

JULIA HÖRSTER

Genexpression von Adipozytokinen im
Zusammenhang zur Menge an epiduralem
Fettgewebe beim Cauda equina
Kompressions-Syndrom des Hundes



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Kleintiere-
Neurochirurgie, Neuroradiologie und Klinische Neurologie

Betreuer: Prof. Dr. Martin Schmidt

und dem

Institut für Veterinär-Physiologie und Biochemie

Betreuer: Prof. Dr. Christoph Rummel

**Genexpression von Adipozytokinen im Zusammenhang zur
Menge an epiduralem Fettgewebe beim Cauda equina
Kompressions-Syndrom des Hundes**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Julia Hörster

Tierärztin aus Hennigsdorf

Gießen 2020

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Christoph Rummel
Prof. Dr. Martin Schmidt
Prof. Dr. Christiane Herden

Tag der Disputation: 13.07.2020

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XII
1. Einleitung	1
2. Die Morphologie der <i>Cauda equina</i>	3
3. Die Lumbosakrale Stenose und das Cauda equina Kompressions-Syndrom	8
3.1. Symptome des Cauda equina Kompressions-Syndroms.....	10
3.2. Diagnostik	11
3.3. Die Therapie des Cauda equina Kompressions- Syndroms	16
4. Adipokine und inflammatorische Marker im Fettgewebe	18
4.1. Interleukin 6 (IL-6).....	20
4.2. Interleukin 10 (IL-10).....	21
4.3. Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α).....	22
4.4. Leptin	25
4.5. Substanz P	26
4.6. C-reaktives Protein (CRP)	27
4.7. Calcitonin gene-related polypeptide alpha (CGRP α)	28
4.8. High Mobility Group Box 1(HMGB1)	29

4.9. Ziel der Studie	31
5. Material und Methoden.....	32
5.1. Material.....	32
5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
5.2.1. Reverse Transkription-PCR.....	35
5.2.2. Real-time PCR.....	37
5.2.3. Durchführung der m-RNA- Quantifizierung.....	38
5.2.3.1. RNA-Extraktion	38
5.2.3.2. Quantifizierung der RNA-Menge.....	41
5.2.3.3. Reverse Transkription der RNA	42
5.2.3.4. Real-Time PCR.....	43
5.2.3.5. Auswertung.....	45
5.3. Magnetresonanztomographie	46
5.3.1. Messung der subkutanen Fettschicht im MRT	48
5.3.2. Messung der epiduralen Fettschicht im MRT.....	50
6. Ergebnisse	51
6.1. Messungen der Zytokinkonzentrationen von Fettgewebsüberständen mittels Zytokin-Bioassays	51
6.2. Bestimmung der Entzündungsmediatoren des epiduralen und subkutanen Fettgewebes mittels PCR.....	53
6.2.1. Relative Expression von IL-6 im epiduralen und subkutanen Fettgewebe.	54

6.2.2. Relative Expression von IL-10 im epiduralen und subkutanen Fettgewebe	55
6.2.3. Relative Expression von TNF α im epiduralen und subkutanen Fettgewebe	56
6.2.4. Relative Expression von Leptin im epiduralen und subkutanen Fettgewebe	57
6.2.5. Relative Expression von Substanz P im epiduralen und subkutanen Fettgewebe	58
6.2.6. Relative Expression von CRP im epiduralen und subkutanen Fettgewebe	59
6.2.7. Relative Expression von CGRP α im epiduralen und subkutanen Fettgewebe	60
6.2.8. Relative Expression von HMGB1 und seiner beiden Rezeptoren TLR4 und RAGE im epiduralen und subkutanen Fettgewebe	61
6.3. Messung der Fettmenge des subkutanen und epiduralen Fettgewebes anhand von MRT-Bildern von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden und einer gesunden Kontrollgruppe.....	63
6.3.1. Messung der subkutanen Fettschicht auf Höhe des lumbosakralen Übergangs	64
6.3.2. Messung der epiduralen Fettmenge auf Höhe des lumbosakralen Übergangs	65
6.4. Stichpunktartige Zusammenfassung der Ergebnisse.....	66
7. Diskussion.....	67
7.1. Konzentration von IL-6 und TNF α in Fettgewebsüberständen.....	68

7.2.	Relative Expression von Adipokinen und Entzündungsmediatoren vergleichend zwischen dem epiduralen und subkutanen Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden	69
7.3.	Auswertung der subkutanen Fettmessung.....	73
7.4.	Auswertung der epiduralen Fettmessung	74
7.5.	Kritische Betrachtung.....	75
8.	Zusammenfassung	79
9.	Summary	81
10.	Literaturverzeichnis	83
11.	Danksagung	102
12.	Erklärung	103

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	- Abbildung
cAMP	- cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	- „complementary deoxyribonucleic acid“
CGRP α	- „calcitonin gene-related polypeptide alpha“
CRP	- C-reaktives Protein
CT-Wert	- „cycle threshold“-Wert
DAMP	- „damage-associated molecular pattern“
DEPC-Wasser	- Diethyldicarbonat-Wasser
DNA	- „deoxyribonucleic acid“
dNTP	- „deoxyribonucleotide triphosphate“
DTT	- Dithiothreitol
HMGB1	- „High Mobility Group“ Box 1
IL-1	- Interleukin-1
IL-10	- Interleukin-10
IL-6	- Interleukin-6
JAK	- Januskinasen
Lig.	- <i>Ligamentum</i>
LPS	- Lipopolysaccharid
MAP-Kinasen	- „mitogen-activated protein-Kinasen“
mRNA	- „messenger ribonucleic acid“
MRT	- Magnetresonanztomographie
N.	- <i>Nervus</i>
NF- κ B	- nukleärer Faktor Kappa B

NK-1-R	- Neurokinin-1- Rezeptor
NK-Rezeptor	- Neurokinin-Rezeptoren
Nn.	- <i>Nervi</i>
NSAID	- “non-steroidal anti-inflammatory drug”
PAI-1	- Plasminogen-Aktivator Inhibitor Typ-1
PBS	- Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	- Polymerasekettenreaktion
qPCR	- “real-time” quantitative Polymerasekettenreaktion
RAGE-Rezeptor	- “receptor advanced glycation endproducts”
RNA	- “ribonucleic acid”
RTase	- Reverse Transkriptase
RT-PCR	- Reverse Transkriptase Polymerasekattenreaktion
SAA	- Serum-Amyloid-A
STAT	- “signal transducer and activator of transcription”
TACE	- “TNF α -converting-enzyme”
TH1-Lymphozyten	- T-Helfer1-Lymphozyten
TH2-Lymphozyten	- T-Helfer2-Lymphozyten
TLR4	- „toll-like receptor 4“
TNF α	- Tumornekrosefaktor α
ZNS	- Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1, Seite 5:

Schematische Darstellung der Anatomie des lumbosakralen Überganges eines Hundes mit Darstellung der *Cauda equina* Fasern im Sagittalschnitt (modifiziert nach SHARP und WHEELER 2005)

Abbildung 2, Seite 7:

Schematische Darstellung der *Cauda equina* eines Hundes (modifiziert nach NICKEL et al. 1999)

Abbildung 3, Seite 12:

Darstellung des lumbosakralen Überganges eines Hundes in einer laterolateralen Röntgenaufnahme (Bild: Klinik für Kleintiere).

Abbildung 4, Seite 13:

Laterolaterales Röntgenbild der hinteren Lendenwirbelsäule eines Hundes mit einer Osteochondrose der Endplatte von S1 (Bild: Klinik für Kleintiere).

Abbildung 5, Seite 14:

T2-gewichtetes, sagittales Schnittbild durch die hintere Lendenwirbelsäule und das Kreuzbein eines 8 Jahre alten Deutschen Schäferhundes (MRT Bilder: Klinik für Kleintiere)

Abbildung 6 Seite 14:

T2-gewichtetes, sagittales Schnittbild durch die hintere Lendenwirbelsäule und das Kreuzbein eines 8 Jahre alten Deutschen Schäferhundes (MRT Bilder: SCHMIDT und KRAMER 2015)

Abbildung 7 Seite 15:

T2-gewichteter Transversalschnitt des lumbosakralen Überganges eines Hundes mit Stenose des rechten Neuroforamens (Pfeil). (MRT Bilder: Klinik für Kleintiere)

Abbildung 8 Seite 15:

T1-gewichteter Transversalschnitt des lumbosakralen Überganges eines Hundes mit Stenose des rechten Neuroforamens (Pfeil). (MRT Bilder: Klinik für Kleintiere)

Abbildung 9 Seite 17:

Aufsicht auf den Übergang zwischen dem 7. Lendenwirbel und dem ersten Sakralwirbel nach Laminektomie.

Abbildung 10 Seite 19:

Darstellung der Wirkung von Adipozyten im Mausmodell (modifiziert nach ANTUNA-PUENTE et al. 2008)

Abbildung 11 Seite 24:

Schema des Signalwegs von TNF- α (modifiziert nach HIMMERICH et al. 2009)

Abbildung 12 Seite 34:

Das Prinzip der PCR (modifiziert nach MÜLHARDT 2009)

Abbildung 13 Seite 36:

Schematische Darstellung der RT-PCR (modifiziert nach MÜLLER et al. 2016)

Abbildung 14 Seite 49:

Messung der subkutanen Fettschicht auf Höhe des lumbosakralen Übergangs eines erkrankten Hundes im MRT-Bild, Saggittalausrichtung in T1-Wichtung

Abbildung 15 Seite 50:

Messung der Menge des epiduralen Fettes und der Cauda equina Fasern im MRT-Bild in T2-Wichtung im Transversalschnitt.

Abbildung 16 Seite 52:

Darstellung der Zytokinkonzentration in Fettgewebsüberständen der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde in Abhängigkeit von der Behandlung mit HMGB1 oder LPS

Abbildung 17 Seite 54:

Graphische Darstellung der Expression von IL-6 aus epiduralem und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden

Abbildung 18 Seite 55:

Graphische Darstellung der Expression von IL-10 aus epiduralem und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden

Abbildung 19 Seite 56:

Graphische Darstellung der Expression von TNF α aus epiduralem und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden

Abbildung 20 Seite 57:

Graphische Darstellung der Expression von Leptin aus epiduralem und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden

Abbildung 21 Seite 58:

PCR-Verlauf von Substanz P im epiduralen und subkutanen Fettgewebe der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde und der Kontrollgruppe

Abbildung 22 Seite 59:

Graphische Darstellung der Expression von CRP aus epiduralem und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden

Abbildung 23 Seite 60:

Graphische Darstellung der relativen Expression von CGRP α aus dem epiduralem und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden

Abbildung 24 Seite 61-62:

Graphische Darstellung der relativen Expression von HMGB1, RAGE und TLR4 aus dem epiduralem und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden

Abbildung 25 Seite 64:

Vergleich der relativen subkutanen Fettdicke von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden

Abbildung 26 Seite 65:

Graphische Darstellung des Anteils an epiduralem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden und einer gesunden Kontrollgruppe

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Seite 39-40:

Protokoll RNA-Extraktion

Tabelle 2 Seite 40:

Verwendete Materialien

Tabelle 3 Seite 40-41:

Verwendete Reagenzien

Tabelle 4 Seite 42-43:

Protokoll Reverse Transkription

Tabelle 5 Seite 44:

Protokoll Real-Time PCR

1. Einleitung

Bereits seit 1994 weiß man, dass das weiße Fettgewebe nicht allein eine energiespeichernde, isolierende und stoßdämpfende Funktion hat, sondern ebenfalls ein endokrines Organ darstellt, welches sogenannte Adipokine produziert. Diese Adipokine haben Einfluss auf die metabolischen Funktionen des Körpers und darüber hinaus auf das Immunsystem und das Entzündungsgeschehen (EIRMANN et al. 2009). Mittlerweile erfolgt eine genauere Einteilung dieser Faktoren. Dabei sind Adipokine die Mediatoren, die ausschließlich aus dem Fettgewebe ausgeschüttet werden. Adipozytokine stellen den Oberbegriff für Adipokine und Zytokine sowie Chemokine dar, welche unter anderem auch im Fettgewebe vorkommen (NEUMANN et al. 2016). Der Einfluss des Fettgewebes auf das Entzündungsgeschehen wurde in der Humanmedizin im Zusammenhang mit metabolischen und kardiologischen Erkrankungen untersucht (AWAD und BRADFORD 2009). So wurde bereits aufgezeigt, dass bei einem Menschen mit einem erhöhten Körperfettanteil eine chronische, systemische Entzündung im Körper vorliegt und er dadurch ein erhöhtes Risiko für bestimmte Erkrankungen aufweist (EIRMANN et al. 2009). Darüber hinaus konnte beim Menschen aufgezeigt werden, dass ein erhöhter Anteil an viszeralem Fettgewebe einen erhöhten Anteil an Entzündungsmediatoren wie IL-6, IL-8 und TNF α im gesamten Körper und in den Gelenken nach sich zieht. Diese werden in den Adipozyten und im sogenannten Stromvaskulären Teil des Fettgewebes (Endothelzellen, Immunzellen etc.) produziert und gelangen unter anderem bis in die Gelenke. Dort können sie zu einer lokalen Entzündung beitragen. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen der Größe und der Aktivität des infrapatellaren Fettkörpers und dem Vorliegen von Arthrose im Knie nachgewiesen werden, da dieser dem viszeralen Fettgewebe strukturell ähnelt und somit ebenfalls Adipokine produziert. Diese haben eine lokale Entzündungsreaktion zur Folge (NEES et al. 2018). Beim Tier gibt es hinsichtlich des Einflusses lokalen

Fettgewebes auf eine Entzündungsreaktion anliegenden Gewebes bisher kaum Untersuchungen. Unklar ist auch inwieweit die Menge an Fettzellen/ Fettgewebe die Menge an produzierten Adipokinen und damit eine schädigende Entzündungsreaktion beeinflusst. Adipozytokine umfassen Proteine in Form von Zytokinen und Chemokinen, welche unterschiedliche Effekte im Körper haben (RYAN et al. 2010). Zu den eigentlichen Adipokinen gehört beispielsweise das den Appetit und Energiehaushalt regulierende Hormon Leptin. Es ist eine praxisrelevante Fragestellung inwieweit die Prädisposition für eine Erkrankung und ebenfalls die Prognose eben dieser von der Menge des Fettgewebes beeinflusst wird. Zudem kann es eine Hilfestellung zur Einschätzung der Schmerzhaftigkeit darstellen, da in der Humanmedizin bereits aufgezeigt wurde, dass der radiologische Befund beispielsweise bei der Arthrose des Knies häufig nicht mit den Symptomen korreliert (NEES et al. 2018).

In der hier vorliegenden Arbeit soll ein möglicher Zusammenhang zwischen der Kompression der Nerven der *Cauda equina* durch eine degenerative Bandscheibenprotrusion und der Entzündungsreaktion im anliegenden epiduralen Fettgewebes untersucht werden, die gegebenenfalls einen Anteil an der Induktion von Schmerzen im Zusammenhang mit der Erkrankung haben. Zum anderen geht es auch um die Fragestellung, ob Hunde mit viel epiduralem Fettgewebe erhöhte Mengen von Entzündungsmediatoren im Fettgewebe aufweisen.

2. Die Morphologie der *Cauda equina*

Die Wirbelsäule des Hundes besteht aus aneinander gereihten Wirbeln, den einzelnen Hals-, Brust-, Lenden-, Sakral- und Schwanzwirbeln. Diese kurzen Knochen (*Ossa breva*) bestehen aus Spongiosa, die nur von einem dünnen Knochenmantel umhüllt sind. Die Wirbel setzen sich aus dem Körper (*Corpus vertebrae*), den Bogen (*Arcus vertebrae*) und den Fortsätzen (*Processus vertebrae*) zusammen. Benachbarte Wirbel sind lückenlos durch die Zwischenwirbelscheiben (*Disci intervertebrales*) verbunden, welche sich zwischen der *Extremitas cranialis* und der *Extremitas caudalis* des Wirbelkörpers befindet. *Dorsal* des Wirbelkörpers, begrenzt der Wirbelbogen das Wirbelloch (*Foramen vertebrale*). Die Wirbellöcher der einzelnen Wirbel bilden den Wirbelkanal (*Canalis vertebralis*) der Wirbelsäule. In ihm verläuft das Rückenmark des Hundes als Anteil des zentralen Nervensystems (DYCE et al. 1991). Der Wirbelbogen ist kranial und kaudal an seinem Ursprung aus dem Wirbelkörper ausgeschnitten, *Incisura vertebralis cranialis* und *caudalis*. Diese bilden zwischen zwei benachbarten Wirbeln das Zwischenwirbelloch (*Foramen intervertebralis*). Aus diesem treten die Rückenmarksnerven aus dem Wirbelkanal. An jedem Wirbel befinden sich verschiedene Fortsätze, diese dienen dem Ansatz von Muskeln und Bändern oder der gelenkigen Verbindung der Wirbel untereinander.

Die Lendenwirbelsäule setzt sich beim Hund in der Regel aus 7 Lendenwirbeln zusammen. Diese sind miteinander verzahnt, um unter anderem die Kraftübertragung der Hintergliedmaßen auf den vorderen Körper zu gewährleisten. Durch die sagittal gestellten Gelenkfortsätze (*Processus articularis*) wird die Seitwärtstbiegung der Lendenwirbelsäule verhindert. Die Verbindung dieser Gelenkfortsätze erfolgt als Schiebegelenke. Zwischen dem letzten Lendenwirbelbogen und dem ersten Kreuzbein besteht ein großes *Spatium interarcuale lumbosacrale*. Dieses bietet einen Zugang zum hinteren Teil des Rückenmarks, beispielsweise für Injektionen. Die Kreuzwirbelsäule besteht aus 3 Kreuzbeinwirbeln, welche im Alter von eineinhalb Jahren

miteinander knöchern verschmelzen und so das Kreuzbein (*Os sacrum*) bilden. Die Wirbelbögen des Kreuzbeins flachen sich dorsal ab und verengen so den Wirbelkanal. Dieser ist im kranialen Bereich am Übergang vom Lendenbereich deutlich verengt und verjüngt sich bis zum kaudalen Ende des Kreuzbeins nochmals um die Hälfte.

Die Verbindung der Wirbelkörper erfolgt über die Zwischenwirbelfugen (*Symphyses intervertebrales*). Diese setzen sich aus den *Disci intervertebrales* und den *Ligamenta longitudinalia dorsalis et ventralis* zusammen. Die Zwischenwirbelscheiben bestehen aus dem Gallertkern (*Nucleus pulposus*) und dem aus Faserknorpel bestehenden *Anulus fibrosus*. Der *Nucleus pulposus* dient als Stoßdämpfer der Wirbel bei Bewegung. Zusätzlich erfolgt die Verbindung der Wirbel durch verschiedene Bänder. Diese lassen sich in zwei große Gruppen unterteilen. Zum einen die kurzen Bänder, welche benachbarte Wirbel miteinander verbinden. Zum anderen die langen Bänder, welche sich über einen Teil oder über die gesamte Wirbelsäule erstrecken. Die Verbindung des letzten Lendenwirbels und des ersten Kreuzbeinwirbels, das *Articulatio lumbosacrale*, setzt sich aus der Zwischenwirbelscheibe, der Verbindung der Gelenkfortsätze (*Articulationes processuum articularium*) und dem *Ligamentum iliolumbale* zusammen (NICKEL et al. 1999).

Das Rückenmark beginnt am *Os Occipitale* und dem 1. Halswirbel und läuft an seinem sakralen Ende auf Höhe des fünften Lendenwirbels zum *Conus medullaris* aus. Aus der *Intumescencia lumbalis- und sacralis* gehen die Nervenfasern hervor deren Nerven als kompaktes Bündel von peripheren Nerven im Rückenmarkskanal weiterverlaufen (KÖNIG und LIEBCH 2012). Umgeben wird das Rückenmark zum einen von der weichen Rückenmarkshaut (*Leptomeninges spinalis*) und der harten Rückenmarkshaut (*Dura mater spinalis*). Innerhalb dieser Rückenmarkshüllen befindet sich das *Cavum leptomeningicum*, welches mit Zerebrospinalflüssigkeit gefüllt ist. Außerhalb dieses Duraschlauchs und begrenzt durch das Periost des Wirbelkanals befindet sich fettreiches Bindegewebe, welches mit *Venenplexi* durchsetzt ist. Unter anderem hat dieses epidurale Fettgewebe die Aufgabe das Rückenmark

im Wirbelkanal zu fixieren und gegen Druckeinwirkungen zu schützen. Im kaudalen Bereich des Rückenmarks verjüngt sich der Duraschlauch des Rückenmarks ebenso wie der *Conus medullaris*, welcher dann mit der *Leptomeninges* verschmilzt und als *Filum terminale durae matris* das kaudale Ende des Rückenmarks (*Filum terminale*) umhüllt.

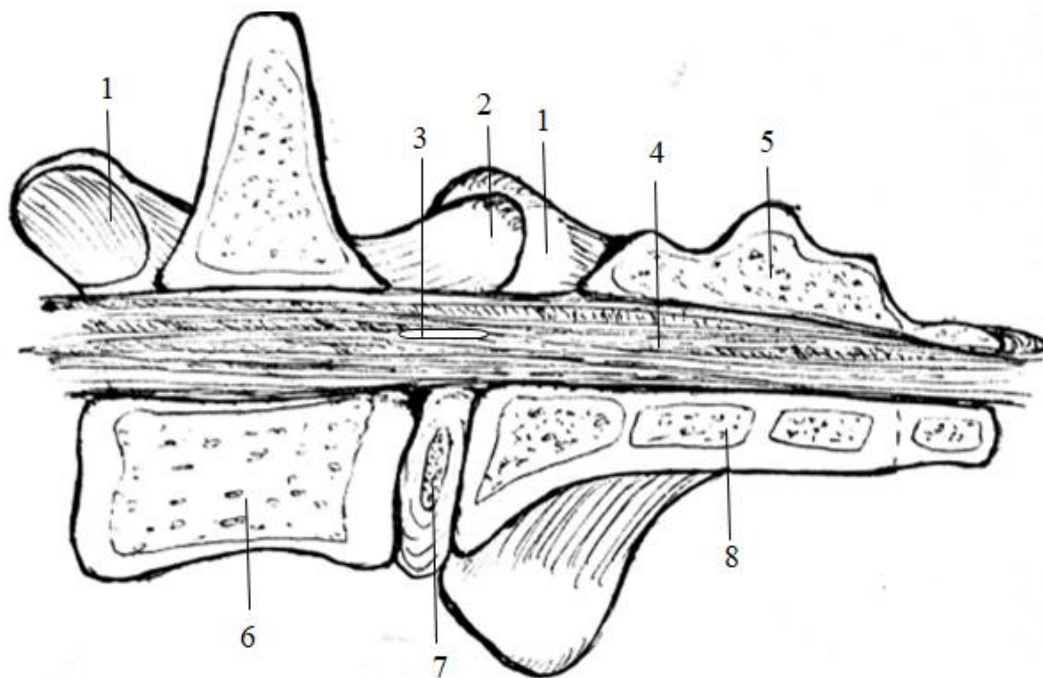


Abb. 1: Schematische Darstellung der Anatomie des lumbosakralen Überganges eines Hundes mit Darstellung der Cauda equina im Sagittalschnitt (modifiziert nach SHARP und WHEELER 2005).

1 *Processus articulares craniales* des L7 und S1; 2 *Processus articularis caudalis* des L7; 3 *Foramen intervertebrale*; 4 Fasern der *Cauda equina* im *Canalis sacralis*; 5 *Processus spinosi* des L7 und S1 – 3; 6 *Corpus vertebrae*; 7 *Discus intervertebralis* mit zentralgelegenen *Nucleus pulposus* 8 Fusionierte *Corpora vertebrae* des *Os sacrum*.

Aufgrund dieser Anordnung, die an einen Pferdeschweif erinnert, wird dieser Abschnitt als *Cauda equina* bezeichnet (NICKEL et al. 1999). Bei der *Cauda*

equina handelt es sich um den lumbalen, sakralen und kokzygealen Bereich des Rückenmarks, der als Spinalfaserwurzeln im Rückenmarkskanal verläuft (KÖNIG und LIEBICH 2012). Dieser Bereich beginnt im 5. Lendenwirbel und verläuft bis zum 3. Sakralsegment. Die Nervenfasern, welche aus den Nervenfasern entspringen, verlassen den Rückenmarkskanal jeweils durch die *Foramina intervertebralia* hinter dem jeweiligen Wirbel. Die sakralen und kokzygealen Nervenfasern verlaufen über das Lumbosakralgelenk (NELSON und GUILLERMO COUTO 2010). In diesem Bereich weist die Wirbelsäule ihre größte Beweglichkeit auf. Zusätzlich findet die Kraftübertragung der Hinterhand auf den Körperstamm statt (LANG et al. 2015). Die Nervenfasern, die in diesem Bereich aus der Wirbelsäule austreten, innervieren die Muskulatur der Hintergliedmaßen, sowie der Rute und die Sphinkter der Harnblase und des Rektums (STEFFEN 2017). Die Kreuzbeinnerven teilen sich innerhalb des Wirbelkanals in Dorsal- und Ventraläste auf. Der motorische Teil der Dorsaläste ist für die Innervation der dorsalen Schwanzmuskeln und als sensibler Anteil für die Haut der Kruppe, des Hüftgelenks und der seitlichen Oberschenkel verantwortlich. Sie entspringen dorsal hinter dem letzten Kreuzbeinwirbel und dem ersten Schwanzwirbel aus dem Wirbelkanal. Die Ventraläste verlassen den Wirbelkanal ventral an derselben Lokalisation und bilden mit dem Ventralast des letzten Lendennervs das Kreuzgeflecht. Aus diesem entspringen als rein motorische Nerven der *N. gluteus cranialis* und *caudalis*, als sensible Nerven der *N. cutaneus femoris caudalis* und der *N. pudendus*. Als gemischte Nerven entspringen die *Nn. rectales caudales*, der *N. ischiadicus*, der *N. fibularis communis* und der *N. tibialis*.

Die Schwanznerven treten zwischen dem ersten und zweiten Schwanzwirbel aus dem Wirbelkanal aus und teilen sich ebenfalls in einen dorsalen und ventralen Ast. Der *Plexus caudalis dorsalis* gibt motorische Äste an die dorsale Schwanzmuskulatur und sensible Äste an die dorsale Haut des Schwanzes ab. Die Äste des ventralen Plexus versorgen motorisch die Muskulatur und sensibel die Haut ventral am Schwanz (NICKEL et al. 19).

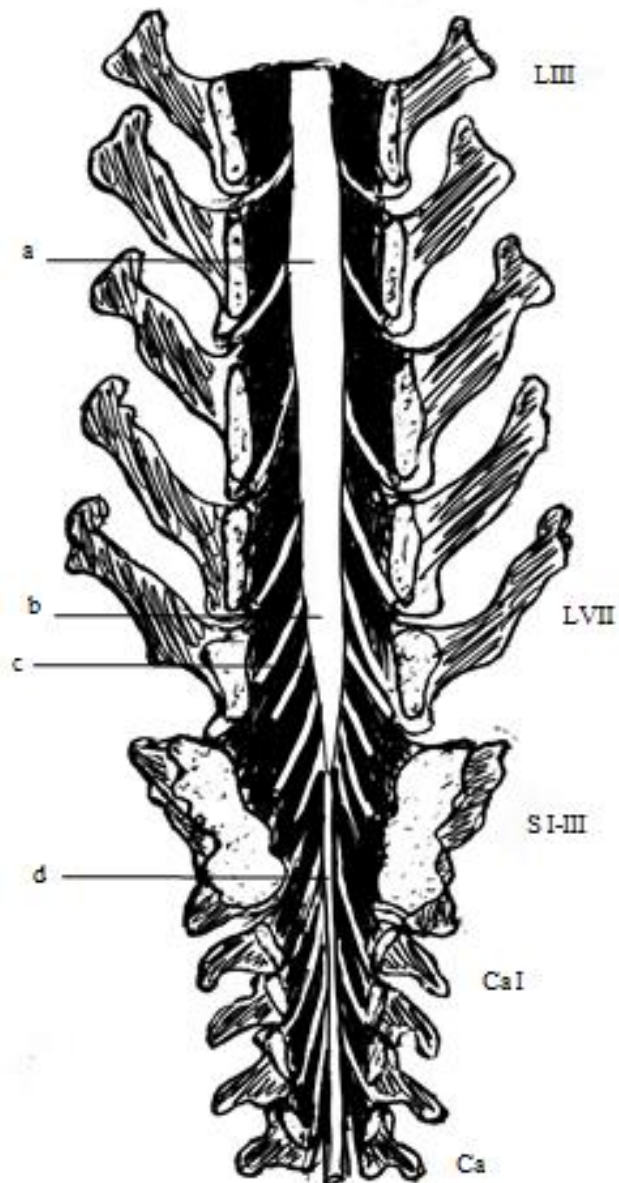


Abb. 2: Schematische Darstellung der Cauda equina eines Hundes. Dorsalansicht. a
Intumescencia lumbalis; b Conus medullaris; c Schwanznerv; d Filum terminale
durae matris;
LIII, LVII 3. und 7. Lendenwirbel; SI-III 1.-3. Kreuzwirbel; CaI, CaIV 1. und 4.
Schwanzwirbel
(modifiziert nach NICKEL et al. 1999)

3. Die Lumbosakrale Stenose und das Cauda equina Kompressions-Syndrom

Beim Cauda equina Kompressions-Syndrom handelt es sich um eine charakteristische Gruppe neurologischer Symptome, die durch die Kompression der *Cauda equina* hervorgerufen werden. Im Zentrum der Pathogenese steht nach dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnis eine vermehrte Beweglichkeit des lumbosakralen Übergangs, welche zu einer vermehrten Krafteinwirkung auf die Bandscheibe führt. Die strukturellen Elemente der Bandscheibe nehmen dabei Schaden, es kommt zu Rissen in den Kollagenfasern des *Anulus fibrosus*. Diese Mikroverletzungen werden repariert und unter vermehrtem Aufbau von Kollagen stabilisiert, was zu einer Umfangsvermehrung der Bandscheibe führt (BERGKNUT et al. 2011). Durch Risse und Zusammenhangstrennungen im *Anulus fibrosus* gelangen auch Notochordzellen aus dem *Nucleus* zwischen die Fasern des *Anulus*, welche hier extrazelluläre Matrix produzieren, die das Kollagenfasergestüt weiter auseinanderdrängen, was wiederum zur Schwächung der Kollagenfaserbündel führt. Die geschwächte Bandscheibe kann den strukturellen Zusammenhalt des lumbosakralen Übergangs nicht mehr in vollem Maß aufrechterhalten, was sich in einer Verschiebung des Kreuzbeins gegen den 7. Lendenwirbel äußert (Translationsbewegung).

Neben der rein degenerativen Veränderung wird auch ein genetischer Hintergrund der Bandscheibendegeneration vermutet (GYSLING 1984; HAGEN 1990), der ein frühzeitiges Absterben der Notochordzellen begünstigt, was das vermehrte Auftreten der Erkrankung bei einigen Rassen (Deutscher Schäferhund, Rottweiler, etc.) erklären könnte. Untersuchungen der Bandscheibe L7/S1 von jungen Deutschen Schäferhunden mittels Magnetresonanztomographie konnten zeigen, dass bei dieser Rasse eine Prädisposition zu einer frühdegenerativen Veränderung der lumbosakralen Bandscheibe vorliegt, was eine genetische Ursache nahelegt (AMORT 2010).

Allerdings wurden auch rein morphologische Eigenschaften der Wirbelsäule bei einigen Hunderassen identifiziert, die die Entwicklung einer degenerativen lumbosakralen Stenose rein mechanisch begünstigen. Spinale Segmentationsstörungen in Form von lumbosakralen Übergangswirbeln destabilisieren den Übergang von L7 zu S1 und tragen zur pathologischen Krafteinwirkung auf die Bandscheibe bei (LANG 1993; FLÜCKIGER et al. 2006). Intensive Untersuchungen der Konformation der kleinen Wirbelgelenke verschiedener Hunderasse ergaben, dass die Form beim Deutschen Schäferhund eine vermehrte Beweglichkeit im Übergang L7/S1 erlaubt (SEILER et al. 2002). Auch sind die großen Hunderassen prädisponiert für die Ausbildung einer sakralen Osteochondrose (LANG et al. 1992; LANG 1993). Die Osteochondrose der Sakrumendplatte im Sinne einer Störung der enchondralen Ossifikation führt in der Regel nicht direkt durch ein Knorpelfragment zur Kompression der Cauda-Fasern, sondern zu einer abnormen mechanischen Belastung und Degeneration der Bandscheibe. Alle beschriebenen Mechanismen führen zu einer schrittweisen Umfangsvermehrung der Bandscheibe und dadurch indirekt oder direkt zu einer Verengung des Übergangs zum Sakrum, einer so genannten degenerativen lumbosakralen Stenose. Dieser Begriff wird oft fälschlicherweise mit dem Begriff des Cauda equina Kompressions-Syndroms gleichgesetzt, was allerdings keinesfalls zulässig ist. Unabhängig von der Ätiologie der Erkrankung können Hunde mit degenerativer lumbosakraler Stenose eine klinisch manifeste neurologische Symptomatik entwickeln, die eine Funktionseinschränkung der Cauda-Fasern reflektiert (DE RISIO et al. 2000). Allerdings können Hunde mit einer hochgradigen Stenose auch kaum klinische Symptome zeigen.

Eine Form des Cauda equina Kompression-Syndroms, zu dem seit einigen Jahren vermehrt Untersuchungen durchgeführt werden, ist die ausschließliche Kompression der Hauptwurzel des *Nervus ischiadicus* in den *Neuroforamina* L7/S1. Durch die beschriebene Translationsbewegung können sich die *Neuroforamina* verengen und die Nervenwurzeln so intermittierend komprimiert werden. Nach chronischer Kompression kommt es zu einer endoneuralen

Fibrose, die wiederum eine endoneurale Druckzunahme bedingt, der eine entscheidende Rolle innerhalb der Pathogenese der Schmerzsymptomatik zugesprochen wird, da sie die Kompression von innen heraus verstärkt und letztendlich auch ohne Translationsbewegung und Verengung der Neuroforamina Schmerzen hervorrufen kann (FOITZIK 2016).

3.1. Symptome des Cauda equina Kompressions-Syndroms

Die Symptome des Syndroms werden durch die Kompression der Nervenfasern bzw. der Nervenfasernwurzeln bestimmt. Das wichtigste und heute oftmals einzige Symptom sind Schmerzen im hinteren Körperabschnitt, die bei Vorstreckung oft nicht offensichtlich sind. Die Besitzer berichten von einer Verweigerung von bestimmten Bewegungen, vor allem auf das Sofa oder ins Auto zu springen. Hunde mit Ausbildung verweigern den Sprung über Hürden. Der Zusammenhang zwischen diesen Berichten und einer Schmerzsymptomatik besteht vermutlich in einer Verstärkung der Protrusion der Bandscheibe nach dorsal bei Streckung des hinteren Wirbelsäulenabschnitts beim Sprung. Denkbar ist in diesem Zusammenhang auch eine Verengung der *Neuroforamina* mit Kompression der Nervenwurzeln. Tiere mit solchen strukturellen Veränderungen werden aber eher mit einer unilateralen oder bilateralen Lahmheit vorgestellt, die positionsunabhängig ist (SUWANKONG et al. 2008)

Bei langanhaltender hochgradiger Druckausübung kann es zu Funktionsausfällen der Nerven der *Cauda equina* kommen. Die Symptome entwickeln sich meist schleichend über mehrere Monate. Für die Besitzer ist zunächst die verminderte Schwanzbewegung auffällig. Der Schwanz wird nicht mehr hochgetragen und verliert in der hängenden Position die S-Form. Es kommt zunehmend zu einer Schwäche bis hin zu Gangstörungen im Bereich der Hinterhand, bis in extremen Fällen zu einer Beeinträchtigung des Anal- und

Blasensphinkters und entsprechend zu Harn- und Kotinkontinenz (STOCK et al. 2009). Oft zeigen betroffene Hunde eine Atrophie der Hinterhandmuskulatur. Im Rahmen einer klinischen Untersuchung kann bei Druck auf den lumbosakralen Übergang oder einer provozierten Hyperextension des Sakrums Schmerzen hervorgerufen werden. Ein weiteres Merkmal ist die Gewichtsverlagerung betroffener Hunde auf eine Körperhälfte im Stand. Teilweise fallen betroffene Tiere mit einem schleppenden Gangbild mit schleifen der Hintergliedmaßen und abgewetzten Krallen auf (STEFFEN 2017; LANG et al. 2015). Eine verminderte Aktivität des Flexorreflexes mit einer Pseudohyperreflexie kann vorliegen.

3.2. Diagnostik

Die Diagnose eines Cauda equina Kompressions-Syndroms besteht in der Kombination der passenden klinischen Befunde mit den Befunden einer degenerativen lumbosakralen Stenose. In der Röntgenaufnahme wird der lumbosakrale Übergang in laterolateralem und ventrodorsalem Strahlengang hinsichtlich Stenosen, knöchernen Zubildungen, Veränderungen oder einer Stufenbildung beurteilt (STOCK et al. 2009). Da das Röntgen meist nicht ausreichend ist, wird eine Myelographie durchgeführt (STEFFEN et al. 2008). Dazu wird Kontrastmittel in den Subarachnoidalraum injiziert und anschließend Röntgenaufnahmen angefertigt, in denen sich die Protrusion der Bandscheibe als Aufhellungsbezirk gegen das röntgendichte Kontrastmittel darstellt. Oftmals reicht der Duraschlauch nicht bis zum Übergang L7/S1, weshalb eine Myelographie nicht den gewünschten Befund einer Kompression darstellen kann. Am sichersten ist daher die Darstellung mittels Schnittbildverfahren wie Magnetresonanztomographie oder Computertomographie. Da diese auch die Nervenabgänge deutlich darstellen und eine Einengung im Bereich der Neuroforamina aufzeigt. Zudem lassen sich Veränderungen in den Weichteilstrukturen wie dem Bandapparat und der Bandscheibe hervorragend darstellen (LANG et al 2015). Jedoch ist anzumerken, dass vor allem bei

älteren Hunden die Befunde der Bildgebung nicht immer mit den klinischen Symptomen korrelieren (JONES und INZANA 2000). So konnte in der Studie von BARTHEZ et al. 1994 teilweise eine Kompression der *Cauda equina* in der bildgebenden Diagnostik identifiziert werden ohne, dass die Hunde Symptome des Cauda equina Kompressions-Syndroms aufwiesen. Es besteht demnach nicht immer ein direkter Zusammenhang zwischen den klinischen neurologischen Symptomen eines Tieres und den Befunden der bildgebenden Diagnostik (MORGAN et al. 1993; SCHARF et al. 2003).



Abb. 3: Darstellung des lumbosakralen Überganges eines Hundes in einer laterolateralen Röntgenaufnahme. Die Aufnahme zeigt einen verengten Zwischenwirbelspalt, mit Sklerose der Endplatten (Pfeil), einer Stufenbildung und der Absenkung des Kreuzbeindaches. Zusätzlich besteht ein lumbosakraler Übergangswirbel (Bild: Klinik für Kleintiere).



Abb. 4: Laterolaterales Röntgenbild der hinteren Lendenwirbelsäule eines Hundes mit einer Osteochondrose der Endplatte von S1. Anzeichen für eine Bandscheibendegeneration bestehen nicht (Bild: Klinik für Kleintiere).

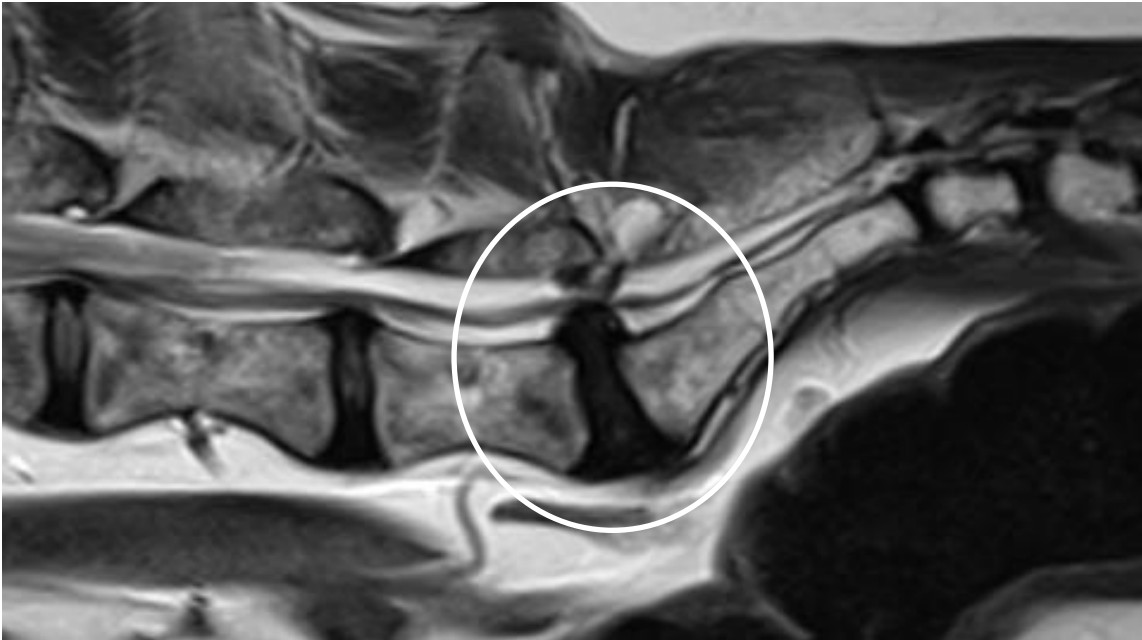


Abb. 5: T2-gewichtetes, sagittales Schnittbild durch die hintere Lendenwirbelsäule und das Kreuzbein eines 8 Jahre alten Deutschen Schäferhundes. Es zeigt sich eine hochgradige degenerative lumbosakrale Stenose mit hochgradiger Kompression der *Cauda equina*-Fasern durch die Protrusion der Bandscheibe und Hypertrophie des *Lig. flavum* (MRT Bilder: Klinik für Kleintiere).

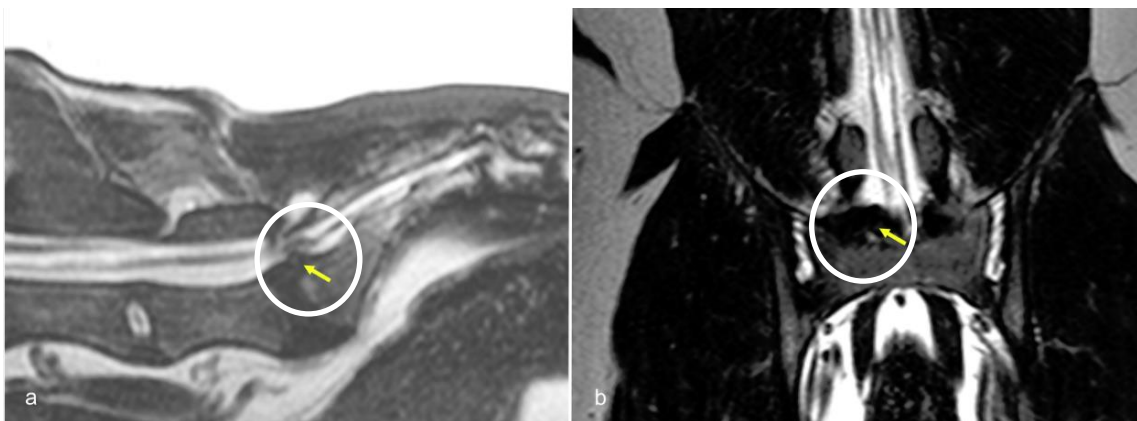


Abb. 6: T2-gewichtetes, sagittales Schnittbild durch die hintere Lendenwirbelsäule und das Kreuzbein eines 8 Jahre alten Deutschen Schäferhundes. Im Kreis hervorgehoben ist die hochgradige degenerative lumbosakrale Stenose mit hochgradiger Kompression der *Cauda equina*-Fasern (MRT Bilder: SCHMIDT und KRAMER 2015).



Abb. 7: T2-gewichteter Transversalschnitt des lumbosakralen Überganges eines Hundes mit Stenose des rechten Neuroforamens (Pfeil) (MRT Bilder: Klinik für Kleintiere)



Abb. 8: T1-gewichteter Transversalschnitt des lumbosakralen Überganges eines Hundes mit Stenose des rechten Neuroforamens (Pfeil). (MRT Bilder: Klinik für Kleintiere)

3.3. Die Therapie des Cauda equina Kompressions-Syndroms

Bei der Therapie kann lediglich eine Minderung der Symptome aber keine Heilung erzielt werden. Sollten die Symptome nicht so weit fortgeschritten sein, kann ein konservativer Ansatz mit Ruhighaltung und Schmerzmedikation versucht werden. In erster Linie kommen nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) zum Einsatz, die bei älteren Hunden ggf. als Dauertherapie verabreicht werden können. Auch Kortikosteroide werden empfohlen, deren längere Verwendung aber durch die Nebenwirkungen eingeschränkt wird. Eine Alternative bietet die lokale Infiltration der Nervenwurzeln mit einem kristallinen Langzeitkortison, das über eine epidurale Injektion direkt an die betroffenen Nervenwurzeln appliziert wird. Vor allem Schmerzen, die durch Einengung der *Neuroforamina* hervorgerufen werden, lassen sich damit gut behandeln (SUWANKONG et al. 2008).

Für die Behandlung chronischer Schmerzen können spezifische Medikamente eingesetzt werden, die speziell gegen Nervenschmerzen gerichtet sind. Gabapentinoide haben sich zur Behandlung neuropathischer Schmerzen durch chronische Irritation der Nervenwurzeln bewährt, können aber nur zusammen mit NSAIDs eine ausreichende Schmerzausschaltung erzielen, wodurch aber die Dosis der NSAIDs reduziert werden kann (MOORE 2016; LEISENGANG et al. 2020).

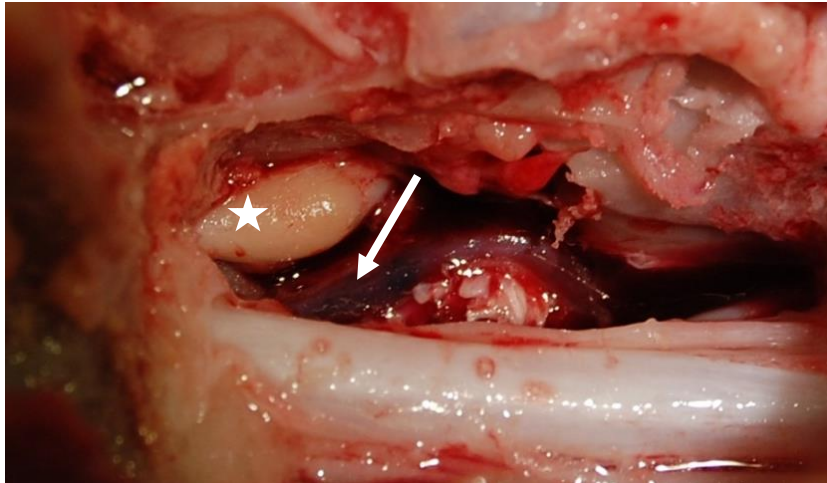


Abb. 9: Aufsicht auf den Übergang zwischen dem 7. Lendenwirbel und dem ersten Sakralwirbel nach Laminektomie. Zwischen dem Ganglion L7 (Stern) und dem Duraschlauch ist der resizierte Anulus der Bandscheibe (Pfeil) ersichtlich. Das epidurale Fett wurde entfernt.

Sollte die medikamentelle Behandlung nicht ausreichen, gibt es chirurgische Therapieoptionen. Die Wahl der Operation hängt zum einen von der auslösenden Ursache und zum anderen von dem Alter und der Nutzung des Hundes ab. Die Laminektomie wird häufig zur Behandlung eingesetzt und verschafft vor allem bei einem Bandscheibenvorfall mit Komprimierung des Rückenmarks im Wirbelkanal Besserung. Dabei wird das Wirbeldach des letzten Lendenwirbels und des Kreuzbeins eröffnet um eine Entlastung des betroffenen Bereichs zu schaffen. Eine weitere Möglichkeit ist die seitliche Eröffnung der Wirbelsäule im Bereich der Nervenwurzellöcher. Diese Methode wird vor allem angewendet, wenn die Austrittsstellen der Nerven komprimiert werden. Sollten diese Varianten nicht ausreichen, kann zunächst eine Kombination beider Varianten erfolgen. Als letzte Alternative ist eine Versteifung des lumbosakralen Übergangs beispielsweise mit Platten möglich (STEFFEN 2017).

4. Adipokine und inflammatorische Marker im Fettgewebe

Adipokine werden in den Adipozyten und Präadipozyten des weißen Fettdepots des Hundes produziert und von dort in die umgebenden Gewebe abgegeben. Sie zeigen neben diesen parakrinen auch systemische endokrine und metabolische Effekte und wirken auf den Stoffwechsel und das Immunsystem (RYAN et al. 2010; EIRMANN et al. 2009; HÄMMERLING 2009). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, erfolgt mittlerweile eine genauere Einteilung der Faktoren, die aus dem Fettgewebe ausgeschüttet werden. So werden sie unter dem Oberbegriff der Adipozytokine zusammengefasst. Adipokine, sind die Faktoren, welche überwiegend von Adipozyten produziert werden, zu diesen zählen unter anderem Leptin, Resistin und Adiponektin (NEUMANN et al. 2016). Es handelt sich bei Adipozytokinen, wie oben bereits erwähnt, um Hormone, Zytokine und Chemokine welche unter anderem bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielen. Für einige Adipokine, wie Leptin und Resistin, konnte beim Menschen bereits ein Zusammenhang zwischen steigendem Körperfettanteil und steigender Produktion nachgewiesen werden (RYAN et al. 2010; EIRMANN et al. 2009; HÄMMERLING 2009). Jedoch besteht auf diesem Gebiet weiterhin Forschungsbedarf.

In den 90er Jahren konnte erstmalig die Bildung von TNF α in Fettgewebe nachgewiesen werden. Damit konnte ein Zusammenhang zwischen Übergewicht und Entzündung aufgrund von Adipozytokinen im menschlichen Körper aufgezeigt werden (HOTAMISLIGIL et al. 1993). Ein Jahr später wurde das Adipokin Leptin entdeckt und seine Wirkung auf den Energiehaushalt. Damit wurde das Fettgewebe als endokrines Organ anerkannt (ZHANG et al. 1994).

Es wurde bereits 2018 von SCHMIDLI et al. der Zusammenhang von Übergewicht und der Wahrscheinlichkeit eines Kreuzbandrisses in Hinblick auf den Zusammenhang mit dem intraartikulärem Fettkörper des Kniegelenks beim Menschen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Überlastung des Gelenks aufgrund von Übergewicht nicht alleine ausschlaggebend für die Entstehung

von Osteoarthritis ist, sondern Adipozytokine (u.a. Adiponektin, Leptin) ebenfalls eine Rolle spielen. Diese konnten bei betroffenen Patienten vermehrt in der Synovia des betroffenen Gelenks nachgewiesen werden. Eine Ausschüttung erfolgte dabei aus dem umliegenden Fettgewebe, den Synoviozyten und Chondrozyten. Zudem konnte in der Humanmedizin ein Zusammenhang zwischen Knieschmerz und der Ausschüttung von Adipozytokinen, insbesondere Substanz P, aus dem infrapatellarem Fettkörper nachgewiesen werden (BOHNSACK et al. 2005; CARRIÓN et al. 2019).

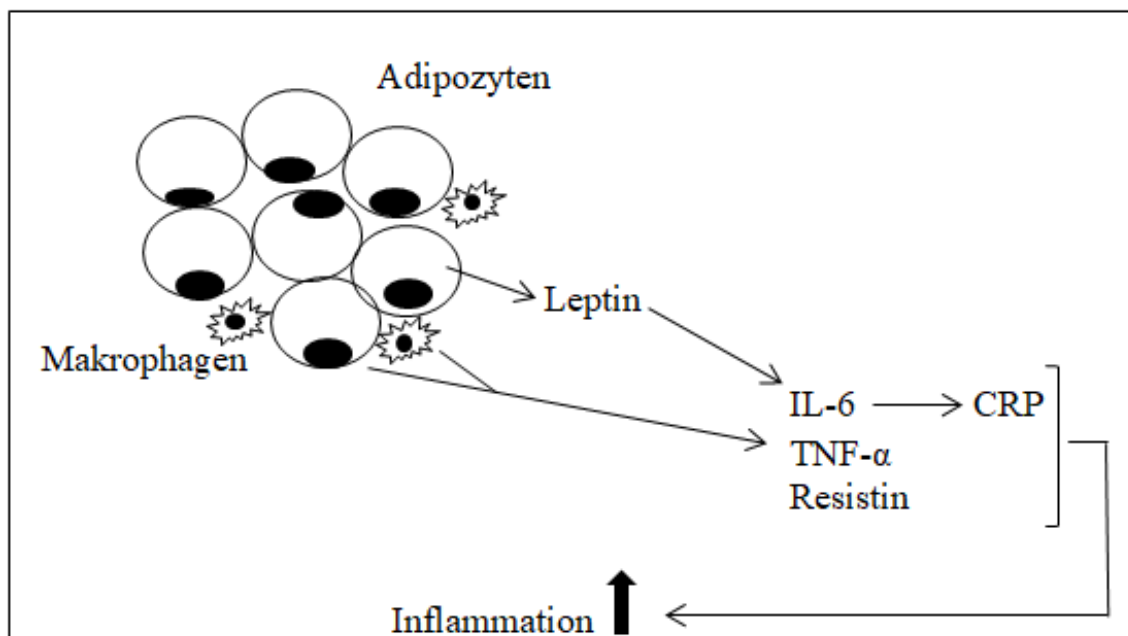


Abb. 10: Darstellung der Wirkung von Adipozyten im Mausmodell. Ausschüttung verschiedener Adipokine, wie Leptin, IL-6, TNF α aus dem weißen Fettgewebe mit Wechselwirkung untereinander und systemischer Wirkung (modifiziert nach ANTUNA-PUENTE et al. 2008)

4.1. Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen und spielt eine wichtige Rolle für das Immunsystem und steht auch im Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen. Es wird von verschiedenen Zellen ausgeschüttet, beispielsweise wenn es zur Gewebeerstörung kommt und initiiert die lokale Entzündungsreaktion (HELLE et al.1988). IL-6 wird vor allem von Monozyten, Adipozyten, Fibroblasten und Endothelzellen produziert (ANDUS et al. 1989; PRADHAN et al. 2001). Es hat eine entscheidende Wirkung auf die Aktivierung der Akutphase-Reaktion in dem es die Synthese der Akutphase-Proteine stimuliert. Es beeinflusst das Immunsystem auf humoraler und zellulärer Ebene in dem es über weitere Mediatoren die T-Zell-Aktivierung und die Enddifferenzierung der B- und T-Zellen initiiert. Die IL-6-Produktion wird positiv durch IL-1 und TNF α beeinflusst (ANDUS et al. 1989). IL-6 gehört zu den α -helikalen Zytokinen und bindet damit an Zytokinrezeptoren der Klasse II. Der IL-6-Rezeptor besitzt zwei extrazelluläre Domänen und eine Transmembranregion. Die Signaltransduktion erfolgt nach Ligandenbindung über den Jak-/STAT-Signaltransduktionsweg. Bei diesem handelt es sich um einen schnellen intrazellulären Signalweg. Es kommt durch die Bindung von IL-6 zur Aktivierung von Januskinasen (Jak), welche zur Phosphorylierung von Tyrosinen führen. Diese binden in ihrer aktivierten Form STAT-Moleküle, welche sich zu Dimeren zusammenlagern und sich vom Rezeptor lösen. Sie translokieren in den Zellkern und initiieren die Transkription (LOPPNOW 2001).

Untersuchungen von SCHMIDT et al. (2013) unterstützen, dass IL-6 eine Rolle bei neuropathischem Schmerz spielt. So wurde gezeigt, dass IL-6 und Substanz P im Liquor von Hunden mit neuropathischen Schmerzen signifikant höher sind, als bei Hunden ohne Schmerzen. Beim Menschen konnte IL-6 im arthrotischem Knie nachgewiesen werden, welches aus intraartikulärem Fettgewebe ausgeschüttet wurde (DIESTEL et al. 2009). Ähnliche Ergebnisse konnten bereits im Vorfeld an Hand von Untersuchungen an Mäusen und Ratten aufgezeigt werden (XU et al. 1999; ZANJANI et al. 2006).

In der Humanmedizin konnte nachgewiesen werden, dass IL-6 sowohl eine neurotoxische als auch eine neuroprotektive Funktion hat (GRUOL und NELSON 1997). Im Mausmodell wurde aufgezeigt, dass ein erhöhter Gehalt von IL-6 die Nervenzelldegeneration begleitet von einer Gliose auslöst. Wiederum zeigte IL-6 eine Stimulation von Nervenwachstumsfaktoren, welche für den Regenerationsprozess der Nervenzellen wichtig sind (SCHELLER et al. 2007; HANSER 2000). Zusätzlich wurde bei Erkrankungen, die durch eine Degeneration von Nervengewebe verursacht werden, ein erhöhter Gehalt von IL-6 nachgewiesen. Zu diesen Erkrankungen gehört unter anderem Alzheimer und Parkinson (HANSER 2000).

4.2. Interleukin 10 (IL-10)

Bei IL-10 handelt es sich um ein Protein, welches aus 181 Aminosäuren besteht. Das Zytokin wurde 1989 im Zusammenhang mit der Forschung an T-Lymphozyten entdeckt. Dabei wurde festgestellt, dass es eine hemmende Wirkung auf die Zytokinsekretion von TH1-Lymphozyten hat und damit eine antiinflammatorische Wirkung besitzt (FIORENTINO et al. 1989). Produziert wird es unter anderem von TH1- und TH2-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Keratinozyten, dendritischen Zellen, zytotoxischen Zellen, NK-Zellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Mastzellen (DE WAAL MALEFYT et al. 1991; DEL PRETE et al. 1993). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Ausschüttung von IL-10 erst nach der Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine erfolgt. So ist die höchste Ausschüttung erst 24-48h nach der Induktion der Entzündung mit LPS (Lipopolysacchariden) messbar (VAN DER POLL et al. 1997). Es soll eine überschießende Immunantwort des Körpers verhindert werden (SABAT et al. 2010). Seine Wirkung wird über den Interleukin-10-Rezeptor vermittelt, welcher aus 2 Untereinheiten besteht, aus der IL-10R α - und der IL-10R β - Untereinheit. Dabei ist die α -Untereinheit vor allem für die Ligandenbindung und die β -Untereinheit besonders für die Signalweiterleitung verantwortlich (FINBLOOM et al. 1995;

KOTENKO et al. 1997). Durch die Bindung von IL-10 kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosinkinase (Janus-Kinasen) welche Bestandteile des Rezeptors sind. Daraus resultiert die Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (STAT). Diese binden einander und bilden so Dimere, welche die Bindung zum Rezeptor lösen und in den Zellkern translokieren. Dort binden sie an die Promotorregion der DNA und initiieren die Transkription. Die STAT's befinden sich unter Kontrollbedingungen permanent im Zytoplasma in der Nähe der Rezeptoren (FINBLOOM et al. 1995; BHATTACHARYA und SCHINDLER 2003). Bei Hunden konnte eine erhöhte Ausschüttung aus der Synovialmembran und aus dem Fettgewebe des Knies in Zusammenhang mit Osteoarthritis nachgewiesen werden (MACCOUX et al. 2007).

Seine antiinflammatorische Wirkung wurde zum Beispiel im Zusammenhang mit der hemmenden Wirkung auf die Cyclooxygenase-2-Synthese, PGE₂-Ausschüttung (NIIRO et al. 1997) und die IL-6 und TNF α - Sekretion aus Mastzellen und eosinophilen Granulozyten aufgezeigt (AROCK et al. 1996; KEEL et al. 1997).

4.3. Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α)

TNF α steht am Beginn der Entzündungskaskade bei akuten Reaktionen, da es als einziges Zytokin nicht nur *de novo* synthetisiert, sondern auch in Makrophagen gespeichert wird. Es bewirkt die Ausschüttung weiterer Entzündungsfaktoren wie IL-1 und IL-6 (SCHMIDT et al. 2013). In den Adipozyten erfolgt die Bildung in den dort residenten Makrophagen (WEISBERG et al. 2003). In der Humanmedizin wurde nachgewiesen, dass es die Ausschüttung von Leptin erhöht und seine im Blut zirkulierende Menge positiv mit dem Körpergewicht korreliert (ZUMBACH et al. 1997). Es ist lokal und systemisch an der Entzündungsreaktion beteiligt. Unter anderem ist es an der Ausschüttung weiterer Zytokine und an verschiedenen Zellfunktionen beteiligt (ZENTELLA et al. 1991). Die Signaltransduktion erfolgt über zwei verschiedene Wege, welche über unterschiedliche Rezeptoren ablaufen. Es

gibt eine membrangebundene inaktive Form, welche an entzündlichen Gelenkserkrankungen beteiligt ist. Diese wird mit Hilfe von TNF- α -converting-enzyme (TACE) von der Membran abgelöst (HIMMERICH et al. 2009). Und die aktive lösliche Form, welche aus der inaktiven Form mittels Spaltung entsteht. Die zwei TNF- α -Rezeptoren, vor allem der TNF- α -1-Rezeptor, mit einem Gewicht von 55kDa, ist außer auf Erythrozyten auf vielen anderen Körperzellen zu finden. Ihm wird eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben. Der TNF α -2-Rezeptor, mit 75kDa, hat vor allem für das Immunsystem eine wichtige Rolle. Er wirkt vor allem antiinflammatorisch (DONG et al. 2016). Kommt es zur Bindung von TNF α an den TNF- α -1-Rezeptor kommt es entweder zur Aktivierung des Signaltransduktionsweges, welcher über den Transkriptionsfaktor nukleärer Faktor kappa B (NF- κ B) die Transkription initiiert oder es kommt zur Aktivierung einer Todesdomäne. Dabei werden Caspasen aktiviert, die zur Apoptose führen. Nach Bindung an den TNF α -2-Rezeptor kommt es ausschließlich zur Transkriptionsaktivierung mittels NF- κ B (HIMMERICH et al. 2009). Die Expression von TNF- α -RNA wird unter anderem durch Arachidonsäuremetaboliten, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Lipopolysaccharide stimuliert (BEUTLER und CERAMI 1986). TNF α wird unter anderem von Adipozyten sezerniert. Es hat eine gewisse Rolle bei der Regulation des Körpergewichts und führt zu einer Steigerung der Leptinproduktion (ROTHWELL 1988; ZUMBACH et al. 1997). 2002 konnten BULLO et. al nachweisen, dass TNF α positiv mit der Menge des Fettgewebes korreliert. Es hat eine immunmodulatorische Funktion durch die Aktivierung der Phagozytose und die Steigerung der Permeabilität des Endothels (TSUJIMOTO et al. 1986).

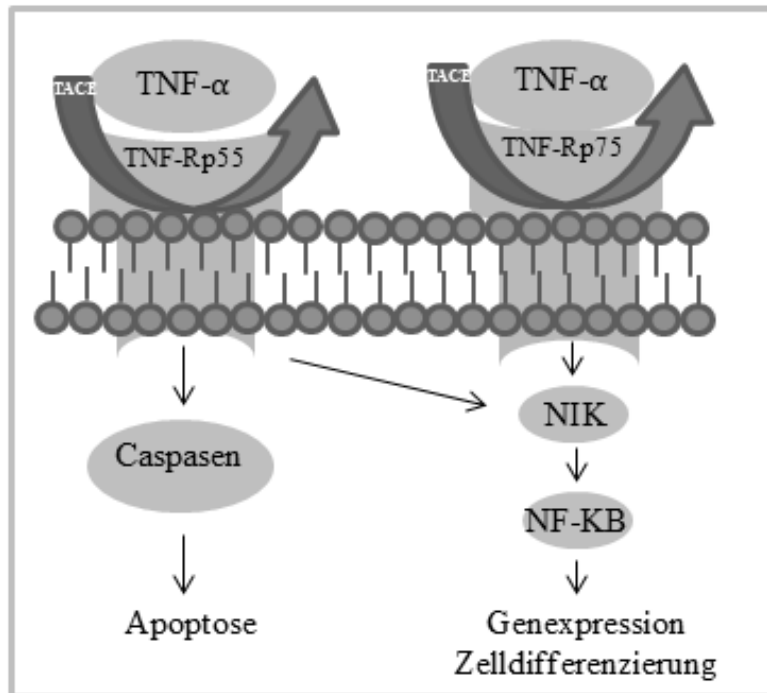


Abb. 11: Schema des Signalwegs von TNF- α . Das Signal, welches TNF- α vermittelt, wird auf zellulärer Ebene über 2 Rezeptoren der Zelloberfläche vermittelt: TNF-Rp55 und TNF-Rp75. Ob TNF- α zu Zelldifferenzierung oder Apoptose führt, hängt vom Signalweg ab, der innerhalb der Zelle aktiviert wird. Bei Vorliegen von NF- κ B kommt es zur Zelldifferenzierung und -vermehrung. Kommt es dagegen zur sequenziellen Aktivierung von Caspasen, führt dies zur Apoptose. Abkürzungen: Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), TNF-Rezeptor (TNF-R), TNF- α -converting-Enzym (TACE), Nukleärer Faktor kappa B (NF- κ B), NF- κ B induzierende Kinase (NIK) (modifiziert nach HIMMERICH et al. 2009).

4.4. Leptin

Leptin (leptos, griechisch: dünn) ist ein Protein, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des Appetits und des Energiehaushaltes spielt. Darüber hinaus hat es Einfluss auf die Nährstoffverteilung und steuert Prozesse der Reproduktion, des Immunsystems und der Hormonsekretion endokriner Drüsen (GEARY et al. 2003). Es wird hauptsächlich von Adipozyten, beispielweise aber auch im Magen produziert (EISELE et al. 2005). Seine Wirkung ist endokrin, autokrin und parakrin innerhalb des produzierenden Gewebes. Es bindet an den Leptin-Rezeptor, der sich unter anderem im Hypothalamus und vielen anderen Organen befindet. Dieser besteht stets aus einer extrazellulären und transmembranen Domäne und teilweise aus einer intrazellulären Domäne. Es werden verschiedene Isoformen des Rezeptors beschrieben, welche tierartlich verschieden ausgeprägt sind (ERHARDT et al. 2000). Der Leptinrezeptor gehört zur Klasse-I der Zytokin-Rezeptoren. Nach Bindung an die lange Form des Rezeptors kommt es zur Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges, ähnlich wie bei IL-10 und IL-6. Es hat eine entscheidende Rolle im Fettstoffwechsel und ist ausschlaggebend für das Sättigungsgefühl. Es besteht eine Korrelation zwischen dem Grad der Adipositas und der Menge an Leptin. Je mehr Fettgewebe vorhanden ist, umso mehr Leptin wird ausgeschüttet und das Sättigungsgefühl steigt. Ebenso kommt es zu einer Steigerung des Grundumsatzes und der körperlichen Aktivität. Bei einem geringen Anteil von Fettgewebe liegt das Leptin hauptsächlich gebunden vor (HÄMMERLING 2009; HAHN et al. 2006). Es hemmt die Lipolyse und steigert die Lipogenese (KERSHAW und FLIER 2004). Zusätzlich hat es eine modulatorische Wirkung auf das angeborene und erworbene Immunsystem. Es regt die T-Zell-Differenzierung an und stimuliert die Produktion und Sekretion von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF α und von Akutphase Proteinen. Es weist viele Übereinstimmungen mit den Zytokinen der IL-6-Familie auf und wird auf ähnliche Weise bei Entzündungen und Infektionen stimuliert. Darüber hinaus führt es zu einer Aktivierung von Monozyten und Makrophagen (FAGGIONI et al. 2001) und aktiviert den JAK/STAT weg über die lange Form des

Leptinrezeptors (ObRb) (FLOWER et al. 2002). Im Zusammenhang mit Rückenmarksverletzungen konnte Leptin eine protektive Funktion nachgewiesen werden (REN et al. 2018)

4.5. Substanz P

Bei Substanz P handelt es sich um ein Peptid, welches aus 11 Aminosäuren aufgebaut ist und zur Gruppe der Tachykinine gezählt wird. Das „p“ stand anfangs für „powder“, da es als weißes Puder zu Forschungszwecken verwendet wurde. Später wurde es als die englische Übersetzung für Schmerz, also „pain“ verwendet (KAMPER 2005). Es wird unter anderem in Schmerzfasern gebildet und im Falle derer Aktivierung freigesetzt. Es fungiert entsprechend in den nozizeptiven Neuronen als Schmerztransmitter und bindet an Neurokinin-1-Rezeptoren (EGLE et al. 2003). Darüber hinaus erfolgt seine Bildung auch im Fettgewebe (IANNONE und LAPADULA 2010). Substanz P kommt im zentralen und peripheren Nervensystem vor und weist dort neuromodulatorische Eigenschaften auf, da es weitere Neurotransmitter beeinflusst. Es wirkt auf die Freisetzung dieser Neurotransmitter und hat damit eine wichtige Funktion bei der Entstehung der neurogenen Entzündung. Diese wird vor allem durch Schmerzen ausgelöst. Substanz P bewirkt die Geninduktion unter anderem von IL-8, TNF α und IL-6. Diese Genexpression erfolgt über die Aktivierung des NK-1-Rezeptor (STRAUB 2006). Über diese Entzündungsmediatoren erfolgt die Aktivierung von Makrophagen und die Freisetzung von Neurotransmittern (NOLI und SCARAMPELLA 2005). Zusätzlich wirkt Substanz P vasodilatatorisch, was eine proinflammatorische Wirkung zur Folge hat (LÜLLMANN et al. 2006). Darüber hinaus hat Substanz P eine wichtige Funktion sowohl in der zentralen als auch in der peripheren Neurosensibilisierung. So führt es zusammen mit weiteren Mediatoren an den peripheren Nozizeptoren zu einer Herabsetzung der Reizschwelle und zu einer Aktivierung von inaktiven Nozizeptoren im geschädigten Gebiet. Im Rahmen

der zentralen Neurosensibilisierung wirkt unter anderem Substanz P als Neurotransmitter wodurch es zu einer Steigerung der Schmerzintensität und zu einer Senkung der Schmerzschwelle kommt (KASPER und ZOHMANN 2007).

4.6. C-reaktives Protein (CRP)

Das C-reaktive Protein ist ein major Akut-Phase-Protein, welches in der klinischen Veterinärmedizin als Entzündungsmarker dient. Es wurde 1941 als das erste Akut-Phase-Protein im Entzündungsprozess des Menschen entdeckt. Seinen Namen erhielt es aufgrund der kalzium-abhängigen Reaktivität (ABERNETHY und AVERY 1941). Beim Hund konnte das dem humanen sehr ähnliche CRP erstmals 1962 detektiert werden (GOTSCHLICH 1962). Es wird, im Gegensatz zu den anderen Adipozytokinen, vor allem in der Leber, aber auch im Fettgewebe produziert und reagiert auf das Vorhandensein von Zytokinen. Inflammatorisch wirksame Zytokine wie IL-6 und TNF α stimulieren die Synthese von CRP in den Hepatozyten. Die Ausschüttung von CRP im Rahmen des Entzündungsgeschehens wird in besonderem Maße von IL-6 getriggert (HARRISON et al 1996). Daher ist der Anstieg des CRP bei übergewichtigen Hunden auf den Anstieg dieser beiden Entzündungsfaktoren zurückzuführen (EIRMANN et al. 2009). Es dient in der Humanmedizin als Biomarker für Entzündungen um das Ausmaß dieser abschätzen zu können (NIEHUES et al. 2017). Es konnte teilweise ein Anstieg um das 1000fache beobachtet werden (STEEL und WHITEHEAD 1994). Das CRP wird nur in geringem Maße durch Stress, Speicherung oder antiinflammatorische Medikamente beeinflusst und kann damit als sicherer Indikator einer Entzündung ausgewertet werden. Es reagiert innerhalb kürzester Zeit (4h) und hat nur eine kurze Halbwertszeit von 19h. Dementsprechend kann nach Beseitigung des Entzündungsherdes ein schneller Abfall beobachtet werden (VIGUSHIN et al. 1993). Zusätzlich korreliert die Höhe des Anstiegs meist mit dem Schweregrad der Entzündung (BREU 2015). Damit das CRP seine

biologische Aktivität entfalten kann, ist die Bindung von Kalziumionen notwendig. Es kommt zu einer Konformationsänderung der fünf Untereinheiten des CRPs. In Folge dessen ist die Ligandenbindung und damit die Wirkung im Entzündungsgeschehen möglich (KILPATRICK et al. 1982). In der hier vorliegenden Arbeit dient die Messung der CRP-Expression als einer der inflammatorischen Marker für die Bestimmung des Entzündungsstatus des untersuchten Fettgewebes.

4.7. Calcitonin gene-related polypeptide alpha (CGRP α)

Das CGRP α ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid, welches zahlreich im Nervengewebe vorhanden ist und als Transmitter fungiert (ZHANG et al. 2001). Es wurde bisher vor allem in der Humanmedizin als proinflammatorisches Zytokin untersucht. Es wird im zentralen Nervensystem gebildet und führt zu einer Vasodilatation. In Studien konnte bereits belegt werden, dass es eine stimulierende Wirkung auf andere Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α hat. Es wurde bislang unter anderem im Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis des Menschen untersucht und konnte bei betroffenen Patienten vermehrt in der Synovia nachgewiesen werden (HERNANZ et al. 2003). Darüber hinaus konnte es in der Humanmedizin im Zusammenhang mit Übergewicht und einer erhöhten Entzündungsreaktion im Körper nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang erfolgte der Nachweis im Fettgewebe (PIVOVAROVA et al. 2012). Bei einer anderen Studie konnte ein Zusammenhang von CGRP α und Migräne bei Menschen und der Katze nachgewiesen werden. Es wurde aufgezeigt, dass es eine entscheidende Rolle im Trigeminalnerv spielt, welcher an der Entstehung der Migräne beteiligt ist (ROBIN et al. 2004). Es wird durch die Transkription des Calca-Gens gebildet. Die Wirkung wird über einen 7-transmembranen G-Protein gekoppelten Rezeptor vermittelt. Seine Wirkung wird sowohl im ZNS als auch im Gewebe beschrieben. Daher hat es vermutlich einen Einfluss auf die Sensorik, die

Motorik und das Kardiovaskuläre System (ZHANG et al. 2001; AMARA et al. 1985). Neuronen, welche CGRP α als Transmitter besitzen, konnten im Zusammenhang mit der Reaktion auf schädliche Noxen wie Hitze und Capsaicin gebracht werden (MCCOY et al. 2013).

4.8. High Mobility Group Box 1(HMGB1)

Bei HMGB1 handelt es sich um ein Protein welches eine hohe elektrophoretische Mobilität in Polyacrylamidgel besitzt und daher seinen Namen erhielt (BUSTIN 2001). Bei Untersuchungen zeigte sich eine hundertprozentige Übereinstimmung des menschlichen und des kaninen HMBG1 (ESCOBAR et al. 2003). Es wurde eine membrangebundene und eine lösliche Variante nachgewiesen (RAUVALA und PIHLASKARI 1987), welche in allen Zellen des Körpers vorkommen (YANG et al. 2001). Es bindet unter anderem an den RAGE-Rezeptor („receptor advanced glycation endproducts“) und den TLR4 („toll-like receptor 4“), welche auf vielen Zellen des Körpers vorkommen (HUTTUNEN et al. 1999). Dazu zählen unter anderem Endothelzellen, Nervenzellen, T-Zellen und Makrophagen (STERN et al. 2002; DUMITRIU 2005). Über diese Rezeptoren werden zwei verschiedene Signalkaskaden aktiviert. Durch das membrangebundene HMGB1 wird das Wachstum von Nervenzellen beeinflusst (PARKKINEN et al. 1993). Der zweite Weg ist die Aktivierung von MAP-Kinasen, welche wiederum Einfluss auf proinflammatorische Zytokine aufweisen und deren Synthese bewirken (LI et al. 2003). Es wird aus nekrotischen Zellen abgegeben und erzeugt eine Entzündung in diesem Bereich indem es unter anderem Monozyten zur TNF α -Sekretion anregt und eine Leukozytenadhäsion bewirkt (SCAFFIDI et al. 2002). Dadurch werden beschädigte Zellen eliminiert und eine Regeneration des Gewebes ermöglicht (PALUMBO et al. 2004). Da es sich um ein rein intrazelluläres Protein handelt, welches von apoptotischen Zellen nicht ausgeschüttet wird, wird es auch als Nekrosemarker angesehen (ULLOA et al.

2006; SCAFFIDI et al. 2002). Es gehört zur Gruppe der DAMP („damage-associated molecular pattern“), welche als intrazelluläre endogene Mediatoren einen frühen Zellschaden aufzeigen. HMGB1 wird ebenfalls im Rahmen von aseptischen Entzündungen ausgeschüttet, welche beispielsweise durch eine Hypoxie oder autoimmun vermittelt auftritt (NISHIBORI et al. 2019; GONELEVUE et al. 2018). Dabei ist die extrazelluläre Disulfidform des HMGB1 wie ein Zytokin (ANDERSSON et al. 2018). Die maximale Serumkonzentration wurde 18 Stunden nach Entzündungsstimulus nachgewiesen und hielt danach für mehrere Tage an (ZETTERSTROM et al. 2002). Die aktive HMGB1-Sekretion erfolgt vor allem durch Monozyten nach einer Stimulation durch TNF α und IL-1. In der Humanmedizin konnte es vermehrt in der Synovia von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten nachgewiesen werden (TANIGUCHI et al. 2003). In der Humanmedizin wurde es im Zusammenhang mit Übergewicht untersucht. Dabei konnte bei übergewichtigen Menschen eine erhöhte Ausschüttung aus dem Fettgewebe nachgewiesen werden. Zusätzlich wiesen die Menschen eine erhöhte Entzündungsreaktion auf (GUNASEKARAN et al. 2013). Es wurden auch verschiedene Wirkungen an anderen Organen wie der Lunge, dem Herzen und dem Darm nachgewiesen. Oft standen diese im Zusammenhang mit immunpathologischen Prozessen (ANDERSSON et al. 2000; PARK et al. 2003; MESSMER et al. 2004).

4.9. Ziel der Studie

In dieser Arbeit soll ein möglicher Zusammenhang zwischen der Kompression der Nerven der *Cauda equina* durch eine degenerative Bandscheibenprotrusion und der Entzündungsreaktion im anliegenden epiduralen Fettgewebe untersucht werden, die gegebenenfalls einen Anteil an den Schmerzen im Zusammenhang mit der Erkrankung haben. Zum anderen geht es auch um die Fragestellung ob Hunde mit viel epiduralem Fettgewebe höhere Werte von Entzündungsmediatoren im Fettgewebe aufweisen.

5. Material und Methoden

5.1. Material

Bei den untersuchten Fett-Proben handelt es sich zum einen um 15 Proben von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden und um 9 Kontrollproben von klinisch gesunden Hunden ohne degenerative lumbosakrale Stenose. Bei der Gruppe der erkrankten Patienten lag das Alter zwischen 2,5 und 11 Jahren. Bei den Rassen handelte es sich um mittelgroße bis große Hunde, welche der Rassen des Deutschen Schäferhundes, des Golden Retrievers, des Labrador Retrievers, des Großen Münsterländers und der Deutschen Dogge angehörten. Die Gruppe bestand aus normalgewichtigen und übergewichtigen Hunden, wobei der Großteil normalgewichtig war. Teilweise wurden die Tiere im Vorfeld mit verschiedenen Schmerzmitteln und teilweise Cortison vorbehandelt. Die Medikamente wurden ca. eine Woche vor der Operation abgesetzt. Die gezeigten Symptome waren Schwäche der Hinterhand, Unwilligkeit zu Springen oder Treppen zu steigen, Schleifen der Pfoten der Hintergliedmaßen und Schmerzen im Bereich der kaudalen Wirbelsäule. Die Gruppe der gesunden Hunde wies ein Alter zwischen 6 Monaten und 11 Jahren auf und beinhaltete Vertreter von kleinen und großen Hunderassen wie dem West Highland White Terrier, dem Golden Retriever und der Deutsche Dogge. Bei ihnen erfolgte die Probenentnahme unmittelbar nach Eintritt des Todes aufgrund einer anderen Erkrankung. Die Proben wurden bei beiden Gruppen mittels einer Laminektomie im Bereich des letzten Lendenwirbels und des ersten Kreuzbeinwirbels gewonnen. Die Haut wurde zunächst im Bereich des lumbosakralen Übergangs mittels Skalpell eröffnet und die subkutane Fettprobe aus der Unterhaut entnommen. Im Anschluss wurde die Muskulatur in dem Bereich präpariert und ein Zugang zu den Wirbelkörpern geschaffen. Im nächsten Schritt wurden die Wirbelkörper des letzten Lendenwirbels und des ersten Kreuzbeinwirbels im Bereich der Bandscheibe

von dorsal aufgefräst und der Rückenmarkskanal eröffnet. Nach dessen Eröffnung wurde ein Teil des epiduralen Fettgewebes entnommen, welches im Zuge der Prozedur ansonsten entsorgt worden wären. Die Fettproben wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und verblieben in einem Tiefkühlfach bei -80° bis zur weiteren Bearbeitung. Der Verschluss der Operationswunde erfolgte danach Schichtweise.

Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Genexpression der mRNA von IL-6, IL-10, TNF α , Leptin, Substanz P, CRP, CGRP α , HMGB1, TLR4 und RAGE wie unter 5.2.3 beschrieben.

5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um ein enzymatisches Verfahren zum Nachweis von Sequenzen eines Einzel- oder Doppelstrang DNA-Moleküls (KLEPPE et al. 1971). Die Reaktion kann in 3 Schritte unterteilt werden. Zunächst erfolgt die Denaturierung der Doppelstrang-DNA von welcher die Sequenzen bestimmt werden sollen. Dafür wird die zu untersuchende Probe auf eine Temperatur von ca. 95°C erhitzt. Dadurch kommt es zur Teilung der Doppelstränge in Einzelstränge. Anschließend wird während der Hybridisierung die Temperatur auf ca. 55°C abgesenkt, um die Anlagerung der Primer, kurze Oligonukleotide, zu ermöglichen. Diese bilden den Startpunkt der DNA-Synthese, welche immer in 5'-3'-Richtung abläuft. Im letzten Schritt, der Elongation, erfolgt die erneute Erwärmung der Probe auf 72°C, um optimale Bedingungen für die DNA-Polymerase, Taq-Polymerase, zu schaffen, welche eine exakte Kopie der jeweiligen Einzelstränge produziert, beginnend bei den Primern. Die Taq-Polymerase hat ihren Namen vom Bakterienstamm *Thermus aquaticus* erhalten, von welchem sie isoliert wurde. Dieser Bakterienstamm hat sein Temperaturoptimum bei 74°C. Die Polymerase synthetisiert 2800 Nukleotide in der Minute. Bei einem Zyklus der PCR erfolgt eine Verdoppelung der ursprünglichen Doppelstrang DNA (MULLIS und FALOONA 1987; LINZ und

DEGENHARDT 1990; MÜLHARDT 2009). Dieser Zyklus wird mehrere Male durchlaufen, um ausreichend DNA zur Identifikation zur Verfügung zu haben. Die Detektion der amplifizierten DNA erfolgt mittels Elektrophorese. Dabei kommt es zur Auftrennung der Fragmente anhand ihrer Größe in Agarose-Gel und anschließender Färbung mittels des fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid. Ein eingebrachter Größenmarker ermöglicht die Zuordnung der Fragmente nach ihrer relativen Größe (GYLLENSTEN und ERLICH 1988; KEMP et al. 1989; SAIKI et al. 1988; LINZ und DEGENHARDT 1990). Die Darstellung erfolgt unter UV-Licht, welches eine Intensität von 254nm besitzt (HIGUCHI et al. 1992; HIGUCHI et al. 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wird die real-time PCR verwendet, welche wie unter 5.2.2 durchgeführt wird.

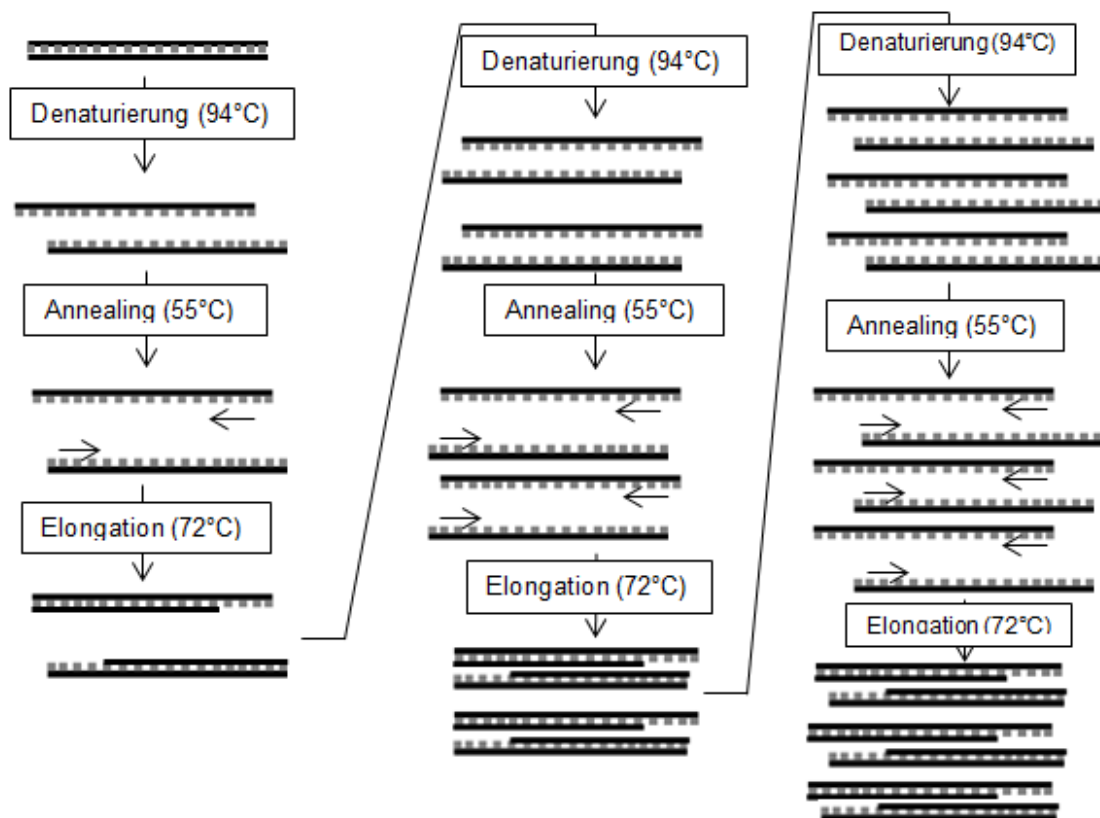


Abb. 12: Das Prinzip der PCR. Denaturierung der DNA bei einer Temperatur von 94°C. Anschließendes Annealing unter Abkühlung der Temperatur auf 55°C um das Anlagern des Primers an den aufgespaltenen DNA-Doppelstrang zu ermöglichen. Während der Elongation erfolgt die erneute Erhitzung auf 72°C um die Neusynthese der DNA durch die Polymerase zu gewährleisten (modifiziert nach MÜLHARDT 2009).

5.2.1. Reverse Transkription-PCR

Die RT-PCR wird unter anderem zur Herstellung einer DNA aus mRNA benötigt um anschließend die PCR durchführen zu können. Zunächst ist die Herstellung einer cDNA notwendig, anhand welcher im Anschluss die PCR durchgeführt werden kann. Dieser Schritt wird als Reverse Transkription bezeichnet und wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RTase) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Enzym, welches von Retroviren stammt. Im Abschluss läuft anhand dieser neu synthetisierten DNA die PCR ab (LINZ und DEGENHARDT 1990). Zunächst lagern sich Oligonucleotide an das 3'-Ende der mRNA. Von da ausgehend, wird mit Hilfe der RTase ein mRNA/DNA-Hybrid synthetisiert. Nach der Denaturierung dieses Stranges kann anhand der entstandenen cDNA die PCR ablaufen. Es kommen verschiedene RTasen zum Einsatz. Je nach Aufbau oder Länge der Ausgangs-RNA wird zwischen Einpuffer und Zweipuffer RT-PCR unterschieden. Bei der Einpuffer RT-PCR wird für die RTase und die DNA-Polymerase der selber Puffer verwendet. Teilweise ist die Durchführung in einem Gefäß möglich, was diese Methode einfacher gestaltet. Sie wird vor allem für den Nachweis geringer mRNA-Mengen eingesetzt. Bei der Zweipuffer RT-PCR werden zwei unterschiedliche Reaktionspuffer benötigt, sowie verschiedene Reaktionsgefäße. Daher ist die Variante aufwendiger (MÜLLER und PRANGE 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Einpuffer RT-PCR verwendet.

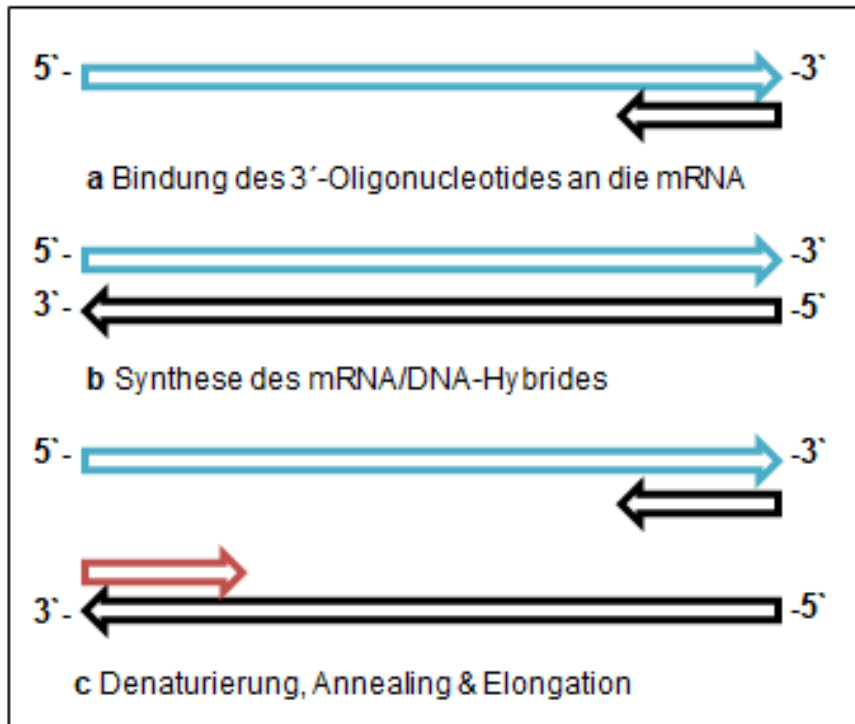


Abb. 13: Schematische Darstellung der RT-PCR. a Die einzelsträngige mRNA (blau) wird an dessen 3'-Ende durch das 3'-Oligonucleotid gebunden. b Durch die Elongation des 3'-Oligonucleotids entsteht ein mRNA/DNA-Hybrid. c In den anschließenden PCR-Zyklen binden die 5'- und 3'-Oligonucleotide, die aus der Reversen Transkription entstandenen DNA-Stränge und die Amplifikation findet statt (modifiziert nach MÜLLER und PRANGE 2016).

5.2.2. Real-time PCR

Bei der qPCR wird in Echtzeit die PCR-Produktion mittels Fluoreszenzfarbstoff während des Zyklus dargestellt und nicht erst nach Vollendung der Zyklen. Dabei werden 2 Verfahren unterschieden. Zum einen werden bei der unspezifischen qPCR alle doppelsträngigen DNA-Produkte mittels Cyber Green dargestellt, welcher unspezifisch an die DNA bindet. Bei der spezifischen qPCR kommen spezifische Sonden zum Einsatz, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind und nur an bestimmte DNA-Sequenzen binden. Umso heller der Farbstoff dargestellt wird, umso mehr Amplifikate wurden mittels qPCR hergestellt. Die Messungen werden in einer Amplifikationskurve dargestellt und stellen so die Menge an entstandener Ziel-DNA graphisch dar (HUGGETT et al. 2005; NOLAN et al. 2006). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Quantität der entstandenen DNA-Produkte direkt während der Amplifizierung abgelesen werden kann. Mit Hilfe einer Lichtquelle in einem Nanometerbereich unter 495, werden die Farbstoffe angeregt. Die Auswertung erfolgt pro Replikationszyklus anhand der Fluoreszenzintensität. Diese wird mittels optischer Detektionseinheiten abgelesen (MÜLLER und PRANGE 2016).

5.2.3. Durchführung der m-RNA- Quantifizierung

Die Fettproben wurden aus dem -80°C Tiefkühlschrank entnommen und in gefrorenem Zustand weiter verarbeitet.

5.2.3.1. RNA-Extraktion

Die subkutanen und epiduralen Fettproben wurden zunächst in entsprechend beschriftete EppendorfgeläÙe (Eppis) verbracht. Zu groÙe Proben wurden auf einem gekühlten Metallblock mit Hilfe eines Skalpell in entsprechende GröÙen zerkleinert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von Trizol und die Homogenisierung mit Hilfe einer Ultraschallsonde. Das Trizol dient der Lyse der Zellen und der Inaktivierung der RNAsen. Der Ultraschall führt zur mechanischen Zerkleinerung. Die im nächsten Schritt durchgeführte Zentrifugation führte zur Ablagerung von Polysacchariden, Bestandteilen der Matrix und DNA als Pellet. Der Überstand wird in ein neues GefäÙ überführt. Die anschließende Inkubation dient der Abspaltung der Nukleoproteinkomplexe. Das zugesetzte Chloroform löst denaturierte Proteine und die DNA heraus. Durch die Zentrifugation erfolgt die Teilung in eine organische (DNA und Proteine) und eine wässrige (RNA) Phase. Im nächsten Schritt wird die organische Phase verworfen. Das zugefügte Isopropanol verdrängt die Hydrathülle und führt damit zur Ausfällung der RNA. Nach der Zentrifugation verbleibt ein RNA-haltiges Pellet. Durch mehrmalige Zugabe von Ethanol werden mögliche Reste von Isopropanol oder andere Rückstände entfernt. Das im letzten Schritt der Extraktion zugefügte DEPC-Wasser führt zur Auflösung der Pellets. Im Anschluss erfolgt die Quantifizierung der RNA.

Tabelle 1: Protokoll RNA-Extraktion

Arbeitsschritt	Beschreibung	Zeit
Überführen der Proben in 2ml Eppendorfgefäße	Vorbereitung der Proben unter Kühlung auf Trockeneis	
Homogenisieren der Probe	1000µl Trizol hinzugefügt, Trizol lysiert Zellen und inaktiviert die RNasen Mechanische Zerkleinerung der Probe mittels Ultraschall	2x 20 Sekunden
Reinigen des Ultraschallkopfes	Je einmal in Ethanol und anschließend in DEPC tauchen	
Zentrifugieren 1. Überstand	Bei 4°C bei 1200q Überstand in 1,5ml Eppendorfgefäße überführen	10 Minuten
Trennung von Nukleoproteinen	Stehen lassen bei Raumtemperatur	5 Minuten
Chloroform	Je 200µl (1ml Trizol) dazu	15 Sekunden
Separation	Stehen lassen bei Raumtemperatur	3 Minuten
Zentrifugieren Isopropanol vorlegen 2. Überstand	Bei 4°C bei 1200q 500µl (1ml Trizol) in neue 1,5ml Eppendorfgefäße Klare Phase (enthält RNA) von der roten Phase durch pipettieren trennen Überstand in neue mit Isopropanol gefüllte Eppendorfgefäße pipettieren	20 Minuten
Mischen	vortexen	
Ausfällen	Bei -20°C im vorgekühlten Rack im Eisschrank	Über Nacht
Zentrifugieren Pellet sichern	Bei 4°C bei 15000q Überstand abgießen, Pellet trocknen	15 Minuten
Waschen I	1ml 70% Ethanol dazu geben und vortexen	
Zentrifugieren	Bei 4°C bei 15000q	10 Minuten

Pellet sichern	Überstand abgießen, Pellet trocknen	
Waschen II	1 ml Ethanol 100% dazugeben und vortexen	
Zentrifugieren	Bei 4°C, bei 15000g	10 Minuten
Pellet sichern	Überstand abgießen und Eppendorfgefäße umgedreht trocknen	20 Minuten
Pellet lösen	Je nach Pelletgröße 15 oder 30µl DEPC H ₂ O hinzufügen	

Tabelle 2: verwendete Materialien

Material	Funktion	Hersteller
2ml Eppendorfgefäß	Probengefäß	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Micro Amp 8-Cap Strips	Verschließen der 8er Stripes	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Micro Amp 8-Tube Strips	Probengefäß für die Zugabe der Primer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Micro Amp 96-Well Support Bases	Halterung der 96-Loch-Platte	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Micro Amp Fast Optical 96-Well Reaction Plates	Probengefäß für die PCR	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Micro Amp Optical Adhesive Films	Verschließen der 96-Loch-Platte	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tabelle 3: verwendete Reagenzien

Material	Hersteller
DNase-Inactivation Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Random-Hexamer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
dNTPs	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
RT-Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
0,1M DTT	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
RT-Enzym	Thermo Fisher Scientific

	Inc.,Waltham, MA, USA
cDNA-Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham, MA, USA
Strip	Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham, MA, USA
Primer	Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham, MA, USA
Taqman Mastermix	Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham, MA, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
TURBO DNase Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham, MA, USA
Ethanol 70% / 100%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
DEPC-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
TRIzol-Reagenz	Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham, MA, USA

5.2.3.2. Quantifizierung der RNA-Menge

Zur Bestimmung der tatsächlichen RNA-Menge und des Reinheitsgrades der Proben wurde jeweils 1µl der Probe auf das Spektrometer gegeben. Dieses misst die Absorptionsmenge des Lichtes bei 260nm und bei 280nm. RNA hat ein Absorptionsmaximum von 260nm, da die Proben nach der oben beschriebenen Verarbeitung lediglich RNA enthalten, dient diese Messung, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, zum Nachweis der tatsächlichen RNA-Menge. Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei 280nm. Diese Messung wird zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Probe verwendet. Der Quotient gebildet aus den beiden Absorptionsmaxima gibt den Reinheitsgrad der Proben an. Dieser sollte sich in einem Bereich von 1,9 bis 2,1 befinden. Ein Wert der sich unter diesem Bereich befindet, zeigt eine Verunreinigung auf. Im Anschluss an die Quantifizierung wurden die Proben durch Zugabe von autoklaviertem RNase freiem DEPC Wasser auf eine einheitliche Konzentration

von 250ng/µl beziehungsweise auf 125 ng/µl gebracht und bis zur weiteren Verarbeitung bei -50°C gelagert.

5.2.3.3. Reverse Transkription der RNA

Mit Hilfe der Reversen Transkription wird aus der RNA eine DNA erstellt. Nur anhand dieser ist die Durchführung der Polymerasekettenreaktion möglich. Da die PCR mit Hilfe einer Taq-Polymerase erfolgt, welche nur an eine DNA anlagern kann. Im ersten Schritt erfolgt die Aufspaltung der mRNA bei 65°C um das Anlagern des Random Hexamer (Primer) zu ermöglichen. Das zugegebene DTT (Dithiothreitol) dient als Reduktionsmittel ebenfalls der Aufspaltung der RNA. Der Primer bindet an einer komplementären Basenfolge des RNA-Stranges. Im Anschluss erfolgt die Anlagerung der RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Diese erstellt bei einer Temperatur von 37°C eine Kopie des RNA-Stranges in Form einer DNA. Die Inaktivierung der Polymerase erfolgt bei 90°C. Zur Kontrolle einer möglichen Verunreinigung während der Durchführung wurden zwei Kontrollen angefertigt. Diese sind in der Tabelle als Blank1 und 2 aufgeführt.

Tabelle 4: Protokoll Reverse Transkription

Auftauen	Proben und Reagenzien auf Eis auftauen	Ca. 30 Minuten
„Tubes“ beschriften	0,2ml Eppendorfgefäße beschriften, plus 2 zusätzliche für die Blanks	
Primer-Mix (RT1) herstellen	5µl DEPC Wasser 1µl Random Hexamer 1µl dNTPs in jede Vertiefung der 8er Stripes	
Vorlegen RNA-Primer-Mix	In jede Vertiefung der 8er Stripes 7µl Primer-Mix vorlegen 4µl RNA dazugeben In Blank 1 Primer-Mix + 4µl DEPC Wasser	
Mischen	vortexen	Ca. 5 Sekunden

Zentrifugieren	bei 1000q	Ca. 30 Sekunden
Reverse Transkription im RealTime Cyclers	65°C	10 Minuten
RT-Mix 2	4µl RT Puffer 2µl steriles Wasser 2µl 0,1M DTT 1µl RT-Enzym	
RT-Mix 2 in die Proben geben	Proben aus dem RealTime Cyclers nehmen und auf Eis lagern In alle Proben 9µl RT-Mix2 zentrifugieren In Blank2 9µl RT-Mix2+ 11µl DEPC Wasser pipettiert	
RealTime Cyclers	37°C 90°C 4°C	1h 5 Minuten ~
Verdünnung	Verdünnung auf 5ng/µl durch Zugabe von 180µl steriles Wasser	
„Backup“	Entnahme von 90µl pro Probe und als „Backup“ bei -40°C lagern	

5.2.3.4. Real-Time PCR

Für die RealTime PCR wurde ein PCR-Mix aus autoklaviertem Wasser, Master-Mix und dem jeweiligen Primer hergestellt. In dem Master-Mix sind die DNA-Polymerase und die dNTPs enthalten. Dieser Mix wurde in jedes Well der 96-Loch-Platte pipettiert. Im Anschluss wurden in Doppelbestimmung die cDNA zu dem PCR-Mix gegeben. Die Platte wurde mit Hilfe einer selbstklebenden Folie luftdicht verschlossen. Im Anschluss wurde die Platte zentrifugiert und in den RealTime Cyclers gegeben. In diesem lief die PCR wie in der Tabelle beschrieben über 40 Zyklen ab. Die Auswertung erfolgte parallel mit Hilfe des StepOne-Programms. Die PCR wurden nach diesem Schema für alle Gene durchgeführt, sowie für 4 endogene Kontrollen (GAPDH, β -Actin, CANX und B2M) und die beiden Negativkontrollen Blank 1 und 2.

Bei den endogenen Kontrollen handelt es sich um Gene, welche stets in der Zelle vorkommen. Sie dienen der Zellstruktur oder dem Zellstoffwechsel und werden von Einflüssen wie Entzündungen, Fieber oder Hormonausschüttungen nicht beeinflusst. Ihre PCR-Daten werden mit den PCR-Daten der zu untersuchenden Gene verrechnet um mögliche Unterschiede auszugleichen. Ein Test der Stabilität der verschiedenen potenziellen endogenen Kontrollen (B2M, GAPDH, β -Actin) ergab, dass CANX das stabilste Gen darstellte. Demnach erfolgte die Auswertung anhand dieses Gens.

Tabelle 5: Protokoll Real-Time PCR

Vorbereitung	Proben und Reagenzien auftauen	ca. 30 Minuten	
PCR-Mix herstellen	3,5 μ l autoklaviertes Wasser 5 μ l Master-Mix 0,5 μ l Primer		
Vorlegen	9 μ l in jedes Well einer 96 Loch-Platte		
cDNA zufügen	1 μ l jeder Probe in Doppelbestimmung in die Wells pipettieren		
Platte verschließen	Im Anschluss die 96-Loch-Platte mit Hilfe einer Klebefolie luftdicht verschließen		
Zentrifugieren	bei 1000g	ca. 1 Minute	
Real Time Cycler	Einlegen der Platte in das Schubfach des Cyclers		
Aktivierung der DNA-Polymerase	bei 50°C	2 Minuten	
Denaturierung	bei 95°C	10 Minuten	
Denaturierung	bei 95°C	15 Sekunden	} 40x
Annealing, Elongation	bei 60°C	60 Sekunden	

5.2.3.5. Auswertung

Zur Bestimmung der Expression des Zielgens, wird dieses mit der Expression der endogenen Kontrolle gegen gerechnet. Durch diese Normalisierung verringert sich die Varianz des Zielgens. Die Berechnung der Expressionsunterschiede erfolgt anhand der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Der dafür benötigte CT-Wert („cycle threshold“) ist der Punkt an dem in allen Probengefäßen die gleiche Menge synthetisierter DNA vorhanden ist. Der CT-Wert richtet sich nach einem definierten Fluoreszenzniveau, welches nach einer undefinierten Zahl an PCR-Zyklen erreicht wird. Zur Normalisierung der Expression wird zunächst der CT-Wert der endogenen Kontrolle vom CT-Wert des Zielgens subtrahiert ($\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT endogene Kontrolle}$). Im nächsten Schritt wird vom ΔCT -Wert der Proben der ΔCT -Wert einer Kontrolle, einer biologischen Kontrollgruppe, abgezogen ($\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT Zielgen} - \Delta\text{CT Kontrolle}$). Bei einer optimalen PCR erfolgt die Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus. Daher lässt sich die relative Menge mit $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ermitteln (PFAFFL 2004). Bei dem durchgeführten Versuch erfolgte die PCR im Doppelversuch. Daher wurde der Mittelwert beider CT-Werte (CT-Mean) errechnet und mit diesem die weitere Rechnung durchgeführt. Die Effizienz der PCR wird vom Hersteller der verwendeten Reagenzien mit einer Effizienz von $100\% \pm 10\%$ angegeben. Daher erfolgte die Rechnung der relativen Menge wie beschrieben.

Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism erfolgten die graphische Darstellung der RQ-Werte sowie die statistische Auswertung. Diese erfolgte mit Hilfe einer ein-faktoriellen ANOVA, bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde ein parametrischer Test (t-Test) angeschlossen. Lag keine Normalverteilung vor wurde der Mann-Whitman Test (nicht-parametrischer Test) angewendet. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen liegt vor, wenn $p < 0,05$ ist.

5.3. Magnetresonanztomographie

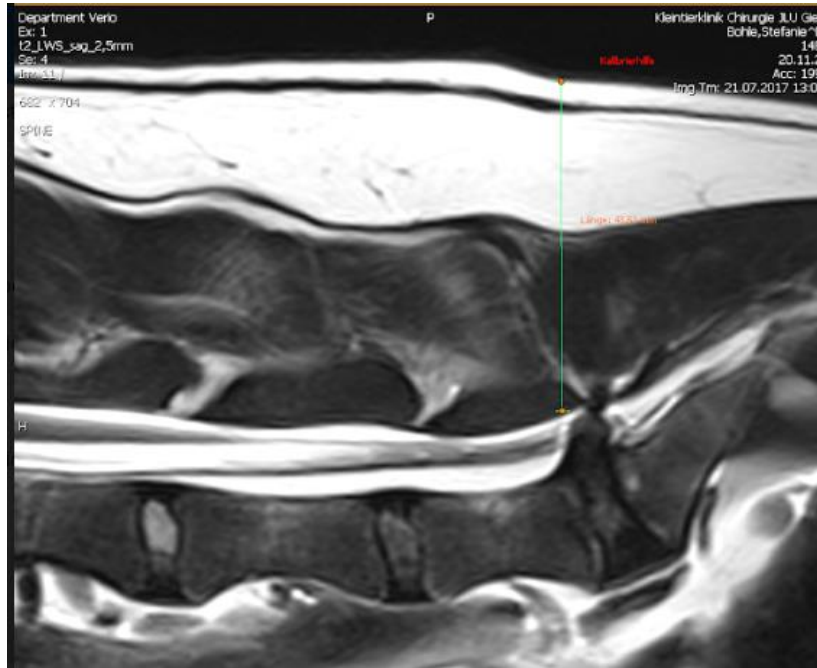
Das MRT stellt seit seiner Entdeckung im Jahr 1964 ein wichtiges bildgebendes Diagnostikum dar (REISER und SEMMLER 1997). Die Grundlage bilden die Wasserstoffatome, die im Körper vorhanden sind. Sie bestehen aus einem Proton und einem Elektron, wobei das Proton sich um sich selbst dreht. Diese Eigenbewegung wird Spin genannt. Werden die Protonen in ein äußeres Magnetfeld eingebracht, verändert sich ihr Spin. Sie richten sich parallel oder antiparallel zu dem äußeren Magnetfeld aus. Diese Ausrichtung wird als Präzessionsbewegung bezeichnet und geschieht immer mit einer bestimmten Frequenz, der Lamorfrequenz. Es richten sich immer mehr Protonen parallel aus, da es energetisch günstiger ist. Der energetische Unterschied der parallelen und antiparallelen Spins stellt sich als Längsmagnetisierung in der Z-Ebene dar. Wird nun ein elektromagnetischer Hochfrequenzimpuls mit einer Frequenz, welcher der Lamorfrequenz entspricht, ins Gewebe eingebracht, kippt die Längsmagnetisierung aus der Z-Ebene in die XY-Ebene, transversale Magnetisierung. Das System wird angeregt. Die Bewegung der transversalen Magnetisierung induziert in einer Empfangsspule eine Wechselspannung, deren Frequenz der Lamorfrequenz entspricht und das MR-Signal darstellt. Mit Hilfe von Computern wird daraus über die Fourier Transformation das MRT-Bild erstellt. Nach der Anregung durch den Hochfrequenzimpuls, nimmt die Magnetisierung in der XY-Ebene langsam ab und baut sich erneut in der Z-Ebene auf. Dieser Vorgang wird als longitudinale Relaxation bezeichnet. Die dabei frei werdende Energie wird an die Umgebung, „Gitter“, abgegeben und wird daher auch als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet. Die Zeit, T_1 , die für diesen Vorgang benötigt wird, ist abhängig von der Stärke des äußeren Magnetfeldes. Die Spins beeinflussen sich zusätzlich gegenseitig. Jeder Spin besitzt ein eigenes Magnetfeld, welches eine Wirkung auf die anderen Spins ausübt. Damit ändert sich permanent die Stärke der Magnetfelder der Spins, indem sie untereinander Energie abgeben und aufnehmen. Dabei kommt es zu keiner Energieabgabe an die Umgebung. Dieser Vorgang wird als transversale Relaxation bezeichnet oder auch Spin-Spin-Relaxation und bewirkt die

Abnahme der transversalen Magnetisierung und damit des MR-Signals. Er wird durch das äußere Magnetfeld nur in geringem Maße beeinflusst. Die Zeitkonstante wird als T2 bezeichnet. Drei wesentliche Faktoren sind für die Intensität des MR-Bildes entscheidend. Diese sind die Protonendichte des Gewebes, die T1-Relaxationszeit und die T2-Relaxationszeit. Die T1-Zeit gibt an wie schnell die Protonen nach einer Anregung erneut angeregt werden können und sind für die Signalintensität wichtig. Die T2-Zeit gibt die Zeit bis zum Erlöschen des MR-Signals nach einer Anregung an. Diese Zeiten können beeinflusst werden und je nachdem ist das MR-Bild T1- oder T2-gewichtet und unterscheidet sich in seinem Gewebekontrast. In einem T1-gewichteten Bild erscheint Fett hell und Wasser dunkel, während bei T2 beides hell dargestellt wird (REISER und SEMMLER 1997; WEISHAUPT et al. 2013).

5.3.1. Messung der subkutanen Fettschicht im MRT

Um die Menge des Fettgewebes zu bestimmen und zu Vergleichen wurde die Strecke von der Hautoberfläche mit zum Epiduralraum des lumbosakralen Übergangs gemessen und anschließend die Dicke der subkutanen Fettschicht des Hundes. Diese Strecken wurden rechnerisch miteinander ins Verhältnis gesetzt um den prozentualen Anteil der subkutanen Fettschicht zu bestimmen. Diese Messungen erfolgten anhand von MRT-Bildern des Lendenwirbelbereichs eines 3 Tesla MRTs (Siemens Verio) im Sagittalschnitt in T1-Wichtung mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms des EasyVet-Programms. Die Kontrollgruppe für die Messung der Fettschicht besteht aus 9 Deutschen Schäferhunden, welche sich in einem Alter von 1-3 Jahren befanden und weder klinische Symptome noch MRT-Befunde im Bereich des lumbosakralen Übergangs aufzeigten. Es waren 2 männliche und 7 weibliche Hunde vertreten, die ein normales Körpergewicht aufwiesen.

A



B

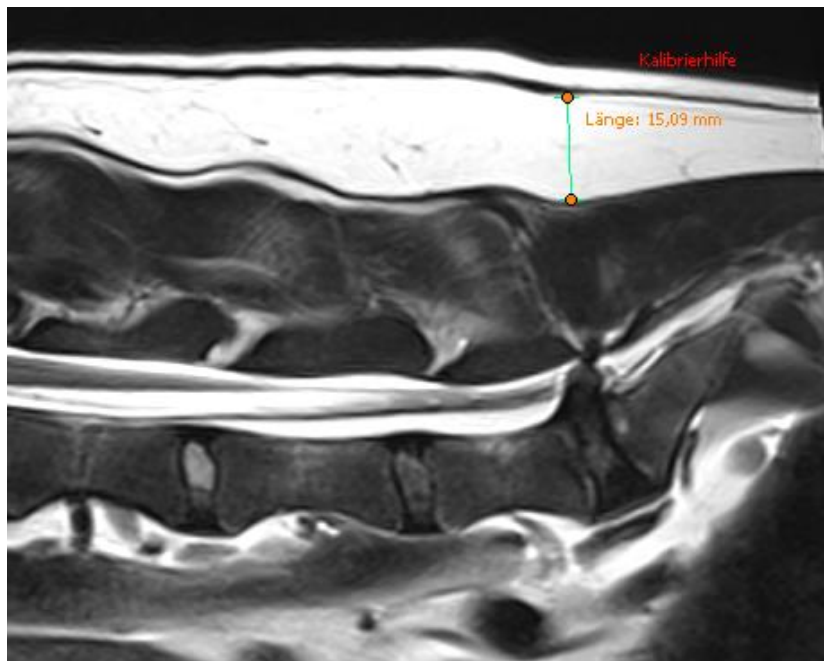


Abb. 14: Messung der subkutanen Fettschicht auf Höhe des lumbosakralen Übergangs eines erkrankten Hundes im MRT-Bild: Saggittalausrichtung in T1-Wichtung. Bild A: Messung der Gesamtstrecke von der Hautfaszie bis zum Epiduralraum. Bild B: Messung der subkutanen Fettschicht

5.3.2. Messung der epiduralen Fettschicht im MRT

Die Messung des epiduralen Fettes am lumbosakralen Übergang erfolge mit Hilfe des Programms Amira 4.1. Dafür wurde anhand der MRT-Bilder eines 3 Tesla MRTs in Transversalausrichtung in T2-Wichtung die Fläche des epiduralen Fettgewebes oberhalb der Bandscheibe zwischen dem letzten Lendenwirbel und dem ersten Kreuzbeinwirbel in 3 Schnitten bestimmt. Mit Hilfe des Programms wurde zum einen die Fläche des epiduralen Fettes in transversaler Ausrichtung markiert, zum anderen die der *Cauda equina* Fasern. Das Amira-Programm hat anhand der 3 Schnitte das Volumen sowohl des Fettes als auch der *Cauda equina* Fasern berechnet. Aus diesen beiden Werten wurde das Verhältnis rechnerisch bestimmt, um den prozentualen Anteil des Fettgewebes zu erhalten.

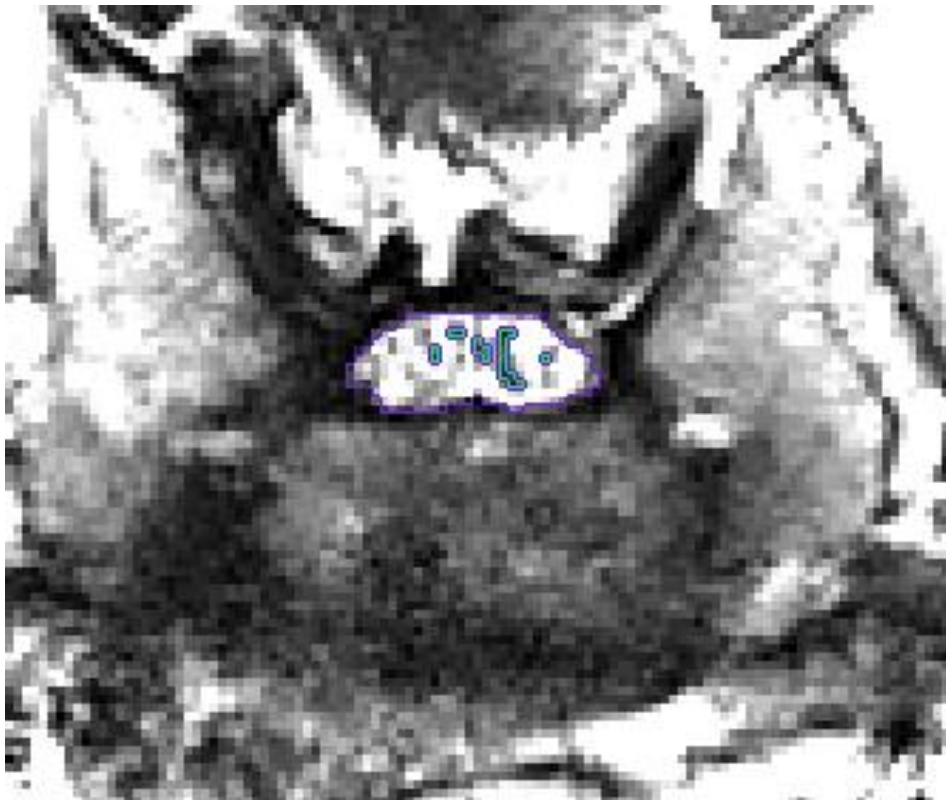


Abb. 15: Messung der Menge des epiduralen Fettes (in Lila hervorgehoben) und der *Cauda equina* Fasern (in Türkis hervorgehoben) im MRT-Bild in T2-Wichtung im Transversalschnitt.

6. Ergebnisse

6.1. Messungen der Zytokinkonzentrationen von Fettgewebsüberständen mittels Zytokin-Bioassays

Im Institut für Veterinärphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde von der Projektgruppe von Professor Rummel durch Dr. Verena Peek bereits Versuche an Fettgewebeskulturen des epiduralen Fettgewebes durchgeführt. Die Methode wurde in der Dissertation von Frau Dr. Peek genau dargestellt (PEEK 2017), die Ergebnisse zu den Hunden allerdings nicht und werden im Folgenden beschrieben. Dabei wurde epidurales und subkutanes Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden entnommen und kultiviert. Die Kulturen wurden im Anschluss mit Lipopolysacchariden (LPS), HMGB1 und einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) inkubiert und mittels Zytokin-Bioassay die Menge an IL-6 und TNF α im Fettgewebsüberstand bestimmt. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied in der Ausschüttung dieser Adipozytokine zwischen dem epiduralem und dem subkutanem Fettgewebe nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass das epidurale Fettgewebe eine signifikant höhere Ausschüttung der genannten Adipozytokine aufweist als das subkutane Fettgewebe. Die Ausschüttung von TNF α zeigt bei der Inkubation mit LPS einen signifikanten Anstieg beider Fettgewebstypen im Vergleich zur Inkubation mit PBS ($p < 0,0001$), sowie zwischen den Lokalisationen des Fettgewebes ($p = 0,0002$) und im direkten Vergleich des epiduralen Fettgewebes ($p = 0,0004$). Es zeigte sich, dass das epidurale Fettgewebe eine signifikant höhere Ausschüttung nach der Inkubation mit LPS aufwies als das subkutane Fettgewebe. Dieser Effekt konnte auch bei der Inkubation mit HMBG1 nachgewiesen werden ($p = 0,0313$), wenn auch nicht in so ausgeprägtem Maße. Die Konzentration von IL-6 zeigte eine ähnliche Tendenz. Für den Haupteffekt Behandlung wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation mit PBS und LPS ($p < 0,0001$) nachgewiesen. Dieser konnte

gleichermaßen im Vergleich des epiduralen Fettgewebes welches einmal mit PBS und einmal mit LPS inkubiert wurde, aufgezeigt werden ($p = 0,0022$), sowie in der Betrachtung der beiden Lokalisationen des Fettgewebes ($p = 0,0009$). Die Ausschüttung von IL-6 nach der Inkubation mit HMGB1 wies ein ähnliches Verhalten auf. Die Betrachtung der beiden verschiedenen Inkubationen zeigte eine signifikant höhere Ausschüttung bei der Behandlung mit HMGB1 ($p = 0,0001$). Dieser signifikante Unterschied wurde auch bei der Betrachtung des epiduralen Fettgewebes ($p = 0,0025$) und der verschiedenen Fettgewebslokalisationen ($p < 0,0001$) nachgewiesen.

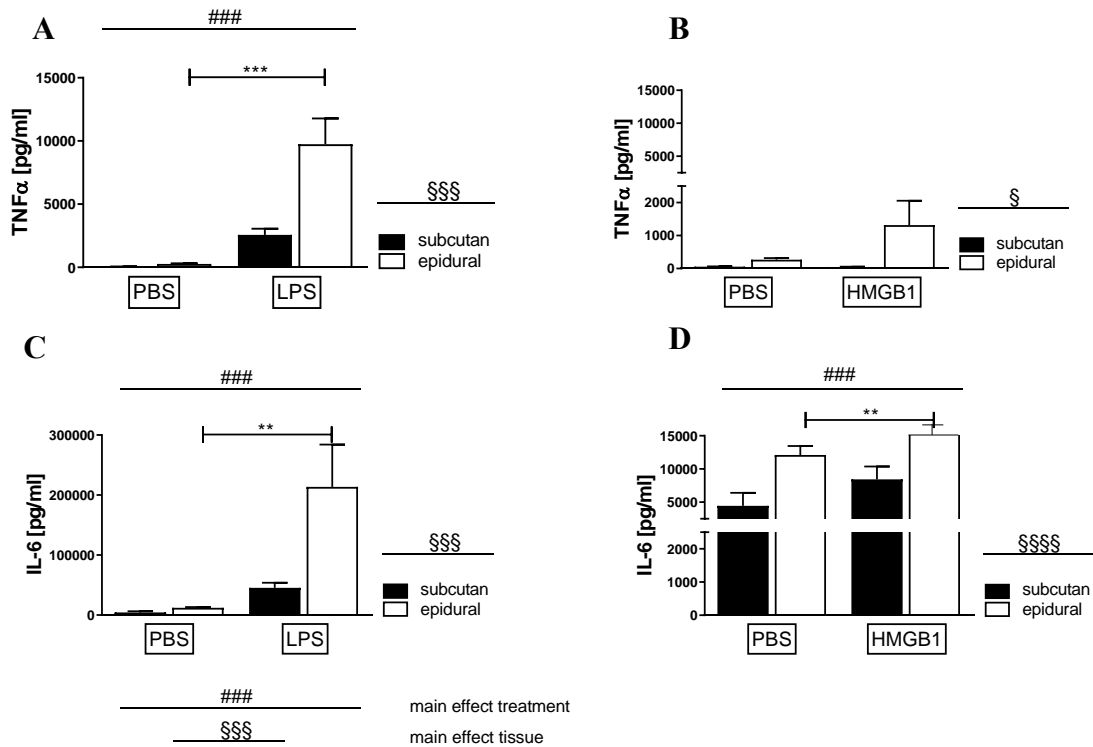


Abb. 16: Darstellung der Zytokinkonzentration in Fettgewebsüberständen der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden in Abhängigkeit der Behandlung der Fettgewebekulturen mit HMGB1 oder LPS. Die Graphen A und B zeigen die Konzentration von TNF α nach Inkubation mit PBS und LPS (A) oder PBS und HMGB1 (B). Die Diagramme C und D stellen die Konzentration von IL-6 nach Inkubation mit PBS und LPS (C) und PBS und HMGB1 (D) dar. Dargestellt wird der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Inkubation mit PBS erfolgt als Kontrollkulturen. In allen Ansätzen konnte eine signifikant höhere Ausschüttung von IL-6 und TNF α im epiduralen Fettgewebe im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe aufgezeigt werden. Die Berechnung der Signifikanz der Inkubation des epiduralen Fettgewebes mit PBS und LPS bzw. HMGB1 erfolgte mittels Post-hoc-Test. (A) ### $p < 0,0001$; *** $p = 0,0004$; \$\$\$ $p = 0,0002$; (B) § $p = 0,0313$; (C) ### $p < 0,0001$; ** $p = 0,0022$; \$\$\$ $p = 0,0009$; (D) ### $p = 0,0001$; ** $p = 0,0025$; \$\$\$\$ $p < 0,0001$.

6.2. Bestimmung der Entzündungsmediatoren des epiduralen und subkutanen Fettgewebes mittels PCR

Es erfolgte der quantitative Nachweis mehrerer Adipozytokine mittels PCR, für welche ein Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen in der Humanmedizin und Veterinärmedizin bereits nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus erfolgte die erneute Betrachtung der Adipozytokine, welche in dem Versuch von Dr. Verena Peek (6.1) bereits untersucht wurden. Der Versuch stützt sich insgesamt auf die Untersuchung von 10 Adipozytokinen. Bei diesen handelt es sich um die Zytokine TNF α , IL-6, IL10, sowie folgende weitere Mediatoren: CRP, Substanz P, CALC α , Leptin und HMGB1 sowie dessen zwei Rezeptoren RAGE und TLR4. Die Ergebnisse der Real-Time PCR wurden mit den endogenen Kontrolle CANX gegen gerechnet und relativ quantifiziert, da die Ergebnisse mit CANX der getesteten potenziellen endogenen Kontrollen am stabilsten waren.

6.2.1. Relative Expression von IL-6 im epiduralen und subkutanen Fettgewebe

Der quantitative Nachweis der mRNA von IL-6 aus dem subkutanem und dem epiduralen Fettgewebe der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde und der gesunden Kontrollgruppe zeigte eine signifikante Erhöhung von IL-6 im epiduralen Fettgewebe der erkrankten Hunde ($p = 0,0297$). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem bereits durchgeführten Versuch der Fettgewebsüberstände (6.1). In der Betrachtung des subkutanen Fettgewebes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Hunden und Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

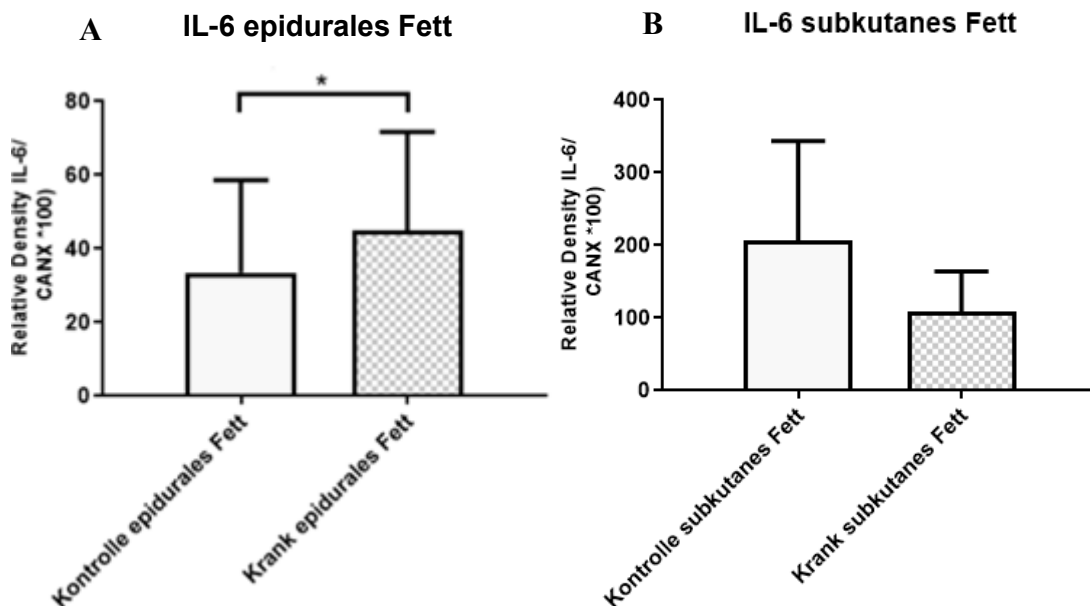


Abb. 17: Graphische Darstellung der Expression von IL-6 aus epiduralen und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden.

Die Darstellung erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung. Diagramm A zeigt eine signifikante Erhöhung der IL-6 Expression des epiduralen Fettgewebes der an CES erkrankten Hunde im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im subkutanem Fettgewebe zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (B).

(A) Hauptfaktor Krankheit * $p = 0,0297$.

6.2.2. Relative Expression von IL-10 im epiduralen und subkutanen Fettgewebe

Die Messung der relativen Expression von IL-10 aus dem epiduralen Fettgewebe der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde zeigte keine signifikant höhere Ausschüttung der erkrankten Hunde als im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Im subkutanen Fettgewebe konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden.

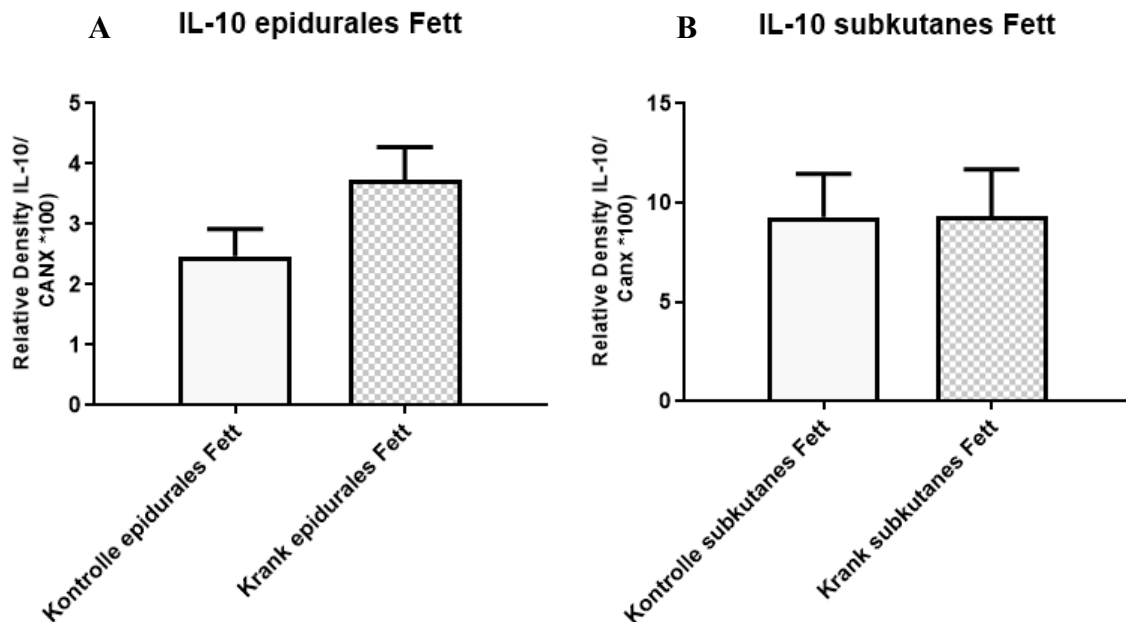


Abb. 18: Graphische Darstellung der Expression von IL-10 aus epiduralen und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden. Da es sich bei den Ergebnissen der relativen Expression um eine Normalverteilung handelt, erfolgt die Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung. Diagramm A zeigt keine signifikante Erhöhung der IL-10 Expression des epiduralen Fettgewebes der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Im subkutanem Fettgewebe zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (B).

6.2.3. Relative Expression von TNF α im epiduralen und subkutanen Fettgewebe

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte die relative Messung der TNF α mRNA-Expression eine signifikant höhere Bildung im epiduralen Fettgewebe der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde als im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,0177$). Dieser Unterschied konnte auch in der Messung des subkutanen Fettgewebes nachgewiesen werden, auch wenn sich die Signifikanz des epiduralen Fettgewebes ausgeprägter darstellte ($p = 0,0212$).

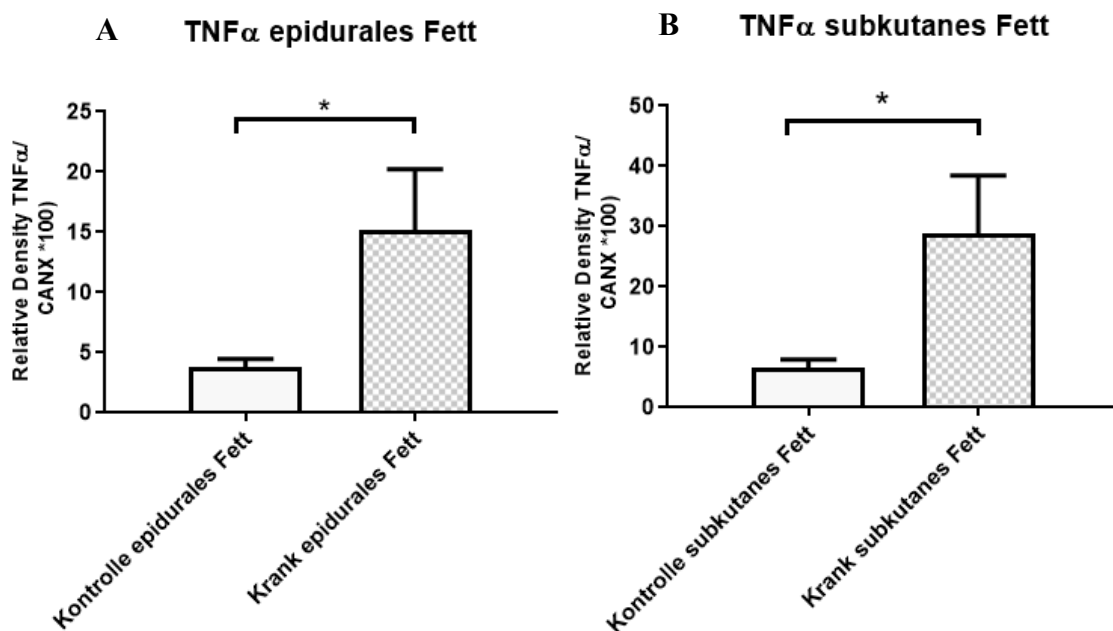


Abb. 19: Graphische Darstellung der Expression von TNF α aus epiduralen und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung. Diagramm A zeigt eine signifikante Erhöhung der TNF α Expression des epiduralen Fettgewebes der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Im subkutanem Fettgewebe konnte ebenfalls eine signifikant höhere Ausschüttung der erkrankten Tiere nachgewiesen werden (B). (A) Hauptfaktor Krankheit * $p = 0,0177$; (B) Hauptfaktor Krankheit * $p = 0,0212$.

6.2.4. Relative Expression von Leptin im epiduralen und subkutanen Fettgewebe

In der Bestimmung der relativen Expression von Leptin konnte im epiduralen Fettgewebe der Kontrollgruppe eine signifikant höhere Expression nachgewiesen werden als im Vergleich zur Gruppe der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde ($p = 0,0044$). Das gleiche Ergebnis stellte sich im subkutanen Fettgewebe dar ($p = 0,0297$). Die Signifikanz für das epidurale Fettgewebe fällt jedoch deutlich höher aus.

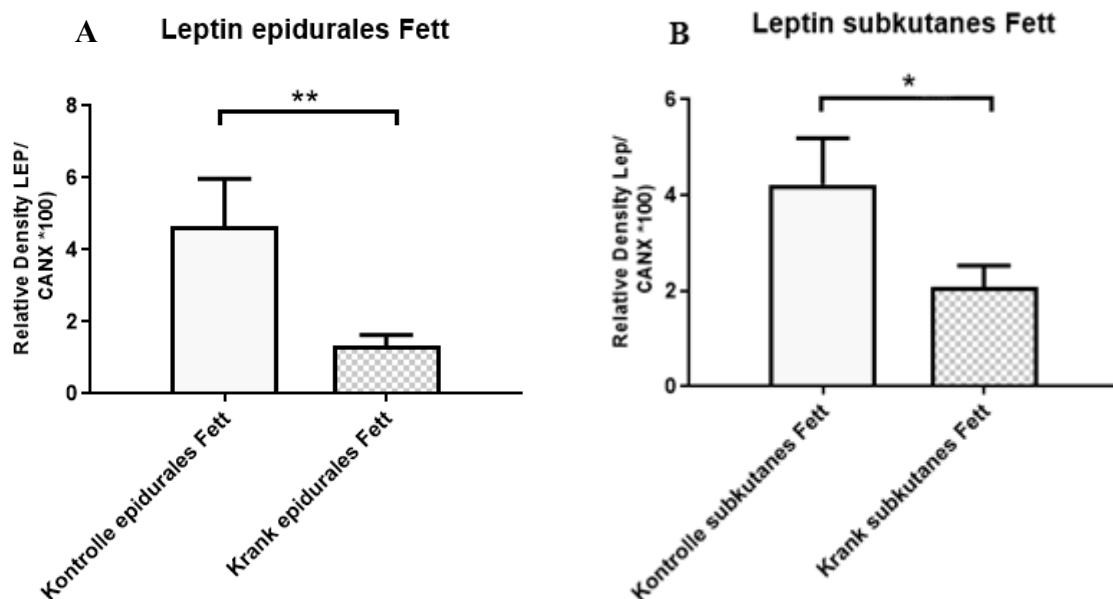


Abb. 20: Graphische Darstellung der Expression von Leptin aus epiduralem und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung. Diagramm A zeigt die relative Expression von Leptin im epiduralen Fettgewebe; Diagramm B die des subkutanen Fettgewebes. Beide Diagramme zeigen eine signifikant höhere Expression von Leptin der Kontrollgruppe sowohl im epiduralen als auch im subkutanen Fettgewebe. (A) Hauptfaktor Krankheit ** $p = 0,0044$; (B) Hauptfaktor Krankheit * $p = 0,0297$.

6.2.5. Relative Expression von Substanz P im epiduralen und subkutanen Fettgewebe

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei der PCR sowohl des epiduralen als auch des subkutanen Fettgewebes von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden und der Kontrollgruppe nur in vereinzelt Proben eine Expression nachgewiesen werden. Daher war keine statistische Auswertung dieses Parameters möglich.

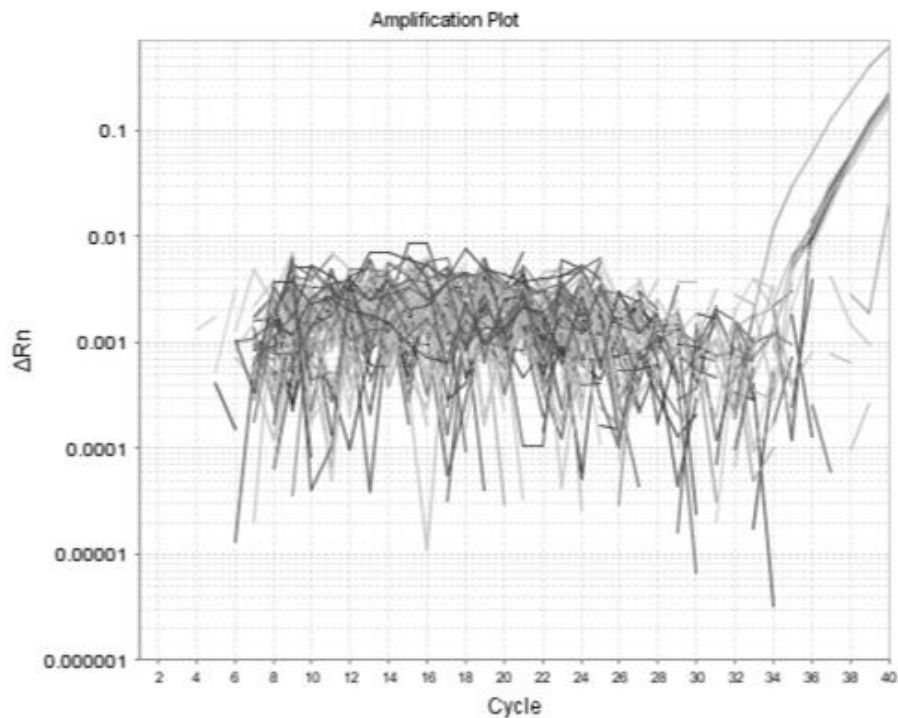


Abb. 21: PCR-Verlauf von Substanz P im epiduralen und subkutanen Fettgewebe der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde und der Kontrollgruppe. Das Diagramm zeigt die PCR-Zyklen des epiduralen und subkutanen Fettgewebes nach vorheriger Zugabe des Primers für Substanz P. Nur bei vereinzelt Proben ist ein Anstieg der DNA-Menge ab Zyklus 32 sichtbar.

6.2.6. Relative Expression von CRP im epiduralen und subkutanen Fettgewebe

Bei der PCR des subkutanen und epiduralen Fettgewebes mit den Primern für CRP konnte nicht in allen Proben eine Expression nachgewiesen werden. Daher ist die Auswertung dieses Versuches nur eingeschränkt möglich. Im epiduralen Fettgewebe der Kontrollgruppe konnte bei 7 von 9 gesunden Hunden eine Expression nachgewiesen werden, bei den am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden waren es 9 von 15. Im subkutanen Fettgewebe war ein Nachweis bei 3 von 9 gesunden Hunden möglich, bei den erkrankten waren es ebenfalls 9 von 15. In der graphischen Darstellung ist ein Unterschied in der relativen Expression sichtbar, diese ist jedoch nicht signifikant.

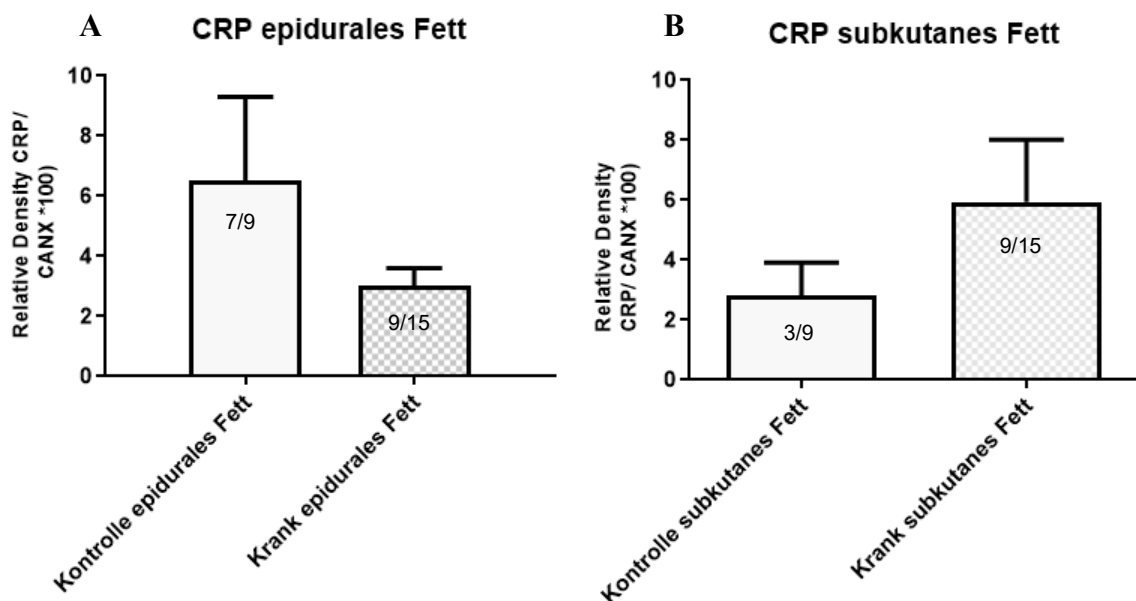


Abb. 22: Graphische Darstellung der Expression von CRP aus epiduralem und subkutanem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden.

Die Darstellung erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung. Diagramm A zeigt die relative Expression von CRP im epiduralen Fettgewebe der erkrankten Hunde und der Kontrollgruppe. Es ist eine höhere Expression bei der Kontrollgruppe sichtbar, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. In Diagramm B ist die Expression im subkutanen Fettgewebe dargestellt. Auch dabei ist ein Unterschied innerhalb der beiden Gruppen erkennbar, aber auch dieser ist nicht signifikant.

6.2.7. Relative Expression von CGRP α im epiduralen und subkutanen Fettgewebe

Im Rahmen dieser Arbeit konnte im epiduralen Fettgewebe ein signifikanter Unterschied in der Höhe der relativen Expression von CGRP α zwischen den am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden und der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p = 0,0293$). Dabei wiesen die gesunden Kontrolltiere eine höhere Expression auf. Im subkutanen Fettgewebe wurde kein signifikanter Unterschied gefunden.

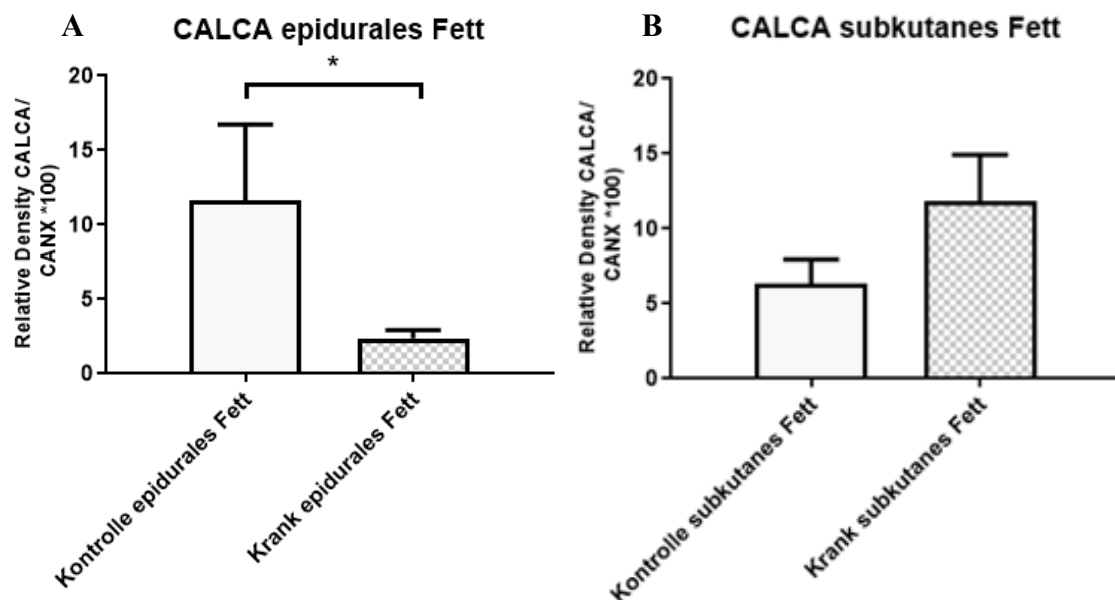
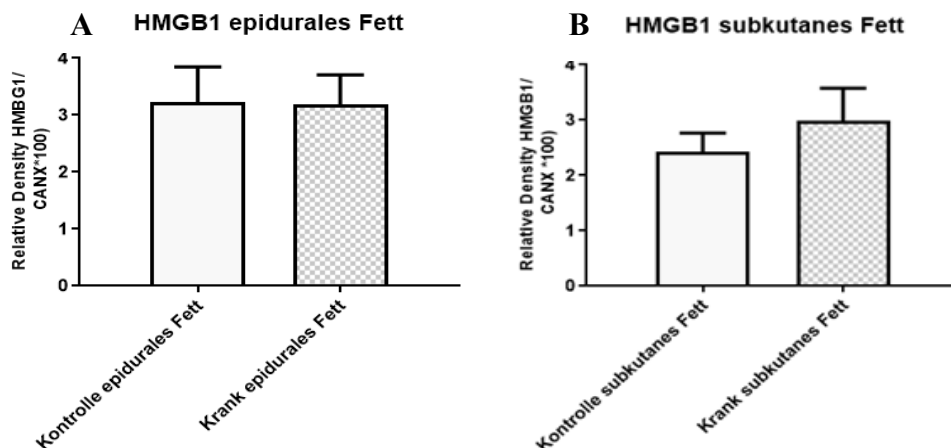


Abb. 23: Graphische Darstellung der relativen Expression von CGRP α aus dem epiduralen und subkutanen Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung. Diagramm A zeigt die relative Expression von CGRP α im epiduralen Fettgewebe der erkrankten Hunde und der Kontrollgruppe. Es ist eine signifikant höhere relative Expression der gesunden Hunde sichtbar ($p = 0,0293$). In Diagramm B ist die relative Expression im subkutanen Fettgewebe dargestellt. Diese zeigt keinen signifikanten Unterschied. (A) Hauptfaktor Krankheit * $p = 0,0293$.

6.2.8. Relative Expression von HMGB1 und seiner beiden Rezeptoren TLR4 und RAGE im epiduralen und subkutanen Fettgewebe

Es wurde die relative Expression von HMGB1 und seiner beiden Rezeptoren RAGE und TLR4 im epiduralen und subkutanen Fettgewebe der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde und der gesunden Kontrollgruppe bestimmt. Dabei konnte für HMGB1 kein signifikanter Unterschied in der relativen Expression im epiduralen oder subkutanen Fettgewebe beider Gruppen bestimmt werden. Gleichermäßen verhält es sich bei der Menge der mRNA des RAGE-Rezeptors. Auch dabei konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Die relative Expression des TLR4-Rezeptors zeigt keinen signifikant höheren Nachweis im subkutanen oder epiduralen Fettgewebe der am Cauda equina Kompressions Syndrom erkrankten Hunde.



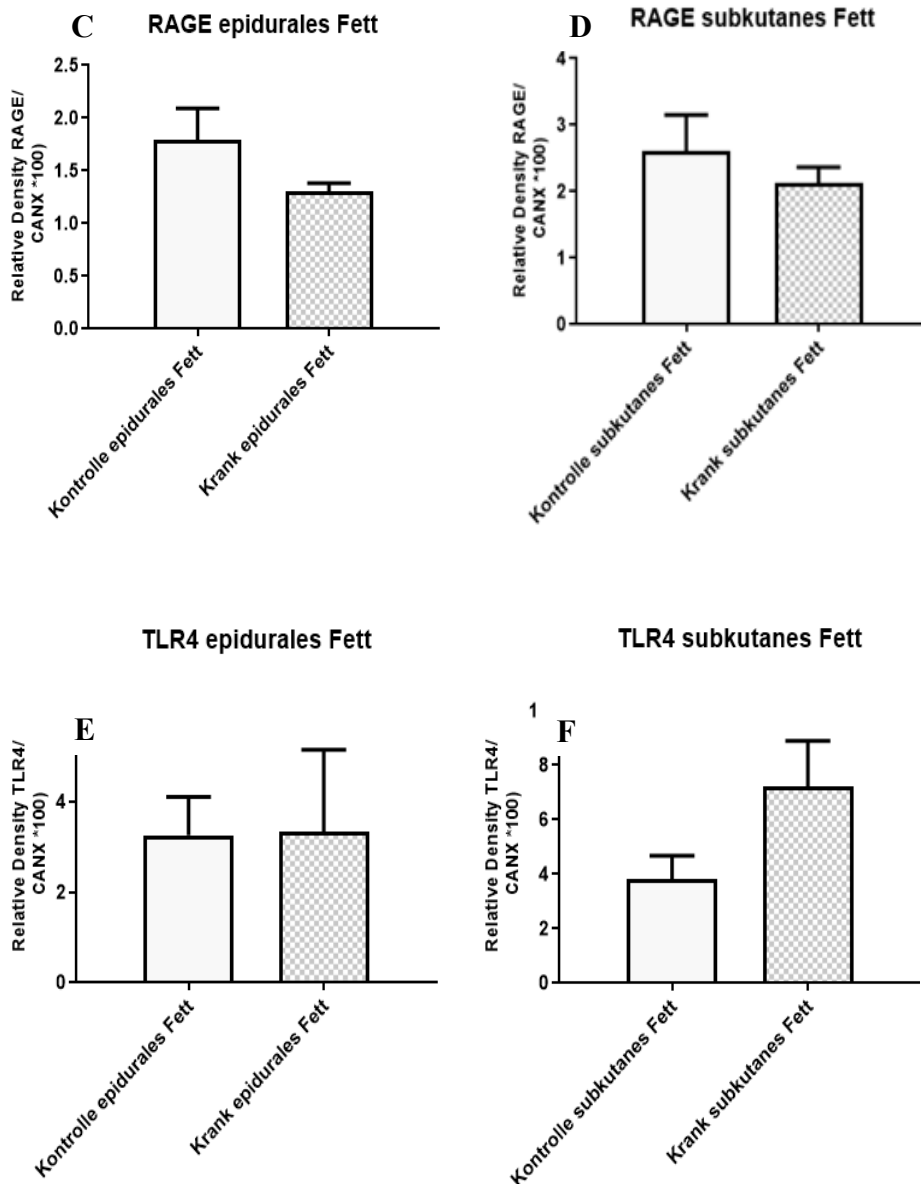


Abb. 24: Graphische Darstellung der relativen Expression von HMGB1, RAGE und TLR4 aus dem epiduralen und subkutanen Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung. Diagramm A stellt die relative Expression von HMGB1 im epiduralen Fettgewebe ohne signifikanten Unterschied zwischen der erkrankten und der gesunden Gruppe dar. Diagramm B stellt diese für das subkutane Fettgewebe dar, ebenfalls ohne signifikanten Unterschied der beiden Gruppen. Diagramm C zeigt die relative Expression von RAGE des epiduralen Fettgewebes, in Diagramm D ist sie für das subkutane Fettgewebe aufgezeigt. In beiden konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Diagramm E stellt den Nachweis für TLR4 ohne signifikanten Unterschied beider Gruppen dar. Diagramm F zeigt keine signifikant höhere Expression von TLR4 im subkutanen Fettgewebe der erkrankten Hunde.

6.3. Messung der Fettmenge des subkutanen und epiduralen Fettgewebes anhand von MRT-Bildern von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden und einer gesunden Kontrollgruppe

Da viele der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Adipozytokine, wie bereits beschrieben, maßgeblich von der Menge des Fettgewebes beeinflusst werden, erfolgte die Bestimmung der Menge des epiduralen und subkutanen Fettgewebes wie bereits unter 5.3 beschrieben anhand von MRT-Bildern. Dabei wurde für das subkutane Fettgewebe die Schichtdicke im Verhältnis zur Strecke ausgehend von der Hautoberfläche bis zum Epiduralraum bestimmt. Für das epidurale Fett wurde das Volumen von diesem auf Höhe des lumbosakralen Übergangs ermittelt.

6.3.1. Messung der subkutanen Fettschicht auf Höhe des lumbosakralen Übergangs

Da das subkutane Fettgewebe sehr individuell ausgebildet ist, erfolgte die Bestimmung der relativen Dicke im Verhältnis zur Gesamtstrecke von der Hautoberfläche bis zum Epiduralraum. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Fettdicke zwischen den am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden und der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,0023$).

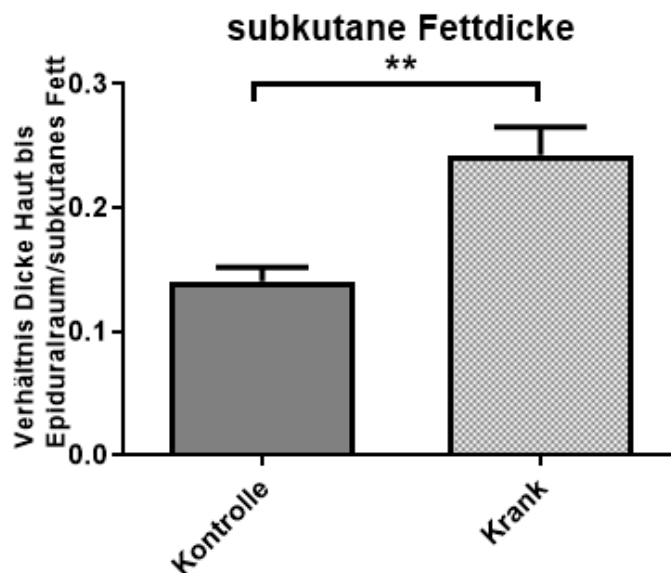


Abb. 25: Vergleich der relativen subkutanen Fettdicke von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert mit Standardabweichung. Es zeigt sich eine signifikant höhere Dicke der Fettschicht der erkrankten Hunde im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. ** Hauptfaktor Krankheit $p = 0,0023$.

6.3.2. Messung der epiduralen Fettmenge auf Höhe des lumbosakralen Übergangs

Es wurde das Volumen des epiduralen Fettgewebes oberhalb der Bandscheibe zwischen dem letzten Lendenwirbel und dem ersten Kreuzbeinwirbel einer am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hundegruppe und einer gesunden Kontrollgruppe bestimmt.

Es konnte ein signifikant höherer Anteil an epiduralem Fettgewebe bei den gesunden Hunden nachgewiesen werden, als im Vergleich zu den am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden ($p < 0,0001$).

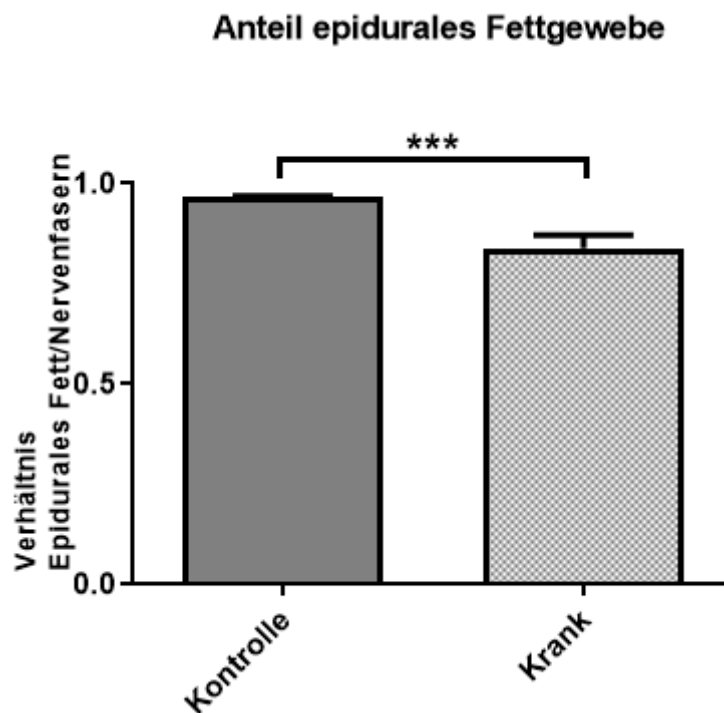


Abb. 26: Graphische Darstellung des Anteils an epiduralem Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden und einer gesunden Kontrollgruppe. Es erfolgt die Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichung. Die Graphen zeigen einen signifikant höheren Anteil an epiduralem Fettgewebe bei der gesunden Kontrollgruppe im Vergleich zu den erkrankten Hunden. *** Hauptfaktor Krankheit $p < 0,001$.

6.4. Stichpunktartige Zusammenfassung der Ergebnisse

- Die Sekretion von IL-6 und TNF α des epidurales Fettgewebes ist durch LPS und HMGB1 (nur IL-6) *in vitro* stärker stimulierbar als von subkutanen Fettgewebe.
- Signifikant höhere Expression von IL-6 und TNF α im epiduralen Fettgewebe der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde
- Signifikant höhere Expression von TNF α im subkutanen Fettgewebe der erkrankten Hunde
- Signifikant höhere Expression von Leptin im epiduralen und subkutanen Fettgewebe der gesunden Kontrollgruppe
- Signifikant höhere Expression von CGRP α im epiduralen Fettgewebe der gesunden Kontrollgruppe
- Kein signifikanter Unterschied in der Expression von IL-10, CRP, HMGB1, RAGE und TLR4 sowohl im epiduralen als auch im subkutanen Fettgewebe beider Gruppen
- Kein Nachweis der Expression von Substanz P in einem Großteil der Proben
- Signifikant höhere Fettdicke der subkutanen Fettschicht der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde
- Signifikant geringerer Anteil des epiduralen Fettgewebes der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde

7. Diskussion

Bereits seit Jahrzehnten ist bekannt, dass das Fettgewebe eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Entzündungen spielt (EIRMANN et al. 2009). So konnte im Rahmen verschiedener Studien die Entstehung unterschiedlicher Erkrankungen auf die Ausschüttung von Adipokinen aus dem Fettgewebe vor allem im Zusammenhang mit Adipositas zurückgeführt werden (EIRMANN et al. 2009). Darüber hinaus ließ sich beispielsweise die Entstehung von Arthrose im Knie beim Menschen nur auf die Produktion von Adipokinen aus dem intraartikulären Fettkörper zurückführen, ohne dass sonst eine Prädisposition in Form von Übergewicht oder Fehlstellung bestand (NEES et al. 2018). In der Veterinärmedizin wurde dieses Themengebiet bisher vor allem beim Hund wenig untersucht, daher ist es eine besonders interessante Fragestellung, vor allem für epidurales Fettgewebe. Zudem konnte die Ursache des Cauda equina Kompressions-Syndrom des Hundes bisher nicht vollständig geklärt werden (LANG et al. 2015). Dementsprechend ist die Kombination beider Themengebiete eine bisher noch nicht vorgenommene Betrachtung. Wie bereits unter 6.1 beschrieben wurden im Vorfeld bereits Untersuchungen auf diesem Themengebiet durchgeführt. Dabei wurden die Konzentrationen von IL-6 und TNF α in Fettgewebsüberständen von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden mit Hilfe von Zytokin-Bioassays nach Stimulation mit LPS oder HMGB1 bestimmt. Auf diesen Ergebnissen bauen die Untersuchungen dieser Arbeit auf. Sie wurden durch Untersuchungen von epiduralem und subkutanem Fettgewebe auf verschiedene Adipozytokine per real-time PCR ergänzt. Gleichzeitig erfolgte eine Untersuchung, ob und inwieweit die Mengen an Adipozytokinen mit der gemessenen Menge des subkutanen und epiduralen Fettgewebes im Zusammenhang stehen, um die Expression der Entzündungsmediatoren besser einschätzen zu können.

7.1. Konzentration von IL-6 und TNF α in Fettgewebsüberständen

Die Untersuchung der Fettgewebsüberstände auf IL-6 und TNF α nach der Stimulation mit LPS zeigte eine signifikant höhere Ausschüttung dieser beiden Entzündungsmediatoren vom epiduralen Fettgewebe der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde als im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe derselben Hunde. Der gleiche Effekt konnte bei der Inkubation mit HMGB1 dargestellt werden (signifikant für IL-6). Das zeigt, dass das epidurale Fettgewebe nach Reizung durch einen Stimulus eine höhere Entzündungsreaktion aufweist als das subkutane Fettgewebe nach derselben Stimulation. Da IL-6 eine entscheidende Rolle für die Aktivierung der Akut-Phase-Reaktion hat und die Ausschüttung weiterer Entzündungsmediatoren wie z.B. CRP bewirkt, geht mit der vermehrten Ausschüttung dieses Interleukins eine Steigerung der Entzündungsreaktion einher (MIHARA et al. 2012). Im Rahmen des Cauda equina Kompressions-Syndroms des Hundes spielt dieser Nachweis eine wichtige Rolle vor allem im Zusammenhang mit der Entstehung der lokalen Entzündung und des Schmerzes. So konnten SCHMIDT et al. 2013 bereits aufzeigen, dass IL-6 eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen aufweist. Kommt es beispielweise im Rahmen eines Bandscheibenvorfalles im lumbosakralen Übergang zur Gewebezzerstörung resultiert daraus, nach den Untersuchungsergebnissen der Fettgewebeskulturen, eine vermehrte Ausschüttung von IL-6, welches die Entzündungskaskade initiiert bzw. weiter triggert. Zusätzlich ist es mit verantwortlich für ein erhöhtes Schmerzempfinden in diesem Bereich. Dieser Effekt erklärt die oftmals gefundene Differenz zwischen den gezeigten klinischen Symptomen der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde und den Befunden der bildgebenden Diagnostik (MORGAN et al. 1993; SCHARF et al. 2003). TNF α steht noch mehr als IL-6 am Beginn der Entzündungskaskade. Es wird ebenfalls unter anderem aus den Makrophagen von Adipozyten ausgeschüttet und stimuliert die Ausschüttung weiterer Entzündungsfaktoren wie beispielweise IL-6 (GADIANT und OTTEN 1997). Die hier vorliegenden Ergebnisse der

Fettgewebekulturen bestätigen demnach, dass epidurales Fettgewebe zu einer Entzündungsreaktion beim Cauda equina Kompressions-Syndrom beitragen kann. Exogene (LPS) und endogene (HMGB1) Stimuli vermögen das epidurale Fettgewebe deutlich stärker zu stimulieren als subkutanes Fettgewebe.

7.2. Relative Expression von Adipokinen und Entzündungsmediatoren vergleichend zwischen dem epiduralen und subkutanen Fettgewebe von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten und gesunden Hunden

In der Untersuchung des subkutanen und epiduralen Fettgewebes der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde und der gesunden Kontrollgruppe zum Nachweis der Bildung verschiedener Adipozytokine erfolgte eine relative Quantifizierung dieser mittels real-time PCR. Dabei wurde die relative Expression der mRNA von typischen proinflammatorischen Entzündungsmediatoren wie IL-6, TNF α , CRP und HMGB1 zusammen mit seinen beiden Rezeptoren RAGE und TLR4 bestimmt. Darüber hinaus erfolgte der Nachweis des Adipokins Leptin, welches im direkten Zusammenhang mit der Menge an Fettgewebe steht. Zusätzlich wurden Entzündungsmediatoren untersucht, welche eine Rolle bei der Entstehung von neuropathischem Schmerz spielen. Bei diesen handelt es sich im Rahmen dieser Arbeit um CGRP α und Substanz P (EGLE et al. 2003; ZHANG et al. 2001). Zudem erfolgte der Nachweis des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (SABAT et al. 2010).

Bei der statistischen Auswertung der relativen Expression dieser Entzündungsmediatoren konnte zum ersten Mal eine signifikant höhere Expression von IL-6 und TNF α im epiduralen Fettgewebe der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ergänzt und untermauert die Befunde aus den Untersuchungen der

Fettgewebekulturen. Wir konnten damit tatsächlich nachweisen, dass das Cauda equina Kompressions-Syndrom von Entzündung auch im epiduralen Fettgewebe begleitet ist, welches direkten Einfluss auf die anliegenden Gewebe haben kann. Diese proinflammatorischen Zytokine haben eine sehr große Bedeutung für Entzündungsreaktionen und könnten zu Pathomechanismen der Schmerzentstehung beitragen. Die Zytokine werden im Zusammenhang der Kompression der *Cauda equina* vermehrt exprimiert. Bei länger anhaltender Kompression kommt es zur Schädigung der Wurzelzellen was zur Apoptose führt, diese konnte im Zusammenhang mit der Schmerzentstehung nachgewiesen werden (SEKIGUCHI et al. 2004). Infiltrierende Makrophagen sind hauptverantwortlich für die Bildung von TNF α im epiduralen Fettgewebe (WEISBERG et al. 2003). Das könnte die erhöhte TNF-Expression im Rahmen des chronischen Geschehens im epiduralen Fettgewebe erklären.

Für die restlichen Entzündungsmediatoren konnte kein signifikanter Unterschied im epiduralen Fettgewebe der erkrankten Hunde im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis kann unter anderem mit der bereits unter 7.1 aufgeführten Erläuterung begründet werden. Zusätzlich handelt es sich bei beiden Erkrankungen, dem Cauda equina Kompressions-Syndrom des Hundes (STOCK et al. 2009) und der Osteoarthritis des Menschen (NEES et al. 2018), um chronische Krankheitsprozesse. Zu Beginn des Cauda equina Kompressions-Syndroms kommt es zur Gewebeschädigung und damit zu einer akuten Entzündungsreaktion mit der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren aus dem zerstörten Gewebe, unter anderem dem epiduralen Fettgewebe. Im Verlauf der Erkrankung kommt es durch verschiedene Mechanismen des Körpers zur Eindämmung dieser Entzündung. Die Entzündung geht in einen chronischen Prozess über, sodass viele der Entzündungsmediatoren runterreguliert werden. Die PCR, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, zeigte keinen signifikanten Unterschied beider Hundegruppen in der Expression von IL-10, CRP, HMGB1 und RAGE aus dem epiduralen Fettgewebe. Eine mögliche Erklärung dafür ist der bereits beschriebene chronische Verlauf der Erkrankung. Des Weiteren konnte kein

signifikanter Unterschied von Substanz P zwischen den erkrankten und gesunden Hunden im epiduralen Fettgewebe nachgewiesen werden bzw. konnte es nur in wenigen Proben nachgewiesen werden. Da es sich bei beiden Substanzen um Transmitter von Schmerzfasern handelt, könnte ein Nachweis von beiden aus den Nervenfasern der *Cauda equina* und vor allem auf Proteinebene notwendig sein, um die Ergebnisse dieser Messung besser beurteilen zu können, da diese beiden Entzündungsmediatoren vor allem im Nervengewebe vorhanden sind (EGLE et al. 2003; ZHANG et al. 2001). Diese Untersuchung könnte in Form von Ganglienzellkulturen oder Gewebsschnitten des Rückenmarks durchgeführt werden. Der Nachweis von IL1 β , CGRP α und Substanz P in diesen Kulturen wäre ein wichtiger Aspekt um das Schmerzgeschehen weiter zu untersuchen, da diese Mediatoren nachweislich an der Entstehung von neuronalem Schmerz beteiligt sind. Untersuchungen solcher Art wurden bereits an Ratten im Rahmen der Migräneforschung vorgenommen (HELLEN 2016). Diese Probenentnahme ist im Rahmen einer Laminektomie aus Tierschutzgründen an lebenden Hunden allerdings nicht ohne genehmigten Tierversuchsantrag durchführbar und ist ethisch schwer zu vertreten.

Im subkutanen Fettgewebe der erkrankten und gesunden Hunde konnte zum ersten Mal eine signifikante Erhöhung von TNF α bei der erkrankten Gruppe festgestellt werden. Hunde, die am Cauda equina Kompressions-Syndrom leiden, zeigen oft noch weitere Entzündungen in anderen Körperbereichen, wie beispielsweise des Pankreas oder des Harntraktes. Diese zusätzlichen Entzündungen werden meist durch den Stress ausgelöst unter dem die Tiere aufgrund der Erkrankung stehen. Dieser wird durch die Einschränkungen ausgelöst, unter welchen die Hunde leiden. Zudem äußert sich die Erkrankung wie unter 3.3 beschrieben durch eine vermehrte Inaktivität (STEFFEN 2017; LANG et al. 2015), was zu einer Störung der Magen-Darm-Motilität führen kann. Im Zusammenhang mit dem Stress können sich Begleiterkrankungen entwickeln, beispielsweise eine Pankreatitis. Zusätzlich ist ein weiteres mögliches Symptom die Harninkontinenz (STOCK et al. 2009), welche durch

die Störung des Blasensphinkters zum Aufsteigen von Bakterien in die Harnblase führen kann. Daraus resultiert die Entstehung einer Zystitis. Diese Begleiterkrankungen sind mögliche Erklärungen für die Erhöhung der genannten Entzündungsparameter im subkutanen Fettgewebe. Da die erkrankten Hunde in der Regel schon seit einem längeren Zeitraum an dem Cauda equina Kompressions-Syndrom leiden, können entsprechend auch die Folgeerkrankungen seitdem bestehen. Das wäre eine mögliche Theorie für den nicht signifikanten Unterschied der anderen nachgewiesenen Entzündungsmediatoren im subkutanen Fettgewebe.

Zusätzlich wurde eine signifikant niedrigere Expression von Leptin im epiduralen und subkutanen Fettgewebe der kranken Hunde im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen. Diese Messung ist von besonderem Interesse. Normalerweise weisen Tiere eine erhöhte Leptinausschüttung auf, die einen hohen Körperfettanteil haben (HÄMMERLING 2009; HAHN et al. 2006). Die gesunde Kontrollgruppe hat laut der MRT-Aufnahmen einen niedrigeren Fettanteil von subkutanem Fettgewebe, dafür aber mehr epidurales Fettgewebe als die erkrankten Tiere. Einige Untersuchungen zeigen, dass Leptin protektive Funktion auf das Rückenmark haben kann (REN et al. 2018). So könnte eine verringerte Leptin-Bildung im epiduralen Fettgewebe bei geringerer Menge an Fettgewebe der erkrankten Hunde darauf hinweisen, dass zu wenig Leptin gebildet wird und parakrin Nervengewebe schützen kann. Allerdings sind auch negative proinflammatorische Wirkungen für Leptin beschrieben worden (MOULTRIE 2004). Eine zusätzliche Messung dieses Adipokins mit Hilfe einer anderen Nachweismethode auf Proteinebene, wie beispielsweise mittels ELISA (Homogenate oder Überstände) wäre in weiterführenden Untersuchungen von besonderem Interesse.

Desweiteren konnte eine signifikant höhere Expression von CGRP α im epiduralen Fettgewebe der gesunden Hunde nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis könnte aufgrund der Probenentnahme post mortem begründet sein. Da CGRP α zum einen durch bestimmte Noxe beeinflusst wird und zum anderen

auch Wirkungen auf die Motorik und das Kardiovaskuläre System hat (ZHANG et al. 2001; AMARA et al. 1985).

Darüber hinaus erfolgte der Abgleich der präoperativen Blutuntersuchung der erkrankten Tiere mit den Ergebnissen der PCR. Die Blutbilder und die Blutchemie der erkrankten Hunde waren alle ohne besonderen Befund. Damit wiesen die Hunde keine Anzeichen für eine systemische Entzündungsreaktion auf.

7.3. Auswertung der subkutanen Fettmessung

Es wurde, wie bereits unter 6.3.1 beschrieben, die Messung des subkutanen Fettgewebes im Verhältnis zur Gesamtstrecke von der Hautoberfläche bis zum Epiduralraum durchgeführt. Durch diese Messung soll die Menge des Fettgewebes beider Gruppen visualisiert werden, um die Menge der Ausschüttung der Entzündungsmediatoren besser einschätzen und auswerten zu können. Dabei wurde eine signifikant höhere subkutane Fettmenge bei den am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden festgestellt. Da Hunde, welche am Cauda equina Kompressions-Syndrom leiden vorher häufig im Hundesport eingesetzt wurden und durch die Beschwerden der Erkrankungen dieser Einsatz nicht mehr möglich ist (STEFFEN 2017; LANG et al. 2015), neigen diese Tiere zur Ausbildung von Übergewicht. Vermutlich passen die meisten Tierhalter in solchen Phasen nicht die Fütterung ihrer Tiere an oder zumindest nicht adäquat, da der verminderte Bedarf unterschätzt wird. Daher ist die Gefahr groß, dass diese Hunde vermehrt Fettdepots ausbilden, was sich mit der Messung im Rahmen dieser Arbeit deckt. Zusätzlich weisen übergewichtige Hunde eine erhöhte Anfälligkeit für andere Erkrankungen wie beispielweise eine Pankreatitis auf. Was die unter 7.2 beschriebene Theorie weiterer Entzündungen im Rahmen des Cauda equina Kompressions-Syndroms bestärkt. Die Messungen der subkutanen Fettmenge zeigen dementsprechend eine signifikant höhere Fettdicke der erkrankten Tiere. In der Humanmedizin konnte bereits belegt werden, dass die Bestimmung des

Fettvolumens anhand von MRT-Aufnahmen eine sichere Nachweismethode darstellt (SCHAUDINN et al. 2015; VOGT et al. 2007).

7.4. Auswertung der epiduralen Fettmessung

Zusätzlich erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Messung der epiduralen Fettmenge wie unter 6.3.2 beschrieben. Diese Messung wurde äquivalent zur Messung des subkutanen Fettgewebes zur besseren Auswertbarkeit der Ergebnisse der PCR durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikant geringere Menge an epiduralem Fettgewebe bei den erkrankten Hunden. Wie bereits beschrieben, kommt es im Rahmen des Cauda equina Kompressions-Syndroms beispielsweise zu einem Vorfall der Bandscheibe, welche zwischen dem letzten Lendenwirbel und dem ersten Kreuzbeinwirbel liegt (STEFFEN et al. 2008; STEFFEN 2017). Diese fällt in den Epiduralraum vor und führt zu einer Verdrängung und teilweise Zerstörung des Fettgewebes an dieser Stelle. Daher ist die signifikant geringere Menge des Fettgewebes in diesem Bereich bei den erkrankten Hunden plausibel und deckt sich mit den Messergebnissen. Die Verdrängung des epiduralen Fettgewebes geht mit einer signifikant höheren Expression im epiduralen Fettgewebe der erkrankten Hunde von IL-6 und TNF α einher. Die zusammenfassende Auswertung der Messung der Fettmenge und der Ergebnisse der PCR weisen daher auf eine erhöhte Aktivität des epiduralen Fettgewebes im Entzündungsgeschehen hin. Am Mausmodell konnte bereits belegt werden, dass Zytokine eine direkte Wirkung auf afferente Nervenfasern ausüben und darüber hinaus durch die Ausschüttung z.B. von Prostaglandinen oder Nervenwachstumsfaktoren, zu einer Stimulation der Nervenfasern führen und damit zu Schmerzreizen beitragen. Dabei zeigte sich, dass nach der Injektion von bestimmten Zytokinen wie IL-6 und TNF α sogar eine Hyperästhesie, eine axonale Demyelinisierung und eine Vermehrung der neuronalen Profile in spinalen Ganglien beobachtet werden konnte (SOMMER 2001, AHRENS et al. 2012). Inwieweit diese Beobachtung im Rahmen des

Cauda equina Kompressions-Syndroms eine Auswirkung auf die Schmerzen der erkrankten Hunde hat, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht werden.

Eine weitere Frage die sich im Rahmen dieser Studie stellt, ist ob die Menge des epiduralen Fettgewebes oder der Grad der Kompression für die Ausbildung der klinischen Symptome entscheidend ist. Da nachweisbar eine erhöhte Expression von Entzündungsmediatoren im epiduralen Fettgewebe der erkrankten Hunde vorliegt, ist hier von einem Entzündungsgeschehen auszugehen. Ist das subkutane Fettgewebe zusätzlich in größerer Menge ausgebildet, kann entsprechend auch von einer größeren Ausschüttung von Entzündungsmediatoren ausgegangen werden. Zusätzlich kommt es im Rahmen der Kompression der *Cauda equina* zu einer mechanischen Zerstörung der Zellen, was einen zusätzlich Entzündungs- und Schmerzreiz zur Folge hat. Einer der Mediatoren, die dabei endogen freigesetzt und diskutiert werden ist HMGB1, welches aus zerstörten Zellen freigesetzt wird und so zu einer Entzündungsreaktion führt (SCAFFIDI et al. 2002). Wie hier gezeigt, wird HMGB1 in der Tat in beiden Fettgewebslokalisationen gebildet. Außerdem konnte HMGB1 die Sekretion von IL-6 in den Kulturen des epiduralen Fettgewebes stark erhöhen. Entsprechend ist eine Beteiligung beider Komponenten, sowohl dem Grad der Kompression und Entzündung im epiduralen Fettgewebe als auch der Menge des subkutanen Fettgewebes, bei der Ausbildung der klinischen Symptome der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde zu diskutieren. Welcher Mechanismus eine größere Rolle spielt, kann im Rahmen dieser Studie nicht weiter bestimmt werden.

7.5. Kritische Betrachtung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der relativen Expression der genannten Entzündungsmediatoren. Ergänzend wäre die exakte Bestimmung ihrer Menge mittels ELISA oder Bioassay aus den Überständen von

Fettgewebskulturen oder Fettgewebshomogenaten wünschenswert. Zum einen könnte so die exakte Ausschüttung bestimmt werden. Zum anderen wäre die Untersuchung weiterer Adipozytokine wie IL-1, Adiponektin und Resistin interessant, da auch diese eine wichtige Rolle beim Entzündungsprozess spielen. Als weiteren Kritikpunkt ist die Kontrollgruppe für die Messung der subkutanen und epiduralen Fettmenge zu erwähnen. Es handelte sich bei dieser um 1-3 jährige Deutsche Schäferhunde, welche im Rahmen einer anderen Dissertation untersucht wurden. Aufgrund des Alters und der Rasse weisen diese Tiere von vornerein eine geringere Fettmenge auf. Eine Alternative wäre die prozentuale Bestimmung des Verhältnisses des epiduralen und subkutanen Fettgewebes zueinander.

Zusätzlich erfolgte die Probenentnahme der erkrankten Hunde in Narkose, wo hingegen die Proben der Kontrollgruppe von toten Tieren entnommen wurden. Auch wenn die Proben unmittelbar nach Eintritt des Todes entnommen wurden, muss ein gewisser Einfluss auf die Probenqualität diskutiert werden. Untersuchungen zu Veränderungen des Gewebes in Folge von Autolyse und Proteinzerfall beziehen sich meist auf Stunden bis Wochen nach dem Eintritt des Todes (CLARK et al. 1997; INOUE 1933). Hier wurde allerdings mRNA untersucht. RNAsen sind im Gewebe immer vorhanden und können Ergebnisse empfindlich beeinflussen. Die Proben wurden deswegen in einem definierten, kurzen Zeitrahmen (ca. 1 Minute) schockgefroren, was eine Vergleichbarkeit gewährleistet. Eine Veränderung der Fettproben im Rahmen der Entnahme kann für die hier vorliegende Arbeit allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden.

Sowohl in der Gruppe der erkrankten Hunde, als auch in der Kontrollgruppe handelt es sich um eine sehr heterogene Verteilung. So waren Hunde von 0,5 Jahren bis 11 Jahren und Vertreter kleiner und großer Hunderassen in den Gruppen vorhanden, welche zusätzlich große Unterschiede in ihrer Körperkondition aufwiesen. In der Humanmedizin wurde bereits die Entwicklung des Immunsystems im Laufe des Alters untersucht. Dabei konnte aufgezeigt werden, dass die Funktion des Immunsystems mit voranschreiten des Alters

„nachlässt“, jedoch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und TNF α , zunimmt (KWETKAT 2010). Inwieweit diese Untersuchungen Einfluss auf die Ergebnisse aus dieser Studie haben, ist schwer abzuschätzen, da solche Untersuchungen beim Hund bisher nicht durchgeführt wurden. Ergebnisse aus Versuchen mit Ratten konnten zum Teil eine verstärkte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren unter anderem aus dem Fettgewebe alter Ratten aufzeigen (KOENIG et al. 2014).

Darüber hinaus erfolgte keine weitere Betrachtung der Fütterung der Hunde. So muss eine mögliche Fütterung von antiinflammatorischen Substanzen wie beispielsweise Omega-3-Fettsäuren und Grünlippenmuschel bedacht werden. Diese weisen zum Teil zusätzlich eine analgetische Wirkung auf (RADE 2015). In Folge dessen können sowohl die klinischen Symptome der Hunde als auch der Gehalt an Entzündungsmediatoren der Proben etwas verändert sein.

Der Großteil der erkrankten Hunde erhielt im Vorfeld eine antiinflammatorische und analgetische Therapie mit NSAID's, Gabapentin und/oder Cortison. Diese Medikamente sollten spätestens eine Woche vor dem geplanten chirurgischen Eingriff abgesetzt werden. Trotzdem ist es möglich, dass der Einsatz dieser Medikamente einen Einfluss auf die Ergebnisse hatte, da diese die lokale Entzündung unterdrücken indem sie unter anderem in die Arachidonsäurekaskade über Hemmung der Cyclooxygenase bzw. Phospholipase A2 eingreifen. Die Halbwertszeiten werden mit bis zu 48h bei den NSAID's und 12 Stunden für Gabapentin beschrieben (GUERRERO 2011; MOORE 2016). Daher sollte der Einfluss auf die hier dargestellten Ergebnisse als eher gering zu werten sein. Diese Medikamente führten während der Gabe zu einer Unterdrückung der Entzündung. Daher ist zum Zeitpunkt der Probenentnahme eventuell nur ein geringeres Maß der lokalen Entzündung ausgebildet und entsprechend nur ein kleinerer Anteil der Entzündungsmediatoren nachweisbar. Darüber hinaus muss bedacht werden, dass eventuell das Absetzen der Medikamente eine Woche vor der Operation durch den Besitzer nicht umgesetzt wurde.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Lagerung des Hundes während der MRT-Aufnahmen. Die Hunde liegen mit nach hinten ausgestreckten Hintergliedmaßen auf dem MRT-Tisch. Damit kommt es zu einer Veränderung der Position der Wirbel im lumbosakralen Übergang im Vergleich zur stehenden Position. Durch das Ausstrecken der Hinterbeine senken sich die Wirbel in diesem Bereich ab, was zu einer verstärkten Kompression der *Cauda equina* Fasern führt. Es ist eben diese Position die auch in der klinischen Untersuchung herbeigeführt wird, um eine mögliche Schmerzhaftigkeit zu provozieren (STEFFEN 2017) oder die beispielweise beim Treppen steigen eingenommen wird. Dementsprechend kann der Grad der Kompression im MRT-Bild stärker ausgeprägt dargestellt sein, als es in physiologischer Körperhaltung tatsächlich der Fall ist (BARTHEZ et al. 1994). Jedoch ist eine andere Lagerung während der MRT-Aufnahmen nicht möglich. Auch eine Position mit nach vorne ausgezogenen Hintergliedmaßen würden die Aufnahmen in ähnlicher Weise verändern.

Zur besseren Einschätzung der Ausschüttung der Entzündungsmediatoren auf das Schmerzgeschehen wäre eine Beurteilung der Schmerzhaftigkeit der betroffenen Hunde vor der bildgebenden Diagnostik und der Probenentnahme anhand einer objektiven Schmerzskala sinnvoll. Anhand dieser Einschätzung könnte im Anschluss ein Vergleich zwischen der Schmerzhaftigkeit und der Menge der Entzündungsmediatoren in einer zukünftigen auf den hier beschriebenen Ergebnissen ausbauende Studie durchgeführt werden. In dieser könnten weitere Adipokine wie beispielsweise IL-1 und Adiponektin untersucht werden, darüber hinaus wäre ein Vergleich der Schmerzhaftigkeit der Tiere mit der Höhe der nachgewiesenen Entzündungsmediatoren von Interesse.

8. Zusammenfassung

Mit Hilfe dieser Arbeit wurde untersucht, ob es einen signifikanten Unterschied in der Expression von Entzündungsmediatoren des epiduralen Fettgewebes beim Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankter Hunde im Vergleich zu nicht von dieser Erkrankung betroffenen Hunden gibt. Die Genexpression wurde zum einen im epiduralen und subkutanen Fettgewebe betrachtet und zum anderen zwischen erkrankten und nicht erkrankten Hunden verglichen. Die Untersuchung stützt sich auf die schon seit Jahren untersuchte und nun etablierten Theorie, dass Fettgewebe nicht nur eine Stütz- und Schutzfunktion hat, sondern auch ein endokrines Organ darstellt (EIRMANN et al. 2009). Die im Fettgewebe produzierten Adipokine konnten bereits bei Mensch und Tier in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen gebracht werden. Bei diesen handelt es sich unter anderem um Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Arthrose (AWAD und BRADFORD 2009). Zudem zeigte sich eine Beeinflussung des Immunsystems und des systemischen Entzündungsgeschehens durch das Fettgewebe (EIRMANN et al. 2009).

Es erfolgte die Entnahme von epiduralem und subkutanem Fett von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden und einer gesunden Kontrollgruppe. Anhand dieser Proben wurde die Expression bestimmter Adipokine und weiterer Entzündungsmediatoren (IL-6, IL-10, TNF α , CRP, Leptin, CGRP α , Substanz P, HMGB1, TLR4 und RAGE) mittels PCR bestimmt. Im Vorfeld wurde bereits die Ausschüttung von TNF α und IL-6 aus Fettgewebeskulturen von am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunden nach Stimulation mit LPS und HMGB1 mittels Bioassay untersucht. Zusätzlich wurde anhand von MRT-Bildern die Menge des subkutanen und des epiduralen Fettgewebes erkrankter Hunde und einer gesunden Kontrollgruppe ermittelt. Es wurden jeweils die Proben des epiduralen Fettgewebes der erkrankten und der gesunden Hunde und die des subkutanen Fettgewebes miteinander verglichen.

Die Ergebnisse der relativen Expression des epiduralen Fettgewebes der am Cauda equina Kompressions-Syndrom erkrankten Hunde, zeigt zum ersten Mal

eine signifikant höhere Expression von IL-6 und TNF α . Das gleiche Ergebnis zeigten auch die mit LPS und HMGB1 inkubierten Fettgewebekulturen der erkrankten Hunde. In der Messung des Fettgewebes konnte eine signifikant geringere Menge des epiduralen Fettgewebes nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet auf ein Entzündungsgeschehen des epiduralen Fettgewebes von am Cauda equina Kompressions-Syndroms erkrankten Hunden hin. Dies könnte zu der Pathophysiologie der Erkrankungen durch parakrine Prozesse beitragen. Interessanterweise war die Expression des Adipokins Leptin signifikant niedriger im epiduralen Fettgewebe kranker Hunde was möglicherweise auf einen Verlust protektiver Funktionen des Fettgewebes über Leptin auf das Nervengewebe hinweist. Für IL-10, CRP, HMGB1, RAGE und TLR4 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den erkrankten und den gesunden Hunden aufgezeigt werden. Der Nachweis von Substanz P war nur in wenigen der untersuchten Proben möglich daher konnte keine weitere Auswertung vorgenommen werden. TNF α konnte mit einer signifikanten Erhöhung im subkutanen Fettgewebe der erkrankten Hunde nachgewiesen werden. Zusätzlich wiesen diese Hunde eine signifikant höhere subkutane Fettdicke im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auf. Dieses Ergebnis deutet auf einen Bewegungsmangel und eine erhöhte Neigung zu sekundären Erkrankungen im Rahmen des Cauda equina Kompressions-Syndroms hin. Zur genaueren Einschätzung dieser Ergebnisse im Zusammenhang mit der Pathophysiologie der Erkrankung sind weiterführende Versuche mit epiduralem Fettgewebe sinnvoll. Hierfür wären beispielsweise Untersuchung mit weiteren Fettgewebekulturen sowie die Detektion der Entzündungsmediatoren auf Proteinebene und deren Korrelation zu Schmerzzuständen sinnvoll.

9. Summary

The aim of this study was to investigate whether there is a significant difference in the expression of inflammatory mediators of the epidural fatty tissue in the cauda equina compression syndrome in diseased dogs compared to dogs not affected by this disease. Gene expression was studied in epidural and subcutaneous adipose tissue and compared between diseased and healthy dogs. The study is based on the theory that adipose tissue not only has a supporting and protective function, but also represents an endocrine organ (EIRMANN et al. 2009). The adipokines produced in fatty tissue have already been linked to various diseases in humans and animals. These include diabetes, cardiovascular diseases and osteoarthritis (AWAD and BRADFORD 2009). In addition, an influence of the immune system and the systemic inflammatory process on the fatty tissue was shown (EIRMANN et al. 2009).

Epidural and subcutaneous fat was collected from dogs suffering from cauda equina compression syndrome and a healthy control group. Based on these samples, the expression of certain adipokines, adipocytokines and other inflammatory mediators (IL-6, IL-10, TNF α , CRP, leptin, CGRP α , substance P, HMGB1, TLR4 and RAGE) was determined by PCR. Previously, the release of TNF α and IL-6 from fat explant tissue cultures of dogs suffering from Cauda equina compression syndrome after stimulation with LPS and HMGB1 was investigated by bioassays. In addition, the amount of subcutaneous and epidural fat tissue of diseased dogs and a healthy control group was determined using MRI images. The epidural fat samples of the diseased and healthy dogs were compared with those of the subcutaneous adipose tissue.

The results of relative expression of epidural adipose tissue in dogs suffering from Cauda equina compression syndrome show a significantly higher expression of IL-6 and TNF α . The same result was also shown by the adipose tissue cultures incubated with LPS and HMGB1 in the diseased dogs. In the measurement of adipose tissue, a significantly lower amount of epidural adipose tissue was detected. This result indicates an inflammatory process in

the epidural fatty tissue of dogs suffering from Cauda equina compression syndrome. This could contribute to the pathophysiology of the disease by paracrine processes. Interestingly, the expression of the adipokine leptin was significantly lower in the epidural adipose tissue of sick dogs, possibly indicating a loss of protective functions of the adipose tissue via leptin to the nervous tissue. For IL-10, CRP, HMGB1, RAGE and TLR4 no significant differences between the diseased and healthy dogs could be shown. The detection of substance P was only possible in a few of the investigated samples and therefore no further analysis could be performed. TNF α could be detected with a significant increase in subcutaneous fat tissue in the diseased dogs. Additionally, these dogs showed a significantly higher subcutaneous fat thickness compared to the healthy control group. This result indicates a lack of exercise and an increased tendency to secondary diseases in the context of cauda equina compression syndrome. For a more precise assessment of these results in connection with the pathophysiology of the disease, further experiments with epidural adipose tissue are useful. For this purpose, for example, investigations with fat explant tissue cultures as well as the detection of inflammation mediators at the protein level linked to clinical plain scores would be useful.

10. Literaturverzeichnis

Abernethy T.J., Avery O.T. (1941): The occurrence during acute infection of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patients sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C-polysaccharide of pneumococcus. J. Exp. Med.; 73, S.173

Ahrens C., Schiltewolf M., Wang H. (2012): Zytokine im psychoneuroendokrinen immunologischen Kontext unspezifischer muskuloskeletaler Schmerzen. Der Schmerz; 26(4), S. 383-388

Amara S., Arriza J., Leff S., Swanson L., Evans R., Rosenfeld M. (1985): Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. Science; 229(4718), S. 1094-1097

Amort K.H. (2010): Magnetresonanztomographische Untersuchung zu frühdegenerativen Veränderungen der lumbosakralen Bandscheibe beim Deutschen Schäferhund. Klinik für Kleintiere, Chirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen

Andersson U., Wang H., Palmblad K., Aveberger A. C., Bloom O., Harris H., Janson A., Kokkola R., Zhang M., Yang H., Tracey K. J. (2000): HMG-1 stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. J Exp Med.; 192, S. 565-570.

Andersson U., Yang H., Harris H. (2018): Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. Expert Opin Ther Targets; 22(3), S.263-277

- Andus T.**, Heinrich P. C., Castell J. C., Gerok W. (1989): Interleukin-6: ein Schlüsselhormon der Akutphase-Reaktion. Dtsch. Med. Wschr.; 114, S.1710-1726
- Antuna-Puente B.**, Feve B., Fellahi S., Bastard J-P (2008): Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. Diabetes Metab, S.34:2-11
- Arock M.**, Zuany-Amorim C., Singer M., Benhamou M., Pretolani M. (1996) Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. European journal of immunology; 26, S. 166-170
- Awad A.B.**, Bradford P.G. (2009): Adipose Tissue and Inflammation. ebook CRC Press; 10, S. 167-188
- Barthez P.Y.**, Morgan J.P., Lipsitz D. (1994): Discography and epidurography for evaluation of the lumbosacral junction in dogs with cauda equina syndrome. Vet Radiol Ultrasound; 35, S.152-157
- Bergknut N.**, Auriemma E., Wijsman S., Voorhout G., Hagman R., Lagerstedt A.S., Hazewinkel H.A.W., Meij B.P. (2011): Evaluation of intervertebral disk degeneration in chondrodystrophic and nonchondrodystrophic dogs by use of Pfirrmann grading of images obtained with low-field magnetic resonance imaging. American Journal of Veterinary Research; 72, S.893-898
- Beutler B.**, Cerami A. (1986): Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. Nature; 320, S.584-588
- Bhattacharya, S.**, Schindler C. (2003): Regulation of Stat3 nuclear export. Journal of clinical investigation; 111, S.553-55
- Bohnsack M.**, Hurschler C., Wilharm A., Rühmann O., Stukenborg-Colsman C., Wirth C.J. (2005): Biomechanische und neurohistologische

Eigenschaften des Hoffaschen Fettkörpers im Zusammenhang mit dem Vorderen Knieschmerzsyndrom. Sportorthopädie – Sporttraumatologie; 21, S.37-45

Bokarewa M., Nagaev I., Dahlberg L., Smith U., Tarkowski A. (2005): Resistin, an Adipokine with Potent Proinflammatory Properties. <http://www.jimmunol.org/content/174/9/5789>

Breu D. (2015): Akute-Phase-Proteine bei Hund und Katze. kleintier konkret; 18(06), S.42 - 43

Bustin M., (2001): Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. Trends in Biochemical Science; 26, S. 152-153

Carrión M., Frommer K., Pèrez-Garcia S., Müller-Ladner U., Gomariz R., Neumann E. (2019): The Adipokine Network in Rheumatic Joint Diseases. International Journal Molecular Science; 20, 4091

Cho K.D., Paek J., Kang J.H., Chang D., Na K.J., Yang M.P. (2014): Serum Adipokine Concentrations in Dogs with Naturally Occurring Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism. J Vet Intern Med; 28, S.429–436

Clark M.A., Worrell M.B., Pless J.E. (1997): Postmortem Changes in Soft Tissues. Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains, S.151-164

Dascombe M.J., Hardwick A., Lefeuvre R.A., Rothwell N.J. (1989): Impaired effects of interleukin-1 beta on fever and thermogenesis in genetically obese rats. International Journal of Obesity; 13(3), S.367-373

De Risio, L., Thomas, W. B., Sharp, N. J. H. (2000): Degenerative lumbosacral stenosis. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.; 30, S.111-132

- De Waal Malefyt**, R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., De VRIES J.E. (1991): Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *Journal of experimental medicine*; 174, S.1209-1220
- Del Prete** G., De Carli M., Almerigogna M., Giudizi M.G., Bisgiotti R., Romagnani S. (1993): Human IL-10 is Produced by Both Type 1 Helper (Th1) and Type 2 Helper (Th2) T Cell Clones and Inhibits Their Antigen-Specific Proliferation and Cytokine Production. *Journal of immunology*; 150, S.353-360
- Distel E.**, Cadouda T., Durant S., Poignard A., Chevalier X., Benelli C. (2009): The infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis: an important source of interleukin-6 and its soluble receptor. *Arthritis Rheum*; 60(11), S.3374-3377
- Dong** Y., Fischer R., Neudé P., Maier O., Duffey M., Van der Zee E., Dekens D., Douwenga W., Herrmann A., Guenzi E., Kontermann R., Pfizenmaier K., Eisel U. (2016): Essential protective role of tumor necrosis factor receptor 2 in neurodegeneration., *Proc Natl Acad Sci USA*; 113(43), S.12304-12309
- Dumitriu** I. E., Baruah P., Bianchi M. E., Manfredi A. A., Rovere-Querini P. (2005): Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology*; 35, S. 2184-2190
- Egle** U.T., Hoffmann S.O., Lehmann K.A., Nix W.A. (2003): *Handbuch chronischer Schmerz, Grundlagen, Pathogenese, Klinik und Therapie aus bio-psycho-sozialer Sicht*. Schattauer Verlag, S. 57-58, ISBN 3-7945-2045-9

- Ehrhardt R.A.**, Slepatis R.M., Siegal-Willott J., van Amburgh M.E., Bell A.W., Boisclair Y.R. (2000): Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *J Endocrinol*; 166, S.519-528
- Eirmann L.A.**, Freeman L.M., Laflamme D.P., Miche K.E.I, Satyaraj E. (2009): Comparison of Adipokine Concentrations and Markers of Inflammation in Obese Versus Lean Dogs. *Intern J Appl Res Vet Med*; 7(4), S. 196-205
- Eisele I.**, Wood I.S., German A.J., Hunter L., Trayhurn P. (2005): Adipokine Gene Expression in Dog Adipose Tissues and Dog White Adipocytes Differentiated in Primary Culture. *Horm Metab Res*; 37, S.474- 481
- Esobar H. M.**, Meyer B., Richter A., Becker K., Flohr A. M., Gullerdiel J., Nolte I. (2003): Molecular characterization of the canine HMGB1., *Cytogenetic and Genomic Research*; 101, S. 33-38
- Faggioni R.**, Feingold K.R., Grunfeld C. (2001): Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J.*; 15, S.2565-2571
- Finbloom D.S.**, Winestock K.D. (1995): IL-10 induces the tyrosin phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *Journal of immunology*; 155, S. 1079-1090
- Fiorentino D. F.**, Bond M.W., Mosmann T.R. (1989): Two Types of Mouse T Helper Cells. *Journal of experimental medicine*; 170, S. 2081-2095
- Flower L.**, Gray R., Pinkney J., Mohamed-Ali V. (2003): Stimulation of interleukin-6 release by interleukin-1 beta from isolated human adipocytes, *Cytokine*; 21(1), S.32-37

- Flückiger M., Damur-Djuric N., Hässig M., Morgan J.P., Steffen F. (2006):** A lumbosacral transitional vertebra in the dog predisposes to cauda equina syndrome. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 47, S.39–44.
- Foitzik, U. (2016):** Pathomorphologie der Nervenwurzelkompression beim Hund, Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, S. 42-60
- Gadient R.A., Otten U.H.(1997):** Interleukin-6 (IL-6)-a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol*; 52, S.379–390.
- Garlanda C., Dinarello C.A., Mantovani A. (2013):** The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*; 39(6), S.1003-1018
- Geary T.W., McFadin E.L., MacNeil M.D., Grings E.E., Short R.E., Funston R.N., Keisler D.H. (2003):** Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *J Anim Sci*; 81, S.1-8
- Gonelevuea S., Bandyopadhyayb A., Bhagatc S., Alamd M., Khan G. (2018):** Sterile Inflammatory Role of High Mobility Group Box 1 Protein: Biological Functions and Involvement in Disease. *J Vasc Res*; 55, S. 244-254
- Gotschlich, E.C. (1962):** Occurrence of a substance analogous to C-reactive protein in acute phase dog sera. *Fed. Proc.*; 21, S.14
- Gruol D., Nelson T. (1997):** Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Molecular Neurobiology*; 15, S.307-339
- Guerrero K.K. (2011):** Perioperative Schmerztherapie beim Hund. *veterinär spiegel*; 21(02), S.76-82
- Gunasekaran M., Viranaicken W., Girard A., Fety F., Cesari M., Roche R. Hoareau L. (2013):** Inflammation triggers high mobility group box 1 (HMGB1) secretion in adipose tissue, a potential link to obesity. *Cytokine*; 64(1), S.103-111

- Gyllensten** U.B., Erlich, H.A. (1988). Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. Proc Natl Acad Sci U S A; 85(20), S.7652-7656.
- Gysling** C.H. (1984): Der Alterungsprozess der Zwischenwirbelscheiben beim Deutschen Schäferhund. Diss. med. vet., Zurich.
- Hagen** A.P. (1990): Alterung der Zwischenwirbelscheiben bei großwüchsigen Hunderassen., Inaugural-Dissertation med. vet., Zürich
- Hahn** S., Tan S., Jannsen O.E.(2006): Leptin-Neuroendokrine Wirkungen und Einflüsse auf den menschlichen Zyklus, Gynäkologische Endokrinologie, S. 33-38
- Hämmerling** R. (2009): Adipositas – Folge oder Auslöser einer metabolischen, endokrinen oder immunologischen Erkrankung?, Veterinär Spiegel; 19(03), S.130-135
- Hanser**, H. (Hrsg.) (2000): IL-6, Lexikon der Neurowissenschaft, Spektrum Akademischer Verlag (Heidelberg)
- Harrison** P., Downs T., Friese P., Wolf R., George J.N., Burstein S.A. (1996): Inhibition of the acute phase response in vivo by anti-gp130 monoclonal antibodies. Br. J. Haematol.; 95, S.443 – 451
- Helle** M., And L.B., Aarden L.A. (1988): Functional discrimination between interleukin 6 and interleukin 1. Eur. J. Immunol.; 18, S.1535-1540
- Hellen** P. (2016): Interleukin-1 β induziert Cyclooxygenase-2-abhängig eine Synthese von Prostaglandin E2 mit anschließender Sekretion des Proteins CGRP in einer Zellkultur aus trigeminalen Ganglienzellen der Ratte, Inaugural-Dissertation med., Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

- Hernanz A., Medina S., Miguel E., Matina-Mola E. (2003):** Effect of calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y, substance P, and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by peripheral whole blood cells from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients, *Regulatory Peptides*; 115, S.19-24
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R.(1992):** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*; 10(4), S. 413-417.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993).** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*; 11(9), S.1026-1030
- Himmerich H., Berthold-Losleben M., Pollmächer T. (2009):** Die Bedeutung des TNF- α -Systems für Erkrankungen des Gehirns, The Relevance of the TNF- α System in Psychiatric Disorder. *Fortschr Neurol Psychiat*; 77, S. 334–345
- Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M. (1993):** Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*; 259, S.87-99
- Huggett J., Dheda K., Bustin s., Zumla (2005):** Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun. Jun*; 6(4), S.279-84
- Huttunen H.J., Fages C., Rauvala H. (1999):** Receptor für advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation on NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem.*; 274, S.19919-19924
- Iannone F., Lapadula G. (2010):** Obesity and inflammation -- targets for OA therapy. *Curr Drug Targets*; 11(5), S.586-98

- Inouye T.** (1933), Der Restkohlenstoff und Reststickstoffgehalt des Muskels und ihre postmortale Veränderung. *Tohoku J. Exp. Med.*; 21, S.532.
- Jones J.C., Inzana K.D.** (2000): Subclinical CT abnormalities in the lumbosacral spine of older largebreed dogs. *Vet Radiol Ultrasound*; 41, S.19-26
- Kasper M., Zohmann A.** (2007): Ganzheitliche Schmerztherapie für Hunde und Katzen, 1. Auflage(2), S. 7-14
- Keel M., Ungethüm U., Steckholzer U., Niederer E., Hartung T., Trentz O., Ertel W.** (1997): Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood*; 90, S.3356-3363
- Keller U.** (2005): Vom Übergewicht zum metabolischen Syndrom- Wie die Insulinresistenz entsteht, Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und klinische Ernährung, www.endo-diabasel.ch
- Kemp D.J., Smith D.B., Foote S.J., Samaras N., Peterson M.G.** (1989): Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions., *Proc Natl Acad Sci U S A*; 86(7), S.2423-2427
- Kilpatrick J., Kearney J., Volanakis J.** (1982): Demonstration of calcium-induced conformational changes in C-reactive protein by using monoclonal antibodies. *Molec.Immunol.*; 19, S.1159 - 1165
- Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G.** (1971): Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*; 56(2), S.341-361
- Koenig S., Luheshi G., Wenz T., Gerstberger R., Roth J., Rummel C.**Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat. *Brain, Behavior and Immunity*; 36, S.128-138

- König** H.E., Liebich H.G. (2012): Anatomie der Haussäugetiere, 5. Auflage, S.485- 486, Schattauer Verlag
- Kotenko** S., Krause C.D., Izotova L.S., Pollack B.P., Wu W., Pestka S. (1997): Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. EMBO journal; 16, S.5894-5903
- Krenning** G., Moonen J.A.J, Harmsen M.C. (2009): Pleiotropism of adiponectin: inflammation, neovascularization, and fibrosis. Circ Res; 104(9), S.1029–31
- Kwetkat** A.(2010): Immunologie im Alter., Prävention und Gesundheitsförderung; 5 (01), S.46-50
- Lang** J., Jaggy A., Seiler G. (2015): Das Cauda-equina-Syndrom oder die degenerative lumbosakrale Stenose (DLSS) des Hundes, Departement für klinische Veterinärmedizin Universität Bern, URL: <http://www.1atoys.net/alanos-blog/das-cauda-equina-syndrom>
- Leisengang** S., Ott D., Murgott J., Nürnberger F., Gerstberger R., Rummel C., Schmidt M., Roth J. (2020): Effects of gabapentinoids on responses of primary cultures from rat dorsal root ganglia to inflammatory or somatosensory stimuli., J Basic Clin Physiol Pharmacol. doi: 10.1515/jbcpp-2019-0261
- Li** J., Kokkola R., Tabibzadeh S., Yang R., Ochani M., Qiang X., Harris H. E., Czura C. J., Wang H., Ulloa L., Wang H., Warren H. S., Moldawer L. L., Fink M. P., Andersson U., Tracey K. J., Yang H. (2003): Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. Molecular Medicine; 9, S.37-45
- Linz**, U., Degenhardt, H. (1990): Die Polymerase-Kettenreaktion, Ein Überblick, Naturwissenschaften; 77, S. 515-530

- Loppnow** H. (2001): Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen, Internist; 42, S.13–27, Springer-Verlag
- Lüllmann** H., Mohr K., Hein L. (2006): Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen, 16. Auflage, S. 119, Thieme Verlag, ISBN 3-13-368516-3
- Maccoux** L.J., Salway F., Day P.J., Clements D.N. (2007): Expression profiling of select cytokines in canine osteoarthritis tissues. Veterinary immunology and immunopathology; 118, S. 59-67
- Mayhew** P.D., Kapatkin A.S., Wortman J.A., Vite C.H. (2002): Association of cauda equina compression on magnetic resonance images and clinical signs in dogs with degenerative lumbosacral stenosis. J Am Anim Hosp Assoc; 38, S.555-562.
- McCoy** E. S., Taylor-Blake B., Street S.E., Pribisko A.L., Zheng J., Zylka M.J. (2013): Peptidergic CGRP α primary sensory neurons encode heat and itch and tonically suppress sensitivity to cold, Neuron; 78, S.138-151
- Messmer** D., Yang H., Telusma G., Knoll F., Li J., Messmer B., Tracey K. J., Chiorazzi N.(2004): High Mobility Group Box Protein 1: An Endogenous Signal for Dendritic Cell Maturation and Th1 Polarization. The Journal of Immunology; 173, S.307-313
- Mihara** M., Hashimuzé M., Yoshida H., Suzuki M., Shiina M. (2012): IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. Clinical Science; 122, S.143-159
- Moore** S.A. (2016): Managing Neuropathic Pain in Dogs. Front Vet Sci; 22(3), S.12
- Morgan** J.P., Bahr A., Franti C.E., Bailey C.S. (1993): Lumbosacral transitional vertebrae as a predisposing cause of cauda equina syndrome in German

Shepherd Dogs: 161 cases (1987-1990)., J Am Vet Med Assoc; 202(11), S. 1877-1882

Mülhardt C. (2009): Der Experimentator, Molekularbiologie/Genomics, Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage, S.84-119

Müller H.J., Prange D.R. (2016): PCR – Polymerase Kettenreaktion, 2. Auflage, Springer Spektrum, S.49-76

Mullis K.B., Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol; 155, S.335-350

Nees T.A. , Rosshirt N., Reiner T., Schiltenswolf M., Moradi B. (2018): Die Rolle der Inflammation bei Arthroseschmerzen, Der Schmerz; 33, <https://doi.org/10.1007/s00482-018-0346-y>

Nelson R.W. , Guillermo C.C. (2010) : Innere Medizin der Kleintiere., 2. Auflage, S.1124-1125, Elsevier Verlag

Neumann E., Knedla A., Meier F., Tarnier I.H., Büchler C., Schäffler A., Müller-Ladner U. (2007): Adipozytokine als treibende Faktoren bei rheumatoider Arthritis, Z Rheumatol; 66, S.139–141, Springer Medizin Verlag

Neumann E., Junker S., Schett G., Frommer K., Müller-Lader U. (2016): Adipokines in bone disease, Nature Reviews Rheumatology; 12, S. 296-302

Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1999): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, 2. Auflage, Band 1 und 4, Parey-Verlag

Niehues T. (2017): C-reaktives Protein und andere immunologische Biomarker, Monatsschr Kinderheilkd; 165, S.560-571, Springer Verlag

Nihiro H., Otsuka T., Izuhara K., Yamaoka K., Ohshima K., Tanabe T., Hara S., Nemoto Y, Tanaka Y., Nakashima H., Niho Y. (1997): Regulation by

Interleukin-10 and Interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood*; 89, S.1621-1628

Nishibori M., Mori S., Takahashi H. (2019): Anti-HMGB1 monoclonal antibody therapy for a wide range of CNS and PNS diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*; 140, S.94-101

Nolan T., Hands R., Bustin S. (2006): Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*; 12(12), S.1559-1569

Noli C., Scarampella F. (2005): *Praktische Dermatologie bei Hund und Katze*, 2. Auflage, S. 69, Schlütersche Verlag, ISBN 3-87706-713-1

Palumbo R., Sampaolesi M., De Marchis F., Tonlorenzi R., Colombetti S., Mondino A., Cossu G., Bianchi M.E. (2004): Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol*; 164, S. 441-449

Park J.S., Arcaroli J., Yum H.K., Yang H., Wang H., Yang K.Y., Choe K.H., Strassheim D., Pitts T.M., Tracey K.J., Abraham E. (2003): Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol*; 284, S. C870-C879

Parkkinen J., Raulo E., Merenmies J., Nolo R., Kajander E.O., Baumann M., Rauvala H. (1993): Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides. Enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation. *Journal of Biological Chemistry*; 268, S.19726-19738

Peek V. (2017): *Das Potenzial von endogenen „toll-like“ Rezeptor-Agonisten und Omega-3-Fettsäuren zur Modulation systemischer Entzündungsreaktionen. Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Laufweiler Verlag*

- Pfaffl** M.W. (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung, Biospektrum 10.Jahrgang, S. 92-95
- Pivovarova** O., Gögebakan O., Osterhoff M., Nauck M., Pfeiffer A., Rudovich N. (2012): In vivo effect of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) on the gene expression of calcitonin peptides in human subcutaneous adipose tissue. Regul Pept.; 179(1-3), S.29-32
- Pradhan** A.D., Manson J.E., Rifai N. (2001): C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus, JAMA; 286, S.327- 334
- Rade** C. (2015): Ernährungstipps für Hunde und Katzen mit Arthrose, TierKonkret; 11(04), S.15-16
- Rauvala** H., Pihlaskari R. (1987): Isolation and some characteristics of an adhesive factor of brain that enhances neurite outgrowth in central neurons. J Biol Chem; 262, S.16625-16635
- Reiser** M., Semmler W. (1997): Magnetresonanztomographie, 2. Auflage, S.4-27, Springer Verlag
- Ren** J., Li X., Sun G., Li S., Liang S. Li Z., Li B., Xia M.(2018): Protective effect of leptin-mediated caveolin-1 expression on neurons after spinal cord injury. Cell Calcium; 76, S.122-128
- Robin** J.S., Akerman S., Goadsby P. (2004): Calcitonin gene-related peptide (CGRP) modulates nociceptive trigeminovascular transmission in the cat, British Journal of Pharmacology; 142, S.1171-1181, Nature Publishing Group
- Rothwell** N. J. (1988): Central effects of TNF alpha on thermogenesis and fever in the rat. Bioscience reports; 8, S.345-352
- Ryan** V.H., German A.J., Wood I.S., Hunter L., Morris P., Trayhurn P. (2010): Adipokine expression and secretion by canine adipocytes: stimulation of

inflammatory adipokine production by LPS and TNF α . Pflugers Arch; 460(3), S.603–616, Springer-Verlag

Sabat R., Grutz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., Geginat J. (2010): Biology of interleukin-10., Cytokine & growth factor reviews; 21, S.331-344

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T. (1988): Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science; 239(4839), S.487-491

Saunders , Worth, P. Bridges, Hartman(2018): Evaluation of the rostral projection of the sacral lamina as a component of degenerative lumbosacral stenosis in German shepherd dogs, Veterinary Surgery; 47, S.654–663

Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E. (2002): Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature; 418, S.191-195

Scharf G., Steffen F., Grünenfelder F. (2003): The lumbosacral junction in working German Shepherd Dogs- neurological and radiological evaluation. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med; 51(1), S.27-32

Schaudinn A., Linder N., Garnov N., Blüher M., Dietrich A., Schütz T., Karlas T., Kahn T., Busse H.(2015): Effiziente MRT-gestützte Quantifizierung des viszeralen Fettgewebes bei adipösen Patienten. Fortschr Röntgenstr; 187, S.961-1052

Scheller J., Grötzinger J., Rose-John S. (2007): Interleukin-6 Zytokinsignale über lösliche und membranständige Rezeptoren., Biospektrum, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schmidli M.R., Fuhrer B., Kurt N., Senn D., Drögemüller M., Rytz U., Spreng D.E., Forterre S. (2018): Inflammatory pattern of the infrapatellar fat pad

in dogs with canine cruciate ligament disease, BMC Veterinary Research; 14(161), S. 161

Schmidt M.J., Roth J., Ondreka N., Kramer M., Rummel C. (2013): A Potential Role for Substance P and Interleukin-6 in the Cerebrospinal Fluid of Cavalier King Charles Spaniels with Neuropathic Pain, J Vet Intern Med; 27, S.530–535

Schmidt M.J., Kramer M. (2015): MRT-Atlas ZNS-Befunde bei Hund und Katze. Enke Verlag; 11, S. 282-317

Sekiguchi M., Kikuchi S., Myers R.(2004): 1 Experimental spinal stenosis: relationship between degree of cauda equina compression, neuropathology, and pain. Spine; 29(10), S.1105-1111

Seiler G.S., Häni H., Busato A.R., Lang J. (2002): Facet joint geometry and intervertebral disk degeneration in the L5-S1 region of the vertebral column in German Shepherd dogs.Am. J. Vet. Res.; 63, S.86–90

Sommer C. (2001): Zytokine bei neuropathischen Schmerzen. Der Anaesthetist; 50 (6), S. 416–426

Steel D.M., Whitehead A.S. (1994): The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. Immunol. Today; 15, S.81 - 88

Steffen F., Hunold K., Scharf G., Flückiger M. (2008): Degenerative lumbosakrale Stenose (Cauda-equina-Syndrom) beim Deutschen Schäferhund, Kann man das Auftreten der Krankheit anhand von Röntgenbildern voraussagen?, Zeitschrift der Schweizerischen Kynologischen Gesellschaft SKG

Steffen F.. (2017): Neues zum Cauda equina-Syndrom des Hundes, Schweizer Hunde Magazin; 8(17), S.64-68

- Stern D.**, Yan S. D., Yan S. F., Schmidt A. M. (2002): Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Advanced Drug Delivery Reviews.*; 54, S.1615-1625
- Stock K.F.**, Ondreka N., Tellhelm B., Distl O. (2009): Genetische Analysen zur degenerativen lumbosakralen Stenose beim Deutschen Schäferhund, Vortragstagung der DGfZ und GfT in Gießen
- Straub H.** (2006): Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen, S.56-58, Vandenhoeck & Ruprecht, ISBN 10: 3-525-45051-6
- Suwankong N.**, Meij B.P., Voorhout G., De Boer A.H., Hazewinkel H. (2008): Review and retrospective analysis of degenerative lumbosacral stenosis in 156 dogs treated by dorsal laminectomy. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*; 21(3), S.285–293
- Taniguchi N.**, Kawahara K., Yone K., Hashiguchi T., Yamakuchi M., Goto M., Inoue K., Yamada S., Ijiri K., Matsunaga S., Nakajima T., Komiya S., Maruyama I. (2003): High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum.*; 48, S.971-981
- Thrall D.E.** (2002): Textbook of veterinary diagnostic radiology, Philadelphia: W.B. Saunders; 4. Auflage
- Tomizawa A.**, Hattori Y., Kasai K. (2008): Adiponectin induces NF-kappaB activation that leads to suppression of cytokine-induced NF-kappaB activation in vascular endothelial cells: globular adiponectin vs. high molecular weight adiponectin. *Diab Vasc Dis Res*; 5(2), S.123–27
- Tsujimoto M.**, Yokota S., Vilcek J., Weissmann U.G. (1986): Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils.

Biochemical and biophysical research communications; 137, S.1094-1100

Ulloa L., Messmer, D. (2006): High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe. Cytokine Growth Factor Review; 17, S.189-201

Van Der Poll T., Janssen P.M., Montegut W.J., Braxton C.C., Calvano S.E., Stackpole S.A., Smith S.R., Swanson S.W., Hack C.E., Lowry S.F., Moldawer L.L. (1997): Effects of IL-10 on systemic inflammatory responses during sublethal primate endotoxemia. Journal of immunology; 158, S.1971-197

Vigushin D.M., Pepys M.B., Hawkins P.N. (1993): Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. J. Clin. Invest.; 91, S.1351-1357

Vogt F.M., Ruehm S., Hunold P., Greiff A., Nuefer M., Barkhausen J., Ladd S.C. (2007): Schnelle Ganzkörperfettmessung mittels MRT: Quantifizierung und Topografie, Fortschr Röntgenstr; 179(5), S. 480-486

Weisberg S., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R., Ferrante A. (2003): Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest.;112(12), S.1796-808

Weishaupt D., Köchli V.D., Marincek B. (2013): Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung, 7. Auflage, Springer Verlag

Xu X., Hao J., Andell-Jonsson S., Poli V., Bartfai T., Wiesenfeld-Hallin Z. (2006): Nociceptive responses in interleukin-6-deficient mice to peripheral inflammation and peripheral nerve section. CYTOKINE; 9(12), S. 1028-1033

- Yang** H., Wang H., Tracey K. J. (2001): HMG-1 rediscovered as a cytokine., Schock; 15, S.247-253
- Zanjani** T., Sabetkasaei M., Mosaffa N., Manaheji H., Labibi F., Farokhi B. (2006): Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain. European Journal of Pharmacology; 538, S.66-72
- Zentella** A., Manogue K., Cerami U.A. (1991): The role of cachectin/TNF and other cytokines in sepsis. Progress in clinical and biological research; 367, S.9-24
- Zetterstrom** C.K., Bergman T., Rynnel-Dagoo B., Erlandsson-Harris H., Soder O., Andersson U., Boman H.G. (2002): High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) is an antibacterial factor produced by the human adenoid. Pediatr Res.; 52, S.148-154
- Zhang** H.H., Kumars S., Barnett A.H., Eggo M.C. (2001): Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and interleukin-1 beta release in human subcutaneous adipocytes and preadipocytes, the Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism; 86(6), S.2817-2825
- Zhang** L., Hoff A.O., Wimalawansa S.J., Cote G.J., Gagel R.F., Westlund K.N. (2001): Arthritic calcitonin/ α calcitonin gene-related peptide knockout mice have reduced nociceptive hypersensitivity, Pain; 89, S.265-273, Elsevier Verlag
- Zhang** Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedmann J.M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, Nature; 372, S.425-432

11. Danksagung

Mein Dank geht in erster Linie an die beiden Professoren Dr. Martin Schmidt und Dr. Christoph Rummel, welche mir die Möglichkeit dieser Dissertation gegeben haben und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Darüber hinaus danke ich Prof. Dr. Martin Schmidt und den Kollegen der Neurochirurgie für die Einblicke und die praktische Weiterbildung im Bereich der Neurologie.

Ein besonderer Dank geht an Doreen Marks aus dem Institut für Veterinärphysiologie für die ständige Betreuung bei der Durchführung der PCR und der Auswertung der Ergebnisse, sowie der Beantwortung jeglicher Fragen meinerseits.

In besonderem Maße gilt mein Dank meiner Familie und meinem Ehemann, die mich jederzeit während des Studiums, meiner Zeit in Gießen und der Durchführung meiner Dissertation unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben und mich zu der Person gemacht haben, die ich heute bin.

12. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-LiebigUniversität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Julia Hörster



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6878-3



9 17 8 3 8 3 5 119 6 8 7 8 3