

Axonale Regeneration und funktionelle Erholung nach Läsion im Rückenmark der adulten Ratte

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Nicole Klapka

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissen-
schaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hans Werner Müller

Korreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	7
1. Einleitung.....	9
1.1. Pathophysiologische Prozesse nach einer Verletzung des Nervensystems.....	9
1.2. Mögliche Ursachen des Fehlens spontaner Regeneration verletzter Neurone des Zentralnervensystems.....	10
1.2.1. Die Wundheilungsnarbe	11
1.2.2. Die fibröse Narbenkomponente als Regenerationsbarriere....	13
1.3. Experimentelle Strategien zur Unterdrückung der Kollagen IV- haltigen fibrösen Narbe.....	14
1.3.1. Die Biosynthese von Kollagen.....	14
1.3.2. Die Behandlung zur transienten Unterdrückung der Bildung der Kollagen IV-haltigen Narben mittels eines Eisenchelators	16
1.3.3. Strategie zur Hemmung Kollagen IV produzierender Zellen.....	17
1.4. Der Aufbau des Rückenmarks der Ratte.....	17
1.5. Mechanismen der Motorik und der supraspinalen motorischen Steuerung in der Ratte.....	19
1.5.1. Hypothesen über die funktionelle Bedeutung des Kortikospinaltraktes.....	20
1.5.2. Funktionelle Tests zur Untersuchung von Lokomotions- störungen im Tiermodell der Ratte.....	23
1.6. Fragestellung und Zielsetzung.....	25
2. Material und Methoden.....	26
2.1. Versuchstiere.....	26
2.2. Puffer und Antikörper, Elvaxpräparation.....	26
2.2.1. Puffer und Lösungen.....	26

2.2.2. Antikörper.....	27
2.2.3. Elvaxpräparation.....	28
2.3. Operationsprotokolle.....	29
2.3.1. Drahtmesserläsion.....	29
2.3.2. Markierung der primären Motoneurone, die in den Kortikospinaltrakt projizieren.....	31
2.3.3. Perfusion.....	32
2.4. Gewebeaufarbeitung.....	32
2.4.1. Rückenmarkspräparation.....	32
2.4.2. Paraffinschnitte.....	32
2.4.3. Gefriermikrotomschnitte.....	33
2.5. Immunhistochemische Färbeprotokolle.....	34
2.5.1. Paraffinschnitte.....	34
2.5.2. Gefriermikrotomschnitte.....	35
2.6. Histologische Auswertung und Dokumentation.....	35
2.7. Funktionelle Tests.....	36
2.7.1. Ausschlußkriterien.....	36
2.7.2. Autotomie.....	38
2.7.3. Offenfeldbeobachtung der Lokomotion.....	38
2.7.4. Lauf über ein horizontales Gitter.....	40
2.7.5. CatWalk Lokomotions Test.....	42
2.7.6. Statistische Auswertungen.....	43
3. Ergebnisse.....	45
3.1. Immunhistochemische Charakterisierung der läsionsinduzierten Narbe im Rückenmark der adulten Ratte.....	45
3.1.1. Untersuchungen in lädierten Kontrolltieren.....	45
3.1.1.1. Immunhistochemische Färbung der Kollagen IV- haltigen fibrösen Narbe in Kontrolltieren.....	47
3.1.1.2. Immunhistochemische Färbungen der GFAP- reichen Glianarbe.....	48

3.1.1.3. Immunhistochemische Färbungen des Rückenmarksgewebes lädierter Kontrolltiere mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Neurofilament.....	50
3.1.2. Effekt der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf das Läsionszentrum und umliegendes Rückenmarksgewebe.....	52
3.1.2.1. Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Kollagen IV-haltige fibröse Narbe und die Glianarbe.....	52
3.1.2.2. Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Verteilung von Chondroitin Sulfat Proteoglykanen.....	54
3.1.2.3. Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf Neurofilamentfärbungen mit dem <i>panaxonal</i> Marker PAM im Läsionszentrum.....	56
3.1.3. Zusammenfassung.....	57
3.2. Effekt der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf Axone des Kortikospinaltraktes	59
3.2.1. Faserverlauf markierter Axone des Kortikospinaltraktes in Kontrolltieren 30 Tage und 4 Monate nach Läsion.....	59
3.2.2. Verlauf der Kortikospinaltraktfasern in lädierten Tieren nach Behandlung zur Narbenunterdrückung.....	62
3.3. Effekt der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf das lokomotorische Verhalten der Ratten.....	65
3.3.1. Offenfeldbeobachtung der Versuchstiere und Bewertung der freien Lokomotion nach der BBB Klassifizierung.....	66
3.3.2. Untersuchungen des Laufes der Versuchstiere über eine horizontale Leiter.....	69

3.3.2.1. Funktionelle Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Fehleranzahl beim Lauf über ein horizontales Gitter.....	69
3.3.2.2. Untersuchung der Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Rückzugszeiten der Hinterpfoten bei einem Zielfehler auf einem horizontalen Gitter.....	72
3.3.3. Untersuchungen der Laufeigenschaften der Versuchstiere im CatWalk Test.....	73
3.3.3.1. Auswirkungen der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf den Anteil irregulärer Laufmuster der Versuchstiere nach Läsion.....	73
3.3.3.2. Auswirkungen der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf den hinteren Fußabstand der Versuchstiere nach Läsion.....	76
3.3.4. Ergebnisse der histologischen Verifizierung der Läsionslage und –größe sowie des Anteils beobachteter Regeneration der Kortikospinaltrakt Fasern in den Versuchstieren.....	77
4. Diskussion.....	78
4.1. Charakterisierung der Wundheilungsnarbe in Kontrolltieren.....	78
4.1.1. Die Wundheilungsnarbe im verletzten Rückenmark der Ratte besteht aus zwei Arealen: einer fibrösen Narbe und einer Glianarbe.....	78
4.1.2. Putativ inhibitorische Moleküle wie Proteoglykane akkumulieren in der fibrösen Narbe im Rückenmark der Ratte	81
4.1.3. Im Läsionszentrum sind auch nach 12 Wochen Überlebenszeit Reststrukturen vorhanden, die phosphorylierte Neurofilamentproteine aufweisen.....	82

4.2. Auswirkungen der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf Moleküle der fibrösen Narbe und der Glianarbe.....	83
4.2.1. Mögliche Wirkungsmechanismen der Behandlung zur Narbenunterdrückung.....	83
4.2.2. Die Behandlung zur Narbenunterdrückung führt zur Verminderung der Kollagen IV-Immunreaktivität aber nicht der GFAP-Immunreaktivität.....	85
4.2.3. Die Behandlung zur Narbenunterdrückung führt zu einer temporär schwächeren CS-56-Immunreaktivität in behandelten Tieren als in Kontrolltieren.....	85
4.3. Die Behandlung zur Narbenunterdrückung bewirkt die Regeneration von Fasern des durchtrennten dorsalen Kortikospinaltraktes.....	86
4.3.1. Die Rolle der Glianarbe bei axonalen Regenerationsprozessen.....	87
4.3.2. Axone des Kortikospinaltraktes regenerieren nach Behandlung in das distale Rückenmark und bilden Verzweigungen in der grauen Substanz aus.....	87
4.3.3. Potentieller Mechanismus der axonalen Regeneration nach Behandlung zur Narbenunterdrückung.....	88
4.4. Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Lokomotion der Ratte.....	89
4.4.1. Verbesserung der allgemeinen Lokomotion im Offenfeld	89
4.4.2. Funktionelle Verbesserung der Lokomotion behandelte Tiere beim Lauf auf der horizontalen Leiter.....	91
4.4.3. Auswirkungen der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Laufeigenschaften der Ratte im CatWalk Test.....	94
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	96
6. Literatur.....	98

Abkürzungen

&	und
8-Br-cAMP	8-Brom- cyclisches Adenosin Monophosphat
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin Biotin Komplex
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse
BBB	Lokomotionsskala nach Basso, Beattie und Bresnahan
BDA	Biotinyliertes Dextranamin
BM	Basalmembran
BPY	2,2'-Dipyridyl
BPY-DCA	5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl
bzw.	beziehungsweise
cAMP	Cyklisches Adenosin Monophosphat
Coll IV	Kollagen Typ IV
CPG	Central Pattern Generator
CSPG	Chondroitin Sulfat Proteoglykane
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAB	Diaminobenzidin
Elvax	Ethylen-Vinyl-Acetat Kopolymer
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
FA	Firma
GFAP	Gliales fibrilläres saures Protein
Gs	Graue Substanz
gt	Ziege
hs	Pferd
IgG	Immunglobulin G
IR	Immunreaktivität
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
ms	Maus
N	Anzahl
OP	Operation
p	Statistische Wahrscheinlichkeit
PAM	Panaxonal Marker
PNS	Peripheres Nervensystem
rb	Kaninchen
RB	Retraction Bulbs
RI	Regularitätsindex

ROP	Projektion vom Nucleus ruber zum Olivenkern
s.	siehe
Th	Thorakal
u.a.	unter anderem
W	Wochen
ws	Weiße Substanz
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Pathophysiologische Prozesse nach einer Verletzung des Nervensystems

Eine traumatische Läsion des Nervensystems löst eine Vielzahl pathophysiologischer Prozesse im Nervengewebe aus. Eine Schädigung der Axone bewirkt eine sofortige Unterbrechung der elektrophysiologischen Signaltransduktion der betroffenen Bahnen. Die Beschädigung von Neuronen, Gliazellen und Blutgefäßen zieht eine Folge von Entzündungsprozessen nach sich. Erhöhte Glutamat- und Aspartatkonzentrationen im Extrazellulärraum, Immigration und Proliferation von Lymphozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen in die Läsionsstelle und die Freisetzung von Zytokinen sind unmittelbare Folgen des Insults. All diese pathophysiologischen Prozesse bewirken einen hohen Grad an Nekrose im betroffenen Gewebe (zur Übersicht siehe Buss & Schwab, 2003; Stichel & Müller, 1998a; Beattie & Bresnahan, 2000). Apoptose von Neuronen und Gliazellen kann in Ratten über einen Zeitraum von mehreren Wochen nach Läsion beobachtet werden (Beattie et al., 1998; Liu et al., 1997).

Der distale Axonstumpf, der vom Soma abgetrennt wird, wird im Zuge der sogenannten Waller'schen Degeneration (nach A. Waller, 1850) mitsamt seiner ihn umgebenden Myelinschicht sowohl im zentralen (ZNS) als auch im peripheren Nervensystem (PNS) abgebaut. Dabei wird das Axonplasma und das Axolemma über Kalzium Influx und die Aktivierung axonaler Proteasen abgebaut. Im ZNS wird die Apoptose von Oligodendrozyten beobachtet (Shuman et al., 1997), die die Myelinschicht zentralnervöser Axone bilden. Im PNS hingegen dedifferenzieren die myelinbildenden Schwann-Zellen und bilden Büngnersche Bänder, die als Leitschienen für neu auswachsende Axone dienen (siehe auch Stoll et al., 2002; Lee & Wolfe, 2000).

Im PNS und ZNS kommt es zur Phagozytose degenerierter Axonabschnitte und Myelinreste durch Makrophagen. Die Einwanderung von Makrophagen aus dem

Blut ist allerdings im PNS erheblich schneller als im ZNS. Im ZNS werden hauptsächlich residente Mikrogliazellen aktiviert, die zu Makrophagen differenzieren. Die Phagozytose von Myelindebris erstreckt sich hingegen im ZNS über einige Monate (zur Übersicht siehe Stoll et al., 2002).

Nach einem Insult des PNS können Neurone des PNS in peripherem Gewebe regenerieren (Lee & Wolfe, 2000). Ramon Y Cajal postulierte 1928, daß Neurone des ZNS nicht in zentralnervöser Umgebung regenerieren können. Später konnte von Aguayo festgestellt werden, daß ZNS Fasern in PNS Gewebe einwachsen (Aguayo et al., 1991; Benfey & Aguayo, 1982). In reversen Implantation-Experimenten stoppten allerdings PNS Axone in ZNS Gewebe (Stoll et al., 2002). ZNS Neurone scheinen also eine inherente Kapazität zur Regeneration nach Insult zu haben. Da diese in PNS Gewebe auswachsen können, liegt die Vermutung nahe, daß es nicht allein eine Eigenschaft der ZNS Neurone ist, die diese an der Regeneration hindert, sondern auch der Einfluß inhibitorischer Faktoren in ZNS Gewebe.

1.2. Mögliche Ursachen des Fehlens spontaner Regeneration verletzter Neurone des Zentralnervensystems

Es konnte beobachtet werden, daß verletzte Axone des ZNS nach Läsion ohne externe Einwirkung wieder für eine kurze Distanz aussprossen können (Li & Raisman, 1994). Der Wachstumsstopp geschieht in der Nähe der Läsionsstelle (Stichel & Müller, 1994). Warum die auswachsenden Axone stoppen, ist bisher ungeklärt. Es werden mehrere Hypothesen diskutiert (zur Übersicht s. Stichel & Müller, 1998b):

- (a) Das Fehlen neurotropher Faktoren im ZNS Gewebe (Houweling et al., 1998);
- (b) Die Anwesenheit inhibitorischer Moleküle im ZNS Gewebe (Bandtlow & Schwab, 2000; Fawcett & Asher, 1999a; Shen et al., 1998);
- (c) Die Ausbildung einer physikalischen Barriere an der Läsionsstelle (Reier et al., 1983).

Zur Aufklärung dieser Mechanismen werden verschiedene Strategien angewandt, die meist entweder die lokale oder systemische Verabreichung neurotropher Faktoren, Antikörper gegen wachstumshemmende Moleküle, Implantation von modifizierten oder nicht modifizierten Zellen zur Wachstumsförderung oder die Steigerung der Immunantwort nach Läsion beinhalten (zur Übersicht s. Bregman, 1998; Bregman et al., 2002; David, 2002; Fouad et al., 2001a; McKerracher, 2001; Schwartz & Moalem, 2001; Stichel & Müller, 1998a). Die Beobachtung des Wachstumsstopps im Läsionsgebiet läßt vermuten, daß dieses Areal zur Untersuchung des regenerativen Versagens im ZNS besonders interessant ist. An der Stelle der Läsion bildet sich auch im Nervensystem wie in jedem anderen Gewebe des Körpers eine Wundheilungsnarbe aus, deren Rolle bei dem regenerativen Versagen der ZNS Axone noch nicht geklärt ist.

1.2.1. Die Wundheilungsnarbe

Bereits am Anfang des letzten Jahrhunderts beobachtete Ramon y Cajal die Ausbildung einer Wundheilungsnarbe an der Stelle der Verletzung des Nervensystems. Heute können zwei Areale dieser Narbe unterschieden werden (s. Abb 1.1.) : die **Gliararbe** im Periläsionsgebiet und die **fibröse Narbe** im Läsionszentrum (Fawcett & Asher, 1999b; Shearer & Fawcett, 2001b; Klapka et al., 2002).

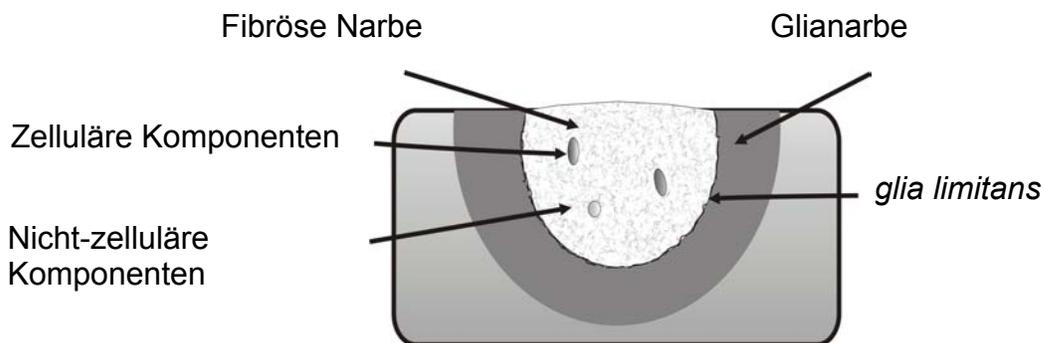


Abb. 1.1.: Schematische Darstellung der Wundheilungsnarbe in einem sagittalen Rückenmarksgewebeschnitt. Die fibröse Narbe besteht aus Extrazellulärmatrix (nicht-zelluläre Komponenten) und eingewanderten Zellen wie Meningealzellen, Schwann-Zellen, Blutzellen etc. Die Glianarbe enthält reaktive Astrozyten und bildet an einigen Grenzstellen zur fibrösen Narbe eine *glia limitans* aus.

Die Glianarbe besteht zum grössten Teil aus reaktiven Astrozyten. Diese sind gekennzeichnet durch eine Überexpression des glialen fibrillären sauren Proteins (GFAP), eines Proteins des Zytoskeletts der Astrozyten (zur Übersicht siehe Fawcett & Asher, 1999b; Shearer & Fawcett, 2001a). Einige Stunden nach einer Läsion gehen residente Astrozyten in einen aktivierten Zustand über. Sie proliferieren und bilden Ausläufer, denen man eine Funktion in der Abschottung des verletzten Nervengewebes zum restlichen Gewebe zuschreibt (Fawcett & Asher, 1999b). Diese Astrozyten sind über *tight junctions* und *gap junctions* (Strukturen an Kontaktstellen zweier Zellen, an denen Stoffaustausch verhindert bzw. ermöglicht wird) mit Oligodendrozyten, Mikroglia, Makrophagen, Endothelzellen und Meningealzellen verbunden (Fawcett & Asher, 1999b; Klapka et al., 2002). Astrozyten exprimieren auch Moleküle, die putativ inhibitorisch auf axonales Wachstum wirken können. Unter diesen sind Tenascin (Faissner, 1997; Fawcett, 1997; Becker et al., 2000), CD44 (Mansour et al., 1990), Brevican und Neurocan zu nennen (Fawcett & Asher, 1999b). Astrozyten exprimieren allerdings auch wachstumsfördernde Substanzen, z.B. das Zell Adhäsionsmolekül NCAM. Es sind neben Astrozyten auch Oligodendrozyten und Meningealzellen in der Glianarbe vorhanden, die inhibitorische Moleküle

synthetisieren wie z.B. NI250/NOGO (Huber & Schwab, 2000; Chen et al., 2000), MAG (Myelin assoziiertes Glykoprotein, Filbin, 1995), Ephrine (Miranda et al., 1999) und Semaphorine (De Winter et al., 2002).

Die fibröse Narbe im Läsionszentrum besteht zu einem großen Teil aus Kollagen des Typs IV (Coll IV). Dieses Kollagen ist ein Bestandteil von Basalmembranen (BM) wie sie auch in Blutgefäßwänden vorkommen (s. Stichel et al., 1999d; Shearer & Fawcett, 2001a). Auch die Immunreaktivität der fibrösen Narbe bei immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern (AK) gegen Laminin weist auf eine BM ähnliche Struktur hin (Yurchenco & Schittny, 1990).

1.2.2. Die fibröse Narbenkomponente als Regenerationsbarriere

Der Einfluß der verschiedenen Komponenten der Wundheilungsnarbe auf das Versagen der Regeneration in ZNS Gewebe ist nicht geklärt. Eine Vielzahl verschiedener Moleküle kann an eine BM assoziiert sein (Timpl, 1994; Yurchenco & Schittny, 1990). Einige dieser Moleküle wurden als Inhibitoren axonalen Wachstums identifiziert: u.a. Chondroitin Sulfat Proteoglykane (CSPG, (Snow et al., 1990; Morgenstern et al., 2002), Semaphorine (De Winter et al., 2002) und Ephrine (Miranda et al., 1999). Coll IV, die Hauptkomponente der Extrazellulärmatrix (EZM) dieses Netzwerkes, wird von verschiedenen Zellen des ZNS synthetisiert, wie meningeale Fibroblasten (Berry et al., 1983), Astrozyten (Liesi & Kauppila, 2002) und Endothelzellen (Schwab et al., 2001). Es wurde in einem früheren Läsionsmodell der Arbeitsgruppe des Labors für Molekulare Neurobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, der Durchtrennung des postkommisuralen Fornix, festgestellt, daß die Coll IV-haltige Narbe im Läsionszentrum eine Wachstumsbarriere für Axone darstellt (Stichel & Müller, 1998d).

1.3. Experimentelle Strategien zur Unterdrückung der Coll IV-haltigen fibrösen Narbe

Die fibröse Narbe besteht zum größten Teil aus einem komplexen EZM Netzwerk. Der Aufbau solcher BM Netzwerke ist detailliert beschrieben worden (Yurchenco & Schittny, 1990). Ein zugrundeliegendes Coll IV-Netzwerk ist über Nidogen/Entactin mit einer Laminin Matrix vernetzt. Über Integrine können an dieses Netzwerk sogar Zellen anheften. Proteolytische Degradation der Coll IV-haltigen Narbe führte in früheren Experimenten anderer Arbeitsgruppen zu extensiver Blutung, da auch Blutgefäße von BM umgeben sind (Matinian & Andreasian, 1973; Feringa et al., 1979). Daher wurde ein Ansatz entwickelt, der nicht die Zerstörung bereits vorhandener Coll IV Matrix sondern die Unterdrückung ihrer *de novo* Synthese nach Verletzung zum Ziel hat. 19 Kollagenarten sind bekannt. Coll IV bildet spontan tuchartige Strukturen aus, die Quervernetzungen aufweisen (Brown & Timpl, 1995).

1.3.1. Die Biosynthese von Kollagen

Der schematische Ablauf der Kollagen Biosynthese ist in Abbildung 1.2. dargestellt (aus Klapka et al., 2002).

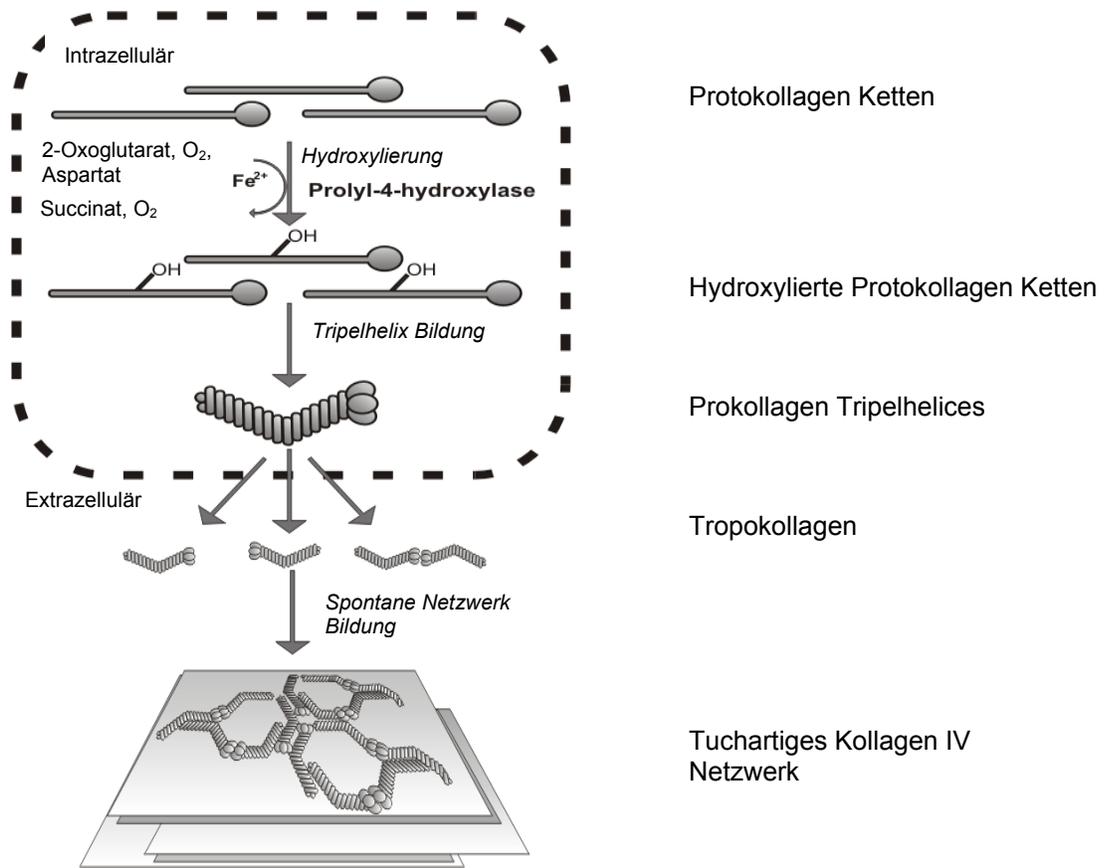


Abb. 1.2. : Schematische Darstellung der Kollagen Synthese. Erklärung s. Text.

In Kollagen produzierenden Zellen wie Fibroblasten (Berry et al., 1983), Astrozyten (Liesi & Kauppila, 2002) und Endothelzellen (Schwab et al., 2001) werden Prokollagen Moleküle von der Prolyl-4-Hydroxylase hydroxyliert. Diese Reaktion ist notwendig, um die Formation stabiler Tripelhelices zu gewährleisten, die dann in den Extrazellulärraum sezerniert werden. Kollagen Tripelhelices bilden spontan Netzwerke aus, im Falle des Coll IV tuchartige Strukturen. Ein Schlüsselenzym der Kollagen Synthese ist demnach die Prolyl-4-Hydroxylase, die als Kofaktor Eisen benötigt. Eine Deprivierung dieses Kofaktors würde zu einer geringen Hydroxylierungsrate führen, die Ausbildung stabiler Kollagen Netzwerke wäre somit gehemmt.

1.3.2. Die Behandlung zur transienten Unterdrückung der Bildung der Kollagen IV-haltigen Narben mittels eines Eisenchelators

Die Behandlung zur transienten Unterdrückung der fibrösen Narbe wurde im Läsionsmodell der Fornixtransektion entwickelt (Stichel et al., 1999a). In diesem Läsionsmodell wurde ein Eisenchelator extrazellulär appliziert (2,2'-Dipyridyl), um einen großen Anteil des Kofaktors Eisen, der extrazellulär in der Läsion vorliegt, für das Enzym Prolyl-4-Hydroxylase unzugänglich zu machen. Diese Behandlung führte zu einer transienten Unterdrückung der Coll IV-Immunreaktivität (IR) bei immunhistochemischen Färbungen der Hirnschnitte mit Coll IV AK. Als Folge der Unterdrückung der Narbenausbildung wurde eine Axonregeneration bis zu 1 – 1,5 mm zum Zielgebiet beobachtet (Stichel et al., 1999a). Dieses Läsionsmodell ermöglichte allerdings nicht die Beobachtung längeren Axonwachstums oder funktionelle Auswirkungen der Behandlung, die über elektrophysiologisch messbare hinausgingen.

Im Modell der Rückenmarksläsion allerdings musste wegen der Größe der Läsion und der Nähe zu den Hirnhäuten ein potenterer Eisenchelator eingesetzt werden, das 5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl (BPY-DCA). BPY-DCA wird in einer Konzentration von 30 mM in Tris Puffer gelöst in die Läsion injiziert (6x0,2 µl, s. Material und Methoden). Da diese Injektionen nicht ausreichend waren, um im Rückenmark eine Reduktion der Coll IV-haltigen Narbe zu bewirken, musste eine zusätzliche Strategie entwickelt werden, um die Coll IV Produktion zu unterdrücken.

1.3.3. Strategie zur Hemmung Kollagen IV produzierender Zellen

Meningeale Fibroblasten wandern im lädierten Rückenmark in die Läsionsnarbe ein, wie in elektronenmikroskopischen Studien gezeigt werden konnte (Berry et al., 1983; Carbonell & Boya, 1988). Coll IV wird von Astrozyten und Fibroblasten produziert (Berry et al., 1983). Beide Zelltypen exprimieren CTGF (*connective tissue growth factor*, s. Carbonell & Boya, 1988; Duncan et al., 1999; Schwab et al., 2001). CTGF ist ein Peptid, das in die Proliferation und EZM Produktion von Fibroblasten involviert ist (Frazier et al., 1996; Grotendorst, 1997). Erhöhung des intrazellulären cAMP (cyclisches Adenosin Monophosphat) Spiegels behindert den CTGF vermittelten autokrinen Effekt der Proliferations-Steigerung und EZM Produktionserhöhung (Duncan et al., 1999). Aus diesem Grund wurde cAMP als weitere Komponente in die Behandlung zur Narbenunterdrückung aufgenommen. Es wird nach Injektion des BPY-DCA in Form von 8-Br-cAMP (8-Brom-cAMP) in die Läsionsstelle gegeben, das auch über die Zellmembran in die Zellen gelangen kann. Zur längerfristigen Freisetzung des BPY-DCA an der Läsionsstelle wurde es in ein Elvax-Kopolymer (Ethylen-Vinyl-Azetat) eingebunden und dieses am Schluß der Operation (OP) auf die Läsionsstelle gegeben.

1.4. Der Aufbau des Rückenmarks der Ratte

Das Rückenmark enthält aufsteigende sensorische Fasertrakte, absteigende motorische Fasertrakte, Interneurone, die lokale Verschaltungen in den Segmenten des Rückenmarks sowie Modulation der Signale erlauben und Motoneurone. Ein schematischer Querschnitt durch das Rückenmark der Ratte ist in Abb. 1.3. dargestellt. Die graue Substanz ist durch eine Vielzahl von optisch dichten Zellkörpern gekennzeichnet, hauptsächlich von Motoneuronen. Im dorsalen Teil des Rückenmarks befinden sich die Hinterstrangbahnen, die sensorische Bahnen enthalten. Unterhalb der Hinterstrangbahnen ist bei der Ratte anders als beim Menschen oder Affen, der Kortikospinaltrakt (CST) zu

finden. Der CST ist ein Teil des pyramidalen motorischen Systems. Ausgehend von Neuronen der Schicht V des Motorkortex projiziert der CST über die Pyramidenbahnen ins Rückenmark. Ein großer Anteil (90-95 %) der Fasern kreuzen die Mittellinie an der Pyramidenkreuzung auf Höhe der Medulla oblongata. Ein kleiner Teil des CST bleibt ungekreuzt und verläuft dann auch nicht im dorsalen Teil des Rückenmarks. Ausser diesem dorsal gelegen Anteil ist der CST im Rückenmark auch lateral und ventral zu finden. Dieser Anteil macht allerdings nur 5-10 % der gesamten Fasern des CST aus (Brösamle & Schwab, 1997).

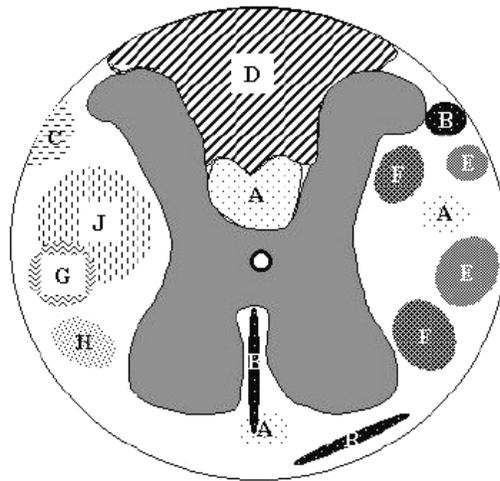


Abb. 1.3.: Schematischer Querschnitt durch das Rückenmark der adulten Ratte. Zur Vereinfachung sind die Trakte, die ausnahmslos bilateral vorliegen, nur auf einer Seite eingezeichnet. A: Tractus Corticospinalis (absteigend), B: Tractus Spinothalamikus (aufsteigend), C: Tractus Rubrospinalis (absteigend), D: Hinterstrangbahnen (Funiculus gracilis und cuneatus, aufsteigend), E: Serotonerge Projektionen des Hirnstamms (absteigend), F: Tractus Spinotektalis (aufsteigend), G: Tractus Spinoreticularis (aufsteigend), H: Projektionen zur zentralen grauen Substanz (aufsteigend), J: Tractus Spinozerebellaris (aufsteigend). (Mit freundlicher Genehmigung aus Hermanns S. ,2001).

Zielzellen des CST sind hauptsächlich alpha-Motoneurone in der grauen Substanz. Der Rubrospinaltrakt (RST) entspringt dem Nucleus ruber im Mittelhirn und projiziert ebenfalls gekreuzt in einen weit lateralen Bereich des dorsalen Rückenmarkes. In der grauen Substanz projiziert er auf Interneurone, die dann alpha-Neurone innervieren (Zilles & Rehkämper, 1993).

1.5. Mechanismen der Motorik und der supraspinalen motorischen Steuerung in der Ratte

Die genauen neurophysiologischen Mechanismen der Lokomotion der Vertebraten sind nicht im Detail aufgeklärt. Wichtige Komponenten sind die sogenannten *Central Pattern Generators* (Grillner, 2002; Pearson, 1993), die im Rückenmark lokalisiert sind und auch nach vollständiger Transektion des Rückenmarks immer noch Schrittfolgen auslösen können (Cazalets et al., 1995; Kiehn & Kjaerulff, 1998). Diese Netzwerke wurden für verschiedene Spezies im tiefen lumbalen Bereich, für die neugeborene Ratte auf der Höhe T13 bis L2 beschrieben (Cazalets et al., 1995; Kiehn & Kjaerulff, 1998) und erzeugen synchronisierte Pulse, die u.a. Schwimmbewegungen oder Schrittfolgen ermöglichen.

Die Bedeutung des CST und RST im Rückenmark der Ratte auf die Lokomotion ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Läsionen eines der beiden Trakte führt in Tiermodellen zu temporären Defiziten, die durch den anderen Trakt funktionell ausgeglichen werden können (Kennedy, 1990). In Experimenten mit Durchtrennung des CST und Aufhebung der inhibitorischen Wirkung des NOGO Proteins konnten aussprossende Kollaterale des RST festgestellt werden. Diese könnten eine Ursache für die beobachtete funktionelle Erholung der untersuchten Ratten darstellen, indem sie die durch das Fehlen CST vermittelter Innervationen verursachten Defizite kompensierten (Raineteau et al., 2001). Diese Befunde lassen ein sehr enges Zusammenspiel dieser Trakte vermuten. Oft wird eine Einteilung in „grobe“ Lokomotionskontrolle durch den RST und „Feinkontrolle“ der Lokomotion durch den CST vorgenommen. Eine andere Hypothese schreibt dem CST die Kontrolle über neu erlernte Bewegungen zu während der RST oft wiederholte Bewegungen steuern soll (s. Kennedy, 1990; Muir & Whishaw, 1999; Fouad et al., 2000; McKenna & Whishaw, 1999; Metz & Whishaw, 2002; Metz et al., 1998; Muir & Whishaw, 2000; Whishaw et al., 1998). Die Initiierung einer Bewegung wird vom Retikulospinaltrakt bewirkt, der lateral zu finden ist (Schucht et al., 2002).

1.5.1. Hypothesen über die funktionelle Bedeutung des Kortikospinaltraktes

Das Zusammenspiel des CST und RST für das lokomotorische Verhalten ist noch nicht im Detail aufgeklärt. Läsionen des CST in Affen führen zwar zu Lähmungen, diese sind allerdings meist nur temporär zu beobachten. Simultane Läsionen des CST und RST erzeugen langanhaltende Defizite (Kennedy, 1990). Dieser Befund spricht für eine enge Zusammenwirkung der beiden Fasertrakte.

Des weiteren konnte festgestellt werden, daß Neuronen des RST elektrophysiologisch aktiv sind, wenn automatisierte Bewegungen durchgeführt werden. Neuronen des CST zeigten hingegen besonders hohe Aktivität wenn neue Bewegungen erlernt wurden. Ein in diesem Zusammenhang interessantes Traktsystem ist der ROP (Projektion vom Nucleus ruber zum Olivenkern). Dieser entstammt dem Nucleus ruber, projiziert dann allerdings über den Olivenkern ins Zerebellum. Eine schematische Darstellung der Fasersysteme im Affen ist in Abb. 1.4. gezeigt.

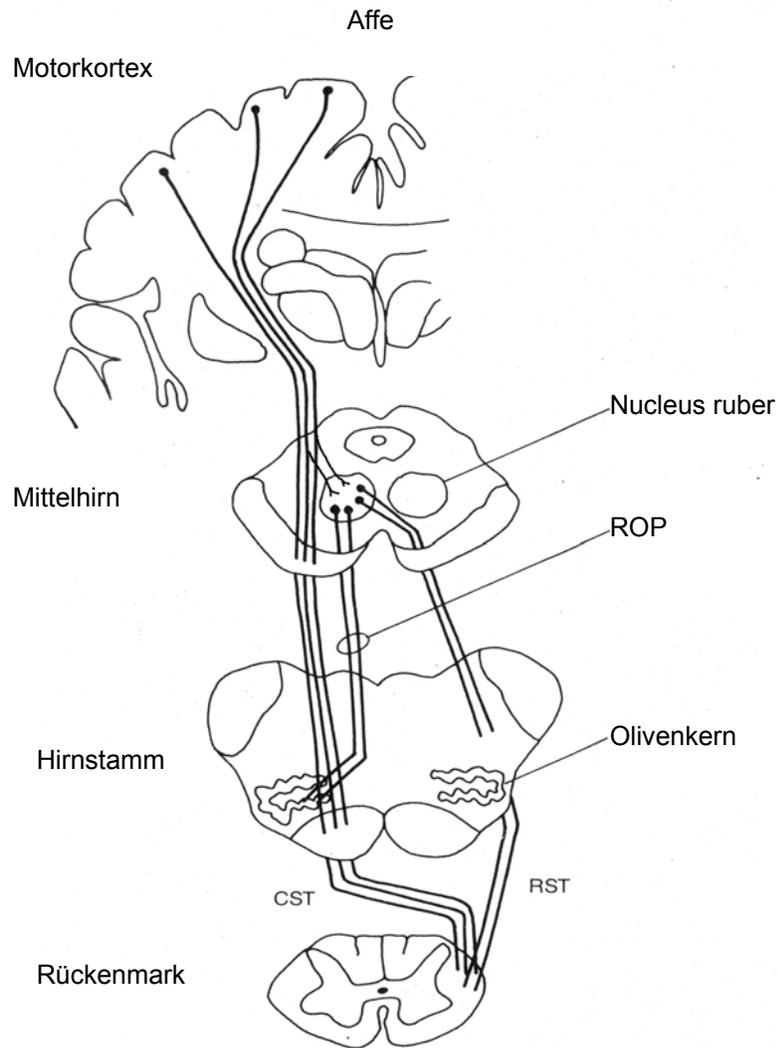


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Verlaufs des CSR, RST und ROP im Hirn und Rückenmark des Affen (modifiziert nach Kennedy, 1990).

Somit sendet der ROP indirekte motorische Befehle über das Zerebellum und empfängt indirekt sensorische Signale. In der Ratte ist der ROP eine Kollaterale Bahn des RST, die selben Neurone projizieren im ROP wie im RST (keine histologischen Unterschiede). Durch Läsionsstudien gelangte man zu folgender Hypothese des Zusammenspiels dieser Traktsysteme (Kennedy, 1990): der ROP bewirkt bei einer Läsion des RST eine Veränderung der Verschaltung des Zerebellums und des CST. Der ROP steuert den Übergang neuer Bewegungsmuster in erlernte Bewegungsmuster, also einen Wechsel von

Funktionen des RST in die des CST. Diese Hypothese lässt den Schluß zu, daß bei RST Läsionen verlorene Funktionen durch den CST übernommen werden können, während bei Läsionen des CST nur das alte Repertoire an Bewegungen zur Verfügung steht.

Der Einfluß des CST bzw. RST auf CPGs in der Ratte sind noch nicht aufgeklärt. Eine supraspinale Kontrolle dieser Systeme wird allerdings angenommen (Mori et al., 1996). Der einzig bekannte elektrophysiologische Reflex, der durch den CST gesteuert wird, ist der sogenannte H-Reflex. Das Verhaltenskorrelat dieses Reflexes ist der Spinale Streckungsreflex, der bei Überstreckung des Musculus Soleus im Bein der Ratte eine Gegenbewegung initiiert. Mit Hilfe von implantierten Elektroden und einem Belohnungssystem kann die Ratte konditioniert werden, das elektrophysiologische Signal, das auf einen reflexauslösenden Reiz folgt entweder zu verstärken (Hochregulation) oder abzuschwächen (Runterregulation). Durch Läsionsstudien wurde festgestellt, daß eine Runterregulation des H-Reflexes nach CST Läsion nicht mehr möglich ist (s.a. Chen et al., 1996; Chen et al., 1999; Chen & Wolpaw, 2002).

Des weiteren werden sensorische Bahnen als Modulatoren der CPGs angesehen, da sensorische Reize der Umgebung wie z.B. Geschwindigkeitsänderungen eines Laufbandes bei kinematischen Versuchen die Frequenz der vom CPG gesteuerten Schrittfolgen beeinflusst (zur Übersicht s. MacKay-Lyons, 2001). Die Läsion der Hinterstrangbahnen, in denen sensorische Axone lokalisiert sind, könnte somit auch einen Einfluß auf CPG evozierte Lokomotion haben.

1.5.2. Funktionelle Tests zur Untersuchung von Lokomotionsstörungen im Tiermodell der Ratte

Da in der Literatur nur wenig Daten über die hier angewandte Läsionsart (Durchtrennung der Hinterstrangbahnen und des dorsalen CST) im Zusammenhang mit lokomotorischen Tests vorhanden war, wurden etablierte Tests zur Untersuchung der allgemeinen Lokomotion der Ratte sowie der Feinkontrolle der Hinterbeine durchgeführt. Zur Bewertung der allgemeinen Lokomotion der Ratte wurden Offenfeldbeobachtungen vorgenommen mit Bewertung des lokomotorischen Verhaltens mittels einer 21 Punkte Klassifizierung (BBB Werte), die von Basso et al. entwickelt wurde (Basso et al., 1995). 21 Punkte werden bei einer normal laufenden Ratte vergeben, 0 Punkte bei keiner sichtbaren Bewegung der Hinterbeine (s. Material und Methoden). Dieser Test wurde zwar für die Kontusionsläsion entwickelt, bei der das Rückenmark ohne Duraeröffnung durch den Fall eines definierten Gewichtes auf das offene Rückenmark beschädigt wird, dennoch greifen viele Arbeitsgruppen mit verschiedenen Läsionsmodellen auf diesen Test zurück. Dadurch existieren bereits für verschiedene Läsionsmodelle Beschreibungen funktioneller Ausfälle über die BBB Klassifizierung. Beispiele sind:

- (A) dorsale Hemisektion des Rückenmarkes auf thorakaler Höhe 8 mit maximalen BBB Werten zwischen 7 und 13 in einem Zeitraum von 4 Wochen für Kontrollratten (Merkler et al., 2001);
- (B) ventrale Hemisektionen mit BBB Werten von ca. 13 nach 4 Wochen (Schucht et al., 2002);
- (C) unilaterale Läsion der Pyramidenbahn mit BBB Werten bis 21 nach 4 Wochen (Metz et al., 1998).

In einer Untersuchung von Metz et al. (Metz et al., 2000) wurde dieser Test in kontusionslädierten und transektionslädierten Ratten getestet und auch als sensitiv für das Modell der dorsalen Hemisektion betrachtet.

Der Lauf der Ratten über ein horizontales Gitter stellt eine anspruchsvollere Aufgabe dar. Es können Defizite der Feinkontrolle der Hinterbeine sowie der Kopplung sensorischer Informationen mit lokomotorischem Verhalten aufgedeckt werden (Metz & Whishaw, 2002). In diesem Zusammenhang spielt der CST eine besonders prominente Rolle. Wie oben beschrieben, wird dem CST eine wichtige Rolle in der Feinkontrolle der Vorder- und Hinterpfoten zugeschrieben (s.a. Diskussion).

Des Weiteren wurden in der Literatur häufig Fußabdruckanalysen der Läufe der Ratten beschrieben (Klapdor et al., 1997). Dazu wurden die Pfoten der Ratte in Tinte getaucht und nach dem Lauf über ein weißes Blatt ausgewertet. Die in dieser Arbeit benutzte CatWalk Apparatur ist eine Weiterentwicklung der herkömmlichen Fußabdruckanalyse (Vrinten & Hamers, 2003), die ausserdem kinematische Aspekte der Bewegung miteinbezieht (s. Material und Methoden).

Zusammenfassend soll darauf hingewiesen werden, daß wegen der individuellen Kompensation von Lokomotionsdefiziten kein Test alleine zur vollkommenen Beschreibung funktioneller Ausfälle und Detektion einer Erholung ausreicht. In den hier angewandten Tests werden verschiedene Aspekte des lokomotorischen Verhaltens untersucht.

1.6. Fragestellung und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt, um weitere Charakterisierungen der läsionsinduzierten Narbe im verletzten Rückenmark der Ratte mittels immunhistochemischen Färbungen durchzuführen. Des Weiteren wurden lange Überlebenszeitpunkte der Versuchstiere histologisch untersucht (30 Tage, 12 Wochen, 4 Monate), um eventuelle Langzeitfolgen der Behandlung zur Narbenunterdrückung oder Veränderungen der Narbenkomponenten zu untersuchen. Das Läsionsmodell der Drahtmesserläsion des CST und der Hinterstrangbahnen im Rückenmark der Ratte lieferte ausserdem die Möglichkeit, Unterschiede im lokomotorischen Verhalten lädierter und behandelter Ratten zu untersuchen. Dazu wurde auch ein Überlebenszeitpunkt von 4 Monaten gewählt.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für die Experimente wurden adulte Wistar-Ratten (Auszuchtstamm) beider Geschlechter verwendet. Für die histologischen Untersuchungen der lädierten Rückenmäcker wurden Rückenmarksschnitte von 22 Tieren immunhistochemisch gefärbt (s. Tabelle 3.1.). Für Verhaltensstudien wurden insgesamt 36 Tiere operiert. Das Körpergewicht der Ratten betrug bei Tieren, die in die Verhaltensstudien aufgenommen wurden anfangs 180-200g, so daß sie zum Zeitpunkt der Operation 200-250g wogen. Alle Tiere wurden bei einem Körpergewicht von 200-250g und einem Alter von 6 – 10 Wochen operiert. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gezüchtet (21°C, 50% ± 5% Luftfeuchtigkeit) und unter denselben Bedingungen konventionell gehalten. Sie wurden in Standardkäfigen in Gruppen gehalten, sofern nicht wegen besonderer Umstände (z.B. Verletzungen) Einzelhaltung erforderlich war. Pelletiertes Trockenfutter und keimfreies Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

2.2. Puffer und Antikörper, Elvaxpräparation

2.2.1. Puffer und Lösungen

- 0,2 M PB (Phosphat Puffer, pH 7,4): 28,8g Na₂HPO₄; 5,2g NaH₂PO₄; ad 1000ml aq. bidest
- 0,1 M PBS (pH 7,4): 50ml 0,2M PB; 9mg NaCl; ad 1000ml aq. bidest
- Tris Puffer (20mM, Einstellen des pH Wertes mit HCl auf 8,1): 2,1g C₄H₁₁NO₃ ad 1000ml aq. bidest
- NHS (FA Camon, Normal Horse Serum, 3%): 300µl NHS ad 10ml PBS
- NGS (FA Camon, Normal Goat Serum, 3%): 300µl NGS ad 10ml PBS
- BPY-DCA (5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl, 30mM, synthetisiert von M. Wehner, Institut für Organische Chemie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf): 14,7mg BPY-DCA ad 2 ml Tris

- Tissue Collecting Solution (250 ml Glycerin+300 ml Ethylenglycol +500 ml 0,1 M PB)
- Rotihistol (Roth, Karlsruhe)
- Citrat-Puffer pH 4.5: 21 g/l Citronensäure Monohydrat (0,1 M) + 35,6 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O (0,2 M)
- Protease XXIV (Sigma)
- Diaminobenzidin (DAB, Sigma)
- DPX (Fluka)

2.2.2. Antikörper

Tabelle 2.1. : Verwendete Antikörper

Antikörper	Antigen	Hersteller	Verdünnung	Behandlung
Coll IV / rb IgG	Kollagen Typ IV	BioGenex	1:100	Protease
Coll IV / rb IgG		Progen	1:200	Mikrowelle
Coll IV / gt IgG		Biodesign	1:500	Protease
PAM / ms IgG	Neurofilament 210kD, phosphoryliert	Affinity	1:800	-
GFAP / ms IgG1	Gliales fibrilläres saures Protein (u.a. Astrozyten)	Chemicon	1:350	-
CS-56	Chondroitin Sulfat Proteoglykane	Sigma	1:200	NaBH ₄

Tabelle 2.2. : Sekundärantikörper, Avidinreagenzien, Markersubstanzen

Substanz /Klasse	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus IgG / hs IgG (biotinyliert)	Vector/Camon	1:150
Anti-Kaninchen IgG / gt IgG (biotinyliert)	Vector/Camon	1:150
Anti-Ziege IgG / hs IgG (biotinyliert)	Vector/Camon	1:150
Streptavidin-gekoppeltes Alexa-488 Konjugat	Molecular Probes	1:1000
Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) Standard	Vectastain ABC Kit	1:100
Biotinyliertes Dextranamin (BDA)	Molecular Probes	10%

2.2.3. Elvaxpräparation

Zur Elvaxpräparation wurden 0,1g Ethylen-Vinyl-Acetat Kopolymer-Kügelchen (Elvax, DuPont) mit 1ml Dichlormethan unter dem Abzug in einem speziellen Schüttler für Reagenzgläser (Fa. Heidolph Reaxtop) vermischt. Nach 20min waren die Elvax-Kugeln gelöst und nach Zugabe von 10µl Fast Green und 100µl BPY-DCA in DMSO (1M) bzw. Tris (200mM) wurde weitere 40min geschüttelt. Während dieser Zeit wurden Objektträger zum Auftropfen der Lösung vorbereitet. Dazu wurde ein Rahmen aus Parafilm 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. Fotoklammern fixierten die zusammengeklappten Objektträger, die nun den Parafilmrahmen und die Elvaxschicht einschlossen. Bei -20°C wurden die Objektträger eingefroren und das Lösemittel eine Woche abgedampft.

2.3. Operationsprotokolle

2.3.1. Drahtmesserläsion

Unter kurzer Ethrane Inhalationsnarkose in einem geschlossenen Glaszylinder wurde den Versuchstieren eine Chloralhydrat-Lösung (400mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Die Tiefe der Narkose wurde durch Auslösen von Schmerzreflexen (Kneifen der Hinterpfoten) ständig überwacht. Der Rücken der Tiere wurde rasiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Mit einer Skalpellklinge wurde ein ca. 3cm langer dorsaler Hautschnitt beginnend zwischen den Schulterblättern nach kaudal durchgeführt. Alle Instrumente wurden mit Ethanol desinfiziert bevor sie mit dem Tier in Berührung kamen.

Das Fettgewebe zwischen den Schulterblättern wurde vorsichtig teilweise von den Rückenmuskeln abgetrennt und weggeklappt. Dabei war darauf zu achten, daß Blutgefäße nicht verletzt wurden. Anschliessend wurde jeweils links und rechts dicht neben der Wirbelsäule zwischen Th6 (thorakale Höhe) und Th10 ein Skalpellschnitt durch die Rückenmuskulatur durchgeführt. Mit einem Muskelspreizer wurden die durchtrennten Muskel auseinander gehalten. Anhand der anatomischen Beschaffenheit der Dornfortsätze Th9-10-11, die eng zusammenliegen und somit als Orientierung dienen, konnte die Position von Th8 ermittelt werden.

Der Dornfortsatz an Th8 wurde mit einer stumpfen Knochenzange entfernt. Die Knochenzange diente auch der Eröffnung des Wirbelbogens, wobei darauf zu achten war, die seitlich des Rückenmarkes verlaufenden Blutgefäße, die lateralen spinalen Arterien, nicht zu beschädigen (s. Paxinos, 1995). Die Knochenöffnung hatte einen etwas grösseren Durchmesser als das geöffnete Drahtmesser. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden dann mit einer Nadel die Dura mater, die Arachnoidea und die Pia an Th8 eröffnet. Dabei wurde auch die mediane dorsale spinale Arterie verletzt. Das Tier wurde in einen stereotaktischen Rahmen (Small animal adaptor, FA David Kopf Instruments) gelegt, damit die Läsion und Injektion kontrolliert durchgeführt werden konnten. Das Scouten-Drahtmesser war an dem stereotaktischen Rahmen befestigt. Es

wurde an der Stelle der eröffneten Hirnhäute möglichst weit links auf das Rückenmark heruntergefahren. Ab Kontakt mit der Rückenmark Oberfläche wurde die Führungskanüle stereotaktisch 1,2 – 1,5 mm heruntergefahren. Das Messer wurde langsam ausgefahren, so daß es im Rückenmark halbkreisförmig ausfuhr. Langsam wurde das ausgefahrene Messer aus dem Rückenmark herausgefahren, wobei mit einem feinen Spatel Rückenmarksgewebe von oben gegen das Drahtmesser gedrückt wurde. Eine schematische Darstellung der Läsion ist in Abb. 2.1. zu sehen.

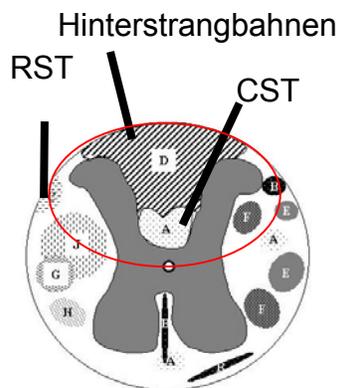


Abb 2.1.: Schematischer Querschnitt durch das Rückenmark der Ratte an Th8 mit Andeutung der Drahtmesser-Läsion (rot).

Puffer Kontrolltieren wurde nun mit einer 10 µl Hamilton Spritze, die mit Paraffin-Öl vorbefüllt war und an der eine ausgezogene Glaskappillare befestigt war, 6 Injektionen von Tris Puffer gesetzt. 4 Injektionen à 0,2 µl wurden in die Läsion selbst gegeben, 2 Injektionen à 0,2 µl kurz davor. Die Injektionen wurden ebenfalls unter mikroskopischer Kontrolle und mit Hilfe des stereotaktischen Rahmens durchgeführt. Ab Rückenmarkskontakt wurde die Glaskappillare 1,2-1,5 mm in das Rückenmark heruntergefahren. Die Substanzen wurden sehr langsam injiziert, um Druckläsionen zu vermeiden.

cAMP Kontrolltiere wurde zusätzlich zu den Tris Injektionen mit einem feinen Spatel 4 mg kristallines 8-Br-cAMP in die Läsion verabreicht.

Tieren der Gruppe mit Behandlung zur Narbenunterdrückung wurde auf die selbe Weise der Eisenchelator BPY-DCA (30 mM in Tris) injiziert und 4 mg 8-Br-cAMP appliziert. Abschliessend wurde ein passendes Stück Elvax mit (behandelte) bzw. ohne (Kontrolle) gelöstem BPY-DCA abdeckend mit einer Dumont Pinzette auf das Rückenmark gelegt. Die Muskulatur und die Haut wurden mit einem resorbierbaren Faden vernäht.

2.3.2. Markierung der primären Motoneurone, die in den Kortikospinaltrakt projizieren

Die Narkose wurde wie in 2.3.1. beschrieben durchgeführt. Dann wurde den Tieren der Kopf rasiert und mit Alkohol desinfiziert. Der Schädel wurde mittels Ohrstecker und Bügel mittig fixiert. Das Schädeldach wurde freipräpariert und die Koordinaten von Bregma abgelesen. Links und rechts der Mittellinie wurde je ein Fenster mit einem Zahnarztbohrer (Fine Science Tools, Ø 1,4 mm) ausgeschnitten, so daß Gefäße an der Hirnhaut nicht verletzt wurden.

Es wurden 16 Injektionen von je 0,2 µl biotinyliertes Dextranamin (BDA, 10 %) in den sensormotorischen Kortex an folgenden Koordinaten in Bezug auf Bregma vorgenommen (Tiefe jeweils 1,2 mm):

Tabelle 2.3.: Koordinaten zur Applikation der Marker Substanz in den sensormotorischen Kortex der Ratte

Kaudal	Lateral 1	Lateral 2
-0,08	+0,20	-0,20
-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

Zur Injektion wurde eine Hamilton Spritze mit einer Glaskappillare wie in 2.3.1. benutzt. Nach der Operation wurde die Kopfhaut mit Metallklips (Michel) geklammert.

2.3.3. Perfusion

Das Tier wurde in Narkose gelegt und auf einer Unterlage mit Gummiringen befestigt. Der Thorax wurde eröffnet und die linke Herzkammer angeschnitten. Eine an eine Perfusionspumpe (505S, Watson Marlowe) angeschlossene Kanüle wurde durch die linke Herzkammer in die Aorta geschoben und Kanüle und Herz mit einer Klammer fixiert. Dann wurde der rechte Vorhof mit einem kleinen Schnitt eröffnet. Nach 2 minütiger Perfusion mit kalter PBS Lösung (4°C, Pumprate 35 ml/min) wurde 15 min mit 4%iger PFA Lösung (Paraformaldehyd, 4°C) perfundiert. Die Wirbelsäulen der Tiere wurden anschliessend in 4%iger PFA Lösung 1 Tag nachfixiert. Dann wurde das PFA mit PBS über Nacht ausgewaschen.

2.4. Gewebeaufarbeitung

2.4.1. Rückenmarkspräparation

Nachdem die Wirbelsäulen einen Tag nachfixieren konnten, wurde der Wirbelkanal mit einer feinen Knochenzange von kaudal an stückweise eröffnet. Dabei wurde darauf geachtet, die Dorsalwurzeln nicht abzureissen, sondern mit einer Skalpellklinge vorsichtig durchzuschneiden. Das freipräparierte Rückenmark wurde in die gewünschte Länge geschnitten, wobei das dorso-kaudale Ende mit einem schräg verlaufenden Schnitt markiert wurde.

2.4.2. Paraffinschnitte

Zur Herstellung von Paraffinschnitten mußte das Rückenmark nach folgendem Protokoll entwässert werden:

- 70 % EtOH 30 min/4°C
- 90 % EtOH 60 min/4°C
- 100 % EtOH 60 min/4°C
- 100 % EtOH 60 min/4°C
- 100 % EtOH 60 min/4°C

- Methylbenzoat über Nacht/4°C.

Am nächsten Tag wurde das Rückenmark in Paraffin eingebettet. Die Prozeduren bei 59 °C wurden in einem Wärmeschrank (Fa Memmert) vorgenommen:

- In 1 ml Benzol, Roldeckelglas (Durchmesser ca. 2 cm), 15 min/RT
- 9 ml Paraffin-Wachs (59°C, 95% Paraffin, FA Merck, 5% Wachs, FA Caelo) Gemisch dazu, 30 min/57°C
- frisches Paraffin-Wachs Gemisch 1h/59°C
- frisches Paraffin-Wachs Gemisch 1h/59°C
- frisches Paraffin-Wachs Gemisch 1h/59°C
- frisches Paraffin-Wachs Gemisch über Nacht/59°C

Am nächsten Tag wurde das Rückenmark mit Hilfe einer Kautschukform in einen Paraffinwürfel eingebettet.

Nach Auskühlen des Paraffinwürfels bei 4°C wurde es mit einem Mikrotom (FA Leica) 10 µm dünn parasagittal geschnitten. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad bei ca. 40°C aufgefangen und auf Adhäsions-Objektträger aufgezogen. Anschliessend wurden sie bei 57 °C im Wärmeschrank über Nacht getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

2.4.3. Gefriermikrotomschnitte

Zur Herstellung dicker Schnitte für Faserfärbung wurde folgendes Protokoll verwendet:

- Einlegen des Gewebes in Sukrose, 10 % in PBS gelöst für 4-6 h bei 4°C, bis es abgesunken ist
- Einlegen des Gewebes in Sukrose, 30 % in PBS für 24 h bei 4°C, bis es abgesunken ist
- Gewebe auf kalten Block des Gefriermikrotoms (FA Frigomobil) auffrieren, Lage längs, etwas schräg zum Messer

- Schneidetemperatur -25°C - 26°C
- 50 μm Schnittdicke, parasagittale Schnittrichtung
- Auffangen der Schnitte in PBS
- Aufbewahrung in PBS für 1-2 Wochen bei 4°C , länger in Tissue Collecting Solution (TCS) bei -20°C

2.5. Immunhistochemische Färbeprotokolle

2.5.1. Paraffinschnitte

Immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Entparaffinieren (bei Raumtemperatur, in Färbeküvetten): 3 x Rotihistol je 10 min, 2 x 100% EtOH je 5 min
2. Abreagieren endogener Peroxidasen: 1 % H_2O_2 in Methanol 10 min
3. Überführung in wässriges Milieu: 90 % EtOH 5 min, 70 % EtOH 5 min, 50 % EtOH 5 min, 2 x PBS je 5 min
4. Demaskieren verdeckter Antigene (in feuchter Kammer):
 - a. Protease: 0,05 % Protease XXI (Sigma) in Tris für 8 min/ 37°C (Wärmeofen), 2x PBS 5 min
 - b. Mikrowelle: in 200 ml Citrat-Puffer pH 4,5, 4 min in der Mikrowelle erhitzen, bis sich erste Bläschen bilden, dann 3 Minuten kochen, anschließend 30 min auskühlen lassen
 - c. Triton X-100: 0,4 % in PBS
 - d. NaBH_4 : 1% NaBH_4 in PBS 10 min
5. Blocken unspezifischer Bindungsstellen: 3 % Normalserum 15 min
6. Erstantikörper über Nacht bei 4°C , 2 x PBS je 5 min
7. Zweitantikörper für 45 min, 2 x PBS je 5 min
8. Detektion mit Avidin-Biotin Peroxidase Reaktion: ABC – Komplex für 45 min, 2 x PBS je 5 min, 0,1 M PB 5 min, DAB (70 mg in 100 ml 0,1 M PB) + 0,01 % H_2O_2 für 3-5 min, 2 x H_2O für 5 min
9. Eindeckeln mit DPX

In Tabelle 2.1. sind die spezifischen Verdünnungen der Antikörper aufgelistet. Als Zweitantikörper wurden Antikörper gegen das Ursprungstier des Erstantikörpers verwendet. Das Serum des Ursprungstieres des Zweitantikörpers wurde als Block-Substanz benutzt. Je nach Färbeintensität mussten die Schnitte 3-5 min in DAB belassen werden. Für die Visualisierung von BDA-getrachten Fasern auf Paraffinschnitten wurden nur die Schritte 1-3 und 8-9 durchgeführt, wobei ABC über Nacht auf den Schnitten belassen wurde.

2.5.2. Gefriermikrotomschnitte

Die 50 µm dicken perfundierten Gewebsschnitte, die mit dem Gefriermikrotom angefertigt wurden, mussten flottierend in 12-Loch Mikrotiterplatten auf einem Schüttler gefärbt werden. Nur so konnte gewährleistet werden, daß die Substanzen von der Schnittober- und Unterseite in das Gewebe diffundieren konnten. Die Färbung des Markers BDA mit Avidin Alexa 488 erfolgte nach folgendem Schema:

1. Waschen der Schnitte: 3 x PBS je 10 min, 4 x PBS je 5 min
2. Avidin Alexa 488 (1:1000 in PRB) über Nacht bei 4°C im Dunkeln auf dem Schüttler
3. Waschen der Schnitte: 3 x PBS je 10 min, 4 x PBS je 5 min
4. Aufziehen der Schnitte mit Gelatine (1 g Gelatine, 0,1 g Chrom-III-Kaliumsulfat, 200 ml H₂O), 15 min trocknen
5. Eindeckeln der Schnitte mit Vectastain und mit Nagellack abdichten
6. Aufbewahrung der fluoreszierenden Schnitte bei -20 °C

Zur Verifizierung der Läsionsgrößen wurden auch GFAP Färbungen mit Gefriermikrotomschnitten vorgenommen.

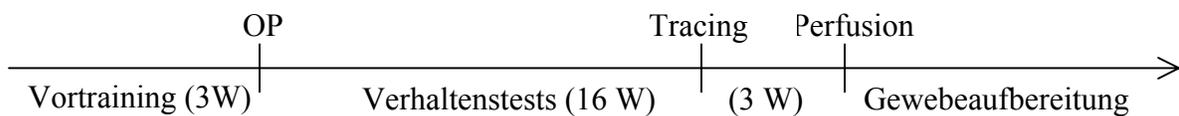
2.6. Histologische Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung der nicht-fluoreszenten Präparate erfolgte an einem Mikroskop der Firma Zeiss (Axioskop) bei bis zu 60 facher Vergrößerung. Fluoreszente Gewebsschnitte wurden an einem konfokalen Laserscanmikroskop (BioRad,

MRC1024; Krypton-Argon Laser; an einem Nikon Diaphot 200 Mikroskop) ausgewertet.

2.7. Funktionelle Tests

Für die lokomotorischen Verhaltenstests wurden 36 weibliche Wistar Ratten verwendet. Alle Geräte für die Verhaltenstests wurden täglich mit Wasser und mindestens einmal wöchentlich mit Desinfektionsmittel gereinigt, um eine Ablenkung der Ratten durch Urin-Geruch zu vermeiden. Nach erfolgreicher Beendigung eines Versuches wurden die Ratten mit Nagetier-Drops belohnt (max. 1 Drop pro Tag und Tier). Alle Verhaltenstests wurden blind durchgeführt. Tiere unterschiedlicher Gruppen saßen während der gesamten Überlebenszeit zu viert gemischt in Polykarbonat Macrolon Standard-Käfigen des Typs IV. Allen Tieren wurde nach der Operation eine Woche lang täglich das Antibiotikum Baytril in Rücksprache mit dem Tierarzt subkutan verabreicht um eine Entzündung der Blase zu vermeiden. Wenn notwendig wurde die Blase der Tiere manuell durch vorsichtiges Massieren des Bauches geleert. Der Zeitplan der Tests ist in folgendem Schema aufgeführt:



2.7.1. Ausschlußkriterien

Um die Vergleichbarkeit der Versuchstiere im Verhalten zu gewährleisten wurden die Rückenmäcker sämtlicher Versuchstiere aufbereitet und immunhistochemisch gegen GFAP und gegen den Marker BDA gefärbt. Es wurde in allen Tieren sichergestellt, daß die Läsion folgenden Kriterien entsprach: (1) die Tiefe der Läsion entspricht 2/3 der Höhe des Rückenmarks, (2) der CST und der

Zentralkanal sind durchtrennt. Beispiele für ein zu stark und ein zu wenig lädiertes Tier zeigt Abb 2.2.

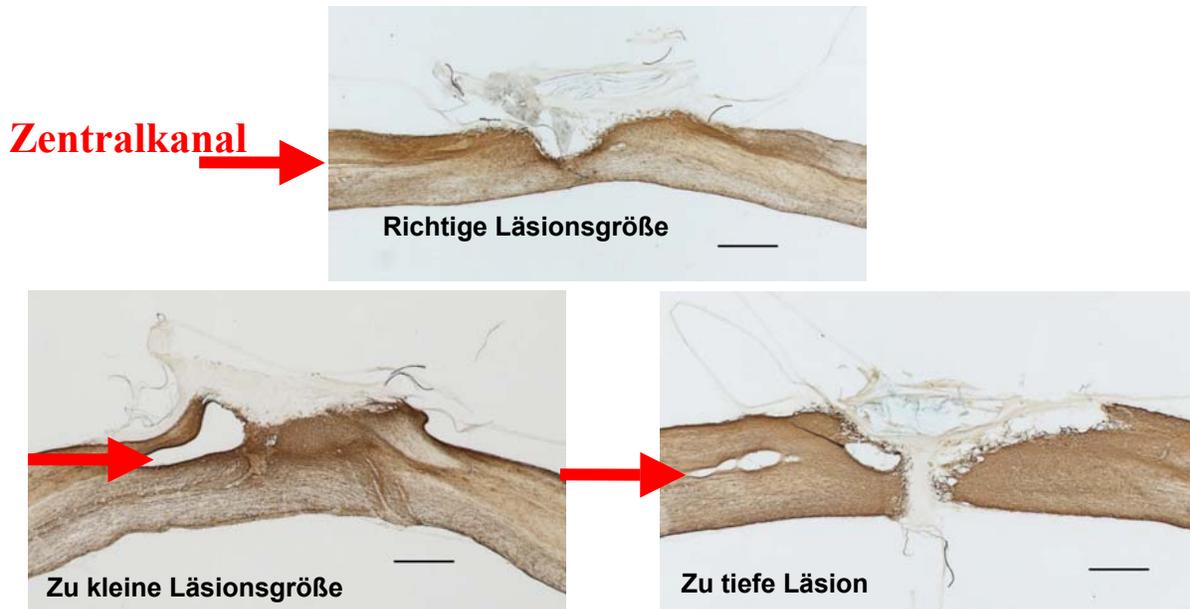


Abb. 2.2: Immunhistochemische Färbungen sagittaler Rückenmarksschnitte der Dicke 50 µm gegen GFAP. Ausrichtung: dorsokaudal= rechts oben. Beispiele für eine korrekte, zu kleine und zu tiefe Läsion als Ausschlußkriterium wie im Text beschrieben. Maßbalken : 1 mm.

2 Tiere von 36 operierten Ratten hatten nicht korrekte Läsionsgrößen. Zusätzlich musste ein Tier aus den Verhaltensanalysen ausgeschlossen werden, weil sein Körpergewicht stark vom mittleren Körpergewicht der restlichen Tiere abwich. Insgesamt ergaben sich somit folgende Tierzahlen für die Verhaltensanalysen:

Tabelle 2.4.: Tierzahlen der Verhaltenstests nach Validierung der korrekten Läsionsgröße und Körpergewichtes

Puffer-Kontrolle	cAMP Kontrolle	Behandelte Tiere	Sham Tiere
N=7	N=9	N=9	N=9

2.7.2. Autotomie

5 von 36 Tieren zeigten während der Zeit der Verhaltensstudien Anzeichen von Autotomie. Die Formen der Autotomie reichten von einigen Bißwunden an der hinteren rechten oder linken Flanke oder am hinteren Oberschenkel bis hin zur vollständigen Verstümmelung der Hinterpfoten. Trotz Behandlung der Wunden und Abdeckung mit Aluminiumspray konnte das Verhalten in keinem der Tiere gestoppt werden.

Nach Perfusion der Tiere und Auflösung des Behandlungsschlüssels konnte festgestellt werden, daß alle Tiere, die Autotomie zeigten zur Gruppe der mit cAMP allein behandelten Tiere gehörten. Da nicht zu unterscheiden war, ob die lokomotorischen Defizite der Tiere allein durch die Läsion selbst oder durch die anschließende Autotomie bedingt waren, konnten diese Tiere nicht in die Verhaltensstudien hineingenommen werden. Die Gruppe der mit cAMP behandelten Tiere bestand somit nur noch aus 4 Tieren. Diese niedrige Anzahl ließ eine Vergleichbarkeit der Verhaltensergebnisse mit den anderen Gruppen nicht zu.

2.7.3. 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 aus Plexiglas (Spezial-Anfertigung der FA Febikon, Köln, s. Abb 2.3) mit einem Durchmesser von 1 m gesetzt und über eine Zeit von 4 min beobachtet. Der Boden des Offenfeldes war mit einer schwarzen Gummimatte ausgelegt.



Abb. 2.3.: Offenfeld für die Beobachtung der freien Lokomotion der Ratten. Die Gummimatte diente der Feststellung von Kratzgeräuschen.

Während des Vortrainings wurden die Ratten für 5-10 min in diesem Offenfeld belassen, damit sie frei explorieren konnten. Nach 3-4 Tagen waren Anzeichen von Streß wie Erstarren, häufiges Kratzen, Schreckhaftigkeit bei Geräuschen, Defäkation etc. nicht mehr zu erkennen. Nach der Operation wurden die Tiere wöchentlich getestet. Eine ausführliche Liste der Punkte-Verteilung nach Basso et al. ist in (Basso et al., 1995) nachzulesen. Wichtige Merkmale der Lokomotionsbewertung sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5.: Basso Beattie Bresnahan Lokomotions Klassifizierung (modifiziert nach Basso et al., 1995)

BBB	Beobachtung
0	<ul style="list-style-type: none"> Keine spontane Bewegung der Hinterbeine
7	<ul style="list-style-type: none"> Extensive Bewegung aller Gelenke der Hinterbeine
11	<ul style="list-style-type: none"> Häufige bis konstante gewichtsunterstützende Schritte Keine Koordination der Vorder- und Hinterbeine

12	<ul style="list-style-type: none"> • Häufige bis konstante gewichtsunterstützende Schritte • Gelegentliche Koordination der Vorder- und Hinterbeine
13	<ul style="list-style-type: none"> • Häufige bis konstante gewichtsunterstützende Schritte • Häufige Koordination der Vorder- und Hinterbeine
15	<ul style="list-style-type: none"> • Konstantes plantares Auftreten • Konstante Koordination der Vorder- und Hinterbeine • Zehen schleifen immer oder häufig über den Boden • Parallele Fussausrichtung beim Auftreten
19	<ul style="list-style-type: none"> • Konstantes plantares Auftreten • Konstante Koordination der Vorder- und Hinterbeine • Zehen schleifen nie über den Boden • Parallele Fussausrichtung beim Auftreten und Abheben • Schwanz ist meist nach unten gerichtet
20	<ul style="list-style-type: none"> • Konstantes plantares Auftreten • Konstante Koordination der Vorder- und Hinterbeine • Zehen schleifen nie über den Boden • Parallele Fussausrichtung beim Auftreten und Abheben • Schwanz ist konstant nach oben gerichtet • Rumpf ist instabil (Schwanken wird beobachtet)
21	<ul style="list-style-type: none"> • Konstantes plantares Auftreten • Konstante Koordination der Vorder- und Hinterbeine • Zehen schleifen nie über den Boden • Parallele Fussausrichtung beim Auftreten und Abheben • Schwanz ist konstant nach oben gerichtet • Rumpf ist stabil (kein Schwanken)

Die Gummimatte erleichterte das Feststellen des Schleifens der Zehen durch ein kratzendes Geräusch. Konnte eine Beobachtung nicht eindeutig klassifiziert werden, wurde stets der niedrigere der möglichen BBB Punkte erteilt. Zur Auswertung wurden die BBB Werte beider Beine gemittelt.

2.7.4. Lauf über ein horizontales Gitter

Dieser Test zur Untersuchung der Feinkontrolle der Hinterbeine wurde nach Metz et al (Metz et al., 2000; Metz & Whishaw, 2002) durchgeführt. Zur

Durchführung dieses Tests wurde eine horizontale Leiter der Lauflänge 1 m und variabler Breite, 30 cm Abstand vom Untergrund und mit veränderbaren Sprossenabständen verwendet (Spezial-Anfertigung der FA Febikon, Köln, Abb. 2.4.). Der Sprossenabstand wurden wöchentlich verändert, damit die Tiere keine Möglichkeit hatten, sich dem Muster anzupassen (Metz & Whishaw, 2002). Die Lücken zwischen einzelnen Sprossen wurde zwischen 1 und 5 cm eingestellt. An einem Ende der Leiter befand sich als Motivation eine abgedunkelte Kammer, in die sich die Ratten zurückziehen konnten. Initial wurden sie direkt auf die ersten Sprossen der Leiter gesetzt und mit einer Videokamera gefilmt (Panasonic Digital Video Camcorder MX-5). Die Ratten wurden wöchentlich in 5 Durchläufen getestet. Die Auswertung wurde anhand der Videoaufzeichnungen in Zeitlupe vorgenommen. Ein Fehler mit einer Hinterpfote wurde erst gezählt, wenn die Ratte mit der Ferse unterhalb der Sprossenebene lag (vergleiche auch "foot fault score" 0-2 in Metz & Whishaw, 2002).

Es konnten zwei Arten von Fehlern beobachtet werden: Fehler durch Abrutschen von einer Sprosse und „Zielfehler“. Zur Bestimmung der Fehlerzahl/Schritt wurden beide Fehlerarten berücksichtigt. Die Rückzugszeiten eines Fußes wurde nur bei Zielfehlern bestimmt. Der Grund hierfür lag darin, daß bei einem Fehler durch Abrutschen meist auch die Standstabilität nicht gewährleistet ist und die Ratte mit dem Bauch auf den Sprossen aufliegt. Dementsprechend wird die gemessene Zeit um den Fuß wieder hochzuziehen auch stark vom Gewicht der Ratte und dem Grad des Verlustes der Stabilität beeinflusst. Zur Ermittlung der Rückzugszeiten stand ein konventioneller Videorekorder zur Verfügung (Panasonic VCR NV-HS960) mit einer Einzelbilddauer von 40 ms. Es wurde die Zeit ermittelt, die benötigt wurde, um den Fuß aus der niedrigsten Position in die Sprossenebene zu ziehen. Notiert wurde die Anzahl der Videobilder. Daher betrug die maximale Auflösung 40 ms.



Abb. 2.4.: Apparatur zur Untersuchung des Laufes über ein horizontales Gitter. Die Box am Ende der Leiter diente der Motivation zum Überqueren der 1 m langen Laufstrecke.

2.7.5. CatWalk Lokomotions Test

Zur Analyse der Laufmuster der Tiere und des Abstandes der Hinterfüsse wurde der CatWalk Apparat mit dazugehöriger Software nach Hamers et al. (Hamers et al., 2001) verwendet. Diese Apparatur besteht aus einer horizontalen Glasplatte der Länge 1 m, über die die Versuchstiere laufen, während sie von unten mit einer Videokamera gefilmt werden. Die Glasplatte wird von der Seite beleuchtet. Bei Verdunkelung des Raumes sind die Fußabdrücke der Ratten auf der Glasplatte als Lichtflecke von unten zu erkennen. Die Kamera ist direkt mit einem Computer verbunden, der die Videosequenzen digitalisiert. Mit Hilfe der Software können den aufgezeichneten Lichtflecken Hinter- oder Vorderpfoten zugeordnet werden. Die Auswertung des Laufmusters und des Fussabstandes in einem Durchlauf wird dann mit Hilfe der Software errechnet.

Die Tiere sind wöchentlich in 3 Durchläufen auf dem CatWalk getestet worden. Für die Bestimmung der Gleichmässigkeit der Laufmuster wurde der „Regularity

Index“ (RI) nach (Hamers et al., 2001) verwendet. Der Anteil falscher Laufmuster ergab sich dann aus $100\% - \text{RI}$.

Der Fussabstand der Tiere wurde in Bild-Pixeln ermittelt. Die relative Veränderung des Fussabstandes ergab sich aus: $\text{Fussabstand in Woche X} / \text{Fussabstand vor OP}$.



Abb. 2.5: CatWalk Apparatur zur Untersuchung des Laufes auf einer ebenen Fläche. Die Box am Ende dient der Motivation zum Überqueren der 1 m langen Laufstrecke.

2.7.6. Statistische Auswertungen

Zur statistischen Auswertung der unabhängigen quantitativen Verhaltensdaten wurden Varianzanalysen (ANOVA, Software Microcal Origin 6) vorgenommen. Die ANOVA basiert auf der Annahme, daß die Standardabweichung oder Varianz jeder Stichprobe einen Schätzwert für die Varianz der Grundgesamtheit darstellt. Ein weiterer Schätzwert für die Varianz der Grundgesamtheit ergibt sich aus den unterschiedlichen Mittelwerten der Stichproben. Die Ähnlichkeit dieser beiden Schätzwerte gibt eine Wahrscheinlichkeit an, mit der die Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen. Es wurden die selben Rattenpopulationen

zu verschiedenen Zeitpunkten nach Operation untersucht, die Stichproben als annähernd normalverteilt angenommen (s.a. Glantz, 1997).

Zur Feststellung der Signifikanzen unter 3.3.2.1., der Fehlerhäufigkeit beim Lauf über ein horizontales Gitter, wurde zunächst für jedes Tier in jedem Lauf eine prozentuale Fehlerquote pro Schritt bestimmt nach der Formel: Anzahl Fehler/Anzahl Schritte = Fehlerquote pro Schritt [%]. Es wurden alle einzelnen Fehlerquoten der einzelnen Läufe der Tiere einer Gruppe zur Ermittlung der mittleren Fehlerquote der Gruppe und zur Berechnung der ANOVA herangezogen. Eine Mittelung der Werte der einzelnen Tiere über die drei Läufe fand nicht statt.

Zur Feststellung der Signifikanzen unter 3.3.3.1., der Anteil irregulärer Laufmuster, wurde ebenfalls für jeden Lauf über den CatWalk ein Regularitätsindex erstellt und nicht über alle 5 Läufe gemittelt.

Die Wahrscheinlichkeit signifikanter Unterschiede der ANOVA wurden mit folgenden Signaturen bezeichnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1. Immunhistochemische Charakterisierung der läsionsinduzierten Narbe im Rückenmark der adulten Ratte

Zur Charakterisierung der läsionsinduzierten Narbe im Rückenmark der adulten Ratte wurde die im Methodenteil beschriebene Drahtmesser Läsion des dorsalen CST und der Hinterstrangbahnen an Th8 (thorakale Höhe 8) durchgeführt. Die experimentellen Gruppen für die histologische Untersuchung der Narbe sind in Tabelle 3.1. aufgeführt.

Tabelle 3.1.: Experimentelle Gruppen für histologische Analysen

Überlebenszeit	7 Tage	12 Tage	30 Tage	12 Wochen
Behandelt	N=3	N=3	N=5	-
Kontrolle	N=5	-	N=3	N=3

3.1.1. Untersuchungen in lädierten Kontrolltieren

Rückenmarksgewebe der in Tabelle 3.1. aufgeführten Kontrolltiere wurde nach den im Material und Methodenteil beschriebenen Protokollen präpariert. Immunhistochemische Färbungen wurden mit verschiedenen Antikörpern an 10 µm dünnen sagittalen Schnitten der Rückenmäcker in der Läsionsgegend durchgeführt. Eine Zusammenstellung der Antikörperfärbungen in Rückenmarksgewebe in ca. 1 cm Entfernung von der Läsion ist in Abb 3.1. dargestellt. In dieser und allen folgenden Abbildungen sind sagittale Rückenmarksschnitte dargestellt mit der Ausrichtung dorsal = oben, caudal = rechts. (A) zeigt eine immunhistochemische Färbung gegen Coll IV, in der Blutgefäße im intakten Gewebe zu erkennen sind. Diese dienen der internen Kontrolle einer spezifischen Coll IV-IR. Zur Kontrolle der Gewebeintegrität der Rückenmarksschnitte in der Läsionsgegend wurden Nissl Färbungen durchgeführt. In der gezeigten Nissl Färbung (B) sind Motoneurone mit großem

Soma in der grauen Substanz auffällig. (C&D) zeigen GFAP Färbungen mit kleineren dicht gepackten Astrozyten in der grauen Substanz und etwas größeren Astrozyten in der weißen Substanz. In (E&F) sind immunhistochemische Färbungen mit dem *panaxonal* Marker PAM dargestellt. Dieser erkennt phosphatierte Neurofilamente.

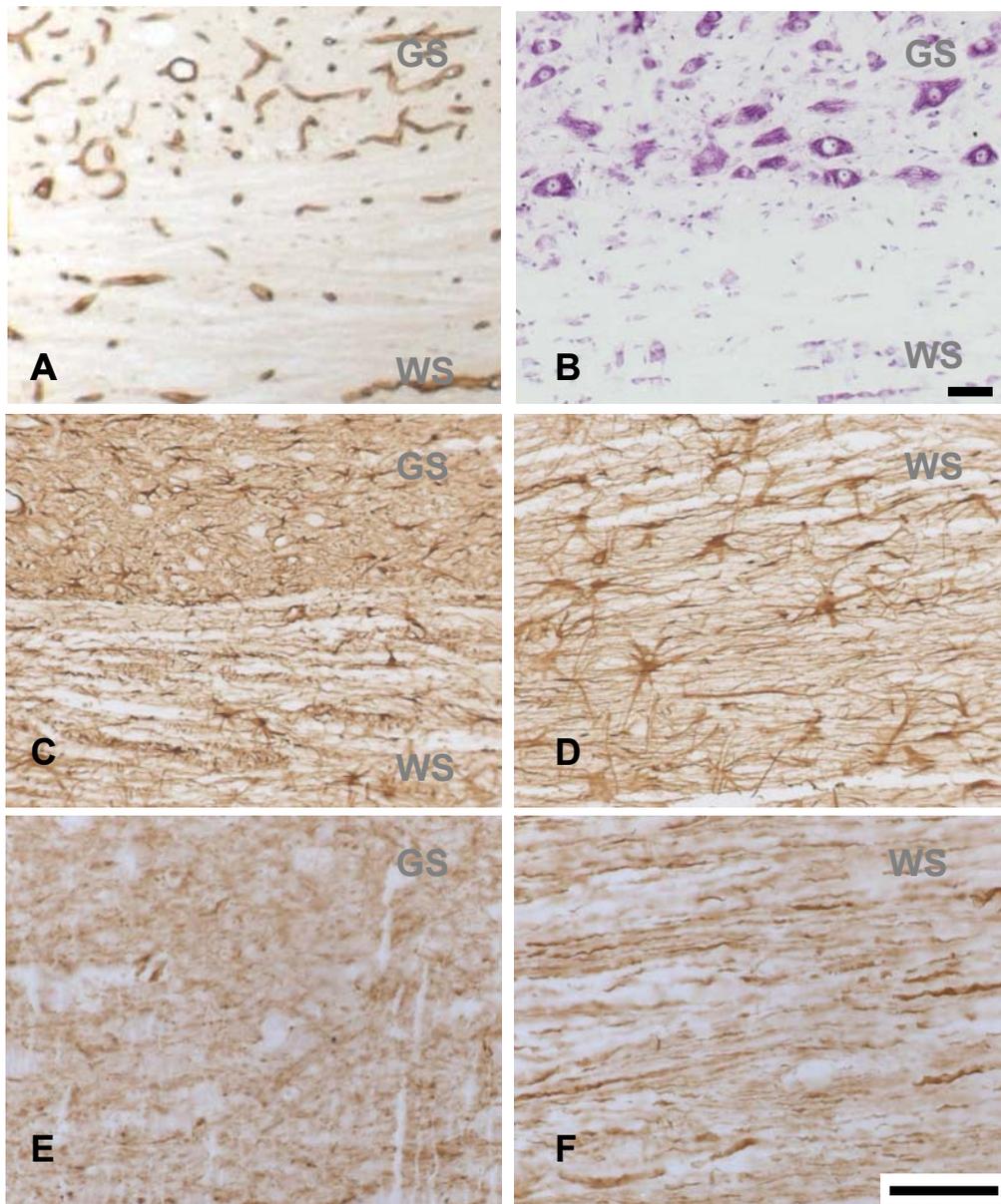


Abb: 3.1: Immunhistochemische Färbungen in 10 µm dicken sagittalen Schnitten des Rückenmarksgewebes lädierter Kontrolltiere 7 Tage nach Operation in einiger Entfernung zur Läsion (ca. 1 cm). (A) Coll IV-IR, (B) Nissl Färbung, (C&D) GFAP-IR, (E&F) PAM-IR. GS= graue Substanz, WS= weiße Substanz. Maßbalken: (A-D) in (B): 50 µm, (E&F) in (F): 50 µm.

3.1.1.1. Immunhistochemische Färbung der Kollagen IV-haltigen fibrösen Narbe in Kontrolltieren

Die Gewebeprozessierung der Rückenmarksgewebe perfundierter Kontrolltiere wurde nach Hermanns et al. (Hermanns & Müller, 2001) durchgeführt. Zur immunhistochemischen Färbung der Coll IV-haltigen fibrösen Narbe im Läsionszentrum stand anfangs nur der Coll IV Antikörper der Firma Progen zur Verfügung, der zur Detektion von Coll IV die im Methodenteil aufgeführte Mikrowellen Demaskierung der Epitope benötigte. Durch die Mikrowellenbehandlung kam es oft zu Gewebeerlust bzw. starker Gewebebeschädigung. Nach Etablierung eines Färbeprotokolls für den Coll IV Antikörper der Firma Biodesign ohne Mikrowellenbehandlung konnten diese Antikörper direkt miteinander verglichen werden. Abb 3.2. zeigt immunhistochemische Färbungen an 10 µm dünnen sagittalen Rückenmarksschnitten eines Kontrolltieres 7 Tage nach OP. (A) und (B) sind direkt benachbarte Schnitte und wurden mit dem Progen Coll IV Antikörper (A) bzw. dem Biodesign Coll IV AK (B) immunhistochemisch gefärbt. Beide Färbungen zeigen Blutgefäße in der Läsion und in umliegendem Gewebe. Die Progen Coll IV-IR ist allerdings erheblich blasser und benötigt zur Auswertbarkeit eine Nickel-Intensivierung. Die vergrößerten Ausschnitte (a) und (b) zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen diesen Färbungen. Die im direkten Nachbarschnitt angefärbten tuchartigen Strukturen in (b) sind in (a) sehr schwer wiederzufinden. Es konnte festgestellt werden, daß der Progen Coll IV Antikörper nach dem verwendeten Protokoll weniger Coll IV positive Strukturen in der fibrösen Narbe aufzeigte als der Biodesign Antikörper. Da Coll IV und Laminin in Basalmembranen Netzwerke ausbilden (s. Einleitung), kann angenommen werden, daß Coll IV positive Strukturen auch Laminin positiv erscheinen. Der Vergleich der Progen Coll IV-IR (C) mit der Laminin-IR in einem Nachbarschnitt (D) zeigte, daß die Progen Coll IV Färbung wesentlich weniger tuchartige Strukturen aufweist als die Laminin Färbung (s. Vergrößerungen in (c&d)).

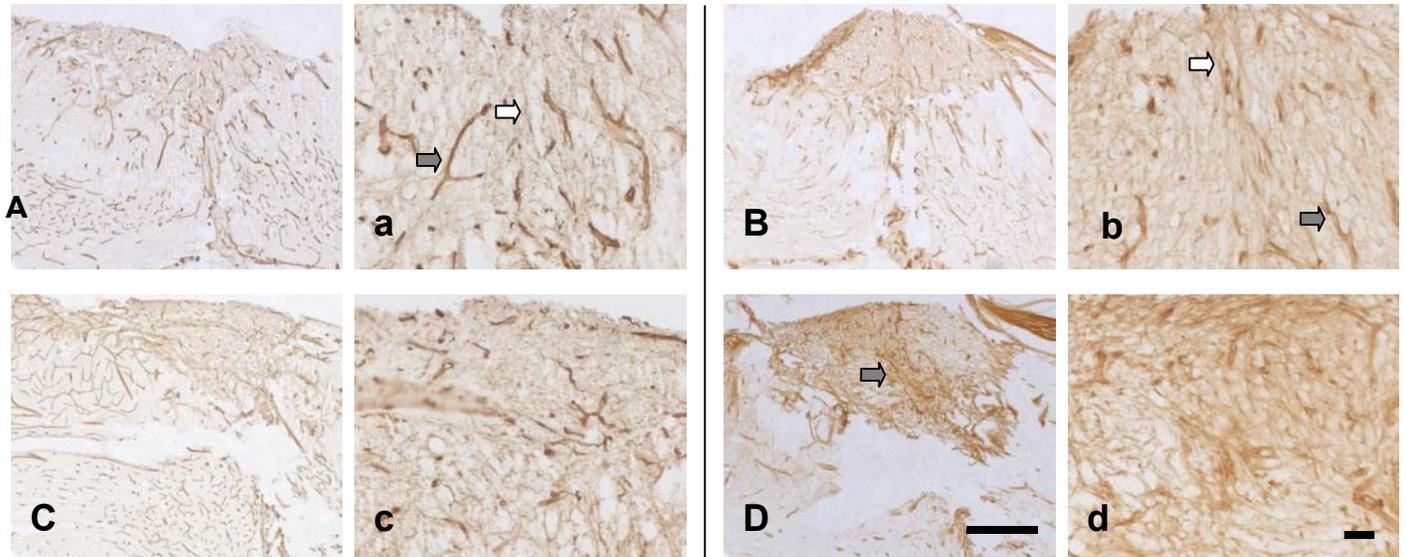


Abb. 3.2. : Immunhistochemische Färbungen von 10 µm dünnen sagittalen Schnitten des Rückenmarksgewebes im Läsionszentrum eines lädierten Kontrolltieres 7 Tage nach OP. Ausrichtung der Schnitte: dorsal=oben, distal=rechts. (A,a) und (C,c): Progen Coll IV-IR; (B,b) Biodesign Coll IV-IR; (D,d) Laminin-IR. (A) ist direkt benachbart zu (B), sowie (C) zu (D). Offene Pfeile markieren tuchartige Strukturen, gefüllte Pfeile markieren Blutgefäße. Es sind jeweils Übersichtsabbildungen der fibrösen Narbe und Vergrößerungen aus dem Läsionszentrum dargestellt. Maßbalken (A-D) in (D): 500 µm; (a-d) in (d): 50 µm.

3.1.1.2. Immunhistochemische Färbungen der GFAP-reichen Glianarbe

In Kontrolltieren wurde nach unterschiedlichen Überlebenszeitpunkten untersucht, wie die Coll IV-haltige fibröse Narbe im Verhältnis zur GFAP-reichen Glianarbe lokalisiert ist. Abb 3.3. zeigt jeweils benachbarte sagittale Rückenmarksschnitte von Kontrolltieren 7 Tage nach OP (A-B) und 30 Tage nach OP (C), die immunhistochemisch gegen Coll IV bzw. GFAP gefärbt sind. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Coll IV-IR und GFAP-IR komplementär lokalisiert sind. Während (A) und (A') eine fast vollständig komplementäre Anordnung zeigen, sind in (B) und (B') auch Bereiche erkennbar, die weder Coll IV noch GFAP positiv sind. Es sind auch Bereiche zu erkennen, an denen Gewebeverlust durch Prozessierung aufgetreten ist (offene Pfeile in Übersichtsbildern) oder Einblutungen vorliegen (gefüllte Pfeile in Übersichtsbildern).

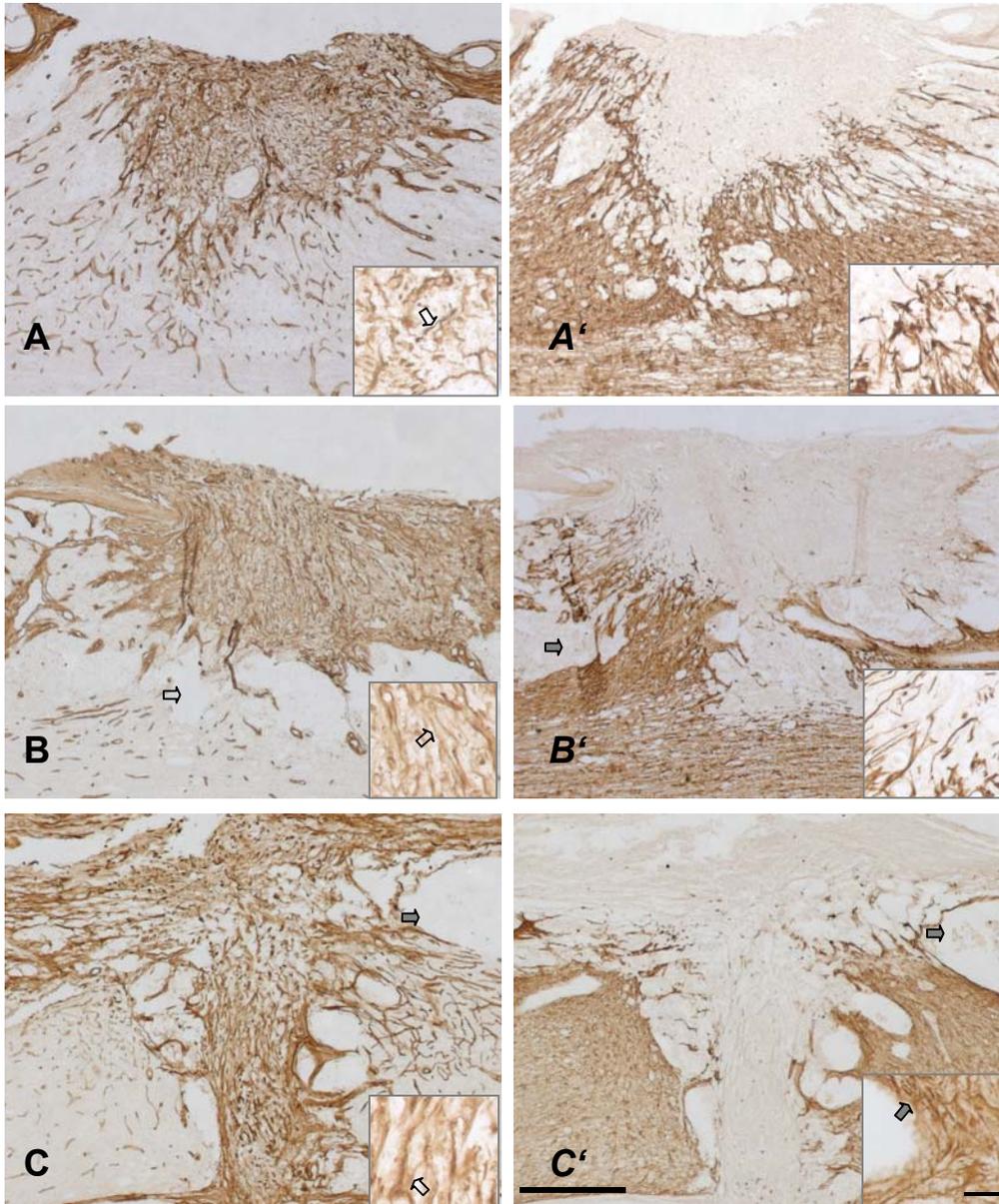


Abb 3.3. : Komplementäre Verteilung der Coll IV-positiven fibrösen Narbe und der GFAP-positiven Glianarbe. Immunhistochemische Färbungen von 10 µm dicken sagittalen Schnitten des Rückenmarksgewebes im Läsionszentrum lädiertter Kontrolltiere 7 Tage (A&B) bzw. 30 Tage (C) nach OP. (A,B,C) Coll IV Färbungen, (A',B',C') GFAP Färbungen. Offene Pfeile markieren in Übersichtsbildern Gewebeverlust durch Prozessierung, in Vergrößerungen Coll IV-IR in tuchartigen Strukturen, gefüllte Pfeile markieren in Übersichtsbildern Einblutungen, in Vergrößerungen eine dichte Grenze GFAP positiver Ausläufer. Maßbalken (A-C) in (C'): 500 µm, Vergrößerungen: 50 µm.

(C) und (C') zeigen auch nach 30 Tagen eine komplementäre Verteilung von Coll IV-IR und GFAP-IR. Die Zone reaktiver Astrozyten ist nicht auf das Gewebe in direkter Nachbarschaft zur Läsion beschränkt, sondern erstreckt sich weit

entlang des Rückenmarks (bisher bis zu 1,5 cm proximal bzw. distal der Läsionsmitte beobachtet). Auch nach 30 Tagen bleibt die erhöhte Immunreaktivität von GFAP erhalten. Die Grenze zwischen fibröser und Glianarbe erscheint entweder locker, mit astrozytären Ausläufern, die sich in das Läsionszentrum hinein erstrecken (Vergrößerungen in A' und B') oder es ist eine *glia limitans* aus einem Geflecht feiner astrozytären Ausläufer zu erkennen (C'), die das geschädigte Gewebe klar abgrenzt (offener Pfeil in C'). Zur Verdeutlichung der tuchartigen Coll IV-positiven Strukturen in der Narbe wurden einige beispielhaft mit gefüllten Pfeilen in den Vergrößerungen von (A,B,C) markiert.

3.1.1.3. Immunhistochemische Färbungen des Rückenmarksgewebes lädierter Kontrolltiere mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Neurofilament

Zur Untersuchung lädierter Neurone wurden immunhistochemische Färbungen mit dem *panaxonal Marker* PAM durchgeführt. Abb. 3.4. zeigt die Ergebnisse dieser Färbungen in Rückenmarksgewebe lädierter Kontrolltiere 7 Tage, 30 Tage und 12 Wochen nach OP. Es konnte festgestellt werden, daß zu jedem untersuchten Überlebenszeitpunkt PAM-IR im Läsionszentrum vorlag. Diese war entweder in zellulären oder in faserigen Strukturen lokalisiert. Während das gesunde Gewebe in weißer Substanz klare faserartige Strukturen zeigte und in grauer Substanz zumindest eine klare Färbung nachweisbar war (s. Abb. 3.1.) war die PAM-IR im Läsionszentrum sehr schwach. Es war ein großer Anteil ungefärbter Strukturen (wahrscheinlich extrazelluläre Matrix) in der Läsion vorhanden. 7 Tage nach OP konnten zelluläre PAM positive Strukturen beobachtet werden, die morphologisch als Makrophagen identifiziert wurden (gefüllte Pfeile in (a,b,c)). Es ist anzunehmen, daß diese Makrophagen Neurofilament-haltige Faserstücke phagozytierten, die im Prozeß der Waller'schen Degeneration zerstört wurden. Kurze faserartige PAM positive Strukturen waren ebenfalls im Läsionszentrum zu beobachten. In der

untersuchten Zeitreihe nahm die Anzahl an PAM positiven Makrophagen von 30 Tagen zu 12 Wochen nach OP ab.

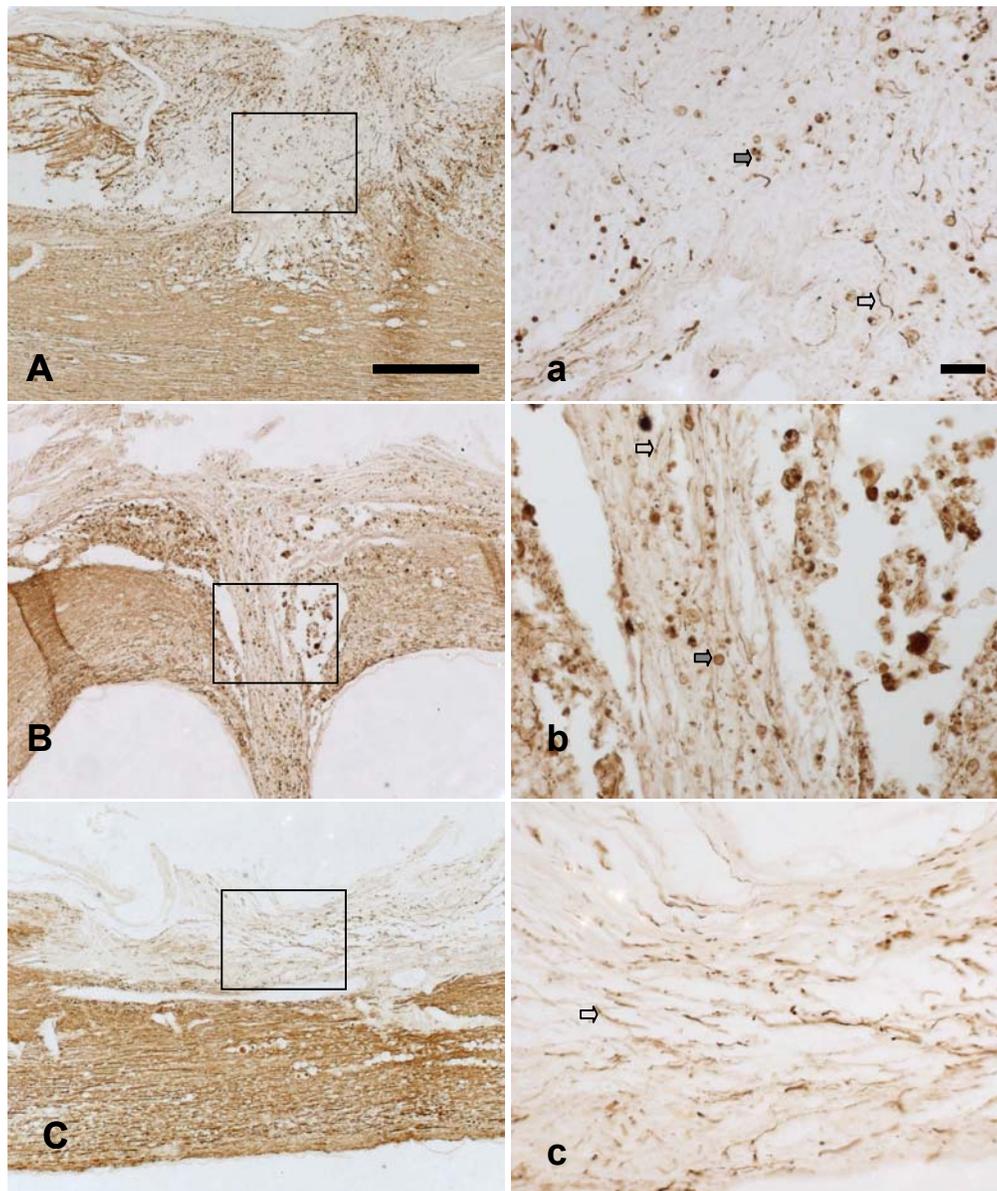


Abb. 3.4: Immunhistochemische Färbungen gegen phosphoryliertes Neurofilament (PAM) zeigten in Rückenmarksläsionen keine eindeutig negative Struktur im Läsionszentrum. (A,a) 7 Tage, (B,b) 30 Tage, (C,c) 12 Wochen nach Läsion. Die rechte Spalte zeigt Vergrößerungen der Abbildungen der linken Spalte (Rechteck). Offene Pfeile: faserartige positiv Strukturen, gefüllte Pfeile: zelluläre positive Strukturen. Maßbalken (A,B,C) in (A) 500 μ m, (a,b,c) in (a) 50 μ m.

Faserartige Strukturen waren auch 12 Wochen nach OP noch zu erkennen (c).

3.1.2. Effekt der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf das Läsionszentrum und umliegendes Rückenmarksgewebe

Um den Effekt der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf das Rückenmark genauer zu charakterisieren, wurden die in Tabelle 3.1. aufgeführten behandelten Tiere nach unterschiedlichen Überlebenszeiten perfundiert und das Gewebe nach den im Material und Methodenteil beschriebenen Protokollen prozessiert und gefärbt.

3.1.2.1. Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Kollagen IV-haltige fibröse Narbe und die Glianarbe

7 Tage nach OP war die Coll IV-haltige fibröse Narbe im Läsionszentrum von Kontrolltieren als dichte Struktur klar erkennbar. In Abb. 3.5. sind immunhistochemische Färbungen gegen Coll IV und gegen GFAP in behandelten Tieren dargestellt. 7 Tage und 12 Tage nach OP war eine deutliche Reduktion des Coll IV Netzwerkes im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 3.3.) erkennbar. Die GFAP-IR in der Glianarbe war durch die Behandlung zur Narbenreduktion nicht beeinflusst. Des Weiteren waren auch in behandelten Tieren die zwei verschiedenen Abgrenzungen zwischen fibröser Narbe und Glianarbe erkennbar, die in Kontrolltieren beobachtet wurden: die strukturell dichte GFAP positive Grenzschicht mit astrozytären Ausläufern (offene Pfeile) und die lockere Grenze. Nach 30 Tagen erschienen sowohl die Coll IV-IR als auch die GFAP-IR vergleichbar derer in Kontrolltieren. Die komplementäre Verteilung der Glianarbe und der fibrösen Narbe wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst. Reaktive Astroglieose wurde demnach nicht durch die Komponenten der Behandlung unterdrückt.

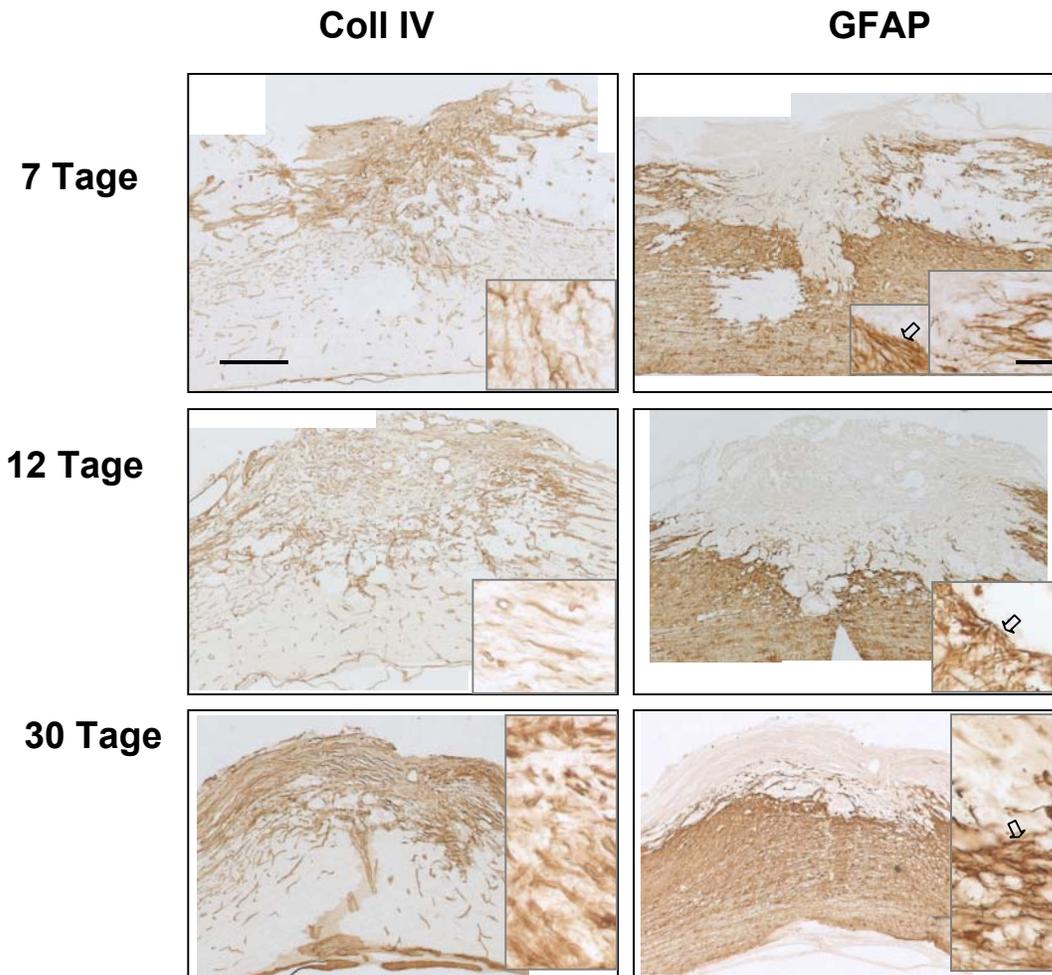


Abb. 3.5: Ergebnis der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Coll IV haltige fibröse Narbe im Läsionszentrum und die Glianarbe. Immunhistochemische Färbungen gegen Coll IV (linke Spalte) und GFAP (rechte Spalte) in 10 µm dünnen Rückenmarksschnitten von drei behandelten Tieren (7, 12 und 30 Tage nach OP). Nebeneinander liegende Abbildungen zeigen Nachbarschnitte desselben Tieres. Vergrößerungen in Übersichtsbildern der Coll IV-IR zeigen aufgelockerte Narbenstrukturen nach 7 und 12, nicht aber nach 30 Tagen. Vergrößerungen in Übersichtsbildern der GFAP-IR zeigen Übergänge zwischen der Glianarbe und der fibrösen Narbe. Pfeil: GFAP positive astrozytäre Ausläufer (*glia limitans*). Maßbalken in Übersichten: 500 µm, in Vergrößerungen: 50 µm.

3.1.2.2. Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Verteilung von Chondroitin Sulfat Proteoglykanen

Zur Untersuchung der Verteilung von Chondroitin Sulfat Proteoglykanen (CSPG) wurde der im Material und Methodenteil beschriebene Antikörper CS-56 benutzt, der C4 und C6 sulfatierte Zuckerseitenketten der CSPG erkennt. Abb. 3.6. zeigt die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit dem CS-56 Antikörper im Vergleich zu Coll IV-IR in Nachbarschnitten eines Kontrolltieres 7 Tage nach OP und behandelte Tiere 12 Tage und 14 Tage nach OP. Die CS-56 -IR war im Läsionszentrum der Kontrolltiere nach 7 Tagen verglichen mit umliegendem Gewebe stark erhöht (B). Die CS-56-IR und Coll IV-IR in Nachbarschnitten waren deckungsgleich lokalisiert (A&B). In behandelten Tieren führte die Behandlung zur Narbenunterdrückung zu einer geringen Coll IV-IR nach 12 Tagen (C). In Nachbarschnitten konnte beobachtet werden, daß auch die CS-56-IR im Läsionszentrum gegenüber Kontrollen reduziert war. 30 Tage nach Behandlung waren sowohl die Coll IV-IR als auch die CS-56-IR im Läsionsbereich prominent und mit Kontrolltieren vergleichbar (E&F).

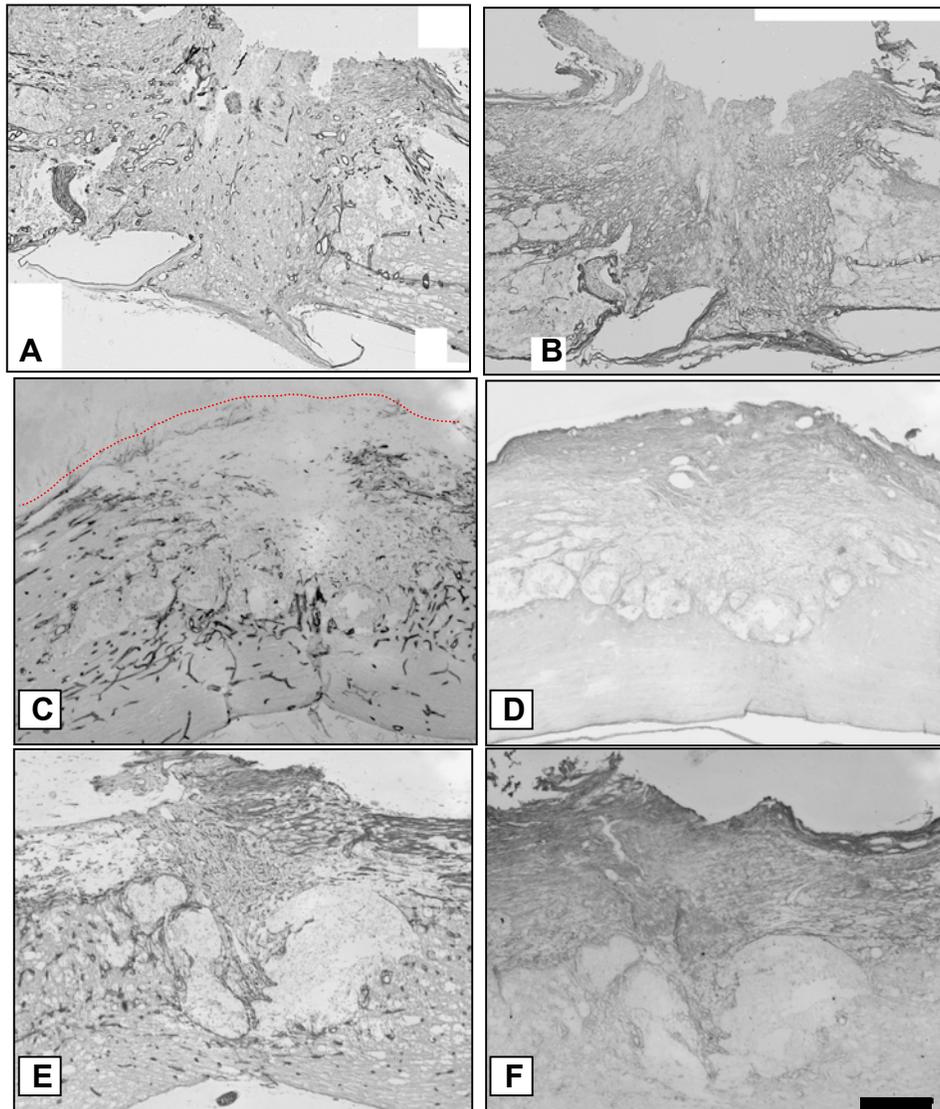


Abb. 3.6 : Immunhistochemische Färbungen in 10 µm dicken sagittalen Schnitten des Rückenmarksgewebes eines behandelten Tieres 7 Tage nach OP (A&B), eines behandelten Tieres 12 Tage nach OP (C&D) und 14 Tage nach OP (E&F). (A,C,E) Coll IV-IR, (B,C,F) CS-56-IR. Abbildungen einer Zeile zeigen benachbarte Schnitte. Maßbalken in (F): 500 µm.

3.1.2.3. Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf Neurofilamentfärbungen mit dem *panaxonal* Marker PAM im Läsionszentrum

Färbungen mit dem *panaxonal* Marker PAM sollten Auskunft darüber geben, ob die Behandlung zur Unterdrücken der fibrösen Narbe zu einer Veränderung in der Neurofilamentfärbung führte. Abb. 3.7. zeigt PAM-IR in einem Kontrolltier und drei behandelten Tieren 30 Tage nach OP.

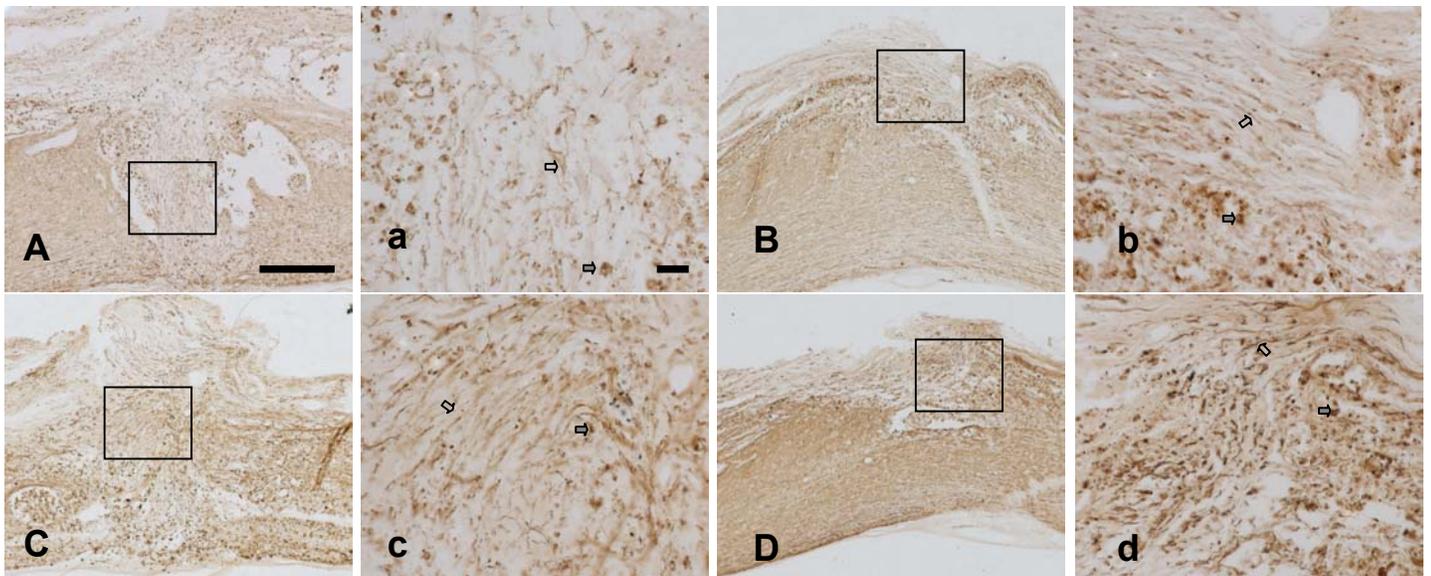


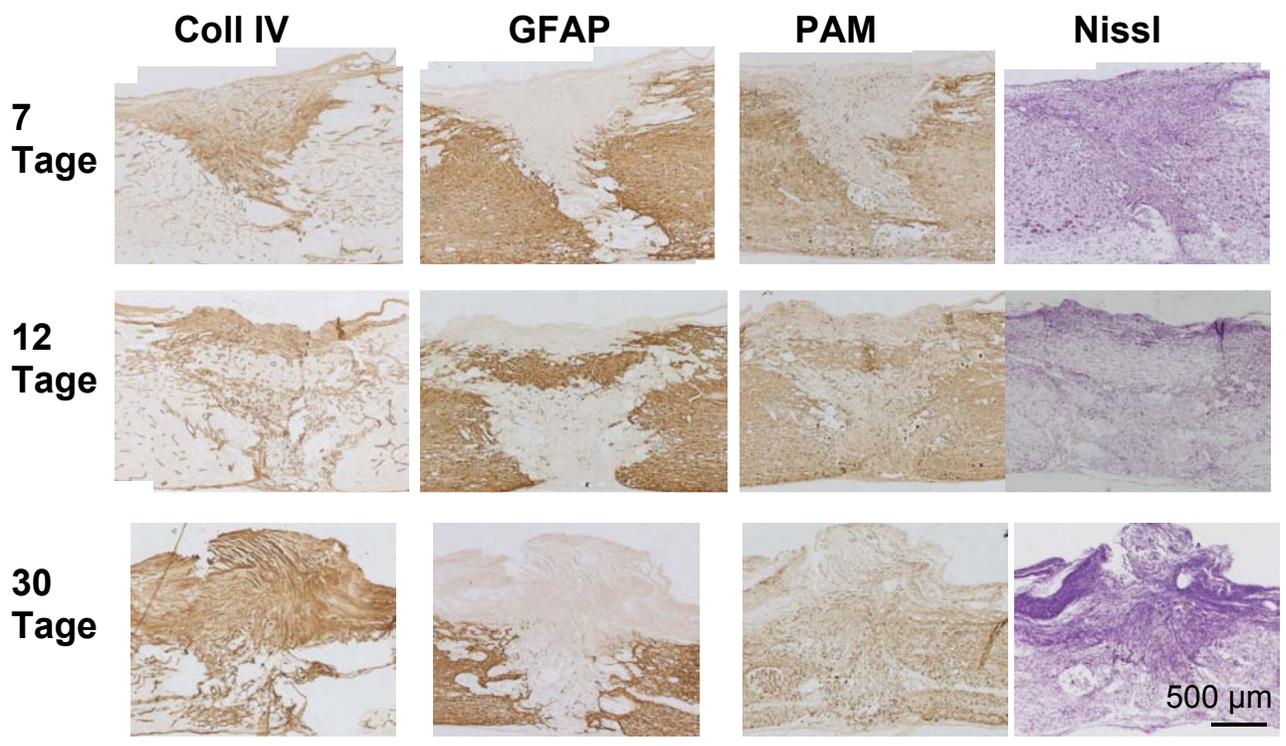
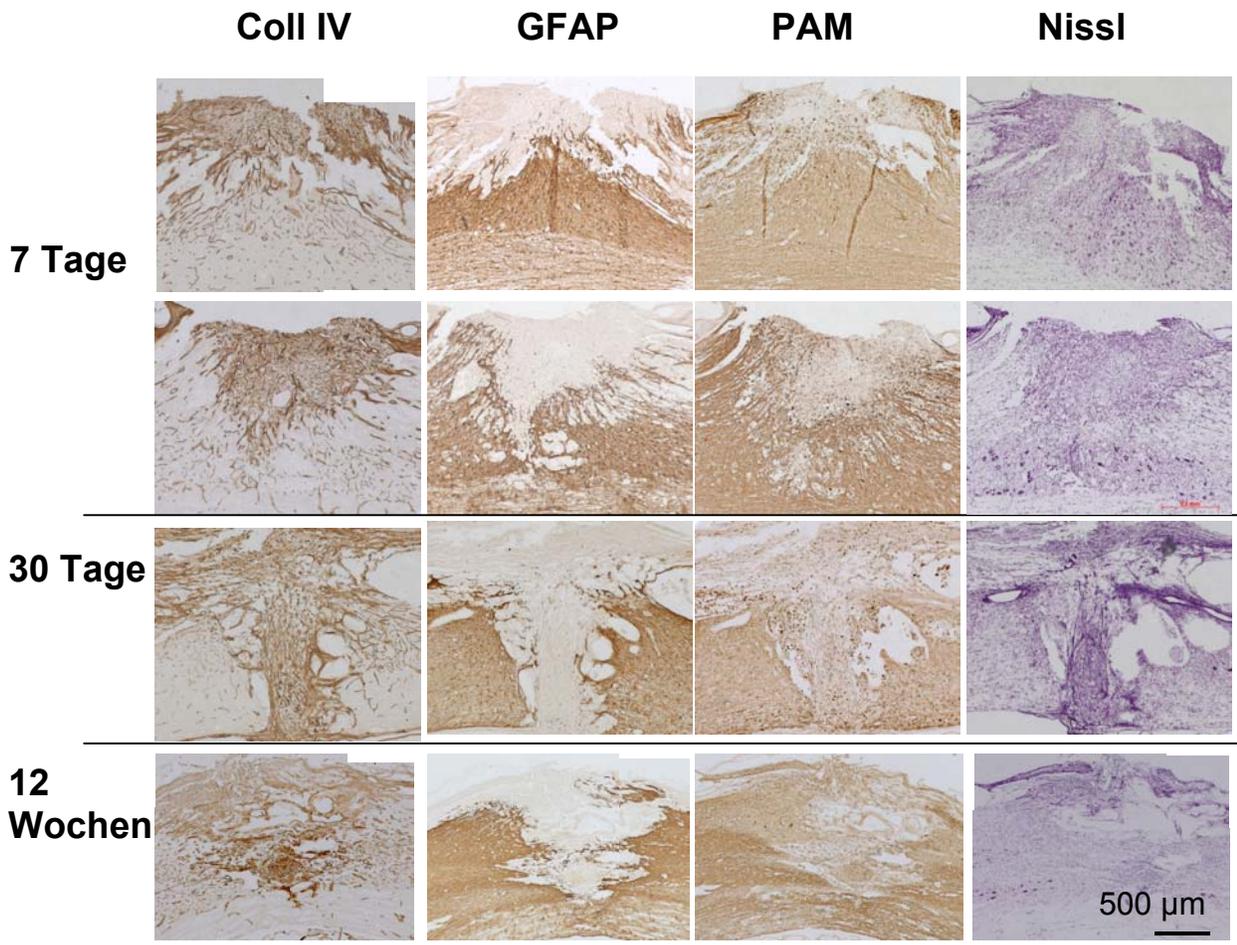
Abb. 3.7.: Immunhistochemische Färbungen gegen phosphoryliertes Neurofilament (PAM) in einem Kontrolltier 30 Tage nach Läsion (A,a) und in behandelten Tieren 30 Tage nach Läsion (B,b,C,c,D,d). Es sind jeweils Übersichtsbilder und Vergrößerungen dargestellt (Rechtecke). Offene Pfeile: faserartige Strukturen, gefüllte Pfeile: zelluläre Strukturen. Maßbalken (A,B,C,D) in (A) 500 μ m, (a,b,c,d) in (a) 50 μ m.

Es waren in allen Tieren Pam-positive Strukturen im Läsionszentrum zu erkennen (vgl. Abb 3.4.). Auch in behandelten Tieren konnten zelluläre Strukturen beobachtet werden, die sich mit dem PAM Antikörper anfärben ließen (gefüllte Pfeile in (a-d)). Behandelte Tiere zeigten im Läsionszentrum untersuchter Rückenmarksschnitte allerdings eine auffällig grössere Anzahl an faserigen Strukturen (offene Pfeile in (a-d)) als Kontrolltiere. Eine genaue Quantifizierung dieser Strukturen war allerdings nicht möglich.

3.1.3. Zusammenfassung

Abb 3.8. zeigt eine Zusammenstellung der immunhistochemischen Färbungen gegen Coll IV, GFAP, PAM und Nissl Färbungen an benachbarten Rückenmarksschnitten von Kontrolltieren und Abb. 3.9. in behandelten Tieren zu mehreren Überlebenszeitpunkten. Es konnte festgestellt werden, daß die Coll IV-IR nach 7 Tagen, 30 Tagen bzw. 12 Wochen in Kontrolltieren unverändert blieb. Auch die komplementäre Lokalisation zur GFAP reichen Läsionsumgebung blieb erhalten. Genauere Betrachtung der PAM-IR ließ keine Festlegung einer Neurofilament-reichen Grenzschicht zu. Intakte Faserstrukturen waren von Axondebris nicht sicher zu unterscheiden. Allerdings konnte zwischen 30 Tagen und 12 Wochen nach OP ein Unterschied in der Menge PAM positiver Makrophagen im Läsionszentrum festgestellt werden, die zu späteren Zeitpunkten hin abnahm.

Die Zusammenstellung der immunhistochemischen Färbungen in behandelten Tieren in Abb. 3.10. macht deutlich, daß der auffälligste Unterschied zu Kontrolltieren in der Coll IV-IR bestand und nicht in einer Veränderung der GFAP reichen Glianarbe. 7 und 12 Tage nach OP war die Coll IV-IR in behandelten Tieren deutlich schwächer ausgebildet als in Kontrolltieren. Wie unter 3.1.2.3. erläutert konnten bei genauerer Betrachtung der PAM-IR in behandelten und Kontrolltieren Unterschiede in der Menge angefarbter faserartiger Strukturen beobachtet werden, deren Quantifizierung aber nicht möglich war.



Vorherige Seite oben: Abb. 3.9.: Immunhistochemische Färbungen in benachbarten Rückenmarksschnitten lädierter Kontrolltiere zu unterschiedlichen Überlebenszeitpunkten. Maßbalken für alle Abbildungen unten rechts.

Vorherige Seite unten: Abb. 3.10.: Immunhistochemische Färbungen in benachbarten Rückenmarksschnitten behandelter Tiere zu unterschiedlichen Überlebenszeitpunkten. Das Gewebebeispiel nach 12 Tagen zeigt eine intakte Gewebebrücke, die nicht lädiert worden ist (z.B. dunklere Struktur im Läsionszentrum in GFAP-IR). Maßbalken für alle Abbildungen unten rechts.

3.2. Effekt der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf Axone des Kortikospinaltraktes

Zur Untersuchung des Verlaufes der markierten CST Axone wurden die in Tabelle 3.2. aufgeführten Wistar Ratten verwendet. Alle bis auf 2 Tiere aus der Kontrollgruppe mit einer Überlebenszeit von 4 Monaten gingen in die Verhaltensstudien unter Punkt 3 ein.

Tabelle 3.2.: Experimentelle Gruppe zur Analyse des CST Verlaufes nach Läsion

Überlebenszeit	30 Tage	4 Monate
Behandelt	N=5	N=9
Kontrolle	N=3	N=9
cAMP Kontrolle	-	N=5

3.2.1. Faserverlauf markierter Axone des Kortikospinaltraktes in Kontrolltieren 30 Tage und 4 Monate nach Läsion.

Zur Darstellung der Fasern des CST wurde den in Tabelle 3.2. aufgeführten Kontrolltieren biotinyliertes Dextranamin (BDA) 3 Wochen vor Perfusion in den Motorkortex injiziert, der die Pyramidalneurone enthält, deren Axone den CST im Rückenmark bilden (s. Material und Methoden). Nach Perfusion der Tiere wurde das Rückenmark entweder mit einem Gefriermikrotom 40 – 50 µm oder in Paraffin eingebettet 20 µm dick sagittal geschnitten. Die Anfärbung der markierten Fasern erfolgte daraufhin entweder mit dem fluoreszierenden

Farbstoff Avidin Alexa 488 oder nicht fluoreszent mit dem Avidin-Biotin Komplex (ABC) und nachfolgender DAB-Reaktion (s. Material und Methoden).

Nach einer Läsion retrahiert der mit dem Soma verbundene Axonstumpf und wächst dann aufgrund seiner inherenten Wachstumskapazität wieder aus. Es konnte vielfach beobachtet werden, daß der proximale CST 30 Tage oder 4 Monate nach Läsion in die Nähe der Grenzschicht zwischen Glianarbe und fibröser Narbe gewachsen ist, sogenannte *retraction bulbs* (RB) ausbildete und stoppte. RB sind Verdickungen am Ende retrahierender Axone, die u.a. durch die Degradation des Cytoskeletts entstehen. Abb 3.11. zeigt einen proximalen CST Stumpf, der in der GFAP reichen Glianarbe nahe der Grenzschicht zur Coll IV-reichen fibrösen Narbe stoppte.

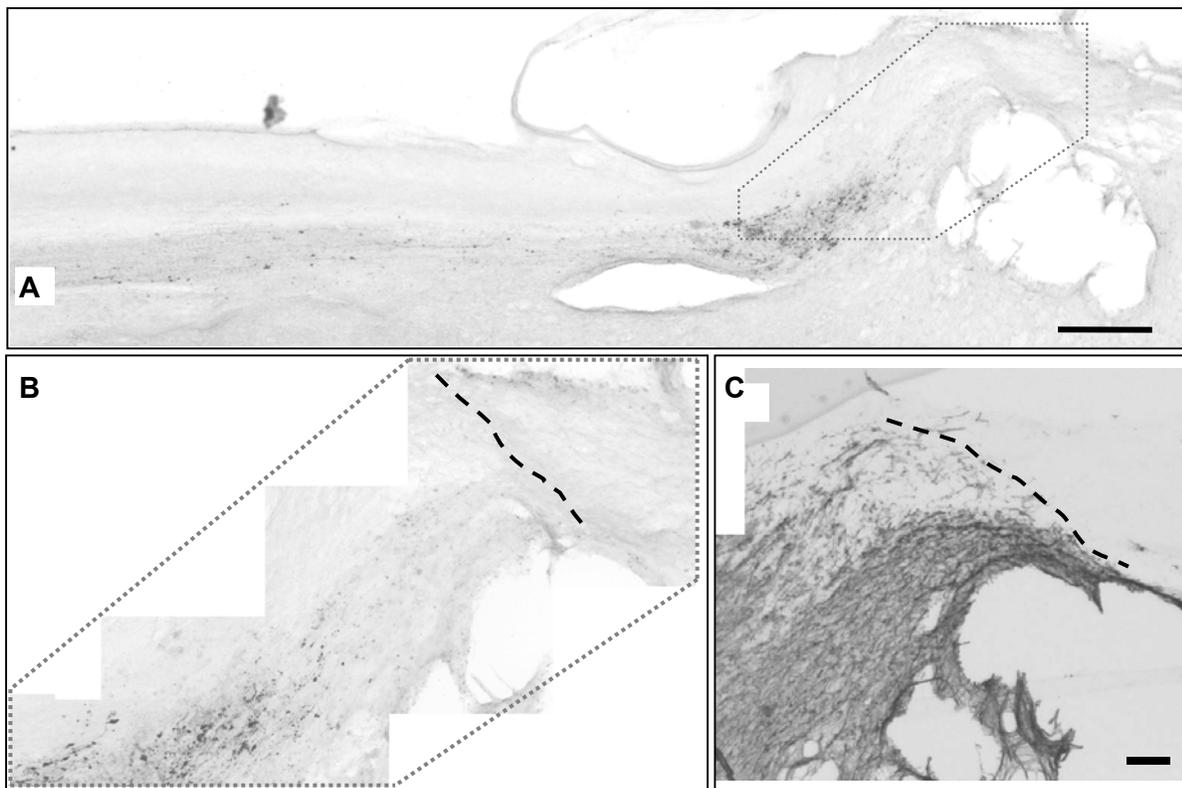


Abb. 3.11. : Nicht-fluoreszente Anfärbung des Markers BDA in markierten CST Fasern eines Kontrolltieres 4 Monate nach OP. (A&B) Färbungen des BDA Tracers in einem 10 µm dünnen Rückenmarksschnitt an der Läsionsstelle (B ist ein vergrößerter Ausschnitt aus A). (C) GFAP-IR des Nachbarschnittes zu (A&B). Unterbrochene Linie deutet Grenzschicht zwischen GFAP-IR und Coll IV-IR an. Maßbalken: (A): 500 µm, (B&C) 100 µm.

Fluoreszente Anfärbung der markierten Fasern mit dem Farbstoff Avidin Alexa 488 ermöglichten eine höhere Auflösung der Strukturen markierter Fasern und machten eine Beobachtung der ausgebildeten RB möglich. Eine Vergrößerung der RB markierter CST Axone eines Kontrolltieres 30 Tage nach OP proximal der Narbe ist in Abb. 3.12. dargestellt.

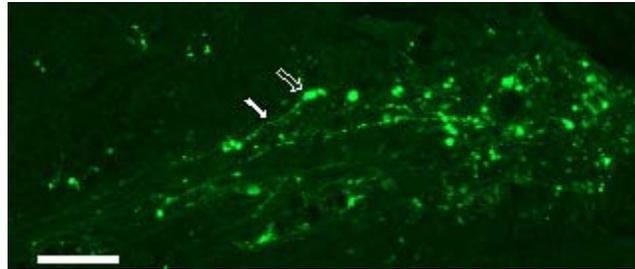


Abb.3.12.: Fluoreszente Anfärbung der markierten CST Fasern 500 μm proximal der Läsionsstelle 30 Tage nach OP. Offener Pfeil deutet auf RB, gefüllter Pfeil auf eine proximale Faser. Maßbalken: 100 μm .

Nach einer Läsion konnte in Kontrolltieren Aussprossen lädierter CST Fasern im proximalen Stumpf beobachtet werden. Abb. 3.13. (A) zeigt ein weit proximal gelegenes markiertes CST Bündel (ca.1 cm Distanz zur Läsion), mit parallelem Faserverlauf. In (B) ist ein der Läsion näher gelegener Abschnitt des CST Bündels des selben Tieres dargestellt (ca. 2 mm proximal der Läsion). Es konnte beobachtet werden, daß proximale CST Fasern in unmittelbarer Nähe zur Läsionsstelle Aussprossungen in weißer und grauer Substanz bildeten. In einigen cAMP-Kontrolltieren konnten hingegen massive Aussprossungen gefunden werden (C), die nicht mit dem Grad der Aussprossung in Kontrolltieren vergleichbar waren.

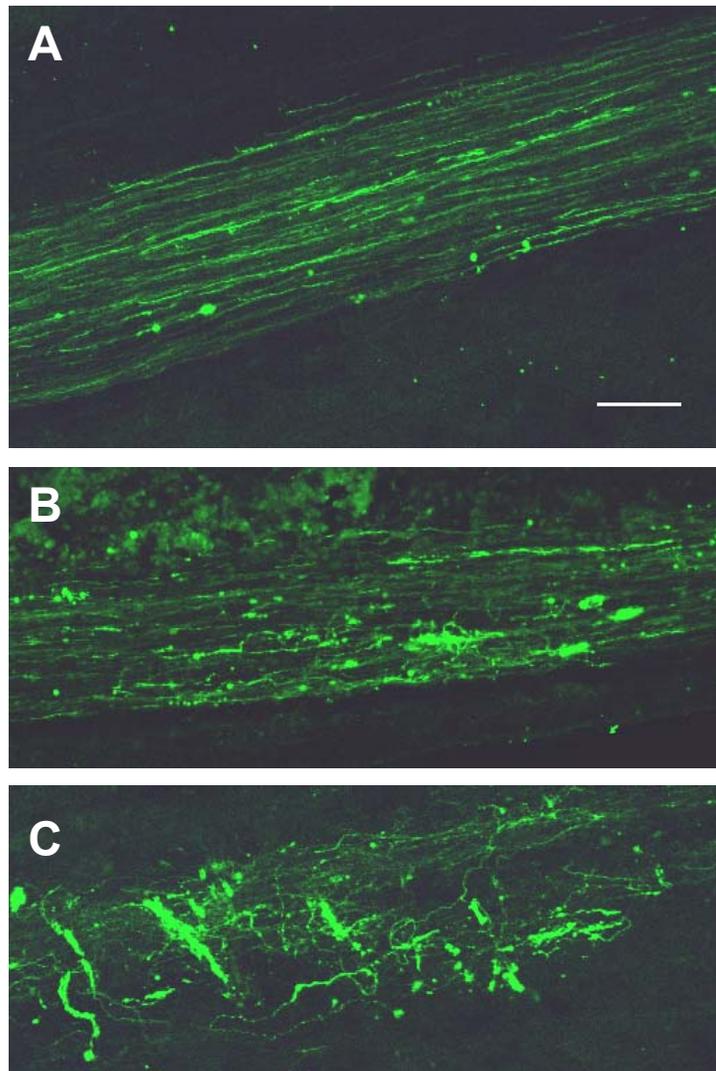


Abb.3.13 : Fluoreszente Färbung markierter CST Fasern in 50 μ m dicken Rückenmarksschnitten 4 Monate nach Läsion. (A) und (B) zeigen Ausschnitte aus dem selben Kontrolltier. Proximale Entfernung zur Läsionsstelle ca. 1 cm (A), ca. 2 mm (B). (C) cAMP Kontrolltier ca. 2 mm proximal der Läsion. Maßbalken: 100 μ m.

3.2.2 Verlauf der Kortikospinaltraktfasern in lädierten Tieren nach Behandlung zur Narbenunterdrückung

Die Detektion regenerierender markierter Fasern im distalen Rückenmark behandelter Tiere wurde an 40 – 50 μ m dicken Kryoschnitten durchgeführt. Die feine Faserstruktur und der gewundenen Verlauf der Fasern machten die

Beobachtungen in nicht fluoreszenten dünnen Schnitten problematisch. In dickeren Schnitten ergab sich unter dem Epifluoreszenzmikroskop das Problem der Überstrahlung und des Gewebehintergrundes. Daher wurden diese Auswertungen mit einem Konfokalen Laserscanmikroskop durchgeführt.

Oft konnten fluoreszierende Zellen in der CST Bahn gesehen werden, die morphologisch Makrophagen glichen. Kontrolltiere und behandelte Tiere zeigten im distalen Bereich des Gewebes fluoreszierende Fasern, die eine intakte Morphologie aufwiesen. Durch die Lokalisation dieser Fasern konnten sie als Bestandteil des ventralen oder lateralen CST Anteils identifiziert werden. In allen behandelten Tieren die auch funktionelle Tests durchliefen konnten distal der Läsion fluoreszierende Fasern gefunden werden, die nach Lokalisation und Morphologie als regenerierte Fasern des dorsalen CST eingestuft wurden. Die örtliche Zuordnung der Fasern war notwendig, da auch Anteile des ventralen und lateralen CST durch den Marker gefärbt werden und somit bei ungenauer Beobachtung fälschlicherweise als regenerierte Axone des dorsalen CST angenommen werden können. Abb. 3.14. zeigt solche regenerierenden CST Fasern im distalen Rückenmark behandelter Tiere 4 Monate nach OP. In (A) und (B) sind regenerierende Axone zu erkennen, die in grauer Substanz verzweigen. In (B) ist ein Axon-Ast herausgehoben, der Varikositäten aufwies, die morphologisch präsynaptischen Verdickungen ähnelten (Vergrößerung in (C)). (D) zeigt ebenfalls eine regenerierende Faser, deren feiner Ausläufer mit Pfeilen angedeutet ist.

Abb. (A-D) zeigen also klar zu identifizierende regenerierende CST Fasern. Ein nicht eindeutiges Beispiel eines fluoreszenten Signals im distalen Rückenmark ist in (E) dargestellt. Die hervorgehobene Struktur zeigte streckenweise eine faserartige Morphologie. Da diese aber in fluoreszierende Signale eingebettet waren, die nicht eindeutig zuzuordnen waren und auch als Artefakt gedeutet werden konnten, wurde in einem solchen Fall nicht die Beobachtung einer regenerierenden Faser angenommen. Zusätzlich zu solchen Strukturen erschwerten fluoreszierende Makrophagen in der Läsionsgegend die Suche nach

regenerierenden Fasern. Daher konnten Faserstücke in der Läsion selbst sehr schwer detektiert werden.

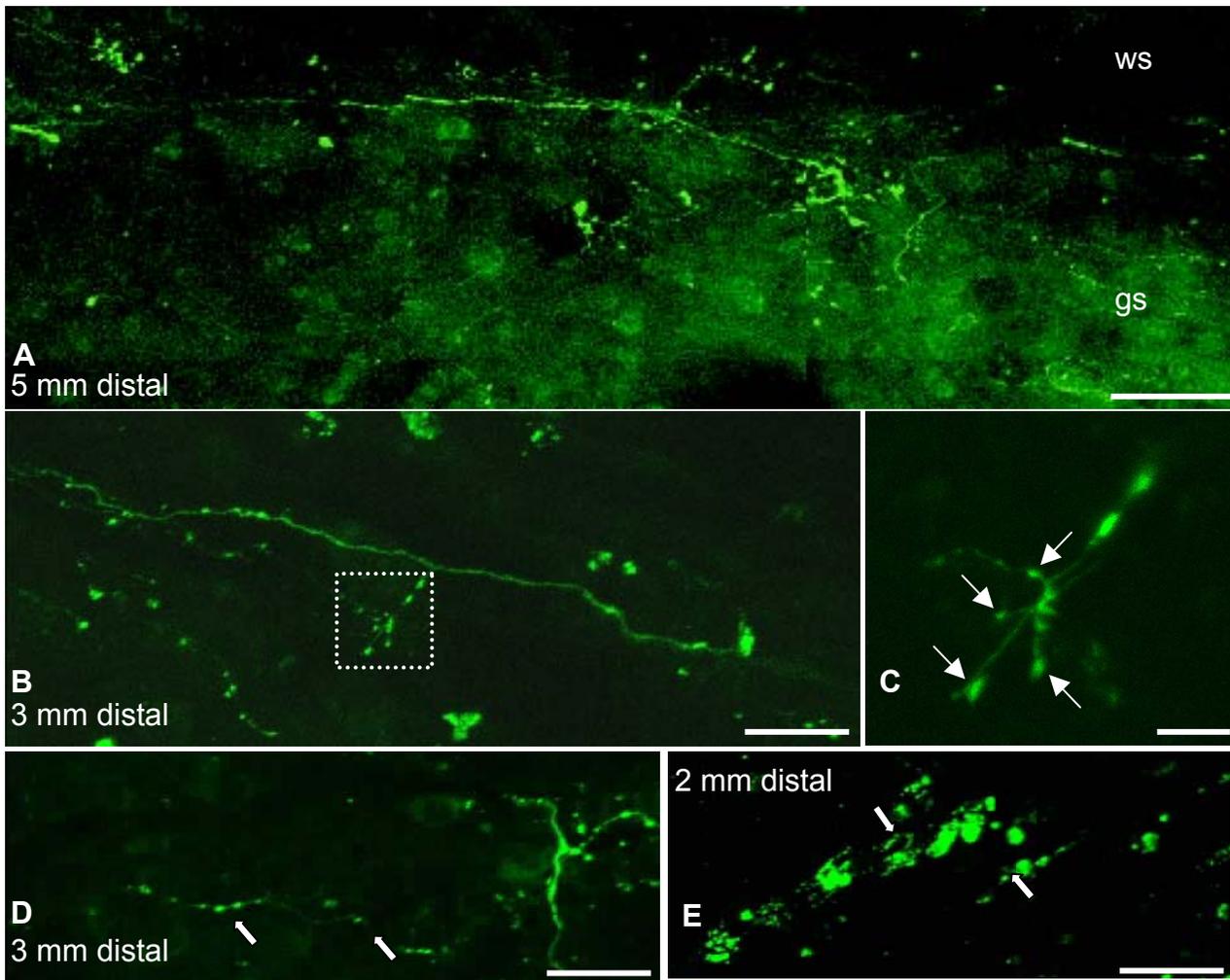


Abb. 3.14.: Konfokale Aufnahmen BDA markierter und mit Alexa 488 visualisierter CST Fasern distal der Läsionsstelle in 40 μm Kryoschnitten von Rückenmarkern behandelter Tiere 4 Monate nach OP. (A-C) regenerierende distale CST Fasern mit terminalen Arborisierungen in grauer Substanz. (C) ist eine Vergrößerung aus (B). Pfeile in (C) markieren Varikositäten, die präsynaptischen Boutons gleichen. (D): weiße Pfeile deuten den Verlauf der markierten Faser an. (E) gefärbte Struktur, die faserahnliche Abschnitte aufweist (Pfeile). GS= graue Substanz, WS= weiße Substanz. Masbalken: (A) 100 μm , (B,D,E), 50 μm , (C) 10 μm .

Bei diesen Tieren wurden auch weiter caudal gelegene Rückenmarkssegmente aufbewahrt und prozessiert. In einer maximalen Entfernung zur Läsion von ca. 1,8 cm konnten noch fluoreszierende Fasern gefunden werden, die aufgrund ihrer Morphologie und Lokalisation als regenerierende Fasern des dorsalen CST identifiziert wurden.

3.3. Effekt der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf das lokomotorische Verhalten der Ratten

Zur Untersuchung der funktionellen Auswirkungen der Behandlung zur Narbenunterdrückung wurden 36 weibliche Wistar Ratten des Alters 6-8 Wochen über einen Zeitraum von 16 Wochen nach Läsion mit verschiedenen Verhaltenstests untersucht. Alle Ratten wurden 3 Wochen lang vortrainiert (s. Material und Methoden). In keinem der Tests gab es signifikante Unterschiede zwischen unlädierten Ratten, die individuellen lokomotorischen Verhaltensweisen waren gut vergleichbar. Diese 36 Ratten wurden in 4 experimentelle Gruppen aufgeteilt:

- (1) Sham operierte Tiere (nur Eröffnung der Dura auf Th8);
- (2) Puffer Kontrolltiere (Drahtmesserläsion und Pufferinjektion, Elvax mit Puffer);
- (3) cAMP Kontrolltiere (Drahtmesserläsion, Pufferinjektion, cAMP Applikation, Elvax mit Puffer);
- (4) Behandelte Tiere (Drahtmesserläsion, Injektion von BPY-DCA, Applikation von cAMP, Elvax mit BPY-DCA).

In der Gruppe der mit cAMP allein behandelten Tiere wurden in 5 von 9 Tieren Autotomie beobachtet (s. Material und Methodenteil). Aus den unter 2.7.2. (Material und Methoden) angeführten Gründen wurden diese Tiere nicht in die lokomotorischen Funktionstest einbezogen.

3.3.1 Offenfeldbeobachtung der Versuchstiere und Bewertung der freien Lokomotion nach der BBB Klassifizierung

Zur Klassifizierung der freien Bewegung der Versuchstiere wurden diese einmal pro Woche in einem Offenfeld für ca. 4 min einzeln beobachtet und nach der BBB Lokomotions Klassifizierung bewertet. Diese Klassifizierung wurde von Basso et al. zur Beurteilung kontusionslädiertes Ratten entwickelt (s. Material und Methoden). Bei einem BBB von 0 zeigte die Ratte keine spontane Bewegung der Hinterbeine, während ein BBB von 21 einer normal laufenden Ratte vergeben wurde. Die Resultate der Bewertung der freien Lokomotion in einem Offenfeld ist in Abb. 3.15. dargestellt.

Sham operierte Tiere wurden wie beschrieben einer Laminektomie und Duraeröffnung an Th8 unterzogen. Nur 3 der 9 Tiere dieser Gruppe zeigten Defizite in den Wochen 1-3 nach OP und erreichten minimale BBB Werte von 12 und 13 (C). Ab der 4. Woche zeigten alle Sham Tiere normales Laufverhalten und erreichten den maximalen BBB Wert 21. Der Verlauf des BBB der Puffer Kontrolltiere ist in (B) dargestellt. Alle Puffer Kontrolltiere zeigten eine Verschlechterung des BBB auf Werte bis maximal 11 in der ersten Woche. Kein Puffer Kontrolltier konnte zu diesem Zeitpunkt koordiniert laufen. Der Minimalwert der beobachteten BBB Werte lag bei 6. Diese Kontrolltiere konnten nicht alle Glieder der Hinterbeine bewegen (N=2). Ab der 3. Woche konnten BBB Werte von 11 und 12 festgestellt werden. Die Tiere zeigten einige Male eine Koordination der Vorder- und Hinterbeine. Die meisten Puffer Kontrolltiere zeigten während der gesamten Versuchszeit ein lokomotorisches Verhalten, das mit BBB Werten von 12 oder 13 bewertet wurde. Ab Woche 13 erreichten allerdings 2 von 7 Tieren BBB Werte von 19 und 21 und zeigten somit konstante Koordination und bis auf kleinere Defizite normales Laufverhalten. 5 von 7 Puffer Kontrolltieren konnten bis zum Ende der Studie (16 Wochen) nicht konstant koordiniert laufen und hatten einen BBB von 12 (N=1) oder 13 (N=4). 2 Tiere dieser Gruppe zeigten weniger Defizite in diesem Test und erreichten BBB Werte von 19,5 (N=1) und 21 (N=1).

Nach Läsion und voller Behandlung zur Narbenunterdrückung zeigten 8 von 9 behandelten Tieren anfangs BBB Werte zwischen 11 und 13 (A). Ein Tier dieser Gruppe zeigte während der gesamten Testzeit keine Defizite und blieb bei einem BBB Wert von 21. Bis zur 7. Woche hatten insgesamt 3 Tiere dieser Gruppe ein normales Laufverhalten und somit einen BBB Wert von 21. Die übrigen 6 Tiere konnten bis Woche 7 nicht konstant koordiniert laufen und befanden sich somit auf einem BBB Niveau von 13. Ab der 8. Woche kam es in all diesen Tieren allerdings zu einer Verbesserung der Lokomotion, so daß in Woche 11 alle Tiere dieser Gruppe BBB Werte zwischen 18 und 21 aufwiesen. Am Endpunkt der Studie zeigten 5 der 9 behandelten Tiere ein normales Laufverhalten (BBB 21), drei zeigten normales Laufverhalten bis auf Instabilität und niedrige Schwanzposition (BBB 19,5) und eins rotierte die Pfoten beim Abheben (BBB 18).

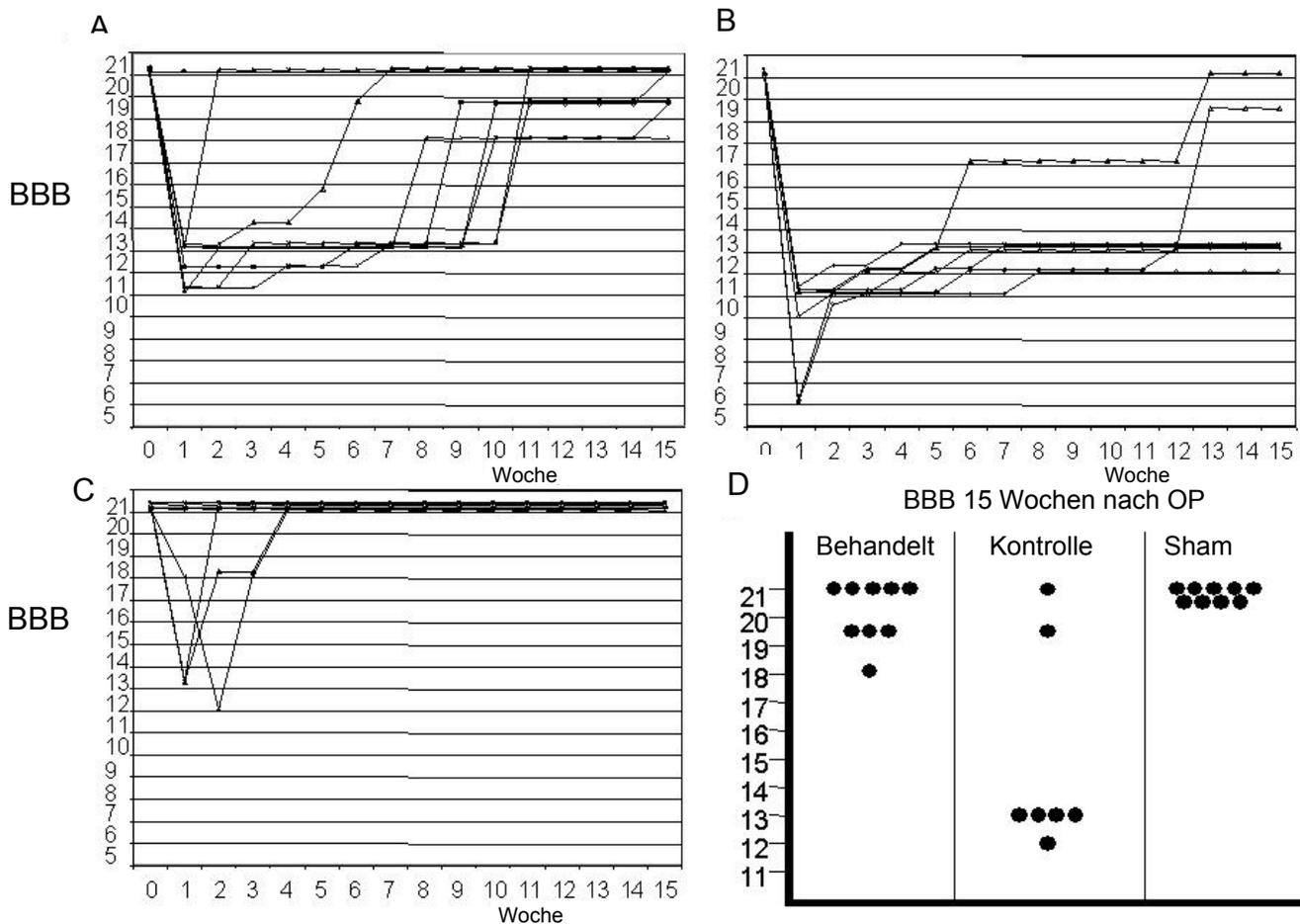


Abb. 3.15.: Resultate der Offenfeld Beobachtung der Versuchstiere und Bewertung anhand der BBB Lokomotions Klassifizierung bei einer 15 wöchigen Beobachtungszeit. Verlauf der BBB Bewertung behandelter Tiere (A, N=9), Kontrolltiere (B, N=7), Sham Tiere (C, N=9). In (D) sind die Endwerte des BBB nach 15 Wochen dargestellt. Alle Tiere, die in die Studie eingingen hatten vergleichbare Läsionsgrößen und Körpergewicht.

Alle behandelten Tiere hatten somit eine konstante Koordination der Vorder- und Hinterbeine, schliften die Zehen nicht über den Boden und setzten die Pfoten parallel auf. Obwohl 2 der 9 behandelten Tiere zu sehr frühen Zeitpunkten bereits den maximalen BBB erreichten (eins in Woche 2 und eins in Woche 7) zeigten diese Tiere beim Lauf über eine horizontale Leiter gleich schwere Defizite wie Puffer-Kontrolltiere.

3.3.2. Untersuchungen des Laufes der Versuchstiere über eine horizontale Leiter

Koordination und Feinkontrolle der Bewegungen der Hinterbeine wurde mit einem weiteren Lokomotionstest wöchentlich beobachtet. Die Versuchstiere liefen dabei über eine horizontale Leiter mit irregulären und variablen Abständen zwischen den Leitersprossen (s. Material und Methoden). Die Videoaufzeichnungen dieser Läufe wurden in Zeitlupe analysiert. Wie in Material und Methoden beschrieben wurden Fehlerzahlen gemessen sowie Rückzugszeiten der Pfoten. Dieser Lokomotions-Test erforderte genaues Zielen und Platzieren der Hinterpfoten auf den dünnen Stangen. Das Vortraining der Tiere für diesen Test wurde so lange durchgeführt bis jedes Tier in 5 aufeinanderfolgenden Läufen höchstens einen Fehler pro Lauf zeigte. Alle Daten umfassen dieselben Versuchstiere, die auch unter 3.1. angegeben sind.

3.3.2.1. Funktionelle Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Fehleranzahl beim Lauf über ein horizontales Gitter

Die Anzahl der Fehler, die während eines Laufes gemacht wurden, wurde wie im Material und Methodenteil beschrieben ermittelt. War ein Tier nicht in der Lage über das Gitter zu laufen, so wurde eine Fehlerquote von 100 % angenommen. Die Ergebnisse dieses Tests für alle Verhaltensgruppen während der gesamten Testperiode sind in Abb. 3.16. zusammengefasst. Die Teilabbildung (A) zeigt die mittlere Fehlerrate für das rechte Hinterbein, (B) für das linke Hinterbein. Es sind jeweils Mittelwerte der Fehler der Kontrolltiere (rot), behandelten Tiere (grau) und Sham operierten Tiere (weiß) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen pro Zeitpunkt sind über den Datenbalken angegeben (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$).

Sham Tiere zeigten keine Defizite in diesem Verhaltenstest, obwohl 3 dieser Tiere im Offenfeld Defizite zeigten (s. 3.1.). Bereits in der ersten Woche nach Läsion zeigten die behandelten Tiere weniger Fehler und ein besseres lokomotorisches Verhalten in diesem Test als Puffer-Kontrolltiere. Während Puffer Kontrolltiere in der ersten Woche mit der rechten Hinterpfote mittlere Fehlerwerte von $0,92 \% \pm 0,02 \%$ (N=7) aufwiesen, waren die behandelten Tiere signifikant besser mit $0,71 \% \pm 0,03 \%$ (N=9) Fehlern pro Schritt. Die linke Hinterpfote war in beiden Gruppe funktionell weniger von der Läsion betroffen als die rechte. Beide Gruppen zeigten eine Verbesserung der Genauigkeit der Pfotenplatzierung beider Hinterpfoten über die gesamte Testzeit. Mit der rechten Hinterpfote wurde in 9 von 14 Zeitpunkten, mit der linken in 13 von 14 Zeitpunkten, eine signifikant oder hoch signifikant bessere Fehlerquote in behandelten Tieren als in Puffer Kontrolltieren gemessen. In allen Zeitpunkten wurden mit beiden Hinterpfoten bei behandelten Tieren weniger Fehler gemessen als bei Puffer Kontrolltieren.

Die Leistung der Tiere änderte sich ab Woche 5 nicht mehr signifikant. Am Endpunkt der Studie zeigten die behandelten Tiere signifikant bessere Fehlerquoten im Vergleich zu den Puffer-Kontrolltieren sowohl mit der rechten Hinterpfote (behandelt: $0,29 \% \pm 0,03 \%$ (N=9); Kontrolle: $0,44 \% \pm 0,04 \%$ (N=7, $p < 0,005$) als auch mit der linken Hinterpfote (behandelt: $0,11 \% \pm 0,02 \%$ (N=9); Kontrolle: $0,27 \% \pm 0,05 \%$ (N=7), $p < 0,005$).

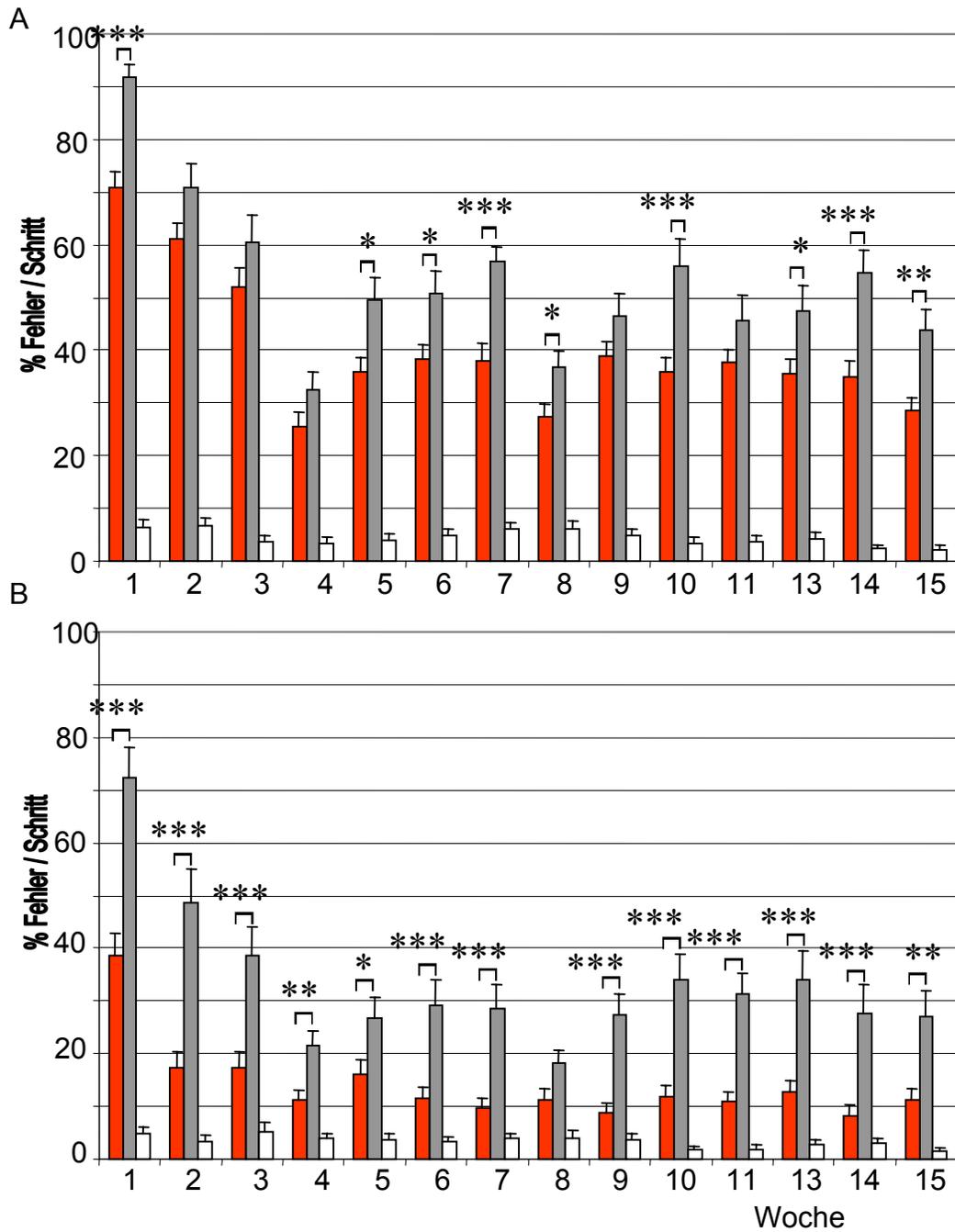


Abb. 3.16.: Ergebnisse der Analysen der Fehlerhäufigkeit pro Schritt beim Lauf über ein horizontales Gitter mit dem rechten (A) und dem linken (B) Hinterbein von behandelten Tieren (rote Balken), Kontrolltieren (graue Balken) und Sham operierten Tieren (weiße Balken). Es sind jeweils Mittelwerte +/- Standardfehler dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen zu einem untersuchten Zeitpunkt sind über den Datenbalken angegeben (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$).

3.3.2.2. Untersuchung der Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Rückzugszeiten der Hinterpfoten bei einem Zielfehler auf einem horizontalen Gitter

Zur Bestimmung der Rückzugszeiten der Beine wurden alle Videoaufzeichnungen von Läufen vor OP und in Woche 15 nach der OP analysiert. Wenn ein Fehler auftrat, wurde er nach den Kriterien in Material und Methoden klassifiziert. Nur Zielfehler wurden zur Bestimmung der Rückzugszeiten verwendet. Die Anzahl der Videobilder, die gezählt wurde bis der Fuß vom tiefsten Punkt wieder die Horizontale der Sprossen erreichte (s. Material und Methoden) wurde als Rückzugszeit notiert. Abb. 3.17. zeigt die mittleren Rückzugszeiten des linken (A) bzw. rechten (B) Hinterbeins der verschiedenen Gruppen (behandelt = rot, Kontrolltiere = grau, Sham operierte Tiere = weiß) mit den entsprechenden Standardabweichung pro Gruppe.

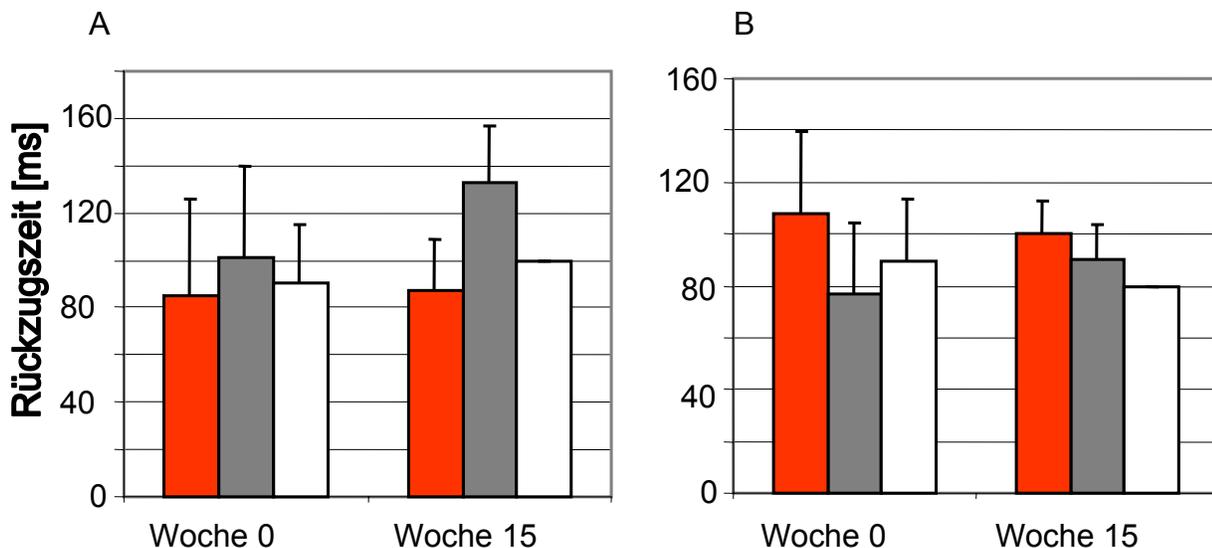


Abb. 3.17.: Mittlere Rückzugszeiten der einzelnen Hinterpfoten bei einem Zielfehler pro experimenteller Gruppe mit jeweiliger Standardabweichung in Woche 0, d.h. vor der OP und in Woche 15 nach der OP. (A) linke Hinterpfote, (B) rechte Hinterpfote. Rote Balken = behandelte Tiere, graue Balken = Kontrolltiere, weiße Balken = Sham operierte Tiere.

Tabelle 3.3. zeigt die ermittelten Datenwerte dieser Untersuchung. Da nur wenige Zielfehler in die Auswertungen eingingen und die zeitliche Auflösung der benutzten Videoapparatur sehr gering ist (nur 40 ms), sind die Standardabweichungen sehr hoch. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Tabelle 3.3.: Ermittelte Rückzugszeiten [ms] bei Zielfehlern auf dem horizontalen Gitter

		Kontrolle	Behandelt	Sham
Links	Tag 0	85 ± 41 (N=4)	101 ± 39 (N=7)	90 ± 25 (N=9)
	Tag 105	87 ± 22 (N=4)	133 ± 24 (N=5)	100 ± 0 (N=1)
rechts	Tag 0	108 ± 31 (N=6)	77 ± 27 (N=7)	90 ± 24 (N=5)
	Tag 105	100 ± 13 (N=6)	90 ± 14 (N=9)	80 ± 0 (N=2)

3.3.3. Untersuchungen der Laufeigenschaften der Versuchstiere im CatWalk Test

Die Analyse der Laufeigenschaften der Tiere wurde mit der CatWalk Apparatur vorgenommen, wie im Material und Methodenteil beschrieben. Dieser Test kombiniert eine Fußabdruckanalyse mit der kinematischen Auswertung der Laufeigenschaften, da sowohl die Fußstellung als auch die zeitliche Abfolge der Platzierung berücksichtigt werden.

3.3.3.1. Auswirkungen der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf den Anteil irregulärer Laufmuster der Versuchstiere nach Läsion

Beim Lauf der Versuchstiere über die Glasplatte der CatWalk Apparatur wurden die zeitlichen Abfolgen der Vorder- und Hinterpfotenplatzierung aufgezeichnet und ausgewertet. Eine unlädierte Ratte zeigte bei einem Lauf 100 % reguläre Laufmuster wie im Material und Methodenteil beschrieben. Dabei wurde jede Pfote bei 4 Schritten nur einmal von der Glasplatte angehoben. Bei lädierten Tieren konnte allerdings ein großer Anteil irregulärer Laufmuster festgestellt

werden. Diese ergaben sich meist durch zu häufige Vorderpfotenbewegungen während die Hinterpfoten bewegungslos blieben. Die Resultate der Auswertung der Anteile irregulärer Laufmuster pro Lauf sind in Abb. 3.18. dargestellt. (A) zeigt die Mittelwerte und Standardfehler behandelter Tiere, (B) die der Kontrolltiere. Das Signifikanzniveau wurde mittels der Varianzanalyse festgestellt. Während des Vortrainings zeigten alle Tiere ein sehr reguläres Laufmuster während der 3 Durchgänge (Kontrolltiere $0,69 \% \pm 0,69 \%$; behandelte Tiere $2,25 \% \pm 1,01 \%$). In Woche 4 erreichte die Rate irregulärer Laufmuster einen mittleren Wert von $23,83 \% \pm 5,23 \%$ für Kontrolltiere und $26,56 \% \pm 5,04 \%$ für behandelte Tiere. Alle nachfolgenden Daten wurden mit dem Niveau in Woche 4 verglichen, da der spinale Schock zu diesem Zeitpunkt abgeklungen sein sollte (s. Einleitung). Während die Kontrolltiere keine signifikante Verbesserung der Laufmuster zeigten, zeigten behandelte Tiere eine stetige Verbesserung des Laufmusters. Eine signifikante Verbesserung verglichen zu Woche 4 wurde in der Woche 15 gefunden mit einer mittleren Rate falscher Laufmuster von $5,78 \% \pm 1,95 \%$, $p < 0,005$. Das Niveau der Rate der Kontrolltiere lag bis zum Ende der Studie bei $15 - 16 \%$.

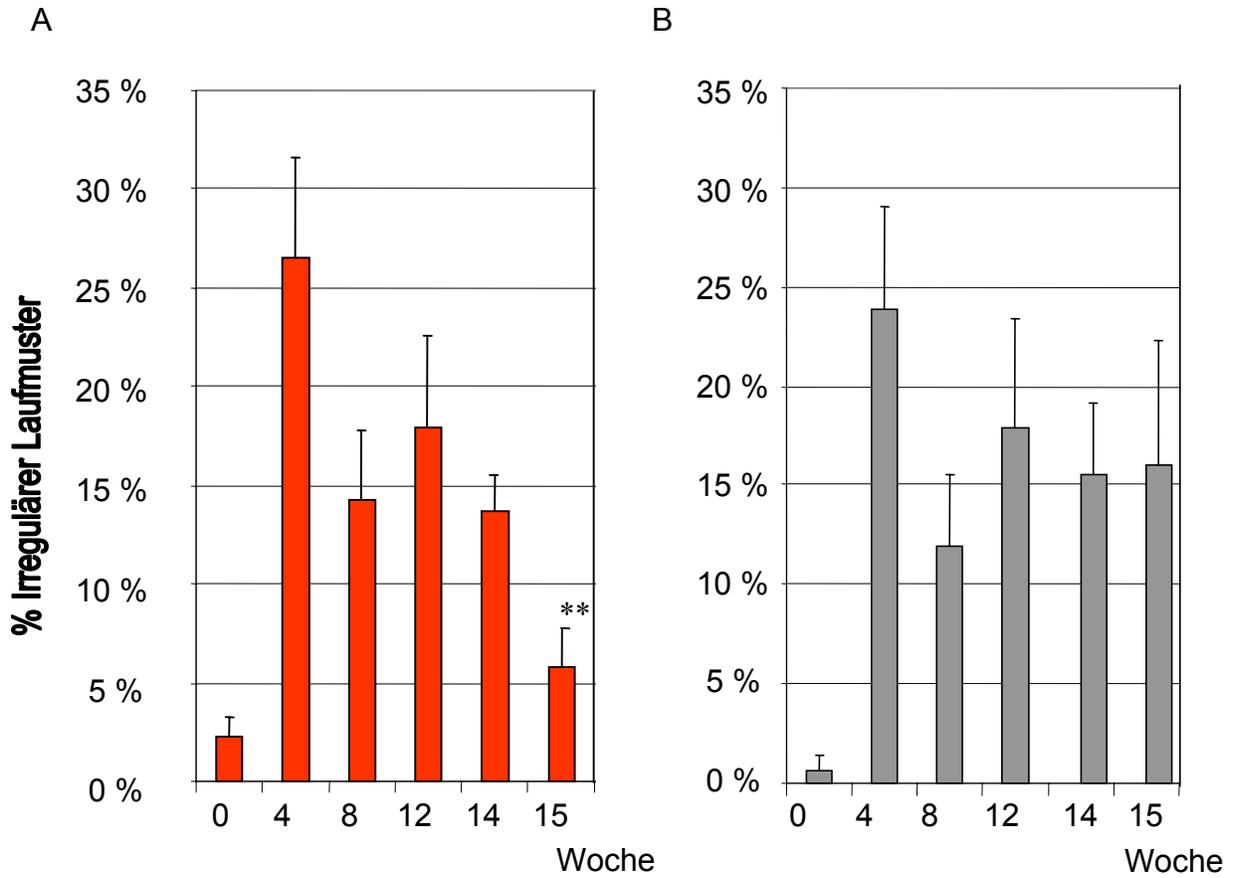


Abb. 3.18: Mittelwerte des Anteils an irregulären Laufmustern pro Lauf und Versuchsgruppe. (A) zeigt behandelte Tiere (N=9), (B) Kontrolltiere (N=7). Signifikante Unterschiede zum Wert des Zeitpunktes 4 Wochen nach OP sind über den Datenbalken mit Sternchen angedeutet (ANOVA, *p<0,05; **p<0,005, ***p<0,001).

3.3.3.2. Auswirkungen der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf den hinteren Fußabstand der Versuchstiere nach Läsion

Der Abstand der Hinterpfoten zueinander wurde ebenfalls mittels der CatWalk Apparatur gemessen und im Vergleich zur Situation vor der OP untersucht. Abb. 3.19. zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Die gemessenen Fußabstände der Hinterpfoten des einzelnen Versuchstieres vor der OP wurden als Grundwert angenommen. Alle darauffolgenden Werte dieses Tieres wurden als Differenz zum Grundwert berechnet (Abstand zum Zeitpunkt x – Abstand zum Zeitpunkt 0). Dann wurden diese Werte über alle Tiere einer Versuchsgruppe gemittelt (behandelte Tiere N=9, Kontrolltiere N=7, Sham operierte Tiere N=9). In der Abbildung 3.19. sind die Werte der behandelten Tiere als rote, die der Kontrolltiere als graue und die der Sham Tiere als weiße Balken mit mittlerem Standardfehler dargestellt. Die Werte sind in Tabelle 3.4. dargestellt. Da die Messungen mit der Software der CatWalk Apparatur vorgenommen wurden, sind alle Werte in relativen Einheiten ohne Umrechnung in cm dargestellt. Die Sham operierten Tiere zeigten während der Versuchszeit trotz des zunehmenden Alters und Gewichtes keine signifikante Änderung des hinteren Fußabstandes im Vergleich zur Situation vor der OP. Sowohl die Puffer Kontrollgruppe als auch die behandelte Gruppe waren zu allen Zeitpunkten signifikant unterschiedlich zu den Sham operierten Tieren. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Puffer Kontrolltiere und behandelten Tieren festgestellt werden (keine Angabe von Signifikanzen in Abb. 3.19.).

Tabelle 3.4.: Ergebnisse der Messungen des hinteren Fußabstandes als Mittelwerte mit Standardfehler [relative Einheit]

	Woche 0	Woche 5	Woche 13	Woche 15
Kontrolle	0 ± 0 (N=7)	11,3 ± 2,2 (N=7)	9,9 ± 2,2 (N=7)	13,4 ± 2,5 (N=7)
Behandelt	0 ± 0 (N=9)	10,2 ± 2,2 (N=9)	8,7 ± 2,6 (N=9)	7,3 ± 2,6 (N=9)
Sham	0 ± 0 (N=9)	-1 ± 1,4 (N=9)	0,5 ± 1,0 (N=9)	1,3 ± 1,6 (N=9)

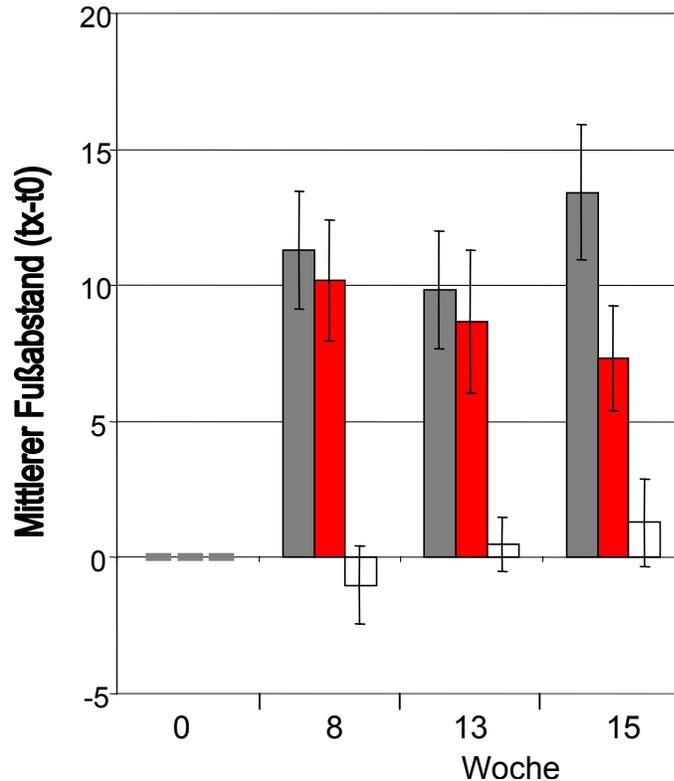


Abb. 3.19.: Mittlerer Fußabstand der Hinterpfoten der behandelten Tiere (N=9, rot), Kontrolltiere (N=7, grau), Sham operierten Tiere (N=9, weiß) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach OP in Relation zur Situation vor der OP. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler.

3.3.4. Ergebnisse der histologischen Verifizierung der Läsionslage und –größe sowie beobachteter Regeneration der Kortikospinalfasern in den Versuchstieren

Die Verifizierung der korrekten Läsionslage und -größe wurde anhand immunhistochemischer Detektion von GFAP durchgeführt. Den im Material- und Methodenteil erklärten Kriterien entsprachen alle bis auf 1 Kontrolltier, bei dem die Läsion zu groß war. Ein weiteres Kontrolltier musste aus den Verhaltensstudien herausgenommen werden, da sein Gewicht zu hoch war. Alle

Tiere dieser Studie mit Behandlung zur Narbenunterdrückung zeigten nach 4 Monaten regenerierende Fasern im distalen Rückenmark (s. Beispiele im Abschnitt 2).

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung der Wundheilungsnarbe in Kontrolltieren

4.1.1 Die Wundheilungsnarbe im verletzten Rückenmark der Ratte besteht aus zwei Arealen: einer fibrösen Narbe und einer Glianarbe

Nach Drahtmesser Läsion des dorsalen Kortikospinaltraktes und der Hinterstränge auf thorakaler Höhe 8 (Th8) entsteht eine Wundheilungsnarbe im Rückenmark (s. Einleitung). Mit immunhistochemischen Methoden konnte diese Wundheilungsnarbe in 2 Bereiche unterteilt werden: eine GFAP reiche Glianarbe im Periläsionsgebiet und eine Coll IV-haltige Narbe im Läsionszentrum (Ergebnis Abb. 3.3, s. a. Klapka et al., 2002; Shearer & Fawcett, 2001a).

Zur Visualisierung der Coll IV-haltigen fibrösen Narbe wurden zwei verschiedene Antikörper getestet. Diese lieferten unterschiedlich starke Färbungen der fibrösen Narbe, wahrscheinlich aufgrund der Demaskierungsprotokolle. Eine Demaskierung mit Mikrowellen Vorbehandlung greift das ohnehin fragile Gewebe stark an und könnte Coll IV-haltige extrazelluläre Strukturen zerstören. Daher erscheint diese Färbung insgesamt blasser und kann nicht zur Untersuchung der Narbenunterdrückung verwendet werden (s. Ergebnis Abb. 3.2.).

Die fibröse Coll IV-haltige Narbe und die Glianarbe sind in allen untersuchten Tieren komplementär zueinander lokalisiert. Im Periläsionsgewebe werden nur Blutgefäße von Coll IV Antikörpern angefärbt. Im Läsionszentrum hingegen sind auch die tuchartigen Coll IV-positiven Strukturen zu sehen, die als Extrazellulärmatrix, also ausserhalb der Zellen vorliegen. Im Läsionszentrum selbst sind kaum GFAP-positive Zellen zu finden. Das deutet entweder auf das Fehlen reaktiver Astrozyten im Läsionszentrum hin oder auf eine Depression des GFAP in Astrozyten im Läsionszentrum. Auch frühere immunhistochemische Färbungen gegen GFAP (Klapka et al., 2002) und das astrozytäre Protein S100 zeigten keine positive Strukturen im Läsionszentrum (Stichel & Müller, 1994). Selbst nach 12 Wochen ändert sich diese komplementäre Lokalisation nicht.

Die Grenzzone zwischen der fibrösen Coll IV-haltigen Narbe im Läsionszentrum und der Glianarbe erscheint nicht ausschließlich als *glia limitans*, wie in der Literatur beschrieben. Es konnten sowohl Regionen beobachtet werden, die aus einer dichten Schicht astrozytärer GFAP positiver Ausläufer bestand (s. Ergebnisse Abb. 3.3.), als auch lockere ineinander übergehende Grenzbereiche. Besonders in diesen lockeren Bereichen astrozytärer Ausläufer könnte ein Passieren der Grenzschicht durch regenerierende Axone wahrscheinlicher sein als in den strukturell dichten Grenzonen.

Die Integrität des Gewebes ist in diesen zwei Narbenbereichen unterschiedlich. Durch die enge Verflechtung der astrozytären Prozesse im Glianarbenbereich, ist das periläsionäre Gebiet in seiner Struktur stabiler als das Läsionszentrum. Die Coll IV-haltige Narbe im Läsionszentrum besteht hauptsächlich aus Extrazellulärmatrix und einigen zellulären Strukturen (s. Einleitung). Diese instabilen Strukturen können je nach Überlebenszeit des Tieren sehr leicht herausgeschwemmt werden, wenn das Rückenmark für immunhistochemische Färbungen aufbereitet wird, bzw. auch während der Färbeprozedur. Nur die Anwendung des Protokolls zur Gewebeaufbereitung des lädierten Rückenmarks, das im Material und Methodenteil beschrieben wird (Hermanns et al., 2001), macht es möglich, die Coll IV-haltige Narbe im Läsionszentrum reproduzierbar zu erhalten und immunhistochemisch zu analysieren. Wie schon früher beschrieben, entstehen nach 5 Tagen erste Coll IV-positive tuchartige Strukturen im Läsionszentrum, die nach 7 Tagen ein komplexes Geflecht darstellen (s. Ergebnisse, Abb. 3.2. und 3.3., s.a. Einleitung). Diese Coll IV-IR ändert sich in einem Zeitraum von 7 Tagen bis zu 12 Wochen nicht. Es ist wahrscheinlich, daß immunhistochemische Färbungen gegen Coll IV auch zu späteren Zeitpunkten dieses Ergebnis liefern. Es wird angenommen, daß die Ausbildung einer permanenten Wundheilungsnarbe der Abschottung des verletzten Gewebes (Fitch & Silver, 1997b; Shearer & Fawcett, 2001b) und der Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke dient.

4.1.2 Putativ inhibitorische Moleküle wie Proteoglykane akkumulieren in der fibrösen Narbe im Rückenmark der Ratte

Reaktive Astrozyten, die in der GFAP reichen Glianarbe vorliegen, können eine Reihe putativ inhibitorischer Moleküle für axonales Wachstum exprimieren, wie z.B. Chondroitin Sulfat Proteoglykane (Fitch & Silver, 1999a; Snow et al., 1990). Abb. 3.6. im Ergebnisteil zeigt die Verteilung der C4- und C6 sulfatierten CSPG, die von dem Antikörper CS-56 erkannt werden. Obwohl sie wahrscheinlich von Zellen der Glianarbe exprimiert werden, zeigt die Färbung eine Akkumulation der CSPG in der Coll IV-haltigen Narbe im Läsionszentrum. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, daß Proteoglykane in Coll IV-haltigen EZM Netzwerken angereichert werden können (Yurchenco & Schittny, 1990; Timpl, 1994; Aumailley & Gayraud, 1998), auch wenn eine direkte Anlagerung von CSPGs an das Coll IV Netzwerk nicht beschrieben wurde. Andere inhibitorische Moleküle der Basalmembran sind z.B. Semaphorine (De Winter et al., 2002) und Ephrine (Miranda et al., 1999).

Auch in Studien eines anderen Läsionsmodells, der Drahtmesserläsion des postkommissuralen Fornix (s. Einleitung), konnten CSPG im Läsionszentrum nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die immunhistochemischen Färbungen auch CSPG positive Bereiche im Periläsionsgebiet (Stichel et al., 1999d). Unsere Befunde im Rückenmark stimmen diesbezüglich mit denen von Fitch und Silver überein, die eine spezifische Färbung mit CS-56 im Läsionszentrum des lädierten Rückenmarks beschreiben (Fitch & Silver, 1997a).

Interessanterweise beschreiben E. Bradbury et al (Bradbury et al., 2002) Regeneration sensorischer und motorischer Fasern und sogar funktionelle Erholung lädierter Ratten bei Abbau von CSPG Molekülen mit Chondroitinase in der Läsion (intrathekale Applikation). Dieser Befund unterstützt die Hypothese, daß eine Akkumulation von CSPG im ZNS Gewebe inhibierend auf Axonwachstum wirken kann.

4.1.3. Im Läsionszentrum sind auch nach 12 Wochen Überlebenszeit Reststrukturen vorhanden, die phosphorylierte Neurofilamentproteine aufweisen

Zur Untersuchung der axonalen Prozesse nach Läsion wurden Rückenmarksschnitte mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Neurofilament (PAM) immunhistochemisch gefärbt (s. Ergebnisse Abb. 3.4.). Es konnten neben zellulären Strukturen, die morphologisch als Makrophagen identifiziert wurden auch faserartige Strukturen im Läsionszentrum von Kontrolltieren gefunden werden. Diese Strukturen waren über den maximalen beobachteten Zeitraum von 12 Wochen vorhanden. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu Beobachtungen im Läsionsmodell des durchtrennten Fornix. Dort konnten nach 6 Wochen weder Makrophagen noch Axon Debris-ähnliche Strukturen mit immunhistochemischen Färbungen gegen phosphoryliertes Neurofilament gefunden werden (Stichel et al., 1999c; Stichel et al., 1999a). Der Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte einerseits darin begründet sein, daß unterschiedliche Antikörper für diese Färbungen benutzt wurden. Zum anderen ist es aber auch vorstellbar, daß die sehr viel größere Läsion im Rückenmark andere Prozesse nach sich zieht, die sich auf das Färbeergebnis auswirken. Bei kurzen Überlebenszeitpunkten liegen die Hauptunterschiede zu den Ergebnissen im Fornix Modell in der Vielzahl angefärbter Makrophagen (s. Ergebnisse, Abb. 3.4.). Diese Beobachtung ist wahrscheinlich darin begründet, daß durch die starken Einblutungen ins Rückenmark direkt bei der OP bereits eine viel größere Anzahl an Makrophagen in das ZNS Gewebe eindringt. Im Fornix Modell wird durch die Lage der Läsion tief im Gehirn eine solch massive Einblutung verhindert. Die Beobachtung faserähnlicher Strukturen in Kontrolltieren nach 12 Wochen könnte darauf zurückzuführen sein, daß eine größere Anzahl verschiedener Faserpopulationen im Rückenmark durchtrennt wird. Darunter befinden sich schnell auswachsende Fasern und langsam auswachsende Fasern, wie der CST. Es ist vorstellbar, daß

die beobachteten PAM positiven faserartigen Strukturen im Läsionszentrum eine Teilpopulation der durchtrennten und wieder aussprossende Fasern darstellen. Auch Joosten et al. (Joosten et al., 2000) konnten 14 Tage nach Hemisektion des Rückenmarkes der Ratte Strukturen im Läsionszentrum zeigen, die positiv waren für den polyklonalen Antikörper anti-NF 200 (gegen Neurofilament 200 kDa). Diese Strukturen blieben bis zu 2 Monate nach Läsion im Zentrum vorhanden. Eine eindeutige Zuordnung dieser Strukturen als verletzte Faserstücke oder aussprossender Fasern ist mit dieser Färbung allerdings nicht möglich. Daher wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Auswirkung der Behandlung auf Regeneration eine Markierung von CST Fasern nach Läsion durchgeführt.

4.2. Auswirkungen der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf Moleküle der fibrösen Narbe und der Glia Narbe

4.2.1. Mögliche Wirkungsmechanismen der Behandlung zur Narbenunterdrückung

Die Behandlung zur Narbenunterdrückung wurde im Modell der Fornix Läsion von C. Stichel et al. (Stichel et al., 1999a) und im Rückenmarksmodell von S. Hermanns et al. (Hermanns et al., 2001) entwickelt. Sie wurde in dieser Arbeit wie im Material und Methodenteil beschrieben durchgeführt und besteht aus mehreren Injektionen des Eisenchelators BPY-DCA in das Läsionszentrum, Applikation von kristallinem 8-Br-cAMP in die Läsion, sowie Abdeckung der Läsion mit einem Elvax Kopolymer, das den Eisenchelator enthält und kontinuierlich abgibt. Im Gegensatz zum Läsionsmodell der Drahtmesserläsion des postkommissuralen Fornix (Stichel et al., 1999a), war die Injektion von BPY allein nicht ausreichend um eine Unterdrückung der Narbenbildung im Rückenmark herbeizuführen (eigene Beobachtungen und Hermanns et al., 2001). Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der größeren Ausdehnung der Coll IV-haltigen Narbe im Rückenmark. Die rostro-kaudale Ausdehnung der Coll

IV-haltigen Narbe ist im Rückenmark bis zu 20 mal größer als im postkommissuralen Fornix (Hermanns et al., 2001). Dieser Unterschied liegt wahrscheinlich darin begründet, daß die Rückenmarksläsion in direkter Nähe der Meningen liegt. Eine erhöhte Einwanderung submeningealer Zellen (Carbonell & Boya, 1988; Berry et al., 1983) sowie eventuell stärkere Entzündungsreaktionen durch stärkere Einblutungen sind anzunehmen. Die Läsion des postkommissuralen Fornix liegt im Hirn-Inneren und daher nicht in unmittelbarer Nähe zu den Hirnhäuten.

Durch die Behandlung wird die Biosynthese von Kollagen (u.a. auch Coll IV) transient gehemmt. Da die fibröse Narbe im Läsionszentrum zu einem großen Teil aus einem Coll IV-haltigen Netzwerk besteht, an das andere Moleküle assoziiert sind, wird somit die Akkumulation verschiedener Moleküle im Läsionszentrum verzögert.

Im lädierten Rückenmark wird Coll IV von Astrozyten (Liesi & Kauppila, 2002), einwandernden meningealen Zellen, die Fibroblasten ähneln und Endothelzellen exprimiert (Berry et al., 1983; Schwab et al., 2001). Meningeale Fibroblasten sekretieren verschiedene Kollagene (Eckes et al., 2000) und Moleküle, die auf Axonwachstum inhibitorisch wirken können. Verschiedene Arbeitsgruppen haben für Moleküle wie Tenascin (Tang et al., 2003), Heparan Sulfat Proteoglykane und CSPGs (Halfter et al., 1990), Semaphorin III A (Yu & Kolodkin, 1999) und Ephrine (EphB2, Bundesen et al., 2000) potentielle inhibitorische Effekte auf das Regenerationsverhalten von Axonen festgestellt. Solche Moleküle können an EZM akkumulieren und damit eine Barriere für regenerierende Axone darstellen. Da Coll IV eine Schlüsselkomponente der EZM in der Narbe ist und einwandernde meningeale Fibroblasten in der Rückenmarksläsion Coll IV produzieren können, wurde cAMP als Komponente der Behandlung zur Narbenunterdrückung appliziert. Fibroblasten besitzen einen autokrinen Mechanismus, der CTGF vermittelt die Proliferation dieser Zellen steigert. Gesteigerte Proliferation führt auch zu gesteigerter EZM Produktion dieser Zellen. TGF- β Expression wird nach Läsion stark erhöht, wodurch dieser autokrine CTGF-vermittelte Mechanismus unterstützt wird. Die Erhöhung des

intrazellulären cAMP Spiegels von Fibroblasten führt zu einer Erniedrigung der CTGF Expression und somit zu einer niedrigeren Proliferationsrate der Fibroblasten in vitro (Duncan et al., 1999).

4.2.2. Die Behandlung zur Narbenunterdrückung führt zur Verminderung der Coll IV-IR aber nicht der GFAP-IR

Die Behandlung ermöglichte, daß die Ausbildung der Coll IV-haltigen Narbe transient unterdrückt wurde. Nach 7 Tagen war ein deutlicher Unterschied von Kontrolltieren zu behandelten Tieren zu erkennen (s. Ergebnisse, Abb. 3.5.). Für ca. 12 Tage war die Bildung der komplexen Basalmembran im Läsionszentrum durch die Kombinationsbehandlung unterdrückt (s. Ergebnisse, Abb. 3.5.). Nach 30 Tagen wurde eine vergleichbare Coll IV-IR in behandelten Tiere wie in Kontrolltieren gezeigt. Wahrscheinlich bildet sich diese Struktur aber schon früher aus. Die GFAP positive Färbung der Glianarbe wurde durch die Behandlung zur Narbenunterdrückung nicht verändert. Auch in den ersten 7 Tagen, in denen bei behandelten Tieren noch keine Coll IV-positive Narbe im Läsionszentrum detektierbar war, zeigte die GFAP Färbung ein mit Kontrolltieren vergleichbares Bild.

4.2.3. Die Behandlung zur Narbenunterdrückung führt zu einer temporär schwächeren CS-56-IR in behandelten Tieren als in Kontrolltieren

Färbungen gegen CSPG korrespondierten in Kontrolltieren und in behandelten Tieren mit der Lokalisation der Coll IV-IR. War keine Coll IV-positive Narbe zu detektieren, wurde auch eine sehr geringe CSPG Expression im Läsionszentrum beobachtet. Dies war bei behandelten Tieren zu den beobachteten Zeitpunkten

von 7 und 12 Tagen der Fall. Danach war aber auch in behandelten Tieren sowohl die Coll IV-IR als auch die CS-56-IR mit der Situation in Kontrolltieren vergleichbar.

Diese zeitliche und örtliche Korrelation der Coll IV und CSPG Expression deutet auf eine Assoziation dieses potentiell wachstumshemmenden Moleküls (Moon et al., 2002) mit der Hauptkomponente der Basalmembran, dem Coll IV hin. Wie oben erwähnt, wurde eine direkte Assoziation der CSPGs mit Coll IV allerdings noch nicht gezeigt, auch wenn diese Moleküle feste Bestandteile von Basalmembranen darstellen (Aumailley & Gayraud, 1998).

4.3. Die Behandlung zur Narbenunterdrückung bewirkt die Regeneration von Fasern des durchtrennten dorsalen Kortikospinaltraktes

Neurone des ZNS haben eine inherente Kapazität nach Läsion zu regenerieren (Aguayo et al., 1991). Im PNS führt das auch zu Reinnervation denervierter Zielzellen (Stoll et al., 2002). Im ZNS stoppt das Axonwachstum nach initialem Rückzug und Aussprossung allerdings wieder (zur Übersicht siehe Stichel & Müller, 1998c).

Durch anterogrades Markieren der CST Axone konnte deren Verlauf nach Drahtmesserläsion des CST dargestellt werden. In Puffer Kontrolltieren wurden distal der Läsion nur wenige markierte Fasern submeningeal (Hermanns S, 2001) nach 4 Monaten Überlebenszeit gefunden. Der proximale Stumpf wurde nie innerhalb der Coll IV-haltigen Narbe beobachtet, er stoppte innerhalb der GFAP positiven Glianarbe (s. Ergebnisse, Abb. 3.11).

4.3.1. Die Rolle der Glianarbe bei axonalen Regenerationsprozessen

Die Glianarbe wird häufig als wichtige Barriere axonalen Wachstums im ZNS angenommen (Asher et al., 2001; Fawcett et al., 2002; Moon et al., 2002; Shearer & Fawcett, 2001b; Fitch and Silver, 1999b). Als wichtige inhibitorische Komponenten werden dabei das Myelin und myelin-assoziierte Moleküle wie MAG, NOGO und MOG (zur Übersicht s. Hunt et al., 2002) aufgeführt. Die Beobachtung, daß Axone in der weißen Substanz aussprossen (s. Ergebnisse Abb. 3.13.) und in atraumatischen Läsionsmodellen, die keine fibrösen Narbenbildung verursachen wachsen können (Davies et al., 1997), impliziert, daß einige Axone diesen inhibitorischen Molekülen der Glianarbe gegenüber insensitiv sind. Eventuell liegt dieser Unterschied in sensiblen und unsensiblen Axonen im Fehlen des entsprechenden Rezeptors des inhibitorischen Moleküls begründet (Davies et al., 1997).

Das initiale Aussprossen verletzter CST Fasern wurde von anderen Arbeitsgruppen schon früher beschrieben (Fouad et al., 2001b; Hill et al., 2001; Weidner et al., 2001). Die Aussprossung des proximalen Stumpfes in weisser Substanz einiger mit cAMP behandelte Tiere war allerdings erstaunlich stark (s. Ergebnisse, Abb. 3.13.). Endogenem cAMP wird eine wichtige Rolle während der Entwicklung und nach Verletzung von Neuronen zugeschrieben (Cai et al., 2001; Qiu et al., 2002). Es wird vermutet, daß nach einer Verletzung inhibitorische Proteine des Myelins wie z.B. MAG durch einen Rho vermittelten Mechanismus axonale Regeneration stoppen. Eine Erhöhung des cAMP Spiegels in Neuronen soll über Protein Kinase A diesen inhibitorischen Mechanismus blockieren.

4.3.2. CST Axone regenerieren nach Behandlung in das distale Rückenmark und bilden Verzweigungen in der grauen Substanz aus

Markierte CST Axone konnten nach Läsion und einer Überlebenszeit von 30 Tagen, 12 Wochen und 4 Monaten nicht im distalen Rückenmark von

Kontrolltieren beobachtet werden. Behandelte Tiere hingegen zeigten nach 4 Monaten mehrere regenerierende Axone im distalen Rückenmarksbereich, bis zu 1,5 cm von der Läsionsmitte entfernt. Wie auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Brosamle et al., 2000), war ihr Verlauf gewunden und die Fasern waren wegen des Anschnitts immer nur kurz zu verfolgen. Sie waren meist im dorsalen Bereich des distalen Rückenmarks lokalisiert und zeigten sogar Arborisierungen in die graue Substanz nach einem Zeitraum von 4 Monaten (s. Ergebnisse, Abb.3.14.). Verdickungen der Endstellen der arborisierenden Axone deuten auf Ausbildung synaptischer Verbindungen hin. Im früheren Modell der Läsion des postkommissuralen Fornix wurden regenerierende Fornix Axone gefunden, die den Mammilarkörper erreichten und chemische Synapsen dort ausbildeten. Sogar elektrophysiologische Untersuchungen unterstützen die Funktionalität dieser Verbindungen – Aktionspotentiale wurden fortgeleitet (Stichel et al., 1999b). Diese Effekte der Behandlung zur Narbenunterdrückung unterstützen die Interpretation der hier gefundenen Strukturen.

4.3.3. Potentieller Mechanismus der axonalen Regeneration nach Behandlung zur Narbenunterdrückung

Der Mechanismus der Axon Regeneration nach Behandlung ist nicht aufgeklärt. Allerdings deuten die immunhistochemischen Ergebnisse darauf hin, daß potentiell wachstumshemmende Moleküle wie CSPG (Morgenstern et al., 2002; Bradbury et al., 2002; Olson, 2002; Moon et al., 2001) ohne die Coll IV Matrix nicht im Läsionszentrum akkumulieren können (s. Diskussion, 4.2.3.). Proteoglykane sind typische Komponenten von Basalmembranen, die ein Coll IV Netzwerk aufweisen (Timpl, 1994).

Die Verzögerung der Ausbildung der Coll IV-haltigen Narbe ermöglicht ein Zeitfenster von ca. 12 Tagen, in denen regenerierende Axone die Region des Läsionszentrums passieren können und in distales Rückenmarksgewebe elongieren können. Eventuell liegt diese Beobachtung in einer Unterexpression

der Rezeptoren für inhibierende Moleküle an Axonen begründet (Davies et al., 1997). Es wäre vorstellbar, daß diese Expression erst durch Komponenten der fibrösen Narbe initiiert wird. Davies et al beobachteten ebenfalls Axonwachstum in weisser Substanz wenn Vernarbung des ZNS Gewebes verhindert wird. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, daß die Narbe im Läsionsbereich die hauptsächlich inhibierende Struktur für regenerierende Axone darstellt.

4.4. Auswirkung der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Lokomotion der Ratte

Die Drahtmesserläsion auf Th8 führt zu einer Schnittläsion der Hinterstrangbahnen sowie des dorsalen CST. Die Hinterstrangbahnen werden hauptsächlich von sensorischen Fasern gebildet während der CST eine Projektion vom Motorkortex ins Rückenmark darstellt. Diese ist hauptsächlich monosynaptisch. Die grobe motorische Kontrolle wird durch den RST gewährleistet, der weit lateral liegt (s. Einleitung).

Verhaltensdefizite nach einer Läsion können durch kompensatorische Mechanismen maskiert werden (Kunkel-Bagden et al., 1993). Deswegen ist es notwendig, die Tiere in mehreren Lokomotionstests zu beobachten (Metz et al., 2000). In den hier angewandten Lokomotionstests werden verschiedene Aspekte der Lokomotion betrachtet. Sie ergänzen sich somit in der Gesamtanalyse des Verhaltens der Tiere.

4.4.1. Verbesserung der allgemeinen Lokomotion im Offenfeld

Zur Klassifizierung der Lokomotion der Tiere im Offenfeld wurde die BBB Klassifizierung angewandt wie im Material und Methodenteil beschrieben. Da diese Klassifizierung für Kontusionsläsionen entwickelt wurde, kann sie auf keinen Fall als alleiniger Test für funktionelle Verbesserung in einem Schnittläsionsmodell herangezogen werden. Trotzdem zeigen Tiere mit

Schnittläsionen verschiedenen Ausmaßes auch in diesem Test Defizite (Schucht et al., 2002; Merkler et al., 2001).

Die Ergebnisse dieser Beobachtung zeigten eine Verbesserung der behandelten Tiere während die Kontrolltiere auf einem niedrigen Niveau blieben. Die wichtigste Beobachtung war hierbei das koordinierte Laufen der behandelten Tiere. 5 von 7 Kontrolltieren waren bis zum Endpunkt der Studie nicht in der Lage koordiniert zu Laufen. Eine Läsion des CST allein, z.B. mittels Durchtrennung der Pyramidenbahnen führt nicht zu einem so schwerwiegenden Defizit. Koordination bedingt sicherlich auch die Funktion des CPG. Zusammenhänge zwischen CST, RST und CPG sind bisher nur wenig aufgeklärt. Wahrscheinlich handelt es sich um einen synergistischen Effekt mehrerer durchtrennter Bahnen in diesem Läsionsmodell. Es kann zumindest festgestellt werden, daß behandelte Tiere diese großen Defizite im Offenfeld nicht zeigen.

Eines der behandelten Tiere zeigte von Anfang an keine Defizite in der BBB Bewertung. Da dieses Tier erstaunlicherweise in den anderen Tests nicht signifikant von den anderen Tieren seiner Gruppe abwich, wird angenommen, daß diese Beobachtung durch individuelle kompensatorische Mechanismen begründet ist. Kompensatorische Mechanismen können eine Verstärkung der Reflexe der Beine oder ein verändertes Zusammenspiel verschiedener Muskelgruppen zur besseren Lokomotion enthalten. Alle Tiere, die in die Verhaltensstudien eingegangen sind wurden auf eine vergleichbare Läsionsgröße und -lage hin untersucht. Die Effekte besonders guter oder schlechter Lokomotion liegen demnach nicht in Unterschieden der Operation begründet.

Zwei der Kontrolltiere konnten dennoch BBB Werte von 19,5 und 21 erreichen. Diese aussergewöhnlich gute lokomotorische Leistung kann in kompensatorischen Mechanismen begründet sein (Helgren and Goldberger, 1993) sowie aber auch in spontaner funktioneller Erholung. Die Tatsache daß eine Rückenmarksläsion in diesem funktionellen Test durch kompensatorische

Mechanismen ganz maskiert werden kann spricht gegen eine alleinige Bewertung der Lokomotion durch den BBB. Es muß beachtet werden, daß diese Klassifizierung für eine viel schwerwiegendere Läsionsart konzipiert ist, die Unbeweglichkeit der Hinterbeine, ein Fehlen gewichtsunterstützender Schritte, unkoordiniertes Laufen und andere offensichtliche und schwerwiegende Defizite zur Folge hat. Dieses Läsionsmodell bedarf anspruchsvolleren lokomotorischen Aufgaben wie dem Lauf über ein horizontales Gitter, in dem auch Fehler der Feinkontrolle der Lokomotion sichtbar werden.

Dennoch ist ein erstaunlicher Befund dieses Tests, daß die meisten behandelten Tiere zwischen 8 und 11 Wochen nach Läsion koordiniertes Laufen zeigen. Der scheinbar sprunghafte Anstieg der BBB Werte deutet auf wichtige Prozesse hin, die genau zu diesem Zeitpunkt funktionelle Veränderungen bewirken. Der Zeitpunkt könnte ein Hinweis darauf sein, daß es sich bei der Ursache funktioneller Erholung um Regeneration verletzter Fasern handelt. Drei bis vier Wochen nach Läsion können regenerierende CST Fasern im distalen Rückenmark gefunden werden. Weiteres Wachstum regenerierender Axone in die Region der ursprünglichen Zielzellen erfolgt mit einer Geschwindigkeit von ca. 1mm/Tag (Schnell & Schwab, 1990; Li & Raisman, 1994). Es erfolgt dann die Ausbildung synaptischer Verbindungen und eventuell sogar Umorganisationen kortikaler oder spinaler Netzwerke. Diese Prozesse machen die Annahme eines Auftretens funktioneller Effekte von Regeneration in der Ratte nach einem Zeitraum von 6-8 Wochen wahrscheinlich.

4.4.2. Funktionelle Verbesserung der Lokomotion behandelte Tiere beim Lauf auf der horizontalen Leiter

Der Lokomotionstest bei dem die Tiere über eine horizontale Leiter mit variablen unregelmäßigen Sprossenabständen laufen wurde als Test für Koordination und Feinkontrolle der Hinterpfoten entwickelt (Metz et al., 2000). Fehlerfreies Laufen über die Leiter setzt Vorderpfoten-Hinterpfoten Koordination voraus, die durch ventrolaterale Trakte vermittelt wird. Das retikulospinale System initiiert einen

Tritt-Rhythmus, der für diese Aufgabe notwendig ist. Desweiteren ist die bewusste Steuerung der Bewegung notwendig, um die Sprossen, die mit den Schnurrhaaren ertastet werden zu treffen. Die willentlichen Bewegungen werden über das Kortikospinal- und das Rubrospinalsystem gesteuert und gewährleisten genaue Pfotenplatzierung (Kunkel-Bagden et al., 1993; Metz & Whishaw, 2002). Die letzte Phase der Pfotenplatzierung setzt auch eine Kopplung der taktilen Information mit der motorischen Innervation voraus. Dieser Reflex wird durch das pyramidale System gesteuert (Metz & Whishaw, 2002).

Fehler auf der horizontalen Leiter werden wie im Material und Methodenteil beschrieben als vollständiges Verfehlen bzw. Durchrutschen der Pfote und aller Zehen durch die Sprossen definiert. Diese Fehler können auf drei verschiedenen Mechanismen basieren: (1) Defizite in der genauen Platzierung der Pfoten, (2) Defizite in der Benutzung der Zehen zum Greifen der Sprossen und (3) Defizite in der Koordinierung der Hinterpfoten zu den Vorderpfoten und der Balance (Metz et al., 2000). Da die Sprossen unregelmäßig weite Lücken einschlossen und das Muster regelmäßig verändert wurde, kann davon ausgegangen werden, daß Verbesserungen in der Leistung der Tiere nicht auf dem Erlernen des Musters basieren (Metz & Whishaw, 2002). Normales Laufverhalten unlädiertes Tiere zeigte meist ein Vortasten der Sprossen mit den Vorderpfoten und Platzieren der Hinterpfoten auf denselben Sprossen. Dieses Laufmuster war in lädierten Tieren gestört.

Untersuchungen an behandelten Tieren und Kontrolltieren zeigten bereits nach einer Woche eine signifikant bessere lokomotorische Leistung der behandelten Tiere auf dem horizontalen Gitter. Der Grund für diese frühe Beobachtung präziserer Lokomotion ist nicht bekannt. Annehmbar ist ein neuroprotektiver Effekt des Eisenchelators (s. auch Gaviria et al., 2000; Pencalet et al., 1993) oder vermehrte Aussprossung nicht lädiertes Fasern, die Defizite maskieren könnten.

Spontane funktionelle Erholung nach relativ kurzen Zeitpunkten wurde in Menschen und Tieren bei inkompletten Rückenmarksläsion (keine Totaltransektion) beschrieben (Rossignol et al., 1999; Merkler et al., 2001; Kaegi

et al., 2002). Spontane funktionelle Erholung wird auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt: plastische Reorganisation neuraler Netzwerke vor und hinter der Läsion, Aktivitäts-abhängige Adaptation der CPGs (Brustein & Rossignol, 1998), Umorganisation kortikaler Strukturen oder Aussprossen lädierter oder intakter Fasen (s.Fouad et al., 2001a; Raineteau & Schwab, 2001). In diesem Zusammenhang ist auch die spontane Erholung vom spinalen Schock zu nennen (Hiersemenzel et al, 2000; Kunkel-Bagden et al., 1993), der auch in einigen Sham operierten Tieren zu Defiziten führt. All diese Prozesse können funktionelle Erholung aufgrund von Regeneration maskieren oder nachahmen.

Der Unterschied zwischen der rechten und linken Hinterpfote könnte darin begründet sein, daß durch die Drahtmesserläsion asymmetrisch mehr Trakte der rechten Rückenmarkshälfte lädiert werden.

Die Analyse der Rückzugszeiten der Hinterpfoten ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tiergruppen. Dieser Test wurde in Anlehnung an die Befunde von Merkler et al (Merkler et al., 2001) im dorsalen Hemisektionsmodell an Th8 durchgeführt. Tritt die Ratte nicht genau auf eine Sprosse, sondern in eine Lücke, wird eine Rückzugsbewegung des Beines eingeleitet, die zumindest in der Katze durch supraspinale Prozesse gesteuert wird (Hiebert et al., 1994). Die hier beobachteten Rückzugszeiten vor OP (zwischen 77 und 108 ms) stimmen nicht mit den von Merkler et al. ermittelten überein (170 ms), da in dieser Auswertung die Rückzugszeit von dem Zeitpunkt der tiefsten Fußlage an gemessen wurden. Merkler et al. haben den gesamten Prozeß des Durchfallens bis zum Ende der Rückzugsbewegung vermessen. Desweiteren waren die signifikanten Unterschiede der Daten von Merkler et al. zwischen Kontrolltieren und unlädierten Tieren in einem Bereich von 35-40 ms, der die Auflösungsgrenze des hier benutzten Videosystems übersteigt. Es ist annehmbar, daß die Ergebnisse daher durch die geringe zeitliche Auflösung nicht auswertbar sind.

4.4.3. Auswirkungen der Behandlung zur Narbenunterdrückung auf die Laufeigenschaften der Ratte im CatWalk Test

Eine detaillierte Analyse der Koordination der Versuchstiere wurde mit der CatWalk Apparatur vorgenommen. Die Untersuchung der Rate irregulärer Laufmuster ergab signifikante Verbesserungen der behandelten Tiere über eine Zeit von 15 Wochen. Kontrolltiere blieben bis zum Ende der Studie auf einem recht hohen Anteil irregulärer Laufmuster. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse der Offenfeldbeobachtungen mittels der BBB Klassifizierung. Der entscheidende Punkt der Verbesserung war dort koordiniertes Laufen. Koordination im BBB entspricht der Rate regulärer Laufmuster im Catwalk. Durch die Feststellung signifikanter Unterschiede im CatWalk Test kann eine Fehleinschätzung koordinierten Laufens durch den Beobachter im Offenfeld nun ausgeschlossen werden.

Die Mechanismen, die zu einem regelmäßigen Laufmuster führen sind nicht vollständig geklärt. Da der CPG allein rhythmische Schrittfolgen bewirken kann muß diesem System ein wesentlicher Anteil dieser Funktion zugeschrieben werden. Es werden aber auch supraspinale Einflüsse auf den CPG angenommen. Ob eine Verbesserung durch Regeneration des CST oder Kompensation durch andere Trakte bewirkt wurde kann aber mit diesen Methoden nicht eindeutig geklärt werden.

Der ebenfalls untersuchte hintere Fußabstand ergab zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten Tieren und Kontrolltieren, aber es konnte klar festgestellt werden, daß die Läsion eine langanhaltende Auswirkung auf diese Größe hat. Sham operierte Tiere veränderten den hinteren Fußabstand kaum in der beobachteten Zeit. Die Vergrößerung des hinteren Fußabstandes gibt dem Tier mehr Stabilität. Es ist anzunehmen, daß eine Unsicherheit in der Körperhaltung durch eine Vergrößerung der Standfläche ausgeglichen werden soll. Es zeigten die behandelten Tiere stets einen kleineren Fussabstand im Vergleich zu Kontrolltieren. Es ist anzunehmen, daß eine grössere

experimentelle Gruppe mehr Klarheit über die Signifikanzen in diesem Test geben könnte.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit diente der immunhistochemischen Charakterisierung der läsionsinduzierten Narbe im verletzten Rückenmark der Ratte und der Untersuchung langfristiger Folgen der Behandlung zur Narbenunterdrückung im zentralen Nervensystem. Die im Labor für Molekulare Neurobiologie entwickelte pharmakologische Behandlung zur Narbenunterdrückung mittels eines Eisenchelators (5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl) und cAMP wurde immunhistochemisch mittels Antikörper gegen verschiedene Narbenkomponenten, durch Markierungsstudien des verletzten Kortikospinaltraktes und mittels funktioneller Tests der Lokomotion der Ratten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß die Behandlung zur Unterdrückung der Narbe eine Verzögerung der Kollagen IV Deposition im Läsionszentrum des Rückenmarks der Ratte bewirkt. Diese Verzögerung öffnet ein Zeitfenster von 12 Tagen, in denen regenerierende Axone die Narbenregion passieren können. Es konnte gezeigt werden, daß die Glianarbe, die mit Antikörpern gegen das gliale fibrilläre saure Protein immunhistochemisch visualisiert werden kann, nicht durch die Behandlung beeinflusst wird. Die Untersuchung einer als inhibitorisch geltenden Molekülgruppe, der Chondroitin Sulfat Proteoglykane (CSPG), ergab in Kontrolltieren eine Akkumulation dieser Moleküle im Läsionszentrum, korrespondierend mit der Kollagen IV-haltigen fibrösen Narbe. In behandelten Tieren konnte eine weniger starke Immunreaktivität für CSPG in der fibrösen Narbe festgestellt werden solange auch die Kollagen IV-Immunreaktivität schwach war.

Die Behandlung zur Narbenunterdrückung bewirkte in einer experimentellen Gruppe von 11 Tiere eine Regeneration markierter Kortikospinaltraktfasern ins distale Rückenmark. Diese Fasern zeigten Verzweigungen in die graue Substanz mit Verdickungen, die morphologisch chemischen Synapsen ähnelten. Des Weiteren konnte in funktionellen Tests der Versuchstiere gezeigt werden, daß in 3 von 5 Tests zur Lokomotion behandelte Tiere ein signifikant besseres

lokomotorisches Verhalten zeigten als Kontrolltiere. Die Verbesserung stellte sich meist in einem Zeitraum über 6 Wochen ein, aber auch frühe Effekte der Behandlung waren zu beobachten.

Es konnte also gezeigt werden, daß die Behandlung zur Narbenunterdrückung im verletztem Rückenmark der adulten Ratte zu axonaler Regeneration und funktioneller Verbesserung der Lokomotion der Ratten führt. Da die Drahtmesserläsion des dorsalen CST und der Hinterstrangbahnen relativ geringe funktionelle Defizite nach sich zieht, ist eine Maskierung funktioneller Erholung durch kompensatorische Mechanismen wahrscheinlich. Es ist anzunehmen, daß Effekte der Behandlung auf die Lokomotion durch Regeneration verletzter Fasern in einem Läsionsmodell grösserer funktioneller Defizite klarer feststellbar ist. Daher wird die Behandlung zur Narbenunterdrückung in einem größeren Läsionsmodell, der dorsalen Hemisektion etabliert. In diesem Läsionsmodell werden sowohl der CST als auch der RST durchtrennt, was zu langanhaltenden Defiziten führen sollte, die schon im Offenfeld klar zu beobachten sind.

6. Literatur

1. Aguayo AJ, Rasminsky M, Bray GM, Carbonetto S, McKerracher L, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Carter DA (1991) Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 331: 337-343.
2. Asher RA, Morgenstern DA, Moon LD, Fawcett JW (2001) Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog. Brain Res.* 132: 611-619.
3. Aumailley M, Gayraud B (1998) Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* 76: 253-265.
4. Bandtlow CE, Schwab ME (2000) NI-35/250/nogo-a: A neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. *GLIA* 29: 175-181.
5. 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.
6. Beattie MS, Bresnahan JC (2000) Cell Death, Repair, and Recovery of Function after Spinal Cord Contusion Injuries in Rats. In: *Neurobiology of Spinal Cord Injury* (Kalb RG, Strittmatter SM, eds), pp 1-21. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
7. Beattie MS, Shuman SL, Bresnahan JC (1998) Apoptosis and spinal cord injury. *The Neuroscientist* 4: 163-171.
8. Becker T, Anliker B, Becker CG, Taylor J, Schachner M, Meyer RL, Bartsch U (2000) Tenascin-R inhibits regrowth of optic fibers in vitro and persists in the optic nerve of mice after injury. *GLIA* 29: 330-346.

9. Benfey M, Aguayo AJ (1982) Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature* 296: 150-152.
10. Berry M, Maxwell WL, Logan A, Mathewson A, McConnell P, Ashhurst DE, Thomas GH (1983) Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* 32: 31-53.
11. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416: 636-640.
12. Bregman BS (1998) Regeneration in the spinal cord. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 800-807.
13. Bregman BS, Coumans JV, Dai HN, Kuhn PL, Lynskey J, McAtee M, Sandhu F (2002) Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. *Spinal Cord Trauma: Regeneration, Neural Repair and Functional Recovery* 137: 257-273.
14. Brösamle C, Huber AB, Fiedler M, Skerra A, Schwab ME (2000) Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J. Neurosci.* 20: 8061-8068.
15. Brösamle 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.
16. Brown JC, Timpl R (1995) The Kollagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 484-490.
17. Brustein E, Rossignol S (1998) Recovery of locomotion after ventral and ventrolateral spinal lesions in the cat. I. Deficits and adaptive mechanisms. *J. Neurophysiol.* 80: 1245-1267.

18. Bundesen, L. Q., Janis, L. S., Bregman, B. S., and Kromer, L. F. Alterations of EphB2 proteins following spinal cord injury in the adult rat. Abstract Book of the 30th annual meeting of the Society for Neuroscience . 2000.
19. Buss A, Schwab ME (2003) Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the rat spinal cord. *GLIA* 42: 424-432.
20. Cai D, Qiu J, Cao ZX, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT (2001) Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J. Neurosci.* 21: 4731-4739.
21. Carbonell AL, Boya J (1988) Ultrastructural study on meningeal regeneration and meningo-glial relationships after cerebral stab wound in the adult rat. *Brain Res.* 439: 337-344.
22. Cazalets JR, Borde M, Clarac F (1995) Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *J. Neurosci.* 15: 4943-4951.
23. Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403: 434-439.
24. Chen XY, Wolpaw JR (2002) Probable corticospinal tract control of spinal cord plasticity in the rat. *J. Neurophysiol.* 87: 645-652.
25. Chen XY, Wolpaw JR, Jakeman LB, Stokes BT (1996) Operant conditioning of H-reflex in spinal cord-injured rats. *J. Neurotrauma* 13: 755-766.
26. Chen XY, Wolpaw JR, Jakeman LB, Stokes BT (1999) Operant conditioning of H-reflex increase in spinal cord--injured rats. *J. Neurotrauma* 16: 175-186.

27. David S (2002) Recruiting the immune response to promote long distance axon regeneration after spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 137: 407-414.
28. Davies SJA, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J (1997) Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 390: 680-683.
29. De Winter F, Holtmaat AJ, Verhaagen J (2002) Neuropilin and class 3 semaphorins in nervous system regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515: 115-139.
30. 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 Kollagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 13: 1774-1786.
31. Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T (2000) Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol.* 19: 325-332.
32. Faissner A (1997) The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res.* 290: 331-341.
33. Fawcett JW (1997) Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res.* 290: 371-377.
34. Fawcett JW, Asher RA (1999a) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bul.* 49: 377-391.
35. Fawcett JW, Shearer MC, Adcock KH (2002) In vitro models of glial boundaries. In: *Glial Interfaces in the Nervous System* (Aldskogius H, Fraher J, eds), pp 131-138. IOS Press.

36. Feringa ER, Kowalski TF, Vahlsing HL, Frye RA (1979) Enzyme treatment of spinal cord transected rats. *Ann. Neurol.* 5: 203-206.
37. Filbin MT (1995) Myelin-associated glycoprotein: a role in myelination and in the inhibition of axonal regeneration? *Curr. Op. Neurobiol.* 5: 588-595.
38. Fitch MT, Silver J (1997a) Activated Macrophages and the Blood-Brain Barrier: Inflammation after CNS Injury Leads to Increases in Putative Inhibitory Molecules. *Experimental Neurology* 148: 587-603.
39. Fitch MT, Silver J (1997b) Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res.* 290: 379-384.
40. Fitch MT, Silver J (1999) Beyond the glial scar. Cellular and molecular mechanisms by which glial cells contribute to CNS regenerative failure. In: *CNS regeneration: basic science and clinical advances* (Tuszynski MH, Kordower JH, eds), pp 55-88. Academic Press.
41. Fouad K, Dietz V, Schwab ME (2001a) Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors. *Brain Res.* 36: 204-212.
42. Fouad K, Metz GA, Merkler D, Dietz V, Schwab ME (2000) Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. *Behav. Brain Res.* 115: 107-113.
43. Fouad K, Pedersen V, Schwab ME, Brosamle C (2001b) Cervical sprouting of corticospinal fibers after thoracic spinal cord injury accompanies shifts in evoked motor responses. *Curr. Biol.* 11: 1766-1770.
44. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR (1996) Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J. Invest. Dermatol.* 107: 404-411.

45. Gaviria M, Privat A, d'Arbigny P, Kamenka J, Haton H, OHanna F (2000) Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, Gacyclidine, after experimental contusive spinal cord injury in adult rats. *Brain Res.* 874: 200-209.
46. Glantz SA (1997) *Biostatistik*. Deutsche Ausgabe von Heinecke A & Köpcke W. McGraw-Hill International (UK) Ltd.
47. Grillner S (2002) The spinal locomotor CPG: a target after spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 137: 97-108.
48. Grotendorst GR (1997) Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 171-179.
49. Halfter W, Liverani D, Vigny M, Monard D (1990) Deposition of extracellular matrix along the pathways of migrating fibroblasts. *Cell Tissue Res.* 262: 467-481.
50. Hamers FPT, Lankhorst AJ, Van Laar TJ, Veldhuis WB, Gispen WH (2001) Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: Its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J. Neurotrauma* 18: 187-201.
51. Helgren ME, Goldberger ME (1993) The recovery of postural reflexes and locomotion following low thoracic hemisection in adult cats involves compensation by undamaged primary afferent pathways. *Exp. Neurol.* 123: 17-34.
52. Hermanns S (2001) *Stimulation axonaler Regeneration im durchtrennten Rückenmark der adulten Ratte*. Dissertation der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
53. Hermanns S, Reiprich P, Müller HW (2001) A reliable method to reduce collagen scar formation in the lesioned rat spinal cord. *J. Neurosci. Methods* 110: 141-146.

54. Hermanns S, Müller HW (2001) Preservation and detection of lesion-induced collagenous scar in the CNS depend on the method of tissue processing. *Brain Res. Protoc.* 7: 162-167.
55. Hiebert GW, Gorassini MA, Jiang W, Prochazka A, Pearson KG (1994) Corrective Responses to Loss of Ground Support During Walking .2. Comparison of Intact and Chronic Spinal Cats. *Journal of Neurophysiology* 71: 611-622.
56. Hiersemenzel LP, Curt A, Dietz V (2000) From spinal shock to spasticity: neuronal adaptations to a spinal cord injury. *Neurology* 54: 1574-82.
57. 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.
58. Houweling DA, Bar PR, Gispens WH, Joosten EA (1998) Spinal cord injury: bridging the lesion and the role of neurotrophic factors in repair. *Prog. Brain Res.* 117:455-71: 455-471.
59. Huber AB, Schwab ME (2000) Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol. Chem.* 381: 407-419.
60. Hunt D, Coffin RS, Anderson PN (2002) The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; A review. *J. Neurocytol.* 31: 93-120.
61. Joosten EA, Dijkstra S, Brook GA, Veldman H, Bar PR (2000) Collagen IV deposits do not prevent regrowing axons from penetrating the lesion site in spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.* 62: 686-691.
62. Kaegi S, Schwab ME, Dietz V, Fouad K (2002) Electromyographic activity associated with spontaneous functional recovery after spinal cord injury in rats. *Eur. J. Neurosci.* 16: 249-258.

63. Kennedy PR (1990) Corticospinal, rubrospinal and rubro-olivary projections: a unifying hypothesis. *Trends Neurosci.* 13: 474-479.
64. Kiehn O, Kjaerulff O (1998) Distribution of central pattern generators for rhythmic motor outputs in the spinal cord of limbed vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 860: 110-129.
65. Klapdor K, Dulfer BG, Hammann A, Van Der Staay FJ (1997) A low-cost method to analyse footprint patterns. *J. Neurosci. Methods* 75: 49-54.
66. Klapka N, Hermanns S, Müller HW (2002) Interactions between glia and extracellular matrix and their role for axonal growth. In: *Glial Interfaces in the Nervous System* (Aldskogius H, Fraher J, eds), pp 139-151. IOS Press.
67. Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS (1993) Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 119: 153-164.
68. Lee SK, Wolfe SW (2000) Peripheral nerve injury and repair. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 8: 243-252.
69. Li Y, Raisman G (1994) Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 14: 4050-4063.
70. Liesi P, Kauppila T (2002) Induction of type IV Kollagen and other basement-membrane-associated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar. *Exp. Neurol.* 173: 31-45.
71. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW (1997) Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 17: 5395-5406.

72. MacKay-Lyons M (2001) Central Pattern Generation of Locomotion: A Review of the Evidence. *Physical Therapy*, 82:69-83.
73. Mansour H, Asher R, Dahl D, Labkovsky B, Perides G, Bignami A (1990) Permissive and non-permissive reactive astrocytes: immunofluorescence study with antibodies to the glial hyaluronate-binding protein. *J. Neurosci. Res.* 25: 300-311.
74. Matinian LA, Andreasian AS (1973) Enzyme therapy in organic lesions of the spinal cord. *Akademia Nauk Armenian SSR* (English translation: Los Angeles: Brain Information Service, University of California, 1976, 156pp) 94pp.
75. McKenna JE, Whishaw IQ (1999) Complete compensation in skilled reaching success with associated impairments in limb synergies, after dorsal column lesion in the rat. *J. Neurosci.* 19: 1885-1894.
76. McKerracher L (2001) Spinal cord repair: strategies to promote axon regeneration. *Neurobiol. Dis.* 8: 11-18.
77. Merkler D, Metz GA, Raineteau O, Dietz V, Schwab ME, Fouad K (2001) Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J. Neurosci.* 21: 3665-3673.
78. 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.
79. Metz GA, Merkler D, Dietz V, Schwab ME, Fouad K (2000) Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res.* 883: 165-177.
80. Metz GA, Whishaw IQ (2002) Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore-

- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J. Neurosci. Methods* 115: 169-179.
81. 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.
 82. Moon LD, Asher RA, Rhodes KE, Fawcett JW (2001) Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat. Neurosci.* 4: 465-466.
 83. Moon LD, Asher RA, Rhodes KE, Fawcett JW (2002) Relationship between sprouting axons, proteoglycans and glial cells following unilateral nigrostriatal axotomy in the adult rat. *Neuroscience* 109: 101-117.
 84. Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW (2002) Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog. Brain Res.* 137: 313-332.
 85. Mori S, Matsuyama K, Miyashita E, Nakajima K, Asanome M (1996) Basic neurophysiology of primate locomotion. *Folia Primatol. (Basel)* 66: 192-203.
 86. Muir GD, Whishaw IQ (1999) Complete locomotor recovery following corticospinal tract lesions: measurement of ground reaction forces during overground locomotion in rats. *Behav. Brain Res.* 103: 45-53.
 87. Muir GD, Whishaw IQ (2000) Red nucleus lesions impair overground locomotion in rats: a kinetic analysis. *Eur. J. Neurosci.* 12: 1113-1122.
 88. Olson L (2002) Medicine: clearing a path for nerve growth. *Nature* 416: 589-590.
 89. Paxinos G (1995) *Cerebral Vascular System. The Rat Nervous System.* Academic Press.

90. Pearson KG (1993) Common principles of motor control in vertebrates and invertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 265-297.
91. Pencalet P, OHanna F, Poulat P, Kamenka JM, Privat A (1993) Thienylphencyclidine protection for the spinal cord of adult rats against extension of lesions secondary to a photochemical injury. *J. Neurosurg.* 78: 603-609.
92. Qiu J, Cai D, Filbin MT (2002) A role for cAMP in regeneration during development and after injury. *Prog. Brain Res.* 137: 381-387.
93. Raineteau O, Fouad K, Noth P, Thallmair M, Schwab ME (2001) Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98: 6929-6934.
94. Raineteau O, Schwab ME (2001) Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 263-273.
95. Reier PJ, Stensaas LJ, Guth L (1983) The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system. In: *Spinal cord reconstruction* (Kao CC, Bunge RP, Reier PJ, eds), pp 163-195. New York: Raven Press.
96. Rossignol S, Drew T, Brustein E, Jiang W (1999) Locomotor performance and adaptation after partial or complete spinal cord lesions in the cat. *Prog. Brain Res.* 123: 349-365.
97. Schnell L, Schwab ME (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 343: 269-272.
98. Schucht P, Raineteau O, Schwab ME, Fouad K (2002) Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 176: 143-153.

99. Schwab JM, Beschorner 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.
100. Schwartz M, Moalem G (2001) Beneficial immune activity after CNS injury: prospects for vaccination. *J. Neuroimmunol.* 113: 185-192.
101. Shearer MC, Fawcett JW (2001a) The astrocyte/meningeal cell interface-- a barrier to successful nerve regeneration? *Cell Tissue Res.* 305: 267-273.
102. Shen YJ, DeBellard ME, Salzer JL, Roder J, Filbin MT (1998) Myelin-associated glycoprotein in myelin and expressed by Schwann cells inhibits axonal regeneration and branching. *Mol. Cell. Neurosci.* 12: 79-91.
103. Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS (1997) Apoptosis of Microglia and Oligodendrocytes After Spinal Cord Contusion in Rats. *Journal of Neuroscience Research* 50: 798-808.
104. Snow DM, Lemmon V, Carrino DA, Caplan AI, Silver J (1990) Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 109: 111-130.
105. Stichel CC, Hermanns S, Luhmann HJ, Lausberg F, Niermann H, D'Urso D, Servos G, Hartwig HG, Müller HW (1999b) Inhibition of Collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons. *Eur. J. Neurosci.* 11: 632-646.
106. Stichel CC, Müller HW (1994) Relationship between injury-induced astrogliosis, laminin expression and axonal sprouting in the adult rat brain. *J. Neurocytol.* 23: 615-630.

107. Stichel CC, Müller HW (1998a) Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Prog. Neurobiol.* 56: 119-148.
108. Stichel CC, Müller HW (1998c) The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res.* 294: 1-9.
109. Stichel CC, Niermann H, D'Urso D, Lausberg F, Hermanns S, Müller HW (1999d) Basal membrane-depleted scar in lesioned CNS: characteristics and relationships with regenerating axons. *Neuroscience* 93: 321-333.
110. Stoll G, Jander S, Myers RR (2002) Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 7: 13-27.
111. 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.
112. Timpl R (1994) Proteoglycans of basement membranes. *EXS* 70: 123-144.
113. Vrinten DH, Hamers FF (2003) 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain* 102: 203-209.
114. Weidner N, Ner A, Salimi N, Tuszynski MH (2001) Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 3513-3518.
115. 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.
116. Yu HH, Kolodkin AL (1999) Semaphorin signaling: a little less per-plexin. *Neuron* 22: 11-14.
117. Yurchenco PD, Schittny JC (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 4: 1577-1590.
118. Zilles K, Rehkämper G (1993) *Funktionelle Neuroanatomie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Hans Werner Müller für die Betreuung meiner Arbeit, für viele inspirierende Diskussionen und Anregungen und die Möglichkeit, auf verschiedenen Kongreßbesuchen internationale Kontakte zu anderen Arbeitsgruppen des Gebietes der Regeneration zu knüpfen. Prof. Dr. Heinz Mehlhorn danke ich herzlich für die Unterstützung und Betreuung meiner Promotionsarbeit.

Des Weiteren danke ich Dr. Susanne Hermanns für die ausführlichen Einführung in die Thematik, viele hilfreiche Diskussionen, ihre ansteckende hochmotivierte Angehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen, die praktische Betreuung der verschiedenen Teilgebiete dieser Arbeit und die ein oder andere nächtliche Sitzung am Mikroskop.

Für die Hilfestellung bei der Etablierung der Verhaltenstests danke ich Dr. Gerlinde Metz (Zürich, Schweiz), die mir bei Fragen zu verschiedenen Tests stets behilflich war, Dr. Frank Hamers (Utrecht, Holland) für die Installation und Hilfestellungen beim CatWalk und Dr. Michele Basso (Columbia University, USA) für hilfreiche Diskussionen über die Offenfeld-Versuche und die BBB Lokomotionsskala.

Bei der Laborcrew möchte ich mich herzlich für die praktische Hilfestellung bedanken: Marcia Gasis und Daniela Müller für Unterstützung bei der umfangreichen Histologie, Simone Duis und Friedemann Pohligh für die hervorragende Pflege und den einfühlsamen Umgang mit den Tieren, Caty Schulte-Eversum und Veronica Estrada für hilfreiche logistische Hilfe und Motivation, Dr. Carmen Masanneck für ihre Motivation durch kritische Diskussionen und die Hilfe bei der Interpretation mikroskopischer Aufnahmen.

Schließlich möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern, Susanne und Georg Klapka, für ihre Geduld und Unterstützung während meines Studiums bedanken. Meinem Lebensgefährten, Christian Brazda, danke ich für seine liebevolle Unterstützung in schwierigen Phasen meiner Arbeit, in denen er ein wertvoller Gesprächspartner war – und wenn gar nichts mehr half, mich sehr schnell wieder zum Lachen bringen konnte.