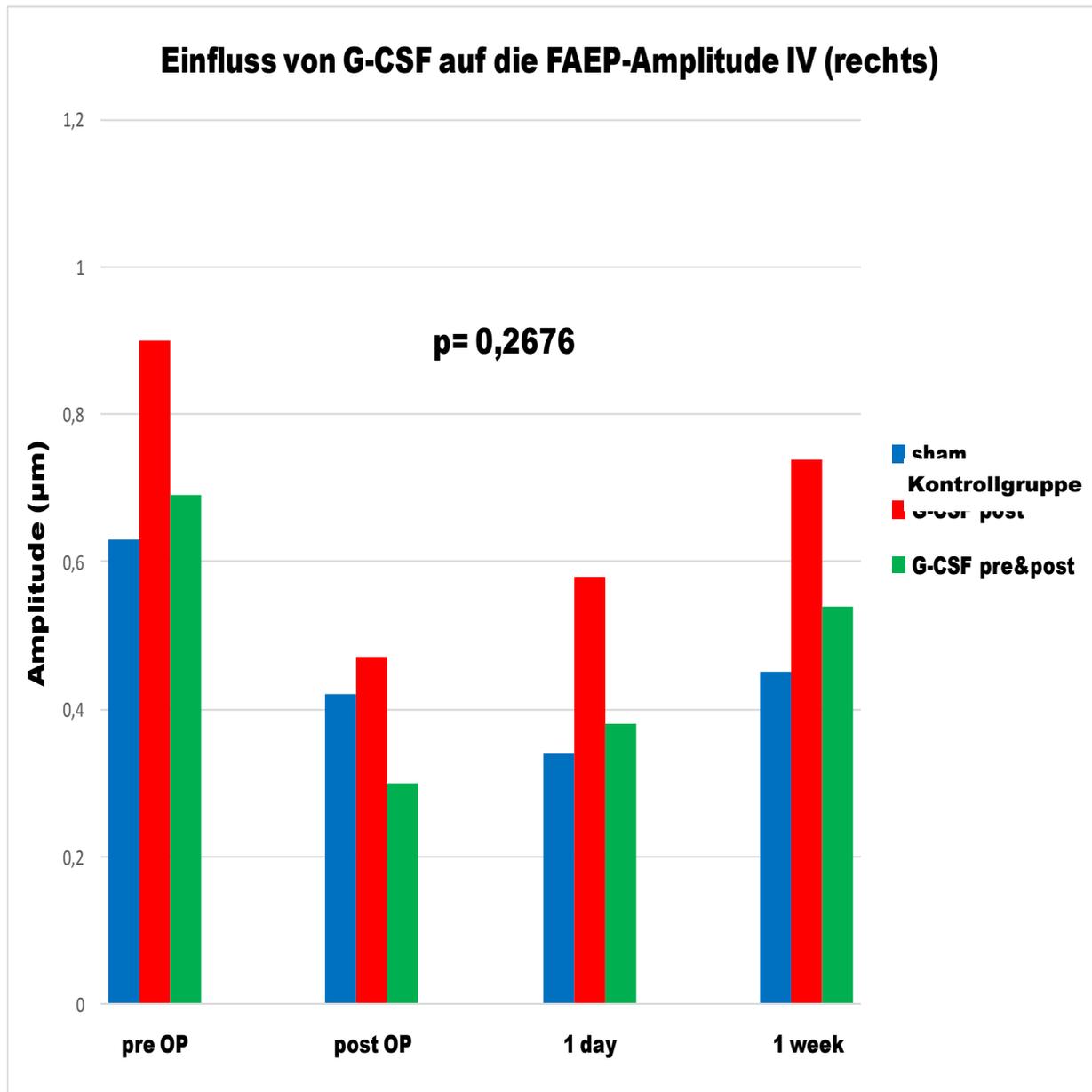


Abb. 4.5 Säulendiagramm: Einfluss von G-CSF auf die FAEP-Amplitude IV (A4) der rechten Seite. Die Amplitudenwerte sind in der Einheit Mikrovolt angegeben. Die Messung erfolgte bei einem Schalldruckpegel von 40 dB. X-Achse mit den vier Messpunkten: präoperativ (pre OP), postoperativ (post OP), 1-Tages-Messung (1 day), 7-Tages-Messung (1 week).

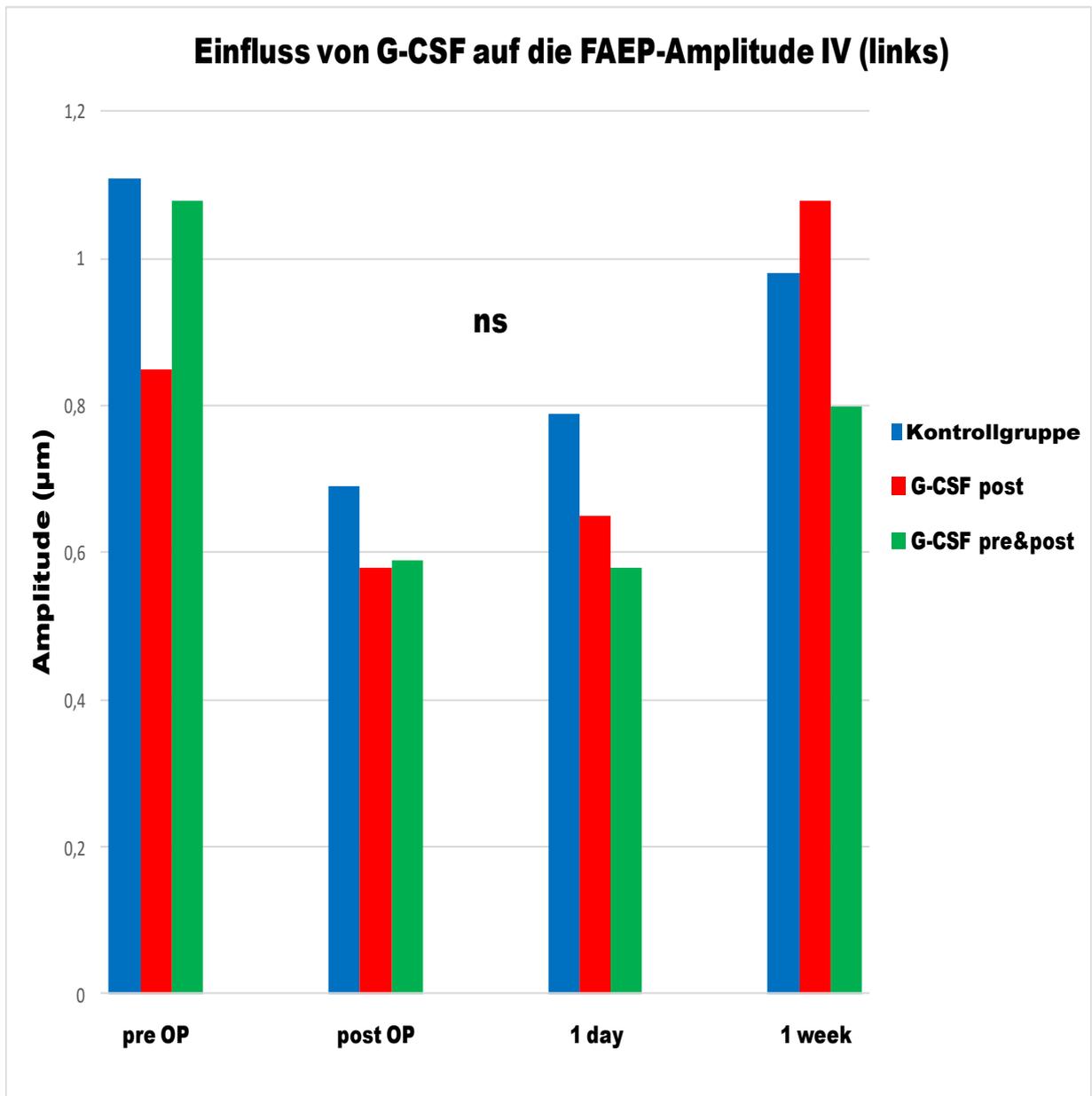


Abb. 4.6 Säulendiagramm: Einfluss von G-CSF auf die FAEP-Amplitude IV (A4) der linken Seite. Amplitudenwerte in Mikrovolt. Schalldruckpegel: 40 dB. X-Achse mit den vier Messpunkten: präoperativ (pre OP), postoperativ (post OP), 1-Tages-Messung (1 day), 7-Tages-Messung (1 week).

4.2.2 Einfluss von G-CSF auf die Latenzen

Sämtliche Daten bezüglich der Latenzen der FAEP lieferten keine statistisch signifikanten Ergebnisse ($p > 0,05$).

Auch grafisch ließ sich kein Trend zugunsten einer Gruppe erkennen. Postoperativ war eine Erhöhung der Latenzzeiten in den meisten Fällen zu erkennen. Bis zur nächsten Messung, einen Tag nach der Operation, normalisierten sich die Latenzzeiten jedoch wieder.

5. Diskussion

Die Wirkungen von G-CSF auf das zentrale und periphere Nervensystem sind vielfältig (vgl. Kapitel 2.4). Die antiapoptotischen Eigenschaften von G-CSF auf Nervenzellen sind hierbei besonders hervorzuheben. Diese beruhen auf der Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege^{14,30,54,61,62,87}, an deren Ende die Exprimierung antiapoptotischer Mediatoren^{7,26,30,54,73,87} und die Supprimierung proapoptotischer Mediatoren steht^{14,30,53,61,73,87}.

Diese schützenden Eigenschaften von G-CSF sorgen für ein besseres Outcome nach ischämischem Hirninsult^{21,60,61,73,87}.

Gegenstand dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob sich die vielversprechenden Forschungsergebnisse vorheriger Studien zur Wirkung von G-CSF auf Nervengewebe auch auf den N. cochlearis reproduzieren lassen.

In unserer Studie wird gezeigt, dass sich G-CSF positiv auf den N. cochlearis und dessen Kerngebiete nach partieller, kontrollierter Schädigung bei Ratten auswirkt.

Die Verabreichung von G-CSF liefert statistisch signifikante Ergebnisse, sowohl im Hinblick auf die Histologie, als auch im Hinblick auf die Elektrophysiologie.

Die Applikation von G-CSF führt zu einer höheren Anzahl an Nervenzellen innerhalb der Ncll. cochleares ($p = 0,0086$) und zum Erhalt einer größeren Kerngebietsfläche ($p = 0,0019$). Elektrophysiologisch zeigt sich durch die Verabreichung von G-CSF eine geringere Depression der FAEP-Welle II ($p = 0,040$).

Unsere Ergebnisse stimmen mit einer Vielzahl anderer wissenschaftlicher Arbeiten überein, in denen die Wirkung von G-CSF auf das Nervensystem untersucht wurde.

Die genauen intrazellulären Wirkmechanismen von G-CSF am N. cochlearis und dessen Kerngebieten werden in einer Folgestudie unserer Arbeitsgruppe untersucht.

Aufgrund der aktuellen Literatur ist anzunehmen, dass unter den zahlreichen Eigenschaften von G-CSF die antiapoptotische Wirkung den größten Einfluss auf den Erhalt von Nervenzellen und Nervengewebe hat.

Die Diskussion dieser Dissertation besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil (5.1) werden die verschiedenen Methoden dieser Studie besprochen und mit den Methoden anderer Studien mit ähnlicher Fragestellung verglichen. Das Ziel dieser Studie ist die Beantwortung der unter 2.5 gestellten Fragen. Der zweite Teil der Diskussion (5.2) widmet sich der Beantwortung dieser vier Fragestellungen und ordnet die Ergebnisse dieser Studie in den literarischen Kontext ein.

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 G-CSF und Applikation der Lösungen

Wachstumsfaktoren stellen im Allgemeinen gute Substanzen für die Behandlung neurologischer Krankheitsbilder dar⁵⁴. Innerhalb dieser Stoffgruppe eignet sich G-CSF aufgrund seiner gut bekannten pharmakokinetischen Eigenschaften besonders gut für Projekte mit neuroprotektiver Fragestellung⁵⁴. Weitere Eigenschaften, wie die gute Verträglichkeit bei nur geringen Nebenwirkungen^{9,27,61,72}, sowie seine Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren^{54,61}, machen G-CSF zum idealen Medikament für intrakranielle Fragestellungen.

G-CSF wurde den Ratten als subkutane Injektion verabreicht. Diese Art der Applikation von G-CSF ist der Standard in experimentellen Tiermodellen^{7,21,43,46,81,82,87}. Andere Möglichkeiten sind die intravenöse Applikation als Einzelinjektion⁷⁴ oder Infusion^{60,61} sowie die intraperitoneale Applikation⁵⁰. Weitere weniger verbreitete Applikationsformen sind die Verabreichung über eine subkutan implantierte Pumpe⁵³ oder über einen intrathekalen Katheter¹⁴. Der Vorteil der subkutanen Injektion gegenüber den anderen Applikationsformen ist neben der zuverlässigeren Anwendbarkeit der umfangreiche Erkenntnisstand über diese Applikation im Tiermodell. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden den Tieren insgesamt drei bzw. vier Injektionen G-CSF verabreicht^{7,43}. Die Dosis einer Einzelinjektion betrug in dieser Studie 30 µg G-CSF (Wirkstoff: Filgrastim) pro Kilogramm Körpergewicht. In der Literatur werden standardmäßig Dosen zwischen

10 µg und 60 µg in verschiedenen experimentellen Modellen an Ratten beschrieben^{14,43,60,61,87}. Jede Einzeldosis G-CSF wurde unmittelbar vor der Injektion mit NaCl auf 1 ml verdünnt²¹. So wurde sichergestellt, dass bei der nur geringen Menge an G-CSF pro Injektion keine Rückstände von G-CSF in der Kanüle zurückblieben. Auch die Gruppenvergleichbarkeit blieb so erhalten, da sowohl den G-CSF-Gruppen als auch der Kontrollgruppe jeweils 1 ml verabreicht wurde.

5.1.2 Kraniektomie und Nervenläsion

Um den Nerv bestmöglich darstellen zu können, wurde mit einem chirurgischen Mikro-Bohrer eine rechtsseitige suboccipitale Kraniektomie mit einem Durchmesser von 4 mm durchgeführt. Die Größe des Kraniektomieareals war entscheidend für den erfolgreichen Verlauf der weiteren Operation. Bei zu kleiner Trepanation konnte der Nerv nicht ausreichend gut dargestellt werden. Bei zu großer Trepanation bestand dagegen die Gefahr, den benachbarten Sinus transversus oder Sinus sigmoideus zu eröffnen. Eine occipitale Kraniektomie mit einem Durchmesser von 4 mm hat sich in der Literatur zur Darstellung des Hörnervs bei Ratten bewährt⁵⁸.

Die Nervenläsion erfolgte mit dem Wasserstrahldissektor. Diese Methode wurde bereits in tierexperimentellen Studien zur Schädigung peripherer Nerven^{36,70,84} und zur Schädigung des N. vestibulocochlearis eingesetzt⁸³. In dieser Studie wurde ein Wasserstrahldruck von 8 bar verwendet. Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Oberfläche des N. vestibulocochlearis bei einer Druckstärke von 6 bar nicht geschädigt wird. Bei einer Druckstärke von 10 bar wird der Nerv irreparabel geschädigt oder vollkommen durchtrennt. Eine Druckstärke von 8 bar ist für unsere Fragestellung optimal, da die Nervenoberfläche hierbei geschädigt, der Nerv aber nicht vollkommen durchtrennt wird⁸³. Aufgrund dieser "Teilläsion" ist es möglich, die Erholung des Nerven zu quantifizieren.

Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis unserer Studie. Nach der Schädigung des N. vestibulocochlearis durch den Wasserstrahldissektor, bei einer Druckstärke von 8 bar, konnten während jeder postoperativen AEP-Messung Potentialwellen ausgemacht werden. Spätestens einen Tag nach der Operation fanden sich wieder

deutlich erkennbare Potentialwellen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Nerv bei einer Wasserstrahlstärke von 8 bar in seiner Kontinuität erhalten blieb.

Eine komplette Durchtrennung des Nerven hätte zwangsläufig zu einem irreversiblen permanenten Hörverlust mit Ausfall der FAEP-Wellen II bis IV geführt⁵⁸. Dadurch wäre die Ermittlung einer Funktionsverbesserung über den vorgegebenen Zeitraum unmöglich gewesen. Dagegen hätte die Schädigung des Nerven durch einen zu geringen Wasserdruck die Nervenfunktion zu gering beeinträchtigt, um eine potentielle Verbesserung durch G-CSF aufzuspüren⁸³.

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Schädigung von Hirnnerven aufgeführt. Eine Möglichkeit ist die Unterbindung der versorgenden Gefäße, wodurch eine ischämische Schädigung der Nerven auftritt⁸². Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass der Nerv nicht direkt mechanisch geschädigt wird, sondern nur indirekt durch die Ischämie. In diesem Fall dürfte es schwierig sein, das Ausmaß der Schädigung zu steuern und eine optimale Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten. Eine gut steuerbare Methode zur Schädigung von Hirnnerven ist die direkte mechanische Kompression mittels Kompressionselektrode bei definiertem Druck^{64,65,66,67,68}. Diese Methode stellt eine Alternative zu der von uns verwendeten Methode dar, ist jedoch sowohl zeitlich als auch in der Umsetzung aufwendiger.

5.1.3 Messung und Auswertung der FAEP

Neben der Messung der FAEP gehören die Impedanzaudiometrie, otoakustische Emissionen und die Stapediusreflexmessung zu den objektiven Hörtests. Letztere sind gegenüber der FAEP-Messung einfacher und schneller durchzuführen, besitzen jedoch eine geringere Aussagekraft. So gibt das Tympanogramm nur Auskunft über eine Mittelohrfunktionsstörung, liefert aber keine genaue Aussage über das Ausmaß des Hörverlusts. Ebenso kann man durch die Messung des Stapediusreflexes kaum Rückschlüsse auf die Hörschwelle ziehen. Otoakustische Emissionen eignen sich zwar zur Untersuchung der Innenohrfunktion, erlauben aber keine Aussage über neurogene Hörschäden. Die Ableitung der FAEP ist zwar mit hohem Mess- und Zeitaufwand verbunden, macht aber eine Aussage über die Art und das Ausmaß von Schädigungen vom peripheren Hörorgan bis zum Mittelhirn möglich⁴⁰.

In dieser Studie wurden Klickreize zur akustischen Reizung verwendet. Das Frequenzspektrum der rechteckförmigen Klickreize ist breit und liegt zwischen 500 und 4000 Hz. Dadurch wird eine Vielzahl an Haarzellen gleichzeitig erregt. Eine genaue Aussage über die Frequenzabhängigkeit von Hörstörungen lässt sich dadurch jedoch nicht treffen⁴⁰. Im Gegensatz dazu sind "tone pips" und "tone bursts" Reize mit geringerem Frequenzspektrum. Sie sind geeignet, um frequenzabhängige Hörstörungen zu identifizieren. In diesem Projekt wird jedoch die Quantifizierung einer generalisierten neuralen Schallempfindungsstörung angestrebt, weshalb Klickreize hier besser geeignet sind. Eine Messung bestand insgesamt aus 1000 Klicks. Diese Anzahl reicht zur Generierung gut reproduzierbarer Wellen aus⁴⁴.

Die Form der FAEP-Wellen variiert bei Ratten stärker als beim Menschen und kann sich schon bei kleineren Abweichungen der Elektrodensteckplätze ändern⁵⁵. Deshalb wurde darauf geachtet, die Anordnung der vier Elektroden bei allen Tieren exakt beizubehalten. FAEP sind durch Vigilanz und Pharmaka kaum beeinflussbar^{44,45}. Im medikamenteninduzierten Schlaf finden sich keine Veränderungen von Latenzen oder Amplituden⁷⁵. Hohe Konzentrationen von Inhalationsnarkotika können die Amplituden der FAEP unter Umständen deprimieren⁶⁹. So verringert Halothan die Amplituden der FAEP, wohingegen die Latenzen kaum beeinflusst werden³⁵. Um bei allen Gruppen bestmögliche AEP-Wellen zu erhalten, wurde die Isoflurandosis möglichst gering gehalten und allen Tieren der gleiche Isoflurananteil im Narkosegasgemisch zugeführt.

Die Werte der Latenzen wurden vom Computer automatisch erfasst. Die Auswertung der Amplituden wurde manuell am Computer durchgeführt. Hierzu wurde die Methode "valley to peak" verwendet, d.h. die Strecke zwischen dem Anstieg der Potentialwelle (valley) und der höchsten Stelle der Potentialwelle (peak) ausgemessen^{44,58,68}.

5.1.4 Perfusion und histologische Auswertung

Die Perfusion der Tiere erfolgte 7 Tage nach der Operation^{46,82} standardmäßig transkardial mit Formaldehyd (4%)^{14,21,30,46,53,54,61,83}. Die Apoptose von Nervenzellen beginnt ca. 2 bis 3 Tage nach Schädigung⁴³ und hat ihren Gipfel nach einer Woche⁴¹.

Anschließend nimmt die Anzahl apoptotischer Zellen wieder ab. Der Zeitpunkt der Perfusion, eine Woche nach der Schädigung, fällt also mit dem Höhepunkt der apoptotischen Aktivität der Nervenzellen zusammen, wodurch die antiapoptotische Wirkung von G-CSF bestmöglich quantifiziert werden konnte.

Zur histologischen Auswertung wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. In der Literatur finden sich für Studien mit ähnlicher Fragestellung wie der Unseren standardmäßig Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke zwischen 1 µm und 10 µm^{7,26,43,46,53,54,60,61,83,87}. Die Schnitte wurden anschließend mit der Nissl-Färbung gefärbt. Diese Färbemethode ist in der Literatur zur Darstellung und Auswertung von Nervengewebe bzw. Nervenzellen weit verbreitet^{21,43,78,87}. Alternative Möglichkeiten um den antiapoptotischen Effekt von G-CSF nachzuweisen, stellen immunhistochemische Färbemethoden wie z.B. TUNEL^{7,26,54,87} oder Färbemethoden zum direkten Nachweis antiapoptotischer^{7,26,30,54,73,87} und proapoptotischer Proteine^{14,30,53,61,73,87} dar. Der Vorteil immunhistochemischer Methoden liegt darin, dass neben der quantitativen Aussage über die Anzahl der in Apoptose gegangenen Nervenzellen, auch eine qualitative Aussage darüber getroffen werden kann, auf welchen intrazellulären Signalwegen die Wirkung von G-CSF beruht. Für die Fragestellung dieses Projekts über einen allgemein positiven Effekt von G-CSF auf die Erholung des N. cochlearis bei Ratten, erscheint die Nissl-Färbung jedoch ausreichend.

Zur Auswertung der histologischen Schnitte wurde bei jedem Gehirn auf beiden Hemisphären der zentralste Schnitt der Ncll. cochleares identifiziert und ausgewertet. Tierney et al. verwenden in ihrer Studie eine ähnliche Methode und gehen ebenfalls von der Mitte des Kerngebiets aus^{78,79}. Neben dem mittigsten Schnitt des Kerngebiets wurde in unserer Studie der nächstgefärbte Schnitt ventral und dorsal der Mitte ausgewertet (jeweils 10 Schnitte (= 50 µm) von der Mitte entfernt). Insgesamt wurden also sechs Schnitte pro Gehirn ausgewertet, drei auf der linken Kontrollseite und drei auf der rechten, geschädigten Seite. Die histologische Auswertung umfasst bei Tierney et al. ebenfalls drei Schnitte pro Seite. Im Unterschied zu unserem Projekt wurden hier neben dem mittigsten Schnitt (50%) die Schnitte ausgewertet, die sich genau auf halber Strecke zwischen der Mitte und dem kranialen bzw. kaudalen Rand des Kerngebiets befanden (25% und 75%)^{78,79}. Da nach unserer Erfahrung die Größe der Ncll. cochlearis unter den Tieren variieren kann, wurden die morphologischen Unterschiede zwischen den Kerngebieten in

Richtung der Randbereiche immer größer. Dagegen waren die mittleren Bereiche der Kerngebiete über alle Tiere hinweg morphologisch sehr charakteristisch, sodass bei allen Tieren immer die gleichen Bereiche miteinander verglichen wurden. Aus diesem Grund entschieden wir uns gegen die von Tierney et al. verwendete Methode und werteten jeweils die drei mittigsten, gefärbten Schnitte aus, um eine validere Aussage treffen zu können.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Wirkt sich G-CSF positiv auf die Anzahl der Nervenzellen innerhalb der Ncll. cochleares bei Ratten aus?

G-CSF wirkt sich positiv auf die Anzahl der Nervenzellen innerhalb der Kerngebiete aus. Die zu dieser Fragestellung erhobenen Daten sind statistisch signifikant.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Studie beschreiben Matchett et al., bezüglich der Erhaltung von Nervenzellen, keine Verbesserung durch die Verabreichung von G-CSF⁴³. Andere tierexperimentelle Studien proklamieren einen deutlichen Vorteil bezüglich der Erhaltung von Nervenzellen durch G-CSF-Applikation^{30,46,53,54,60,61,87}.

Bezüglich des Einflusses von G-CSF auf die Anzahl der Nervenzellen lässt sich kein Vorteil durch eine zusätzliche präoperative Applikation von G-CSF gegenüber der reinen postoperativen Applikation erkennen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Nervenzellen erst nach zwei bis drei Tagen nach Schädigung in Apoptose gehen⁴³ und G-CSF eine Plasma-Halbwertszeit von lediglich 4 Stunden aufweist^{53,54}. Zum Zeitpunkt des Apoptosebeginns ist die G-CSF-Konzentration der präoperativen Injektion zu gering, um einen antiapoptotischen Effekt auszuüben.

Zwischen der G-CSF pre & post-Gruppe und der Kontrollgruppe besteht kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der Nervenzellen. Grafisch zeigt sich jedoch ein Trend zugunsten der G-CSF pre & post-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 4.1).

Zwischen den beiden G-CSF-Gruppen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied.

5.2.2 Wirkt sich G-CSF positiv auf den Erhalt der Kerngebietsfläche der NcII. cochleares bei Ratten aus?

G-CSF hat einen positiven Effekt auf die Größe der Kerngebietsfläche. Die zu dieser Fragestellung erhobenen Daten sind statistisch signifikant.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen anderer tierexperimenteller Studien, die ebenfalls eine Erhaltung von Nervengewebe durch G-CSF-Applikation beschreiben^{21,60,61,73,87}.

Es lässt sich auch hier kein Vorteil durch eine zusätzliche präoperative G-CSF-Applikation erkennen.

Beide G-CSF-Gruppen zeigen gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikante Ergebnisse.

Zwischen den beiden G-CSF-Gruppen besteht auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied.

5.2.3 Wirkt sich G-CSF positiv auf die Höhe der Amplituden der FAEP bei Ratten aus?

Sowohl bei der Amplitude II, als auch bei der Amplitude IV der Ratten erkennt man eine deutliche Verbesserung durch die Applikation von G-CSF.

Im Hinblick auf die Amplitude II besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den G-CSF-Gruppen und der Kontrollgruppe. Bezüglich Amplitude IV findet sich ein Trend zugunsten der beiden G-CSF-Gruppen, verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 4.5). Diese beiden Amplituden waren die einzigen, bei denen wir bessere Ergebnisse durch die Applikation von G-CSF erwartet haben. In Kapitel 2.3 wurde bereits erwähnt, dass die Amplituden II und IV der Ratte den Amplituden III und V des Menschen entsprechen. Aufgrund ihrer Regelmäßigkeit und Größe sind die Amplituden I, III und V des Menschen die einzigen Amplituden, die im klinischen

Alltag von Bedeutung sind. Die anderen Wellen (II, IV, VI und VII) treten zu unsicher auf und sind deshalb zur klinischen Diagnostik nicht geeignet⁴⁰. Diese Aussage stimmt mit unseren Beobachtungen bei Ratten überein.

Da die Welle I des Menschen das Summenaktionspotential des Nerven darstellt^{40,44,45,75} und dieses selbst bei kompletter Durchtrennung des Nerven erhalten bleibt⁵⁸, erwarteten wir auch für die Welle I der Ratten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

5.2.4 Wirkt sich G-CSF positiv auf die Latenzen der FAEP bei Ratten aus?

Bezüglich der Latenzen der FAEP fanden sich zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Zu erkennen war ein geringgradiger postoperativer Anstieg der meisten Latenzen, der sich jedoch bereits bis zur Messung einen Tag nach dem Eingriff nivellierte. Zu diesem Ergebnis kommen auch Sekiya et al., die nach Schädigung des N. vestibulocochlearis einen statistisch signifikanten Abfall der Amplitude der Welle IV bei Ratten beschreiben. Wie in unserer Studie nimmt hier die Latenz der Welle IV unmittelbar nach dem Eingriff leicht zu und ist bereits 11 min später wieder auf Höhe des Ausgangsniveaus. Ein statistisch signifikanter Abfall der Amplitude der Welle IV bleibt jedoch über die 11 min hinaus erhalten⁶⁸.

5.3 Ausblick

Diese Studie liefert die ersten Forschungsergebnisse bezüglich der Wirkung von G-CSF auf den N. cochlearis und seiner Kerngebiete. Sie ergänzt damit vorherige Studien, in denen die Wirkung von G-CSF auf andere periphere Nerven und das zentrale Nervensystem bereits erprobt wurde.

G-CSF ist ein Medikament mit guter Verträglichkeit und weitreichender klinischer Anwendung auf dem Gebiet der Blut- und Stammzellmobilisation. Im Mittelpunkt der heutigen Forschung steht jedoch immer mehr die Wirkung von G-CSF auf das Nervensystem.

Aufgrund der signifikanten Ergebnisse dieser Arbeit empfiehlt sich die Erprobung von G-CSF in weiteren experimentellen Studien zum Erhalt von Nervengewebe. Interessant wären Untersuchungen nach Schädigung des N. facialis oder anderer Hirnnerven. Hier könnten in einem ähnlichen Versuchsaufbau wie dem unseren die positiven Auswirkungen von G-CSF auf den postoperativen Erhalt der Hirnnervenfunktionen untersucht werden.

Darüber hinaus bietet das in dieser Studie gesammelte histologische Material zahlreiche Möglichkeiten, die Ursachen der neuroprotektiven Eigenschaften von G-CSF aufzudecken und die intrazellulären Wirkmechanismen von G-CSF genauer zu beleuchten.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die antiapoptotische Wirkung von G-CSF. Diese antiapoptotische Wirkung könnte in experimentellen Folgearbeiten durch immunhistochemische Färbungen, des in dieser Studie gesammelten histologischen Materials, genauer beleuchtet werden. Momentan wird in einem Projekt unserer Arbeitsgruppe ein direkter Nachweis apoptotischer Zellen mit Hilfe der TUNEL-Methode und der Nachweis der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 oder Bax untersucht. Die histologischen Schnitte unserer Studie bilden die Grundlage dieses immunhistochemischen Folgeprojekts.

Darüber hinaus käme auch eine klinische Studie in Betracht, um die Reproduzierbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse auf den Menschen zu untersuchen. Nach Eingriffen im Bereich des Kleinhirnbrückenwinkels, z.B. nach Akustikusneurinom-Operationen, könnte G-CSF einer postoperativen Hörminderung entgegenwirken und die Lebensqualität von Patienten nachhaltig verbessern.

6. Literaturverzeichnis

1. Achor LJ, Starr A (1980) Auditory brain stem responses in the cat. I. Intracranial and extracranial recordings. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 48:154-173
2. Achor LJ, Starr A (1980) Auditory brain stem responses in the cat. II. Effects of lesions. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 48:174-190
3. Acoustic Neuroma Association (2010) Patient Survey 2007-2008. Acoustic Neuroma Association (<http://anausa.org/index.php/patient-surveys/2007-2008-survey-results>)
4. Acoustic Neuroma Association (2013) Patient Survey 2012. Acoustic Neuroma Association (<http://anausa.org/index.php/patient-surveys/2012-survey-results>)
5. Arriaga MA, Chen DA, Fukushima T (1997) Individualizing hearing preservation in acoustic neuroma surgery. *Laryngoscope* 107:1043-1047
6. Arts HA, Telian SA, El-Kashlan H, Thompson BG (2006) Hearing preservation and facial nerve outcomes in vestibular schwannoma surgery: results using the middle cranial fossa approach. *Otology & Neurotology* 27:234-241
7. Baldo MP, Davel AP, Damas-Souza DM, Nicoletti-Carvalho JE, Bordin S, Carvalho HF, Rodrigues SL, Rossoni LV, Mill JG (2011) The antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor reduces infarct size and prevents heart failure development in rats. *Cellular Physiology and Biochemistry* 28:33-40
8. Benoudiba F, Toulgoat F, Sarrazin JL (2013) The vestibulocochlear nerve (VIII). *Diagnostic and Interventional Imaging* 94:1043-1050
9. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, Lilleby K, Longin K, Rowley S, Clarke E, Clift R, Hansen J, Shields T (1993) Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 81:3158-3163
10. Bodine DM, Seidel NE, Gale MS, Nienhuis AW, Orlic D (1994) Efficient retrovirus transduction of mouse pluripotent hematopoietic stem cells mobilized into the peripheral blood by treatment with granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor. *Blood* 84:1482-1491

11. Buchwald JS, Huang C (1975) Far-field acoustic response: origins in the cat. *Science* 189:382-384
12. Bush ML, Jones RO, Shinn JB (2008) Auditory brainstem response threshold differences in patients with vestibular schwannoma: a new diagnostic index. *Ear, Nose, & Throat Journal* 87:458-462
13. Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, Long GD, Negrin RS, Raimondi CM, Horning SJ, Brown SL, Miller L, Blume KG (1993) Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 81:2031-2035
14. Chen WF, Jean YH, Sung CS, Wu GJ, Huang SY, Ho JT, Su TM, Wen ZH (2008) Intrathecally injected granulocyte colony-stimulating factor produced neuroprotective effects in spinal cord ischemia via the mitogen-activated protein kinase and Akt pathways. *Neuroscience* 153:31-43
15. Dell'Aringa AH, Sena LF, Teixeira R, Dell'Aringa AR, Nardi JC (2008) The importance of the auditory evoked potential in acoustic neuromas. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 74:639
16. Demetri GD, Griffin JD (1991) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78:2791-2808
17. Diederich K, Sevimli S, Dörr H, Kösters E, Hoppen M, Lewejohann L, Klocke R, Minnerup J, Knecht S, Nikol S, Sachser N, Schneider A, Gorji A, Sommer C, Schäbitz WR (2009) The role of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in the healthy brain: a characterization of G-CSF-deficient mice. *Journal of Neuroscience* 29:11572–11581
18. Dong F, Lerner AC (2000) Activation of Akt kinase by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): evidence for the role of a tyrosine kinase activity distinct from the Janus kinases. *Blood* 95:1656-1662
19. Fortnum H, O'Neill C, Taylor R, Lenthall R, Nikolopoulos T, Lightfoot G, O'Donoghue G, Mason S, Baguley D, Jones H, Mulvaney C (2009) The role of magnetic resonance imaging in the identification of suspected acoustic neuroma: a systematic review of clinical and cost effectiveness and natural history. *Health Technology Assessment* 13:1-154
20. Ghanta RK, Tangella P, Koti K, Dandamudi S (2013) A rare case of an extra-axial cavernous angioma in the cerebellopontine angle. *Journal of Neurosciences in Rural Practice* 4:210-212

21. Gibson CL, Jones NC, Prior MJ, Bath PM, Murphy SP (2005) G-CSF suppresses edema formation and reduces interleukin-1beta expression after cerebral ischemia in mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64:763-769
22. Görgen I, Hartung T, Leist M, Niehörster M, Tiegs G, Uhlig S, Weitzel F, Wendel A (1992) Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Immunology* 149:918-924
23. Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, Houghton S, Layton JE, Boyd AW, McGrath KM, Maher D (1995) Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 86:4437-4445
24. Grundy BL, Jannetta PJ, Procopio PT, Lina A, Boston JR, Doyle E (1982) Intraoperative monitoring of brain-stem auditory evoked potentials. *Journal of Neurosurgery* 57:674-681
25. Hacke W (2010) *Neurologie*, 13. Aufl. Springer, Heidelberg
26. Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I (2005) G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nature medicine* 11:305-311
27. Hartung T (1998) Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Current opinion in hematology* 5:221-225
28. Hofmann E, Choné L (2011) [Imaging of acoustic neuroma (vestibular schwannoma). Breakthrough or dilemma?]. *HNO* 59:9-15
29. Höhmann D, Dornhoffer JL (1994) [Clinical presentation and diagnosis of small acoustic neurinomas]. *Laryngorhinootologie* 73:320-323
30. Huang HY, Lin SZ, Kuo JS, Chen WF, Wang MJ (2007) G-CSF protects dopaminergic neurons from 6-OHDA-induced toxicity via the ERK pathway. *Neurobiology of Aging* 28:1258-1269
31. Jackson CG, Glasscock ME 3rd, Hughes G, Sismanis A (1980) Facial paralysis of neoplastic origin: diagnosis and management. *Laryngoscope* 90:1581-1595

32. Jewett DL (1970) Volume-conducted potentials in response to auditory stimuli as detected by averaging in the cat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 28:609-618
33. Jewett DL, Romano MN, Williston JS (1970) Human auditory evoked potentials: possible brain stem components detected on the scalp. *Science* 167:1517-1518
34. Jewett DL, Williston JS (1971) Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans. *Brain* 94:681-696
35. Jewett DL, Romano MN (1972) Neonatal development of auditory system potentials averaged from the scalp of rat and cat. *Brain Research* 14:101-115
36. Kaduk WM, Stengel B, Pöhl A, Nizze H, Gundlach KK (1999) Hydro-jet cutting: a method for selective surgical dissection of nerve tissue. An experimental study on the sciatic nerve of rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 27:327-330
37. Keiner D, Pein H, Sommer C, Heimann A, Kempfski O, Oertel J (2013) G-CSF and its possible regenerative effect on traumatic nerve lesion. Abstractband 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Düsseldorf, 26.-29.05.2013. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; DocMO.15.12 (DOI: 10.3205/13dgnc137, URN: urn:nbn:de:0183-13dgnc1370)
38. Koors PD, Thacker LR, Coelho DH (2013) ABR in the diagnosis of vestibular schwannomas: a meta-analysis. *American Journal of Otolaryngology* 34:195-204
39. Lassaletta L, Roda JM, Frutos R, Patrón M, Gavilán J (2002) Facial nerve schwannoma of the cerebellopontine angle: a diagnostic challenge. *Skull Base* 12:203-207
40. Lehnhardt E, Laszig R (2009) *Praxis der Audiometrie*, 9 Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart
41. Li Y, Han F, Shi Y (2013) Increased neuronal apoptosis in medial prefrontal cortex is accompanied with changes of Bcl-2 and Bax in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Journal of Molecular Neuroscience* 51:127-137
42. Masuhr K, Neumann M (2007) *Duale Reihe Neurologie*, 6. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart

43. Matchett GA, Calinisan JB, Matchett GC, Martin RD, Zhang JH (2007) The effect of granulocyte-colony stimulating factor in global cerebral ischemia in rats. *Brain Research* 1136:200-207
44. Maurer K, Lang N, Eckert J (2005) *Praxis der evozierten Potentiale: SEP, AEP, MEP, VEP*, 2. Aufl. Steinkopff Verlag, Darmstadt
45. Maurer J (2008) [The role of brain stem evoked potentials in acoustic neuroma screening and diagnosis]. *Laryngorhinootologie* 87:585-596
46. Meuer K, Pitzer C, Teismann P, Krüger C, Göricke B, Laage R, Lingor P, Peters K, Schlachetzki JC, Kobayashi K, Dietz GP, Weber D, Feger B, Schäbitz WR, Bach A, Schulz JB, Bähr M, Schneider A, Weishaupt JH (2006) Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 97:675-686
47. Montibeller GR, Gaab MR, Oertel J (2012) What is the role of the endoscope during microsurgical removal of vestibular schwannomas? Abstractband 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Leipzig, 13.-16.06.2012. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; DocFR.12.04 (DOI: 10.3205/12dgnc269, URN: urn:nbn:de:0183-12dgnc2692)
48. Montibeller GR, Oertel J (2013) Endoskopisch assistierte Operationen der hinteren Schädelgrube. Abstractband "Hintere Schädelgrube und kraniozervikaler Übergang - innovative Techniken". 30-30.-21. Jahrestagung der Gesellschaft für Schädelbasischirurgie e. V. (GSB); OCT 11-12, 2013; Tübingen, GERMANY. (ISBN: 978-3-9816002-5-4)
49. Moriyama T, Fukushima T, Asaoka K, Roche PH, Barrs DM, McElveen JT Jr (2002) Hearing preservation in acoustic neuroma surgery: importance of adhesion between the cochlear nerve and the tumor. *Journal of Neurosurgery* 97:337-340
50. Naito T, Goto K, Morioka S, Matsuba Y, Akema T, Sugiura T, Ohira Y, Beppu M, Yoshioka T (2009) Administration of granulocyte colony-stimulating factor facilitates the regenerative process of injured mice skeletal muscle via the activation of Akt/GSK3 α signals. *European journal of applied physiology* 105:643-651
51. Nonaka Y, Fukushima T, Watanabe K, Friedman AH, Sampson JH, McElveen JT Jr, Cunningham CD 3rd, Zomorodi AR (2013) Contemporary surgical management of vestibular schwannomas: analysis of complications and lessons learned over the past decade. *Neurosurgery* 72:103-115

52. Patel J, Vasan R, van Loveren H, Downes K, Agazzi S (2013) The changing face of acoustic neuroma management in the USA: Analysis of the 1998 and 2008 patient surveys from the acoustic neuroma association. *British Journal of Neurosurgery*
53. Pitzer C, Krüger C, Plaas C, Kirsch F, Dittgen T, Müller R, Laage R, Kastner S, Suess S, Spoelgen R, Henriques A, Ehrenreich H, Schäbitz WR, Bach A, Schneider A (2008) Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131:3335-3347
54. Pitzer C, Klusmann S, Krüger C, Letellier E, Plaas C, Dittgen T, Kirsch F, Stieltjes B, Weber D, Laage R, Martin-Villalba A, Schneider A (2010) The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry* 113:930-942
55. Plantz RG, Williston JS, Jewett DL (1974) Spatio-temporal distribution of auditory-evoked far field potentials in rat and cat. *Brain Research* 15:55-71
56. Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov AO, Barker FG 2nd, Halpin C, Padera TP, Tyrrell A, Sorensen AG, Jain RK, di Tomaso E (2009) Hearing improvement after bevacizumab in patients with neurofibromatosis type 2. *New England Journal of Medicine* 361:358-367
57. Rizk A, Lepski G, Ebner FH, Eick AT, Horstmann GA, Tatagiba M (2012) Comparative long-term results of microsurgery and gamma knife for vestibular schwannomas. Abstractband 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Joint Meeting mit der Japanischen Gesellschaft für Neurochirurgie (JNS), Leipzig, 13.-16.06.2012. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; DocFR.12.11 (DOI: 10.3205/12dgnc276, URN: urn:nbn:de:0183-12dgnc2764)
58. Rosahl SK, Tatagiba M, Gharabaghi A, Matthies C, Samii M (2000) Acoustic evoked response following transection of the eighth nerve in the rat. *Acta Neurochirurgica (Wien)* 142:1037-1045
59. Sanna M, Khrais T, Russo A, Piccirillo E, Augurio A (2004) Hearing preservation surgery in vestibular schwannoma: the hidden truth. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 113:156-163
60. Schäbitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Schölzke MN, Sommer C, Schwab S (2003) Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke* 34:745-751

61. Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schäbitz WR (2005) The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 115: 2083–2098
62. Schneider A, Kuhn HG, Schäbitz WR (2005) A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle* 4:1753-1757
63. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2009) *Prometheus LernAtlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie*, 2. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart New York
64. Sekiya T, Hatayama T, Shimamura N, Suzuki S (2000) An in vivo quantifiable model of cochlear neuronal degeneration induced by central process injury. *Experimental Neurology* 161:490-502
65. Sekiya T, Shimamura N, Hatayama T, Suzuki S (2000) Effectiveness of preoperative administration of an N-methyl-D-aspartate antagonist to enhance cochlear neuron resistance to intraoperative traumatic stress: an experimental study. *Journal of Neurosurgery* 93:90-98
66. Sekiya T, Shimamura N, Suzuki S, Hatayama T (2001) Methylprednisolone ameliorates cochlear nerve degeneration following mechanical injury. *Hearing Research* 151:125-132
67. Sekiya T, Tanaka M, Shimamura N, Suzuki S (2001) Macrophage invasion into injured cochlear nerve and its modification by methylprednisolone. *Brain Research* 905:152-160
68. Sekiya T, Shimamura N, Yagihashi A, Suzuki S (2002) Axonal injury in auditory nerve observed in reversible latency changes of brainstem auditory evoked potentials (BAEP) during cerebellopontine angle manipulations in rats. *Hearing Research* 173:91-99
69. Shaw NA (1988) The auditory evoked potential in the rat--a review. *Progress in Neurobiology* 31:19-45
70. Shekarriz B, Upadhyay J, Jewett MA (2004) Nerve-sparing retroperitoneal lymphadenectomy using hydro-jet dissection: initial experience. *Journal of Endourology* 18:273-276

71. Sheridan WP, Morstyn G, Wolf M, Dodds A, Lusk J, Maher D, Layton JE, Green MD, Souza L, Fox RM (1989) Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *The Lancet* 2:891-895
72. Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, McGrath KM, Morstyn G, Fox RM (1992) Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *The Lancet* 339:640-644
73. Solaroglu I, Cahill J, Tsubokawa T, Beskonakli E, Zhang JH (2009) Granulocyte colony-stimulating factor protects the brain against experimental stroke via inhibition of apoptosis and inflammation. *Neurological Research* 31:167-172
74. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Ioculano M, Ammedolia L, Arlotta M, Saitta A, Caputi AP (1997) The effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor on vascular dysfunction and splanchnic ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology* 120:333-339
75. Stöhr M, Dichgans J, Diener HC, Buettner UW (1982) *Evozierte Potentiale: SEP, VEP, AEP*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
76. Swanson LW (1992) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Elsevier, Amsterdam London New York Tokyo
77. Szczesny G, Veihelmann A, Massberg S, Nolte D, Messmer K (2004) Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice-the haemodynamic effects. *Laboratory Animals* 38:64-69
78. Tierney TS, Moore DR (1997) Naturally occurring neuron death during postnatal development of the gerbil ventral cochlear nucleus begins at the onset of hearing. *Journal of Comparative Neurology* 387:421-429
79. Tierney TS, Russell FA, Moore DR (1997) Susceptibility of developing cochlear nucleus neurons to deafferentation-induced death abruptly ends just before the onset of hearing. *Journal of Comparative Neurology* 378:295-306
80. Tos M, Stangerup SE, Cayé-Thomasen P, Tos T, Thomsen J (2004) What is the real incidence of vestibular schwannoma? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130:216-220
81. Tsai KJ, Tsai YC, Shen CK (2007) G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease. *Journal of Experimental Medicine* 204:1273-1280

82. Tsai RK, Chang CH, Sheu MM, Huang ZL (2010) Anti-apoptotic effects of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on retinal ganglion cells after optic nerve crush are PI3K/AKT-dependent. *Experimental Eye Research* 90:537-545
83. Tschan C, Gaab MR, Krauss JK, Oertel J (2009) Waterjet dissection of the vestibulocochlear nerve: an experimental study. *Journal of Neurosurgery* 110:656-661
84. Tschan CA, Keiner D, Müller HD, Schwabe K, Gaab MR, Krauss JK, Sommer C, Oertel J (2010) Waterjet dissection of peripheral nerves: an experimental study of the sciatic nerve of rats. *Neurosurgery* 67:368-376
85. Wang AC, Chinn SB, Than KD, Arts HA, Telian SA, El-Kashlan HK, Thompson BG (2013) Durability of hearing preservation after microsurgical treatment of vestibular schwannoma using the middle cranial fossa approach. *Journal of Neurosurgery* 119:131-138
86. Wanibuchi M, Fukushima T, McElveen JT Jr, Friedman AH (2009) Hearing preservation in surgery for large vestibular schwannomas. *Journal of Neurosurgery* 111:845-854
87. Yata K, Matchett GA, Tsubokawa T, Tang J, Kanamaru K, Zhang JH (2007) Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Research* 1145:227-238
88. You YP, Zhang JX, Lu AL, Liu N (2013) Vestibular schwannoma surgical treatment. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19:289-293
89. Zhou LF, Mao Y, Zhang R (2007) Surgical treatment of dumbbell-shaped neurinomas: report of an experience with 57 cases in a single hospital. *Surgical Neurology* 68:594-602

Materialliste

Chirurgische Instrumente (Operation):

- Skalpell (BB73, Aesculap)
- Skalpellklingen (Nr.10, Martor)
- Präparierschere (Classic-Plus 36-5015, Codman)
- Mikro-Federschere (FD12, Codman)
- Mikro-Federschere (FD13, Codman)
- Chirurgische Pinzette (1x2 Zähne, Aesculap)
- Mikro-Pinzette (Malis "fein", Codman)
- Nadelhalter (Medica)
- Dura-Häkchen (FD376R, Aesculap)
- Mikro-Dissektor (FF303R, 4,5mm, Aesculap)
- Mikro-Dissektor (doppelendig, leicht gebogen, Medica)
- Schaber (681.11, Grieshaber)
- Wundspreizer (BV002R, Aesculap)
- Nagelschere (HF014R, Aesculap)

Chirurgische Instrumente (Perfusion):

- Chirurgische Schere (ES106, Everhards)
- Klemme (EK61, Everhards)
- Hohlmeisselzange (schmal, leicht gebogen, Medica)
- Infusionskanüle (B. Braun)

Technische Geräte:

- Mikroskop (Superlux 300, Zeiss)
- Wärmeplatte (TCAT-2LV, Phystemp Instruments Inc.)
- Chirurgischer Mikro-Bohrer (MicroTRON, Aesculap)
- Diamantbohrkopf GD128, 2,7mm
- Rosettenbohrkopf 2,3mm
- Wasserstrahldissektor (Erbejet 2, Erbe)
- Anaesthetic Vaporizer (Dräger-Vapor Isoflurane 19.3, Dräger)
- AEP-Messgerät (ND-System, Inomed)

- Bipolar (Bipolator, Fischer MET GmbH, Freiburg)
- Sauerstoffflasche (Air Liquide Medical GmbH, Düsseldorf)
- Rasierapparat (Elektra 2, Aeskulap)
- Waage (P-1200, Mettler)

Andere Materialien für Operation, Perfusion und Lösungs-Applikation:

- Einweg-Hautklammerer (35W Autosuture, Appose ULC)
- Chirurgischer Enthefter (US Patent No. 4026520)
- Handschuhe (Gammex PF)
- Nahtmaterial (Safil HR 26 oder HR 17, 4 x 3-0, 45cm, Polyglykolsäure, B/Braun)
- Saugtupfer (REF 31601, Kettenbach)
- Tabotamp (Johnson & Johnson Medical)
- Kompressen (Gazin Mullkompressen, Lohmann & Rauscher)
- NaCl-Lösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9%, B/Braun)
- Desinfektionsmittel (Softasept N, B/Braun)
- Einwegspritze (InjektR 5ml, B/Braun)
- Einweginsulinspritze (1ml, B/Braun)
- Kanülen (BD Microlance 3)
- Formalin (Roti-Histofix 4%, Roth)

Medikamente:

- Dexpanthenol (Bepanthen®, Bayer AG)
- Ketavet (10ml, 100mg/ml, Pfizer)
- Isofluran (HDG9623, 250ml, Baxter)
- Tramadol (Tramal®, 100mg, Grünenthal)
- Filgrastim (G-CSF, Neupogen®, Amgen)

Material und Geräte zur histologischen Auswertung:

- Eosin G-Lösung (0,5%, wässrig, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Hämalaulnösung nach Mayer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Xylol (Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes)
- Ethanol (Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes)
- Propanol (VWR, Prolabo)
- Kresylviolett-pulver (5235, Merck)

- Natriumacetatpulver (Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes)
- Roti-Histokitt 2 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Glasküvette
- Objektträgerkorb
- Objektträger (Menzel-Gläser)
- Pinsel
- Mikropinzette (46-555, AF Instrumente Germany)
- Rotationsmikrotom (CUT 4062, SLEE)
- Trockner (DRY-Line, VWR)
- Wasserbad (1052, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel)

Sonstiges:

- Glaszylinder (30cm Durchmesser, 10cm Wandhöhe)
- Trichter (20cm Durchmesser, Eigenbau)

Publikationen

- 08.11.2014 Die Auswirkung von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) auf den Nervus cochlearis nach partieller Schädigung. Eine experimentelle Studie an Ratten.
Montibeller G.R., Schackmann B., Oertel J.
Universitätsklinikum des Saarlandes, Neurochirurgie, Homburg-Saar, Germany
22. Jahrestagung der Gesellschaft für Schädelbasischirurgie e.V., Wien, Palais Auersperg
- 01.06.2015 The effect of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) on the cochlear nerve. An electrophysiological and immunohistochemical study on rats.
Guilherme R. Montibeller, Benjamin Schackmann, Julia Lessing, Stefanie Urbschat, Joachim Oertel (Homburg/Saar)
66th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery, DGNC
- Mai 2016 The effect of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) on the cochlear nuclei after partial nerve lesion. An experimental study on rats.
Guilherme Ramina Montibeller, Benjamin Schackmann, Steffi Urbschat, Joachim M. K. Oertel
Department of Neurosurgery, Saarland University Medical Center and Saarland University Faculty of Medicine, Homburg/Saar, Germany

Manuskript eingereicht, Journal of Neurosurgery

Danksagung

Mein großer Dank geht zunächst an meinen Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Oertel für die Überlassung dieser Promotion und die zahlreichen Verbesserungsvorschläge im Verlauf dieser Arbeit.

Ganz herzlich danke ich dem Betreuer meiner Promotion Herrn Dr. med. Guilherme Montibeller für die Begleitung meiner Doktorarbeit, die jahrelange freundschaftliche Zusammenarbeit und die unzähligen guten Ratschläge, ohne die diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Leiterin des Neurochirurgischen Forschungslabors Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat für die umfangreiche Unterstützung und Anregungen in allen Bereichen dieser Arbeit bedanken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Neurochirurgischen Forschungslabors, allen voran Frau Sigrid Welsch, Frau Svetlana Beletskaya, Frau Sonja Hoffmann und Frau Wilja Daub, danke ich für die Herstellung der histologischen Schnittpräparate sowie für diverse Tipps und Tricks rund um das Thema Histologie.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. med. Jacek Szczygielski für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bzw. für den Crashkurs in statistischer Analyse und bei Herrn Jörg Siefert für seine vielen Ratschläge rund um dieses Thema.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Y.-J. Kim für den guten Ratschlag bezüglich der Auswertung der histologischen Schnittpräparate.

Ein herzliches Dankeschön geht an Julia Lessing, Dr. med. Guilherme Montibeller, Beate Lessing, Dr. med. Peter Lessing, Ulrike Schackmann und Prof. Dr. med. Joachim Oertel für ihre Hilfe beim Gegenlesen der Arbeit.

Ich danke meiner Familie, die die Hoffnung all die Jahre nie ganz aufgab.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Freundin Julia Lessing bedanken, die mich in allen Phasen dieser Promotion begleitet hat. Ohne ihr Verständnis und ihre Unterstützung hätte diese Arbeit nicht das schöne Ende gefunden, auf das ich heute stolz sein kann.

Diese Arbeit widme ich dir.