



Axonale Regeneration und Plastizität unterschiedlicher
Fasersysteme nach Rückenmarksverletzungen und
verschiedenen Behandlungsansätzen in der adulten
Ratte

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nora Ellen Schiwy

Recklinghausen

Aus dem Institut für Molekulare Neurobiologie
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hans Werner Müller

Korreferent: Prof. Dr. Christine Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	7
1. Einleitung.....	9
1.1 Das Rückenmark der adulten Ratte.....	9
1.1.1 Der Aufbau des Rückenmarks der adulten Ratte.....	9
1.1.2 Der Kortikospinaltrakt.....	10
1.1.3 Der Rubrospinaltrakt.....	11
1.1.4 Die noradrenerge und dopaminerge (catecholaminerge) Faserpopulation.....	12
1.1.5 Die serotonerge Faserpopulation.....	13
1.1.6 Die Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) Faserpopulation.....	14
1.1.7 Mechanismen der motorischen Steuerung der Ratte.....	15
1.2 Pathophysiologische Prozesse nach einer Verletzung des zentralen Nervensystems.....	16
1.2.1 Die Wundheilungsnarbe.....	17
1.2.2 Behandlung zur transienten Unterdrückung einer Kollagen IV-haltigen Narbe mittels Eisenchelator.....	18
1.3 Chemokine.....	19
1.3.1 Chemokine im zentralen Nervensystem.....	20
1.3.2 Das Chemokin SDF-1 als möglicher therapeutischer Behandlungsansatz nach Rückenmarksverletzung.....	20
1.4 Hormone.....	22
1.4.1 Das Hormon Glucose dependent insulinotropic polypeptid (GIP).....	22
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	24
2. Materialien und Methoden.....	24
2.2 Puffer, Lösungen und Antikörper.....	25
2.1.1 Lösungen und Puffer der Immunhistochemie.....	25
2.1.2 Lösungen und Puffer für Operationen und Gewebeaufarbeitung.....	25
2.1.3 Antikörper.....	26
2.1.4 Elvax-Präparation.....	27

2.2 Versuchstiere.....	27
2.3 Operationsprotokolle.....	28
2.3.1 Drahtmesserläsion und Substanzverabreichung mittels Druckinjektion.....	28
2.3.2 Drahtmesserläsion und Substanzverabreichung mittels osmotischer Minipumpe.....	30
2.3.3 Drahtmesserläsion und eine kombinierte Substanzverabreichung mittels Druckinjektion und Minipumpe.....	32
2.3.4 Markierung des Kortikospinaltrakts.....	32
2.3.5 Markierung des Rubrospinaltrakts.....	33
2.3.6 Postoperative Tierversorgung.....	33
2.3.7 Perfusion.....	34
2.3.8 Offenfeldbeobachtung der Lokomotion.....	34
2.4 Gewebeaufarbeitung.....	35
2.4.1 Gewebeentnahme zur Herstellung von Gefriermikrotomschnitten.....	35
2.5 Anfertigung histologischer Schnittpräparate.....	35
2.5.1 Perfundierte Gefriermikrotomschnitte.....	35
2.6 Immunhistologische Färbungen.....	35
2.6.1 Fluoreszente (Doppel-/Triple-) Färbungen von Gefriermikrotomschnitten.....	37
2.6.2 DAB-Färbungen von Gefriermikrotomschnitten.....	37
2.7 Auswertung und Dokumentation	37
3. Ergebnisse.....	39
3.1 Untersuchungen des Regenerationsverhaltens verschiedener Faserpopulationen nach Läsion und anschließender Behandlung zur Unterdrückung der Narbenbildung.....	40
3.1.1 Untersuchung des Regerationsverhaltens der unterschiedlichen Axonpopulationen in lädierten Kontrolltieren 5 Wochen nach Verletzung.....	41
3.1.2 Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf das Regenerationsverhalten 5 Wochen nach Verletzung.....	41
3.1.3 Verteilung der Axonfragmente in der rostralen bzw. caudalen Hälfte des Narbenareals 5 Wochen nach Verletzung.....	43

3.1.4 Längerfristige Auswirkungen auf die axonale Regeneration durch eine transiente Narbenunterdrückung.....	45
3.1.5 Verteilung der Axonfragmente in der rostralen bzw. caudalen Hälfte des Narbenareals 12 Wochen nach Verletzung.....	46
3.1.6 Überqueren der Narbengrenze und Einwachsen in die Narbe 5 und 12 Wochen nach Verletzung.....	47
3.1.7 Regeneration verletzter Axone in das distale Rückenmark.....	50
3.2 Untersuchungen des Aussprossungsverhaltens des kortikospinalen Traktes nach Läsion und anschließender Verabreichung verschiedener wachstumsfördernder Substanzen.....	52
3.2.1 Auswirkungen auf das axonale Aussprossen durchtrennter kortikospinaler Axone nach kontinuierlicher Verabreichung des Peptidhormons GIP.....	52
3.2.2 Auswirkungen auf das axonale Aussprossen durchtrennter kortikospinaler Axone nach kontinuierlicher Verabreichung des Chemokins SDF-1 α	54
3.3 Kombinationsbehandlung von AST und dem Chemokin SDF-1 α	56
3.3.1 Auswirkung auf das rostrale Aussprossungsverhalten durch die kombinierte Verabreichung des Chemokins SDF-1 α und des AST.....	57
3.3.2 Auswirkung auf das Regenerationsverhalten durch die kombinierte Verabreichung des Chemokins SDF-1 α und des AST.....	70
3.3.3 Untersuchung der SDF-Rezeptorexpression.....	75
3.3.4 Auswirkungen der Behandlungen auf das lokomotorische Verhalten durch Beobachtungen der Versuchstiere im Offenfeld.....	77
4. Diskussion.....	80
4.1 Untersuchungen des Regenerationsverhaltens verschiedener Faserpopulationen nach Läsion und anschließender Behandlung zur Unterdrückung der Narbenbildung.....	80
4.1.1 Spontanes Einwachsen in die primäre fibröse Narbe.....	80
4.1.2 Das AST-induzierte gesteigerte Einwachsen in die sekundäre Narbe ist nicht auf eine Faserpopulation beschränkt	82

4.1.3 Kurz- und Langzeiteffekte der AST-Behandlung auf das axonale Einwachsen in die Narbenregion.....	83
4.1.4 AST erhöht die Zahl an regenerierten Axonen im distalen Rückenmark.....	85
4.2 Untersuchung des rostralen Aussprossungsverhaltens nach Verabreichung verschiedener wachstumsfördernder Substanzen.....	86
4.2.1 Das Peptidhormon GIP scheint keine regenerationsfördernden Eigenschaften im ZNS zu besitzen.....	86
4.2.2 Die Verabreichung des Chemokins SDF-1 α bewirkt eine Signifikante Steigerung des rostralen Aussprossens des.....	86
4.3 Untersuchung des rostralen Aussprossungsverhaltens nach kombinierter Verabreichung des AST und des Chemokins SDF-1 α	87
4.3.1 Unterschiedliche Reaktionen der Faserpopulationen auf das axonale Aussprossen 5 Wochen nach Verletzung und Behandlung.....	88
4.3.2 Plastizität rostral der Läsionsstelle: Kollaterales und regeneratives Aussprossen.....	92
4.3.3. Der CST profitiert von der kombinierten Behandlung und zeigt ein stark erhöhtes Einwachsen in die Narbe.....	93
4.3.4 Auswirkung der Behandlungen auf die Lokomotion der Ratte.....	96
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	98
6. Summary and perspectives	100
7. Literatur.....	102
Danksagung.....	117

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5-HT	5-Hydroxytryptamin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin Biotin Komplex
ACh	Acetylcholin
AP	Anterior-Posterior
AST	Anti-Narben-Behandlung
BBB	Lokomotionsskala nach Basso, Beattie und Bresnahan
BDA	Biotinyliertes Dextranamin
BPY-DCA	5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
cAMP	Zyklisches Adenosin Monophosphat
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
cm	Zentimeter
Col IV	Kollagen Typ IV
CoST	Coeruleospinaler Trakt
CPG	Central Pattern Generator
CST	Kortikospinaltrakt
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
d.h.	Das heist
DA	Dopamin
DAB	Diaminobenzidin
Elvax	Ethylen-Vinyl-Acetat Kopolymer
EZM	Extrazelluläre Matrix
g	Gramm
GFAP	Gliales fibrilläres saures Protein
ggf.	gegebenenfalls
GIP	Gastric Inhibitory Polypeptide oder Glucose-Dependent Insulinotrophic Polypeptide
GIPR	GIP Rezeptor
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
min	Minuten
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
n.v.	Nicht verfügbar
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NDS	Normales Esel Serum
NGS	Normales Ziegen Serum
NR	<i>Nucleus ruber</i>

p	Statistische Wahrscheinlichkeit
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
PSN	Propriospinale Neurone
RaST	Raphespinaler Trakt
RST	Rubrospinaltrakt
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor-1
SEM	Standard error of the mean
SPF	Spezifizierte pathogenfreie Bedingungen
Tab.	Tabelle
TH	Tyrosin Hydroxylase
Th	Thorakal
Tn-C	Tensacin-C
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
α	alpha

1. Einleitung

1.1 Das Rückenmark der adulten Ratte

1.1.1 Der Aufbau des Rückenmarks der adulten Ratte

Das Rückenmark, *Medulla spinalis*, ist der Teil des zentralen Nervensystems (ZNS), von dem aus die Extremitäten, der Rumpf und zum Teil auch der Hals über die Spinalnerven versorgt werden. Das Rückenmark liegt im Wirbelkanal und ist wie das Gehirn von *Liquor cerebrospinalis* umgeben (Trepel, 2006). Das Rückenmark wird entsprechend den Austrittsstellen der Spinalnerven in verschiedene Abschnitte gegliedert, die jeweils in mehrere Segmente unterteilt werden können:

- Hals- oder Zervikalmark (*Pars cervicalis*): bei Säugetieren 8 Segmente (C1-C8)
- Brust- oder Thorakalmark (*Pars thoracica*): Segmente entsprechend der Wirbelzahl (Th1-Th12)
- Lenden- und Lumbalmark (*Pars lumbalis*): Segmente entsprechend der Wirbelzahl (L1-L5)
- Kreuz- und Sakralmark (*Pars sacralis*): Segmente entsprechend der Wirbelzahl (S1-S5)
- Schwanz- oder Kokzygealmark (*Pars coccygis*): beim Menschen nur rudimentär ausgebildet; bei der Ratte Segmente (Co1-Co6)

Das Rückenmark besteht aus grauer und weißer Substanz (Abb. 1.1). Die graue Substanz besteht überwiegend aus Nervenzellkörpern, die Weiße aus auf- und absteigenden Axonen. Die graue Substanz wird in zehn Schichten unterteilt. Die *Laminae I-VII* befinden sich im Hinterhorn, die *Laminae VIII-IX* im Vorderhorn. Die *Lamina X* bildet die *Commissura grisea*, in dessen Mitte der Zentralkanal verläuft, der mit *Liquor* gefüllt ist. In der weißen Substanz des Rückenmarks verlaufen sowohl aufsteigende (meist sensible) Bahnen, die zum Gehirn ziehen, als auch absteigende (meist motorische) Bahnen, die vom Gehirn entlang des Rückenmarks projizieren. Die Ursache für die weiße Farbe ist die Myelinisierung der Neuronen. Das Hinterhorn enthält über die dorsale Wurzel des Spinalnervs sensible Informationen aus der

Peripherie. Diese Informationen werden in Richtung Gehirn weitergeleitet. Die sensiblen Wurzelzellen liegen außerhalb des Rückenmarks im Spinalganglion. Ihre Axone treten über die dorsale Wurzel in das Hinterhorn des Rückenmarks ein. Hier werden sie entweder auf ein zweites Neuron umgeschaltet oder ziehen direkt über spezielle Bahnen der weißen Substanz in das Gehirn. Das Vorderhorn enthält Motoneurone, die ihre Axone, als ventrale Spinalnervenwurzel zusammengelagert, zu den Muskeln entsenden (Trepel, 2006).

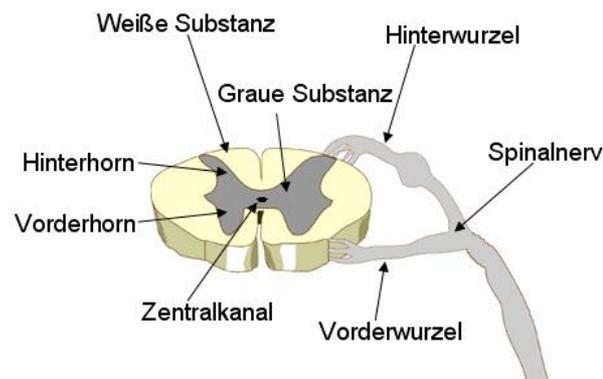


Abbildung 1.1. Querschnitt durch das Rückenmark. Modifiziert nach: Benjamin Cummings (2006).

Die von Axonen gebildeten Faserbahnen können, je nach Ursprung und Ziel, zu Trakten zusammengefasst werden, deren Ziel- bzw. Ursprungsort in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns zu finden sind. Dabei unterscheidet man zwischen den aufsteigenden bzw. afferenten, sensorischen und den absteigenden bzw. efferenten, motorischen Fasertrakten (Zilles und Rehkämper, 1998).

1.1.2 Der Kortikospinaltrakt

Der Kortikospinaltrakt (*Traktus corticospinalis*, CST) ist der Größte der absteigenden Bahnen und innerviert die α -Motoneurone der grauen Substanz. Sein Ursprung liegt in der Schicht V des Motorkortex. Von dort verläuft er durch den Hirnstamm bis in die Vorderhörner des Rückenmarks. 70-90% der Fasern kreuzen auf die Gegenseite und nur ein kleiner Teil (10-30%) der Bahnen verlaufen ungekreuzt und bilden die zwei lateralen, sowie den ventralen Bereich des CST (Trepel, Neuroanatomie). Der CST ist primär an erlernten motorischen Funktionen, wie z.B. das Greifen und der

Essenshandhabung beteiligt (Whishaw et al., 1998) und weniger an einfacher Lokomotion (Metz et al., 1998). Der kortikospinale Trakt terminiert überwiegend die medialen Bereiche des Hinterhorns und die intermediäre graue Substanz (Rexed Laminae 3, 4, 5 und 6; Abb. 1.2) (Watson et al., 2009) im zervikalem, als auch im lumbaren Teil des Rückenmarks (Elbert et al., 1999).

Nach Verletzung des kortikospinalen Traktes unterziehen sich die CST Axone caudal der Läsionsstelle, welche von ihrem Zellkörper getrennt wurden, der Wallerischen Degeneration. Die verletzten Axone rostral der Verletzung bilden Retraktionskolben aus und weisen ein erhebliches Rückzugsverhalten von der Läsionsstelle weg, auf (Bernstein und Stelzer, 1983). Dieses progressive Rückzugsverhalten beginnt direkt nach der initialen Verletzung, wobei sich die Mehrheit der Axone bis zu 2,5 mm von der verletzten Stelle zurückziehen (Oudega et al., 1999). CST Axone zeigen initiale Aussprossungs- und Wachstumsversuche, die bereits 2 Wochen nach Verletzung erfolgen und über ca. 13 Wochen nach Verletzung anhalten (Li und Raisman, 1995).

1.1.3 Der Rubrospinaltrakt

Die wichtigste laterale, aus dem Hirnstamm absteigende Bahn ist der Rubrospinaltrakt (*Tractus rubrospinalis*, RST), der mit dem magnozellulären Anteil des *Nucleus ruber* (NR) im Mittelhirn entspringt. Die rubrospinalen Fasern ziehen durch die *Medulla oblongata* und nach Kreuzung der meisten Fasern auf die Gegenseite, verlaufen diese zum dorsalen Teil des Seitenstrangs des Rückenmarks ab; sie enden innerhalb der dorsolateralen Gruppe von Motorneuronen, welche die distalen Muskeln der Gliedmaßen innervieren. Diese Muskeln treten bei feinen Bewegungen in Aktion, wie z.B. dem Greifen und der Essenshandhabung (Kandel, Neurowissenschaften).

Die rubrospinalen Axone terminieren im Vorderhorn auf zervikalem, als auch auf lumbarem Level, meist auf Interneurone, teilweise aber auch direkt auf Motorneurone (Rexed Laminae 5, 6 und 7; Abb. 1.2) (Antal et al., 1992). Nach Verletzung des RST verbleiben die verletzten Axone rostral der verletzten Stelle (Houle und Jin, 2001).

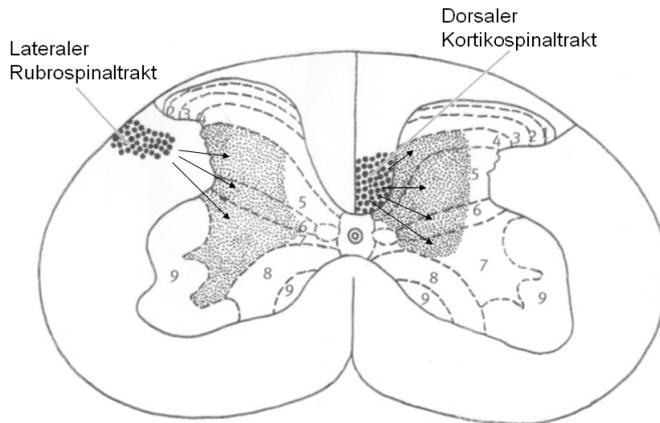


Abbildung 1.2. Hauptsächlicher Verlauf des dorsalen kortikospinalen (rechte Seite) und des rubrospinalen Traktes (linke Seite) in der weißen Substanz der Ratte. Beide Faserbahnen sind bilateral ausgelegt und terminieren in genau definierten Regionen der grauen Substanz (Pfeile). (Watson, The spinal cord atlas).

1.1.4 Die noradrenerge und dopaminerge (catecholaminerge) Faserpopulation

Die catecholaminergen Neurone produzieren ihre Neurotransmitter Dopamin (DA), Noradrenalin (NA), oder Adrenalin aus der Aminosäure Tyrosin über eine Reihe von enzymatischen Reaktionen. In dopaminergen Neuronen hört die Synthese bei DA auf, während in noradrenergen Neuronen DA weiter zu NA umgewandelt wird. DA ist unter anderem an der Steuerung der extrapyramidalen Motorik beteiligt. Dopaminerge Neurone werden in neun verschiedene Zellgruppen eingeteilt, A9-A17, wobei nur die Zellgruppe A11 das Rückenmark innerviert (Qu et al., 2006). Diese Axone verlaufen entlang des dorsolateralen Funikulus und des Zentralkanals, wobei sie die graue Substanz über das ganze Rückenmark hinweg innervieren (Abb. 1.4).

Wie die Klassifizierung der dopaminergen Neurone werden die noradrenergen Neurone in die Zellgruppen A1-A7 eingeteilt (Hynes and Rosenthal, 1999). Die NA Neurone bilden unterschiedliche mesencephale Kerne im Locus coeruleus (LC, A4 und A6, Abb. 1.3) und einer Reihe von locker organisierten Zellgruppen, die im gesamten Hirnstamm verteilt sind (A1-A3, A5 und A7(Locus subcoeruleus)). Die Projektionsbahnen des coeruleospinalen Trakts (CoST) verlaufen im ventrolateralen Funikulus der weißen Substanz entlang, von wo aus sie das gesamte Rückenmark innervieren (Sluka und Westlund, 1992). Zur Übersicht siehe Abbildung 1.4.

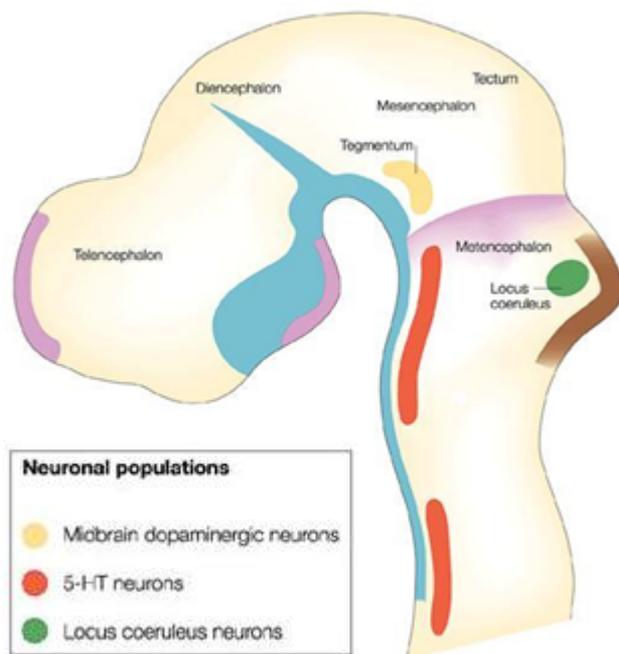


Abbildung 1.3. Dopaminerge (gelb), noradrenerge (grün) und serotonerge (rot) Neurone im Gehirn. (Goridis & Rohrer, 2002;)

1.1.5 Die serotonerge Faserpopulation

Der raphespinaler Trakt (RaST) übt neuromuskuläre Reaktionen auf motorische Funktionen aus, wie z.B. die Erleichterung der rhythmischen Bewegungsaktivität (Gerin et al., 1995), ist aber ebenso an der Regulierung von autonomen, reproduktiven und exkretorischen Funktionen beteiligt (Ono und Fukuda, 1995; Mason, 1999; Deumens et al., 2005). In den *Raphe* Kernen befinden sich die Somata (Zellkörper) der serotonergen Nervenbahnen, deren Axone in alle Teile des Gehirns und in das Rückenmark projizieren. Die Gehirnstruktur der *Raphe* Kerne, die aus neun Kernen besteht, liegt im Hirnstamm, im Medianbereich zwischen dem verlängerten Rückenmark (*Medulla oblongata*) und dem Mittelhirn (*Mesencephalon*) (Abb. 1.3). Die Axone des RaST die zum Rückenmark projizieren, entspringen der *raphe magnus*, *obscurus* und *pallidus* (Tork 1985; Skagerberg und Björklund, 1985). Neurone der *Raphe magnus* verlaufen im dorsolateralen Funiculus und terminieren überwiegend in das Hinterhorn (Mason, 1999). Serotonerge Neurone der *Raphe obscurus* und *Raphe pallidus* verlaufen im ventrolateralen Teil der weißen Substanz und terminieren die intermediäre graue Substanz und Motorneurone im Vorderhorn (Abb. 1.4) (Tracey et al., 2004).

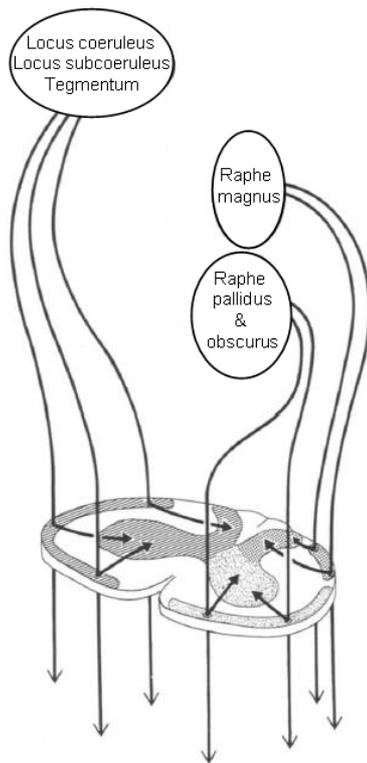


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung serotonerger (rechte Seite) und catecholaminерger Projektionen (linke Seite) die in alle spinalen Bereiche terminieren. Modifiziert nach Holstege und Kuypers, 1987)

Die serotonergen Axone gehen Verbindungen, in Form von Synapsen, mit den α - und γ -Motorneuronen, sowie den in der *Substantia gelatinosa* befindlichen Zellen der preganglionären sympathischen Nervenfasern, ein (Inman et al., 2003). Einige wenige lokale serotonerge Neurone wurden sowohl um den Zentralkanal, als auch im Hinterhorn beobachtet (Yoshimura et al., 2006).

Der Neurotransmitter Serotonin (5-HT; 5-Hydroxytryptamin) spielt eine wichtige Rolle im motorischen Kreislauf, wie z.B. die Erhöhung der Erregbarkeit der α -Motorneurone, sowie nach Rückenmarksverletzung bei der Verbesserung des Bewegungsverhaltens (Hains et al., 2002). Nach Verletzung des RaST zeigen die Axone nur ein geringes spontanes Einwachsen in die Läsionsstelle (Ramon-Cueto et al., 2000).

1.1.6 Die Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) Faserpopulation

Das Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid. Dieses Peptid wird durch dasselbe Gen wie Calcitonin codiert und wird aus diesem im peripheren Nervensystem sowie im

Zentralnervensystem durch selektives Splicing der mRNA gebildet. CGRP scheint ebenso an trophischen Effekten der Muskel-Innervierung durch periphere Nerven beteiligt zu sein, wie z.B. der Erhöhung der Muskelkontraktion, der Anhebung des cyclischen AMP (cAMP) Spiegels, der Unterstützung der nikotinischen Acetylcholin (ACh) Rezeptor Synthese, die Regulierung der Phosphorylierung der nikotinischen ACh Rezeptoren, sowie bei der Bildung und Verschaltung von neuromuskulären Verbindungen (Zheng et al., 2008). Durch die Regulierung des CGRP während der Entwicklung, der Beteiligung von Aussprossungsprozessen an motorischen Nervenendigungen, sowie der Nachweis, dass seine Expression durch neurale Aktivitäten beeinflusst wird, führte zu der Vermutung, dass dieses Peptid eine regulatorische Schlüsselrolle in der Regeneration nach Nervenverletzung ausübt (Wang et al., 1993). Im primären afferenten System sind die α -CGRP Fasern in den peripheren Projektionen lokalisiert. Die Fasern, die zur Lamina I, der äußeren Schicht der Lamina II und der Lamina V des dorsalen Horns projizieren sind vermutlich an der Übertragung von Schmerz, Temperatur, sowie schädlichen, als auch unschädlichen mechanischen Reizen beteiligt (Ondarza et al. 2003).

Die Körperfunktionen, inklusive der Lokomotion, werden durch die Interaktionen von verschiedenen Axontrakten vermittelt. Dazu zählen unter anderem der kortikospinale (CST), der rubrospinale Trakt (RST), sowie der raphespinal (RaST) und der coeruleospinal (CoST) Trakt. Darüber hinaus existieren noch weitere Fasertrakte, die bei der motorischen Interaktion eine Rolle spielen, diese werden hier jedoch nicht näher erläutert.

1.1.7 Mechanismen der motorischen Steuerung der Ratte

Die genauen neurophysiologischen Mechanismen der Lokomotion der Vertebraten sind noch nicht im Detail aufgeklärt. Wichtige Komponenten sind die sogenannten *Central Pattern Generators (CPG)* (Grillner, 2002; Pearson, 1993), die überwiegend im zervikalen und lumbaren Bereich des Rückenmarks lokalisiert sind. Als CPG bezeichnet man die Teile im neuronalen Netz, die für oft wiederholte Bewegungen (Bewegungsmuster) verantwortlich sind.

Zum CPG gehören die propriospinalen Neurone (PSN; Abb. 1.5), wobei man zwischen der „langen“- und der „kurzen“- Population unterscheiden muss. Die langen

PSN's sind an der Kopplung der Vorderbein- und Hinterbeinaktivität beteiligt, wie z.B. während des Laufens (Jankowska et al., 1974; Miller et al., 1973).

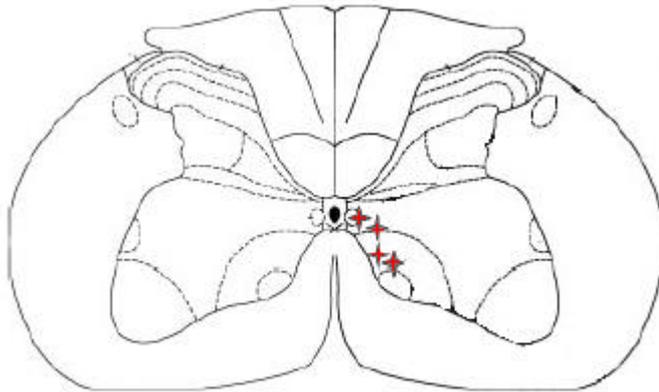


Abbildung 1.5 Lokalisation der propriospinalen Neurone im zervikalen Rückenmark. Sie sind sowohl seitlich des Zentralkanals in der Lamina VII, als auch mehr ventral in der Lamina VIII lokalisiert (Vavrek et al., 2006)

Sie entspringen im zervikalen Rückenmark (C3-C5) und wandern im ventralen und lateralen Funikuli entlang (Giovanni et al., 1969) und terminieren das Hinterhorn im lumbrosakralen Bereich des Rückenmarks (Alstermark et al., 1987a; Alstermark et al., 1987b). Bei einer dorsalen, thorakalen Hemisektion bleibt diese Population unverletzt, wodurch sie den zervikalen Bereich des Rückenmarks mit dem Lumbaren überbrücken kann.

Die kurzen PSN verbinden den oberen zervikalen (C3-C4) mit dem unteren zervikalen Teil des Rückenmarks (C6-Th1). Sie sind beteiligt am visuell-gelenktem Greifen nach einem Objekt durch die Vorderbeine (Alstermark et al., 1987c; Alstermark et al., 1990). Auch diese Population ist durch eine thorakale dorsale Hemisektion nicht betroffen, jedoch kann die „kurze“-Population eine thorakale Läsionsstelle nicht überbrücken.

1.2 Pathophysiologische Prozesse nach einer Verletzung des zentralen Nervensystems

Eine Verletzung des zentralen Nervensystems führt in der Regel zu bleibenden motorischen Defiziten. Die verletzten Axone sind nicht in der Lage über lange Distanzen auszuwachsen und funktionelle Verbindungen mit den entsprechenden Zielgebieten herzustellen. Dies ist unter anderem auf die geringe intrinsische

Kapazität der Axone zu regenerieren, das Fehlen neurotropher Wachstumsfaktoren, sowie die Anwesenheit inhibitorischer Moleküle, die eine Regeneration unterdrücken, zurückzuführen. Die Wachstums-hemmenden Faktoren entstehen unter anderem bei der Narbenbildung (Deumens et al., 2005).

Direkt nach Durchtrennung der Axone bildet sich zunächst eine primäre Läsionsstelle aus, die aus durchtrennten Axonen, sterbenden Neuronen und Gliazellen, sowie einer gestörten Mikrovaskulatur besteht. Auf die Bildung des nekrotischen Epizentrums folgt dann eine sekundäre Welle der Degeneration (sekundäre Verletzung), sowie eine progressive Demyelinisierung aller absteigenden und aufsteigenden Axone (Lin et al., 2007). Der distale Axonstumpf, der vom Soma abgetrennt wurde, wird im Zuge der sogenannten Waller'schen Degeneration abgebaut, wobei die verletzten Axone rostral der Verletzung sich von der Läsionsstelle zurückziehen (von Meyenburg, 1998; Oudega et al., 1999). Verletzte Axone zeigen spontane Regenerationsversuche, die jedoch durch die wachstumshemmende Umgebung unterdrückt werden. In Folge dessen sind bestimmte Körperfunktionen, die durch die verletzten Trakte vermittelt wurden, beeinträchtigt oder komplett verloren, je nach Verletzungsgrad.

1.2.1 Die Wundheilungsnarbe

Die Läsionsnarbe setzt sich sowohl aus der fibrösen Narbe im Zentrum, als auch der glialen Narbe im Periläsionsgebiet zusammen (Abb. 1.6) (Grimpe und Silver 2002; Silver und Miller 2004). Während die Glianarbe größtenteils aus reaktiven Astrozyten besteht, welche durch die Expression des glialen fibrillären sauren Proteins (GFAP) detektiert werden kann (Fawcett und Asher, 1999b; Shearer und Fawcett, 2001a), setzt sich die fibröse Narbe zum größten Teil aus Kollagen des Typs IV (Col IV) zusammen. Col IV ist die Hauptstrukturkomponente von Basalmembranen, wie es z.B. in Wänden von Blutgefäßen vorkommt (Stichel et al., 1999). Col IV wird nach Verletzung des ZNS von verschiedenen Zelltypen, die in das Läsionsgebiet eindringen, synthetisiert, wie z.B. von meningealen Fibroblasten, Astrozyten, oder endothelialen Zellen (Schwab et al., 2001). Col IV wirkt nicht per se inhibitorisch auf das Axonwachstum ein, es bildet jedoch ein dichtes Netzwerk, an dem sich andere, auf das Wachstum hemmend auswirkende Moleküle anheften können (Klapka et al.,

2005). Dazu gehören unter anderem die Myelin-assoziierten Moleküle (Filbin, 2003), die Semaphorine (Pasterkamp et al., 1999, 2001; Goldberg et al., 2004), die Ephrine (Miranda et al., 1999; Benson et al., 2005) und verschiedene Chondroitinsulfat Proteoglykane (CSPG) (Morgenstern et al., 2002). Diese Moleküle bilden eine physiologische und biochemische Barriere die eine Regeneration der Axone verhindert.

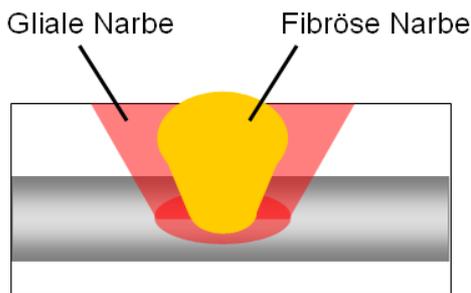


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der Wundheilungsnarbe im parasagitalen Schnitt. In gelb dargestellt ist die gliale, in rot die fibröse Narbe, die sich im Zentrum der Läsion befindet.

1.2.2. Behandlung zur transienten Unterdrückung einer Kollagen IV-haltigen Narbe mittels Eisenchelator

Um die Inhibition der axonalen Regeneration durch die fibröse Narbe zu überwinden, wurde in der Arbeitsgruppe für Molekulare Neurobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eine Behandlung, das so genannte AST (Anti-Narben-Behandlung), entwickelt. Durch dieses Verfahren wird die Bildung der Col IV-haltigen Narbe vorübergehend unterdrückt.

Für die Behandlung wurde der Eisenchelator 5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl (BPY-DCA) verwendet, welcher direkt in die Läsionsstelle appliziert wurde, wo er einen großen Anteil des Eisens, der extrazellulär in der Läsion vorliegt, binden kann. Somit wird das Eisen für das Enzym Prolyl-4-Hydroxylase, welches ein Schlüsselenzym in der Kollagenbiosynthese ist, unzugänglich gemacht (Abb. 1.7). So kann die Ausbildung des Col IV-haltigen Netzwerkes für ca. 2 Wochen unterdrückt werden, um so den verletzten Axonen ein Aussprossen und Auswachsen zu ermöglichen. Zur weiteren Unterstützung der Narbenunterdrückung wurde eine zusätzliche Strategie angewendet um die Kollagenproduktion weitgehend zu hemmen. Da das Col IV überwiegend von eingewanderten Fibroblasten und Astrozyten produziert wird, ist es förderlich die Proliferation dieser Zellen zu unterdrücken. Beide Zelltypen exprimieren CTGF (connective tissue growth factor), welches an der Proliferation und der

Produktion der extrazellulären Matrix (EZM) involviert ist. Durch eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen AMP-Spiegels (cAMP) wird der CTGF-vermittelte Effekt jedoch behindert, was eine Verminderung der Proliferation und somit eine verringerte Bildung der EZM zur Folge hat. (Conrad et al., 2005; Duncan et al., 1999). Aus diesem Grund wurde zusätzlich cAMP in Form von 8-Brom-cAMP in die Läsionsstelle verabreicht.

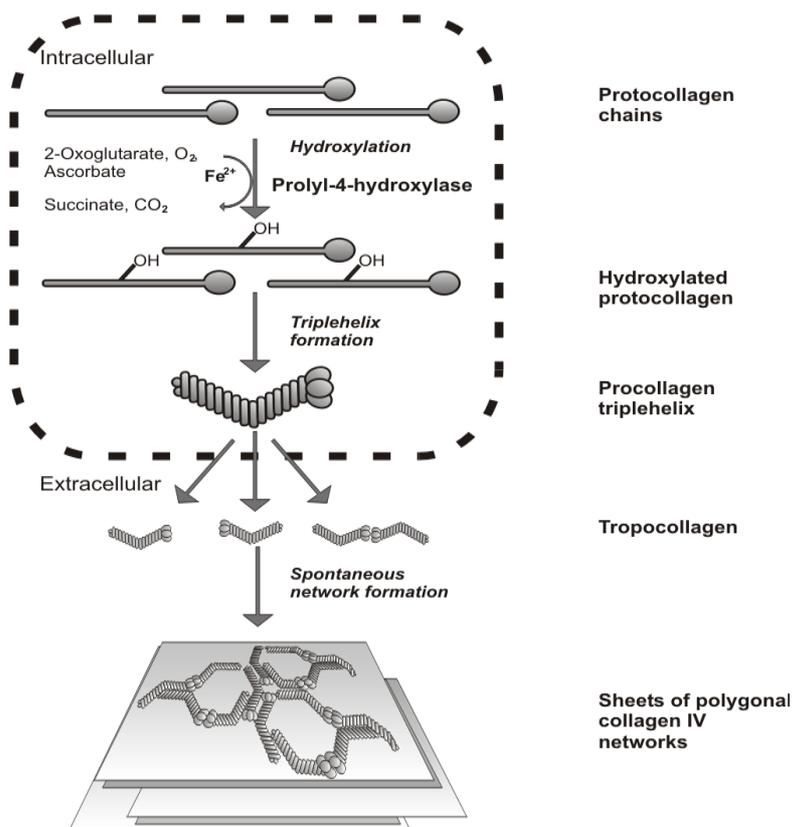


Abbildung 1.7. Schematischer Ablauf der Kollagen Biosynthese. In Kollagen produzierenden Zellen werden Prokollagen-Moleküle von der Prolyl-4-Hydroxylase hydroxyliert. Diese Reaktion ist notwendig, um die Bildung stabiler Tripelhelices zu gewährleisten, welche dann in den Extrazellulärraum sezerniert werden. Kollagen-Tripelhelices bilden spontan Netzwerke aus. Das Schlüssel-enzym der Kollagen Synthese ist die

Prolyl-4-Hydroxylase, die als Kofaktor Eisen benötigt. Eine Deprivierung dieses Kofaktors führt zu einer geringeren Hydroxylierungs-rate, was die Ausbildung stabiler Kollagen-Netzwerke hemmt (Klapka et al., 2005).

1.3 Chemokine

Chemotaktische Zytokine (intrazelluläre Botenstoffe) sind kleine sekretierte Signalproteine die bei Zellen eine Wanderungsbewegung auslösen. Chemokine spielen unter anderem eine zentrale Rolle bei der Migration von Immunzellen. Ihre Wirkung wird in der Regel über spezifische Rezeptoren vermittelt. Chemokine

werden von einer Vielzahl verschiedener Zellen gebildet und wirken auch auf diese, wobei ihre Synthese durch eine zelluläre Aktivierung ausgelöst wird (Fernandez et al., 2002).

1.3.1 Chemokine im zentralen Nervensystem

Neben ihrer Rolle im Immunsystem, spielen die Chemokine und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle im ZNS. Zum Beispiel bei neurodegenerativen und neuroentzündlichen Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit (Streit et al., 2001; Lee et al., 2002; Cartier et al., 2005).

Die Chemokine wurden in vier Familien unterteilt, deren Unterschiede auf der Anzahl der Cysteinreste am Amino-Ende basieren. Die Familien heißen CXC, CC, C und Cx3C Chemokine. Sie vermitteln ihre biologischen Effekte über Zell-Oberflächen Rezeptoren, welche zur Familie der sieben transmembranen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Abb. 1.8). Chemokine der CXC Familie sind bekannt als Lockstoffe für Neutrophile, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (Rostene et al., 2007).

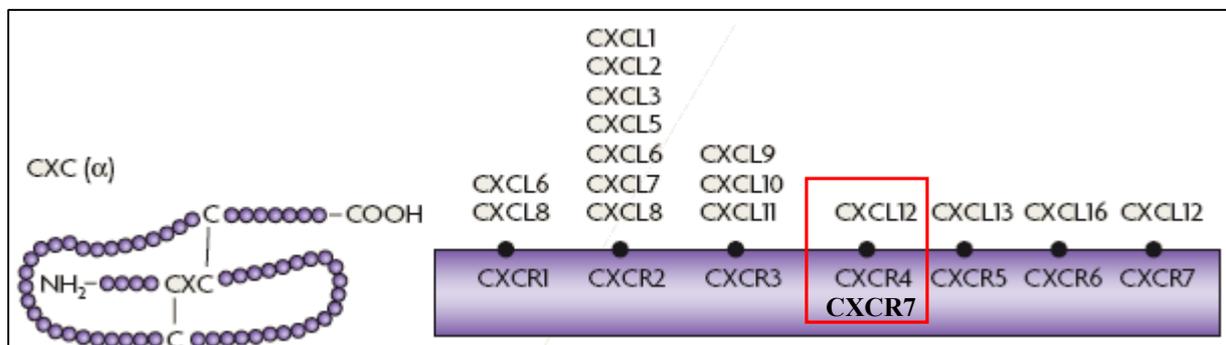


Abbildung 1.8. Übersicht der CXC Familie der Chemokine und deren dazugehörigen Rezeptoren. Bei den CXC Chemokinen separiert eine Aminosäure die ersten zwei Cysteinreste (Cystein – Aminosäure – Cystein). Das Chemokin SDF-1 (CXCL12) vermittelt seine Wirkung durch Bindung an seine Rezeptoren, CXCR4 bzw. CXCR7 (Rostene et al., 2007).

1.3.2 Das Chemokin SDF-1 als möglicher therapeutischer Behandlungsansatz nach Rückenmarksverletzung

Das Chemokin Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), auch bekannt als CXCL12, tritt in drei verschiedenen Isoformen auf (α , β und γ), welche durch alternatives Spleißen

entstehen. Die verschiedenen Formen des CXCL12 werden unterschiedlich stark im juvenilen und adulten ZNS exprimiert. Der Unterschied des CXCL12 Chemokins zu anderen ist die starke Expression im embryonalen Stadium der Entwicklung und sein ontogenetisches Muster, welches sich denen verschiedener Neuropeptiden sehr ähnelt (Tham et al., 2001).

Das SDF-1 α welches für die Experimente verwendet wurde, wird konstitutiv im ZNS exprimiert und dies nicht nur von Astrozyten und Mikroglia, sondern ebenfalls von Neuronen in bestimmten neuroanatomischen Regionen (Stumm et al., 2002; Bandisadr et al., 2003).

SDF-1 α und sein Rezeptor CXCR4 werden sowohl im embryonalen, als auch im adulten Gehirn stark exprimiert, vor allem im Kortex, der Substantia nigra und dem Hypothalamus (Stumm et al., 2003), wo sie verschiedene Funktionen ausüben, wie z.B. bei der Neurogenese (Tran und Miller 2005), der Neurotransmission (Limatola et al., 2000), der Leitung von Axonen (Xiang et al., 2002; Chalasani et al., 2003), sowie der Axonelongation (Arakawa et al., 2003). Zusätzlich zum CXCR4 wurde noch ein weiterer Rezeptor für SDF-1 α gefunden, der RDC1/CXCR7 (Balabanian et al., 2005). Durch *in vitro* Experimente konnte nachgewiesen werden, dass SDF-1 als Neurotransmitter agiert und an der Leitung und Elongation der Axone während der frühen embryonalen Phase der hippocampalen Neuronenanordnung eine Rolle spielt. Dies geschieht indem das axonale Auswachsen reduziert und dafür ein vermehrtes Verzweigungswachstum/Aussprossen stimuliert wird (Pujol et al., 2005). Chemokine regulieren ebenfalls die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP's), welche am neuronalen Überleben beteiligt sind, weshalb ihnen ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben wird, wozu auch das SDF-1 α zählt (Rostene et al., 2007). Nach Läsion im peripheren Nervensystem wurde eine transiente Steigerung der mRNA Expression von SDF-1 β beobachtet, was auf eine Rolle bei der Nervenregeneration hindeutet (Gleichmann et al., 2000).

Aufgrund der positiven Eigenschaften des Chemokins und seiner zugeschriebenen Rolle bei der Regeneration im PNS wurde das SDF-1 α als möglicher Behandlungsansatz bei der Regeneration von Rückenmarksverletzungen eingesetzt und getestet.

1.4 Hormone

Ein Hormon ist ein biochemischer Botenstoff. Er übermittelt Informationen von einem Organ, oder Gewebe zu einem anderen. Dort befinden sich spezielle Rezeptoren, an welche die Hormonmoleküle binden. Diese Rezeptoren sind meist an der Zellmembran lokalisiert. Typischerweise werden Hormone in tierischen Organismen in Hormondrüsen gebildet, die man auch als endokrine Drüsen bezeichnet, da sie im Gegensatz zu anderen Drüsen keinen Ausführungsgang besitzen. Die Hormone werden direkt in das Blut abgegeben. Neurohormone hingegen werden von Nervenzellen produziert und in die Blutbahn sezerniert.

1.4.1 Das Hormon Glucose-dependent insulinotropic polypeptid (GIP)

GIP, auch bekannt als gastric inhibitory polypeptide, oder glucose-dependent insulinotropic polypeptide, ist ein 42 Aminosäuren großes Peptidhormon. Es gehört zu den Inkretinhormonen und wird während der Nahrungsaufnahme von endokrinen Zellen freigelassen (Buchanan et al., 1978). Die GIP-vermittelten Effekte werden über die Bindung an einen sieben transmembranen G-Protein gekoppelten Rezeptor vermittelt. Dieser Rezeptor (GIPR) befindet sich auf den β -Inselzellen. Sobald GIP an den GIPR gebunden ist, wird die Adenylatzyklase aktiviert, was in einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration und eine gleichzeitige Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) resultiert. Diese Signalkaskade führt zur Exozytose von Insulin (Wheeler et al., 1995). Neben der primären, stimulierenden Funktion der Insulinsekretion, zeigte sich, dass dieses Protein ebenfalls in anderen Geweben, wie z.B. einigen Hirnregionen, exprimiert wird (Usdin et al., 1993). Abawanka et al. fand heraus das GIP zum Zeitpunkt von axonalen Wachstumsprozessen weitaus höher reguliert wird (Abankawa et al., 2004). Diese und weitere Autoren konnten zeigen, dass GIP als potenter Regulator bei der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen agieren kann (Nyberg et al., 2005). Bühren et al. (2009) beobachtete, dass die Expression von GIP, als auch die des GIP-Rezeptors, nach Verletzung des Ischiasnervs in dorsalen Wurzelganglionen (DRG) und im ventralen Rückenmark stark hoch reguliert wird.

Dies deutet auf eine putative Rolle des GIP/GIPR Systems bei der Signalgebung der spontanen Nervenregeneration hin (Buhren et al., 2009), weshalb dieses Hormon ebenfalls als möglicher Behandlungsansatz bei Rückenmarksverletzungen eingesetzt und untersucht wurde.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt, um die Wirkungen verschiedener Behandlungsansätze (AST, SDF-1, GIP) auf die Regeneration unterschiedlicher Fasertrakte nach traumatischer Verletzung zu untersuchen. Die wichtigsten absteigenden und aufsteigenden Axontrakte, wie der CST, RST, RaST, CoST und CGRP wurden aufgrund ihrer funktionellen Bedeutung bei der Lokomotorik eingehender betrachtet. Obwohl jeder dieser Trakte nach Verletzung initiale Wachstumsversuche unternehmen, ist kein Trakt in der Lage in bzw. über eine Läsionsstelle hinweg zu wandern und für eine funktionelle Erholung zu sorgen. Deshalb ist ein Eingreifen in die Narbenzusammensetzung bzw. Narbenumgebung unabkömmlich. Die hier angewendeten Behandlungen wurden entwickelt, um (1) die wachstumshemmenden Faktoren zu verringern, (2) die wachstumsfördernden Faktoren zu erhöhen, oder (3) eine Kombination aus beiden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Puffer, Lösungen und Antikörper

2.1.1 Lösungen und Puffer der Immunhistochemie

Lösungen und Puffer	Inhaltsstoffe	Konzentration/Menge
PB (Phosphatpuffer 0,2M; pH 7,4)	Na ₂ HPO ₄ (Merck) NaH ₂ PO ₄ (Merck) Aq. bidest	28,8g 5,2g 1000ml
PBS (0,1M; pH 7,4)	PB NaCl (Merck) Aq. bidest	50 ml 9 g 1000ml
TRIS (20 mM; pH 8,1)	C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Sigma) Aq. bidest	2,1g 1000ml
NGS (Normal Goat Serum)	NGS (Vector) PBS	3%
NDS (Normal Donkey Serum)	DS (Sigma) PBS	5%

Tabelle 2.1 Verwendete Lösungen und Puffer bei immunhistochemischen Färbungen

2.1.2 Lösungen und Puffer für Operationen und Gewebeaufarbeitung

Lösungen und Puffer	Inhaltsstoffe	Konzentration/Menge
BPY-DCA (5,5`-Dicarboxy-2,2`-Dipyridyl; 40mM; pH 7,4)	BPY-DCA Tris,	9,75mg 1ml
SDF-1α	SDF-1α PBS	83,34 µg 1ml
Vehikel	BSA PBS	83,4 µg 1ml
GIP	GIP H ₂ O	25 µg 1ml
BDA	BDA NaCl	250µg 250µl
PFA (4%)	PFA PB Aq. bidest	40g 500ml 500ml
Saccharose (30%)	Saccharose PBS	30g 100ml

Tabelle 2.2 Verwendete Lösungen und Puffer für Operationen und Gewebeaufarbeitung

2.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Subtyp	Verdünnung	Detektion
5-HT (BioLogo)	Kaninchen	polyklonal	1:30	5- Hydroxytryptamin → Serotonin
TH (abcam)	Kaninchen	polyklonal, IgG	1:750	Tyrosin Hydroxylase → Dopamin
CGRP (Biomol)	Kaninchen	polyklonal	1:750	Calcitonin Gene Related Peptide
CGRP (AbD Serotec)	Ziege	polyklonal	1:1500	Calcitonin Gene Related Peptide
GFAP (Chemicon)	Maus	monoklonal IgG ₁	1:250	Glial Fibrillary Acidic Protein → Astrozyten
NG2 (Chemicon)	Kaninchen	polyklonal	1:500	Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan
CXCR4 (Santa Cruz/ R&D Systems)	Kaninchen	polyklonal	1:100	SDF-1 Rezeptor 1 → CXCR4
	Maus	monoklonal	1:100	
CXCR7/RDC1 (Abcam/ R&D Systems)	Kaninchen	polyklonal	1:100	SDF-1 Rezeptor 2 → CXCR7/RDC1
	Maus	monoklonal	1:100	

Tabelle. 2.3 Verwendete primäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Kopplung/Detektion	Verdünnung	
Esel α Kaninchen IgG 488 (Molecular Probes)	Alexa Flour 488	1:250	■
Esel α Kaninchen IgG 594 (Molecular Probes)	Alexa Flour 594	1:250	■
Esel α Maus IgG 488 (Molecular Probes)	Alexa Flour 488	1:250	■
Esel α Maus IgG 594 (Molecular Probes)	Alexa Flour 594	1:250	■
Esel α Ziege IgG 488 (Molecular Probes)	Alexa Flour 488	1:250	■
Esel α Ziege IgG 594 (Molecular Probes)	Alexa Flour 594	1:250	■
Streptavidin 647 (Vector)	Biotinyliert	1:250	■
Pferd α Maus IgG, rat adsorbed (Vector)	Biotinyliert	1:500	■
Ziege α Kaninchen IgG (Biozol)	Biotinyliert	1:150	■
Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (ABC)(Vector)	ABC Kit	1:100	
NeutrAvidin (Molecular Probes)	488 Konjugat	1:1000	■
DAPI (Sigma)	Detektiert AT Kluster in der DNA	1:150	■

Tabelle 2.4 Verwendete sekundäre Antikörper, Markersubstanzen und Avidinreagenzien

2.1.4 Elvax-Präparation

Zur Elvax-Präparation wurden 0,1g Ethylen-Vinyl-Acetat Kopolymer-Kügelchen (Elvax, Dupont) mit 1ml Dichlormethan in einem Schüttler, speziell für Reagenzgläser (Firma Heidolph Reaxtop) vermischt und für ca. 20 min geschüttelt bis sich die Elvax-Kugeln auflösten. Nach Zugabe von 10 µl Fast Green und 100 µl BPY-DCA in DMSO (1M) bzw. Tris (200mM) wurde für weitere 40 min geschüttelt. Objektträger zum Auftropfen der Lösung wurden vorbereitet. Dazu wurde ein Rahmen aus Paraffin mit Vaseline auf einen Objektträger befestigt, der über einen Klebestreifen mit einem weiteren Objektträger verbunden war. Die Objektträger wurden auf Trockeneis gekühlt und die fertige Elvax-Lösung aufgetropft. Durch Fotoklammern wurden die Objektträger zusammengepresst und fixiert. Die fertigen Elvax-Objektträger wurden anschließend bei -20°C eingefroren und für eine Woche dort belassen. So konnte ein vollständiges abdampfen des Lösemittels gewährleistet werden. Bis zur endgültigen Verwendung wurde das fertige Elvax weiterhin bei -20°C aufbewahrt.

2.2 Versuchstiere

Für die Experimente wurden adulte, weibliche Wistar-Ratten (Auszuchtstamm) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 220 g verwendet. Diese wurden unter spezifizierten pathogenfreien Bedingungen (SPF) bei einer Temperatur von 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% ± 5% gezüchtet. Die Tiere wurden in einem zwölfstündigen Hell-/Dunkelwechsel in Standardkäfigen mit 3 bis 4 Tieren gehalten und erhielten pelletiertes Trockenfutter und keimfreies Wasser (pH 2) *ad libitum*.

Alle Tiere stammten aus der Eigenzucht der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Die Überlebenszeiten der Tiere betragen 5- bzw. 12-Wochen. Die Markierungen des kortikospinalen Traktes erfolgten drei Wochen vor der Perfusion, die des rubrospinalen Traktes 5 Wochen vor der Perfusion.

2.3 Operationsprotokolle

2.3.1 Drahtmesserläsion und Substanzverabreichung mittels Druckinjektion

Bei allen Operationen wurde eine Inhalationsnarkose (Mix aus O₂:N₂O - 30:60, Isoflurane 2,5%) verwendet. Der Rücken der Tiere wurde rasiert und mit einem alkoholischen Hautantisept desinfiziert. Alle verwendeten Instrumente wurden zuvor mit Ethanol gereinigt. Mit einem Skalpell wurde, beginnend zwischen den Schulterblättern, ein ca. 3 cm langer Hautschnitt nach caudal gesetzt und die Haut durch Spreizen einer Schere vom darunter liegenden Muskelgewebe getrennt.

Das sich zwischen den Schulterblättern befindliche Fettgewebe wurde teilweise vom Muskelgewebe abgetrennt und weggeklappt. Im Anschluss erfolgte rechts und links ein Schnitt entlang der Wirbelsäule (thorakaler Bereich, ca. Th7 bis Th10) wodurch die Rückenmuskulatur durchtrennt wurde. Die durchtrennten Muskeln wurden mittels eines Muskelspreizers auseinander gehalten. Mit einer Knochenzange wurde der Dornfortsatz an Th8 entfernt und der Wirbelbogen eröffnet. Der Durchmesser der Knochenöffnung betrug ca. 5 mm, so dass genug Platz für das ausgefahrene Drahtmesser (Scouten-/Tungsten wire knife, Bilaney) vorhanden war. Bevor die Drahtmesserläsion erfolgte, wurde das Tier in eine stereotaktische Klemmvorrichtung (Model A-3-S, Narishige) gespannt, um die Atembewegungen des Tieres zu reduzieren und so eine kontrollierte Läsion bzw. Injektion durchführen zu können. Das Drahtmesser wurde in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt (Small animal adaptor, David Kopf Instruments). Dort wo das Drahtmesser in das Rückenmark eingeführt werden sollte, wurde mittels einer Augenschere (Fine Science Tools) zunächst ein kleines Loch in die *Dura mater*, *Arachnoidea mater* und die *Pia mater* geschnitten und anschließend die Führungskanüle ca. 1 mm tief eingeführt (Abb. 2.1). Anschließend wurde das Messer ausgefahren, so dass sich eine Halbkreisform ausbildete. Das Drahtmesser wurde leicht nach oben gefahren und mit einer feinen Augenschere konnte nun das Rückenmark entlang des Drahtmessers eingeschnitten und durchtrennt werden. Bei dem Läsionsmodell handelt es sich um eine leicht asymmetrische Hemisektion, bei der nur der dorsale Teil des Rückenmarkes vollständig durchtrennt wurde (siehe Abb. 2.1). Bevor die Injektionen erfolgten wurden 2 mg 8-Br-cAMP in die Läsionsstelle appliziert und anschließend die Dura mater mittels eines speziellen Fadens (Ethilon 10-0, Ethicon) mit 3 Stichen vernäht, um das heraus fließen der injizierten Substanzen zu

verhindern bzw. zu reduzieren, sowie das Einwandern von Fibroblasten zu vermindern.

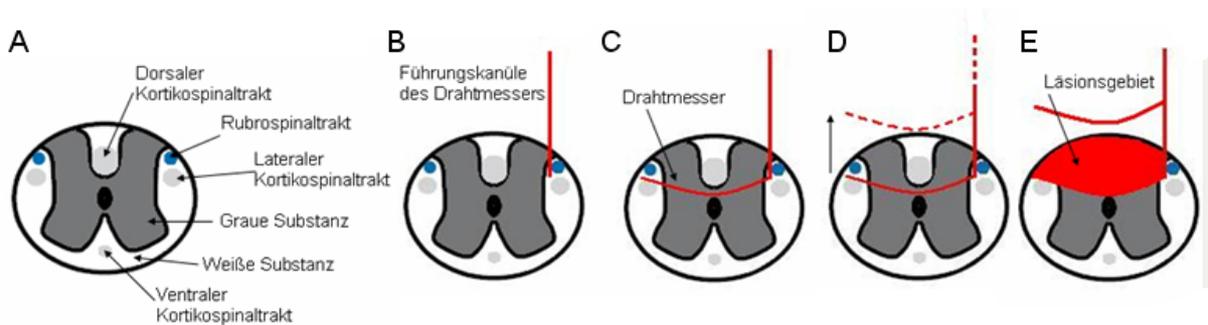


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Drahtmesserläsion zur Durchtrennung des dorsalen Kortikospinaltraktes bzw. des linken lateralen Rubrospinaltraktes. A: Querschnitt eines unverletzten Rückenmarks; B-E: Nach Laminektomie und Öffnung der Dura wurde die Führungskanüle des Drahtmessers in das Rückenmark eingeführt (B), das Drahtmesser aus- (C) und anschließend hochgefahren (D) und das Drahtmesser entfernt. E zeigt das entstandene Läsionsgebiet.

Nach erfolgter Hemisektion und Vernäherung der Dura wurde die Läsions- durch eine Injektionsvorrichtung ersetzt. Diese bestand aus einer 10 µl Hamilton-Spritze (Model 7110 N), an die eine ausgezogene Glaskapillare angeschlossen war. Es erfolgten vier Injektionen direkt in die Läsionsstelle und jeweils 2 weitere Injektionen rostral und caudal der Läsion, in einem Abstand von ca. 2 mm (Abb. 2.2). Bei den injizierten Substanzen handelte es sich entweder um den Eisenchelator BPY-DCA (MoBiTec), oder um die Kontrollsubstanz Tris pH 7,4. Die Substanzen wurden langsam appliziert, um zusätzliche Druckverletzungen zu vermeiden. Die Kanüle wurde für 3 min im Einstichkanal belassen, um die Verteilung der Substanz im Rückenmark zu gewährleisten und ein frühzeitiges heraus fließen zu vermeiden. Das Volumen der jeweiligen Injektionen betrug 0,2 µl. Den Tieren, die eine Anti-Narben-Behandlung (AST) bekamen, wurde nun nochmals 2 mg 8-Br-cAMP verabreicht. Anschließend wurde die Läsionsstelle, je nach Behandlungsgruppe, mit einem Stück Elvax das entweder Tris, oder das gelöste BPY-DCA enthielten, abgedeckt.

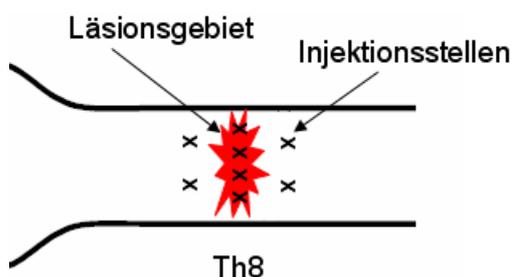


Abbildung 2.2 Übersicht der Injektionen in die Läsionsstelle, sowie das rostrale und caudale Rückenmark. In rot ist die Läsion dargestellt; die mit X gekennzeichneten Bereiche zeigen die einzelnen Injektionspunkte an.

Die Operation wurde durch das Vernähen des Muskelgewebes und der Haut mit mehreren Stichen (Vicryl Plus 4-0, Firma Ethicon) abgeschlossen.

2.3.2. Drahtmesserläsion und Substanzverabreichung mittels osmotischer Minipumpe

Bei dieser Art der Verabreichung erfolgte die Operation bis zur Laminektomie an Th8 wie in 2.2.1 beschrieben.

Da der Katheter (rat intrathecal Catheter 7740, Alzet) eine größere Knochenöffnung benötigt, wurde zusätzlich zur Wirbelöffnung an Th8 auch der Wirbel 9 entfernt. Eine dritte Wirbelöffnung erfolgte an Th11, durch die der Katheter später mit dem Führungsdraht unter dem Knochen bis zur Läsionsstelle geführt werden sollte. Die Drahtmesserläsion erfolgte wie bereits in 2.2.1 beschrieben, bis einschließlich der Vernähung der *Dura mater*.

Nach Einführen des Katheters unter Th11 (Abb.2.3) wurde der Führungsdraht entfernt und das hintere, etwas dickere Ende des Katheters mit einem Faden am Muskelgewebe befestigt. Nun wurde der Katheter luftblasenfrei befüllt und so gekürzt, dass er direkt über der Läsionsstelle zu liegen kam. Anschließend wurde in die Dura mittig ein kleines Loch mit einer feinen Augenschere eröffnet und der Katheter von dort unter der Dura soweit nach rostral geschoben, dass bis zum Läsionszentrum reichte. Der Katheter wurde mit einem feinen Faden an der Dura befestigt, um ein Verrutschen zu verhindern. Die bereits im Vorfeld befüllten und bei 37°C vorinkubierten osmotischen Minipumpen (Mini-Osmotic-Pump Model 2001, Alzet; 200µl Ladevolumen; Pumprate 1µl/h, 7 Tage) wurden an dem Katheter befestigt. Die Läsionsstelle wurde mit einem Stück Tris-Elvax abgedeckt und das darüber liegende Muskelgewebe vernäht. Die Pumpe wurde unter die Haut geschoben und der Katheter an einigen Stellen am Muskelgewebe befestigt. Abschließend konnte die Haut vernäht werden.

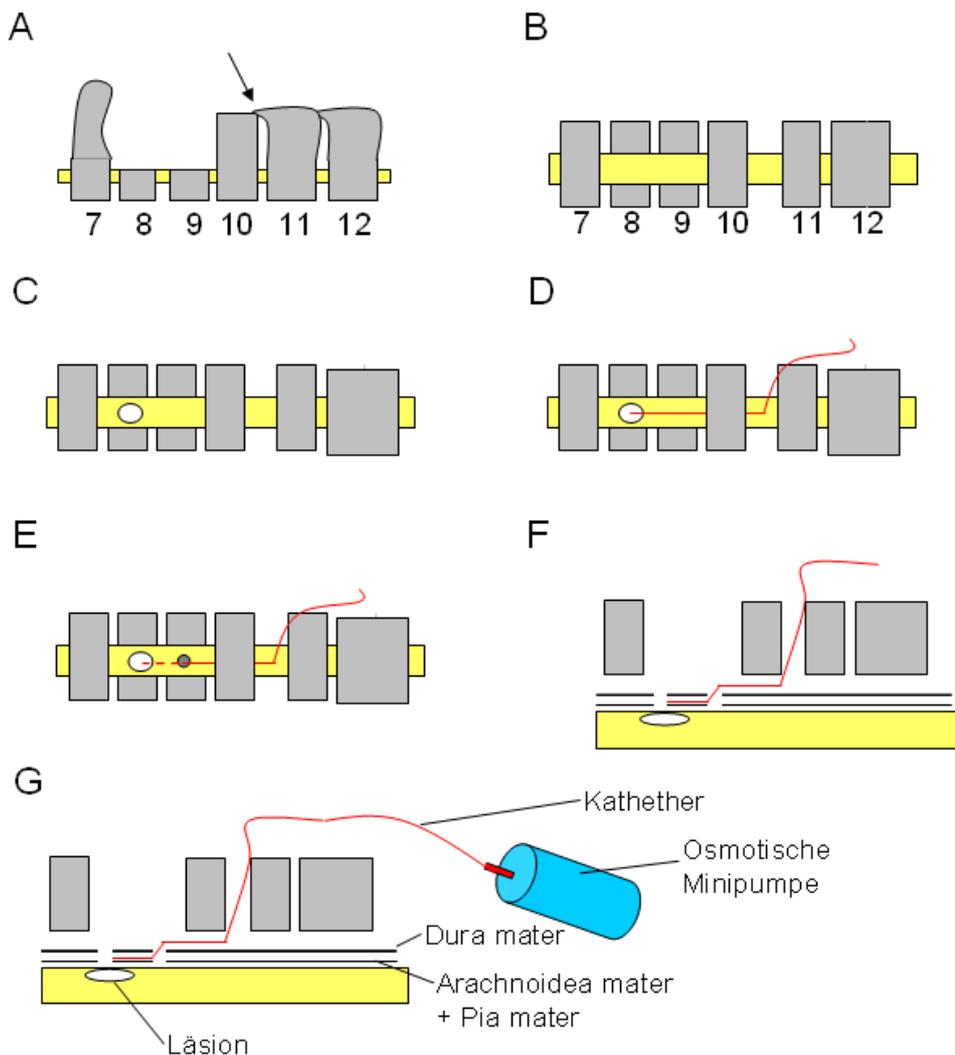


Abbildung 2.3 Schematische Darstellungen der Implantation der osmotischen Minipumpe in das Rückenmark der Ratte. (A) Laminektomie an Wirbel 8 und 9, eine weitere Laminektomie erfolgt zwischen Wirbel 10 und 11 (Pfeil), seitliche Ansicht. (B) Laminektomie der Wirbel 8, 9 und ein Teil des Wirbel 11, Ansicht von oben. (C) Transektion in Höhe des Wirbels 8. (D) Einführen des Katheters zwischen die Wirbel 10 und 11; die Führung des Katheters erfolgt über der Dura mater; der Katheter wird so gekürzt, dass er mittig der Läsion zu liegen kommt. (E) ca. 5 mm vor der Läsion wird ein Loch in die äußere Hirnhaut (Dura mater) geschnitten, von wo aus der Katheter unterhalb der Dura mater intrathekal, bis zur Läsionsstelle verläuft. (F) Seitliche Darstellung des Katheterverlaufs über- und unterhalb der Dura mater. (G) Nach Einsetzen des Katheters erfolgt der Anschluss an die osmotische Minipumpe.

Nach sieben Tagen wurden die Pumpen entfernt. Dafür wurden die Tiere ein weiteres Mal narkotisiert, die Naht geöffnet und die Pumpe, sowie der Katheter entnommen. Anschließend wurde die Haut wieder vernäht.

2.3.3 Drahtmesserläsion und eine kombinierte Substanzverabreichung mittels Druckinjektion und Minipumpe

Zur gleichzeitigen Verabreichung des AST mittels Druckinjektion und einer wachstumsstimulierenden Substanz mittels osmotischer Minipumpe wurde wie unter 2.2.1 bzw. 2.2.2 beschrieben verfahren.

2.3.4 Markierung des Kortikospinaltrakts

Die Markierung des Kortikospinaltraktes (CST) wurde drei Wochen vor Perfusion durchgeführt. Diese Zeitspanne benötigt das biotinylierte Dextran (BDA, Sigma) um bis zur Läsionsstelle transportiert zu werden.

Die Narkose wurde wie in 2.2.1 beschrieben durchgeführt, der Schädel rasiert und desinfiziert. Bei diesen Eingriff wurden die Tiere in einem Stereotaxiegerät (Small animal adaptor, David Kopf Instruments) fixiert. Die benötigte unbewegliche Position des Schädels wurde durch zwei in den *Meatus akustikus externus* eingeführte Ohrstecker, sowie durch das Einhängen des Oberkiefers hinter den vorderen Schneidezähnen in einem Bügel, gewährleistet.

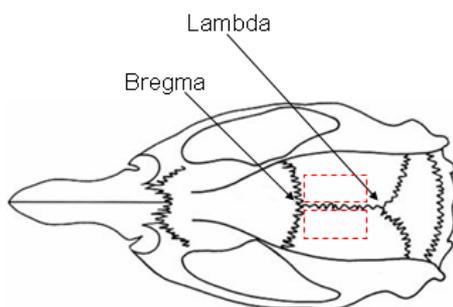


Abbildung 2.4 Aufsicht auf den Schädel der Ratte, mit den Orientierungspunkten Bregma und Lambda. Die rot markierten Rechtecke zeigen die Bereiche an dem die Schädeldecke für eine CST-Markierung geöffnet wurde.

Das Schädeldach wurde frei präpariert und die Null-Koordinaten von Bregma abgelesen (Abb. 2.4). Links und rechts der Mittellinie wurde je ein Fenster mittels eines Zahnarztbohrers (Fine Science Tools, Ø 1,4 mm) geöffnet (Abb. 2.4). Zur Markierung des CST wurden 16 Injektionen von je 0,2 µl Volumen in den sensomotorischen Kortex, in eine Tiefe von ca. 1 mm, an folgende Koordinaten injiziert:

Bregma AP [cm]	Lateral links [cm]		Lateral rechts [cm]	
- 0,08	+ 0,2		- 0,2	
- 0,13	+ 0,22		- 0,22	
- 0,18	+ 0,24	+ 0,29	- 0,24	- 0,29
- 0,23	+ 0,24	+ 0,29	- 0,24	- 0,29
- 0,28	+ 0,24		- 0,24	
- 0,33	+ 0,24		- 0,24	

Tabelle 2.5 Koordinaten zur Markierung des sensorimotorischen Kortexes der adulten Ratte.

Zur Verabreichung des 10%igen BDA wurde die gleiche Injektionsapparatur verwendet, wie sie bereits für die BPY-DCA Applikation verwendet wurde. Nach erfolgter Injektion wurde die Kanüle nach 3 min Wartezeit wieder entfernt. Zum Verschluss der Kopfhaut wurden Metallklips (Michel Wundklammern, rk instrumente) verwendet.

2.3.5 Markierung des Rubrospinaltrakts

Dieser Eingriff wurde 5 Wochen vor Perfusion gleichermaßen durchgeführt wie in 2.2.3 beschrieben. Zur Markierung des Rubrospinaltraktes (RST) wurde an jede Koordinate (Tab 2.5) ein Volumen von 0,8 µl in den rechten NR injiziert. Das BDA wurde an folgenden Koordinaten appliziert.

Bregma AP [cm]	Lateral [cm]	DV [cm]
- 0,58	- 0,07	- 0,70
- 0,62	- 0,1	- 0,72
- 0,66	- 0,15	- 0,83

Tabelle 2.5 Koordinaten zur Applikation der Marker Substanz in den Nucleus Ruber der Ratte

2.3.6 Postoperative Tierversorgung

In der ersten postoperativen Woche zeigten die Tiere eine verminderte Blasenfunktion, d.h. eine selbständige Entleerung war nicht möglich, was unter Umständen zu Infektionen der Harnwege, bis hin zum Tod führen kann. Um dies zu

verhindern wurde, über einen Zeitraum von 7 Tagen, ein- bis zweimal pro Tag die Blasenfunktion der Tiere kontrolliert und ggf. die Blase entleert. Zusätzlich wurde täglich das Gewicht der Tiere überprüft und zur Vermeidung einer Infektion wurde vorbeugend ein Antibiotikum (100 µl Baytril® 2,5%; Bayer) über 7 Tage oral verabreicht, ggf. auch länger.

2.3.7 Perfusion

Nach peritonealer Injektion eines Ketamin/Rompun-gemisches wurden die vollnarkotisierten Tiere, auf einer speziell für die Perfusion angefertigten Apparatur (Welabo), mit Gummiringen fixiert. Nach Öffnen des Thorax und der linken Herzkammer wurde eine Kanüle, die an eine Perfusionspumpe (505S, Watson Marlowe) angeschlossen war, in die Herzkammer, bis zur Aorta eingeführt und mittels einer Klemme dort fixiert. Anschließend wurde der rechte Vorhof geöffnet. Nach zwei min Spülung mit kalter PBS-Lösung (4°C, Pumprate 25 ml/min) wurde 12 min mit 4%iger PFA-Lösung (Paraformaldehyd, Merck, 4°C, Pumprate 25 ml/min) perfundiert. Im Anschluss wurde die Wirbelsäule herauspräpariert und über Nacht in 4%iger PFA-Lösung nachfixiert.

2.3.8 Offenfeldbeobachtung der Lokomotion

Zur Klassifizierung der freien Lokomotion der Tiere im Offenfeld wurde die Lokomotionsklassifizierung nach Basso et al. (Basso et al., 1995) verwendet. Dazu wurde ein Tier in ein rundes Offenfeld mit einem Durchmesser von ca. 1 m gesetzt und über eine Zeit von ca. 4 Minuten beobachtet.

Nach der Operation wurden die Tiere wöchentlich getestet. Eine ausführliche Liste der Punkteverteilung nach Basso et al. ist in (Basso et al., 1995) nachzulesen. Zur Auswertung wurden die BBB-Werte beider Hinterbeine gemittelt.

2.4 Gewebeaufarbeitung

2.4.1 Gewebeentnahme zur Herstellung von Gefriermikrotomschnitten

Den über Nacht in 4%igem PFA nachfixierten Wirbelsäulen wurde der Wirbelkanal mit einer feinen Knochenzange geöffnet und die dorsalen Wurzeln mittels eines Skalpell vom Rückenmark getrennt. Das nun frei präparierte Rückenmark wurde in eine gewünschte Länge zurecht geschnitten. Die Rückenmarkstücke wurden kurz in PBS gewaschen und anschließend in 30%iger Saccharoselösung (Merck), bis zum Absinken inkubiert.

2.5 Anfertigung histologischer Schnittpräparate

2.5.1 Perfundierte Gefriermikrotomschnitte

Zur Herstellung von 50 µm dicken Rückenmarksschnitten wurden die Rückenmarksstücke je nach Bedarf entweder in parasagitaler oder coronaler Orientierung mittels Saccharose auf dem Objekthalter des Gefriermikrotoms (Microm HM430) aufgefroren (Schneidetemperatur ca. -25 bis -30°C, Schnittrichtung: lateral → lateral bzw. rostral → caudal). Die Serienschnitte wurden in 24-Loch- bzw. 96-Loch- Mikrotiterplatten (Costar) in PBS gesammelt und bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.6 Immunhistologische Färbungen

Der Einsatz von Antikörpern zur Identifizierung von unterschiedlichen Zelltypen, Strukturen ist eine wichtige Methode in der modernen Neurowissenschaft. Die Methode ist sehr spezifisch und kann an lebenden wie auch an fixierten Zellen oder Geweben durchgeführt werden und hat deshalb einen hohen Stellenwert.

Zuerst werden die Gewebeschnitte in Serum inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen und zu blockieren. Die Detektion der Primärantikörper erfolgt mittels Sekundärantikörpern, die nicht aus der gleichen Spezies stammen und meist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet sind. Die Methode ist sehr flexibel, da eine Reihe von unterschiedlich konjugierten Sekundärantikörpern zur Detektion der

Primärantikörper zu Verfügung steht. Es gibt Sekundärantikörper, an die ein Fluorochrom gekoppelt wurde, wie z.B. Cyanin 2 oder 3 (Cy2, Cy3). Werden diese Fluorochrome mit UV-Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, emittieren sie wiederum Licht einer bestimmten Wellenlänge, das z.B. als grünes (Cy2) oder rotes Licht (Cy3) detektiert werden kann. Es gibt auch Antikörper, die mit speziellen Enzymen gekoppelt sind, wie z.B. mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP).

Eine Übersicht über die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper ist in Tab. 2.3 und 2.4 angegeben.

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbemethoden erfolgte die Darstellung der verschiedenen Faserpopulationen (CGRP, TH, 5-HT), sowie die mit BDA markierten Axone des CST bzw. RST. Bei der fluoreszenten Markierungsmethode wurde stets eine Doppelfärbung mit GFAP oder NG2 angewandt, um die Narbe identifizieren zu können.

2.6.1 Fluoreszente (Doppel-/Triple-) Färbungen von Gefriermikrotomschnitten

Aufgrund ihrer Dicke von 50 µm wurden die am Gefriermikrotom angefertigten Schnitte flotierend in 12-Loch-Mikrotiterplatten (Costar) auf dem Schüttler gefärbt. So konnte gewährleistet werden, dass die verwendeten Substanzen in das gesamte Gewebe eindringen konnten.

Zunächst wurden die Schnitte mehrmals gründlich in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen im Gewebe zu blockieren, wurde mit 3 bzw. 5 %igen Serum blockiert. Es erfolgte eine Inkubation der verschiedenen primären Antikörper (Tab 2.3) über Nacht, auf dem Schüttler bei 4°C. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation der fluoreszent-gekoppelten Zweitantikörper für eine weitere Stunde, welche ebenfalls in PBS verdünnt wurden (Tab. 2.4). Bei einer Triple-Färbung wurde ein weiterer Zwischenschritt eingeführt, die Inkubation eines biotinylierten sekundär-Antikörpers. Dann erst erfolgte die Inkubation des fluoreszent-gekoppelten Zweitantikörpers unter lichtgeschützten Bedingungen.

Zum Schluss wurden die Schnitte auf Objektträger (engelbrecht) aufgezogen und nach dem Trocknen in Fluoromount G eingedeckelt. Zwischen allen Inkubationsschritten wurde gründlich mit PBS gewaschen. Alle Schritte des 2. Tages

wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Aufbewahrung der gefärbten Schnitte erfolgte bei 4°C bzw. -20°C.

Eine Auflistung der verwendeten Antikörper ist in den Tabellen 2.3 und 2.4 zu finden.

2.6.2 DAB-Färbungen von Gefriermikrotomschnitten

Für diese Art der Färbung wurde wie in 2.6.1 beschrieben bis zur sekundären Antikörperinkubation gleich verfahren. Der sekundäre, Biotin-gekoppelte Antikörper wurden über einen Avidin-Peroxidase-Komplex (ABC, Vector) nachgewiesen. Dafür erfolgte eine ABC-Inkubation 1:100 in PBS für eine Stunde. Durch die anschließende Inkubation des Komplexes in 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma), reagierte letzteres durch die Avidin-gekoppelte Peroxidase in einer Oxidationsreaktion zu einem braunen Phenazinpolymer. Wasserstoffperoxid diente dabei als Elektronendonator. Zum Schluss wurden die Schnitte auf Objektträger (engelbrecht) aufgezogen, getrocknet und in Fluoromount G eingedeckelt. Zwischen allen Inkubationsschritten wurde gründlich mit PBS gewaschen. Alle Schritte des zweiten Tages erfolgten bei Raumtemperatur. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei Raumtemperatur.

Eine Auflistung der verwendeten Antikörper ist in den Tabellen 2.3 und 2.4 zu finden.

2.7 Auswertung und Dokumentation

Für die Auswertung der Regenerationsfähigkeit der verschiedenen Faserpopulationen (CGRP, TH, 5-HT, RST, CST) in parasagitalen und coronalen Schnitten wurden folgende Mikroskope verwendet:

Die Auswertung der fluoreszent markierten Präparate erfolgte am Mikroskop der Firma Nikon (Diaphot 300) bei 100 bis 200-facher Vergrößerung und am Mikroskop der Firma Keyence (BZ-8000) bei 200 bis 600-facher Vergrößerung. Die nicht-fluoreszent-gekoppelten Schnitte wurden am Olympus (BH 2) bei 100- bis 160-facher Vergrößerung oder am Mikroskop der Firma Keyence (BZ-8000) bei 200 bis 600-facher Vergrößerung ausgewertet.

Um die Regenerationsfähigkeit der verschiedenen Fasertrakte in parasagitalen Schnitten zu quantifizieren wurden alle Faserfragmente gezählt, die sich im Narbeareal befanden. Die fibröse Narbe wurde in eine rostrale und eine caudale Hälfte unterteilt. Die Auszählung der Axonfragmente erfolgte jeweils separat für beide Hälften (Abb. 2.5). Die Narbe wurde entweder mittels einer Doppelfärbung gegen GFAP oder NG2 detektiert.

Um die Anzahl der regenerierten serotonergen und catecholaminergen Axone distal des Läsionsgebietes bestimmen zu können, wurde ein bestimmter Bereich von einer Größe von 300 x 300 µm ausgewählt. Dieser befand sich an der dorsalen Oberfläche direkt hinter der Narbe, somit konnte eine Zählung von unverletzten, eingewanderten Axonen vermieden werden (Abb. 2.5, Stern). Regenerierte kortikospinale- oder rubrospinale Axone wurden in der gesamten dorsalen weißen Substanz caudal der Läsion ausgezählt (Abb. 2.5, gestrichelter Bereich).

Bei der Auswertung des Aussprossungsverhaltens in coronalen Rückenmarkschnitten wurden alle Axonfragmente des kortikospinalen- also auch des rubrospinalen Traktes in der grauen und weißen Substanz durch Auszählen ermittelt. Dabei wurde der Bereich von 2 bis 0,1 cm bzw. 2 bis 1 cm rostral des Läsionsareals untersucht.

Um verfälschte Ergebnisse aufgrund Varianzen in der Markierungsmethode auszuschließen, wurde eine Normierung durchgeführt. Dazu wurde die Größe des markierten kortiko- bzw. rubrospinalen Traktes durch Messung der Pixelanzahl bzw. durch Auszählen ermittelt. Die ausgezählten Werte der grauen und weißen Substanz wurden dann durch die Werte des markierten Traktes dividiert und als relative Pixel in % angegeben.

Für die Bestimmung des Aussprossens der serotonergen und der catecholaminergen Faserpopulation wurden Bilder der coronalen Schnitte angefertigt und die Intensität der Färbung wurde anschließend mittels eines Programms (ImageJ) bestimmt. Dabei wurden verschiedene Bereiche untersucht, welche im Ergebnisteil genauer dargestellt ist.

Zur Ermittlung des Aussprossungsverhaltens des CST an coronalen, DAB gefärbten Schnitten wurde ein Olympus Mikroskop (CH 2) mit einem Camera lucida- Aufsatz

verwendet, womit Zeichnungen angefertigt werden konnten. Alle Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop der Firma Keyence (BZ-8000) gemacht.

Zur Ermittlung des Aussprossungsverhaltens der verschiedenen Faserpopulationen (CGRP, 5-HT, TH, RST, CST) an coronalen, fluoreszenten Schnitten wurde das Mikroskop der Firma Keyence (BZ-8000) verwendet.

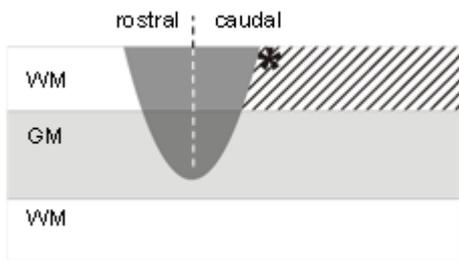


Abbildung 2.5 Schematische Darstellung des Narbenareals, sowie die Quantifizierungsbereiche im parasagitalen Schnitt. Der Läsionsbereich (dunkelgrau) wurde in eine rostrale und eine caudale Hälfte unterteilt. Die Quantifizierung der serotonergen und catecholaminergen Axonfragmente caudal der Läsion wurde auf einen Bereich von 300x300 µm in der weißen Substanz beschränkt (Stern).

Axonfragmente des CST wurden in der gesamten dorsalen weißen Substanz (gestrichelter Bereich) ausgezählt. GM: graue Substanz; WM: weiße Substanz.

Für die statistische Auswertung wurde entweder der Student-T-Test oder der Mann Whitney U Test verwendet, bei welchem es sich um einen parameterfreien statistischen Test handelt. Der U-Test ist ein Homogenitätstest, der zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen dient. Zusätzlich zum Mann Whitney U Test wurde eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen, um die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen zu neutralisieren.

Die unlädierten Tiere wurden nicht in die statistischen Berechnungen mit einbezogen. Diese Werte dienen lediglich als Anhaltspunkt, in welcher Größenordnung die intrinsische Expression liegt und ob ein vermehrtes Aussprossen von Axonen nach Verletzung mit und ohne Behandlung zu verzeichnen ist.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen des Regenerationsverhaltens verschiedener Faserpopulationen nach Läsion und anschließender Behandlung zur Unterdrückung der Narbenbildung

Um die Wirkung des Eisenchelators BPY-DCA zur Narbenunterdrückung auf die axonale Regeneration verschiedener Axontrakte zu untersuchen, wurde die im Methodenteil beschriebene, dorsale Hemisektion (Th8) an adulten Ratten durchgeführt.

Die Axonpopulationen wurden auf ihr regeneratives Wachstumsverhalten mit und ohne Behandlung untersucht und verglichen. Dazu wurde die Anzahl der Axonfragmente ermittelt, die 5- bzw. 12-Wochen nach erfolgter Operation den Narbenbereich penetrierten. Die Narbe wurde mittels Immunfärbungen gegen GFAP bzw. NG2 identifiziert. In jedem zweiten parasagittalen Schnitt wurden die serotonergen (RaST, 5-HT), catecholaminergen (CoST, TH) und CGRP-positiven Axonfragmente mittels Antikörperfärbungen detektiert, ausgezählt und statistisch ausgewertet. Der kortikospinale (CST) und rubrospinale Trakt (RST) wurde mittels anterogradem Tracing mit BDA detektiert, anschließend ebenfalls ausgezählt und ausgewertet. Für eine genauere Evaluierung des Wachstumsverhaltens der unterschiedlichen Axonpopulationen wurde die Narbe in eine rostrale und eine caudale Hälfte unterteilt.

Die experimentellen Gruppen für die histologischen Untersuchungen des Narbenareals sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Axonpopulation	Behandlung	5 Wochen nach Läsion	12 Wochen nach Läsion
CGRP	Kontrolle	4	5
	AST	5	5
5-HT	Kontrolle	4	5
	AST	4	5
TH	Kontrolle	4	4
	AST	5	5
RST	Kontrolle	5	n.v.
	AST	5	n.v.
CST	Kontrolle	5	4
	AST	5	5

Tabelle 3.1 Anzahl der verwendeten Ratten in den jeweiligen experimentellen Gruppen. (n.v.: nicht verfügbar)

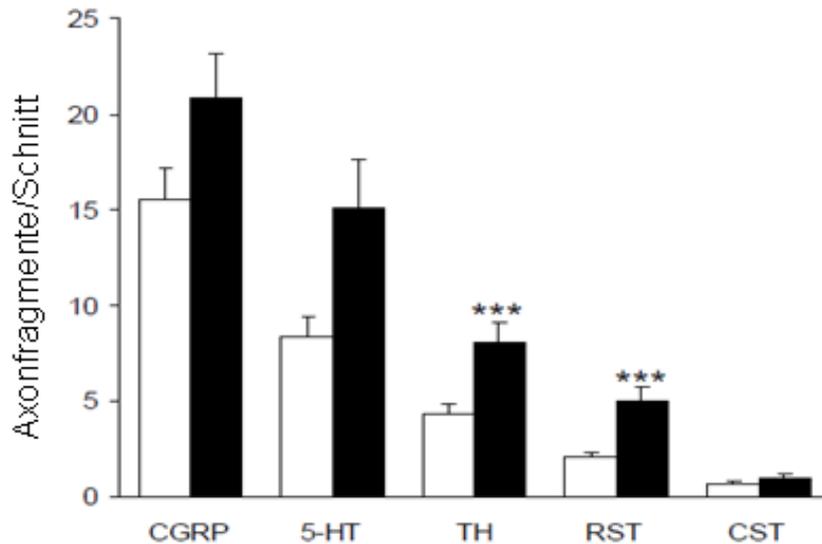
3.1.1 Untersuchung des Regenerationsverhaltens der unterschiedlichen Axonpopulationen in lädierten Kontrolltieren 5 Wochen nach Verletzung

Fünf Wochen nach erfolgter Hemisektion wurde die Anzahl der serotonergen, catecholaminergen, kortikospinalen und rubrospinalen, sowie der CGRP-positiven Axonfragmente im GFAP-negativen bzw. NG2-positiven Läsionsbereich in jedem Tier durch Zählen bestimmt.

Es zeigte sich für alle untersuchten Faserpopulationen dass einige Axonfragmente spontan in den Narbenbereich eingewandert waren. Die Anzahl dieser spontan eingewachsenen Fasern fiel jedoch sehr gering aus (Abb. 3.1; weiße Balken). Am höchsten war die Anzahl der CGRP-positiven Axonfragmente ($15,5 \pm 1,7$ pro Schnitt) die in der primären fibrösen Narbe detektiert wurden, gefolgt von der serotonergen ($8,5 \pm 1,1$ pro Schnitt) und der catecholaminergen Faserpopulation ($4,3 \pm 0,6$ pro Schnitt). Die geringste spontane Regeneration 5 Wochen nach Läsion zeigten der RST ($2,0 \pm 0,3$ pro Schnitt) und der CST ($0,7 \pm 0,1$ pro Schnitt). Bei allen Fasersystemen konnte jedoch beobachtet werden, dass die Mehrheit der Fasern an der Grenze zur fibrösen Narbe stoppten und rostral des Läsionsbereichs verblieben (Abb. 3.2 A-C).

3.1.2 Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf das Regenerationsverhalten 5 Wochen nach Verletzung

Das beobachtete spontane Einwandern der Axone in das Narbenareal konnte durch die Verabreichung der Anti-Narbenbehandlung (AST) deutlich gesteigert werden (Abb. 3.1 und 3.2). Dieses erhöhte Einwachsen in die sich später ausgebildete Narbe konnte bei allen untersuchten Fasertrakten beobachtet werden.



3.1 Quantifizierung der Axonfragmente in der Narbe 5 Wochen nach Verletzung. Die Anzahl der Axonfragmente in der GFAP-negativen bzw. NG2-positiven fibrösen Narbe wurde in jedem zweiten parasagittalen Schnitt pro Tier bestimmt und der Mittelwert pro experimenteller Gruppe (45-75 Schnitte pro Gruppe) ermittelt (Balken: Mittelwerte + SEM). Weiße Balken: Tris-Puffer-Kontrolltiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere. Ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen wurde für TH und RST detektiert. Statistik: Mann Whitney U Test. *** $p < 0,001$; Holm-Bonferroni Korrektur.

Die vorübergehende Unterdrückung der Narbenbildung bewirkte eine Zunahme an Axonfragmenten in der Narbe von ca. 35% bei der CGRP-positiven Faserpopulation ($21 \pm 2,4$ Axonfragmente pro Schnitt) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei 5-HT (Abb. 3.2 E) konnte eine Zunahme von 78% ($15,1 \pm 2,6$ Axonfragmente pro Schnitt) im Vergleich zu den Kontrollen verzeichnet werden. Bei der catecholaminergen und der rubrospinalen Population zeigte sich nach AST Behandlung eine statistisch signifikante Zunahme der Faserdichte im Narbenbereich. Für TH konnte eine Zunahme von 88% ($8,1 \pm 1,0$ Axonfragmente pro Schnitt) im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.2 B) registriert werden, beim RST wurde sogar ein Anstieg von 100% ($5,0 \pm 0,7$ Axonfragmente pro Schnitt) beobachtet. Wie die CGRP-Population zeigte der CST nur eine geringe Zunahme in der Axondichte im Narbenareal (43%; $1,0 \pm 0,2$ Axonfragmente pro Schnitt).

Die Reihenfolge der Trakte wurde in Bezug auf die Axondichte in der Narbe durch die transiente Narbenunterdrückung nicht verändert, da alle Fasertrakte auf die Behandlung reagierten und die Anzahl der Axonfragmente bei allen Trakten durch ein vermehrtes Einwachsen erhöht wurde.

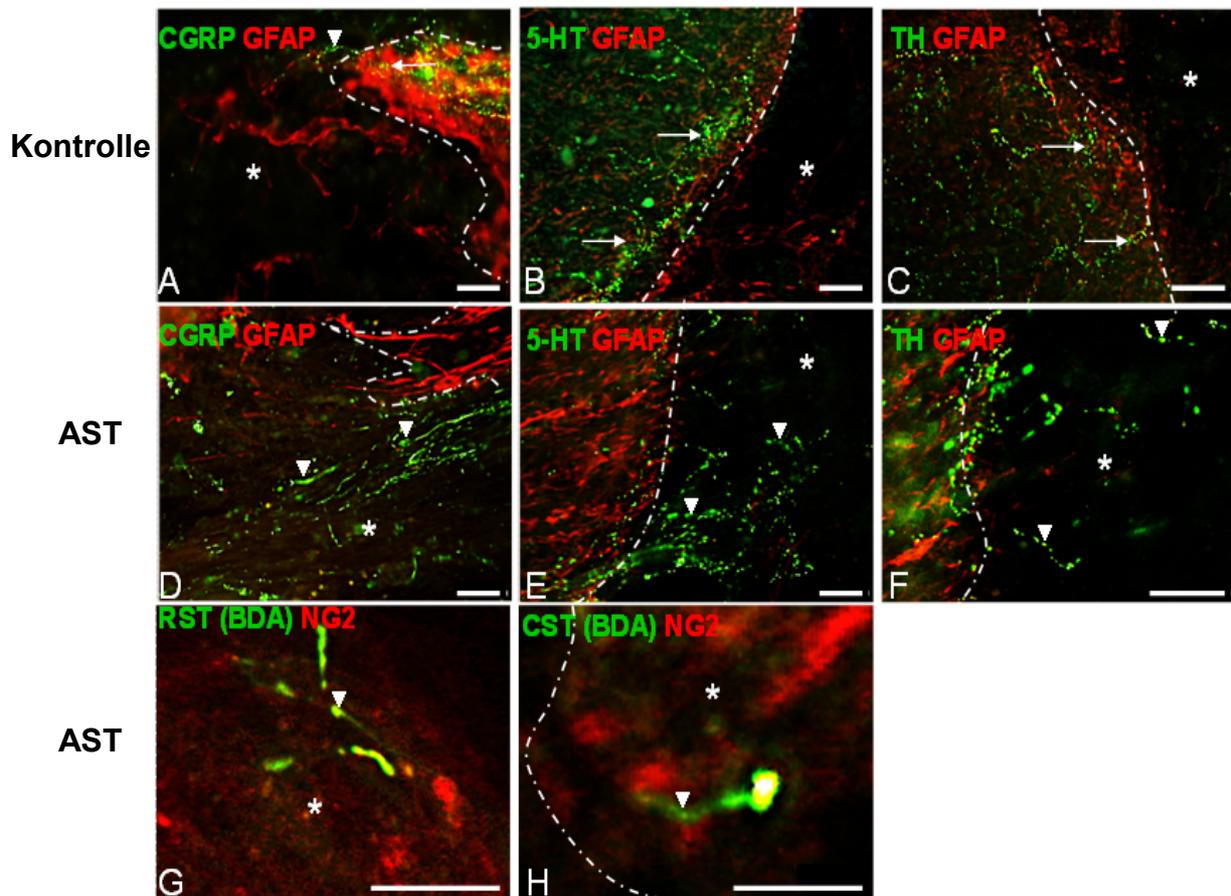


Abbildung 3.2 Immunhistochemische Doppelfärbungen an parasagittalen Rückenmarksschnitten 5 Wochen nach Verletzung in Kontroll (A-C) und AST-behandelten (D-H) Tieren. Orientierung: dorsal = oben, rostral = links. Die Mehrheit der CGRP (A), 5-HT (B), TH (C), RST und CST Axonfragmente (grün) stoppen, ohne Behandlung an der proximalen Grenze zur fibrösen Narbe (GFAP-negativ, Stern) (Pfeile). Durch die AST Behandlung konnten zahlreiche CGRP- (D), 5-HT- (E), TH- (F) immunopositive Axone die Narbengrenze (gestrichelte Linie) überwinden und in die fibröse Narbe einwandern (Pfeilspitze). Die mit BDA markierten RST- (G) und CST- (H) Axone wurden ebenfalls, nach AST Behandlung, vermehrt in der fibrösen, NG2-positiven Narbe (rot) detektiert, in Kontrolltieren jedoch nur sehr vereinzelt. Maßbalken A-F: 100 µm; G-H: 50 µm.

3.1.3 Verteilung der Axonfragmente in der rostralen bzw. caudalen Hälfte des Narbenareals 5 Wochen nach Verletzung

Für eine detaillierte Untersuchung der Verteilung der Axonfragmente innerhalb des Narbenareals wurde dieses in eine rostrale und caudale Hälfte unterteilt und die Axonfragmente der verschiedenen Populationen separat ausgezählt. Die Mittelwerte der Axonzählung sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Für alle Fasertrakte konnte ein Gradient der Axondichte in der Narbe festgestellt werden, der der Wachstumsrichtung des jeweiligen Traktes entsprach. Die Axonfragmente des

aufsteigenden CGRP-Fasertraktes zeigten in der caudalen Hälfte eine deutlich höhere Anzahl als in der rostralen Hälfte. Dies konnte in beiden experimentellen Gruppen (AST und Tris-Kontrolltieren) beobachtet werden.

Axon Population	Behandlung	Behandlung	
		rostral	caudal
CGRP	Tris	59	118
	AST	85	150
5-HT	Tris	90	13
	AST	124	35
TH	Tris	42	8
	AST	92	15
RST	Tris	30	1
	AST	79	1
CST	Tris	8	0
	AST	11	1

Tabelle 3.2 Quantifizierung der Axonfragmente in der rostralen und caudalen Narbenhälfte 5 Wochen nach Läsion. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte pro Gruppe (4-5 Tiere/Gruppe, siehe Tabelle 3.1). Alle aufsteigenden Fasertrakte zeigten wesentlich mehr Fragmente in der rostralen, als der caudalen Narbenhälfte. Bei der aufsteigenden CGRP-Population wurde eine umgekehrte Verteilung beobachtet.

Diese räumliche Verteilung im Narbenareal zeigte eine umgekehrte Verteilung bei allen absteigenden Axontrakten (5-HT, TH, CST, RST), die, im Gegensatz zur CGRP-Population, ein vermehrtes rostrales einwachsen aufwiesen, was ihre natürliche Wachstumsrichtung widerspiegelt. Die meisten Axonfragmente konnten in der rostralen Hälfte detektiert werden, in Richtung caudal nahm die Anzahl hingegen ab. Diese rostrocaudale Verteilung wurde für alle absteigenden Trakte, in beiden experimentellen Gruppen (AST und Tris-Kontrollen) beobachtet.

Durch die AST Behandlung konnte bei allen Trakten eine deutliche Zunahme an Axonfragmenten in beiden Narbenhälften im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden.

3.1.4 Längerfristige Auswirkungen auf die axonale Regeneration durch eine transiente Narbenunterdrückung

Zur Untersuchung einer längerfristigen axonalen Regeneration durch die vorübergehende Unterdrückung der Narbenbildung wurde ein Überlebenszeitraum von 12 Wochen gewählt. Die Quantifizierung der Axonfragmente im Narbenbereich zeigte eine weitere Erhöhung der Anzahl an CGRP, 5-HT, TH und CST Axonfragmenten 12 Wochen nach Verletzung. Der RST konnte zu diesem späten Zeitpunkt leider nicht weiter untersucht werden, da die Markierung aufgrund einer Atrophie bedingten Verschiebung des *Nucleus rubers* nicht mehr möglich war (Xiao et al., 2005, siehe Diskussion).

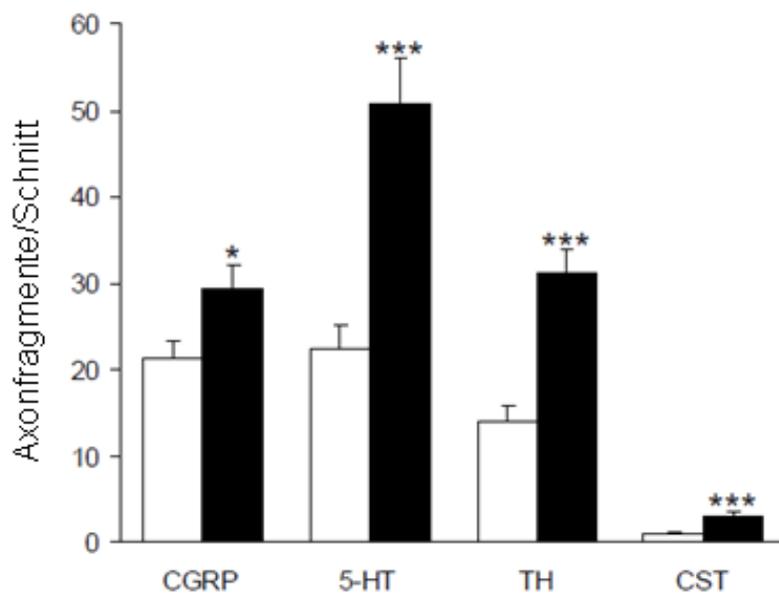


Abbildung 3.3 Quantifizierung der Axonfragmente in der Narbe 12 Wochen nach Verletzung. Die Anzahl der Axonfragmente in der GFAP-negativen fibrösen Narbe wurde in jedem zweiten parasagittalen Schnitt pro Tier bestimmt und der Mittelwert pro experimenteller Gruppe (45-75 Schnitte pro Gruppe) ermittelt (Balken: Mittelwerte + SEM). Weiße Balken: Tris-Puffer-Kontrolltiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere. Ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen wurde für alle Trakte detektiert. Statistik: Mann Whitney U Test. ***, $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; Holm-Bonferroni Korrektur.

Zwölf Wochen nach Verletzung zeigten alle untersuchten Fasertrakte nach AST-Behandlung eine signifikante Zunahme der Axondichte im Läsionsbereich. Auch bei den Tris-Kontrollen war eine Erhöhung der Axonfragmente in der Narbe zu beobachten, diese fiel jedoch sehr gering aus.

Bezüglich der Reihenfolge der Axondichte in der Narbe konnte nach 12 Wochen, durch die transiente Narbenunterdrückung eine deutliche Veränderung beobachtet werden. Es zeigte sich, dass im Vergleich zum 5 Wochen Zeitpunkt, die 5-HT Faserpopulation die vorherrschende Population darstellte, gefolgt von der TH-Population und dem CST, bei denen ebenfalls ein signifikant gesteigertes Einwachsen in die Narbe nach AST Behandlung zu beobachten war. Die CGRP-positive Axonpopulation hingegen zeigte zu diesem späten Zeitpunkt zwar eine signifikante, jedoch die geringste Zunahme an Axonfragmenten in der Narbe im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

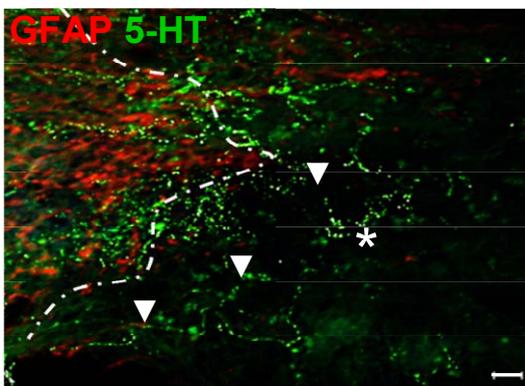


Abbildung 3.4 Immunhistochemische Doppelfärbung an einem parasagittalen Rückenmarksschnitt. Beispiel für das signifikant gesteigerte Einwachsen serotonerger Axone (grün, Pfeilspitzen) in die fibrose Narbe (Stern) 12 Wochen nach Läsion. Maßbalken: 50 µm.

3.1.5 Verteilung der Axonfragmente in der rostralen bzw. caudalen Hälfte des Narbenareals 12 Wochen nach Verletzung

Auch für den 12-Wochen Überlebenszeitpunkt wurden die Axonfragmente im Narbenareal separat für die rostrale und caudale Hälfte ermittelt. Die Mittelwerte der Zählung sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Wie für den 5 Wochen Zeitpunkt zeigte sich hier ebenfalls der wachstumsspezifische rostrocaudale Gradient in der Axondichte im Narbenbereich.

Die Axonfragmente des aufsteigenden CGRP-Fasertraktes zeigten in der caudalen Hälfte eine deutlich höhere Anzahl als in der rostralen Hälfte. Dies konnte sowohl in Tris-Kontrollen als auch AST behandelten Tieren beobachtet werden. Diese räumliche Verteilung im Narbenareal zeigte, wie bereits 5 Wochen nach Läsion beobachtet, eine umgekehrte Verteilung aller absteigenden Axontrakte (5-HT, TH, CST), die, im Gegensatz zur CGRP-Population, ein vermehrtes rostrales Einwachsen aufwies. Auch hier konnte nach AST Behandlung bei allen Trakten eine deutliche

Zunahme an Axonfragmenten in beiden Narbenhälften beobachtet werden. Außerdem zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg in der Axondichte in beiden Narbenhälften im Vergleich zu den 5 Wochen Experimenten.

Axon Population	Behandlung	Behandlung	
		rostral	caudal
CGRP	Tris	77	186
	AST	94	282
5-HT	Tris	163	52
	AST	587	124
TH	Tris	127	30
	AST	298	76
RST	Tris	n.a.	n.a.
	AST	n.a.	n.a.
CST	Tris	8	3
	AST	34	9

Tabelle 3.3 Quantifizierung der Axonfragmente in der rostralen und caudalen Narbenhälfte 12 Wochen nach Läsion. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte pro Gruppe (4-5 Tiere/Gruppe, siehe Tabelle 3.1). Alle aufsteigenden Fasertrakte zeigten mehr Fragmente in der rostralen, als der caudalen Narbenhälfte. Bei der aufsteigenden CGRP- Population wurde eine umgekehrte Verteilung beobachtet.

3.1.6 Überqueren der Narbengrenze und Einwachsen der Axone in die Narbe 5 und 12 Wochen nach Verletzung

Um die Wirkung des AST auf die Fähigkeit der Axone zu untersuchen, die sich später ausgebildete Narbe zu einem späteren Zeitpunkt zu penetrieren, wurden alle CGRP-, 5-HT- und TH-positiven Axone gezählt, die die proximale Grenze der Narbe überschritten und in das Narbengewebe einwachsen.

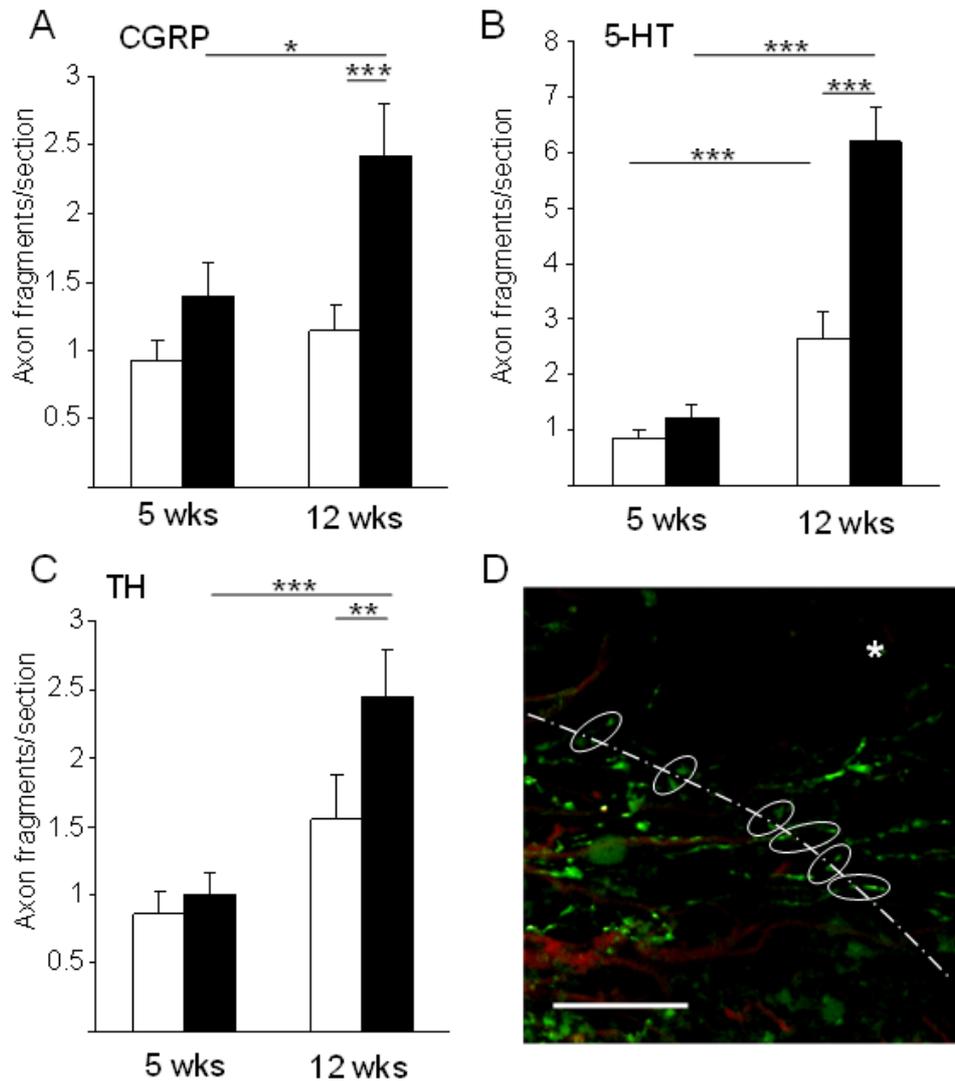


Abbildung 3.5 Quantifizierung der CGRP- (A), 5-HT- (B,D) und TH-positiven (C) Axone, welche die proximale Grenze der Läsion (D, gestrichelte Linie) nach 5 und 12 Wochen überschritten. Weiße Balken: Tris-Puffer-Kontrolltiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere (Mittelwerte + SEM). Statistik: Mann-Whitney U Test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), Holm-Bonferroni Korrektur. Immunhistochemische Färbung in D zeigt ein Beispiel einer Narbengrenze (gestrichelte Linie) die von 5-HT-positiven Axonen (grün, eingekreist) überquert wird, welche in die Quantifizierungen (A-C) eingeflossen sind. Stern: fibröse Narbe. Maßbalken: 50 μm .

Die CGRP-positiven Axonfragmente (Abb. 3.5 A) wurden an der caudalen, 5-HT (Abb. 3.5 B) und TH (Abb. 3.5 C) an der rostralen Narbengrenze gezählt. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Axone die die Narbengrenze 12 Wochen nach Läsion überquerten deutlich erhöht war, verglichen zum 5 Wochenzeitpunkt. Dies konnte bei allen Fasertrakten beobachtet werden, sowohl in den AST-behandelten, als auch den Tris-Kontroll-Tieren. Dabei zeigten die CGRP-positiven Fasern bei der Tris-Kontrollgruppe den geringsten Anstieg über die Zeit von nur 22%. Nach AST

Behandlung konnte eine signifikante Zunahme über die Zeit von 98%, im Vergleich zu 5 Wochen nach Verletzung erreicht werden. Bei der TH-positiven Axonpopulation konnte bei der Tris-Kontrollgruppe ein vermehrtes Einwachsen von 102% zwischen der 5ten und der 12ten Woche beobachtet werden. Nach AST Behandlung konnte diese Zunahme um weitere 40% gesteigert werden. Die 5-HT Population zeigte von allen untersuchten Trakten den größten Anstieg zwischen der 5ten und 12ten Woche, sowohl in der Tris- (226%), als auch der AST-behandelten Gruppe (420%). Die Daten zeigen deutlich, dass ein spontanes Einwachsen der Axone der verschiedenen Trakte nicht nur zu einem frühen Zeitpunkt geschieht, sondern auch noch später erfolgt, wobei das Einwachsen zu einem späteren Zeitpunkt sich bei einigen Trakten sogar noch steigerte (siehe Abb. 3.5 B, 5-HT). Eine Unterdrückung der Narbenbildung mittels AST konnte diesen Effekt signifikant steigern. Es scheint dass die serotonerge Axonpopulation ein generell später aktiviertes Regenerationsprogramm besitzt. Übereinstimmende Resultate zeigten sich auch bei der Zunahme der Axonfragmente in der Narbe über die Zeit (siehe Abbildung 3.6). Die verschiedenen Trakte weisen deutliche Unterschiede im zeitlichen Verlauf des axonalen Einwachsens in die Narbe auf. Auch die Reaktionen auf die AST Behandlung fiel unterschiedlich aus. Die CGRP Faserpopulation zeigt, im Vergleich zu den anderen Populationen, zu Beginn ein massives Einwachsen in das Narbenareal, welches jedoch im zeitlichen Verlauf abnahm. Dieser Verlauf konnte auch nicht durch die Gabe des AST verlängert werden. Ein ähnliches geringes, frühes Einwachsen war bei der CST Faserpopulation ohne Behandlung zu beobachten. Das Einwachsen in das Narbenareal blieb über die gesamte Periode (12 Wochen) relativ konstant. Durch die AST Behandlung konnte das Einwachsen in die Narbe, insbesondere zu einem späteren Zeitpunkt nach Läsion, deutlich gesteigert werden. Die 5-HT und TH Axonpopulation zeigten anfänglich ein eher geringes Einwachsen in den Narbenbereich, sowohl bei AST- als auch bei Tris-Tieren, was sich jedoch über die Zeit erhöhte. Dies war besonders deutlich bei der 5-HT Population zu beobachten. Die Gabe des AST bewirkte eine weitere Steigerung regenerierter Fasernfragmente im Narbenareal über die Zeit.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Permeabilität der später gebildeten, sekundären Narbe in den AST-behandelten Tieren sich von der primären, initial gebildeten Narbe stark unterscheidet. Ebenfalls ist zu erkennen, dass jeder

Fasertrakt ein individuelles zeitliches Wachstumsmuster aufweist, welches durch die Behandlung zur Narbenunterdrückung stark erhöht bzw. verlängert werden kann.

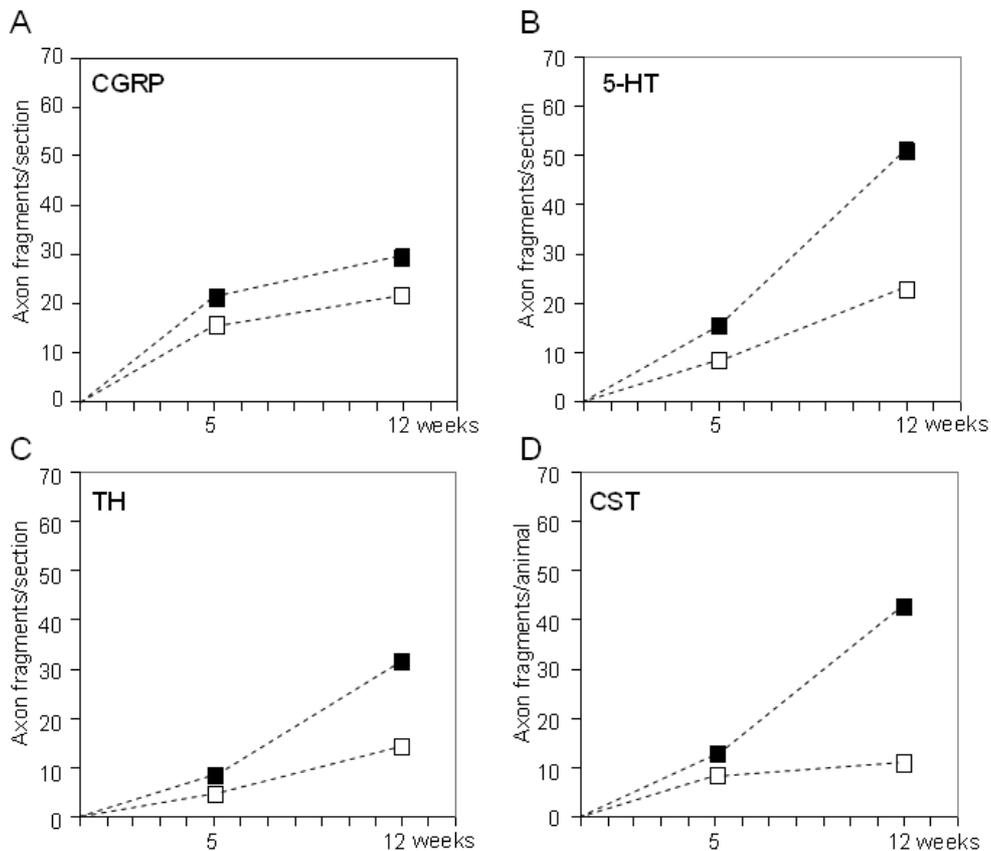


Abbildung 3.6 Zeitliche Verläufe der Zunahme an CGRP-(A), 5-HT- (B), TH- (C) und CST Axonfragmenten in der fibrösen Narbe. Weiße Vierecke: Tris-Puffer-Kontrolltiere; Schwarze Vierecke: AST-behandelte Tiere. Deutlich zeigt sich die späte Erhöhung der Axonfragmente nach AST Behandlung insbesondere des serotonergen (B) und CST (D) Fasersystems.

3.1.7 Regeneration verletzter Axone in das distale Rückenmark

Um den Grad der Regeneration verletzter Axone feststellen zu können, die durch die Narbe hindurch gewachsen und in das caudale unverletzte Rückenmark eingewachsen sind, wurde für die 5-HT und TH Axontrakte nur ein kleiner Bereich in der dorsalen weißen Substanz, direkt angrenzend zur Narbe, ausgewählt, um ein versehentliches Mitzählen ausgesprossener unverletzter Axone zu vermeiden (siehe Abbildung 2.5; Stern). Caudale CST Axone wurden in der gesamten dorsalen weißen Substanz gezählt (siehe Abbildung 2.5; gestrichelter Bereich). Es zeigte sich dass 5 Wochen nach Verletzung nur sehr wenige Axone in das caudale unverletzte Rückenmark eingedrungen waren, so dass eine Quantifizierung nur für den späteren

Zeitpunkt durchführbar war. 12 Wochen nach Läsion konnten deutlich mehr Axone im Bereich caudal der Narbe detektiert werden. Beispiele für regenerierte Axone, die den gesamten Narbenbereich durchwandert und in die caudale weiße Substanz eingewachsen sind, sind in Abbildung 3.7 A-C dargestellt. Die Anzahl der caudal der Läsion detektierten regenerierten Axonfragmente der 5-HT- (Abb. 3.7A), TH- (Abb. 3.7B) und CST- Population (Abb. 3.7C) sind in der Abbildung 3.7 D zu finden. Aufgrund des sehr kleinen ausgewählten Bereichs ($0,1 \text{ mm}^2$) hinter der Narbe für die 5-HT und TH Faserquantifizierung fiel die Anzahl der detektierten Fragmente relativ gering aus. Diese konnten durch den Einsatz des AST deutlich erhöht werden, ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen.

Im Gegensatz zu den Kontrollen wurde eine signifikant erhöhte Anzahl an CST Axonfragmenten in der dorsalen weißen Substanz in AST-behandelten Tieren detektiert. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass einige, wenn auch wenige Axone, in der Lage sind das gesamte Narbenareal zu durchwandern und in das caudale unlädierte Rückenmark einzudringen. Durch die AST Behandlung konnte die Anzahl an durchgewachsenen Axonen deutlich gesteigert werden.

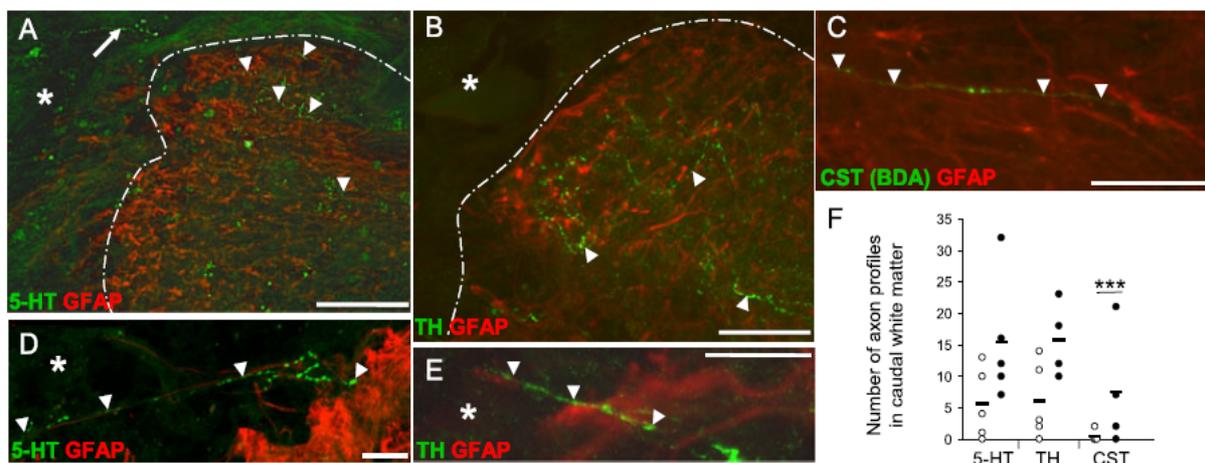


Abbildung 3.7 Axonfragmente in der unlädierten weißen Substanz caudal der Läsionsstelle. Immunhistochemische Färbungen in A-E zeigen Doppelfärbungen mit GFAP (rot) und Axonen (grün) der unterschiedlichen Faserpopulationen, 5-HT (A), TH (B) und CST (C). Das in F dargestellte Diagramm zeigt die Quantifizierung der Axonfragmente von unbehandelten Kontrolltieren (weiße Kreise) und AST-behandelten Tieren (schwarze Kreise).

Der Mittelwert der Axonfragmente für jede Gruppe ist durch eine Linie dargestellt. Statistik: Mann Whitney U Test (***, $p < 0.001$); Holm-Bonferroni Korrektur. Pfeilspitzen in A-C zeigen Axonfragmente im caudalen Rückenmarksgewebe; Pfeil in A zeigt ein Axonfragment an der caudalen Narbengrenze vor dem Austritt in das unlädierte Rückenmark. Pfeilspitzen in D und E zeigen 5-HT und TH Axone, welche die caudale Narbengrenze überqueren, um in das unverletzte Rückenmark einzuwachsen. Maßbalken in A und B: $100 \mu\text{m}$, C: $50 \mu\text{m}$.

Die CGRP-positive Axonpopulation wurde bei dieser Quantifizierung nicht berücksichtigt, da diese in jedem Segment über die Hinterwurzel in das Rückenmark projiziert, weshalb die Herkunft nicht genau bestimmt werden konnte.

3.2 Untersuchungen des Aussprossungsverhaltens des kortikospinalen Traktes nach Läsion und anschließender Verabreichung verschiedener wachstumsfördernder Substanzen

Die verwendeten Substanzen (GIP, SDF-1) wurden ausgewählt, da ihnen sowohl eine Rolle als Neurotransmitter bei der Zellwanderung zugeschrieben wird, als auch eine Beteiligung bei der Modulierung des Zellwachstums und des Überlebens. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Verabreichung neurotropher Faktoren in akuten Läsionsmodellen des Rückenmarks abgetrennte Neurone vor dem Tod retten, das axonale Wachstum anregen und teilweise eine Wiederherstellung von Körperfunktionen bewirken kann. In dieser Studie wurde die Wirksamkeit von GIP (gastric inhibitory polypeptide) und SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1) auf das Aussprossen verletzter Axone rostral des verletzten Rückenmarks untersucht.

3.2.1 Auswirkungen auf das axonale Aussprossen durchtrennter kortikospinaler Axone nach kontinuierlicher Verabreichung des Peptidhormons GIP

Bereits im Vorfeld wurden in unserem Labor Untersuchungen zum Expressionsprofil des GIP Hormons und seines Rezeptors (GIPR) durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Läsions-induzierte Veränderung des CXCR4 und CXCR7 Expressionsprofils nach Quetschung des Ischiasnervs sowohl im proximalen und distalen Nerv, im dorsalen Wurzelganglion, und im Rückenmark (Buhren et al., 2009). Diese läsions- bzw. regenerationsspezifische Expression lässt auf eine Rolle des GIP/GIPR Systems bei der Signalgebung der spontanen peripheren Nervenregeneration schließen. Um eine mögliche wachstumsfördernde Funktion des GIP bei der axonalen Regeneration im zentralen Rückenmark zu untersuchen, wurde das Peptid (80 μ M) mittels osmotischer Minipumpen über einen Zeitraum von 7 Tagen in das Läsionsareal appliziert. Dies wurde wie unter Punkt 2.3.2 beschrieben durchgeführt. Die Tiere wurden einer dorsalen Hemisektion unterzogen, bei dem der

dorsale Teil des kortikospinalen Traktes durchtrennt wurde. Anschließend erhielten die Tiere eine intrathekale Infusion des GIP-Peptids bzw. das Vehikel (Wasser) als Kontrolle. Der CST wurde mittels BDA-Injektion in den sensorischen Kortex anterograd markiert und 5 Wochen nach Verletzung wurden die Tiere getötet. Die BDA-markierten CST Axone wurden immunhistochemisch dargestellt und durch Auszählen aller Fragmente in der grauen und weißen Substanz konnte das Aussprossen des Traktes ermittelt werden. Dabei wurde ein Bereich von 2 bis 0 cm rostral des Läsionsareals untersucht (Abb. 3.8 B).

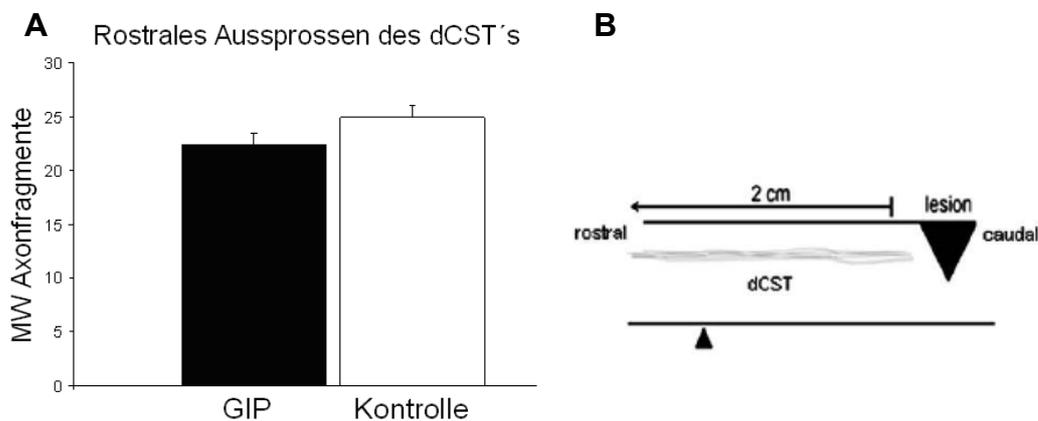


Abbildung 3.8 Quantifizierung des axonalen Aussprossens des dorsalen CST's nach Verletzung und anschließender lokaler GIP-Verabreichung. A: Diagramm zeigt die komplett (weiße + graue Substanz) ausgezählten Axonfragmente pro Gruppe. Durchschnittlich wurden 45 Schnitte pro Tier über einen Bereich von 2 cm untersucht (B, großer Balken). Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM.

5 Wochen nach Läsion und lokaler einwöchiger Applikation des GIP bzw. Vehikels zeigten sich keine Unterschiede im Aussprossen dorsaler kortikospinaler Axone. Die durchschnittliche Anzahl der Faserfragmente bei GIP-behandelten Tieren (n=3) lag bei 22, bei den Kontrolltieren (n=3) dagegen bei 25 Fragmenten. Der Vergleich der beiden Behandlungsgruppen zeigt deutlich, dass die Verabreichung des GIP die Anzahl der Faserfragmente nicht erhöht. Sie erreichen das gleiche Niveau wie die Kontrolltiere. Eine wachstums- bzw. regenerationsfördernde Eigenschaft kann somit im ZNS *in vivo* nicht bestätigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Peptid aus weiteren Versuchen ausgeschlossen.

3.2.2 Auswirkungen auf das axonale Aussprossen durchtrennter kortikospinaler Axone nach kontinuierlicher Verabreichung des Chemokins SDF-1 α

In vitro konnte bereits gezeigt werden dass eine Preinkubation mit dem SDF-1 α Chemokin das Neuritenwachstum von DRG Neuronen, die auf ZNS-Myelin kultiviert wurden, stark erhöht (Opatz et al., 2008). Um diesen wachstumsfördernden Effekt des SDF-1 α *in vivo* zu bestätigen, wurde das Chemokin (10 μ M), wie in Punkt 2.3.2, 2.7 und 3.2.1 beschrieben, appliziert und ausgewertet.

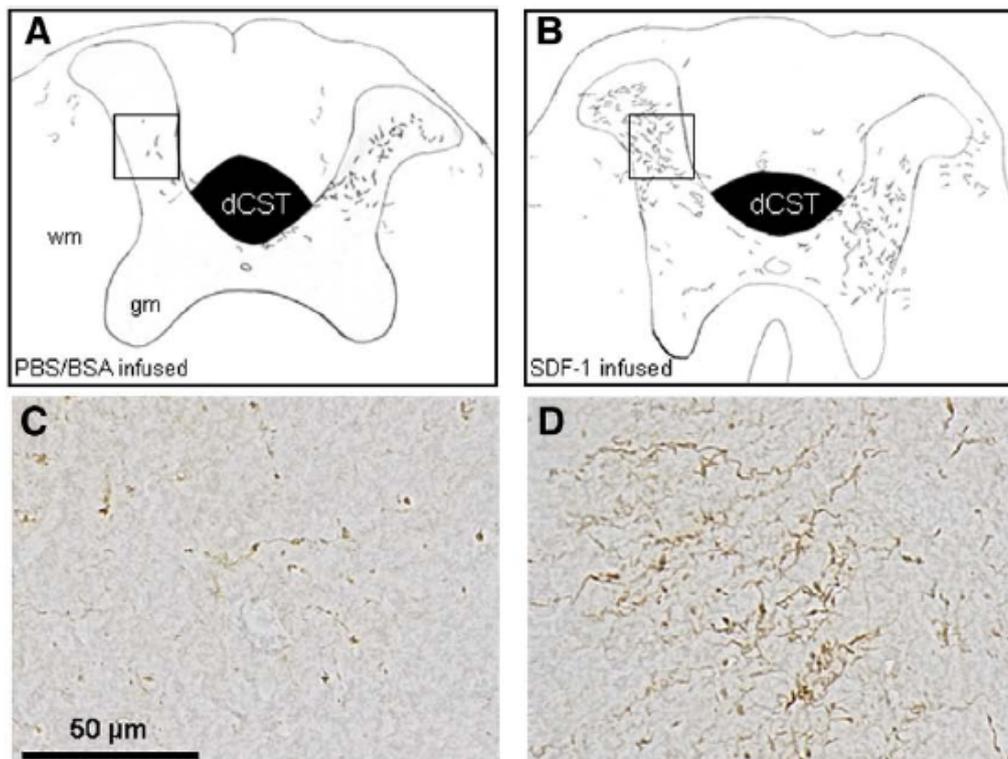


Abbildung 3.9 Darstellung des SDF-1 α induzierten axonalen Aussprossens dorsaler CST Axone nach Verletzung und lokaler Chemokin-Verabreichung. A und B zeigen repräsentative *Camera lucida* Rekonstruktionen coronaler Rückenmarksschnitte mit markiertem CST von Kontrolltieren (A) und SDF-1 α -behandelten Tieren (B). Der in A bis D dargestellte Bereich ist in Abbildung 3.8 D durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet (1,5 bis 1,0 cm rostral der Narbe). C, D: Lichtmikroskopische Bilder BDA-markierter CST Axone in der grauen Substanz der in A und B eingezeichneten Ausschnitte (Boxen). dCST: dorsaler kortikospinaler Trakt; GM: graue Substanz; WM: weiße Substanz. Maßbalken 50 μ m.

Abbildung 3.9 zu sehen ist, führt die Behandlung mit SDF-1 α zu einer starken Erhöhung der Anzahl ausgesprossener kortikospinaler Axone in der grauen und weißen Substanz. Die Quantifizierung, dargestellt in Diagramm 3.10 A und D, kann diese Beobachtung verdeutlichen. In der Kontrollgruppe wurden durchschnittlich 60 Faserfragmente in der grauen und weißen Substanz (Abb. 3.10 D) gefunden. Durch die SDF-1 α Behandlung konnte dies noch signifikant um 153% auf durchschnittlich 152 Fragmente gesteigert werden (Abb. 3.10 D). Abbildung 3.10 A zeigt die Anzahl der ermittelten Fragmente pro Tier, welche bei den Kontrolltieren zwischen 43 und 88 lag. Bei der SDF-1 α -behandelten Gruppe lag die Anzahl zwischen 124 und 204 Faserfragmente pro Tier. In der weißen Substanz zeigte sich nur ein schwaches Aussprossen der CST Axone (Abb. 3.10 B). In der grauen Substanz hingegen konnten doppelt so viele Axonfragmente detektiert werden als in der weißen Substanz (Abb. 3.10 C). In beiden Regionen konnte jedoch die Anzahl aussprossender Axone signifikant durch die Verabreichung des SDF-1 α gesteigert werden.

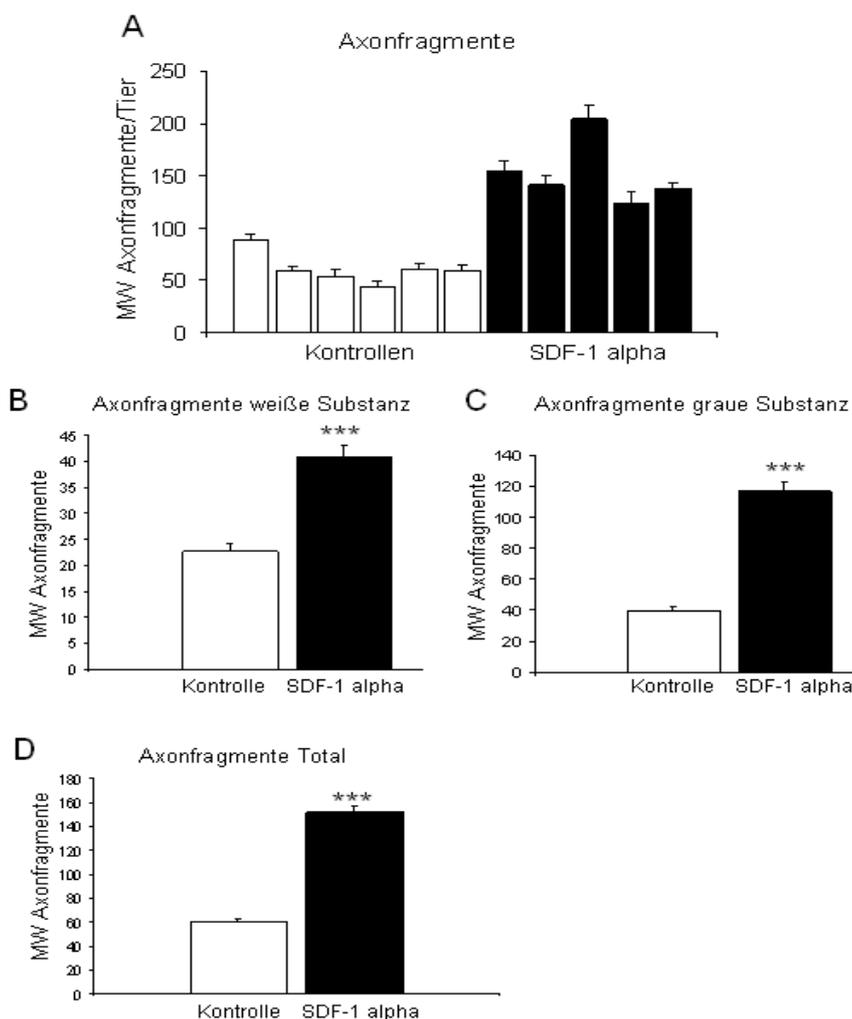


Abbildung 3.10 Quantifizierung des SDF-1 α induzierten axonalen Aussprossens durchtrennter CST Axone nach lokaler Chemokin-Verabreichung. A-D zeigen Diagramme der durchschnittlich detektierten Axonfragmente pro Tier insgesamt (A), in der weißen Substanz pro Gruppe (B), der grauen Substanz pro Gruppe (C) und insgesamt pro Gruppe (D), ermittelt aus 10-12 Schnitten pro Tier. In allen ausgewerteten Bereichen zeigen die SDF-1 α -behandelten Tiere eine signifikant erhöhte Anzahl an Faserfragmenten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. Statistik: Student T-Test (***) $p < 0,001$). Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM.

Die Dichte der CST Axone konnte durch die Chemokin-Verabreichung auf durchschnittlich 41 Faserfragmente in der weißen bzw. 117 Faserfragmente pro Tier in der grauen Substanz gesteigert werden (Abb. 3.10 B, C). Aufgrund der positiven Resultate des Chemokins auf das rostrale Aussprossen dorsaler CST-Axone wurde das SDF-1 α für weitere *in vivo* Experimente verwendet.

3.3 Kombinationsbehandlung von AST und dem Chemokin SDF-1 α

Aufgrund der in 3.1 und 3.2.2 gewonnenen, positiven Wirkungen von AST und SDF-1 α wurden beide Therapieansätze kombiniert, um gleichermaßen ein vermehrtes Aussprossen, sowie eine Steigerung der Penetration der Fasertrakte in das Narbenareal zu erzielen. Die AST-Behandlung wurde wie bereits unter Punkt 2.2.1 beschrieben einmalig verabreicht, das SDF-1 α Chemokin wurde mittels osmotischer Minipumpen über einen Zeitraum von einer Woche appliziert (siehe Punkt 2.2.2). Fünf Wochen nach Verletzung wurden die Tiere perfundiert und das Rückenmark aufbereitet. Für diese Studie wurde die serotonerge (5-HT) und die catecholaminerge (TH) Faserpopulation sowie der rubrospinale und kortikospinale Trakt, auf ihr Einwachsen in das Narbenareal, als auch auf das Aussprossen rostral der Läsionsstelle untersucht und quantifiziert. Die Auswertung regenerierter Fasern im Narbenareal erfolgte wie bereits unter 2.7 beschrieben durch auszählen der Faserfragmente im GFAP-negativen Narbenbereich. Die Quantifizierung des rostralen Aussprossens des CST und des RST erfolgte durch das Auszählen der Axonfragmente in der grauen und weißen Substanz, TH und 5-HT wurden jedoch durch Berechnung der Farbintensität mittels ImageJ ermittelt (siehe 2.7). Dabei wurden für beide Faserpopulationen bestimmte Bereiche in der grauen und weißen Substanz des Rückenmarks ausgewählt, die spezifische Färbemuster aufwiesen.

Axonpopulation	Behandlung	Tierzahlen
5-HT	Vehikel	4
	AST	4
	SDF	4
	SDF+AST	4
TH	Vehikel	4
	AST	4
	SDF	4
	SDF+AST	4
CST	Vehikel	4
	AST	3
	SDF	4
	SDF+AST	3
RST	Vehikel	4
	AST	4
	SDF	3
	SDF+AST	4

Tabelle 3.4 Anzahl der verwendeten Ratten in den jeweiligen experimentellen Gruppen.

3.3.1 Auswirkung der kombinatorischen Anwendung des Chemokins SDF-1 α und des AST

Fünf Wochen nach erfolgter Hemisektion wurde das rostrale Aussprossungsverhalten entweder durch die Ermittlung der Färbeintensität (5-HT, TH) oder durch das Auszählen der Faserfragmente (CST, RST) bestimmt. Die ausgezählten Faserfragmente in der grauen und weißen Substanz wurden dann anhand der Pixelintensität bzw. der Faseranzahl der BDA-markierten Trakte (dorsaler CST, linker lateraler RST) normiert. Die verschiedenen Behandlungsansätze, sowie die verwendeten Tierzahlen und die untersuchten Axonpopulationen sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Zur Verdeutlichung des Aussprossungsverhaltens nach Verletzung und anschließenden Behandlungen wurde bei der serotonergen und catecholaminergen Faserpopulation zusätzlich das normale Verteilungsmuster im intakten Rückenmark untersucht. Diese Daten wurden jedoch nicht in die Statistik mit einbezogen.

Die Verabreichung des SDF-1 α allein oder in Kombination mit dem Eisenchelator führt zu einem stark vermehrten Aussprossen aller untersuchten Fasertrakte. Dabei konnten deutliche Unterschiede im Verteilungsmuster der ausgesprossenen Fasern innerhalb einer Faserpopulation in den verschiedenen Regionen beobachten werden.

Im Vergleich zu den Kontrollen und dem intakten Rückenmark zeigte sich im Bereich des Zentralkanals (Abb. 3.11) ein gleichermaßen starkes Aussprossen sowohl nach einer Behandlung mit SDF-1 α allein oder in Kombination mit AST bei der **serotonergen Faserpopulation**. In beiden Gruppen konnte eine Zunahme des Pixelwertes um 50% im Vergleich zu den Kontrollen verzeichnet werden. Eine Behandlung mit AST allein zeigte keinen Effekt auf die serotonerge Population im Bereich des Zentralkanals. Durch den Vergleich der Vehikel-Tiere und der unverletzten Tiere konnte ebenfalls eine Läsions-induzierte Zunahme festgestellt werden (Abb. 3.11 A, B, graue Balken).

Die Übersicht der einzelnen Tiere (Abb. 3.11 B) zeigt eine relativ homogene Anzahl an aussprossenden Axonen in den einzelnen Gruppen.

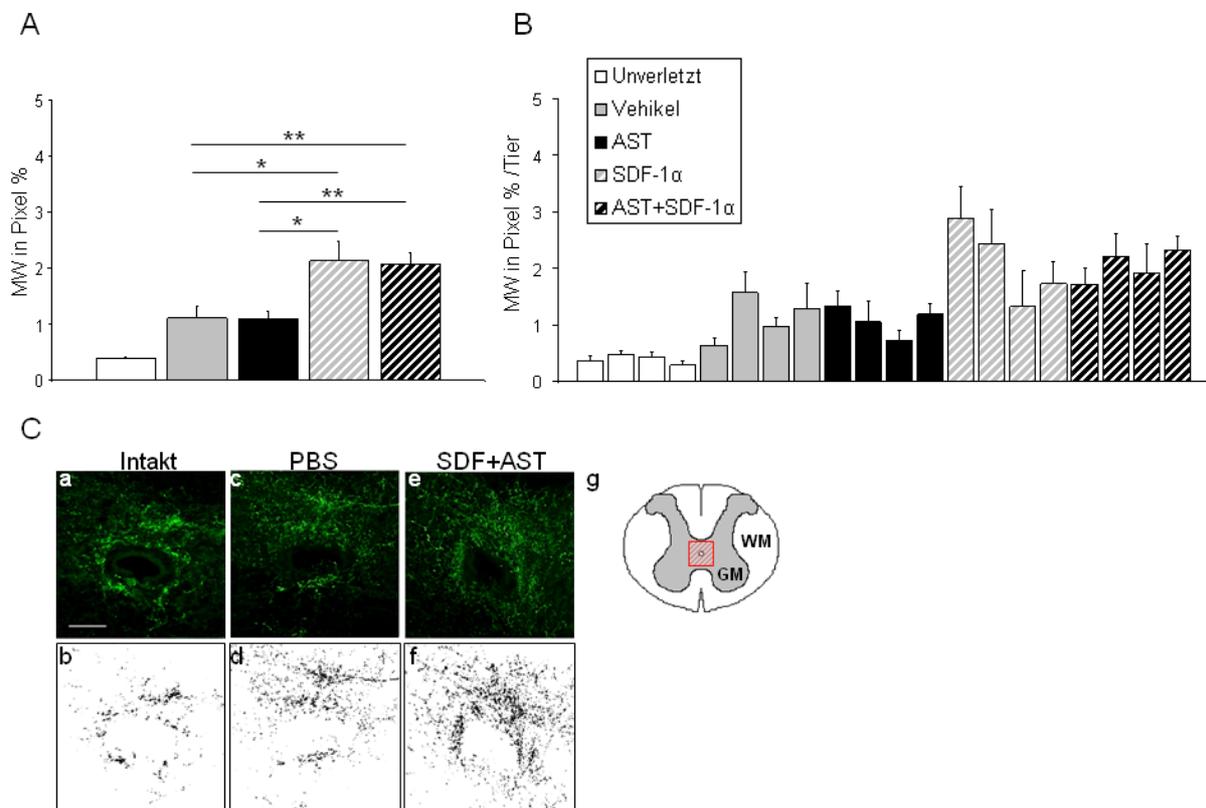


Abbildung 3.11 Quantifizierung des rostralen axonalen Aussprossens der serotonergen Faserpopulation im Bereich des Zentralkanals. A zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Gruppe. B zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Tier. Weiße Balken: Unverletztes Rückenmark; Graue Balken: Vehikel-Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0005$), Holm-Bonferroni Korrektur. Immunhistochemische Färbungen und die entsprechenden ImageJ-Auswertungen der Zentralkanalregion im coronalen Schnitt sind in C (a-f) dargestellt, C (g) zeigt eine schematische Übersicht des Rückenmarks mit der untersuchten Region. Maßbalken: 50 μ m.

Auch im Vorderhorn zeigte sich in der Kontrollgruppe eine Läsions-induzierte Zunahme an aussprossenden 5-HT-positiven Axonen (Abb. 3.12).

Jedoch ist zu erwähnen, dass dieser Bereich des Rückenmarks in allen Tieren unverletzt blieb, da es sich bei dem verwendeten Läsionsmodell um eine dorsale Hemisektion handelt. Die Verabreichung des AST bzw. des SDF-1 α allein konnte das Aussprossen serotonerger Axone um ca. 20% erhöhen. Dabei zeigte sich, dass auch das AST das Aussprossen serotonerger Axone im Vorderhorn stimulieren kann, was im Bereich des Zentralkanals nicht beobachtet werden konnte. Eine Kombination von AST und SDF-1 α hingegen zeigt keine signifikante Steigerung mehr.

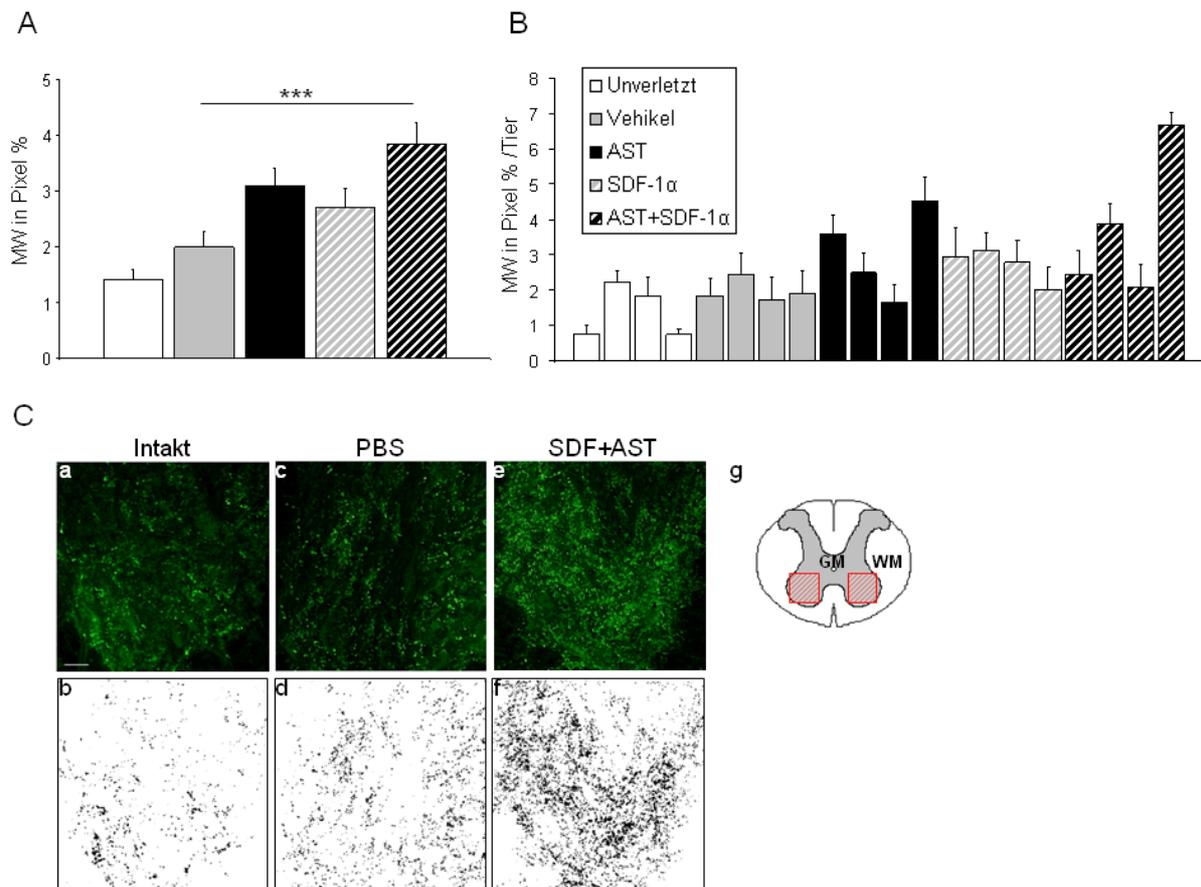


Abbildung 3.12 Quantifizierung des rostralen axonalen Aussprossens der serotonergen Faserpopulation im Vorderhorn. A zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Gruppe. B zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Tier. Weiße Balken: Unverletztes Rückenmark; Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0005$), Holm-Bonferroni Korrektur. Immunohistochemische Färbungen und die entsprechenden ImageJ-Auswertungen des Vorderhorns im coronalen Schnitt sind in C (a-f) dargestellt, C (g) zeigt eine schematische Übersicht des Rückenmarks mit der untersuchten Region. Maßbalken: 50 μ m

Für die Analyse der serotonergen Faserpopulation im Hinterhorn wurde die Lamina 4 bis 5 untersucht, da nur in dieser Region eindeutige Faserfragmente zu beobachten sind (Abb. 3.13 C). Es zeigt sich, dass die Verabreichung des AST die Anzahl der serotonergen Axonfragmente so weit erhöht, so dass es wieder das normale Niveau eines unverletzten Tieres erreicht (Abb. 313). Die Gabe des SDF-1 α allein oder in Kombination mit AST führt zu einer signifikant gesteigerten Anzahl an ausgesprossenen serotonergen Axonen. SDF-1 α allein und in Kombination zeigen eine starke signifikante Zunahme von 1000% bzw. 1500%, im Vergleich zur Kontrolle.

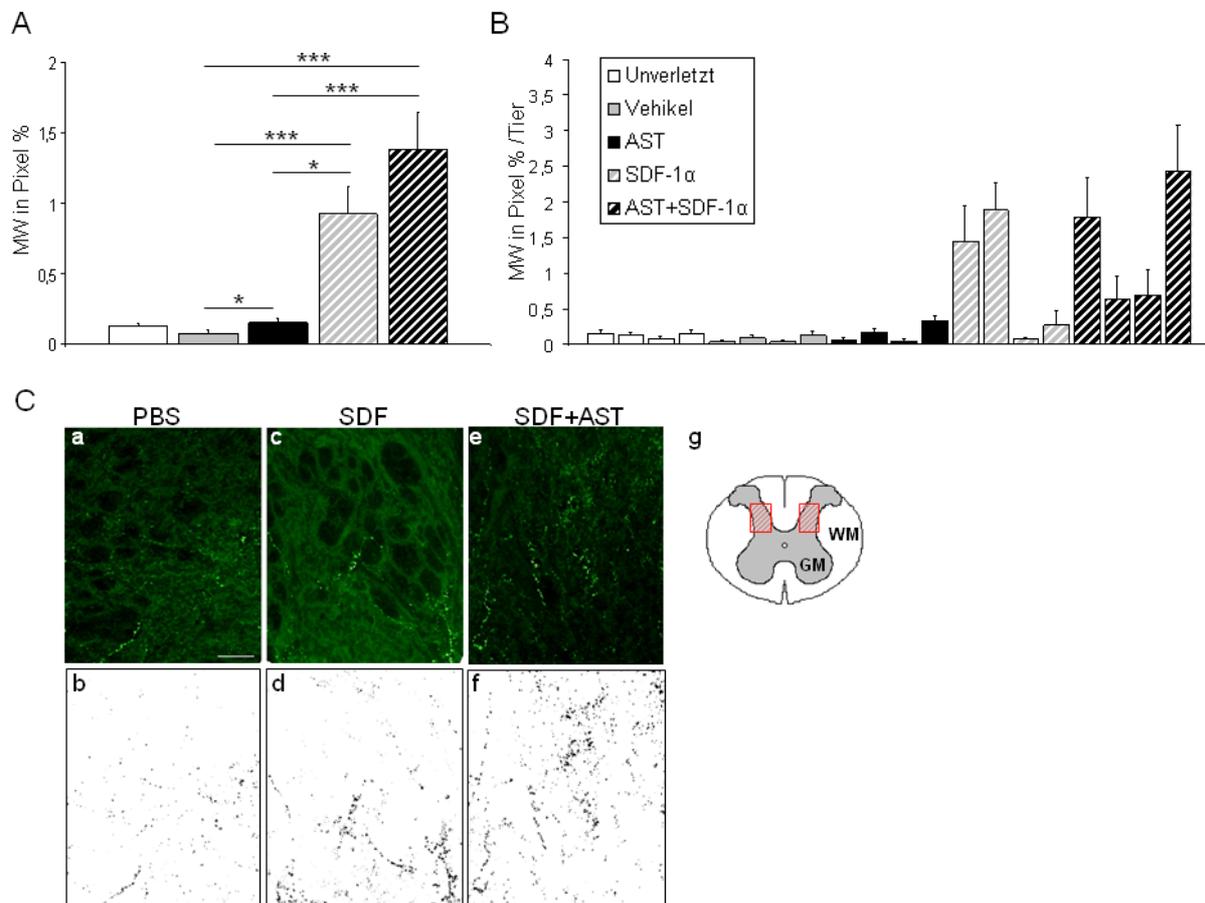


Abbildung 3.13 Quantifizierung des rostralen axonalen Aussprossens der serotonergen Faserpopulation im Hinterhorn. A zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Gruppe. B zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Tier. Weiße Balken: Unverletztes Rückenmark; Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0005$), Holm-Bonferroni Korrektur. Immunhistochemische Färbungen und die entsprechenden ImageJ-Auswertungen des Hinterhorns im coronalen Schnitt sind in C (a-f) dargestellt, C (g) zeigt eine schematische Übersicht des Rückenmarks mit der untersuchten Region. Maßbalken: 50 μ m

Anhand der immunhistochemischen Färbungen konnten deutliche faserartige Strukturen in bestimmten Bereichen der weißen Substanz beobachtet werden (Abb. 3.14 C). Dieser Bereich wurde dann als repräsentativer Bereich für die gesamte weiße Substanz ausgewählt. Hier zeigten die Vehikel- und AST-Tiere einen Wert der nur gering über dem Niveau eines unverletzten Tieres liegt. Die Gabe des SDF-1 α zeigt dagegen eine signifikante Zunahme um ca. 75 % im Vergleich zur Kontrolle. Ein überraschendes Ergebnis konnte bei der kombinatorischen Verabreichung beobachtet werden. Hier zeigte sich eine extrem hohe signifikante Zunahme an serotonergen Fasern in der weißen Substanz im Vergleich zu allen anderen Behandlungsgruppen (Abb. 3.14). Hierbei scheint es sich um einen synergistischen Effekt zu handeln, bei der sich die Wirkungen der einzelnen Substanzen kombinieren und gegenseitig verstärken. Die Übersicht der einzelnen Tiere (Abb. 3.14 B) zeigt eine relativ homogene Anzahl an aussprossenden Axonen in den einzelnen Gruppen.

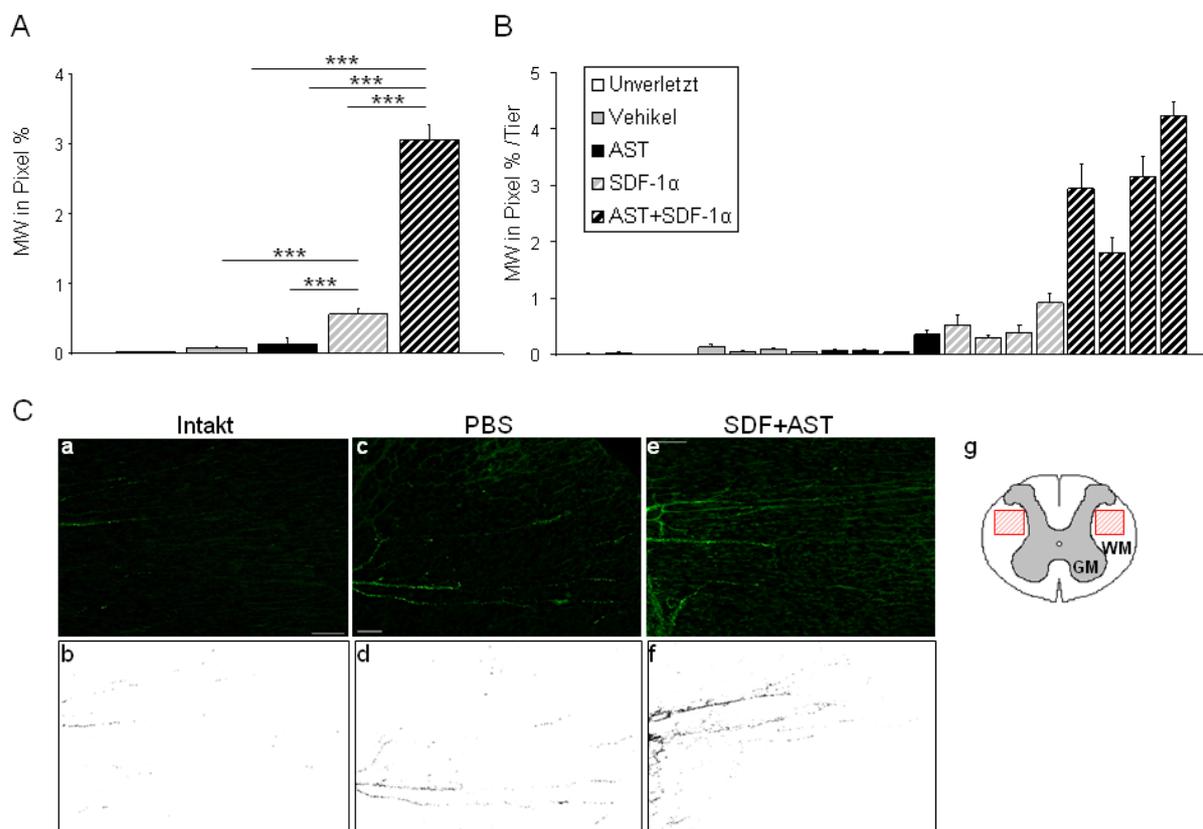


Abbildung 3.14 Quantifizierung des rostralen axonalen Aussprossens der serotonergen Faserpopulation in der weißen Substanz. A zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Gruppe. B zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Tier. Weiße Balken: Unverletztes Rückenmark; Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test

(* , p<0.05 ; ** , p<0.001; ***,p<0.0005), Holm-Bonferroni Korrektur. Immunhistochemische Färbungen und die entsprechenden ImageJ-Auswertungen der weißen Substanz im coronalen Schnitt sind in C (a-f) dargestellt, C (g) zeigt eine schematische Übersicht des Rückenmarks mit der untersuchten Region. Maßbalken: 50 µm

Im Bereich des Zentralkanals (Abb. 3.15) zeigt sich nicht nur eine Läsions-induzierte Zunahme an Axonfragmenten rostral der Verletztenstelle, sondern ebenfalls ein AST-vermittelter Aussprossungseffekt **catecholaminerger Fasern**. Durch die Verabreichung des AST konnte das Aussprossen signifikant um ca. 50% gesteigert werden. Die Gabe des SDF-1α allein oder in Kombination mit AST führte zu einer weiteren Erhöhung auf 90% bzw. 75%. Die Übersicht der einzelnen Tiere (Abb. 3.15 B) zeigt eine relativ homogene Anzahl an aussprossenden Axonen in den einzelnen Gruppen, nur in der SDF-1α Gruppe ist bei einem Tier eine größere Standardabweichung zu verzeichnen.

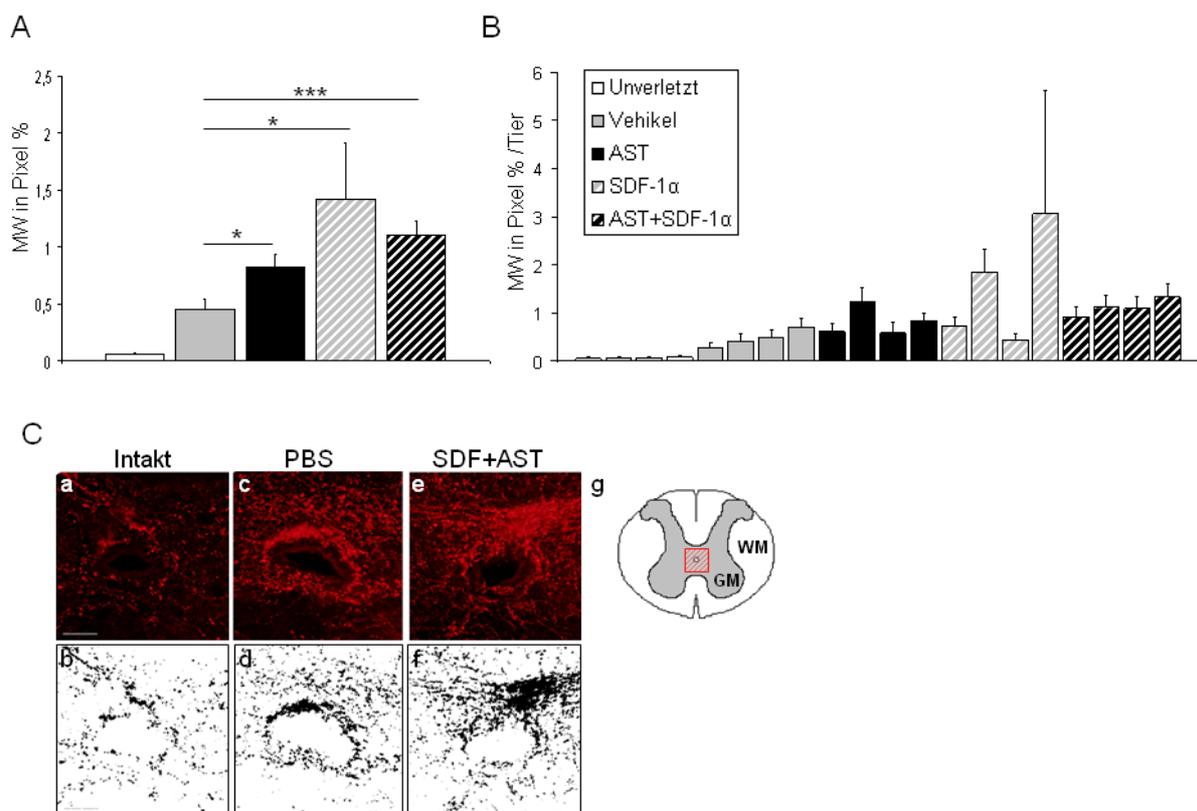


Abbildung 3.15 Quantifizierung des rostralen axonalen Aussprossens der catecholaminerger Faserpopulation im Bereich des Zentralkanals. A zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Gruppe. B zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Tier. Weiße Balken: Unverletztes Rückenmark; Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1α-behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1α+AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (* , p<0.05 ; ** , p<0.001; ***,p<0.0005), Holm-Bonferroni Korrektur. Immunhistochemische Färbungen und die entsprechenden ImageJ-Auswertungen der

Zentralkanalregion im coronalen Schnitt sind in C (a-f) dargestellt, C (g) zeigt eine schematische Übersicht des Rückenmarks mit der untersuchten Region. Maßbalken: 50 μ m

Im Bereich des Vorderhorns ist zu beobachten, dass es zu keiner Läsions-induzierten Zunahme an aussprossenden catecholaminergen Axonen kommt (Abb. 3.16, graue Balken). Eine Verabreichung des AST führt zu einer signifikanten Zunahme (25%) an catecholaminergen Axonen. SDF-1 α zeigt ebenfalls einen Effekt auf das rostrale Aussprossen catecholaminerger Fasern im Vorderhorn, wobei die AST- und SDF-1 α -behandelten Tiere einen ähnlichen Wert an aussprossenden Fasern aufweisen. In der Gruppe die beide Substanzen verabreicht wurden, zeigt sich eine weitere Zunahme an aussprossenden TH-positiven Fasern. Eine Verdopplung bzw. Addition der einzelnen Behandlungseffekte konnte jedoch nicht beobachtet werden.

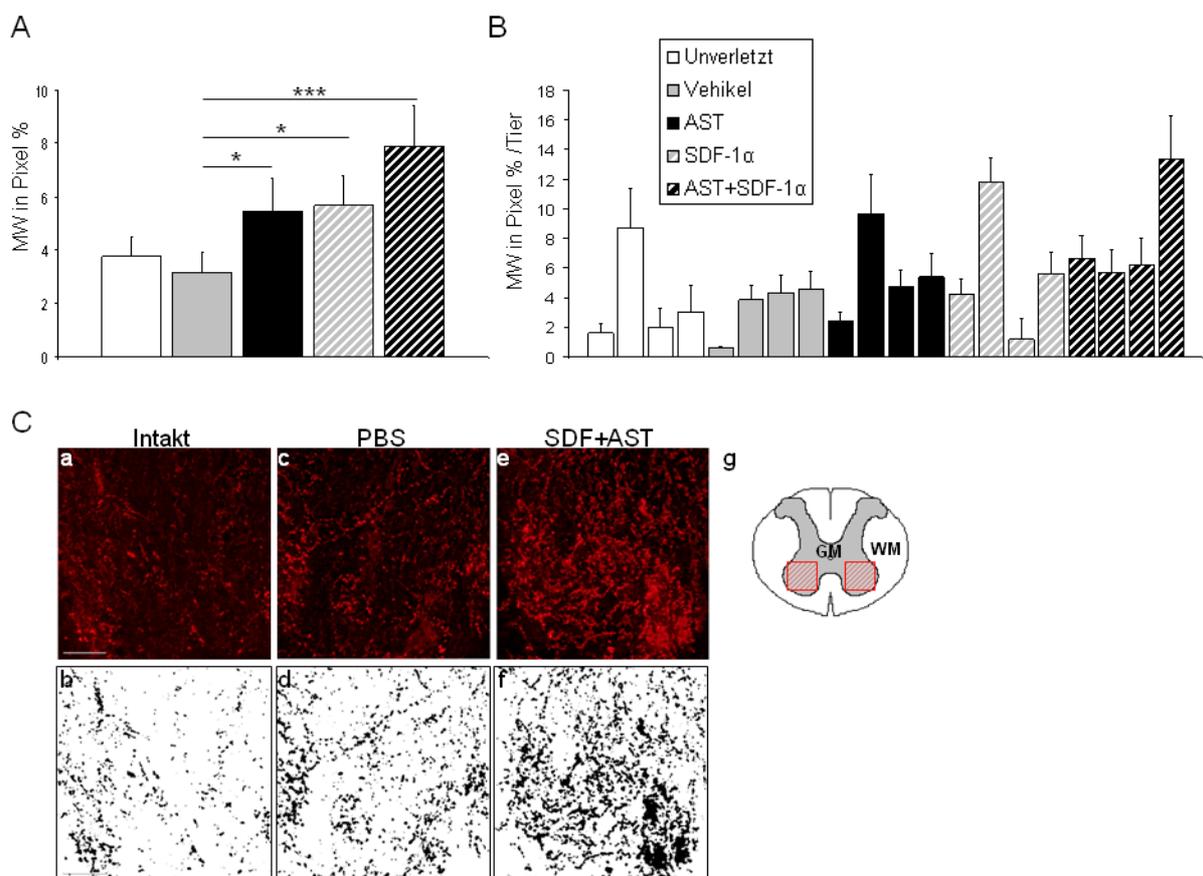


Abbildung 3.16 Quantifizierung des rostralen axonalen Aussprossens der catecholaminergen Faserpopulation im Vorderhorn. A zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Gruppe. B zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Tier. Weiße Balken: Unverletztes Rückenmark; Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0005$), Holm-Bonferroni Korrektur. Immunhistochemische Färbungen und die entsprechenden ImageJ-Auswertungen des Vorderhorns im coronalen

Schnitt sind in C (a-f) dargestellt, C (g) zeigt eine schematische Übersicht des Rückenmarks mit der untersuchten Region. Maßbalken: 50 µm

Für die Analyse der catecholaminergen Faserpopulation im Hinterhorn wurde Lamina 1 bis 3 verwendet, da nur in dieser Region eindeutige Faserfragmente zu beobachten waren. Im Hinterhorn zeigt sich ein deutlicher Läsions-induzierter Effekt in der Vehikel Gruppe (Abb. 3.17, graue Balken). Durch die Gabe des AST konnte der Wert signifikant um ca. 60% gesteigert werden. Auch die SDF-1α Gruppe zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung aussprossender catecholaminerger Axone um ca. 80%, wobei auch hier die AST- und die SDF-1α-behandelten Tiere einen ähnlichen hohen Wert aufweisen. Die Verabreichung beider Substanzen konnte die Wirkung jedoch nicht weiter steigern.

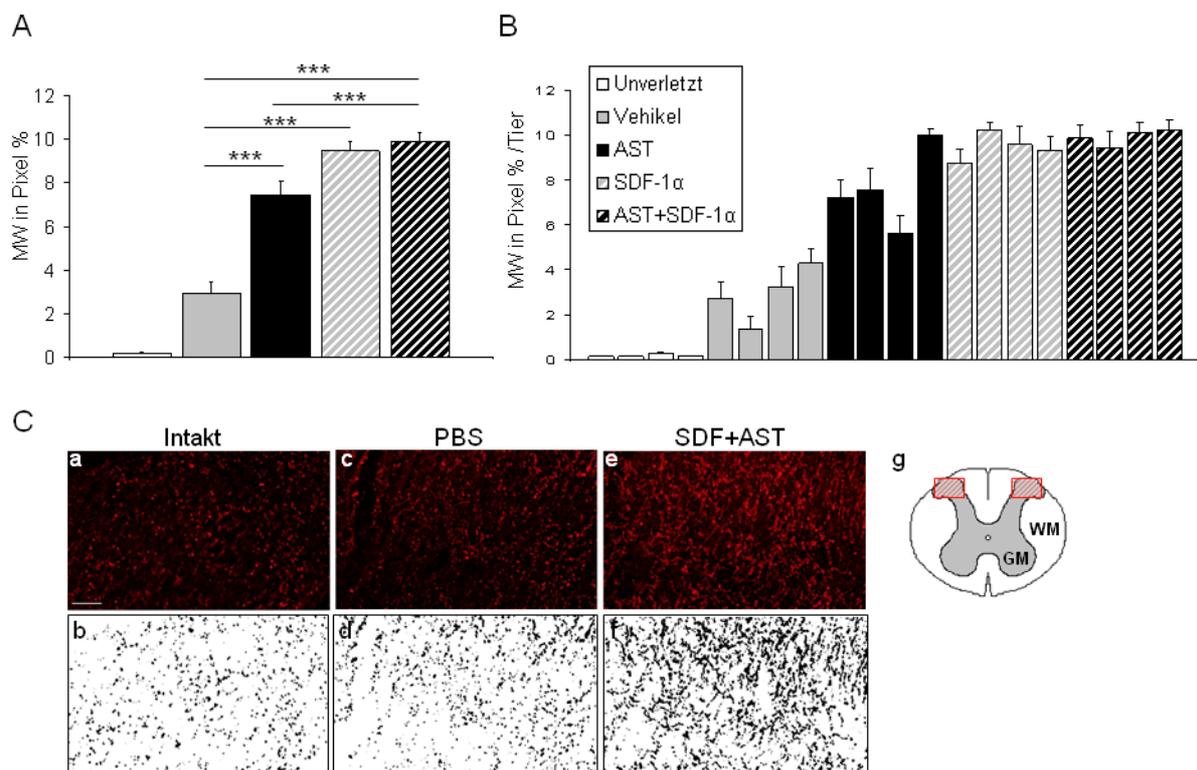


Abbildung 3.17 Quantifizierung des rostralen axonalen Aussprossens der catecholaminergen Faserpopulation im Hinterhorn. A zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Gruppe. B zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Tier. Weiße Balken: Unverletztes Rückenmark; Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1α-behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1α+AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0005$), Holm-Bonferroni Korrektur. Immunhistochemische Färbungen und die entsprechenden ImageJ-Auswertungen des Hinterhorns im coronalen Schnitt sind in C (a-f) dargestellt, C (g) zeigt eine schematische Übersicht des Rückenmarks mit der untersuchten Region. Maßbalken: 50 µm

In der weißen Substanz zeigt sich erneut eine Läsions-induzierte Erhöhung aussprossender catecholaminerger Axone in der Vehikelgruppe (Abb. 3.18, graue Balken). Die Verabreichung des AST konnte diese Anzahl signifikant um ca. 50% steigern. Bei der SDF-1 α -Behandlungsgruppe konnte, verglichen mit den Kontrollen, ebenfalls eine signifikante Erhöhung um ca. 60% aussprossender catecholaminerger Axone in der weißen Substanz verzeichnet werden. Wobei auch hier die AST- und SDF-1 α -Gruppe eine ähnlich hohe Anzahl an Fasern aufwiesen. Die Gabe beider Substanzen konnte die Wirkung der einzeln verabreichten Substanzen jedoch nicht weiter steigern. Bei der serotonergen Faserpopulation zeigte sich in diesem Bereich eine synergistische Wirkung, die bei der catecholaminergen Population jedoch nicht zu beobachten ist. Anhand der immunhistochemischen Färbungen konnten, wie schon bei der serotonergen Faserpopulation detektiert, deutliche faserartige Strukturen in diesem Bereich der weißen Substanz beobachtet werden (Abb. 3.18 C).

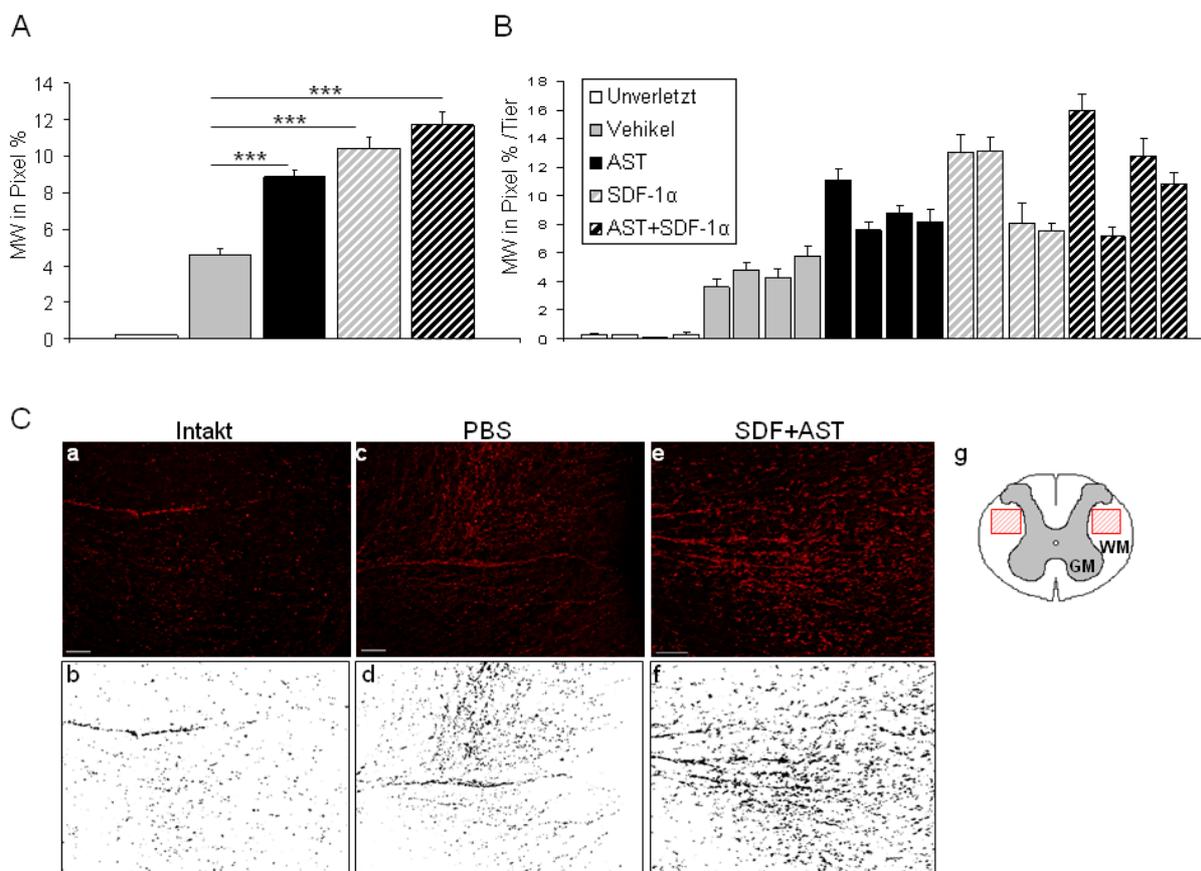


Abbildung 3.18 Quantifizierung des rostralen axonalen Aussprossens der catecholaminergen Faserpopulation der weißen Substanz. A zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Gruppe. B zeigt den durchschnittlichen Pixel-Wert in % pro Tier. Weiße Balken: Unverletztes Rückenmark; Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test

(* , $p < 0.05$; ** , $p < 0.001$; ***, $p < 0.0005$), Holm Bonferroni Korrektur. Immunhistochemische Färbungen und die entsprechenden ImageJ-Auswertungen der weißen Substanz im coronalen Schnitt sind in C (a-f) dargestellt, C (g) zeigt eine schematische Übersicht des Rückenmarks mit der untersuchten Region. Maßbalken: 50 μm

Die Auswertung der **rubrospinalen und kortikospinalen Fasertrakte** erfolgte durch das Auszählen einzelner Faserfragmente. Allerdings wurde der RST nur auf der linken Seite ausgezählt, da diese auch nur einseitig verletzt wurden. Anschließend wurden die Werte auf den errechneten Pixelwert der mit BDA-markierten Axone des dorsalen CST normiert (Abb. 3.22 C, Blockpfeil) bzw. auf den ausgezählten linken lateralen RST (Abb. 3.19 C, Blockpfeil). Dies erfolgte nicht, wie bei der Auswertung der serotonergen und catecholaminergen Population, in einem bestimmten Areal, sondern in der gesamten grauen und weißen Substanz (siehe Übersichtsschemata in Abb. 3.19 B bis 3.21 B).

Für den RST zeigt sich im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Axondichte um ca. 50% in der gesamten grauen Substanz AST-behandelter Tiere (Abb. 3.19 A). SDF-1 α allein zeigt ebenfalls eine ca. 50 %ige Zunahme an RST Faserfragmenten in der grauen Substanz. Die SDF-1 α - und AST-Gruppen zeigen, wie bereits bei der catecholaminergen Faserpopulation beobachtet, eine ähnliche Erhöhung des Aussprossens rostral der Läsion. Eine Kombination von AST und SDF-1 α konnte die einzelnen Wirkungen jedoch nicht weiter steigern. Auch hier konnte, wie bereits bei der catecholaminergen Population, ein deutlich AST-induziertes Aussprossen beobachtet werden.

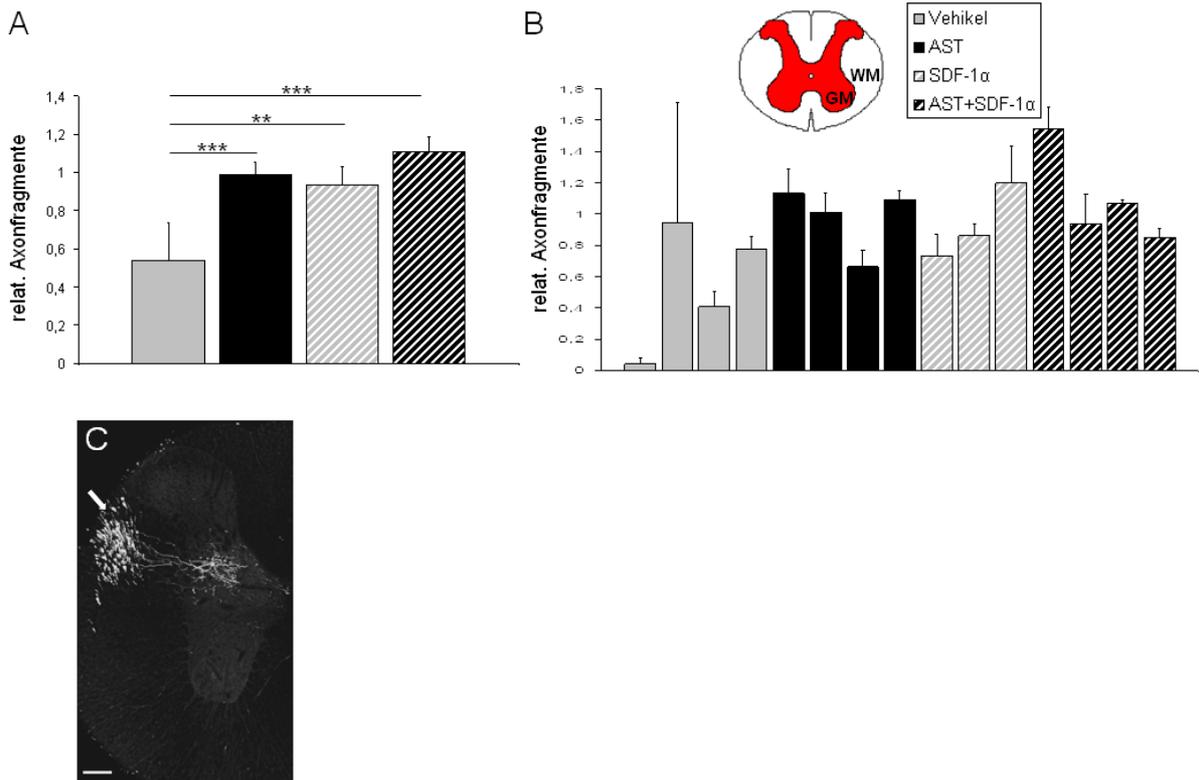


Abbildung 3.19 Quantifizierung des rostralen axonalen Aussprossens der rubrospinalen Faserpopulation in der grauen Substanz (linke Seite). A zeigt den Wert der ausgezählten Faserfragmente in der grauen Substanz pro Gruppe, normiert auf die Anzahl der mit BDA markierten Axone des linken RST. B zeigt den Wert der ausgezählten Faserfragmente pro Tier, normiert auf die Anzahl der mit BDA markierten Axone des linken lateralen RST. Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (**, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0005$), Holm Bonferroni Korrektur. C zeigt eine immunhistochemische Färbung rubrospinaler Fasern in der grauen und weißen Substanz im coronalen Schnitt. Maßbalken: 100 μ m. Blockpfeil: linker RST.

Die Auszählung der RST Axone in der weißen Substanz zeigte kein eindeutiges Ergebnis, was wahrscheinlich auf die sehr geringe Anzahl detektierter Faserfragmente zurückzuführen ist. Alle Behandlungsgruppen zeigen eine nahezu gleiche Anzahl an Faserfragmente in der weißen Substanz rostral der Läsion (Abb. 3.20).

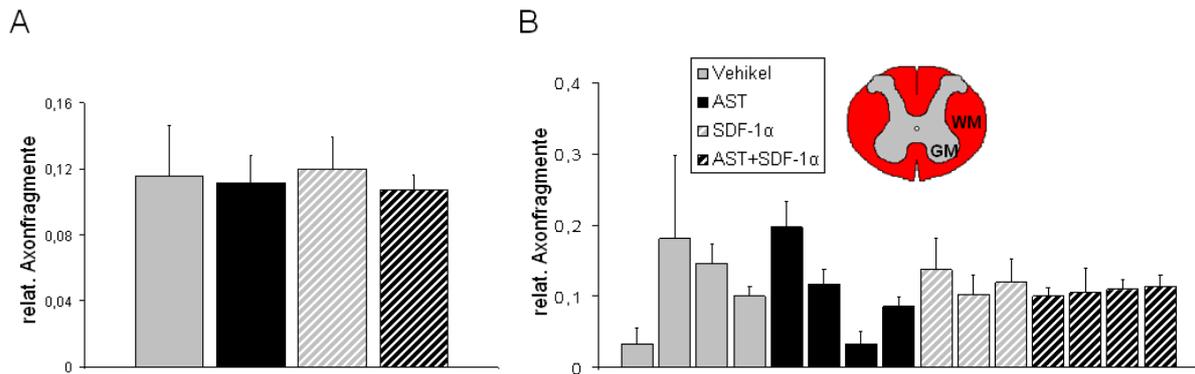


Abbildung 3.20 Quantifizierung rubrospinaler Fasern in der weißen Substanz (linke Seite). A zeigt den Wert der ausgezählten Faserfragmente in der weißen Substanz pro Gruppe, normiert auf die Anzahl der mit BDA markierten Axone des linken RST. B zeigt den Wert der ausgezählten Faserfragmente in der weißen Substanz pro Tier, normiert auf die Anzahl der mit BDA markierten Axone des linken lateralen RST. Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (**, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0005$), Holm Bonferroni Korrektur.

Sowohl in der grauen als auch der weißen Substanz konnte eine deutliche Chemokin-induzierte Erhöhung aussprossender kortikospinaler Axone beobachtet werden (Abb. 3.22, 3.23). Dieses Ergebnis konnte bereits in einer früheren Untersuchung gezeigt werden (siehe Punkt 3.22). Sowohl bei den SDF-1 α -, als auch den SDF-1 α +AST-behandelten Tieren ist ein signifikanter Anstieg der Axondichte um ca. 40% im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten. SDF-1 α und SDF-1 α +AST weisen eine ähnlich hohe Axondichte auf. Für den CST konnte kein AST-induziertes Aussprossen detektiert werden. Eine Übersicht der einzelnen Tiere ist in Abbildung 3.22 B dargestellt. Immunhistochemische Färbungen zeigen eine Verteilung der kortikospinalen Axone überwiegend in Lamina 3 bis 6 und Lamina 10. Gelegentlich wurden auch vereinzelt Axonfragmente in Lamina 1 bis 2 bzw. 7 bis 9 detektiert.

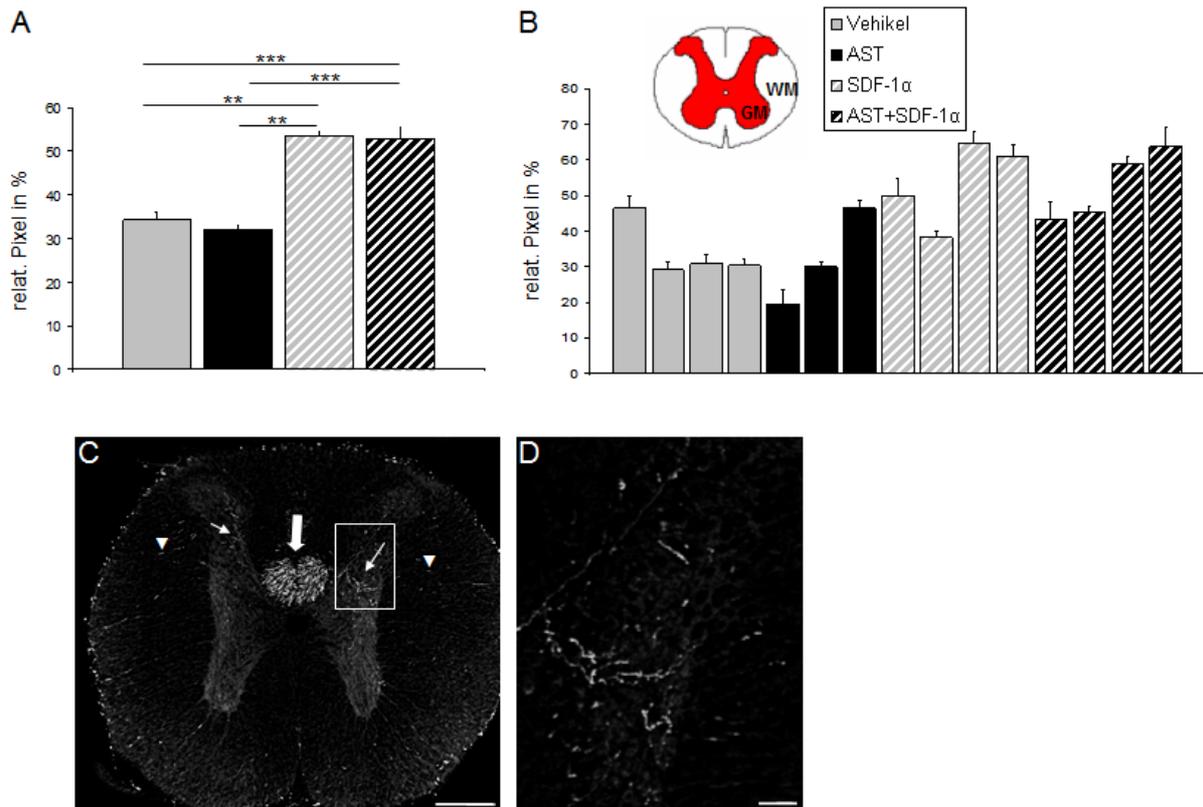


Abbildung 3.22 Quantifizierung des rostralen axonalen Ausprossens der kortikospinalen Faserpopulation in der grauen Substanz. A zeigt den Wert der ausgezählten Faserfragmente pro Gruppe, normiert auf den Pixelwert der mit BDA markierten Axone des dorsalen CST. B zeigt den Wert der ausgezählten Faserfragmente pro Tier, normiert auf den Pixelwert der mit BDA markierten Axone des dorsalen CST. Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (**, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0005$), Holm-Bonferroni Korrektur. C zeigt eine immunhistochemische Färbung im coronalen Schnitt. D zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abbildung C. Maßbalken: 100 μm . Blockpfeil: dorsaler CST, Pfeilkopf: Axone in der weißen Substanz, Pfeile: Axone in der grauen Substanz.

Ähnliche Ergebnisse wie in der grauen, zeigten sich auch in der weißen Substanz für den CST (Abb. 3.23). Auch hier konnte, weder in der Vehikel-, noch der SDF-1 α -Behandlungsgruppe eine AST-vermittelte Wirkung auf das rostrale Ausprossens beobachtet werden. Die Behandlung mit dem Chemokin allein oder in Kombination mit AST ergab einen signifikanten Anstieg der Axondichte in der weißen Substanz, im Vergleich zu beiden Kontrollen um ca. 40%.

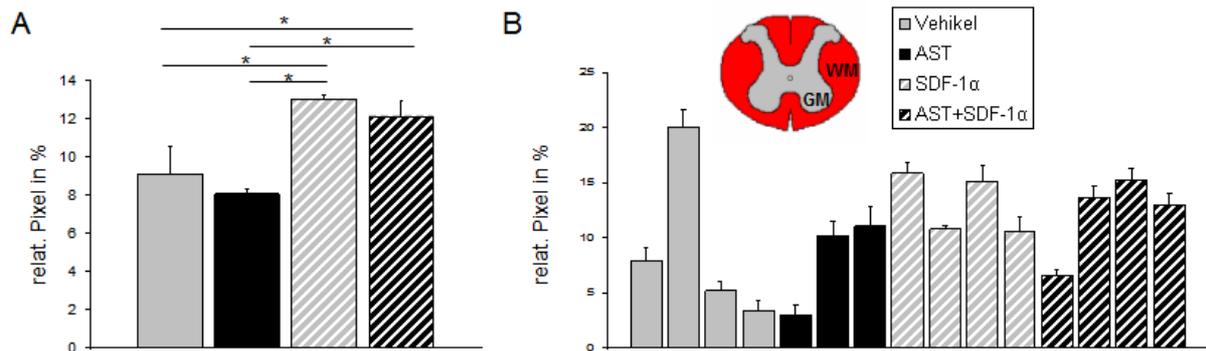


Abbildung 3.23 Quantifizierung des rostralen axonalen Aussprossens der kortikospinalen Faserpopulation in der weißen Substanz. A zeigt den Wert der ausgezählten Faserfragmente pro Gruppe, normiert auf den Pixelwert der mit BDA markierten Axone des dorsalen CST. B zeigt den Wert der ausgezählten Faserfragmente pro Tier, normiert auf den Pixelwert der mit BDA markierten Axone des dorsalen CST. Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (*, $p < 0.05$), Holm-Bonferroni Korrektur.

Die Auswertung der verschiedenen Behandlungen auf das rostrale axonale Aussprossen ergab eine grobe Einteilung in zwei Gruppen. In der einen Gruppe, zu dem der RST und die TH-Population gehört, zeigt sich ein starkes AST-induziertes Ausprossen, jedoch einen vergleichsweise geringen Einfluss des Chemokins auf das rostrale Aussprossen der jeweiligen Axonpopulation. Zu der zweiten Gruppe gehören der CST und die 5-HT Population. Hier ist kein bzw. nur ein geringfügiger AST Effekt zu verzeichnen, mit Ausnahme der serotonergen Population in der weißen Substanz. Wohingegen eine starke SDF-1 α -vermittelte Wirkung auftritt.

3.3.2 Auswirkung der kombinierten Verabreichung von AST und Chemokin auf das Regenerationsverhalten

Fünf Wochen nach erfolgter Hemisektion wurde die Anzahl der serotonergen, catecholaminergen, sowie der kortiko- und rubrospinalen Axonfragmente im GFAP-negativen Läsionsbereich in jedem Tier durch Zählen bestimmt (siehe 2.7).

Auch hier konnte für alle untersuchten Fasertrakte eine spontane Regeneration in den Kontrollgruppen beobachtet werden (siehe auch Abb. 3.1).

Die **serotonerge Faserpopulation** zeigt in der Vehikelgruppe nur vereinzelte Faserfragmente in der Narbenregion (Abb. 3.24, graue Balken). Die Mehrzahl der Fasern stoppen an der rostralen fibrösen Narbengrenze ohne weiter in den Läsionsbereich vorzudringen (Abb. 3.24 B). Die Anzahl der Faserfragmente erhöhte sich durch die eine Verabreichung des AST (Abb. 3.24 A, C). Diese Ergebnisse stimmen mit den gewonnenen Daten der ersten Studie überein (siehe dazu 3.1). Überraschenderweise führte die SDF-1 α -Behandlung bei der serotonergen Faserpopulation zu einem Rückgang der Faserfragmente im Narbenbereich. Dies zeigt sich sowohl in der SDF-1 α +AST, als auch der Gruppe die das SDF-1 α allein erhielt.

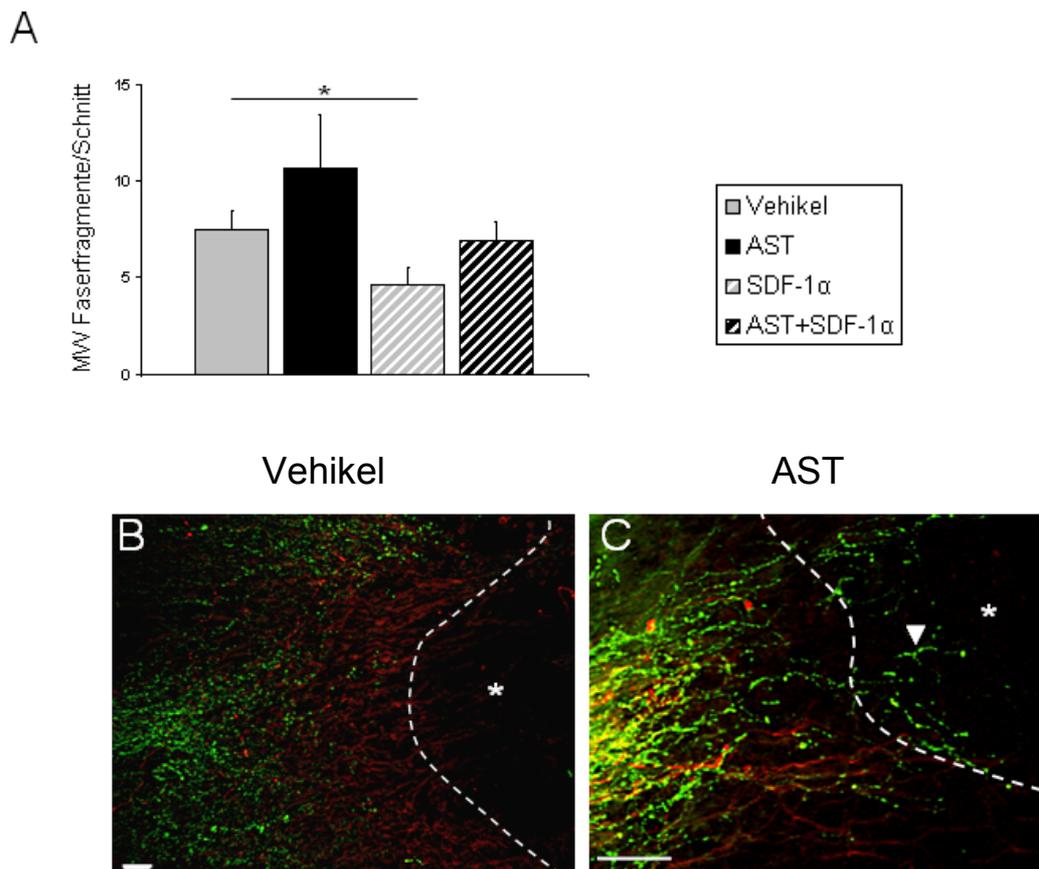


Abbildung 3.24 Quantifizierung der serotonergen Axonfragmente in der Narbe 5 Wochen nach Verletzung. A Die Anzahl der Axonfragmente in der GFAP-negativen fibrösen Narbe wurde in jedem zweiten parasagittalen Schnitt pro Tier bestimmt und der Mittelwert pro Schnitt ermittelt (Balken: Mittelwerte + SEM). Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test, Holm-Bonferroni Korrektur. B und C zeigen immunhistochemische Doppelfärbungen mit GFAP (rot) und 5-HT Axonen (grün). Gestrichelte Linie: Narbengrenze; Stern: fibröse Narbe; Pfeilspitze in D zeigt Axonfragmente im Narbenbereich. Maßbalken: 50 μ m.

Die **catecholaminerge Faserpopulation** zeigt in der Vehikel- und SDF-1 α -Gruppe nur vereinzelte Faserfragmente in der Narbenregion (Abb. 3.25). Die Mehrzahl der Fasern stoppen an der rostralen fibrösen Narbengrenze ohne weiter in den Läsionsbereich vorzudringen (Abb. 3.25 B). Die Anzahl der Faserfragmente erhöhte sich durch die zusätzliche Verabreichung des AST. Auch dies konnte bereits in der ersten Studie nachgewiesen werden (siehe hierzu 3.1). Die SDF-1 α +AST-behandelten Tieren zeigten im Vergleich zu den SDF-1 α -behandelten Tieren, eine signifikante Erhöhung der Faserfragmente im Läsionsbereich (Abb. 3.25 A, C). Ein Vergleich mit den AST-behandelten Tieren hingegen zeigt jedoch keine deutliche Zunahme an catecholaminergen Faserfragmenten im Narbenbereich durch eine SDF-1 α Behandlung.

A

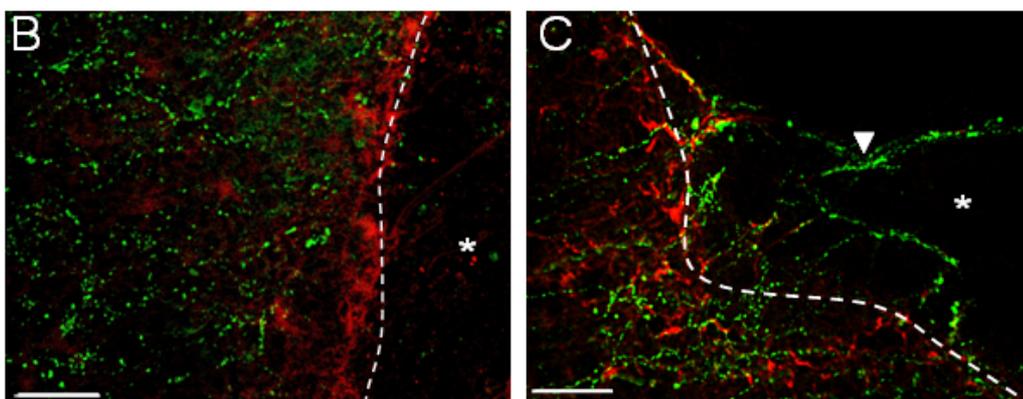
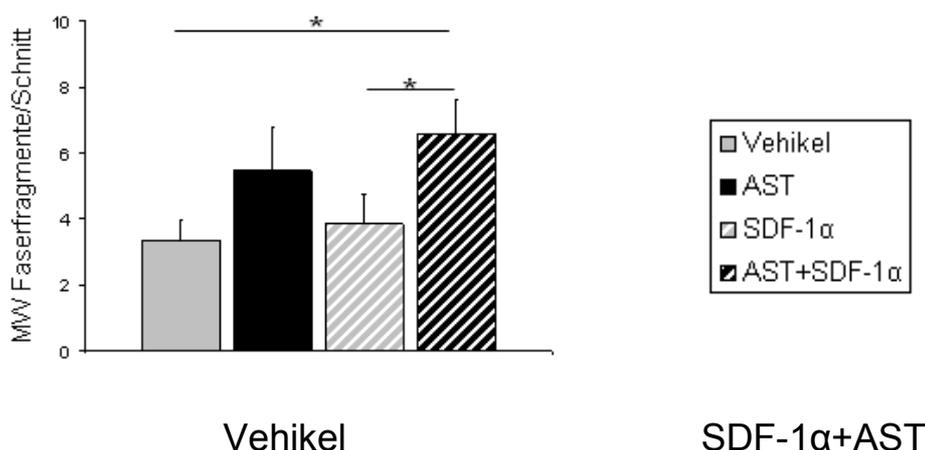


Abbildung 3.25 Quantifizierung der catecholaminergen Axonfragmente in der Narbe 5 Wochen nach Verletzung. A Die Anzahl der Axonfragmente in der GFAP-negativen fibrösen Narbe wurde in jedem zweiten parasagittalen Schnitt proTier bestimmt und der Mittelwert pro Schnitt ermittelt (Balken: Mittelwerte + SEM). Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (*, $p < 0.05$), Holm-Bonferroni Korrektur. B und C zeigen immunhistochemische Doppelfärbungen mit GFAP (rot) und TH-Axonon (grün). Gestrichelte

Linie: Narbengrenze; Stern: fibröse Narbe; Pfeilspitze in D zeigt Axonfragmente im Narbenbereich. Maßbalken: 50 μ m.

Der **rubrospinalen Fasertrakt** zeigt, wie die catecholaminerge Population, ohne AST-Behandlung nur vereinzelte Faserfragmente in der Narbenregion (Abb. 3.26). Auch hier stoppt die Mehrzahl der Fasern an der rostralen fibrösen Narbengrenze ohne weiter in den Läsionsbereich vorzudringen (Abb. 3.26 B). Die Anzahl der Faserfragmente erhöhte sich erst durch die zusätzliche Verabreichung des AST. Die SDF-1 α +AST-behandelten Tiere zeigten, wie auch die AST-behandelten Tiere, eine Steigerung der Anzahl der Faserfragmente in der Narbe. Jedoch konnte auch hier das SDF-1 α nicht zu einer signifikant gesteigerten Anzahl an Faserfragmenten im Narbenbereich führen.

A

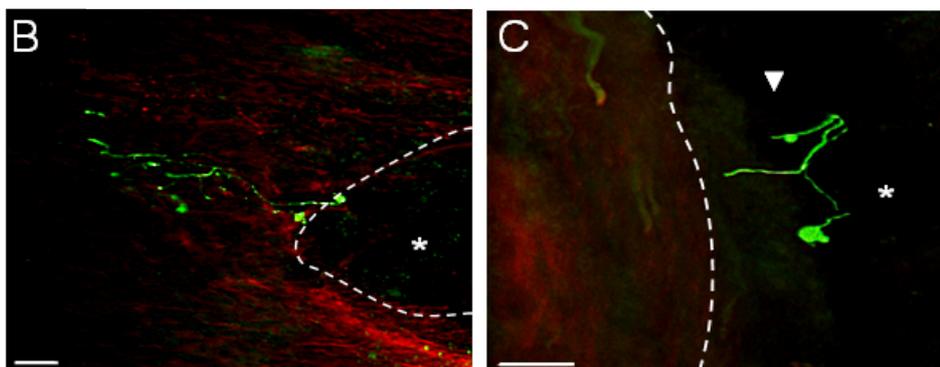
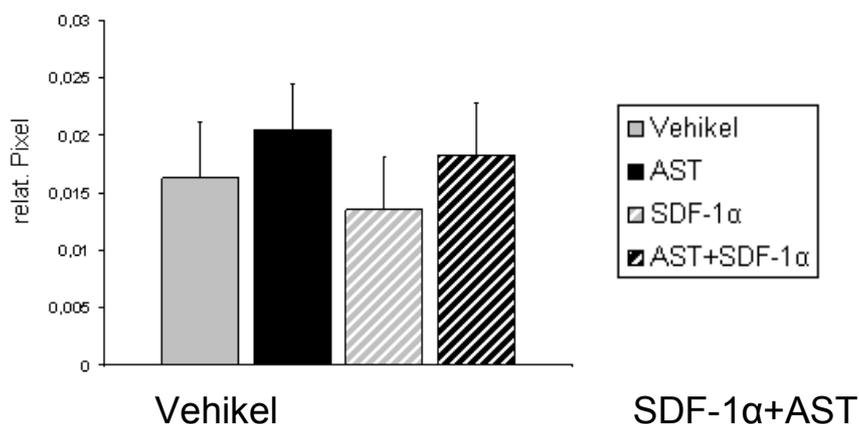


Abbildung 3.26 Quantifizierung der rubrospinalen Axonfragmente in der Narbe 5 Wochen nach Verletzung. A Die Anzahl der Axonfragmente in der GFAP-negativen fibrösen Narbe wurde in jedem zweiten parasagittalen Schnitt proTier bestimmt und der Mittelwert pro Schnitt ermittelt (Balken: Mittelwerte + SEM). Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test, Holm-Bonferroni Korrektur. B und C zeigen immunhistochemische Doppelfärbungen mit GFAP (rot) und RST-Axonen (grün); gestrichelte

Linie: Narbengrenze; Stern: fibröse Narbe; Pfeilspitze in D zeigt ein Axonfragment im Narbenbereich. Maßbalken: 50 μm .

Der **kortikospinale Trakt** zeigt ohne AST-Behandlung nur vereinzelte Faserfragmente in der Narbenregion (Abb. 3.27). Die Mehrzahl der Fasern stoppen jedoch an der rostralen fibrösen Narbengrenze ohne weiter in den Läsionsbereich vorzudringen (Abb. 3.27 B). Durch die Verabreichung des AST konnte die Anzahl der Faserfragmente erhöht werden. Das Ergebnis zeigte sich bereits in der ersten AST-Studie (siehe hierzu 3.1). Die SDF-1 α -behandelten Tiere zeigen bereits eine deutliche Zunahme in der Anzahl an Faserfragmenten in der Narbe im Vergleich zur Vehikel Gruppe. Sie erreichen eine ähnliche hohe Anzahl an Faserfragmente wie nach AST Behandlung. Eine Kombination beider Substanzen zeigt im Vergleich zur Vehikel Kontrolle und der SDF-1 α -Gruppe eine weitere signifikante Erhöhung der Faserfragmente im Läsionsbereich. Für diesen Trakt konnte das SDF-1 α nicht nur ein stark erhöhtes rostrales Aussprossen hervorrufen, sondern kann, in Kombination mit AST ebenfalls die Regeneration bzw. das Einwachsen in den Läsionsbereich signifikant steigern.

A

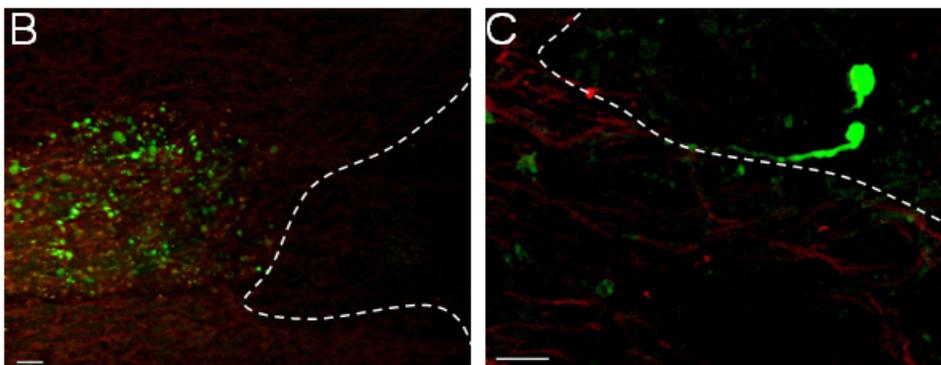
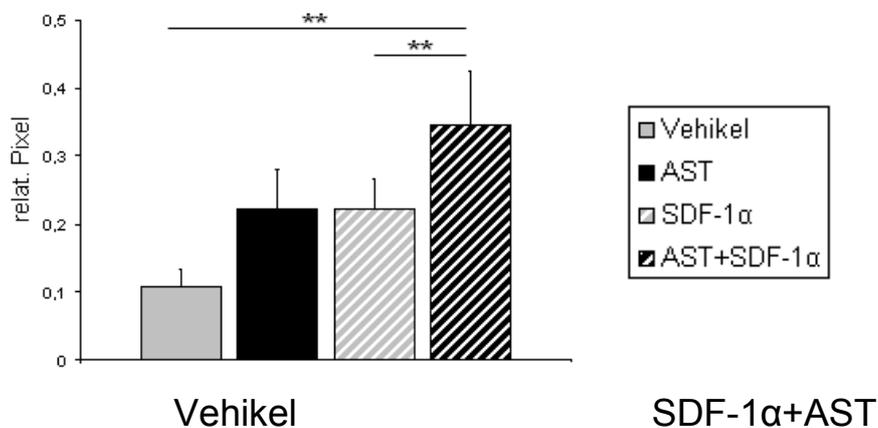


Abbildung
3.27

Quantifizierung der kortikospinalen Axonfragmente in der Narbe 5 Wochen nach Verletzung. A Die Anzahl der Axonfragmente in der GFAP-negativen fibrösen Narbe wurde in jedem

zweiten parasagittalen Schnitt pro Tier bestimmt und der Mittelwert pro Schnitt ermittelt (Balken: Mittelwerte + SEM). Graue Balken: Vehikel Tiere; Schwarze Balken: AST-behandelte Tiere; Grau-Gestreifte Balken: SDF-1 α -behandelte Tiere; Schwarz-Gestreifte Balken: SDF-1 α +AST-behandelte Tiere. Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM. Statistik: Mann-Whitney U Test (**, $p < 0.001$), Holm-Bonferroni Korrektur. B und C zeigen immunhistochemische Doppelfärbungen mit GFAP (rot) und CST-Axonon (grün). Gestrichelte Linie: Narbengrenze; Stern: fibröse Narbe. Maßbalken: 50 μ m.

Wie bereits in der ersten AST-Studie, konnte auch hier die gleiche Anordnung der verschiedenen Populationen in Hinblick auf die Anzahl an Faserfragmenten in der Narbe 5 Wochen nach Verletzung beobachtet werden. Die serotonerge Faserpopulation weist die meisten Faserfragmente in der Narbenregion auf (die CGRP-Population wurde hier nicht untersucht), gefolgt von der catecholaminergen Population. Der CST und RST zeigen die wenigsten Fragmente im Narbenbereich. Auch die rostral-caudale Verteilung innerhalb des Narbeareals der einzelnen Faserpopulationen ist vergleichbar (Daten für diese Studie sind nicht gezeigt).

3.3.3. Untersuchung der SDF-Rezeptorexpression

Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionen auf die SDF-1 α Verabreichung bezüglich des Aussprossens rostral der Läsion, als auch auf das Einwachsen in das Narbenareal, wurde das Vorkommen der beiden bekannten SDF-Rezeptoren, CXCR4 und CXCR7, in den verschiedenen Faserpopulationen untersucht. Für den CST wurde die Expression der beiden Rezeptoren bereits untersucht und es zeigte sich, dass sowohl der CXCR4 als auch der CXCR7 von den kortikospinalen Axonen exprimiert wird (Opatz et al., 2008).

Die Expression der beiden SDF-1 Rezeptoren konnte für den CST bestätigt werden (Abb. 3.28 D, 3.29 D). Ein ähnliches Expressionsmuster wurde auch für den RST beobachtet. Sowohl der CXCR4 (Abb. 3.28 C) als auch der CXCR7 (Abb. 3.29 C) werden von den Axonen des RST exprimiert. Jedoch weder für die serotonergen noch für die catecholaminergen Fasern konnten die SDF-1 Rezeptoren detektiert werden (Abb. 3.28 A, B und 3.29 A, B; Gefärbt von Anne Järve).

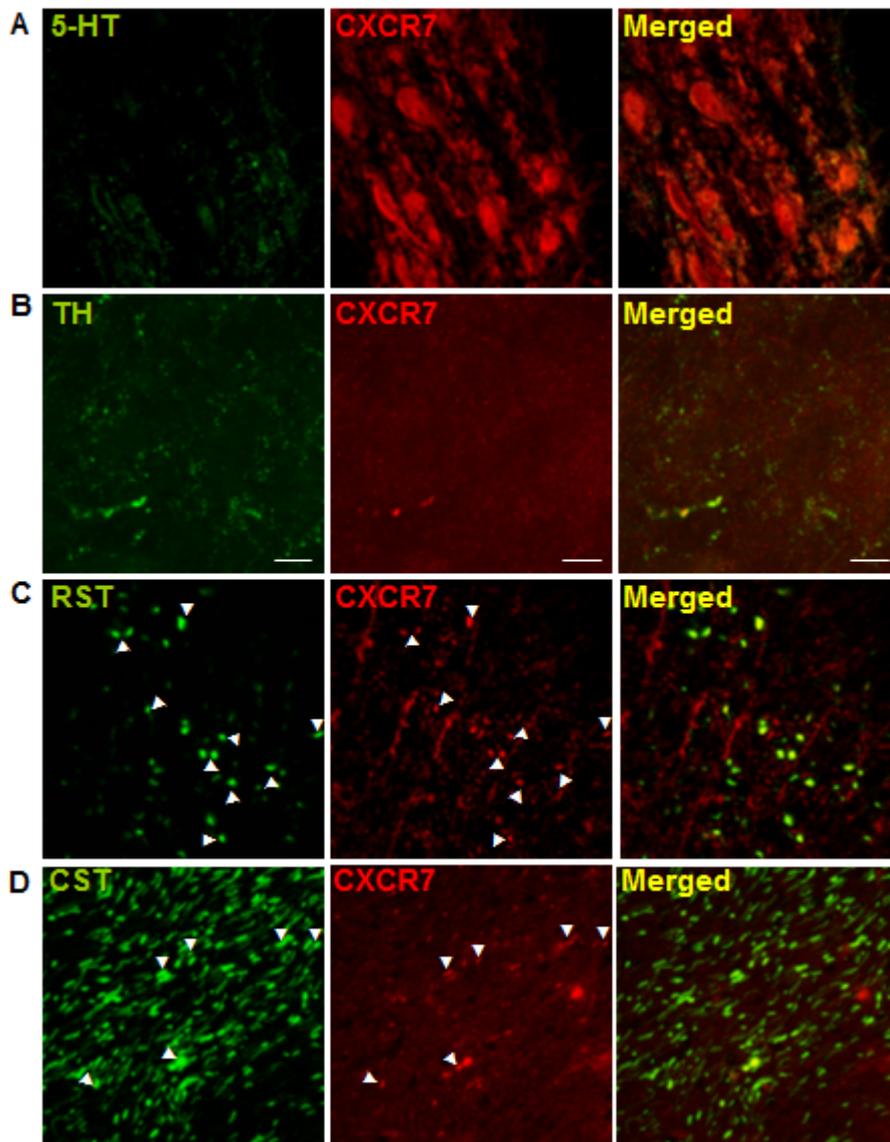


Abbildung 3.28 Immunhistochemische Doppelfärbungen an parasagittalen oder coronalen Rückenmarksschnitten 5 Wochen nach Verletzung. (A) 5-HT Axone (grün) zeigen keine Kolokalisation mit dem CXCR7 (rot). (B) TH Axone (grün) zeigen keine Kolokalisation mit dem CXCR7. (C) Einige RST Axone (grün) zeigen eine Kolokalisation mit dem CXCR7 (rot). (D) Einige CST Axone (grün) zeigen eine Kolokalisation mit dem CXCR7 (rot). Färbungen erstellt von Anne Järve. Maßbalken: 20 μ m.

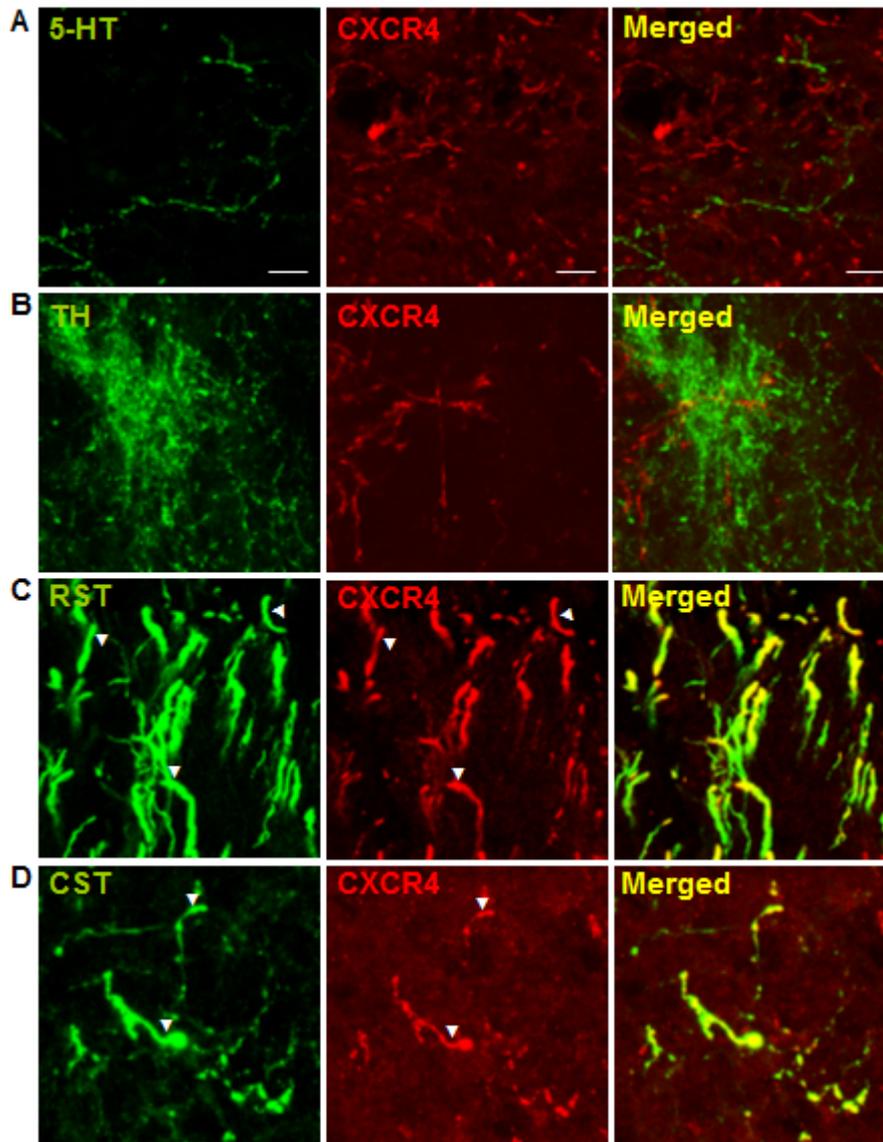


Abbildung 3.29 Immunhistochemische Doppelfärbungen an parasagittalen oder coronalen Rückenmarksschnitten 5 Wochen nach Verletzung. (A) 5-HT Axone (grün) zeigen keine Kolokalisation mit dem CXCR4 (rot). (B) TH Axone (grün) zeigen keine Kolokalisation mit dem CXCR4. (C) Einige RST Axone (grün) zeigen eine Kolokalisation mit dem CXCR4 (rot). (D) Einige CST Axone (grün) zeigen eine Kolokalisation mit dem CXCR4 (rot). Färbungen erstellt von Anne Järve Maßbalken: 20 μ m.

3.3.4 Auswirkung der Behandlungen auf das lokomotorische Verhalten durch Beobachtung der Versuchstiere im Offenfeld

Zur Klassifizierung der freien Bewegung der Versuchstiere wurden diese einmal pro Woche in einem Offenfeld für ca. 4 Minuten einzeln beobachtet und nach der BBB-Lokomotionsklassifizierung bewertet. Diese Klassifizierung wurde von Basso et al. (1995) zur Beurteilung kontusionslädiertes Ratten entwickelt. Bei einem BBB von 0

zeigt die Ratte keinerlei Bewegungen der Hinterbeine, während ein BBB von 21 einer normal laufenden Ratte entspricht. Die Resultate der freien Lokomotion im Offenfeld ist in Abb. 3.30 dargestellt. In der Kontrollgruppe wurden nur 4 der 8 Tiere, in der AST Behandlungsgruppe 5 von 8 Tiere getestet. Die anderen Versuchstiere dieser beiden Gruppen wurden zu einem Zeitpunkt operiert an dem keine Möglichkeit bestand den Verhaltenstest durchzuführen. In der SDF-1 α Gruppe verstarb ein Tier, so dass nur noch 7 Tiere verblieben. In der SDF-1 α +AST Gruppe konnten alle der 8 Tiere getestet werden.

Alle Tiere der Kontrollgruppe, der AST-, sowie der SDF-1 α Gruppe zeigten einen BBB-Wert von 11. Dieser Wert bedeutet häufige bis konstante gewichtsunterstützende Schritte, jedoch keinerlei Koordination der Vorder- und Hinterbeine. Drei Tiere der SDF-1 α +AST Behandlungsgruppe zeigten höhere BBB-Werte. Ein Tier erreichte einen Wert von 12, zwei Tiere einen Wert von 13. Bei einem Wert von 12 zeigen sich häufige bis konstante gewichtsunterstützende Schritte, sowie eine gelegentliche Koordination der Vorder- und Hinterbeine. Bei einem Punkt von 13 zeigen sich ebenfalls häufige bis konstante gewichtsunterstützende Schritte, sowie eine häufige Koordination der Vorder- und Hinterbeine. Die drei Werte zeigten sich jedoch erst am letzten Testtag. 16 Tiere bei denen ein BBB von 11 am letzten Testtag (30 Tage nach Operation) beobachtet werden konnte zeigten bereits am ersten Tag der Verhaltensuntersuchung (6 Tage nach Operation) einen BBB von 11. Drei Tiere, davon ein Kontroll-, und zwei SDF-1 α Tiere zeigten zu Beginn einen BBB von 8 bzw. 9,5 und 6,5 welcher dann nach 2 Wochen auf 11 anstieg.

Um das lokomotorische Verhalten der Ratte detaillierter zu bewerten wurde auch der Sub-Wert der einzelnen Hinterbeine untersucht und dokumentiert. Der BBB Sub-Wert ist eine vom BBB abgeleitete 7-Punkte Skala, bei dem die Pfotenpositionen, die Zehenbewegung, die Schwanzposition und die Laufstabilität zusätzlich bewertet werden.

Hier konnte für das linke Hinterbein bei den Kontrollgruppen, sowie die SDF-1 α Behandlungsgruppe ein Wert im Bereich von 0 bis 3 Punkten detektiert werden. Auch hier zeigt sich, wie für den BBB-Wert, dass 3 Tiere der SDF-1 α +AST-Behandlungsgruppe über einem Wert von 3 liegen (4, 5, 6). Für die rechte Hinterpfote zeigt sich im allgemeinen ein höherer BBB-Sub-Wert, was sich jedoch durch die leicht asymmetrische Läsionsform, bei der die linke Seite stärker betroffen

ist als die rechte, erklären lässt. Der Sub-Wert für die rechte Seite liegt bei allen Gruppen zwischen 0 und 6.

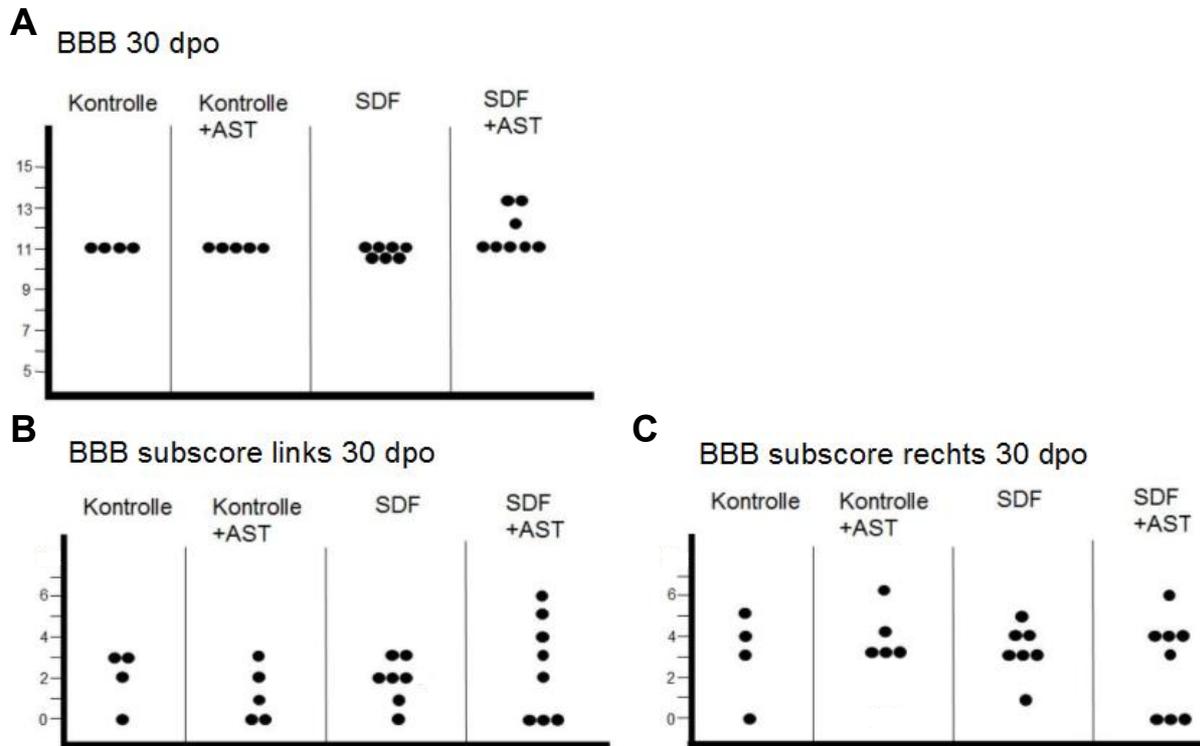


Abbildung 3.30 Resultate der Offenfeld Beobachtung der Versuchstiere und Bewertung der Lokomotion anhand der BBB Klassifizierung bei einer 30-tägigen Beobachtungszeit. In A sind die Endwerte des BBB nach 30 Tagen dargestellt. B und C zeigen die Sub-Werte des BBB des linken bzw. rechten Hinterbeines.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen des Regenerationsverhaltens verschiedener Faserpopulationen nach Läsion und anschließender Behandlung zur Unterdrückung der Narbenbildung

In dieser Studie wurde die Wirkung des Eisenchelators BPY-DCA, welcher zur Unterdrückung der Narbenbildung verabreicht wurde, auf die axonale Regeneration in fünf verschiedenen Axontrakten nach Verletzung des Rückenmarks untersucht. Dazu wurden die Axonfragmente absteigender (serotonerger, 5-HT; catecholaminerger, TH; rubrospinaler, RST; und kortikospinaler Trakt, CST), als auch aufsteigender Trakte (CGRP) durch immunhistochemische Färbungen oder anterograde Markierungen detektiert und quantifiziert.

4.1.1 Spontanes Einwachsen in die primäre fibröse Narbe

Ein Vergleich aller fünf verschiedenen Axonpopulationen in Bezug auf das spontane Einwachsen in den Narbenbereich wurde bisher noch nicht durchgeführt. Einige Studien beschäftigten sich mit der spontanen Regeneration einzelner Traktsysteme, wie z.B. CGRP (Brook et al., 1998), TH (von Euler et al., 2002) und 5-HT (Ramon-Cueto et al., 2000; Brook et al., 1998; von Euler et al., 2002), ein direkter Vergleich fehlt jedoch.

Die aktuellen Untersuchungen zeigten anhand der Kontrolltiere, dass alle untersuchten Fasertrakte 5 Wochen nach Verletzung spontan in die Narbe einwachsen (Abb. 3.1, weiße Balken). Dabei war zu beobachten, dass die CGRP-positiven Axone die höchste Axondichte im Narbenbereich aufwiesen, gefolgt von der serotonergen und catecholaminerger Axonpopulation. Der RST und CST zeigten die wenigsten spontan eingewachsenen Fragmente in der Narbe. Die entstandene Reihenfolge der Fasertrakte in Bezug auf das spontane Einwachsen in die Narbe reflektiert nicht zwingend die grundlegende, inhärente Kapazität der jeweiligen Neuronentypen, da die Gesamtanzahl der Axone der einzelnen Populationen im Rückenmark auf thorakaler Ebene nicht bekannt ist. Dennoch konnten Übereinstimmungen mit vorherigen Untersuchungen beobachtet werden, bei denen die CGRP-positiven Fasern einen höheren Grad an Regeneration zeigten als z.B.

serotonerge Fasern (de Castro et al., 2005). Die geringe Zahl an Axonfragmenten des RST und CST kann zum Teil auf die unzulängliche anterograde Markierungsmethode zurückzuführen sein, da nur ca. 25% der gesamten Faserpopulation markiert werden (Bareyre et al., 2005).

Interessanterweise zeigte sich bei allen Populationen, außer dem RST, dass das spontane Einwachsen in die primäre Narbe der Kontrollen über einen längeren Zeitraum (12 Wochen) anhielt bzw. sich sogar erhöhte (Abb. 3.3). Die Axondichte im Läsionszentrum nahm zwischen der fünften und zwölften Woche um das 1,5-fache (CGRP) bis 3,1-fache (TH) zu (Tab. 3.2). Ähnliche Beobachtungen wurden in einer Langzeitstudie zur Aussprossungskapazität des retikularen Traktes und des CST 3 Monate nach Verletzung gemacht (Hill et al., 2001). Der späte Beginn des Einwachsens in den Läsionsbereich der serotonergen Fasern wurde vermutlich durch eine molekulare Veränderung des Narbengewebes hervorgebracht (Camand et al., 2004). In der Arbeit von Camand et al. (2004) zeigte sich, dass die Expression potentieller wachstumshemmender Moleküle, wie z.B. die Chondroitinsulfat-Proteoglykane, in der ersten Woche nach einer Verletzung stark hoch reguliert werden. Die Expression wird dann kontinuierlich auf das normale Niveau herunter reguliert.

Diese Ergebnisse zeigen bzw. deuten an, dass (1) die Axontrakte ihre regenerative Kapazität über länger als nur 5 Wochen beibehalten, auch ohne jegliche Behandlung und (2) die Wachstums-inhibierenden Eigenschaften der fibrösen Narbe über die Zeit nicht zunehmen.

Der RST musste von der Untersuchung des 12-Wochen Zeitpunktes ausgeschlossen werden da, bedingt durch die neuronale Atrophy, eine exakte Markierung des *Nucleus ruber* nicht mehr gewährleistet werden konnte (Xiao et al., 2005). Es zeigte sich, zwei Monate nach Läsion, eine große Varianz in der Markierung der RST Axone, so dass dieser Zeitpunkt nicht in die Auswertung mit einbezogen werden konnte.

Diese und andere Untersuchungen machen deutlich, dass die spontane Regeneration nicht ausreichend ist, um die funktionellen Defizite zu überwinden. Es zeigt sich jedoch deutlich, dass alle hier untersuchten Fasersysteme eine spontane Läsions-induzierte Reaktion aufweisen, die sie befähigt, die Wachstumsinhibitoren in der fibrösen Narbe über einen längeren Zeitraum zumindest teilweise zu überwinden oder zu umgehen.

4.1.2 Das AST-induzierte gesteigerte Einwachsen in die sekundäre Narbe ist nicht auf eine Faserpopulation beschränkt

Die regenerative Reaktion des CST auf die Narbenunterdrückung wurde bereits in vorherigen Studien beschrieben (Klapka et al., 2005), bei der eine axonale Regeneration über lange Distanzen bis in das distale, unverletzte Rückenmark detektiert wurde.

In dieser aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass 5 Wochen nach Verletzung alle Fasertrakte auf die AST-Behandlung mit vermehrtem axonalem Einwachsen in die Narbe reagierten (Abb. 3.1). Dieses vermehrte Einwachsen in die sekundäre Narbe konnte auch noch 12 Wochen nach Verletzung beobachtet werden (Abb. 3.3). Besonders beim serotonergen Fasertrakt konnte eine auffallend starke Zunahme an Faserfragmenten im Narbenbereich beobachtet werden.

Die heterogene Verteilung der Axonfragmente in der rostralen und caudalen Narbenhälfte (Tab. 3.2; Tab 3.3) zu beiden Zeitpunkten nach Verletzung weist darauf hin, dass die Axone, ihrer spezifischen Wuchsrichtung entsprechend, tatsächlich in die fibröse Narbe eingewachsen sind und nicht durch das Auswachsen innerhalb der Narbe oder durch verbliebene degenerierte Axonfragmente entstanden sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine weitere quantitative Analyse durchgeführt, bei der alle Axonfragmente gezählt wurden, die die Narbengrenze überschritten (Abb. 3.5). Dabei wurden signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und AST-behandelten Tieren in Bezug auf die Anzahl an Axonfragmenten gefunden, die die Narbengrenze überschreiten. Diese Daten demonstrieren, dass die sekundäre fibröse Narbe der AST-behandelten Tiere weniger repulsiv ist, als die primär ausgebildete Narbe der Kontrolltiere. Des Weiteren zeigte sich eine weitaus größere Anzahl an einwandernden Axonfragmenten zwischen der fünften und zwölften Woche, als während den ersten 5 Wochen nach Verletzung. Der lang anhaltende AST-vermittelte Wachstumseffekt deutet auf eine lang anhaltende, wenn nicht sogar permanente Veränderung der Zusammensetzung der sekundären Narbe hin.

Die gewonnenen Daten offenbaren, dass (1) die sekundär gebildete Narbe wesentlich permissiver für regenerierende Axone ist, als die ursprüngliche, primäre Narbe, (2) die Wirkung des AST nicht CST-spezifisch ist, sondern sich auf alle Systeme gleichermaßen auswirkt und (3) die AST-Behandlung nicht nur einen

vorübergehenden Effekt auf die Regeneration von Axonen hat, sondern auch bzw. insbesondere eine lang anhaltende Wirkung auf die Permeabilität der sekundären fibrösen Narbe besitzt.

Obwohl bereits bekannt ist, dass die verschiedenen Faserpopulationen, wie z.B. die aufsteigenden sensorischen Fasern (Inman and Steward, 2003; Sivasankaran et al., 2004) oder die absteigenden kortikalen Projektionen (Hill et al., 2001, Li et al., 1995) unterschiedliche Anforderungen an die axonale Regeneration besitzen, wird deutlich, dass das AST einen der ersten therapeutischen Ansätze darstellt, der die Regeneration von, nicht weniger als 5 verschiedenen Fasersystemen begünstigt.

4.1.3 Kurz- und Langzeiteffekte der AST-Behandlung auf das axonale Einwachsen in die Narbenregion

Der Vergleich der 5- und 12-Wochen Daten in Abbildung 3.6 zeigt deutlich, dass die serotonergen Axone besonders zu einem späteren Zeitpunkt (12 Wochen) empfänglich für einen Regeneratiosschub sind, der durch Anwendung des AST extrem gesteigert wird (Abb. 3.6 B). Auch die kortikalen Axone (CST) scheinen durch das AST erst zu einem späteren Zeitpunkt vermehrt zur Regeneration angeregt zu werden (Abb. 3.6 D), während die CGRP- und TH-Population (Abb. 3.6 A, C) eher in der frühen Phase der Behandlung (5 Wochen) profitieren. Die in den Kontrolltieren beobachtete hohe Anzahl an CGRP Faserfragmenten 5 Wochen nach Verletzung, zusammen mit der relativ schwachen Zunahme der Axondichte 12 Wochen nach Verletzung, und der unveränderten Anzahl an Fragmenten, die die Narbengrenze 5 und 12 Wochen nach Verletzung kreuzen deutet auf eine frühe spontane Regeneration hin, die über die Zeit nicht weiter gesteigert wird. Ein späteres Aussprossen der serotonergen und catecholaminergen Faserpopulation wurde bereits durch andere Untersuchungen belegt (Camand et al., 2004; Inman and Steward, 2003; Hill et al., 2001; Hu und Strittmatter, 2008). Diese späte Reaktion auf die Axotomie könnte auf die große Distanz zwischen der verletzten Stelle und dem Zellkörper zurückzuführen sein (Richardson et al., 1984). Nach dieser Hypothese müsste auch der CST eine verzögerte Zunahme an spontan regenerierten Axonen in den Kontrolltieren zeigen, was jedoch hier nicht der Fall ist. Die widersprüchlichen Resultate deuten auf zusätzliche Einflüsse hin, wie z.B. einer Läsion-induzierten

Atrophy oder Apoptose der pyramidalen Neurone, die schon von verschiedenen Gruppen detektiert und beschrieben wurde (Hains et al., 2003; Klapka et al., 2005; Carter et al., 2008).

Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Reaktionen der untersuchten Fasersysteme zwischen der fünften und zwölften Woche nach Verletzung könnte auch im axonalen Rückzug liegen. Zurückgezogene Axone brauchen mehr Zeit bis sie die Narbenregion wieder erreichen und werden dann mit einer anderen lokalen Umgebung konfrontiert, als solche Axone die die Narbengrenze direkt nach Verletzung überquert haben. Der RST und reticulospinale Neurone zeigen nur einen geringen Rückzug (ca. 480 µm zwischen der ersten und vierten Woche) (Dolbeare und Houle, 2003), wohingegen der CST über eine Distanz von bis zu 2 mm retrahiert (Seif et al., 2007).

Der „verlängerte“ Wachstumseffekt des AST könnte auch auf eine Veränderung der molekularen Zusammensetzung der fibrösen Narbe hindeuten. Die fibröse Narbe ist eine extrem dynamische extrazelluläre Matrixstruktur deren molekulare Beschaffenheit sich mit der Zeit verändert. Z.B. zeigt das Proteoglykan Tenascin-C (Tn-C) ein Expressionsmaximum 8 Tage nach Verletzung und wird dann stark herunter reguliert, NG2 hat sein Expressionsmaximum ebenfalls nach 8 Tagen, Phosphacan aber erst 1 Monat nach Verletzung (Camand et al., 2004; Tang et al., 2003). Die gleichzeitige verzögerte Narbenbildung und die daraus resultierende Reduktion von Wachstumsinhibitoren im Läsionszentrum würde sich besonders gut auf das später verzögerte regenerative Wachstum auswirken.

Die verschiedenen Narben-assoziierten Moleküle sind meist nur für bestimmte Axonpopulationen repulsiv (Klapka und Müller, 2006; Condic und Lemons, 2002), wie z.B. das Proteoglykan NG2, welches nur für sensorische Axone und den RST inhibitorisch wirken (Jones et al., 2003), jedoch nicht für serotonerge Axone (Tang et al., 2006). Dies ist möglicher Weise auf Unterschiede in der Expression entsprechender Membranrezeptoren der verschiedenen Neuronenpopulationen zurückzuführen (Barrette et al., 2007).

4.1.4 AST erhöht die Zahl an regenerierten Axonen im distalen Rückenmark

Zwölf Wochen nach Verletzung konnte bei den AST-behandelten Tieren eine ausgeprägte Regeneration der serotonergen, catecholaminergen und kortikospinalen Axonpopulation in das distale, unverletzte Rückenmark beobachtet werden (Abb. 3.7). Die relativ kleine Region in der die serotonergen und catecholaminergen Fasern ausgezählt wurden, wurde ausgewählt um eine Zählung von Aussprossungen unverletzter Axone zu vermeiden. Aus dem gleichen Grund wurde der CST nur in der dorsalen weißen Substanz des distalen Rückenmarks ausgezählt. Obwohl diese selektive Auswahl der zu untersuchenden Region die Anzahl an Axonfragmenten stark reduzierte, konnten die detektierten Axone zweifelsfrei als regenerierte identifiziert werden (Steward et al., 2003). Es konnte beobachtet werden, dass unverletzte serotonerge und catecholaminerge Axone in das dorsale Rückenmark aussprosseten, dies jedoch erst im Bereich ab ca. 1mm caudal der Läsionsstelle. Deshalb wurde eine kleine Region ausgewählt, die unmittelbar an die Läsionsgrenze anschließt, um nur regenerierte Axone zu zählen, die durch die Narbenregion hindurch und distal wieder heraus gewachsen sein müssen (Abb. 3.7 A, B, C).

Die CGRP-Population wurde bei dieser Auswertung ausgeschlossen, da diese Fasern in jedem thorakalen Segment in das Rückenmark eintreten. Der RST konnte nicht ausgezählt werden, da eine exakte Markierung des *Nucleus ruber* zu dem späteren Überlebenszeitpunkt durch die Atrophy der Neurone nicht mehr gewährleistet werden konnte.

Der Zeitpunkt der erst spät detektierten (12 Wochen) distalen kortikospinalen Axonfragmente stimmt überein mit früheren Daten der funktionellen Erholung nach AST-Behandlung (Klapka et al., 2005). Durch den Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Test, konnte bei dieser Studie eine axonale Regeneration zwischen der siebten und zehnten Woche nach Verletzung erfasst werden. Durch Catwalk Analysen konnte beobachtet werden, dass die Tiere ab der fünfzehnten Woche ein normales Laufmuster aufwiesen. Dies stützt die Annahme, dass der regenerative Effekt des AST eine lang anhaltende Reaktion auf die Narbenunterdrückung ist, was die Basis für eine funktionelle Erholung bzw. Verbesserung darstellt.

4.2 Untersuchung des rostralen Aussprossungsverhaltens nach Verabreichung verschiedener wachstumsfördernder Substanzen

In diesen Studien wurden zwei unterschiedliche Substanzen ausgewählt denen eine Rolle bei der Axonregeneration zugeschrieben wird. Zum einen wurde das Peptidhormon GIP (gastric inhibitory polypeptide) verwendet, zum anderen das Chemokin SDF-1 α . Beide Substanzen wurden über osmotische Minipumpen über einen Zeitraum von 7 Tagen lokal appliziert. In beiden Studien wurde der kortikospinale Trakt auf das rostrale Aussprossen untersucht.

4.2.1 Das Peptidhormon GIP scheint keine regenerationsfördernden Eigenschaften im ZNS zu besitzen

Die einwöchige Gabe des Peptidhormon GIP zeigte im direkten Vergleich zu den Kontrolltieren keine Erhöhung bzw. Steigerung des Aussprossens kortikospinaler Axone rostral der Läsionsstelle. Weder in der weißen noch in der grauen Substanz konnte die Anzahl der Axonfragmente gesteigert werden. Einige Autoren hingegen konnten zeigen, dass GIP als potenter Regulator der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen agieren kann (Nyberg et al., 2005; Abawanka et al.,). Bühren et al. (2009) beobachtete, dass die Expression von GIP, als auch die des GIP-Rezeptors (GIPR), nach Verletzung des Ischiasnervs in dorsalen Hinterwurzelganglien (DRG) und im ventralen Rückenmark stark hoch reguliert wird, weshalb dem GIP/GIPR Systems eine putative Rolle bei der Signalgebung der spontanen Nervenregeneration im PNS zugeschrieben wurde (Bühren et al., 2009). Die hier im ZNS gewonnen Ergebnisse können die am PNS erhaltenen Resultate jedoch nicht stützen. Möglich ist, dass GIP nur bei der spontanen Regeneration im PNS eine Rolle spielt, nicht jedoch im ZNS.

4.2.2 Die Verabreichung des Chemokins SDF-1 α bewirkt eine signifikante Steigerung des rostralen Aussprossens kortikospinaler Axone

Nach einer einwöchigen Verabreichung des Chemokins SDF-1 α konnte eine starke Zunahme an rostral aussprossenden kortikospinalen Axonen festgestellt werden.

Dies zeigte sich sowohl in der weißen (Abb. 3.10 B), also auch in der grauen Substanz (Abb. 3.10 C). *In vitro* konnte in unserem Labor bereits nachgewiesen werden, dass die Präinkubation von Neuronen mit SDF-1 α das Neuritenwachstum von DRG Neuronen, welche auf inhibitorischem Myelin kultiviert wurden, stark erhöht (Opatz et al., 2008). Die Expression beider SDF-1 Rezeptoren konnte in den DRG Neuronen festgestellt werden (Abb. 3.28D, 3.29D; Opatz et al., 2008). *In vitro* kann SDF-1 als Neurotransmitter agieren, der an der axonalen Leitung und Elongation hippocampaler Neurone beteiligt ist (Pujol et al., 2005; Arakawa et al., 2003; Chalasani et al., 2003). Auch andere Arbeitsgruppen konnten dem SDF-1 Chemokin positive Eigenschaften wie z.B. der Chemotaxis, dem Bewegungsvermögen und der Adhäsion zuschreiben (Janowska-Wieczorek et al., 2000). Ähnliche Resultate zum rostralen Aussprossen konnte *in vivo* nach Infusion eines funktionell-blockierenden Nogo-Rezeptor (NgR) Antikörpers über osmotische Minipumpen beobachtet werden. Dadurch wurde der NgR-abhängige Signalweg blockiert. Auch hier zeigte sich eine signifikante Zunahme des axonalen Aussprossens des CST rostral der verletzten Stelle (Li et al., 2004; Liebscher et al., 2005; Bareyre et al., 2002). Die in dieser Untersuchung erhaltenen Resultate stützen die These, dass SDF-1 an der Regeneration, zumindest von CST Axonen beteiligt sein könnte.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse wurde das SDF-1 α für weiterführende Experimente ausgewählt. Das Peptidhormon GIP hingegen wurde nicht weiter verwendet.

4.3 Untersuchung des rostralen Aussprossungsverhaltens nach kombinierter Verabreichung des AST und des Chemokins SDF-1 α

In dieser Studie wurde eine Kombination aus Narbenunterdrückung (BPY-DCA + cAMP) und Wachstumsfaktor (SDF-1 α) verwendet. Durch die gleichzeitige Verabreichung beider Komponenten sollte einerseits ein vermehrtes axonales Aussprossen, sowie andererseits eine Steigerung der Penetration der Fasertrakte in das Narbenareal erzielt werden. Fünf Wochen nach erfolgter Operation wurden vier verschiedene absteigende Faserpopulationen (serotonerge, 5-HT; catecholaminerge, TH; rubrospinaler, RST; und kortikospinaler Trakt, CST) auf ihr axonales

Aussprossen, sowie auf die axonale Regeneration, anhand von anterograden Markierungen bzw. immunhistochemischen Färbungen untersucht und quantifiziert.

4.3.1 Unterschiedliche Reaktionen der Faserpopulationen auf das axonale Aussprossen 5 Wochen nach Verletzung und Behandlung

Ein Vergleich der vier verschiedenen Axonpopulationen in Bezug auf das Aussprossen rostral der Verletzungsstelle (Th2 bis Th5) zeigt starke Varianzen bezüglich ihrer Reaktion auf die verabreichten Substanzen. Zwei der untersuchten Populationen (5-HT, CST) werden stark durch das Chemokin SDF-1 α zum rostralen Aussprossen angeregt. Die Anwendung des AST hat bei beiden Trakten nur einen kleinen bzw. keinen Effekt auf die Axonsprossung. Dies zeigt sich vor allem für den CST, der einzig auf das Chemokin reagiert, eine kombinatorische Gabe zeigt keine weitere Erhöhung der Axonfragmente rostral der Läsion, weder in der grauen noch in der weißen Substanz (Abb. 3.22, 3.23). Für den CST, aber auch für die serotonerge Population konnte das rostrale Aussprossen, angeregt durch verschiedene Substanzen, bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben werden (Fouad et al., 2001; Li und Strittmatter 2003; Iarikov et al., 2007; Brambilla et al., 2009). Die serotonerge Faserpopulation weist ein ähnliches Verhaltensmuster wie der CST auf. Bei der Auswertung dieser Population wurde jedoch die Pixeldichte in verschiedenen Bereichen der grauen und weißen Substanz ermittelt. Es zeigt sich im ventralen Bereich der grauen Substanz ein vermehrtes Aussprossen besonders nach Gabe des SDF allein oder in Kombination mit AST (Abb. 3.12). Jedoch ist dieser Anstieg eher gering im Vergleich zu den dorsalen Bereichen, wie der weißen Substanz und dem Hinterhorn (graue Substanz). Dies ist jedoch nicht allzu überraschend, da die ventralen Bereiche nicht bzw. nur sehr geringfügig durch die dorsale Hemisektion verletzt wurden, im Gegensatz zu den dorsal verlaufenden Fasertrakten, die durch die Hemisektion nahezu vollständig durchtrennt wurden (eine Übersicht über das Läsionsgebiet ist in Abb. 2.1 E dargestellt).

Im Hinterhorn ist ein extremer Anstieg des Aussprossens, insbesondere nach SDF-1 α allein bzw. SDF-1 α in Kombination mit AST zu verzeichnen. Ein überraschender Befund zeigte sich in der weißen Substanz. Es konnte in der SDF-Gruppe ein signifikant gesteigertes axonales Aussprossen im Vergleich zu den Kontrollen

detektiert werden (Abb. 3.13). Die Wirkung des SDF-1 α in Kombination mit AST konnte in diesem sensorischen Fasersystem um ein Vielfaches verstärkt werden (Abb. 3.14). In diesem Fall kann man von einem synergistischen Effekt sprechen, bei dem sich die einzelnen Komponenten gegenseitig verstärken. Eine solche kombinatorische Wirkung war überraschend, da weder das SDF-1 α noch das AST allein die Axondichte stark erhöhte. In keiner anderen Faserpopulation konnte ein solcher synergistischer Effekt beobachtet werden. Chiba et al. (2009) konnte ebenfalls einen synergistischen Effekt beobachten, nach einer kombinierten Gabe von Knochenmarkszellen (Bone marrow stromal cells) und Fasudil, einem Rho Kinase Inhibitor, welcher die Aktivierung von RhoA verhindert. RhoA wird stark von Neuronen und Astrozyten im verletzten Rückenmark exprimiert und inhibiert so die axonale Regeneration (Sung et al., 2003; Madura et al., 2004). Bei Gabe dieser Kombination detektierten sie einen dramatischen Anstieg von kortikospinalen Fasern caudal der Läsionsstelle bzw. eine erhöhte Anzahl an 5-HT Fasern rostral der Läsion (Furuya et al., 2009). Die Bindung des SDF-1 α an seinen Rezeptor CXCR4 führt z.B. bei DRG und Cerebellum Neuronen zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels (Spencer and Filbin 2004). Diese Zunahme wiederum führt zu der Aktivierung einer Signalkaskade, um so die Myelin-assoziierten-Glykoprotein- (MAG) oder Myelin-induzierte Inhibition der axonalen Regeneration zu blockieren. Die Gabe des Rho Kinase Inhibitors führt ebenfalls, wie das SDF-1 α zu einer axonalen Regeneration. Er vermittelt seine Wirkung jedoch über eine weitere Signalkaskade (siehe hierzu Abb. 4.1).

Das Hinterhorn, wie auch der untersuchte Teil der weißen Substanz, wurden durch die dorsale Hemisektion vollständig zerstört, weshalb hier auch ein wesentlich größerer Effekt als in den ventralen Bereichen zu erwarten war. Dieser Teil des Rückenmarks bleibt durch die OP größtenteils unverletzt. Bei der Reaktion der serotonergen Faserpopulation scheint es sich im Gegensatz zum CST eher um eine indirekte Chemokin-Wirkung zu handeln, da die immunhistochemischen Doppelfärbungen mit den beiden bekannten SDF-1 Rezeptoren keine Kolo-kalisation mit 5-HT positiven Fasern ergab (Abb. 3.28A, 3.29A). Beim kortikospinalen Trakt handelt es sich wahrscheinlich um eine direkte, rezeptorvermittelte Reaktion. Für beide SDF-1 Rezeptoren konnten Kolo-kalisationen detektiert werden (Abb. 3.28D, 3.29D). Für den CST konnte dies bereits durch Opatz et al., 2008 beschrieben werden. Die Rezeptoren waren entlang des gesamten kortikospinalen Axons verteilt, jedoch

zeigte sich eine Anreicherung der Immunreaktivität an Verzweigungspunkten oder Endkolben-ähnlichen Strukturen (Opatz et al., 2008), was auf ein gesteigertes axonales Auswachsen bzw. Verzweigen hindeutet. Ein ähnliches Axon spezifisches Verteilungsmuster des CXCR4 wurde bereits für hippocampale Neurone beschrieben (Pujol et al., 2004).

Der RST und die catecholaminerge Faserpopulation zeigten hingegen eine vergleichsweise geringe Wirkung auf die Verabreichung des Chemokins. Bei diesen zwei Populationen konnte hingegen ein deutlicher AST-Effekt auf das Aussprossen rostral des Läsionsbereiches beobachtet werden. Die Kombination aus beiden Substanzen konnte zwar eine geringe, jedoch keine signifikante Steigerung erzielen (Abb. 3.15 bis 3.19). Für den RST konnte für beide SDF-1 Rezeptoren eine Kolokalisation beobachtet werden (Abb. 3.28C, 3.29C), somit handelt es sich bei dem RST vermutlich um einen direkt vermittelten Chemokineffekt. Für die catecholaminerge Faserpopulation konnte, wie für das serotonerge System, keinerlei Kolokalisation mit dem CXCR4- bzw. CXCR7-Rezeptor beobachtet werden (Abb. 3.28B, 3.29B). Somit scheint es sich bei der SDF-vermittelten axonalen Aussprossung catecholaminerger Axone rostral der Läsion ebenfalls um einen indirekten Effekt zu handeln. Es konnte jedoch für einen Teil der catecholaminergen Neuronenpopulation im Gehirn eine CXCR4 Expression festgestellt werden (Banisadr et al., 2002). Auch für einen Teil serotonerger Neurone in den dorsalen Raphekernen des Hirnstammes konnte eine Kolokalisation mit dem CXCR4 Rezeptor detektiert werden (Heinisch und Kirby 2009). Somit könnte es sich zumindest teilweise um eine direkt-vermittelte Wirkung handeln, bei dem das SDF-1 α über die Cerebrospinalflüssigkeit zu den Neuronen im Hirnstamm gelangt sein könnte, um dort über eine direkte Interaktion mit seinen Rezeptoren die Aussprossung zu aktivieren. Nach einem ZNS Trauma erhöht sich die Permeabilität der Blut-Hirnschranke (Whetstone et al., 2003; Habgood et al., 2007; Mauter et al., 2000), was ein Erreichen des Zielgebietes, in diesem Fall der Hirnstamm, erleichtert. Eine weitere Möglichkeit für die Reaktion auf das Chemokin könnte in der indirekten Wirkung des SDF über die Aktivierung bzw. Interaktion lokaler Zellen bestehen, wie z.B. den Astrozyten oder Mikroglia für die bereits eine CXCR4 Expression beschrieben wurde (Dorf et al., 2000; Lavi et al., 1997; Albright et al., 1999; Banisadr et al., 2002). Die Astrozyten und Mikroglia wiederum lassen andere Zytokine, Chemokine und/oder Wachstumsfaktoren frei, die das rostrale Aussprossen der

serotonergen und catecholaminergen Faserpopulationen positiv beeinflussen könnten.

Der Unterschied zwischen der starken Reaktion des CST und der eher schwachen Antwort des RST auf die Verabreichung des Chemokins könnte durch eine unterschiedlich starke Expression der Rezeptoren hervorgerufen sein bzw. durch unterschiedliche Dimerisierungen des CXCR4 Rezeptors. Guyon und Nahon (2007) erklärten die verschiedenen Reaktionen auf das SDF-1 α durch das unterschiedliche Ausmaß der Dimerisierungen des Rezeptors bzw. des Chemokins selbst. Je nach Konzentration agiert das SDF-1 als Mono- oder Oligomer auf den CXCR4, welcher wiederum entweder als Monomer oder Homodimer vorliegt, was zu den verschiedenen Reaktionen führen kann. Da sich der CST nach Verletzung stark zurückzieht (1 bis 2 mm; von Meyenburg et al., 1998; Oudega et al., 1999), der RST jedoch näher an der Läsionsstelle verbleibt, sind beide Trakte zunächst unterschiedlichen SDF-1 α Konzentrationen ausgesetzt. Eine solche Konzentrationsabhängige Axonleitung konnte bereits an T-Zellen gezeigt werden, bei denen eine geringe SDF-1 Konzentration zu einer anziehenden, eine hohe SDF-1 Konzentration hingegen zu einer abstoßenden Reaktion führte (Zlatopolskiy und Laurence 2001).

Das Aussprossen des RST und der catecholaminergen Faserpopulation wird überwiegend durch die AST-Behandlung hervorgerufen, welche aus zwei verschiedenen Komponenten besteht. Dem Eisenchelator, welcher vorübergehend die Bildung der Kollagen-haltigen Narbe unterdrückt (Klapka et al., 2005) und dem zyklischen Adenosin Monophosphat (cAMP), welches die Proliferation der Fibroblasten verhindern soll (Duncan et al., 1999), da diese stark an der Bildung der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Andere Studien konnten bereits zeigen, dass eine Inhibition durch Myelin durch eine Erhöhung des neuronalen cAMP-Spiegels überwunden werden konnte (Cai et al., 1999; Neumann et al., 2002; Qiu et al., 2002). Warum insbesondere der RST und die catecholaminergen Population auf die Erhöhung des cAMP-Spiegels reagieren, bzw. die anderen beiden Fasersysteme kaum oder gar nicht, bleibt unklar.

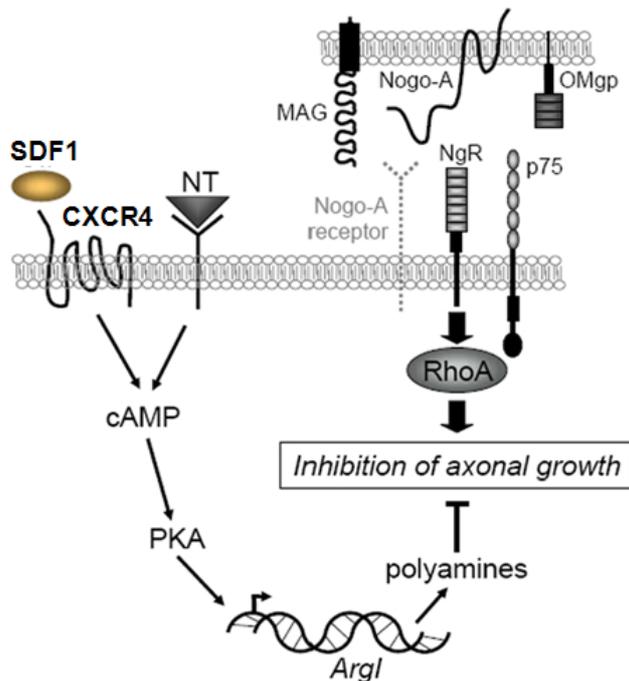


Abb. 4.1 Regenerationsmodell. Nach einer Verletzung kann die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu einer Signalkaskade führen, bei der die Aktivierung der Protein Kinase (PKA), zu einer Induktion von regenerationsverwandten-Genen wie der Arginase I führen kann. Das Enzym Arginase I katalysiert wiederum die Produktion der Polyamine (Cai et al., 2002). Wie die Polyamine die axonale Regeneration induzieren ist jedoch noch unklar. (Modifiziert nach Spencer und Filbin, 2004)

4.3.2 Plastizität rostral der Läsionsstelle: Kollaterales und regeneratives Aussprossen

Eine direkte Regeneration durchtrennter Axone ist nicht zwangsläufig der einzige Weg um supraspinale Verbindungen wiederherzustellen (Weidner und Tuszynski, 2002). Eine weitere Möglichkeit besteht in der kompensatorischen Reorganisation unverletzter Axontrakte. Ein Aussprossen unverletzter absteigender Fasertrakte im adulten Rückenmark konnte bereits nachgewiesen werden (Weidner et al., 2001).

Sowohl bei der serotonergen als auch bei der catecholaminergen Faserpopulation wurden verschiedene Bereiche der grauen und weißen Substanz untersucht. Dabei lassen sich die untersuchten Gebiete in einen ventralen und dorsalen Bereich einteilen. Bei der Aussprossung im dorsalen Bereich handelt es sich überwiegend um ein regeneratives Auswachsen verletzter Axone, da der obere Teil des Rückenmarkes nahezu vollständig durchtrennt wurde. Im ventralen Teil des Rückenmarks, welcher durch die dorsale Hemisektion nicht bzw. nur sehr gering verletzt wurde, kommt es eher zu einem kollateralen, kompensativen Aussprossen unverletzter Axone. In beiden Populationen (5-HT, TH) konnte sowohl im dorsalen als auch im ventralen Teil eine Zunahme des Aussprossens verzeichnet werden. In beiden Fällen zeigte sich eine maximale Zunahme der axonalen Aussprossung im

ventralen Bereich von ca. 40%, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um ein kollaterales Auswachsen unverletzter Axone handelt. Im dorsalen Bereich konnte bei der catecholaminergen Population eine maximale Zunahme von ca. 60%, bei der serotonergen Population sogar ein extremer Anstieg auf bis zu 800% detektiert werden. Insbesondere die serotonerge Population zeigt ein sehr ausgeprägtes regeneratives Aussprossen rostral der Läsionsstelle. Ähnliches konnte bereits für diese Population nach einer Verabreichung des Wachstumsfaktors BDNF beschrieben werden. Nach dauerhafter lokaler Gabe des BDNF über osmotische Minipumpen wurde ein Aussprossen sowohl lädierter als auch intakter serotonerger Axone beobachtet (Mamounas et al., 2000).

Im Gegensatz zum teilweise sehr ausgeprägten regenerativen Aussprossen, ist das kollaterale Aussprossen in geringerem Maße zu beobachten. Diese Art des Aussprossens rostral der Läsionsstelle ist beteiligt an der Bildung indirekter, intraspinaler Verschaltungen über die propriospinalen Neurone (PSN). Jedoch bleibt unklar ob, bzw. welche der propriospinalen Neurone, die lokalen oder die weit-absteigenden, terminiert werden. Vavrek et al. 2006 und andere konnten für den CST eine solche Verbindung über die PSN beobachten (Fouad et al., 2001; Bareyre et al., 2004). Courtine et al. (2008) schrieb bereits der propriospinalen Verschaltung in der Vermittlung spontaner funktioneller Erholung und der supraspinalen Kontrolle des Laufens nach Rückenmarksverletzungen eine große Bedeutung zu. Die Gruppe konnte zeigen, dass eine funktionelle Erholung auch ohne die Regeneration direkter, supraspinaler Projektionen erfolgen kann, nur durch die Reorganisation absteigender Axone und PSN's.

Jedoch bleibt ungeklärt ob die ventralen, kollateral ausgesprossenen Axone (a) auf die PSN terminieren und funktionelle Verbindungen eingehen, oder (b) lokal verbleiben ohne funktionelle Verbindungen einzugehen oder (c) über längere Distanzen unterhalb der Läsionsstelle hindurch wachsen.

4.3.3 Der CST profitiert von der kombinierten Behandlung und zeigt ein stark erhöhtes Einwachsen in die Narbe

Die Quantifizierung der Axonfragmente in der Narbe 5 Wochen nach Läsion zeigte kein einheitliches Verhaltensmuster der einzelnen Fasertrakte auf die Behandlungen.

Für den RST und die catecholaminerge Population zeigte sich, wie schon zuvor unter Punkt 3.1 beschrieben, eine Erhöhung der Axonfragmente im Narbenareal nach AST-Behandlung. Die zusätzliche, längerfristige Verabreichung des Chemokins SDF-1 α konnte die Anzahl der Axone im Narbenbereich nicht steigern (Abb. 3.25 bis 3.26). Dieses Ergebnis stimmt mit den gewonnenen Daten des axonalen, rostralen Aussprossens überein. Beide Populationen werden ebenso stark durch das AST zum Aussprossen angeregt wie durch das Chemokin. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die zusätzliche Verabreichung des SDF-1 zu einer Reduktion des Längenwachstums führt, das regionale Aussprossen hingegen scheint angeregt zu werden.

Die serotonerge Population und der CST, welche beide überwiegend durch das SDF zum Aussprossen angeregt wurden, zeigen ein eher konträres Bild im Narbenareal. Auch hier konnte beobachtet werden, dass die Verabreichung des AST allein das Einwachsen in die Narbe erhöht, was sich bereits in der ersten Studie (Abb. 3.3) zeigte. Beim CST konnte die zusätzliche Gabe des Chemokins eine Verdoppelung regenerierter Axonfragmente im Narbenareal bewirken (Abb. 3.24). Hier scheint ein vermehrtes rostrales Aussprossen auch zu einer erhöhten Anzahl an regenerierten Axonfragmenten in der Narbe zu führen. Die Gabe des Chemokins führt bei der kortikospinalen Faserpopulation nicht nur zu einem erhöhtem regionalen Aussprossen, sondern ebenfalls zu einem vermehrten Längenwachstum über größere Distanzen.

Bei der serotonergen Faserpopulation ist in der Kontroll- und AST-Gruppe ein ähnliches Muster zu beobachten wie bei allen anderen Trakten. Nach AST allein ist eine erhöhte Axondichte in der Narbe zu verzeichnen. Überraschenderweise, führt die Verabreichung des Chemokins allein oder in Kombination zu einer Abnahme an Axonfragmenten im Narbenareal um bis zu 50% (Abb. 3.27). Chalasani et al. (2003) konnte zeigen, dass SDF-1 die abweisenden Eigenschaften verschiedener extrazellulärer Moleküle wie z.B. Slit-2, Semaphorin 3A, oder Semaphorin 3C reduziert. Diese Modulation wird über den CXCR4 vermittelt. Für den CST konnte bereits nachgewiesen werden, dass er diesen Rezeptor trägt (Opatz et al., 2008; Abb. 3.28D, 3.29D). Immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass die serotonerge Population diesen Rezeptor nicht besitzt (Abb. 3.28A, 3.29A). Somit reduzieren sich die abweisenden Eigenschaften bestimmter extrazellulärer Moleküle

nur für Axone die einen der beiden Rezeptoren tragen, nicht jedoch für die serotonergen Fasern, die keine Rezeptorexpressionen aufweisen.

Eine weitere Erklärung für das verschiedenartige Einwachsen in die Narbe von 5-HT- und CST-Axonon liegt möglicherweise in ihrer Zielregion. Der CST innerviert die graue Substanz nur im zervikalen und lumbaren Bereich. Das heißt, dass die kortikospinalen Axone nur noch ein Zielgebiet im lumbaren Rückenmark besitzen. Die serotonergen Axone innervieren die graue Substanz über das ganze Rückenmark hinweg. Das bedeutet, dass diese Population auch Zielgebiete rostral der Läsionsstelle besitzt. Möglicherweise führt die Verabreichung des Chemokins zu einem gesteigerten Aussprossen, welches jedoch regional begrenzt ist und zu einer vermehrten Innervierung von Zielneuronen rostral der Läsion führen könnte. Das Längenwachstum hingegen scheint bei dieser Population reduziert zu sein.

Pujol et al. (2004) konnten zeigen, dass sich die Wachstumskegel hippocampaler Neurone nach Gabe des SDF-1 reduzierten, jedoch die axonale Verzweigung stimuliert wurde. Dies führte zu einem lokalen Aussprossen, statt zu einem Wachstum über lange Distanzen. Bei cerebellaren Körnerzellen zeigte sich durch die Behandlung mit SDF-1 eine Elongation der Axone (Arakawa et al., 2003). Die konträre Wirkung dieses Chemokins könnte die unterschiedlichen Verhaltensweisen der verschiedenen Faserpopulation erklären.

Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Auswirkungen des AST und SDF-1 auf das axonale Aussprossen und die Regeneration, sowie das Rezeptorvorkommen. RST und TH, welche durch das AST und das SDF allein zum Aussprossen angeregt werden, zeigen ein gleichbleibendes Längenwachstum, dafür aber ein erhöhtes regionales Auswachsen. Der RST exprimiert, im Gegensatz zur catecholaminergen Population, beide SDF-1 Rezeptoren. Da beide Trakte jedoch gleich reagieren scheint es sich bei der kombinatorischen Behandlung überwiegend um einen AST-vermittelten Effekt zu handeln. Bei der 5-HT Faserpopulation, welche keinen der beiden Rezeptor exprimiert, bewirkt das Chemokin ein stark reduziertes Längenwachstum und ein extrem gesteigertes regionales Auswachsen. Der CST welcher ebenfalls nur auf die alleinige Behandlung des Chemokins reagiert zeigt ein erhöhtes rostrales Aussprossen. Zusätzlich wird auch noch das Längenwachstum stimuliert, was sich durch die Rezeptorexpression erklären lässt.

Eine genauere Angabe der verschiedenen Wirkungsweisen des SDF-1 Chemokins, sowie die genutzten Signalwege kann erst durch weitere Untersuchungen aufgeschlüsselt werden.

Enhanced sprouting	5-HT	TH	RST	CST
AST	-	+	+	-
SDF	+	+	+	+
AST+SDF	+	+	+	+
CXCR4	-	-	+	+
CXCR7	-	-	+	+

Enhanced regeneration	5-HT	TH	RST	CST
AST	(+)	(+)	(+)	(+)
SDF	-	-	-	-
AST+SDF	-	(+)	(+)	+
CXCR4	-	-	+	+
CXCR7	-	-	+	+

Tabelle 4.1 Übersicht der unterschiedlichen Auswirkungen auf die verschiedenen Behandlungen sowie die Rezeptorexpression

4.3.4 Auswirkung der Behandlungen auf die Lokomotion der Ratte

Zur Klassifizierung der Lokomotion der Tiere im Offenfeld wurde die BBB Klassifizierung angewandt wie im Materialien und Methodenteil beschrieben.

Die Ergebnisse der freien Lokomotion zeigen, 30 Tage nach Verletzung, eine leichte Verbesserung der Lokomotion in der Behandlungsgruppe, die eine kombinatorische Verabreichung von AST und SDF-1 α erhielten. Drei von vier Tieren dieser Gruppe erzielten einen BBB-Wert der über 11 lag (Abb. 3.30). Alle anderen Tiere erreichten einen Maximalwert von 11. Dieses Resultat zeigt sich ebenfalls nach Ermittlung der Sub-Werte beider Hinterpfoten. Auf der rechten Seite ergaben sich keine Unterschiede im Sub-Wert in den einzelnen Gruppen. Der Wert für die linke Seite lag im Allgemeinen zwischen 0 bis 3. Drei Tiere in der SDF-1 α +AST Gruppe zeigten

Werte über 3. Der Unterschied zwischen der rechten und linken Seite erklärt sich durch eine leicht asymmetrische, nach links versetzte Läsion (siehe Abb. 2.1). Im Allgemeinen zeigt sich ein leichter Trend zu einer verbesserten Lokomotion in der Gruppe die eine kombinierte Behandlung von AST und SDF-1 α erhielten. Dies könnte unter anderem durch das verstärkte Einwachsen der kortikospinalen Fasern in, bzw. durch das Überwinden der Narbe verursacht werden. Auch ein gesteigertes kollaterales Aussprossen serotonerger, catecholaminerger, sowie RST Fasern, die durch eine indirekte Verbindung über die PSN die Läsionsstelle überbrücken, kann an der Verbesserung der Lokomotion beteiligt sein.

An einem so frühen Zeitpunkt nach Verletzung ist jedoch keine große Verbesserung der Lokomotion zu erwarten gewesen. Klapka et al. (2005) konnte für das in dieser Studie verwendete Model zeigen, dass eine erste funktionelle Erholung nach AST-Behandlung frühestens nach ca. 4 Wochen erfolgt. Eine signifikante Verbesserung der Lokomotion konnte jedoch erst nach ca. 11 Wochen beobachtet werden. Für eine genauere Aussage der SDF- bzw. kombinatorischen Behandlung auf die Lokomotion müssten Tiere in weiteren Studien über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt um die Wirkung verschiedener Behandlungsansätze auf die Regeneration unterschiedlicher Fasertrakte nach traumatischer Rückenmarksverletzung zu untersuchen. Dabei wurden die wichtigsten absteigenden und aufsteigenden Axontrakte, wie der CST, RST, RaST, CoST und CGRP-positive Axone eingehender betrachtet. Die hier angewandten Behandlungsmethoden wurden entwickelt, um (1) die wachstumshemmenden Faktoren zu verringern, (2) die wachstumsfördernden Faktoren zu erhöhen, oder (3) eine Kombination aus beiden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung zur Unterdrückung der Narbenbildung (AST) eine starke Zunahme der Anzahl regenerierter Fasern in der fibrösen Narbe bewirkte. Diese Zunahme konnte bei allen untersuchten Faserpopulationen (CGRP, 5-HT, TH, RST, CST) beobachtet werden. Des Weiteren konnte auch ein langfristiges Einwachsen in die sekundäre Narbe 12 Wochen nach Verletzung beobachtet werden. Die gewonnenen Daten offenbaren, dass (1) die sekundär gebildete Narbe wesentlich permissiver für regenerierende Axone ist, als die ursprüngliche, primäre Narbe, (2) dass AST sich auf alle Systeme gleichermaßen auswirkt und (3) dass die AST-Behandlung nicht nur einen vorübergehenden Effekt auf die Regeneration von Axonen ausübt, sondern auch bzw. insbesondere eine lang anhaltende Wirkung auf die Permeabilität der sekundären fibrösen Narbe besitzt.

In einem weiteren Behandlungsansatz wurde das Chemokin SDF-1 α über 7 Tage nach Verletzung appliziert, was zu einer signifikanten Zunahme aussprossender serotonerger, catecholaminerger, RST- und CST-Axone rostral der Läsionsstelle führte. Das AST bewirkte nur bei der catecholaminergen und der RST Population eine Erhöhung aussprossender Axone. Eine Kombination aus beiden Substanzen konnte das Aussprossen jedoch nicht weiter steigern.

Allerdings führte die kombinatorische Verabreichung beider Substanzen zu einer signifikant erhöhten Anzahl an CST Fasern im Narbenareal. Der RST und die catecholaminergen Fasern hingegen zeigten keine Zunahme der Anzahl an Fragmenten in der Narbe. Im Fall der serotonergen Faserpopulation wurde sogar eine Abnahme an Faserfragmenten im Narbenareal beobachtet.

Es zeigte sich, dass, abhängig von einer SDF-1 Rezeptorexpression und AST-Mitwirkung, (1) entweder das Wachstum über längere Distanzen, oder (2) das

regional beschränkte Auswachsen mit einer gleichzeitigen Reduktion des Längenwachstums stimuliert wurde.

Die gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass eine Kombination beider Therapieansätze zu einer funktionellen Erholung führen kann. Durch die Kombination von Narbenunterdrückung und Chemokinverabreichung kommt es einerseits zur Zunahme einer direkten Regeneration, mittels Axone die durch das Narbenareal wachsen, andererseits aber auch zu einem rostral vermehrtes Aussprossen, was vermehrt zu einer indirekte intraspinalen Verbindungen über die propriospinalen Neurone (PSN) führen kann. Die Ergebnisse geben Hinweise auf beide Arten der Regeneration. Es konnte sowohl ein vermehrtes Aussprossen rostral der Läsion, als auch ein teilweise erhöhtes Längenwachstum beobachtet werden. In wieweit die Axone funktionelle Verbindungen eingehen bleibt noch unklar, allerdings deuten die Verhaltensdaten (BBB-Test) auf eine verbesserte Lokomotion bereits nach 5 Wochen hin. Dies kann jedoch erst durch weitere Langzeitverhaltensuntersuchungen geklärt werden.

6. Literatur

Albright AV, Shieh JT, Itoh T, Lee B, Pleasure D, O'Connor MJ, Doms RW, Gonzalez-Scarano F (1999) Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates. *J Virol* 73: 205-213.

Alstermark B, Isa T, Kummel H, Tantisira B (1990) Projection from excitatory C3-C4 propriospinal neurones to lamina VII and VIII neurones in the C6-Th1 segments of the cat. *Neurosci Res* 8: 131-137.

Alstermark B, Kummel H, Pinter MJ, Tantisira B (1987) Branching and termination of C3-C4 propriospinal neurones in the cervical spinal cord of the cat. *Neurosci Lett* 74: 291-296.

Alstermark B, Lundberg A, Pinter M, Sasaki S (1987) Long C3-C5 propriospinal neurones in the cat. *Brain Res* 404: 382-388.

Alstermark B, Lundberg A, Pinter M, Sasaki S (1987) Subpopulations and functions of long C3-C5 propriospinal neurones. *Brain Res* 404: 395-400.

Antal M, Sholomenko GN, Moschovakis AK, Storm-Mathisen J, Heizmann CW, Hunziker W (1992) The termination pattern and postsynaptic targets of rubrospinal fibers in the rat spinal cord: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 325: 22-37.

Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Kimura K, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S (2003) Control of axon elongation via an SDF-1 α /Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J Cell Biol* 161: 381-391.

Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280: 35760-35766.

Banisadr G, Fontanges P, Haour F, Kitabgi P, Rostene W, Melik PS (2002) Neuroanatomical distribution of CXCR4 in adult rat brain and its localization in cholinergic and dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 16: 1661-1671.

Banisadr G, Skrzydelski D, Kitabgi P, Rostene W, Parsadaniantz SM (2003) Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons. *Eur J Neurosci* 18: 1593-1606.

Bareyre FM, Haudenschield B, Schwab ME (2002) Long-lasting sprouting and gene expression changes induced by the monoclonal antibody IN-1 in the adult spinal cord. *J Neurosci* 22: 7097-7110.

Bareyre FM, Kerschensteiner M, Misgeld T, Sanes JR (2005) Transgenic labeling of the corticospinal tract for monitoring axonal responses to spinal cord injury. *Nat Med* 11: 1355-1360.

Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME (2004) The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci* 7: 269-277.

Barrette B, Vallieres N, Dube M, Lacroix S (2007) Expression profile of receptors for myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the intact and injured mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 34: 519-538.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12: 1-21.

Benson MD, Romero MI, Lush ME, Lu QR, Henkemeyer M, Parada LF (2005) Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10694-10699.

Bernstein DR, Stelzner DJ (1983) Plasticity of the corticospinal tract following midthoracic spinal injury in the postnatal rat. *J Comp Neurol* 221: 382-400.
Reprint: Not in File

Brambilla R, Hurtado A, Persaud T, Esham K, Pearse DD, Oudega M, Bethea JR (2009) Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B leads to increased axonal sparing and sprouting following spinal cord injury. *J Neurochem* 110: 765-778.

Brook GA, Plate D, Franzen R, Martin D, Moonen G, Schoenen J, Schmitt AB, Noth J, Nacimiento W (1998) Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat. *J Neurosci Res* 53: 51-65.

Brosamle C, Schwab ME (1997) Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract. *J Comp Neurol* 386: 293-303.

Buchan AM, Polak JM, Capella C, Solcia E, Pearse AG (1978) Electronimmunocytochemical evidence for the K cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man. *Histochemistry* 56: 37-44.

Buhren BA, Gasis M, Thorens B, Muller HW, Bosse F (2009) Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) and its receptor (GIPR): cellular localization, lesion-affected expression, and impaired regenerative axonal growth. *J Neurosci Res* 87:

1858-1870.

Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* 22: 89-101.

Camand E, Morel MP, Faissner A, Sotelo C, Dusart I (2004) Long-term changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 20: 1161-1176.

Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH (2005) Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 16-42.

Chalasani SH, Sabelko KA, Sunshine MJ, Littman DR, Raper JA (2003) A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *J Neurosci* 23: 1360-1371.

Chiba Y, Kuroda S, Shichinohe H, Hokari M, Osanai T, Maruichi K, Yano S, Hida K, Iwasaki Y (2009) Synergistic effects of bone marrow stromal cells and a Rho kinase (ROCK) inhibitor, Fasudil on axon regeneration in rat spinal cord injury. *Neuropathology*.

Conrad S, Schluesener HJ, Adibzahdeh M, Schwab JM (2005) Spinal cord injury induction of lesional expression of profibrotic and angiogenic connective tissue growth factor confined to reactive astrocytes, invading fibroblasts and endothelial cells. *J Neurosurg Spine* 2: 319-326.

Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, Ao Y, Qi J, Edgerton VR, Sofroniew MV (2008) Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med* 14: 69-74.

de CR, Jr., Tajrishi R, Claros J, Stallcup WB (2005) Differential responses of spinal axons to transection: influence of the NG2 proteoglycan. *Exp Neurol* 192: 299-309.

Deumens R, Koopmans GC, Joosten EA (2005) Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Prog Neurobiol* 77: 57-89.

Deumens R, Koopmans GC, Joosten EAJ (2005) Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Progress in Neurobiology* 77: 57-89.

Dolbeare D, Houle JD (2003) Restriction of axonal retraction and promotion of axonal regeneration by chronically injured neurons after intraspinal treatment with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *J Neurotrauma* 20: 1251-1261.

Dorf ME, Berman MA, Tanabe S, Heesen M, Luo Y (2000) Astrocytes express functional chemokine receptors. *J Neuroimmunol* 111: 109-121.

Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR (1999) Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 13: 1774-1786.

Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49: 377-391.

Fernandez EJ, Lolis E (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:469-99.: 469-499.

Filbin MT (2003) Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 4: 703-713.

Fouad K, Pedersen V, Schwab ME, Brosamle C (2001) Cervical sprouting of corticospinal fibers after thoracic spinal cord injury accompanies shifts in evoked motor responses. *Curr Biol* 11: 1766-1770.

Gerin C, Becquet D, Privat A (1995) Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity. I. A study with microdialysis probes implanted in the ventral funiculus of the spinal cord. *Brain Res* 704: 191-201.

Gleichmann M, Gillen C, Czardybon M, Bosse F, Greiner-Petter R, Auer J, Muller HW (2000) Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci* 12: 1857-1866.

Goldberg JL, Vargas ME, Wang JT, Mandemakers W, Oster SF, Sretavan DW, Barres BA (2004) An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells. *J Neurosci* 24: 4989-4999.

Goridis C, Rohrer H (2002) Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 3: 531-541.

Goridis C, Rohrer H (2002) Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 3: 531-541.

Grillner S (2002) The spinal locomotor CPG: a target after spinal cord injury. *Prog Brain Res* 137:97-108.: 97-108.

Grimpe B, Silver J (2002) The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog Brain Res* 137:333-49.: 333-349.

Guyon A, Nahon JL (2007) Multiple actions of the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha on neuronal activity. *J Mol Endocrinol* 38: 365-376.

Habgood MD, Bye N, Dziegielewska KM, Ek CJ, Lane MA, Potter A, Morganti-Kossmann C, Saunders NR (2007) Changes in blood-brain barrier permeability to large and small molecules following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci* 25: 231-238.

Hains BC, Black JA, Waxman SG (2003) Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury. *J Comp Neurol* 462: 328-341.

Hains BC, Everhart AE, Fullwood SD, Hulsebosch CE (2002) Changes in serotonin, serotonin transporter expression and serotonin denervation supersensitivity: Involvement in chronic central pain after spinal hemisection in the rat. *Experimental Neurology* 175: 347-362.

Heinisch S, Kirby LG (2009) SDF-1alpha/CXCL12 enhances GABA and glutamate synaptic activity at serotonin neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*.

Hill CE, Beattie MS, Bresnahan JC (2001) Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol* 171: 153-169.

Holstege JC, Kuypers HG (1987) Brainstem projections to spinal motoneurons: an update. *Neuroscience* 23: 809-821.

Houle JD, Jin Y (2001) Chronically injured supraspinal neurons exhibit only modest axonal dieback in response to a cervical hemisection lesion. *Experimental Neurology* 169: 208-217.

Hu F, Strittmatter SM (2008) The N-terminal domain of Nogo-A inhibits cell adhesion and axonal outgrowth by an integrin-specific mechanism. *J Neurosci* 28: 1262-1269.

Hynes M, Rosenthal A (1999) Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr Opin Neurobiol* 9: 26-36.

Iarikov DE, Kim BG, Dai HN, McAtee M, Kuhn PL, Bregman BS (2007) Delayed transplantation with exogenous neurotrophin administration enhances plasticity of corticofugal projections after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 24: 690-702.

Inman DM, Steward O (2003) Ascending sensory, but not other long-tract axons, regenerate into the connective tissue matrix that forms at the site of a spinal cord injury in mice. *Journal of Comparative Neurology* 462: 431-449.

Jankowska E, Lundberg A, Roberts WJ, Stuart D (1974) A long propriospinal system with direct effect on motoneurons and on interneurons in the cat lumbosacral cord. *Exp Brain Res* 21: 169-194.

Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Dobrowsky A, Ratajczak MZ, Cabuhat ML (2000) Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. *Exp Hematol* 28: 1274-1285.

Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH (2003) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol* 182: 399-411.

Joosten EA, Bar DP (1999) Axon guidance of outgrowing corticospinal fibres in the rat. *J Anat* 194: 15-32.

Klapka N, Hermanns S, Straten G, Masannek C, Duis S, Hamers FPT, Muller D, Zuschratter W, Muller HW (2005) Suppression of fibrous scarring in spinal cord injury of rat promotes long-distance regeneration of corticospinal tract axons, rescue of primary motoneurons in somatosensory cortex and significant functional recovery. *European Journal of Neuroscience* 22: 3047-3058.

Klapka N, Muller HW (2006) Collagen matrix in spinal cord. *Journal of Neurotrauma* 23: 422-435.

Lavi E, Strizki JM, Ulrich AM, Zhang W, Fu L, Wang Q, O'Connor M, Hoxie JA, Gonzalez-Scarano F (1997) CXCR-4 (Fusin), a co-receptor for the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1), is expressed in the human brain in a variety of cell types, including microglia and neurons. *Am J Pathol* 151: 1035-1042.

Lee YB, Nagai A, Kim SU (2002) Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res* 69: 94-103.

Li S, Liu BP, Budel S, Li M, Ji B, Walus L, Li W, Jirik A, Rabacchi S, Choi E, Worley D, Sah DW, Pepinsky B, Lee D, Relton J, Strittmatter SM (2004) Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury. *J Neurosci* 24: 10511-10520.

Li Y, Raisman G (1995) Sprouts from cut corticospinal axons persist in the presence of astrocytic scarring in long-term lesions of the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 134: 102-111.

Li Y, Raisman G (1995) Sprouts from cut corticospinal axons persist in the presence of astrocytic scarring in long-term lesions of the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 134: 102-111.

Liebscher T, Schnell L, Schnell D, Scholl J, Schneider R, Gullo M, Fouad K, Mir A, Rausch M, Kindler D, Hamers FP, Schwab ME (2005) Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Ann Neurol* 58: 706-719.

Limatola C, Giovannelli A, Maggi L, Ragozzino D, Castellani L, Ciotti MT, Vacca F, Mercanti D, Santoni A, Eusebi F (2000) SDF-1alpha-mediated modulation of synaptic transmission in rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 12: 2497-2504.

Lin W, Bailey SL, Ho H, Harding HP, Ron D, Miller SD, Popko B (2007) The integrated stress response prevents demyelination by protecting oligodendrocytes against immune-mediated damage. *J Clin Invest* 117: 448-456.

Mamounas LA, Altar CA, Blue ME, Kaplan DR, Tessarollo L, Lyons WE (2000) BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. *J Neurosci* 20: 771-782.

Mason P (1999) Central mechanisms of pain modulation. *Curr Opin Neurobiol* 9: 436-441.

Mauter AE, Weinzierl MR, Donovan F, Noble LJ (2000) Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Phys Ther* 80: 673-687.

Metz GA, Dietz V, Schwab ME, van de MH (1998) The effects of unilateral pyramidal tract section on hindlimb motor performance in the rat. *Behav Brain Res* 96: 37-46.

Miller S, van Berkum R, van der BJ, van der Meche FG (1973) Interlimb co-ordination in stepping in the cat. *J Physiol* 230: 30P-31P.

Miranda JD, White LA, Marcillo AE, Willson CA, Jagid J, Whittemore SR (1999) Induction of eph B3 after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 156: 218-222.

Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW (2002) Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res* 137:313-32.: 313-332.

Neumann S, Woolf CJ (1999) Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron* 23: 83-91.

Nyberg J, Anderson MF, Meister B, Alborn AM, Strom AK, Brederlau A, Illerskog AC, Nilsson O, Kieffer TJ, Hietala MA, Ricksten A, Eriksson PS (2005) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *J Neurosci* 25: 1816-1825.

Ondarza AB, Ye Z, Hulsebosch CE (2003) Direct evidence of primary afferent sprouting in distant segments following spinal cord injury in the rat: colocalization of GAP-43 and CGRP. *Exp Neurol* 184: 373-380.

Ono H, Fukuda H (1995) Pharmacology of descending noradrenergic systems in relation to motor function. *Pharmacol Ther* 68: 105-112.

Opatz J, Kury P, Schiwy N, Jarve A, Estrada V, Brazda N, Bosse F, Muller HW (2008) SDF-1 stimulates neurite growth on inhibitory CNS myelin. *Mol Cell Neurosci.*

Oudega M, Vargas CG, Weber AB, Kleitman N, Bunge MB (1999) Long-term effects of methylprednisolone following transection of adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci*

11: 2453-2464.

Pasterkamp RJ, Anderson PN, Verhaagen J (2001) Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur J Neurosci* 13: 457-471.

Pasterkamp RJ, Giger RJ, Ruitenbergh MJ, Holtmaat AJ, De Wit J, De Winter F, Verhaagen J (1999) Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol Cell Neurosci* 13: 143-166.

Pearson KG (1993) Common principles of motor control in vertebrates and invertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 265-297.

Pujol F, Kitabgi P, Boudin H (2005) The chemokine SDF-1 differentially regulates axonal elongation and branching in hippocampal neurons. *J Cell Sci* 118: 1071-1080.

Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, Filbin MT (2002) Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34: 895-903.

Qu S, Ondo WG, Zhang X, Xie WJ, Pan TH, Le WD (2006) Projections of diencephalic dopamine neurons into the spinal cord in mice. *Experimental Brain Research* 168: 152-156.

Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB (1998) Long distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *Experimental Neurology* 153: 384-385.

Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory

ensheathing glia. *Neuron* 25: 425-435.

Richardson PM, Issa VM, Aguayo AJ (1984) Regeneration of long spinal axons in the rat. *J Neurocytol* 13: 165-182.

Rostene W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM (2007) Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat Rev Neurosci* 8: 895-903.

Rostene W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM (2007) Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat Rev Neurosci* 8: 895-903.

Schwab JM, Beschoner R, Nguyen TD, Meyermann R, Schluesener HJ (2001) Differential cellular accumulation of connective tissue growth factor defines a subset of reactive astrocytes, invading fibroblasts, and endothelial cells following central nervous system injury in rats and humans. *J Neurotrauma* 18: 377-388.

Seif GI, Nomura H, Tator CH (2007) Retrograde axonal degeneration "dieback" in the corticospinal tract after transection injury of the rat spinal cord: a confocal microscopy study. *J Neurotrauma* 24: 1513-1528.

Shearer MC, Fawcett JW (2001) The astrocyte/meningeal cell interface--a barrier to successful nerve regeneration? *Cell Tissue Res* 305: 267-273.

Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5: 146-156.

Sivasankaran R, Pei J, Wang KC, Zhang YP, Shields CB, Xu XM, He Z (2004) PKC mediates inhibitory effects of myelin and chondroitin sulfate proteoglycans on axonal regeneration. *Nat Neurosci* 7: 261-268.

Skagerberg G, Bjorklund A (1985) Topographic principles in the spinal projections of serotonergic and non-serotonergic brainstem neurons in the rat. *Neuroscience* 15: 445-480.

Sluka KA, Westlund KN (1992) Spinal projections of the locus coeruleus and the nucleus subcoeruleus in the Harlan and the Sasco Sprague-Dawley rat. *Brain Res* 579: 67-73.

Steward O, Zheng B, Tessier-Lavigne M (2003) False resurrections: distinguishing regenerated from spared axons in the injured central nervous system. *J Comp Neurol* 459: 1-8.

Stichel CC, Hermanns S, Luhmann HJ, Lausberg F, Niermann H, D'Urso D, Servos G, Hartwig HG, Muller HW (1999) Inhibition of collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons. *Eur J Neurosci* 11: 632-646.

Streit WJ, Conde JR, Harrison JK (2001) Chemokines and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22: 909-913.

Stumm RK, Rummel J, Junker V, Culmsee C, Pfeiffer M, Kriegstein J, Holtt V, Schulz S (2002) A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J Neurosci* 22: 5865-5878.

Stumm RK, Zhou C, Ara T, Lazarini F, Dubois-Dalcq M, Nagasawa T, Holtt V, Schulz S (2003) CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci* 23: 5123-5130.

Tang X, Davies JE, Davies SJ (2003) Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J Neurosci Res* 71: 427-444.

Tham TN, Lazarini F, Franceschini IA, Lachapelle F, Amara A, Dubois-Dalcq M (2001) Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 13: 845-856.

Reprint: Not in File

Tork, I., 1985. Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System: Hindbrain and Spinal Cord*. Australia Academic, Sydney, pp. 43–78.

Tran PB, Miller RJ (2005) HIV-1, chemokines and neurogenesis. *Neurotox Res* 8: 149-158.

Trepel M (2006) *Neuroanatomie. Struktur und Funktion*

Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI (1993) Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133: 2861-2870.

Vavrek R, Girgis J, Tetzlaff W, Hiebert GW, Fouad K (2006) BDNF promotes connections of corticospinal neurons onto spared descending interneurons in spinal cord injured rats. *Brain* 129: 1534-1545.

von Euler M, Janson AM, Larsen JO, Seiger A, Forno L, Bunge MB, Sundstrom E (2002) Spontaneous axonal regeneration in rodent spinal cord after ischemic injury. *J*

Neuropathol Exp Neurol 61: 64-75.

von Meyenburg J, Brosamle C, Metz GA, Schwab ME (1998) Regeneration and sprouting of chronically injured corticospinal tract fibers in adult rats promoted by NT-3 and the mAb IN-1, which neutralizes myelin-associated neurite growth inhibitors. *Exp Neurol* 154: 583-594.

Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G (2008) *The Spinal Cord: A Christopher and Diana Reeve Foundation Text and Atlas*

Wang XH, Iannuzzelli PG, Murphy EH (1993) Calcitonin gene-related peptide increases following axotomy of trochlear motoneurons. *Exp Neurol* 123: 157-166.

Weidner N, Ner A, Salimi N, Tuszynski MH (2001) Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3513-3518.

Weidner N, Tuszynski MH (2002) Spontaneous plasticity in the injured spinal cord-implications for repair strategies. *Mol Psychiatry* 7: 9-11.

Wheeler MB, Gelling RW, McIntosh CH, Georgiou J, Brown JC, Pederson RA (1995) Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signaling properties. *Endocrinology* 136: 4629-4639.

Whetstone WD, Hsu JY, Eisenberg M, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ (2003) Blood-spinal cord barrier after spinal cord injury: relation to revascularization and wound healing. *J Neurosci Res* 74: 227-239.

Whishaw IQ, Gorny B, Sarna J (1998) Paw and limb use in skilled and spontaneous reaching after pyramidal tract, red nucleus and combined lesions in the rat: behavioral and anatomical dissociations. *Behav Brain Res* 93: 167-183.

Xiang Y, Li Y, Zhang Z, Cui K, Wang S, Yuan XB, Wu CP, Poo MM, Duan S (2002) Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nat Neurosci* 5: 843-848.

Xiao M, Klueber KM, Lu C, Guo Z, Marshall CT, Wang H, Roisen FJ (2005) Human adult olfactory neural progenitors rescue axotomized rodent rubrospinal neurons and promote functional recovery. *Exp Neurol* 194: 12-30.

Yoshimura M, Furue H (2006) Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J Pharmacol Sci* 101: 107-117.

Zheng LF, Wang R, Xu YZ, Yi XN, Zhang JW, Zeng ZC (2008) Calcitonin gene-related peptide dynamics in rat dorsal root ganglia and spinal cord following different sciatic nerve injuries. *Brain Res* 1187:20-32. Epub; %2007 Oct 26.: 20-32.

Zilles K, Rehkämper G (1998) *Funktionelle Neuroanatomie. Lehrbuch und Atlas*

Zlatopolskiy A, Laurence J (2001) 'Reverse gear' cellular movement mediated by chemokines. *Immunol Cell Biol* 79: 340-344.

Danksagung

Besonders danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans Werner Müller für die Betreuung meiner Promotionsarbeit, für seine fachliche Unterstützung, den zahlreichen Diskussionen und Anregungen, sowie der Durchsicht meiner Arbeit.

Prof. Dr. Christine Rose danke ich herzlich für die Unterstützung und Durchsicht meiner Promotionsarbeit.

Des Weiteren danke ich Dr. Nicole Brazda für die optimale Einführung in die Thematik. Sie brachte mir sehr viel Geduld entgegen und sorgte mit wertvollen Ratschlägen und fundierten Fachwissen für das Gelingen meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Ein großer Dank geht auch an meine Kolleginnen, insbesondere Veronica Estrada und Christine Schmitz, denn die Zusammenarbeit mit ihnen hat mir sehr viel Freude bereitet. Sie hielten nicht nur meine schlechte Laune aus, sondern konnten mir mit ihrem Fachwissen, ihrer konstruktiven Kritik und ihren vielen Ideen immer wieder den nötigen Schwung geben.

Schließlich möchte ich mich noch herzlich bei meinem Vater, Gerd Schiwy, bedanken, der immer an mich geglaubt und mich bei jeder Entscheidung unterstützt hat.

Meinem Mann, Filip Zalewski, danke ich für seine Geduld und Unterstützung in den schwierigen Phasen meiner Arbeit. Er hat mich stets bestärkt, wenn ich an mir gezweifelt habe.