

Aus der Klinik für Neurologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hans-Peter Hartung

Untersuchung zur Regeneration nach einer traumatischen Rückenmarksverletzung unter  
Behandlung von Fingolimod und Clodronat am Modell der Ratte

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Jordana Bauer

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. Barbara Grimpe

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Charlotte von Gall

## **Widmung**

*Ich widme diese Arbeit einem besonderen Menschen,  
denn ohne diesen Menschen hätte ich in meinem Leben nicht das erreicht, was ich  
geschafft habe und ich stände nicht hier, wo ich stehe und ich hätte nicht das Leben,  
welches ich lebe.*

*Ohne diesen Menschen wäre ich nicht der Mensch geworden, der ich heute bin.*

*Mögen die Tore in Valhalla offen stehen für dich und der Tisch reich gedeckt sein.*

*Ich hoffe, dass du hin und wieder auf mich herabblickst und lächelst.*

*Nur die Besten sterben jung!*

## Zusammenfassung Deutsch

Pro Jahr erleiden in Europa etwa eine Millionen Menschen eine traumatische Rückenmarksschädigung durch Unfälle oder Freizeitaktivitäten. In den meisten Fällen kommt es durch ein stumpfes Trauma zu einer Quetschung des Rückenmarks. Nach der primären mechanischen Verletzung kommt es zu einer sekundären inflammatorischen Reaktion. Diese besteht aus einer Einwanderung von Entzündungszellen in das Gewebe. Es entsteht eine zentrale Kavitation mit randständiger astroglialer Narbe. Astrozyten und Fibroblasten verschließt zwar den Schaden der Blut-Hirn-Schranke, es kommt jedoch zu einer fibrotischen Narbenbildung, die zu einem Funktionsverlust führt. Zusätzlich trägt die Ausschüttung von Transmittersubstanzen, Zytokinen und Proteoglykanen auf Zellebene zum neurologischen Defizit bei. In dieser Arbeit werden insbesondere chondroitinsulfathaltige Proteoglykane und die Beeinflussung durch Lymphozyten unter Behandlung mit zwei in bisherigen Studien effektiv bewerteten Medikamenten (Fingolimod und Clodronat) betrachtet. Fingolimod ist ein neues Immunsuppressivum zur Behandlung von schubförmig verlaufender Multipler Sklerose, welche zu einer Sequestration von T-Lymphozyten über die Bindung an den Sphingosin1-Phosphat-Rezeptor in den Lymphknoten führt. Clodronat wird zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt und führt zu einem Abbau von blutständigen Makrophagen.

**Material und Methoden:** Für die Untersuchung erhielten männliche Wistar-Ratten nach einer Laminektomie eine Kontusion mittels des Infinite Horizon Impactors. Die Tiere wurden mit Fingolimod/DMSO, Clodronat/Liposom oder kombiniert behandelt. Als Kontrolle erhielt eine Gruppe ausschließlich eine Laminektomie, eine andere Versuchsgruppe erhielt die Kontrollsubstanzen DMSO/Liposom. Die Regeneration nach erfolgter Kontusion wurde anhand des *BBB-open field locomotor rating test* und des horizontalen Leitertests untersucht. Weiterhin wurden Blutanalysen mittels FACS-Analyse durchgeführt. Anschließend wurde das Rückenmark entnommen, fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Es wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder erstellt.

**Ergebnisse:** Die Clodronat-behandelten Tiere zeigten eine erhöhte motorische Hinterbeinfunktion. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zur kombiniert behandelten Gruppe. Die Fingolimod/DMSO behandelte Gruppe zeigte keine signifikante Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Fingolimod-behandelten Tiere zeigten bis zur 4. postoperativen Woche eine signifikant verminderte Lymphozytenzahl. Die Anzahl der Monozyten zeigte keine Unterschiede in allen Versuchstiergruppen. Die Granulozyten waren in den Clodronat-behandelten Tieren in der zweiten postoperativen Woche signifikant höher als in den anderen Versuchsgruppen. In den immunhistochemischen Bildern konnte eine verminderte Expression von GFAP und Chondroitinsulfaten in den Clodronat-behandelten Gruppen nachgewiesen werden.

Diskussion: Clodronat scheint über die Beeinflussung der Makrophagen zu einer Herunterregulation der inflammatorischen Immunantwort zu führen. Dies könnte zum einen durch eine Differenzierung in M2-Makrophagen oder zum anderen durch eine Suppression der M1-Makrophagen geschehen. Eine unerwartete und neue Erkenntnis stellt die Granulozytenerhöhung in der zweiten postoperativen Woche dar, die ausschließlich in den Clodronat-behandelten Gruppen auftritt. Es scheint dabei nicht zur Ausschüttung von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies zu kommen, sondern über einen möglichen G-CSF gesteuerten Mechanismus zu einer verbesserten Angiogenese zu kommen. Durch diese beiden Mechanismen könnte es zu einer verbesserten motorischen Funktion gekommen sein, die in den anderen Versuchsgruppen nicht auftritt.

## Zusammenfassung Englisch

Approximately half a million people suffer a traumatic spinal cord injury due to accidents or recreation activities yearly. In most of the cases a blunt trauma causes a contusion of the spinal cord. Following the mechanical injury, an inflammatory reaction initiates an infiltration of immune cells into the affected tissue. A central cavitation with an astroglial scar develops. The affected contused neurons are marked by a decisive demyelination. Astrocytes and fibroblast close the blood-brain-barrier. The resulting fibrosis causes the loss of function. The release of transmitter substances such as cytokines and upregulation of proteoglycans on a cellular level contribute to the neurological deficit. In this work we focus on the expression of chondroitin sulfate consisting proteoglycans and on the influence of lymphocytes which are under treatment of two, in previous studies as effective considered pharmaceuticals (Fingolimod and Clodronat). Fingolimod is a new immunosuppressive agent for the treatment of relapsing multiple sclerosis, which leads to a sequestration of T-lymphocytes by binding to the sphingosin1-phosphat receptor of the lymph nodes. Clodronat is used in treatment of osteoporosis and leads to a deterioration of blood incessant macrophages.

**Materials and Methods:** In this thesis a laminectomy was applied to male Wistar-rats utilizing the Infinite Horizon Impactor. The animals were treated with either Fingolimod/DMSO or Clodronat/Liposom or a combination of both. Another group received DMSO/Liposom as control substances. An additional control group obtained solely a laminectomy. All animals were analyzed via the BBB-open field locomotor rating test and the horizontal ladder test. Blood analysis was performed using fluorescence-activated cell sorting (FACS). In the end, the spinal cords were removed, immunohistochemically stained and fluorescence microscopy images were taken.

**Results:** The Clodronat treated animals increased in motoric hind leg function whereas the combined treated group (Clodronat/Fingolimod) showed no significant differences. Also, the Fingolimod/DMSO treated group showed no significant improvement compared to its control group. Investigation on the number of lymphocytes in Fingolimod treated animals showed until postoperative week four a significant decrease, whereas the number of monocytes showed no significant difference in all tested groups. The number of granulocytes in the Clodronat treated animals were significantly higher in the second postoperative week than in all other tested groups. The immunohistochemical images proved a decreased expression of the GFAP and chondroitin sulfate proteoglycans in the clodronate treated groups.

**Discussion:** Clodronat causes a down regulation of the inflammatory response, which influences macrophage differentiation. Through this they might differentiate into M2 macrophages or M1 macrophages development is suppressed. An unexpected and new insight poses our observation that granulocytes increase in the second postoperative week. This only appeared in the Clodronat treated groups. It seems that there is no release of

cytokines and reactive oxygen. Instead an improved angiogenesis through a possible G-CSF controlled mechanism is taking place. These two mechanisms might have led to the improvement of the motoric function, which has not appeared in the other test groups.

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APC	Allophycocyanin
BBB	Basso-Beattie-Bresnahan <i>open-field locomotor rating scale</i>
BDNF	<i>brain-derived-neurotrophic-factor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ca.	circa
CaCl	<i>calciumchlorid</i> (Kalziumchlorid)
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
CS	Chondroitinsulfat
CSPG	Chondroitinsulfathaltige Proteoglykane
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i> (extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FTY	Fingolimod
GFAP	<i>glia fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
HWI	Harnwegsinfektion
HCl	Salzsäure
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IFN- $\beta$	Interferon $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1	Interleukin- 1

IL-2	Interleukin- 2
IL-6	Interleukin- 6
IL-8	Interleukin- 8
MgCl	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MS	Multiple Sklerose
NaOH	Natronlauge
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury Study
NDS	normal donkey serum (normales Affenserum)
NGS	normal goat serum (normales Ziegenserum)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAID	nichtsteroidale Antirheumatika
OPC	Oligodendrozytäre Vorläuferzellen (oligodendrocyte precursor cells)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Saline)
PE	Phycoerythrobilin
pH	potentia Hydrogenii (pH-Wert)
PFA	Paraformaldehyd
PNS	peripheres Nervensystem
s. k.	subkutan
s. o.	siehe oben
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR <sub>1-5</sub>	Sphingosin-1Phosphat-Rezeptoren 1,2,3,4,5
Th	T-Helfer Zellen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Triton X100	[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl]-deca(ethylenglycol)ether
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## Einheiten

cm	Zentimeter
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
L	Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
M	Molar
nm	Nanometer
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
μl	Mikroliter
Sek	Sekunden
°C	Temperatur in Grad Celsius
%	Prozent

# Inhaltsverzeichnis

1.0 Einleitung .....	1
1.1 Rückenmarkskontusion .....	1
1.2 Entzündungsreaktion .....	3
1.2.1 Extrazelluläre Matrix .....	3
1.2.1.1 Chondroitinsulfat .....	4
1.2.2 Zellvermittelte Immunantwort .....	5
1.2.2.1 Monozyten und Makrophagen .....	5
1.2.2.2 Clodronat.....	6
1.2.2.3 Lymphozyten.....	7
1.2.2.4 Sphingosin-1-Phosphat .....	8
1.2.2.4.1 Spingosin-1-Phosphat-Rezeptoren .....	9
1.2.2.4.2 Fingolimod.....	10
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	12
2.0 Material und Methoden.....	13
2.1 Versuchstiere .....	13
2.1.1 Tierversuchsgenehmigung .....	14
2.2 applizierte Substanzen .....	14
2.2.1 Isofluran .....	14
2.2.2 Rimadyl.....	14
2.2.3 Baytril 15	
2.2.4 Jonosteril .....	15
2.2.5 Fingolimod.....	15
2.2.6 Clodronat.....	15
2.3 Operationsverfahren.....	16
2.3.1 Laminektomie.....	16
2.3.2 Kontusion .....	18
2.3.3 Wundverschluss .....	19
2.4 Versuchstier- Nachsorge .....	19
2.5 Verhaltenstests .....	20
2.5.1 Eingewöhnung.....	20
2.5.2 Basso-Beattie-Bresnahan open-field locomotor rating test (BBB).....	20
2.5.3 Sub- BBB Test .....	24

2.5.4 Horizontaler Leiter Test.....	25
2.6 Blutentnahme .....	26
2.7 Durchflusszytometrie/ <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (FACS) .....	27
2.7.1 FACS- Puffer .....	27
2.7.2 DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ).....	27
2.7.3 FACS- Medium.....	27
2.7.4 Vorbereitung der Proben .....	28
2.7.5 Zugabe der Antikörper .....	29
2.7.6 FACS-Analyse.....	30
2.8 Perfusion .....	32
2.8.1 Phosphat gepufferte Saline (PBS) .....	32
2.8.2 Paraformaldehyd.....	32
2.8.3 Fixierung.....	32
2.9 Gewebeentnahme.....	33
2.10 Gewebeaufarbeitung .....	34
2.10.1 Einbettungsverfahren .....	34
2.10.2 Erstellen der Rückenmarksschnitte.....	35
2.10.3 Immunhistochemie .....	35
2.10.3.1 Triton X 100.....	35
2.10.3.2 PBS/BSA.....	35
2.10.3.3 Inkubationslösungen.....	35
2.10.3.4 CS-56/GFAP- Färbung.....	36
2.10.4 Einbetten der Schnitte .....	38
2.10.5 Mikroskopie.....	39
2.11. Statistik.....	39
3.0. Ergebnisse .....	40
3.1 Der BBB open-field locomotor Verhaltenstests zur Beurteilung der Hinterbeinfunktion bei den Versuchstieren.....	40
3.2 Sub-BBB Test zur Beurteilung der höheren Motorfunktionen .....	42
3.3 Horizontaler Leiter Test zur Beurteilung von sensorischen und motorischen Funktionen der Hinterbeine .....	43
3.3.1 Vergleich zwischen beiden Hinterbeinen.....	45
3.4 FACS- Analyse .....	47
3.4.1 Auswertung der Lymphozyten .....	48

3.4.2 Auswertung der Monozyten .....	49
3.4.3 Auswertung der Granulozyten .....	50
3.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen .....	51
3.5.1 Fingolimod/Clodronat .....	53
3.5.2 Clodronat/Liposom .....	53
3.5.3 Fingolimod.....	53
3.5.4 DMSO/Liposom .....	53
3.5.5 Sham .....	54
4.0 Diskussion.....	55
4.1. Regeneration nach erfolgter Substanzapplikation.....	56
4.1.1 Einfluss von Fingolimod .....	56
4.1.2 Einfluss von Clodronat .....	57
4.1.3 potentielle Interaktion von Fingolimod und Clodronat .....	59
4.2 Granulozyten als potentielle regenerative Induktoren.....	60
4.3. Vergleich der immunhistochemischen Untersuchungen.....	62
4.3.1 Auswirkungen auf Mikrogliazellen und Astrozyten .....	62
4.3.2 Auswirkungen auf Chondroitinsulfate .....	63
4. 4 Schlussfolgerung .....	66

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Skelett einer Ratte .....	17
Abbildung 2:	Infinite Horizon Impactor (Park et al., 2016) .....	18
Abbildung 3:	BBB-Gehege .....	21
Abbildung 4:	BBB Bewertungstabelle (Von links nach rechts):.....	21
Abbildung 5:	Darstellung der Punktevergabe (0 - 21) nach Abhängigkeit der Bewegungen im BBB- Test (Basso et al, 1995). .....	24
Abbildung 6:	Horizontaler Leiter Test.....	26
Abbildung 7:	Formel zur Zellberechnung in der Neubauer Zählkammer .....	28
Abbildung 8:	FACS-Analyse .....	31
Abbildung 9:	Darstellung der Hinterbeinfunktion der verschiedenen Versuchstiergruppen im BBB- <i>open-field locomotor</i> Test .....	41
Abbildung 10:	Sub-BBB: Darstellung der Hinterbeinfunktion der verschiedenen Versuchstiergruppen im Sub- BBB Test .....	43
Abbildung 11:	Statistische Ergebnisse des horizontalen Leitertests im Überblick .....	44
Abbildung 12:	Vergleich der behandelten Gruppen durch eine „ <i>area under the curve</i> “- Analyse von Woche sechs zu sieben .....	45
Abbildung 13:	Vergleich des linken und rechten Hinterbeins in der Behandlungsgruppe von DMSO/Liposom (Kontrollgruppe).....	46
Abbildung 14:	Vergleich des linken und rechten Hinterbeins in der Behandlungsgruppe von Clodronat/Liposom .....	46
Abbildung 15:	Vergleich des linken und rechten Hinterbeins in der Behandlungsgruppe von FTY/DMSO .....	47
Abbildung 16:	Vergleich des linken und rechten Hinterbeins in der Behandlungsgruppe von FTY/Clodronat .....	47
Abbildung 17:	Ermittelte Zellzahlen der Lymphozyten im zeitlichen Verlauf in den verschiedenen Behandlungsgruppen .....	49
Abbildung 18:	Ermittelte Anzahl der Monozyten im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Behandlungsgruppen .....	50
Abbildung 19:	Ermittelte Anzahl der Granulozyten im zeitlichen Verlauf in den verschiedenen Behandlungsgruppen. ....	51
Abbildung 20:	Repräsentative Darstellung horizontaler Rückenmarksschnitte von Thorakalsegment 6-11: A, A' FTY/Clodronat; B, B' Clodronat/Liposom; C, C' FTY/DMSO; D,D' DMSO/Liposom; E, E',sham .....	54

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tierübersicht .....	13
Tabelle 2: Übersicht der Ausschlussgründe aus dem Versuch .....	14
Tabelle 3: Bewertung der Bewegung im Sub- BBB zur genaueren Differenzierung der ermittelten Ergebnisse im BBB .....	25
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper.....	38
Tabelle 5: Auflistung der Versuchstiere nach Fluoreszenz (Proteoglykan positiv/mäßig/negativ) .....	52
Tabelle 6: Auflistung der Versuchstiere nach Fluoreszenz (GFAP positiv/mäßig/negativ)	52

## 1.0 Einleitung

Pro Jahr erleiden etwa eine Millionen Menschen in Europa eine traumatische Rückenmarksschädigung. Dabei handelt es sich zum einen hauptsächlich um jüngere Männer zwischen 16 und 30 Jahren, die sich im Rahmen von Autounfällen sowie bei Sport- oder Freizeitaktivitäten verletzen, und andererseits um ältere Menschen, die sich eine sturzassoziierte Rückenmarksschädigung zuziehen (Chamberlain et al., 2015). Im Jahr 2007 sind etwa 22 Millionen Menschen weltweit betroffen, davon 2,5 Millionen Überlebende mit hohem pflegerischen Bedarf und gravierender Einschränkung der Lebensqualität (Rossignol et al., 2007). Die Mehrheit der entstandenen Rückenmarksschädigungen entsteht durch ein stumpfes Trauma, wodurch eine Fraktur der Wirbelsäule und/oder eine Quetschung mit darunterliegender Verengung oder Stenose des Spinalkanals verbunden ist (Rossignol et al., 2007). Nur ein kleiner Teil der Geschädigten erleidet eine inkomplette oder komplette Durchtrennung des Rückenmarks (Krishna et al., 2013). Obwohl die Untersuchung einer effektiven Regeneration der Schädigung Gegenstand zahlreicher Studien ist, gibt es zurzeit immer noch keinen einheitlichen Therapieansatz, der zu einer zufriedenstellenden Lösung für behandelnde Ärzte und Betroffene geführt hat.

## 1.1 Rückenmarkskontusion

Die Rückenmarkskontusion wird in eine primäre und sekundäre mechanische Verletzung eingeteilt. Im Rahmen der primären Verletzung kommt es zur akuten mechanischen Kompression des Rückenmarks. Typischerweise bleibt eine kleine Menge weißer Substanz mit aufsteigenden sensorischen und absteigenden motorischen Bahnen intakt (Hall und Springer, 2004), welche eine neuronale Regeneration ermöglicht. Der traumatische Schaden des zentralen Nervensystems (ZNS) zerstört die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und führt zu einer Einwanderung von Blutzellen wie Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten in das neurale Gewebe. Dem akuten mechanischen Schaden folgt proportional zur Größe des primären Schadens eine sekundäre Verletzung durch Schwellung, Wirbelsäuleninstabilität, Ischämie, Ionenverschiebungen, oxidativen Stress, Entzündungsreaktion und Apoptose. Dadurch erweitert sich der Schaden in den ersten Stunden bis Tagen nach dem Trauma (Rossignol et al., 2007). Die durch einwandernde Immunzellen bedingte Zytokinproduktion verursacht eine entzündliche Reaktion und führt

zur neuralen Degeneration mit Formung einer zystischen Höhle. Die Verletzungsstelle ist dann typischerweise charakterisiert durch eine zentrale Kavitationsbildung mit randständiger astroglialer Narbe, umgeben von einer dünnen Schicht von überlebenden Axonen, mit starker Demyelinisierung (Hackett und Lee, 2016). Die umgebenden Gliazellen wie Astrozyten und aktivierte Fibroblasten verschließen den Defekt der BHS. Es bilden sich eine fibrotische Narbe sowie neuroinhibitorische Substanzen (Kawano et al., 2012). Auf Zellebene kommt es einerseits zur mechanisch induzierten Depolarisation der Neurone durch die Öffnung von spannungsabhängigen Ionenkanälen mit massiver Freisetzung von Neurotransmittern, insbesondere Glutamat. Andererseits kommt es zu einer Akkumulation von intrazellulärem Kalzium mit mitochondrialer Dysfunktion, welche zu einer Zerstörung der aeroben Energiegewinnung und Laktatakkumulation führt. Weiterhin entstehen Nitritoxid-Radikale durch die Aktivierung der Nitridoxid-Synthase. Des Weiteren führt die Aktivierung von Phospholipase A<sub>2</sub> zur Produktion von Arachidonsäure, welche durch die Cyclooxygenasen in vasokonstriktive Prostaglandine und inflammatorische Leukotriene gespalten wird. Diese aktivieren Leukozyten und Makrophagen und wandeln die Arachidonsäure in Thromboxan A<sub>2</sub> um, welches zu einer erhöhten Plättchenaggregation mit verminderter Gewebepfusion führt (Hall und Springer, 2004). Insbesondere durch die Bildung von Nitritoxid-Radikalen kommt es zu einer Lipidperoxidation von Neuronen und Blutgefäßen mit Veränderung der Funktion und Integrität der Membran. Dadurch kommt es zu einer Vergrößerung des mikrovaskulären Schadens und sekundärer Ischämie (Hall, 1989; Hall, et al., 1996) Ein anderer Prozess auf Zellebene besteht in der Bildung von endogenen Opioiden, welche über die Stimulation von glutamergen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren zu einer weiteren vaskulären sowie metabolischen Fehlfunktion und einem Ionenungleichgewicht führt (Faden und Salzman, 1992). Faden und Holaday konnten bereits 1981 ein verbessertes neurologisches Ergebnis nach Rückenmarksverletzung unter der Therapie mit dem Opiat-Antagonisten Naloxon durch eine verminderte Opioid- induzierte Hypotension als einen relevanten Aspekt der sekundären Prozesse nach einem Trauma nachweisen. Ein weiterer Aspekt ist bedingt durch die Apoptose, welche über Stunden bis Wochen nach dem Trauma zum Untergang von Neuronen und Oligodendrozyten durch inflammatorische Zellen wie Neutrophile, Mikroglia und Makrophagen führt (Crowe et al., 1997; Shuman et al., 1997; Emery et al.,

1998; Lou et al., 1998; Beattie et al., 2000). Dabei scheint insbesondere der Zelltod von Oligodendrozyten zur axonalen Demyelinisierung und zur Entstehung von neurologischen Defiziten beizutragen (Hall und Springer, 2004). Der Prozess der Apoptose wird zum einen über intrazelluläre Signalwege, die proapoptotischen Kaspasen, aktiviert (Bossy-Wetzel et al., 1998) und zum anderen über extrazelluläre apoptotische Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Sauerstoff- und Peroxynitridradikale getriggert (Hall und Springer, 2004). Weiterhin wurden Membranproteine, extrazelluläre Matrixbestandteile sowie sekretorische Proteine und Glykoproteine mit inhibitorischer Aktivität identifiziert, die an der Entstehung des sekundären Schadens beteiligt sind. Darunter befinden sich beispielweise Nogo-A und andere Myelinkomponenten (Schwab, 2004) sowie Proteoglykane, insbesondere Chondroitinsulfate, Semaphorine und Tenaschine.

## 1.2 Entzündungsreaktion

In dieser Arbeit wurden die entzündlichen Vorgänge des sekundären Schadens untersucht. Diese finden zum einen in der extrazellulären Matrix statt, in der beispielsweise durch Zytokine ECM-Bestandteile hochreguliert werden. Zum anderen führt eine zellvermittelte Immunantwort zur Einwanderung von Entzündungszellen in das Gewebe. So kommt es unmittelbar nach einer Rückenmarksverletzung zur Einwanderung von CD8 positiven T-Lymphozyten, die sich in der Akutphase bis zu zwei Wochen im Gewebe aufhalten (Wu et al., 2017).

### 1.2.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist Gegenstand zahlreicher Studien der letzten Jahrzehnte, da sie aufgrund der Zusammensetzung und Veränderung der Bestandteile nach einem Trauma einen Einfluss auf die Regeneration haben kann (De Luca und Papa, 2017). In Kenntnis der Ergebnisse von Rhodes und Fawcett (2004) ist die ECM der die Zellen umgebende Raum und kann ein inhibitorisches oder aktivierendes Milieu in Abhängigkeit von einwirkenden Reizen auf das Gewebe liefern. In der Entwicklung des zentralen Nervensystems dient die ECM als Hüllsubstanz der Zellkörper, Axone und Synapsen und spielt eine Rolle bei der Zellmigration, beim Neuronenwachstum sowie bei der neuronalen Stabilität und Axonregeneration im Erwachsenenalter. Außerdem trägt die ECM zur Bildung

und Stabilisierung des perineuralen Netzes und somit zur neuronalen Plastizität bei. Die Bestandteile der ECM werden von Neuronen und Gliazellen gebildet (Song und Dityatev, 2018). Sie besteht aus Kollagen, Glykoproteinen sowie Tenascin C und Tenascin R, chondroitinsulfathaltigen Proteoglykanen (CSPG) sowie heparansulfathaltigen Proteoglykanen, Zelladhäsionsmolekülen und Integrinen (Rhodes und Fawcett, 2004; Song und Dityatev, 2018). Im Rahmen eines Traumas wird die ECM in erster Linie durch reaktive Astrozyten beeinflusst (Watanabe und Kakizaki, 2017). In der Nähe der astrozytären Zellmembran kommt es nach einem Trauma zu einer Verdichtung der ECM (Rhodes und Fawcett, 2004).

### 1.2.1.1 Chondroitinsulfat

Einen Hauptbestandteil der ECM stellen CSPGs dar. CSPGs finden sich explizit vermehrt in geschädigtem Gewebe, wie es z.B. nach einer Kontusion im ZNS vorliegt und sind bei verschiedenen Zellprozessen wie Adhäsion, Wachstum, Rezeptorbindung, Migration, Barrierefunktion und Interaktion mit anderen ECM-Bestandteilen beteiligt. Sie bestehen aus einem Kernprotein und glykosaminoglykanhaltigen (GAG-) Zuckerketten. Eine GAG-Kette ist ein einfaches, lineares Polymer aus sich wiederholenden Disacchariden. Diese Disaccharide bestehen aus einer Uronsäure (entweder Glucuronsäure oder Iduronsäure) und aus einem N-Acetylglukosamin oder einem N-Acetylgalactosamin. Unterschiede zwischen den einzelnen GAG-Ketten entstehen durch Sulfatierung oder Polymerisation und beruhen auf deren Länge, die von 4 kDa bis 400.000 kDa variieren kann (Rhodes und Fawcett, 2004). Die unterschiedlichen Proteoglykane können letztlich über die GAG-Ketten mit anderen Molekülen interagieren. Die Menge der Proteoglykane wird durch Matrix-Metalloproteinasen reguliert. Im inflammatorischen Milieu sowie Modellen von chronisch neuroregenerativen Erkrankungen konnte eine vermehrte Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen mit konsekutiver Akkumulation von Proteoglykanen, insbesondere CS, nachgewiesen werden (De Luca und Papa, 2017). CSPGs tragen zur Bildung der astroglialen Narbe bei, indem sie nach einer Läsion in der Umgebung der aktivierten Astrozyten akkumulieren und die neuronale Plastizität vermindern. Außerdem stören sie das perineurale Netz (Pizzorusso et al., 2002; Gogolla et al., 2009; Shijo et al., 2018). Reaktive Astrozyten exprimieren vermehrt Rezeptoren für CS an ihrer Oberfläche, an die

die Proteoglykane binden (Hackett und Lee, 2016; Shijo et al., 2018). CS können durch das Enzym Chondroitinase ABC gespalten werden. Applikationen von Chondroitinase ABC in Läsionsstellen nach Rückenmarksverletzung konnten ein verbessertes axonales Wachstum mit erhöhter Regeneration der motorischen Funktion nachweisen (Bradbury et al., 2002; Zerhouni, 2004; Fawcett, 2006; Galtrey und Fawcett, 2007; Galtrey et al., 2007; Cheng et al., 2015).

## 1.2.2 Zellvermittelte Immunantwort

Die zellvermittelte Immunantwort besteht zum einen aus der angeborenen Immunantwort durch neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen und zum anderen aus der erworbenen, erlernten Immunantwort. Letztere besteht aus B- und T-Lymphozyten.

### 1.2.2.1 Monozyten und Makrophagen

Monozyten differenzieren sich aus Monoblasten, die im Knochenmark aus den dort gewebeständigen pluripotenten Stammzellen entstehen, und bilden das monozytäre Phagozyten-System bestehend aus Knochenmarkprogenitorzellen, Blutmonozyten und Gewebemakrophagen (Hume et al., 2002). Blutmonozyten wandern schnell, meist innerhalb von einem Tag, aus der Blutbahn in das Gewebe ein. Diese können sich unter bestimmten Wachstumsfaktoreinflüssen zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren. Die Entwicklung in Gewebemakrophagen findet dabei bereits im Blut, vor dem Eintritt in das Gewebe, statt (Baba et al., 2006). Im Gewebe erlangen die Zellen ihre spezifische Funktion. Je nach Gewebe werden unterschiedliche Makrophagen beschrieben. So werden die Makrophagen in der Leber als Kupfer-Stern-Zellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen, in der Pleura als Pleuralmakrophagen, in der Synovialmembran als A-Zellen bezeichnet (Carson et al., 1998; Kuwana et al., 2003; Ziegler-Heitbrock, 2007). Die zwei Hauptgruppen der blutständigen Monozyten werden in CD14 positive sowie CD14 und CD16 doppelpositive Monozyten unterteilt (Ziegler-Heitbrock, 2007). Zirkulierende CD16 negative Monozyten fungieren als Vorläuferzellen von Makrophagen und dendritischen Zellen, die aus dem Blut austreten und sich zu mesenchymalen Zellen differenzieren können (Kuwana et al., 2003). Die doppelpositiven

Monozyten wurden insbesondere mit der Fähigkeit proinflammatorische Zytokine zu exprimieren und Antigene zu präsentieren in Verbindung gebracht (Ziegler-Heitbrock, 2007). Die lokalen phagozytären Zellen der Haut, des Knochenmarks sowie des Bewegungsapparates werden andererseits durch lokale Gewebereaktionen reguliert (Cecchini et al., 1994). Makrophagen im ZNS können über sekretorische Proteine die Regeneration nach Verletzungen beeinflussen. Weitere positive Effekte sind der Abbau von abgestorbenen Zellen, Zellbestandteilen und inhibitorischen Myelinkomponenten sowie die Signalvermittlung an umliegende Zellen (Yin et al., 2003).

### 1.2.2.2 Clodronat

Durch die Reduktion der inflammatorischen, nach einem Trauma in das Gewebe eintretenden, Makrophagen soll die lokale Entzündungsreaktion gemindert und die Neuroregeneration verbessert werden. Zur Reduktion der Makrophagen wurde eine Applikation von Clodronat ausgewählt. Clodronat ist ein altbewährtes Medikament aus der Gruppe der stickstofffreien Bisphosphonate mit spezifischer Wirkungen auf den Knochen, welche zu den ersten Therapeutika zur Behandlung der Osteoporose, insbesondere der postmenopausalen Osteoporose bei älteren Frauen, eingesetzt wurde und in diesem Bereich auch heute noch erfolgreich eingesetzt wird. Im medizinischen Bereich wird es aufgrund seines analgetischen Potentials außerdem als Co-Analgetikum bei osteolytischen Frakturen, tumorbedingter Hyperkalzämie, Morbus Paget, Arthritis und als „*off-label use*“ im Rahmen eines chronischen Schmerzsyndroms eingesetzt (Frediani und Bertoldi, 2015). Die Applikation kann oral, intraperitoneal (i. p.) sowie intravenös (i. v.) erfolgen, wodurch das Einsatzgebiet stark erweitert wird. Eine zusätzliche Steigerung der Wirkungsintensität kann durch ein Einkapseln in einschichtige Liposomen erreicht werden (Frediani und Bertoldi, 2015). Durch das Einkapseln in Liposomen wird aufgrund der fehlenden BHS-Gängigkeit der Übertritt von Clodronat in das gesunde ZNS verhindert (Popovich et al., 1999). Einerseits wird Clodronat nach der Applikation von den knochenständigen Osteoklasten phagozytiert und führt dadurch zur Apoptose der Zellen. Andererseits wird die Knochenmineralisation über eine Anlagerung der Substanz an die Knochenoberfläche verringert. Über diese Mechanismen wird der unerwünschte Knochenabbau verhindert. Eine weitere Wirkung besteht in dessen Einfluss auf das Monozyten-, Makrophagen-

System. Clodronat führt zu einem Abbau peripherer, im Blut zirkulierender, Makrophagen. Dadurch kommt es zu einer verminderten Gewebeeinfiltration dieser Zellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion, wie sie beispielsweise bei einer Rückenmarksschädigung auftritt (Popovich et al., 1999). Iannotti und Kollegen (2011) konnten durch die Therapie mit Clodronat und Rolipram in histologischen Schnitten eine erhöhte Anzahl intakter, myelinisierter Axone und Neuronen mit verbesserter Hinterbeinmotorik nachweisen. Ähnlich der Anreicherung in den Makrophagen der Knochen, den Osteoklasten, inhibiert Clodronat die Einwanderung von Makrophagen in die Läsionsstelle nach traumatischer Rückenmarksschädigung. Aufgrund der bereits durchgeführten Studien mit dem Nachweis einer erhöhten axonalen Regeneration, Prävention vor Apoptose und Myelinverlust mit daraus folgender verbesserter neurologisch- motorischer Funktion im Rückenmarkskontusions-Modell (Gruner et al., 1996; Popovich et al., 1999; Stirling et al., 2004; Iannotti et al., 2011; Oudega, 2012) stellt Clodronat eine vielversprechende therapeutische Option zur Therapie des sekundären Schadens bei Rückenmarkskontusionen dar.

### 1.2.2.3 Lymphozyten

Neben der immunvermittelten Antwort durch Makrophagen und ihrer Beeinflussung durch beispielsweise Clodronat wird die Immunzellpopulation der Lymphozyten zur erworbenen Immunantwort gezählt. Es existieren B- und T- Lymphozyten. B- Lymphozyten sind die einzigen Zellen, die spezialisiert Immunglobuline wie IgA, IgD, IgE, IgG und IgM in Säugetieren bilden, ausschütten und erkennen. Nach der Aktivierung durch körperfremde Antigene differenziert sich die B- Zellen entweder in eine Gedächtniszelle, in der die Antikörperinformationen über Jahrzehnte gespeichert werden können, oder in eine Plasmazelle, in der Antikörper produziert werden können. Bei Zweitkontakt des gleichen Antigens werden über eine Aktivierung durch Th2- Helferzellen Immunglobuline in einer Plasmazelle gebildet und ausgeschüttet, die an die Antigene binden und diese dadurch anderen Immunzellen präsentiert werden (Yam-Puc et al., 2018; Laffleur et al., 2017). Naive T- Zellen können sich in verschiedene Unterpopulationen differenzieren (Woller et al., 2017). T- Lymphozyten unterteilen sich zum einen in zytotoxische T- Lymphozyten, die an ihrer Oberfläche CD8 exprimieren und über bestimmte Oberflächenmoleküle wie den *Major*

*Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse I verfügen. An diese können Antigene und Fremdzellen wie Tumorzellen binden (de Ruiter et al., 2017; Van Kaer et al., 2017). Außerdem können CD8 positive T- Zellen über diese MHC- Oberflächenmoleküle mit anderen Antigen-präsentierenden Zellen, wie beispielsweise dendritischen Zellen, kommunizieren (Finetti et al., 2017). Weiterhin existieren CD4 positive T-Lymphozyten, sogenannte T-Helferzellen. Sie werden in zwei Populationen eingeteilt. Zum einen existieren regulatorische CD4 positive T-Lymphozyten (Th2) zum anderen CD4 positive Effektorzellen (Th1) (Dyck et al., 2018). Th1- Lymphozyten können über die Sekretion von Zytokinen und Oberflächenrezeptoren und über IFN- $\gamma$  eine Zerstörung von beispielsweise Tumorzellen, über die Anlockung von anderen Immunzellen wie B-Zellen, natürlichen Killerzellen und CD8 positiven Lymphozyten (de Ruiter et al., 2017), induzieren. Wohingegen Th2- Lymphozyten fähig zur Langzeitimmunität sind und über antigenspezifische Mechanismen fungieren (Woller et al., 2017). Des Weiteren tragen regulatorische Th2- Zellen zur immunologischen Toleranz bei und spielen bei Autoimmunerkrankungen eine zentrale Rolle.

#### 1.2.2.4 Sphingosin-1-Phosphat

Gegenstand aktueller Forschung ist Sphingosin-1-Phosphat (S1P), welches einen Einfluss auf die Modulation von Immunzellen zu haben scheint. Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren sind auf den CD4 positiven T- Helferzellen exprimiert und können bei einer Aktivierung Einfluss auf die Immunantwort nehmen.

S1P ist ein biologisch aktives Lysophospholipid, welches über G-Protein gekoppelte Rezeptoren zelluläre Differenzierung, Apoptose und Zellüberleben sowie Zellfunktionen vermittelt. Im Plasma ist S1P vorwiegend an Albumin und Plasmaproteine gebunden. Der Großteil von S1P befindet sich jedoch intrazellulär in Mastzellen, Thrombozyten und monozytären Phagozyten. Die Menge an S1P wird durch Immunstimulation nach Traumen oder im Rahmen von allergischen Prozessen sowie Abstoßungsreaktionen nach Transplantation hochreguliert. Dabei führen Substanzen wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und Interleukin (IL) -1 sowie allergisch bedingte, IgE-vermittelte Reaktionen, zur Phosphorylierung von Sphingosin-1 in die aktive Form S1P. S1P vermittelt anschließend autokrine und parakrine Effekte wie die Emigration von lymphatischen Zellen aus dem

Thymus, die Lymphozytenausschüttung und Verteilung innerhalb der sekundären lymphatischen Organe sowie die autokrine Aktivierung von Mastzellen mit konsekutiver Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren (Hla, 2004; Rosen und Goetzl, 2005; Chiba und Adachi, 2012).

#### 1.2.2.4.1 Spingosin-1-Phosphat-Rezeptoren

Aktuell sind fünf Rezeptoren für S1P beschrieben (Anada et al., 2007). S1P<sub>1-3</sub> werden auf vielen Zellen gefunden, jedoch liegt eine erhöhte Akkumulation auf Immunzellen vor. So weist S1P<sub>1</sub> eine hohe Rezeptordichte auf CD4 positiven T-Helferlymphozyten auf. Zusätzlich exprimieren Zellen des kardiovaskulären Systems und Zellen im ZNS S1P<sub>1</sub>. S1P<sub>4</sub> liegt selektiv im lymphatischen Gewebe und in der Lunge vor, wohingegen sich S1P<sub>5</sub> in der weißen Substanz des ZNS sowie in der Milz finden lässt. Die Wirkung von S1P<sub>1</sub> auf die Zellen ist weitestgehend von der Höhe der Konzentration an S1P sowie von der Wirkung auf die verschiedenen Rezeptoren abhängig. Hohe Konzentrationen von S1P auf den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor führen zur Inhibition der Auswanderung von Lymphozyten aus den sekundären lymphatischen Organen (Chiba und Adachi, 2012). Weiterhin konnten Finley und Kollegen (2013) in ihrer Studie zur plantaren Hyperalgesie zeigen, dass eine Inhibierung von S1P<sub>1</sub> die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche und dadurch die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Gewebe vermindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor eine wichtige Rolle für die Zellwanderungen von Immunzellen spielt. Der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor spielt hingegen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des auditorischen und vestibulären Systems. Ein Fehlen von S1P<sub>2</sub> in der Entwicklung führt zu multiplen Innenohrschäden und Taubheit bereits einen Monat nach der Geburt durch zerstörte Epithel- und Gefäßbarrieren in der Stria vascularis (Kono et al., 2007). Kongruent zu diesen Ergebnissen konnte weiterhin gezeigt werden, dass über S1P<sub>2</sub> eine Aktivierung der Inflammation und Reduktion von vasodilatatorischem NO im Rahmen einer Hypoxie ausgelöst wird. Ein Fehlen des Rezeptors führte im Experiment zu einer verminderten Neovaskularisation und Inflammation (Skoura et al., 2007). Der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor wird unter anderem auf Endothelzellen und Kardiomyozyten exprimiert und kann nach der Aktivierung zur Generation von Nitritoxiden und zur Vasodilatation mit verbesserter mikrovaskulärer Perfusion nach einem Herzinfarkt führen (Theilmeyer et al.,

2006). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor an der Migration von Endothelzellen beteiligt ist (Kimura et al., 2003). Auch für den S1P<sub>4</sub>-Rezeptor konnten immunsupprimierende Effekte durch die Hemmung der Proliferation und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-2 und IL-6 dargestellt werden (Wang et al., 2005). Letztlich wird nur der S1P<sub>5</sub>-Rezeptor in Oligodendrozyten und oligodendrozytären Vorläuferzellen exprimiert. Eine Bindung von S1P an den S1P<sub>5</sub>-Rezeptor blockiert die Migration von OPC (Novgorodov et al., 2007) aber fördert andererseits das Überleben dieser Zellen (Jaillard et al., 2005) und beeinflusst somit die Hirnentwicklung. Insgesamt hat die Forschung seit Entdeckung von S1P und seiner Rezeptoren zu vielen neuen Erkenntnissen geführt und ein erweitertes Spektrum an Angriffspunkten potentieller neuer Therapien eröffnet.

#### 1.2.2.4.2 Fingolimod

Eines dieser neuen medikamentösen Therapieoptionen stellt Fingolimod (FTY) dar. FTY ist ein synthetisch hergestelltes strukturelles Analogon von Sphingosin, isoliert aus dem entomopathogenen Pilz, *Isaria sinclairii*. Es ist verwandt mit Myriocin, welches schon lange Zeit in der traditionellen chinesischen Medizin verwendet wird. Aufgrund der von Myriocin bekannten immunsuppressiven Wirkung, die jedoch zum Teil tödliche Nebenwirkungen aufwies, wurde eine synthetische Modifikation durchgeführt, die die positiven Effekte mit weniger Nebenwirkungen zum Ziel hatte (Kahan et al., 1998). So kam es zur Entwicklung von FTY (2-amino-2(2-[4-octylphenyl]ethyl)-1,3-propandiol-Hydrochlorid).

Die Zulassung für FTY wurde 2010 für schubförmig verlaufende Multiple Sklerose (MS) erteilt (Hartung et al., 2010; Mehling et al., 2011). Wie Sphingosin-1 wird FTY über die Sphingosin-Kinase 2 zu seiner biologisch aktiven Form phosphoryliert (Brinkmann und Lynch, 2002; Paugh et al., 2003) und vermittelt danach über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren von S1P eine Signaltransduktion (Rosen und Goetzl, 2005). Die aktive Form von FTY, FTY-1-Phosphat, fungiert als funktioneller Agonist an den S1P<sub>1, 4, 5</sub>-Rezeptoren. Dabei besteht jedoch eine hohe Affinität und damit eine bevorzugte Bindung am S1P<sub>1</sub>-Rezeptor (Deogracias et al., 2012). Eine Bindung an den Rezeptor führt zur Internalisierung und zum Abbau der membranständigen Rezeptoren (Brinkmann, 2009). Später verläuft

diese Herunterregulation auf Genebene (Aktas et al., 2011). Dadurch wird die Auswanderung der Zellen aus dem Lymphknoten vermindert. T- Lymphozyten, insbesondere autoaggressive Th17-Helferlymphozyten im Rahmen der MS, werden in den sekundären lymphatischen Geweben festgehalten (Lopes et al., 2008; Brinkmann, 2009). Außerdem ist FTY fähig die BHS zu überwinden. Auch diese Fähigkeit wurde bereits unter dem Aspekt der neuronalen Regeneration erforscht. Zum einen zeigte sich unter der Therapie eine Herunterregulation von S1P<sub>1</sub> in neuronalen Zellen und Astrozyten mit reduzierter Astrogliose im MS-Modell. Zum anderen konnten Deogracias und Kollegen (2012) unter der Therapie mit FTY eine Erhöhung der *brain-derived-neurotrophic factor* (BDNF)-Konzentration nachweisen. Reduzierte BDNF-Konzentrationen sind mit einer verminderten neurologischen Funktion verbunden. Durch FTY konnte eine verbesserte neurologische Funktion durch BDNF-abhängige Beeinflussung des NMDA-aktivierten neuronalen Zelltods nachgewiesen werden (Deogracias et al., 2012). Weitere Studien mit FTY in Kombinationstherapie mit anderen Substanzen bestätigten die positiven immunmodulatorischen Effekte. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie das Transplantatüberleben von allogenen Hautzellen im Vergleich zur Monotherapie mit den herkömmlichen Chemotherapeutika wie Ciclosporin A und Tacrolimus verlängert (Lopes et al., 2008). Letztlich wurde FTY ebenfalls zur Untersuchung der Regeneration von Rückenmarksverletzungen genutzt. In den durchgeführten Studien zeigten unter anderem Norimatsu und Kollegen (2012) eine signifikant erhöhte Bewegungsfunktion nach oraler Therapie mit FTY. Hierbei stellte sich heraus, dass insbesondere zu Beginn der sekundären Phase der Rückenmarksschädigung zwischen dem 0. und 14. Tag nach der Verletzung eine Regeneration und motorische Verbesserung auftrat. Zhang und Kollegen (2009) untersuchten die Kombination von FTY mit Tacrolimus in Bezug auf Rückenmarksverletzungen, in der sich eine signifikant verbesserte Regeneration in der Versuchsgruppe, die die Kombination der Medikamente erhielt, im Vergleich zur Monotherapie herausstellte.

## 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Zwischen der chirurgischen und rehabilitativen Therapie erstreckt sich ein weites therapeutisches Feld der innovativen Therapieansätze der letzten Jahrzehnte, um die regenerativen Prozesse auf Zellebene zu beeinflussen. Zur Bereicherung dieser Therapien wurde in dieser Arbeit eine potentielle Behandlungsmethode zur Regeneration nach einer Rückenmarksquetschung untersucht. Dafür griff ich auf ein standardisiertes computergesteuertes Modell für Rückenmarkskontusionen (*Infinity Horizon Impactor*) bei der Ratte zurück. Der Vorteil in der Nutzung eines computergesteuerten Systems liegt in der Durchführung einer einheitlichen, reproduzierbaren und seitengleichen Kontusion (Cao et al., 2005; Krishna et al., 2013). Im Anschluss an die erzeugte Rückenmarksschädigung sollte die Regeneration durch eine Kombinationsbehandlung mit FTY und Clodronat untersucht werden. Die Auswahl der medikamentösen Therapie erfolgte auf der Grundlage einer immunvermittelten Entzündungsreaktion, die durch die Verletzung ausgelöst wird und die Plastizität der überlebenden Axone am geschädigten Rückenmarksabschnitt einschränkt oder sogar komplett verhindert (Krishna et al., 2013). Durch Restriktion des Immunsystems soll die sekundäre Entzündung nach einer Rückenmarkskontusion verhindert bzw. abgeschwächt werden, um den überlebenden Axonen ein Wachstum zu ermöglichen. Beide Therapieansätze wurden in den vergangenen Jahren unabhängig voneinander an einem Modell für Rückenmarksschädigung an der Ratte untersucht und konnten zeigen, dass sowohl FTY als auch Clodronat zu einer verbesserten Regeneration im Vergleich zur Kontrollgruppe geführt haben. In dieser Arbeit untersuchte ich, ob eine Kombinationstherapie beider Medikamente durch ihren unterschiedlichen Wirkmechanismus einen potenzierten regenerativen Effekt bewirkt.

## 2.0 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Es wurden 78 männliche Wistar-Ratten für die Versuche verwendet. Deren Verteilung in vier durchgeführten Versuchsdurchgängen der unterschiedlichen Versuchsgruppen wird in Tabelle 1 aufgelistet. Die Tiere stammten entweder aus der zentralen Hauszucht der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf oder aus der Zucht des Zulieferers Janvier.

**Tabelle 1: Tierübersicht**

	Sham	DMSO/Liposom	FTY	Clodronat	Clodronat	ausgeschlossene Tiere
		(Kontrollgruppe)	DMSO	Liposom	FTY	
<b>1. Versuch</b>	5	0	4	0	0	1
<b>2. Versuch</b>	0	6	1	3	4	17
<b>3. Versuch</b>	3	1	3	4	2	14
<b>4. Versuch</b>	0	2	0	2	1	6
<b>Summe</b>	8	9	8	9	7	38

Die Tiere wurden nach der Zulieferung in Einzelkäfigen bei 21°C Raumtemperatur mit 50% +/- 5% relativer Luftfeuchtigkeit und einem Tag-Nacht-Wechsel alle 12 Stunden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten. Sie wurden mit Ozon angesäuertem Wasser (PH2) und Trockenfutterpellets der Firma Sniff (Soest, DE) *ad libitum* versorgt.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Gründe, die zum Ausschluss der jeweiligen Tiere aus dem Versuch führten. Hierzu gehören die Standardabweichung der Kontusionsstärke, ein erhöhter postoperativer Wert im Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) *open-field locomotor rating scale*, der Tod der Tiere oder das frühzeitige Töten der Tiere aufgrund (a) einer Harnwegsinfektion (HWI) oder (b) einer Hautinfektion.

Der häufigste Grund, die Tiere aus dem Versuch zu entfernen, bestand in einer Abweichung von über 5% (mehr als 10 kDyne) während der Kontusionsverletzung. Dies wurde entweder unmittelbar postoperativ anhand der angezeigten Kontusionsverlaufskurve auf dem Computer oder am ersten postoperativen Tag im BBB entschieden. Nur ein kleiner Anteil der ausgeschlossenen Tiere starb postoperativ oder musste infektionsbedingt in Rücksprache mit den Tierschutzbeauftragten getötet werden. Drei der vier morbiden Tiere erkrankten an einer Infektion des Urogenitaltraktes(a), wie sie häufig nach einer experimentellen Kontusion auftritt. Das andere Tier musste aufgrund einer Hautinfektion(b)

getötet werden. Diese Tiere entstammten entweder aus der Behandlungsgruppe FTY/DMSO (C) oder Clodronat/Liposom(D)

**Tabelle 2: Übersicht der Ausschlussgründe aus dem Versuch**

	ausgeschlossene Tiere	OP-bedingt	nach dem BBB (Score $\geq 3$ )	Infektions bedingt	Ursache der Infektion	Versuchsgruppe
<b>1. Versuch</b>	1	0	0	1	a	C
<b>2. Versuch</b>	17	10	4	3	1x a 2x b	1xC 2xD
<b>3. Versuch</b>	14	6	7	1	a	C
<b>4. Versuch</b>	6	4	2	0		
<b>Summe</b>	38	20	13	5		

## 2.1.1 Tierversuchsgenehmigung

Das Aktenzeichen des Tierversuchsantrages lautet: 84-02.04.2012.A273. Eine Teilnahme am Versuchstierkudenkurs erfolgte vom 20.-24.8.2012.

## 2.2 applizierte Substanzen

### 2.2.1 Isofluran

Isofluran (Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München, DE) ist ein inhalatives Hypnotikum aus der Klasse der Flurane mit hypnotischer und muskelrelaxierender Wirkung. Für die Narkoseeinleitung wurden die Ratten so lange in eine Kammer, die mit 4L /min Isofluran und 3L/min O<sub>2</sub> durchflutet wurde, gesetzt, bis sie einschliefen und keine Reflexe mehr auslösbar waren (s.2.5.1.). Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden die Tiere über eine Maske mit 2,25L/min Isofluran und 3L/min O<sub>2</sub> beatmet bis die Operation beendet wurde. Für die Perfusion wurden die Tiere in eine Kammer, die mit einer Überdosis Isofluran versetzt war, gesetzt, bis sie aufhörten zu atmen.

### 2.2.2 Rimadyl

Rimadyl (Henry Schein VET, Hamburg, DE) ist ein Analgetikum, Antipyretikum und Antiphlogistikum, welches den Wirkstoff Carprofen enthält und zur Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAID) gehört. Es wirkt über eine reversible Inhibition der Cyclooxygenase. Da die handelsüblichen Injektionslösungen eine zu hohe Dosis (50mg/ml) enthalten, wurde die Injektionslösung für die Ratten mit Jonosteril (siehe 2.6.4) im

Verhältnis 1:5 verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung, wurde den Ratten 5 min vor der Operation sowie an den folgenden drei Tagen je 0,4 ml subkutan (s. k.) injiziert.

### 2.2.3 Baytril

Baytril (Bayer, Leverkusen, DE) ist ein bakterizides Antibiotikum mit dem Wirkstoff Enrofloxacin (Fluorchinolon) für Tiere, welches den Ratten prophylaktisch postoperativ über zehn Tage zu je 0,1ml pro Tag oral als Flüssigkeit verabreicht wurde. Dadurch wurde ein großes grampositives und –negatives Keimspektrum der Normalflora bekämpft, welches nach der Schädigung des Rückenmarks durch die Operation zu einer Infektion führen könnte.

### 2.2.4 Jonosteril

Jonosteril (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., DE) ist eine Vollelektrolytlösung. 1000 ml Infusionslösung enthalten: Natriumchlorid 6,430 g, Natriumacetat-Trihydrat 3,674 g, Kaliumacetat 0,393 g, Magnesiumacetat-Tetrahydrat 0,268 g, Calciumacetat 0,261g; Natrium 137 mmol/l, Kalium 4 mmol/l, Calcium 1,65 mmol/l, Magnesium 1,25 mmol/l, Chlorid 110 mmol/l, Acetat 36,8 mmol/l. Sonstige Bestandteile: Salzsäure 25 %, Natriumhydroxid und Wasser für Injektionszwecke. Die Tiere erhielten Jonosteril unmittelbar postoperativ sowie an den folgenden Tagen zur Verhinderung einer Dehydratation sowie als Energielieferant zu je 5ml s. k. bis sich das Gewicht und der allgemeine Gesundheitszustand auch ohne tägliche Injektionen stabilisierte.

### 2.2.5 Fingolimod

FTY (Novartis-Pharma, Nürnberg, DE ) wurde für die Therapie nach der Rückenmarksverletzung zur besseren Applikation in DMSO oder physiologischer Kochsalzlösung mit DMSO gelöst und i. p. gewichtsdosiert (0,3mg/kg) unmittelbar postoperativ sowie an den folgenden Tagen (insgesamt 14 Tage) einmal täglich verabreicht (Kahan, 1998; Foster et al., 2007).

### 2.2.6 Clodronat

Clodronat (bestellt bei: <http://www.clodronateliposomes.org>) ist ein Medikament aus der Gruppe der Bisphosphonate. Es führt zu einem Abbau von Monozyten und gewebständigen Makrophagen und beeinflusst dadurch Entzündungsreaktionen im

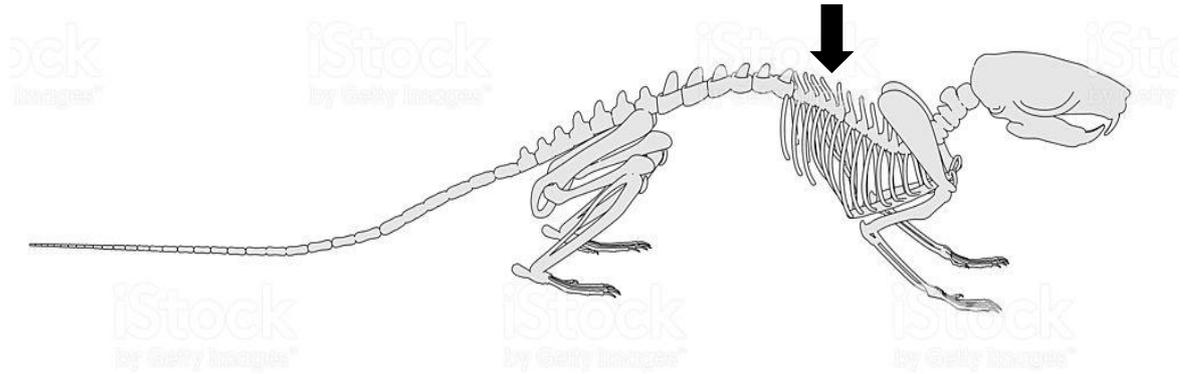
Gewebe. 2ml liposomal eingekapseltes Clodronat (5mg/ml Lösung) wurde den Tieren unmittelbar postoperativ sowie am 1., 3. und 6. Tag postoperativ i. p. appliziert (Lee et al., 2009; Popovich et al., 1999).

## 2.3 Operationsverfahren

### 2.3.1 Laminektomie

Die Ratten erhielten eine Inhalationsnarkose mit Isofluran. Sie wurden in eine Kammer gesetzt, die mit 4L/min Isofluran und 3L/min O<sub>2</sub> durchflutet wurde, bis sie sich im für die Operation gewünschten Toleranzstadium der Narkose befanden. Die Tiefe der Narkose wurde dabei anhand des Lidschlussreflexes und dem Zurückziehen eines Beines nach Setzen eines Schmerzreizes zwischen den Zehen getestet. Wenn auf beides keine Reaktion erfolgte, war von einer adäquaten Tiefe der Narkose auszugehen. Für die Operation wurde den Tieren anschließend eine Maske angelegt, über die die Tiere 2,25L/min Isofluran und 3L/min O<sub>2</sub> einatmeten, um die Narkose aufrechtzuerhalten. Des Weiteren erhielten die Tiere 0,4ml Rimadyl subkutan zur Analgesie. Das Operationsgebiet am Rücken wurde rasiert. Außerdem wurden die Außenseiten der Beine rasiert, um eine bessere Beurteilung für die postoperativen Verhaltenstests zu ermöglichen. Das Operationsgebiet wurde mit Kodan (Schülke, Zürich, CH), einem herkömmlichen Hautdesinfektionsmittel, desinfiziert.

Der Hautschnitt wurde mit einem Skalpell mit einer Hautklinge (Figur 10, Aesculap, Neuwied, DE) vertebral, ca. 2-3cm lang durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Skalpellwechsel. Paramedian der Processi spinosi wurde mit diesem zweiten Skalpell (Figur 15, Aesculap, Neuwied, DE) die paravertebrale Muskulatur durchtrennt und danach das Gewebe mit einem Muskelspreizer nach außen gedrängt, um einen besseren Blick auf das Operationsgebiet zu erlangen. Die Muskulatur zwischen den Processi spinosi der Wirbelbögen wurde durchtrennt. Danach wurde der achte thorakale Wirbelbogen aufgesucht. Dieser war im Operationsgebiet dadurch zu erkennen, dass zwischen dem achten und neunten Processus ein größerer Zwischenraum liegt als zwischen den restlichen Processi (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Skelett einer Ratte (<https://www.istockphoto.com/de/foto/maus-skelett-gm478763863-36032540>, lizenzfreies Bild)**

Der Pfeil markiert den leicht vergrößerten Abstand zwischen dem 8. und 9. Processus spinosus, anhand dem der 8. Wirbelbogen aufzufinden ist.

Die Spitze des Processus spinosus wurde mit der Knochenzange abgetrennt. Danach wurde die Operation unter mikroskopischer Sicht fortgeführt. Der Wirbelbogen des achten thorakalen Wirbels wurde mit der Knochenzange abgetragen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Wirbelsäule mit einer Pinzette leicht angehoben wird um einen kleinen Zwischenraum zwischen dem Wirbelbogen und dem Duralsack zu schaffen und um die Verletzungsgefahr des Duralsacks zu reduzieren, da dieser im Rahmen der Laminektomie nicht verletzt werden sollte. Nachdem der komplette Wirbelbogen mit der Knochenzange entfernt wurde, wurde das Epiduralgewebe entfernt. Dies geschah durch ein leichtes Abstreifen mit einem Wattestäbchen oder durch vorsichtiges Abtragen mit Hilfe einer feinen Pinzette, da es ohne eine Entfernung dieses geleeartigen Gewebes zu einer Beeinträchtigung der Kontusionsstärke gekommen wäre. Als letztes wurden für die bevorstehende Kontusion zwei Vertiefungen paravertebral unmittelbar neben den Wirbelbögen der Brustwirbel 7 und 9 mit einer Pinzette erstellt, die der Befestigung der Ratte im Infinite Horizon Impactor (PSI LLC, Fairfax Station, VA, USA) dienen. Um eine Austrocknung des freigelegten Gewebes und des Duralsacks zu verhindern, wurde in regelmäßigen Abständen mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gespült. Die Blutstillung erfolgte in erster Linie durch Wattestäbchen, mit denen die verletzten Blutgefäße durch leichten Druck komprimiert wurden. Wenn die Blutung dadurch nicht adäquat gestillt werden konnte, wurden kleine Norephedrin-Wattepads eingelegt, die zur Vasokonstriktion führten

und die Blutung stillten.

### 2.3.2 Kontusion

Die Ratte wurde nun auf den Tisch des Infinite Horizon Impactors (PSI LLC, Fairfax Station, VA, USA) umgelagert.



**Abbildung 2: Infinite Horizon Impactor (PSI)**

An dem Gerät befanden sich zwei Pinzetten mit chirurgischem Haken, mit denen die Wirbelsäule gehalten werden konnte. Dazu wurden die Pinzetten mit der Spitze in die vorgefertigten Vertiefungen geführt und so zusammengedrückt, dass die Wirbelsäule der Ratte in leicht schwebendem Zustand festgehalten werden konnte. Der Stempel des Impactors wurde mittig über dem freigelegten Duralsack platziert und exakt drei Umdrehungen, also eine fest definierte Entfernung vom Gewebe, nach oben gefahren. Alle Schrauben und der Tisch wurden festgezogen, damit es zu keinem Verrutschen der Position der Ratte oder des Stempels kommen konnte. Anschließend wurde die Kontusion computergesteuert vorbereitet. Die Kraft, mit der der Stempel auf das Rückenmark treffen sollte, wurde auf 200 kilodyne festgelegt. Dadurch wurde eine moderate Kontusionsverletzung erzeugt. Eine Abweichung von  $\pm 5\%$ , also 10 kilodyne *post contusionem*, fiel in den Toleranzbereich.

Die Kontusion wurde gestartet. Dabei senkte sich der Stempel schnell mit der voreingestellten Kraft auf das Rückenmark, traf dieses und fuhr wieder nach oben.

Unmittelbar nach der Kontusion war eine Rotfärbung über dem freigelegten Duralsack zu sehen. Des Weiteren konnte eine vorübergehende Schnappatmung der Ratte beobachtet werden. Der Verlauf der Kontusion war am Computer nachzuvollziehen. Im Optimalfall war eine gerade ansteigende Kurve ohne Unregelmäßigkeiten wie Zacken mit anschließendem Abfall zu erkennen. Insbesondere der Anstieg der Kurve war dabei wichtig, da dieser den Vorgang der Senkung des Stempels auf das Rückenmark repräsentiert. Bei starken Abweichungen vom normalen Verlauf musste das Tier vom Versuch ausgeschlossen werden, ebenso, wenn in der Auswertung des Computers eine zu hohe Abweichung von der voreingestellten Kraft festgestellt wurde.

### 2.3.3 Wundverschluss

Das Tier wurde nach der Kontusion sofort aus der Halterung gelöst. Die Muskeln wurden mit einer Muskelnahrt in Einzelknopftechnik mit selbstauflösendem polymerem Nahtmaterial Vicryl Plus von Ethicon USP 2-0 (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DE) vernäht. Die Haut wurde mit Titanclips (Braun, Melsungen, DE) verschlossen und die äußere Oberfläche erneut mit Desinfektionsmittel gereinigt. Die Tiere erhielten nach der Narkose 5 ml Ringer- Laktat- Lösung s. k. zum Flüssigkeitsausgleich. Zusätzlich bekamen sie kohlenhydratreiche Zusatznahrung als postoperative Nahrungsergänzung.

## 2.4 Versuchstier- Nachsorge

Den Tieren wurde postoperativ zwei Mal täglich manuell die Blase entleert, bis die eigenständige Miktion wieder möglich war. Die Beurteilung erfolgte anhand der Blasengröße und Urinmenge bei der Entleerung. Die Größe der Blase wurde in "*empty* (E), *drops* (D), *small* (S), *medium* (M), *large* (L) und *extra large* (XL)" eingeteilt. Wenn die Blase drei Tage eine Größe von "S" oder weniger zeigte, wurde die tägliche manuelle Blasenentleerung eingestellt und in den kommenden Tagen stichprobenartig kontrolliert. In den weiteren Kontrollen zeigte sich allerdings zu keinem Zeitpunkt ein erneutes Bedürfnis für eine manuelle Entleerung. Die Tiere wurden täglich gewogen und der Allgemeinzustand sowie die Fellpflege beurteilt. Bis zum 10.Tag postoperativ erhielten die Ratten täglich 0,1ml Baytril oral. Als Analgesie wurde ihnen bis zum 3. Tag postoperativ täglich 0,4ml Rimadyl-Lösung s. k. injiziert. Des Weiteren erhielten sie bei einer Gewichtsabnahme 5ml Jonosteril Infusionslösung s. k. zum Flüssigkeitsausgleich und zur Prävention einer weiteren

Gewichtsabnahme bei mangelndem Appetit durch die Operation.

## 2.5 Verhaltenstests

### 2.5.1 Eingewöhnung

Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn zwischen zwei bis drei Wochen an den Forscher gewöhnt. Da die Tiere teilweise von externen Lieferanten gekauft wurden, diente die Eingewöhnungszeit zum einen zur Anpassung der Tiere an den Forscher und die Verhaltenstests und zum anderen zur Adaptation der Tiere an die Haltungsbedingungen wie z.B. Futter, Räumlichkeiten und Tag-Nacht-Zyklus in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität.

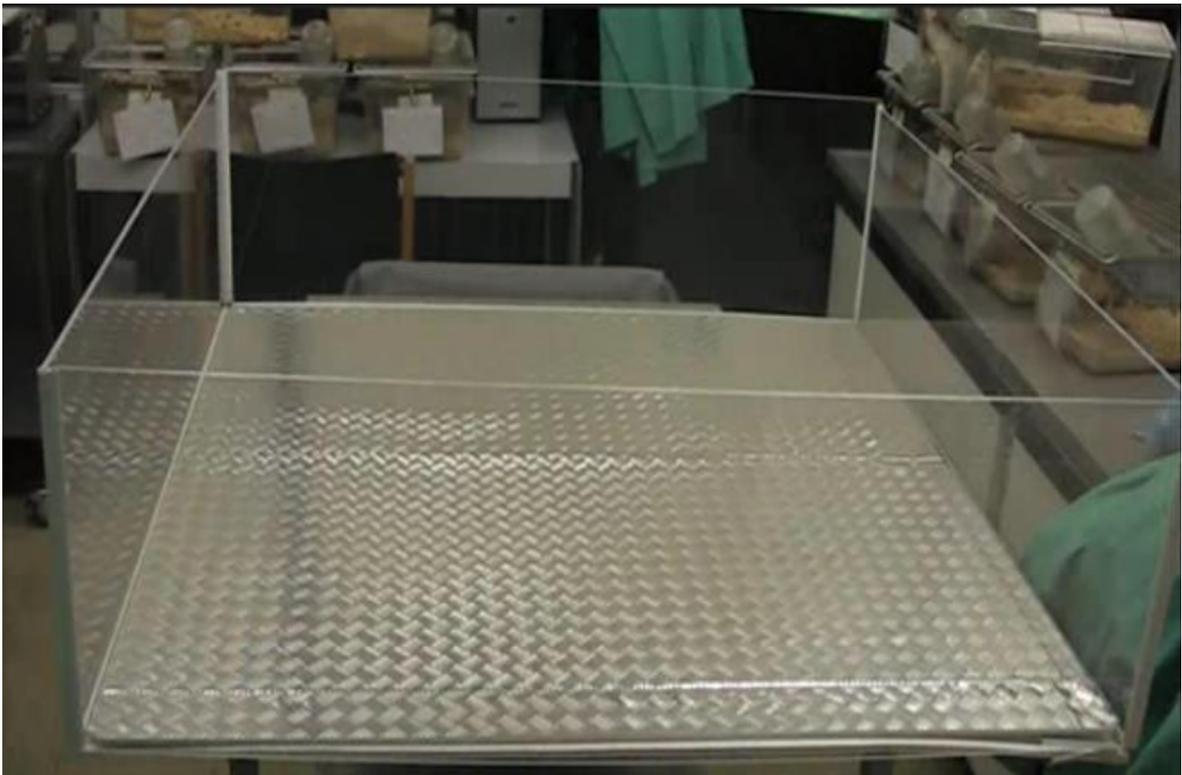
Am ersten Tag wurde bei jedem Tier für 5 min eine Hand in den Käfig gehalten. Ab dem zweiten Tag wurden die Tiere jeweils zu zweit auf den Schoß genommen und gestreichelt. Nach drei bis vier Tagen waren die Ratten soweit an den Forscher gewöhnt, dass sie ohne Probleme und ohne Stress für die Tiere aus ihrem Käfig genommen werden konnten.

Die Tiere wurden anschließend an die Verhaltenstests gewöhnt. Am ersten Tag wurden sie zu zweit auf die aufgebaute horizontale Leiter gesetzt, die sie für 10 min frei erkunden durften. Je nach Persönlichkeit der Tiere wurde am nächsten Tag bzw. in den folgenden Tagen spielerisch mit dem Training auf der horizontalen Leiter begonnen.

Erst am Ende jedes Eingewöhnungsschrittes erhielten die Tiere eine Belohnung in Form von kleinen getrockneten Bananenchipstücken.

### 2.5.2 Basso-Beattie-Bresnahan open-field locomotor rating test (BBB)

Der sogenannte BBB ist ein offener Feld-Test, in dem die Ratten 4 min lang in ein leeres Gehege von 1,2 x 1,2m Größe, das mit einem rutschfesten Untergrund ausgelegt war, gesetzt und beobachtet wurden (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: BBB-Gehege**

Das Bild zeigt das Gehege für den BBB. Der Boden ist mit einer rauen, rutschfesten Oberfläche ausgelegt. Die Wände sind aus Plexiglas. Das Gehege ist 1,2 x 1,2 m groß.

Im BBB wurde die Bewegung der Hinterläufe der Tiere anhand der in Abbildung 4 ausgearbeiteten Kriterien beurteilt. Dabei wurde jedes Bein getrennt evaluiert. Anhand der Bewegung wurden Punkte zwischen 0 und 21 vergeben, wobei 0 gar keiner Bewegung und 21 einer sich gesund bewegenden Ratte entspricht. Der Test wurde immer am Nachmittag durchgeführt, damit die Tageszeit keinen unerlaubten Einfluss auf die Aussage des BBB-

**Rat #:** \_\_\_\_\_ **Date:** \_\_\_\_\_ **DPO:** \_\_\_\_\_ **Rater:** \_\_\_\_\_ **Score: L** \_\_\_\_\_ **R** \_\_\_\_\_

Limb Movement						Trunk Position				Abdomen	Paw Placement				Stepping				Coordination	Toe Clear		Predominant Paw Position				Trunk Instability	Tail	
Hip		Knee		Ankle		Side		Prop			Sweep	Plantar Pl.		Dorsal		Plantar		L		R	Initial Contact		Lift Off					
L	R	L	R	L	R	L	R	L	R			W/O	W	L	R	L	R				L	R	L	R	L			R
Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	L	R	L	R	Drag	L	R	L	R	L	R	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø*	Ø*	I	I	I	I	
S	S	S	S	S	S					Parallel							O	O	O	O	O	O	O	E	E	E	E	Up
E	E	E	E	E	E	Mid				High						F	F	F†	F†	F	F**	F**	P	P	P	P	Down	
																C	C	C	C	C	C	C						

**Abbildung 4: BBB Bewertungstabelle (Von links nach rechts):**

Beinbewegung (keine, wenig, intensiv), Position des Rumpfes(seitlich, mittig), Bauchhöhe (flach, parallel, hoch), Fußplatzierung (seitlich links/rechts, hinterherziehend, mit/ohne Gewichtsunterstützung), Gang(keiner, selten, häufig, konstant), Koordination, Zehenfreiheit, überwiegende Fußposition(nach innen/außen rotiert, parallel), Rumpfstabilität(ja/nein), Schwanzhöhe(oben/unten).

Score Systems hatte. Die 4-minütige Untersuchung jedes Tieres wurde mit einer Kamera aufgenommen, um im Zweifelsfall die Möglichkeit zu haben, die Bewegung nochmals anzuschauen. Jedoch durfte nie ein Tier ausschließlich über die Kameraaufnahmen im BBB-Test bewertet werden.

Der Test wurde präoperativ als Baseline, am ersten Tag und jede weitere Woche postoperativ durchgeführt. Dabei fand die Auswertung während des Tests von zwei bis drei Personen (Daniel Pape, Jordana Bauer und Barbara Grimpe) statt. Das Ergebnis wurde gemittelt. Nach eingehendem Training der Auswerter variierten die Ergebnisse im Verlauf des Versuchs jedoch nur geringfügig.

Zu Beginn des Tests wurden die Ratten in die Mitte des Geheges gerade hineingesetzt. Um durch eine eventuelle Stimulation des Rückenmarks durch das Anfassen der Ratte den Test nicht zu beeinflussen, begann die Bewertung der Tiere erst nach ca. fünf Sekunden.

Während der gesamten Testzeit herrschte Ruhe, um das Tier nicht abzulenken. Blieb ein Tier über längere Zeit an einer Stelle stehen, konnte es durch leichtes Klopfen an die Scheibe des Geheges oder durch Zurücksetzen in die Mitte des Geheges zur Bewegung animiert werden, da ohne Bewegung keine adäquate Bewertung der Beweglichkeit durchgeführt werden konnte.

Bei der präoperativen Beurteilung der Beweglichkeit sollten die Tiere eine volle Punktzahl erhalten. In anderem Fall wurden die Tiere nicht in den Versuch aufgenommen, da von einer eventuellen neuronalen oder muskuloskelettalen Vorschädigung ausgegangen werden musste.

Am ersten postoperativen Tag beschränkte sich die Beurteilung auf das „*limb movement*“, die „*trunk position*“ und „*abdomen*“. An diesem Tag durften die Tiere nicht über oder gleich drei Punkte erreichen, da ansonsten davon ausgegangen werden musste, dass die Kontusion nicht ausreichend gelungen war.

Die Bewegung der Gelenke des Hinterlaufs wurde in „*slight*“ und „*extensive movement*“ eingeteilt. „*Slight*“ entsprach dabei einem leichten Zucken oder einer unvollständigen Beugung eines Gelenks; „*extensive*“ einer vollständig ausgeführten Bewegung wohingegen (und (insbesondere unmittelbar postoperativ)) spastische Krämpfe in die Bewertung mit einfließen. Ab einer extensiven Bewegung von zwei Gelenken waren drei Punkte erreicht (siehe Abbildung 5) und das Tier musste, wenn dies am ersten

postoperativen Tag geschah, vom Versuch ausgeschlossen werden. Mit der „*trunk position*“ wurde beurteilt, ob sich die Tiere, wenn sie sich bei Bewegungen und Drehungen auf eine Seite verlagerten, wieder selbstständig in die mittlere Position drehen konnten oder nicht.

Die abdominelle Position war zu Beginn des Versuchs immer „*drag*“, da sich die Tiere nicht abstützen konnten und den Rest des Körpers unterhalb der Läsionsstelle hinter sich herzogen. Im postoperativen Verlauf über acht Wochen nahm die Beweglichkeit der Hinterläufe zu. Sobald ein plantarer „*weight support*“ vorlag, die Tiere also mit ihren Hinterläufen das Gewicht des Körpers anheben konnten, konnte anhand der abdominellen Position beurteilt werden, wie gut die Tiere ihren Körper mit den Hinterläufen getragen haben.

Wenn dieser Meilenstein der Regeneration erreicht war, wurde auch der Rest des Scores beurteilt, da die folgenden Bewertungskriterien auf den „*weight support*“ aufbauten.

Mit Hilfe der Einteilung in „*none – occasionaly – frequently – consistent*“ wurde die Häufigkeit, in der die Punkte erfüllt waren, beurteilt. Also wie häufig die Tiere ihre Füße plantar bzw. dorsal aufsetzten, wie oft die Ratten koordiniert liefen und wie gut die Tiere die Bewegung ausführten („*toe clearance*“ beschreibt ein Kratzen der Krallen auf dem Boden, welches bei gesunden Tieren durch ordentliches Abrollen des Fußes auf dem Untergrund nicht stattfindet). Des Weiteren wurde die „*paw position*“ beurteilt. Dabei wurde darauf geachtet, ob die Tiere mit außen oder innen rotiertem oder parallel zum Körper positioniertem Fuß liefen. Zuletzt wurde beurteilt, ob die Tiere eine Rumpfinstabilität zeigten und ob sie ebenso den Schwanz anheben konnten oder nicht. Nahezu bei allen Ratten, die eine Kontusion erhielten, blieb eine gewisse Rumpfinstabilität bis zum Versuchsende bestehen.

- 0 No observable hindlimb (HL) movement
- 1 Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee
- 2 Extensive movement of one joint  
or  
extensive movement of one joint *and* slight movement of one other joint
- 3 Extensive movement of two joints
- 4 Slight movement of all three joints of the HL
- 5 Slight movement of two joints *and* extensive movement of the third
- 6 Extensive movement of two joints *and* slight movement of the third
- 7 Extensive movement of all three joints of the HL
- 8 Sweeping with no weight support  
or  
plantar placement of the paw with no weight support
- 9 Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e., when stationary)  
or  
occasional, frequent, or consistent weight supported dorsal stepping and no plantar stepping
- 10 Occasional weight supported plantar steps, no forelimb (FL)–HL coordination
- 11 Frequent to consistent weight supported plantar steps *and* no FL–HL coordination
- 12 Frequent to consistent weight supported plantar steps *and* occasional FL–HL coordination
- 13 Frequent to consistent weight supported plantar steps *and* frequent FL–HL coordination
- 14 Consistent weight supported plantar steps, consistent FL–HL coordination; *and*  
predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes  
*initial contact* with the surface as well as just before it is *lifted off* at the end of stance  
or  
frequent plantar stepping, consistent FL–HL coordination, and occasional dorsal stepping
- 15 Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination; *and*  
no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement;  
predominant paw position is parallel to the body at initial contact
- 16 Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait; *and*  
toe clearance occurs frequently during forward limb advancement;  
predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off

---

- 17 Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait; *and*  
toe clearance occurs frequently during forward limb advancement;  
predominant paw position is parallel at initial contact *and* lift off
- 18 Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait; *and*  
toe clearance occurs consistently during forward limb advancement;  
predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
- 19 Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait; *and*  
toe clearance occurs consistently during forward limb advancement;  
predominant paw position is parallel at initial contact *and* lift off; *and*  
tail is down part or all of the time
- 20 Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait; consistent toe clearance;  
predominant paw position is parallel at initial contact and lift off; tail consistently up;  
*and* trunk instability
- 21 Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw  
position is parallel throughout stance, consistent trunk stability, tail consistently up

**Abbildung 5: Darstellung der Punktevergabe (0 - 21) nach Abhängigkeit der Bewegungen im BBB- Test (Basso et al, 1995).**

### 2.5.3 Sub- BBB Test

Mit Hilfe des Sub-BBB-Scores wurde das Ergebnis des BBB's noch genauer aufgeschlüsselt. Da im konventionellen BBB ein Punktwert über 15 Punkte nur durch durchgängiges plantares Laufen erreicht werden konnte, ermöglichten die Bewertungskriterien „*toe clearance, paw position, trunk instability*„ und „*tail*“ im Sub-BBB eine differenziertere Betrachtung um damit auch kleinere Unterschiede feststellen zu

können (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3: Bewertung der Bewegung im Sub-BBB zur genaueren Differenzierung der ermittelten Ergebnisse im BBB**

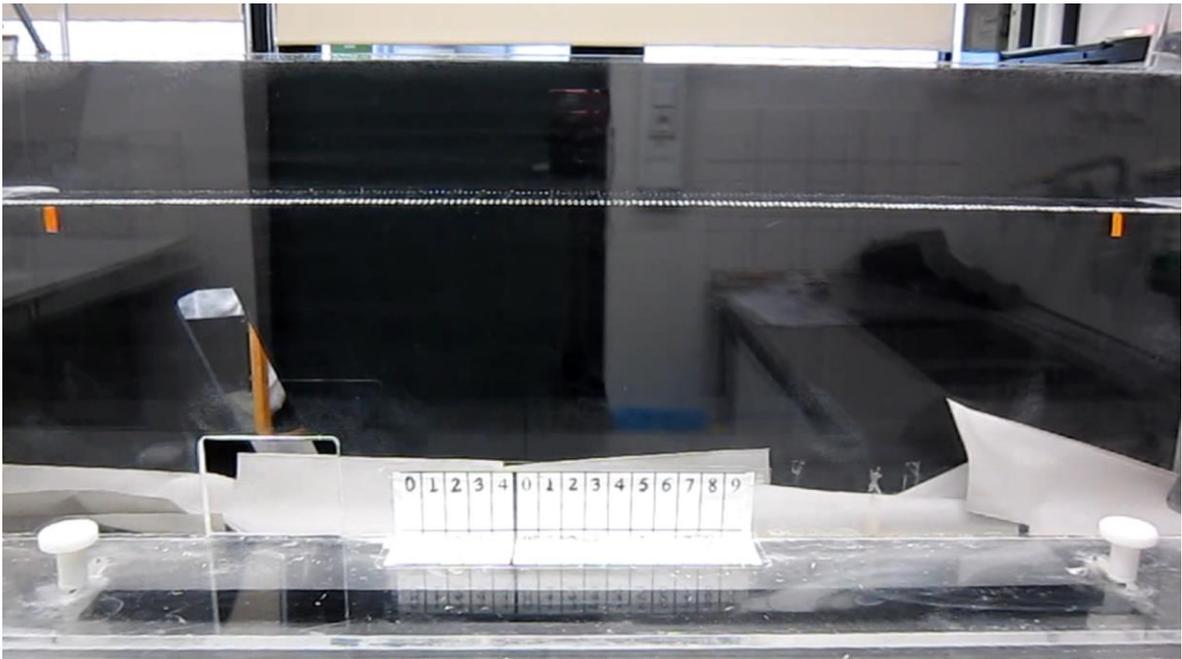
<b>Sub- BBB- Score</b>							
<b>Toe Clearance:</b>		<b>Paw Position:</b>		<b>Trunk Instability:</b>		<b>Tail:</b>	
None	= 0	Rotated	= 0	if yes	= 0	tail down, never up	= 0
Occasional	= 1	Parallel	= 1	no	= 1	tail both, up and down	= 1
Frequent	= 2					tail up, never down	= 2
Consistent	= 3						
<b>Total Max. for both</b>	<b>= 6</b>	Sore R+L "initital contact" and "lift off"	<b>= 4</b>	<b>Max. Score</b>	<b>=1</b>	<b>Max. Score</b>	<b>= 2</b>
<b>Subscore represented</b>		<b>by a single value</b>					
<b>Perfect Score</b>	<b>=13</b>						

## 2.5.4 Horizontaler Leiter Test

Der horizontale Leiter Test wurde in Anlehnung an die Testdurchführung von Metz und Whishaw (2009) durchgeführt und besteht aus zwei Plexiglasscheiben, zwischen denen in unregelmäßigem Abstand Metallstäbe befestigt sind. Die bewertete Laufstrecke erstreckte sich über einen Meter. Die Strecke war von außen für die Filmaufnahmen mit einem Klebestreifen markiert. Die Tiere liefen erst von links nach rechts, wobei sich ein dunkler Käfig als Anreiz zum Hineinlaufen und als Fluchtstätte auf der rechten Seite befand. Anschließend wurde dieser auf der linken Seite platziert, damit die Tiere von rechts nach links liefen. Außerdem durften die Tiere mit Rufen und mit Raschelgeräuschen zum Laufen motiviert werden. Die Metallstäbe wurden jede Woche in ihrer Reihenfolge verändert, um eine Adaption der Tiere an den jeweiligen Versuchsaufbau zu erschweren bzw. zu unterbinden. An der Rückseite einer der Plexiglasscheiben befanden sich Löcher, in die die Leitersprossen gesteckt wurden. Diese waren mit zwei verschiedenen Markierungen versehen. Jede Woche wurden die Metallstäbe zwischen den zwei unterschiedlichen Markierungen gewechselt. Während der Eingewöhnung wurden die Tiere zuerst in den Käfig gesetzt und konnten sich in Ruhe an diesen gewöhnen. Wenn sie von sich aus über die horizontale Leiter liefen, wurden sie zur Belohnung gelobt und gestreichelt. Wenn sie auch nach einigen Tagen noch etwas ängstlich waren, wurden sie vorsichtig auf die Gittersprossen gesetzt, damit sie lernten über diese zurück in den Käfig zu laufen. Da die Tiere immer zu zweit eingewöhnt wurden, liefen sie meistens schon nach kurzer Zeit spielerisch von einer Seite zur anderen. Nach der Eingewöhnung wurde dieser Test präoperativ als Basiswert/Ausgangswert und postoperativ in Abhängigkeit von dem im BBB

ermittelten Fortschritt (ab einem Punktwert von 9 → „*weight support*“), durchgeführt, mit einer Videokamera aufgezeichnet und am Computer ausgewertet. Dabei wurden jeweils drei Läufe in jede Laufrichtung (links nach rechts; rechts nach links) aufgezeichnet, um einen statistischen Durchschnittswert berechnen zu können.

Um einen Lauf erfolgreich auswerten zu können, musste das Tier konstant über die auszuwertende Strecke von einem Meter laufen ohne stehen zu bleiben (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Horizontaler Leiter Test.**

Die orangenen Markierungen legen die zu messende Strecke fest, an den beiden Enden der Strecke befindet sich jeweils ein Käfig

Der Test wurde so oft wiederholt, bis die gewünschte Anzahl an erfolgreichen Läufen erzielt wurde. Zum Teil erstreckte sich dies über zwei bis drei Tage, da die Tiere an manchen Tagen nicht motiviert werden konnten zu laufen.

## 2.6 Blutentnahme

Die Blutentnahme für die *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS)-Auswertung erfolgte aus der Schwanzspitze. Die Blutentnahme erfolgte zum einen präoperativ, um einen Ausgangswert, die Basislinie, zu erhalten und zum anderen in der ersten, zweiten, vierten und achten Woche postoperativ. Dazu wurde den Tieren mit einer spitzen Schere ein kleiner Teil der Schwanzspitze abgeschnitten, um ein paar Tropfen Blut zu erhalten. Dieses Verfahren erwies sich in der Vorbereitung als die beste Methode, da die Tiere

keinem unnötigen Stress ausgesetzt waren. Die Tiere wurden auf dem Schoß gehalten und gestreichelt. Die Schwanzspitze wurde ein paar Millimeter abgeschnitten. Das Blut wurde an der Schwanzspitze in eine mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) beschichtete Kapillare gesaugt, die zu einem Drittel gefüllt werden musste. Dafür reichten ein bis zwei Blutstropfen aus. Nach der ersten Entnahme, konnte für die weiteren Blutabnahmen der Schorf mit der Schere abgetrennt werden, sodass die Tiere kein weiteres Mal an der Schwanzspitze beschnitten werden mussten.

## 2.7 Durchflusszytometrie/*Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS)

### 2.7.1 FACS- Puffer

Eine 500 ml Flasche DMEM/PBS (-CaCl<sub>2</sub> und -MgCl<sub>2</sub>) (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) wurde mit 10ml filtriertem fetalem Kälberserum (FCS, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE), 10ml EDTA (1mM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) und 500mg Natriumazid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) versetzt. EDTA verhindert die Gerinnung der Blutzellen durch eine irreversible Komplexbindung der im Blut enthaltenen zweiwertigen Ionen wie Kalziumionen. Natriumazid verhindert bei der Lagerung das Wachsen von Pilzen und anderen Keimen im Medium. Die Lösung wurde zwischen dem Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### 2.7.2 DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

Gibco DMEM (Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE) ist ein Medium zum Wachstum von Fibroblasten, Neuronen und Gliazellen. Es enthält Glucose, Glutamin, Natriumpyruvat, Phenolrot sowie Aminosäuren und Vitamine. Es enthält keine Proteine, Fette oder Wachstumsfaktoren. Durch einen enthaltenen Bikarbonatpuffer schafft es ein 5-10%iges Kohlenstoffdioxidmilieu und erzeugt einen physiologischen pH-Wert.

### 2.7.3 FACS- Medium

Beschreibung wie oben DMEM (+ Glucose, + L-Glutamin, +Pyruvat)

5% filtriertes FCS

Das Medium wurde für jeden Versuchstag frisch hergestellt.

## 2.7.4 Vorbereitung der Proben

Das Blut aus den Kapillaren wurde in einem 15ml Plastikgefäß (Falcon, Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL), welcher mit 3ml FACS-Puffer gefüllt war, gelöst. Das Gemisch wurde mehrfach geschwenkt, damit das im Puffer enthaltene EDTA die Gerinnung effektiv verhinderte. Im Anschluss daran wurden die Proben bei 4°C 10 min bei 1295rpm (300 g) in einer Eppendorf- Zentrifuge (Centrifuge 5810 R; Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, DE) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Es wurde 2ml 0,84%-iges Ammoniumchlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) zu jeder Probe gegeben, mit einem Vortexer vermischt und 2 min inkubiert. Nach Zugabe von 10ml FACS-Medium wurden die Proben 10 min lang bei 4°C und 1295rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Verfahren wurde wiederholt, sodass insgesamt zwei Waschvorgänge durchgeführt wurden. Danach erfolgte die Zugabe von 500µl FACS-Puffer ohne EDTA zu jeder Probe. Mit der Pipette wurden der Puffer und der Zellüberstand am Boden so vermischt, bis keine Festbestandteile mehr zu sehen waren. Die Proben wurden aufgeteilt. Zum einen wurden 10µl einer Probe mit 10µl 0,4% Tryptan blau (Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE) vermischt und auf eine Zählkammer (Neubauer) aufgetragen. Das Deckglas wurde durch das Erzeugen von Newton`schen Ringen auf der Zählkammer festgehalten. Die Zellen, die sich in der Zählkammer befanden, wurden unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden jeweils vier Zählfelder ausgezählt. Der Wert wurde dann gemittelt. Im Anschluss daran erfolgte die Zellberechnung anhand untenstehender Formel.

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Flächen} \times \text{Kammertiefe (0,1mm)} \times \text{Verdünnung (1/2)}}$$

**Abbildung 7: Formel zur Zellberechnung in der Neubauer Zählkammer**

Der andere Teil der Probe wurde in 2x 200µl aufgeteilt und in jeweils 2 FACS-Glasröhrchen (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE) pipettiert. Der verbleibende Probenrest wurde in ein Sammelglasröhrchen pipettiert.

In jedes Röhrchen erfolgte die Zugabe von 1,5ml FACS-Puffer. Die Proben wurden erneut 10 min bei 4°C bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert.

## 2.7.5 Zugabe der Antikörper

Zuerst erfolgte die Zugabe von FC-Block (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) in einer Verdünnung von 1:25. FC-Block ist ein rekombinant hergestelltes Protein des Fc - Teils der Immunglobuline, in diesem Fall ein in der Maus hergestelltes Protein, welches gegen Ratten CD32 gerichtet war. CD32 ist ein Oberflächenmolekül der auf B-Lymphozyten exprimierten Rezeptoren. Vor allem bei FC-Rezeptor tragenden Zellen können bei der Immunfluoreszenz falsche Ergebnisse durch unspezifische Antikörperbindungen entstehen. Deswegen sollten durch die Zugabe von FC-Block falsch positive Antikörperbindungen reduziert bzw. unterbunden werden. Die Proben wurden gemischt und 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von biotinylierten CD8 $\alpha$  Antikörper (Abcam, USA) in einer Verdünnung von 1:50. CD8 $\alpha$  entspricht der Alphakette des CD8-Oberflächenrezeptors, welcher im Thymus und insbesondere auf MHC1 positiven T-Lymphozyten exprimiert wird. Durch die Zugabe dieses Antikörpers sollten die CD8+ Zellen in der späteren Analyse erkannt werden. Die Proben wurden 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurde zu jeder Probe 1,5ml FACS-Puffer hinzugegeben. Die Proben wurden bei 4°C 10 min bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet. Nun wurden weitere Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 zu den Proben hinzugegeben. Die verwendeten Antikörper waren CD11b (PE, antibodies-online GmbH, Deutschland), CD4 (FITC, Becton Dickinson, Deutschland) und His48 (FITC Santa Cruz Biotechnologies, USA). FITC und PE sind an Antikörper gekoppelte Farbstoffe, die durch die Bestrahlung mit Licht in bestimmten Wellenlängen fluoreszieren. Die oben beschriebenen Antikörper waren nicht biotinyliert, damit keine Interaktionen (die einzelnen Biotinreste können sich verbinden) zwischen den Antikörpern entstehen konnten. Des Weiteren erfolgte die Zugabe von APC (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE), einem Phycobiliprotein, welches an den verwendeten CD8-Antikörper bindet und wie PE und FITC als fluoreszierender sekundärer Antikörper verwendet wurde, in einer Verdünnung von 1:200. Zuletzt wurde das Sammelröhrchen so aufgeteilt, dass einerseits eine ungefärbte Kontrolle und andererseits für jeden Antikörper ein Kontrollröhrchen, welches nur einen der verwendeten Antikörper enthielt, angefertigt wurde. Mit diesen Kontrollröhrchen wurde getestet, ob die Antikörperbindung funktionierte.

Zum anderen wurde eine Probe aus dem Sammelröhrchen mit Zugabe von DAPI (5 mg/ml)(4',6-Diamidin-2-phenylindol, Sigma Aldrich, Deutschland) angefertigt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei Wellenlängen von ca. 350nm blau fluoresziert und zum Anfärben von Desoxyribonukleinsäure (DNS) über eine Bindung an Adenin/Thymidin-Regionen eingesetzt wird. Durch die Fluoreszenz in diesem Wellenlängenbereich ist dieser Farbstoff gut mit anderen Floreszenzen kombinierbar. Mit Hilfe dieser Färbung konnte unterschieden werden, ob es sich um beschädigte Zellen handelt, denn DAPI kann nur schwerlich intakte Zellmembranen durchbrechen. Diese Zellen würden im Falle des Nachweises nicht mit in die Bewertung einfließen. Anschließend wurden die Proben wieder 30 min lang im Dunkeln auf Eis inkubiert und im Anschluss mit 1,5ml FACS-Puffer versetzt und bei 4°C 10 min bei 300g zentrifugiert. Nachdem alle Antikörper hinzugegeben, inkubiert und die ungebundenen Antikörper ausgewaschen wurden, wurde der Überstand dekantiert und zu jeder Probe 250µl FACS-Puffer hinzugegeben. Die Proben waren nun bereit für die Analyse.

## 2.7.6 FACS-Analyse

Vor jeder Analyse wurde das FACS-Gerät (Beckman Coulter, CytoFLEX, Brea, Kalifornien, USA) mit NaOH (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) und destilliertem Wasser gespült um eventuelle Restverschmutzungen zu beseitigen. Vor der unmittelbaren Verwendung der einzelnen Röhrchen wurde die Probe nochmal kurz gemischt. Zuerst wurde anhand der Kontrollröhrchen jeder Antikörper auf seine Bindung getestet. Waren alle Kontrollen positiv, wurde mit der Probenanalyse begonnen. Dafür wurde für jede Probe eine 30-sekündige Aufnahmezeit benutzt. Nach der Analyse der Probe wurden manuell die folgenden Grafiken erstellt. Das Gerät zeigte je nach Einteilung der Bereiche die dazugehörigen Zellzahlen an.

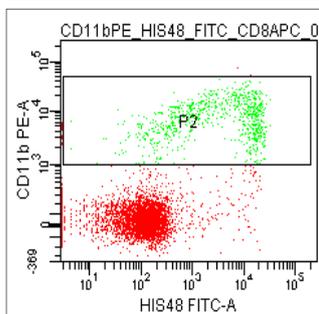
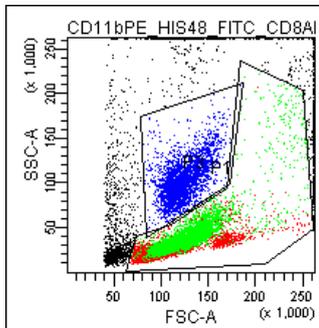
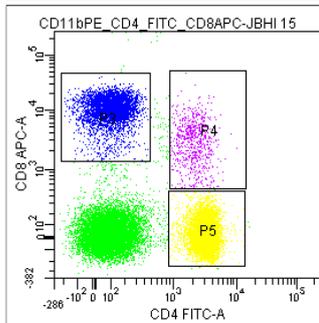
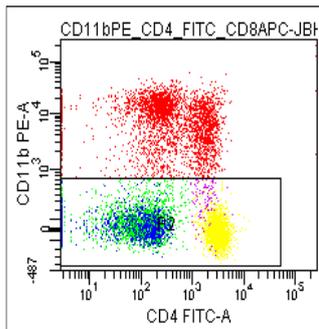
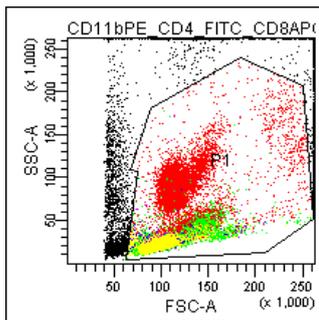


Abbildung 8: FACS-Analyse

### 1. Lymphozyten (CD4, CD8, CD4+8)

FSC beschreibt das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*), es ist abhängig vom Volumen der Zelle, SSC das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*), es ist abhängig von der Granularität der Zellen. In dieser Abbildung zeigt das Gerät alle analysierten Zellen. Die große Population mit kleinem Volumen und geringer Granularität entspricht dem Anteil der Erythrozyten in den Proben. Da die Anteile der anderen im Blut befindlichen Zellen bestimmt werden sollten, wurden die Erythrozyten durch das Feld P1 von der Quantifizierung ausgeschlossen.

P1 wurde in dieser Grafik nochmals differenziert betrachtet. Im Feld P2 sind nun alle CD11b- Zellen ausgewählt.

Die CD11b – Zellen wurden in die Felder P3-5 aufgeteilt. P3-5 repräsentieren die ermittelten Populationen der CD4+(P5), CD8+(P3) und CD4+ +CD8+(P4) Zellen.

### 2. Monozyten (CD11b+ und His 48+) und Granulozyten (SSC+)

FSC beschreibt wieder das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*), SSC das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*). Die Zellpopulation mit dem höheren SSC- Anteil entspricht den Granulozyten (P3). Um die andere Zellpopulation im Feld P1 in Monozyten und andere Zellen unterteilen zu können, wurde dieses in einem anderen Kanal betrachtet.

In dieser Abbildung wurde P1 anhand der CD11b+ und His48+ Fluoreszenz klassifiziert. Das Feld P2 wurde durch diese Antikörper als Zellanteil der Monozyten bestimmt.

## 2.8 Perfusion

### 2.8.1 Phosphat gepufferte Saline (PBS)

82,3g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Di-Natriumhydrogenphosphat; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) wurde mit 23,5g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Natriumdihydrogenphosphat; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) und 4,0g  $\text{NaCl}$  (Natriumchlorid; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) unter Rühren in ca. 960 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend auf 1 L aufgefüllt. Hatten sich die Festbestandteile im Wasser gelöst, erhielt man eine 10fach konzentrierte PBS-Stocklösung. Für die Herstellung einer 1fach konzentrierten PBS-Lösung wurde die Stocklösung im Verhältnis 1:9 mit destilliertem Wasser verdünnt. Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH oder 4 M HCl (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE) auf 7,4 eingestellt.

### 2.8.2 Paraformaldehyd

40g Paraformaldehyd (PFA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) in Pulverform wurde in 1 L 1x PBS unter ständigem Rühren gelöst und langsam auf ca. 70°C erhitzt. Die Lösung wurde mit Hilfe von 4 M HCl oder 5 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt, wodurch die Lösung klar wurde. Im Anschluss daran erfolgte eine Filtration, um alle Schwebeteilchen zurückzuhalten, die ansonsten Kapillaren bei der Perfusion verstopfen könnten. Die Lösung wurde auf 4°C abgekühlt. Kurz vor der Verwendung wurde Glutaraldehyd (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE) in einer Konzentration von 0,05% hinzugefügt, um eine bessere Gewebefixierung zu erzielen.

### 2.8.3 Fixierung

Die Tiere wurden in der achten Woche postoperativ (Tag 50 +/- 2) mit einer Überdosis Isofluran eingeschläfert. Sobald die Tiere aufgehört hatten zu atmen, wurden sie mit dem Rücken auf ein Perfusionstisch gelegt. Anschließend wurde das Brustbein getastet, darunter wurde die Haut und das Zwerchfell mit einer Schere eröffnet. Die Rippen wurden schräg nach kranial aufgeschnitten. Das Brustbein wurde nach oben geklappt und mit einer Klammer am Perfusionstisch fixiert. Die Nadel der Perfusionspumpe (Acufirm, Dreieich, DE) wurde in den linken Ventrikel gestochen. Danach wurde der rechte Vorhof mit einer spitzen Schere eröffnet. Die Pumpe (Watson Marlow 5058, Wuppertal, DE) wurde auf 25

Umdrehungen/Minute (2ml/Umdrehung) eingestellt. Zuerst wurden die Tiere mit auf 4°C gekühlter 1x PBS- Lösung (pH 7,4) so lange perfundiert, bis aus dem rechten Vorhof nur noch klare Flüssigkeit austrat, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass sich kein Blut mehr im großen Kreislauf befand. Damit das Gewebe, welches im Anschluss entnommen werden sollte, eine ausreichende Stabilität erhielt und es zu keinen zellulären Veränderungen nach der Entnahme kam, wurden die Tiere im Anschluss mit einer auf 4°C abgekühlten Lösung aus 1x PBS/4%PFA/0,05%Glutaraldehyd (pH 7,4) perfundiert, bis eine ausreichende Fixation des Gewebes stattgefunden hatte. Dies wurde durch das Verhärten des Schwanzes bestätigt, wofür im Durchschnitt etwa 300ml der PBS/PFA/Glutaraldehyd-Lösung benötigt wurden.

## 2.9 Gewebeentnahme

Die perfundierten Ratten wurden auf den Bauch gelegt. Mit einer Schere wurde die Haut vom Schwanzansatz bis zum Nasenrücken des Kopfes geöffnet. Paramedian zur Wirbelsäule wurde die Rückenmuskulatur mit einer kleinen Nagelschere bis zum Nacken durchtrennt. Auch das Fettgewebe im Nacken wurde mit der Schere entfernt. Anschließend wurde die auf der Wirbelsäule gelegene Muskulatur mit einer Schere flach abgetrennt, bis die Wirbelbögen mit den Processi spinosi zu sehen waren. Um die Muskulatur am Nacken zu entfernen, wurde die Wirbelsäule dort mit einer Pinzette angehoben um die Lordose auszugleichen und nicht versehentlich mit der spitzen Schere das Rückenmark zu verletzen. Der Knochen wurde mit einer Knochenzange Stück für Stück abgetragen bis der komplette Spinalkanal und Schädel bis hin zum Bulbus olfactorius geöffnet war. Dabei wurde die Wirbelsäule mit einer Pinzette angehoben, um einen kleinen Spielraum für die Knochenzange zwischen dem knöchernen Spinalkanal und Duralsack zu schaffen. Mit einem Skalpell wurden die abgehenden/zuführenden Hinter- und Vorderwurzeln der Spinalnerven durchtrennt. Das Rückenmark wurde auf Höhe der Cauda equina durchtrennt, mit einem Spatel angehoben und am Stück, zusammen mit dem Hirnstamm und dem Gehirn entnommen. Um das Gehirn aus dem Schädel zu lösen, wurde es ebenfalls mit einem Spatel von der Seite aus angehoben. Zur Entnahme musste das Chiasma opticum mit einem Skalpell durchtrennt werden. Abschließend wurde das Zentralnervensystem in einem mit PFA /Glutaraldehyd gefüllten 50 ml Plastikgefäß (Falcon, Corning B.V. Life

Sciences, Amsterdam, NL) bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

## 2.10 Gewebeaufarbeitung

### 2.10.1 Einbettungsverfahren

#### 1. Tag:

Um das Gewebe schneiden und färben zu können, wurde es in Gelatine (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE) eingebettet. Dazu wurde das fixierte Gewebe zugeschnitten. Hierzu wurde ein ca. 2cm langes Stück Rückenmark mit zentrierter Kontusionsstelle benötigt. Anschließend wurde das Rückenmark zu gleichen Teilen kranial und kaudal der Kontusionsstelle mit einem Skalpell durchtrennt. Der Rest des Gewebes wurde für eine eventuelle spätere Verwendung weiterhin in PFA gelagert. Für die Einbettung wurde „Difco-Gelatine“ verwendet, da diese im Vergleich zu anderen Gelatinesorten bei Raumtemperatur nach Erwärmung fest wurde. Es wurde eine 12%-ige Lösung aus Gelatine mit 1x PBS-Lösung (pH 7,2-7,4) hergestellt. Die Lösung wurde erhitzt, bis sich die Festbestandteile der Gelatine im 1x PBS gelöst hatten. Nach dem Erhitzen kühlte die Gelatine auf 40°C ab. Für jedes Rückenmarkstück wurde ein Glasszintillationsgefäß (VWR International GmbH, Darmstadt, DE) soweit mit der Gelatine befüllt, dass das komplette Stück von allen Seiten bedeckt war. Diese gefüllten Glasszintillationsgefäße wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2. Tag:

Nachdem die Rückenmarksstücke über Nacht in Gelatine inkubiert wurden, wurden sie in Gelatineblöcke eingebettet. Dafür wurden quadratische Plastikschalen (Pearl, Buggingen, Deutschland) zur Hälfte mit Gelatine gefüllt. Die Gelatine wurde so lange gekühlt, bis sie ausgehärtet war. Mit Hilfe von Kanülen wurden durch die Plastikschalen Schienen gestochen, auf die die Rückenmarksstücke gelegt wurden. Der Rest der Plastikschalen wurde mit 40°C warmer flüssiger Gelatine aufgefüllt. Dabei wurden Luftblasen mit einer Einmalpipette abgesaugt, damit die Rückenmärker sich beim Schneiden nicht aus der Gelatine lösten. Im Anschluss daran konnte die Gelatine aushärten. Danach wurden die Plastikschalen an den Ecken mit einer Rasierklinge eingeschnitten, sodass sie leicht entfernt werden konnten. Die Gelatineblöcke mit dem enthaltenen Rückenmarksstück wurden über Nacht bei 4°C in frischem PBS/PFA/Glutaraldehyd inkubiert, damit sich das Gewebe des Rückenmarks mit der Gelatine so fest wie möglich verbinden konnte.

## 2.10.2 Erstellen der Rückenmarksschnitte

Nachdem die Gelatineblöcke eine Nacht in PBS/PFA/Glutaraldehyd inkubiert wurden, wurden sie aus diesem entnommen und mit einer Rasierklinge zurechtgeschnitten. Die Schnitte wurden mit dem Vibratom (Leica VT1200, Leica Biosystems, US) angefertigt. Der zurechtgeschnittene Block wurde mit Sekundenkleber auf den Metallaufsatz des Vibratoms geklebt. Die Schale des Geräts wurde eingesetzt und mit PBS-Lösung gefüllt. Die Parameter zum Schneiden waren wie folgt: Die Schnittdicke betrug 50µm. Es wurde mit einer Frequenz von 40 Vibrationen/Sek., einer Amplitude von 0,9 und einer Geschwindigkeit von 25mm/Minute gearbeitet. Das Vibratom schnitt nun kontinuierlich 50µm dicke Schichten. Die Schnitte wurden einzeln in 24 Well-Platten (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) transferiert, die mit 1x PBS-Lösung gefüllt waren.

## 2.10.3 Immunhistochemie

### 2.10.3.1 Triton X 100

Triton X 100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) ist ein nichtionisches Tensid, das die Integrität der Zellwand beschädigt, indem es Proteine aus dieser herauslöst, damit der Antikörper in Zellinneren eindringen kann. Triton X 100 wurde bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.10.3.2 PBS/BSA

Für die immunhistologischen Färbungen wurde eine 0,05% BSA-Lösung hergestellt. Dazu wurde 0,05 mg BSA-Pulver (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) in 99,5 ml 1x PBS unter langsamen rühren gelöst. Mit dieser Lösung wurden unspezifische Antikörperbindungen bei der Färbung durch Konkurrenz um die Bindestelle des verwendeten Antikörpers blockiert.

### 2.10.3.3 Inkubationslösungen

Antikörper, in der laut Herstellerangabe zu verwendenden Verdünnung (s. Tabelle 4), 5% normales Ziegenserum (NGS; Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE), zur Reduktion von unspezifischen Bindungen des zweiten Antikörpers und 0,05%iger 1x PBS/BSA-Lösung bildete die Inkubationslösung.

Das Ziegenserum wurde in die PBS/BSA-Lösung gegeben. Für jeden Schnitt wurden 500µl Lösung benötigt. Bei der Verwendung von intrazellulär bindenden Antikörpern (GFAP und der dazugehörige Zweitantikörper Alexa 488) wurde zu den oben aufgeführten Substanzen zusätzlich 0,1% Triton X 100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) hinzugefügt (Maity et al., 2013).

### 2.10.3.4 CS-56/GFAP- Färbung

#### 1. Tag:

Die Rückenmarksschnitte konnten nun für die Färbung verwendet werden. Dazu wurde jeder achte Schnitt aus der Palette der gesamten Rückenmarksschnitte eines Tieres verwendet. Am ersten Tag wurden die Schnitte mit einem monoklonalen Maus IgM Antikörper gegen Chondroitinsulfat (clone CS-56, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE) inkubiert. Der Antikörper wurde hierfür vor dem Gebrauch kurz zentrifugiert und in einer 1:500 Verdünnung verwendet. Die Inkubationslösung bestand aus: 5% NGS, 0,05% BSA, CS-56 (1:500), 1x PBS. 500 µl Lösung wurden in jedes Well einer 24 Well Platte gegeben und ein Schnitt hineingelegt. Die 24 Well Platten wurden mit Aluminiumfolie zum Schutz gegen Licht abgedeckt und anschließend bei 4°C über Nacht auf einem Orbitalschüttler (WT16, Biometra, Göttingen, DE) langsam inkubiert.

#### 2.Tag:

Am nächsten Tag mussten die Schnitte zunächst gewaschen werden. Dazu wurden sie in 4°C kaltes PBS transferiert. Beim ersten Waschgang wurde das PBS nach ca. 10 min gewechselt. Es folgen drei weitere Waschgänge, die über den Zeitraum von einer Stunde durchgeführt wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte mit dem zweiten Antikörper, einem in der Ziege gegen Maus IgM hergestellten Antikörper, der mit Alexa 594 konjugiert war (Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE), in einer Verdünnung von 1:500 inkubiert. Dieser musste vor Gebrauch 5 min bei 6400 rpm mit einer Tischzentrifuge (Qualitron, DW-41-23-0-NEW, Korea) zentrifugiert werden, damit alle festen Bestandteile, die sich in der Lösung befanden, zu Boden sanken. Diese würden ansonsten zu einer unspezifischen „Sandkörner-ähnlichen“ Fluoreszenz unter dem UV-Licht-Mikroskop führen und die Beurteilung verfälschen. Die Schnitte wurden in die Inkubationslösung (5% NGS, 0,05% BSA, 1x PBS) transferiert und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler ohne Lichteinfluss

inkubiert.

### **3.Tag:**

Zuerst wurden die Schnitte erneut gewaschen (s.o.). Danach wurden sie mit einem Kaninchen IgG Antikörper gegen GFAP (Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE) gefärbt. Der Antikörper wurde wieder zuvor kurz zentrifugiert. Für die Inkubationslösung (5% NGS, 0,05% BSA, 1x PBS) wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Da dieser Antikörper intrazellulär bindet, musste zu der Inkubationslösung noch 0,1% Triton X100 hinzugefügt werden. Im Anschluss wurden die Schnitte in der Lösung bei 4°C über Nacht auf einem Orbitalschüttler mit 10 rpm unter Lichtausschluss inkubiert.

### **4.Tag:**

Die Schnitte wurden wie bereits oben beschrieben gewaschen. Danach wurden sie mit einem in der Ziege gegen Kaninchen IgG hergestellten Antikörper mit Alexa 488 (Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE) konjugiert. In einer Verdünnung von 1:1000 wurde Triton X 100 zur Inkubationslösung hinzugefügt. Danach wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler mit 10 rpm unter Lichtausschluss inkubiert.

**Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper**

<b>1.Antikörper</b>	<b>Definition</b>	<b>Antikörperart</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
CS-56	Chondroitinsulfat, Antikörper erkennt „GAG“-Reste (Zuckerreste) an Chondroitinsulfat, die ein Teil der inhibitorischen extrazellulären Matrix darstellen.	Maus IgM	1:500	Sigma-Aldrich, C8035-0.2ML
GFAP	saures Gliafaserprotein, färbt Astrozyten, Gliazellen, Ependymzellen, Schwannzellen, es wird zur Erkennung von Neubildungen astrozytären Ursprungs verwendet	Kaninchen IgG	1:1000	Life Technologies, PA5-18598
<b>2.Antikörper</b>				
Alexa 594	2. Antikörper für die CS- 56 Färbung, roter Kanal	Ziege gegen Maus IgM	1:500	Life Technologies, A21044
Alexa 488	2. Antikörper für die GFAP-Färbung, grüner Kanal	Ziege gegen Kaninchen IgG	1:1000	Life Technologies A-21206

## 2.10.4 Einbetten der Schnitte

Nachdem die Schnitte mit den jeweils verwendeten Antikörpern gefärbt wurden, wurden sie am letzten Tag zuerst erneut mit PBS-Lösung gewaschen. Im Anschluss daran wurden je zwei Schnitte mit Hilfe eines Pinsels auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger (Marienfeld, Emmendingen, DE) aufgezogen. Danach wurde ImmuMount (Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE) aufgetragen und die Oberfläche anschließend mit einem Deckglas (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE) eingedeckelt. Im Anschluss wurden die eingedeckelten Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Ränder mit durchsichtigem Nagellack versiegelt, damit bei der Lagerung über längere Zeit keine Luft unter das Deckglas gelangte. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

## 2.10.5 Mikroskopie

Die Bilder der gefärbten Schnitte wurden mit einem digitalen Keyence Biozero Fluoreszenz Mikroskops BZ-8000K (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, DE) angefertigt. Für jeden Schnitt wurde die Belichtungszeit von jedem Antikörper konstant gehalten, damit die Fluoreszenzstärke zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen vergleichbar war. Für den sekundären Antikörper Alexa594 wurde eine Belichtungszeit von 1/2sek, für den sekundären Antikörper Alexa488 wurde eine Belichtungszeit von 1/4,5sek ermittelt. Es wurde kein Dunkelfilter verwendet. Mit dem Mikroskop wurden Bilder der einzelnen Antikörperfärbungen der beiden Antikörper angefertigt.

## 2.11. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS vs. 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) und Prism vs. 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden im Rahmen einer Vergleichsanalyse mit Hilfe eines „*two-way ANOVA*“ ausgewertet, die den Vergleich von mehr als zwei Gruppen erlaubt. Zielvariablen in diesem Test waren zum einen die unterschiedlichen Versuchsgruppen und zum anderen die Berücksichtigung der Zeit, um die physiologischen Daten und das Verhalten im zeitlichen Verlauf zu bewerten (Scheff et al., 2002; Pearse et al., 2004). Eine statistische Auswertung mit lediglich einer Variablen, dem Faktor Versuchsgruppe, wurde mittels „*one-way ANOVA*“ ermittelt. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  festgelegt. Die statistische Auswertung wurde auf Normalverteilung geprüft. Die Ergebnisse werden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Wenn die Ergebnisse für weitere statistische Vergleiche geeignet waren, wurde zusätzlich ein „*post-hoc Turkey-Kramer-Test*“ zur Überprüfung der wöchentlichen Veränderungen bzw. des wöchentlichen motorischen Fortschritts durchgeführt. Mit diesem Verfahren wurden die Unterschiede aller möglichen Mittelwerte der Behandlungsgruppen auf ihre Signifikanz überprüft.

## 3.0. Ergebnisse

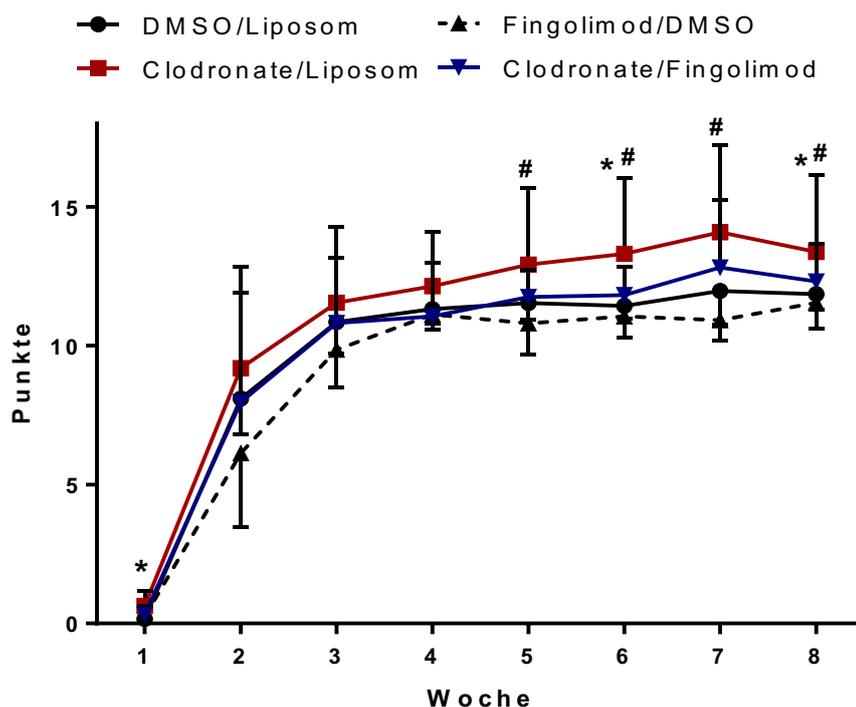
Nach einer Rückenmarksverletzung infiltrieren Makrophagen und Leukozyten die Läsionsstelle. Dies führt zu einer inflammatorischen Reaktion, welche gleichzeitig eine Verschlechterung der Regenerationsfähigkeit zur Folge hat. Eine Behandlung mit jeweils Clodronat oder Fingolimod zeigte eine Verbesserung der motorischen Funktion. Daher wurde in dieser Arbeit die Auswirkung einer kombinierten Behandlung von Clodronat und FTY auf das Genesungsverhalten sowie auf die Regenerationsfähigkeit untersucht.

### 3.1 Der BBB open-field locomotor Verhaltenstest zur Beurteilung der Hinterbeinfunktion bei den Versuchstieren

Die Zuordnung der einzelnen Tiere in die entsprechenden Versuchsgruppen sham (n = 8), DMSO/Liposomen (n = 9), FTY/DMSO (n = 8), Clodronat/Liposom (n = 9), FTY/Clodronat (n = 7)) erfolgte zufällig und jedes Tier erreichte vor der Operation 21 Punkte im BBB *open-field locomotor* Test. Demnach wurden alle Tiere unter gleichen Voraussetzungen operiert. Die sham-Kontrollgruppe, die eine Laminektomie aber keine Kontusion erhielt, zeigte zu keinem Zeitpunkt des postoperativen Verlaufs Einschränkungen der motorischen Funktion. Dies zeigt, dass die Laminektomie ohne eine Schädigung des Rückenmarks durchgeführt wurde. Im BBB *open-field locomotor* Test erreichten die sham-Tiere in jeder Woche den maximal möglichen Punktwert von 21 mit einem Signifikanzwert von  $p < 0,001$  im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen. Da die sham- Kontrollgruppe zur Überprüfung der korrekten Operationstechnik ausgewählt wurde, wird sie im Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen nicht dargestellt. Die Überprüfung der restlichen Versuchstiere lieferte folgende Ergebnisse: Eine Woche nach der Kontusion zeigte die mit Clodronat/Liposom behandelte Gruppe signifikant höhere Werte, als die DMSO/Liposom - Kontrollgruppe ( $p = 0,008$ ). In den darauffolgenden Wochen zwei bis vier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen allen vier behandelten Versuchsgruppen (FTY/Clodronat, FTY/DMSO, Clodronat/Liposom und DMSO/Liposom) gefunden (Abbildung 9).

In der fünften ( $p=0.012$ ), sechsten ( $p=0.01$ ), siebten ( $p=0.008$ ) und achten ( $p=0.029$ ) Woche nach der Kontusion erreichte die mit Clodronat/Liposom behandelte Versuchsgruppe eine höhere Punktzahl im BBB *open-field locomotor* Test im Vergleich zur FTY/DMSO Versuchsgruppe. Des Weiteren erreichten die Tiere aus der Clodronat/Liposom Versuchsgruppe in den Wochen sechs ( $p=0,033$ ) und acht ( $p=0,041$ ) eine höhere Punktzahl im BBB *open-field locomotor* Test im Vergleich zur DMSO/Liposomen Kontrollgruppe (Abbildung 9).

Insgesamt erreichte die Clodronat/Liposom Versuchsgruppe eine signifikant erhöhte Punktzahl im BBB *open-field locomotor* Test im Vergleich zur FTY/DMSO Versuchsgruppe (Woche fünf bis acht) und zur DMSO/Liposom Kontrollgruppe in Woche sechs und acht. Somit weist der BBB *open-field locomotor* Verhaltenstest auf eine verbesserte motorische Regenerationsfähigkeit in der Clodronat/Liposom Versuchsgruppe hin (Abbildung 9).

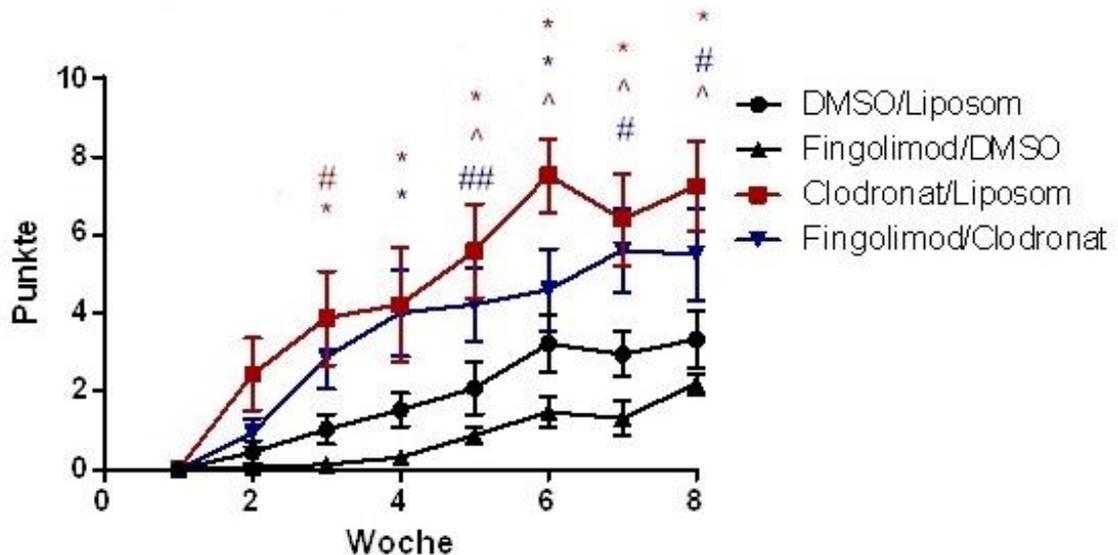


**Abbildung 9: Darstellung der Hinterbeinfunktion der verschiedenen Versuchstiergruppen im BBB-*open-field locomotor* Test**

Clodronat/Liposom-behandelte Tiere ( $n=9$ ) zeigen einen höheren Punktwerte im BBB *open-field locomotor* Test verglichen zu FTY/DMSO-behandelten Tieren ( $\# p<0.05$ ,  $n=8$ ) ab der 5. Woche bis zur 8. Woche. In der 6. und 8. Woche zeigte sich außerdem ein signifikanter Unterschied der Clodronat/Liposom-behandelten Tiere zu DMSO/Liposom-behandelten Tieren ( $*p<0.05$ ,  $n=9$ ). Die Ergebnisse sind in Form von Mittelwerten +/- Standardabweichung dargestellt.

## 3.2 Sub-BBB Test zur Beurteilung der höheren Motorfunktionen

Der Sub- BBB wurde zur Differenzierung feiner motorischer Unterschiede in den BBB-Ergebnissen durchgeführt. Dadurch konnte zusätzlich zu den Ergebnissen vom BBB-*open-field locomotor* Verhaltenstest eine erhöhte motorische Funktion der FTY/Clodronat-Gruppe im Vergleich zu der Clodronat/Liposom- Gruppe erkannt werden. Vor der Operation erreichten die Tiere entsprechend den Ergebnissen im BBB auch in diesem Testverfahren eine volle Punktzahl. Die Sham- Kontrollgruppe, in der ausschließlich eine Laminektomie durchgeführt wurde, erreichte ebenfalls zu jedem postoperativen Zeitpunkt eine volle Punktzahl und ist aus diesem Grund nicht in der Abbildung aufgeführt. In diesem Testverfahren zeigt die Clodronat/Liposom-Versuchsgruppe (n=9) von der dritten bis zur achten Woche signifikant erhöhte Punktwerte im Vergleich zu den Versuchsgruppen DMSO/Liposom (n=9, #p<0,05 in Woche drei, \*p<0,01 in Woche vier bis acht) und FTY/DMSO (n=8, \*p<0,01 in Woche drei und vier, ^p<0,0001 in Woche fünf bis acht). Außerdem wurden signifikant erhöhte Punktwerte für FTY/Clodronat (n=7) im Vergleich zu FTY/DMSO (n=8, \*p<0,01 in Woche vier und sechs, #p<0,05 in Woche fünf, sieben und acht) von Woche vier bis acht ermittelt. In der sechsten Woche ist einmalig, mit einer statistischen Signifikanz von p< 0,05, eine erhöhte Punktezahl der Clodronat/Liposom-Behandlungsgruppe (n=7) gegenüber der FTY/Clodronat- Behandlungsgruppe (n = 9) im Sub- BBB Test ermittelbar.



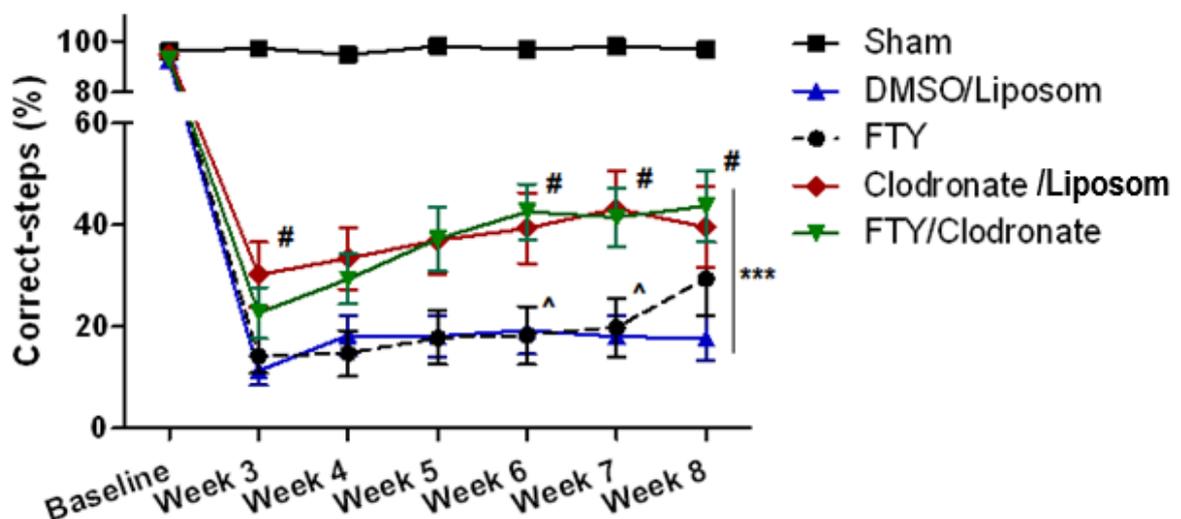
**Abbildung 10: Sub-BBB: Darstellung der Hinterbeinfunktion der verschiedenen Versuchstiergruppen im Sub- BBB Test**

Die Clodronat/Liposom- Gruppe zeigt signifikant höhere Werte als die FTY/DMSO und die DMSO/Liposom- Behandlungsgruppe von Woche 3 bis 8. Die FTY/Clodronat- Gruppe zeigt in Woche 4 bis 8 signifikant erhöhte Punktwerte im Vergleich zur FTY/DMSO- Behandlungsgruppe. In der 6. Woche zeigt die Clodronat/Liposom- Gruppe zum einzigen Zeitpunkt einen signifikant höheren Punktwert als die FTY/Clodronat- Behandlungsgruppe. Dabei stellt #  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,01$  und ^  $p < 0,0001$  dar. Die farblichen Markierungen entsprechen der Gruppenmarkierung in der Legende der Abbildung. Die Ergebnisse sind in Form von Mittelwerten +/- Standardabweichung dargestellt.

### 3.3 Horizontaler Leiter Test zur Beurteilung von sensorischen und motorischen Funktionen der Hinterbeine

Der horizontale Leiter Test ermöglichte es die sensorischen und motorischen Funktionen der Hinterbeine gemeinsam zu bewerten. Die Anzahl der richtigen sowie der falschen Schritte wurde abgestuft untersucht (nur mit dem Fuß abgerutscht, Danebentreten mit Abrutschen bis zum Knie und bis zur Hüfte). Im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse auf der horizontalen Leiter konnten signifikante Effekte zwischen den Gruppen zu allen Zeitpunkten nach der Operation festgestellt werden. In der Auswertung der präoperativen Kontrolle wurde kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt bestand zwischen allen Gruppen eine ähnliche, über 90%ige Korrektheit der Schritte im Test. Nach der Operation bestand in der Sham Gruppe weiterhin eine etwa 97%ige Korrektheit der Schritte, die im gesamten Versuchsverlauf nachgewiesen werden konnte. Dadurch wurde ein signifikant besseres Ergebnis im Vergleich zu den anderen Gruppen ermittelt ( $p < 0,01$ ).

Alle mit Clodronat behandelten Tiere entwickelten höhere Werte im Test als die mit DMSO/Liposom behandelten Versuchstiere in Woche drei ( $p=0,016$ ) und die mit FTY/DMSO behandelten Tiere in Woche vier ( $p=0,043$ ). Es wurde kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen in der fünften Woche postoperativ gefunden ( $p>0,05$ ). In der sechsten Woche erreichte die FTY/Clodronat- Behandlungsgruppe ein signifikant besseres Ergebnis als die FTY/DMSO- Gruppe ( $p=0,017$ ) und die DMSO/Liposom- Gruppe ( $p=0,019$ ). Dieser Unterschied konnte auch noch in der siebten Woche nachgewiesen werden (FTY/DMSO  $p=0,045$ ; DMSO/Liposom  $p=0,02$ ). Auch die Clodronat/Liposom- Behandlungsgruppe zeigte signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den mit FTY/DMSO behandelten Tieren ( $p=0,026$ ) und der DMSO/Liposom- Gruppe ( $p=0,011$ ). In der achten Woche wurde eine erhöhte Korrektheit der Schritte von der FTY/Clodronat- Behandlungsgruppe im Vergleich zu den mit DMSO/Liposom behandelten Tieren nachgewiesen ( $p=0,027$ ).

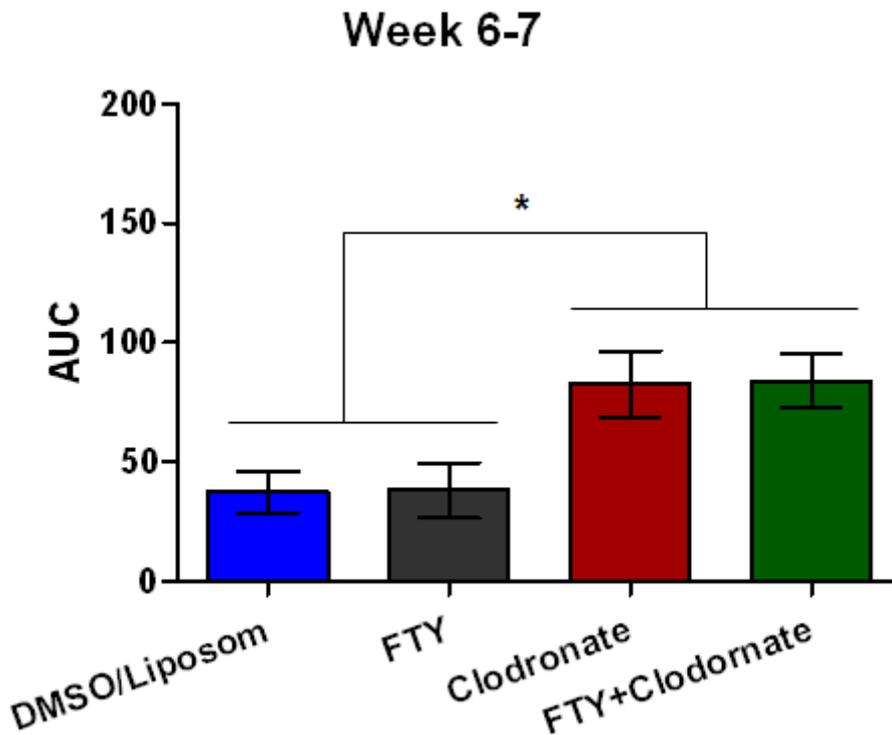


**Abbildung 11: Statistische Ergebnisse des horizontalen Leitertests im Überblick**

Die Abbildung zeigt eine nahezu 100%ige Korrektheit der Schritte von Sham Tieren über die gesamte Versuchszeit. Die mit Clodronat/Liposom und FTY/Clodronat behandelten Tiere zeigten im Vergleich zu den mit DMSO/Liposom und FTY/DMSO behandelten Tieren eine höhere Rate an erfolgreichen Schritten ( $***p<0,001$ ;  $\#p<0,05$ ;  $\wedge p<0,05$ ). Die Ergebnisse sind in Form von Mittelwerten +/- Standardabweichung dargestellt.

Insgesamt ist anhand der Ergebnisse zu erkennen, dass die Behandlung mit Clodronat bzw. FTY/ Clodronat zu einer erhöhten Korrektheit der Schritte auf der horizontalen Leiter führte. Um diese Aussage zu unterstreichen, wurde eine Analyse der „area under the curve“ der

Wochen sechs und sieben durchgeführt, die diese Schlussfolgerung bestätigt (siehe Abb. 12).



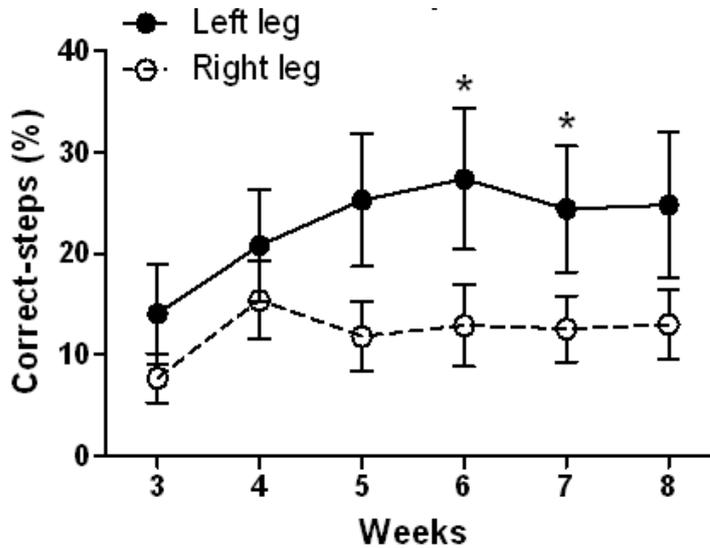
**Abbildung 12: Vergleich der behandelten Gruppen durch eine „area under the curve“-Analyse von Woche sechs zu sieben**

In der Abbildung ist ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen ersichtlich. Die Clodronat/Liposom und FTY/Clodronat behandelten Gruppen zeigten eine deutlich verbesserte Korrektheit der Schritte im horizontalen Leitertest als die Behandlungsgruppen von FTY/DMSO ( $p=0,033$ ;  $p=0,025$ ) und DMSO/Liposom ( $p=0,023$ ;  $p=0,017$ ). (\* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ ). Die Ergebnisse sind in Form von Mittelwerten +/- Standardabweichung dargestellt.

### 3.3.1 Vergleich zwischen beiden Hinterbeinen

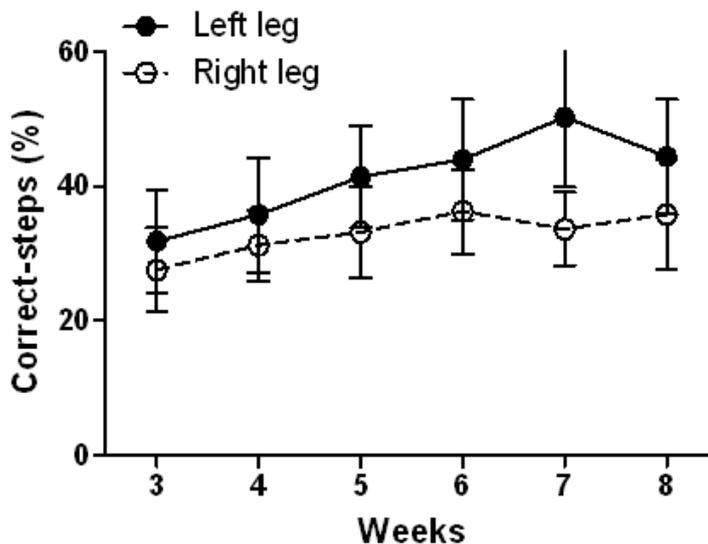
Neben der Gesamtanalyse im horizontalen Leitertest wurde innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen auch ein Vergleich zwischen den rechten und linken Hinterbeinen durchgeführt. Dadurch konnten aufgetretene Seitenunterschiede nach der Rückenmarksverletzung erkannt werden. In den Abbildungen 13- 16 sind beide Hinterbeine einzeln ausgewertet worden. In allen Gruppen außer der DMSO/Liposom-Behandlungsgruppe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem rechten und linken Bein ermittelt werden. In der DMSO/Liposom behandelten Gruppe konnte eine verbesserte senso-motorische Funktion des linken Hinterbeines im Vergleich zum rechten Hinterbein in der sechsten Woche ( $p=0,04$ ) und der siebten Woche ( $p=0,048$ ) postoperativ beobachtet werden (Abbildung 13). Außerdem konnte in der sechsten Woche in der

FTY/Clodronat- Behandlungsgruppe ein signifikantes Überwiegen des linken Beins nachgewiesen werde (Abbildung 16).



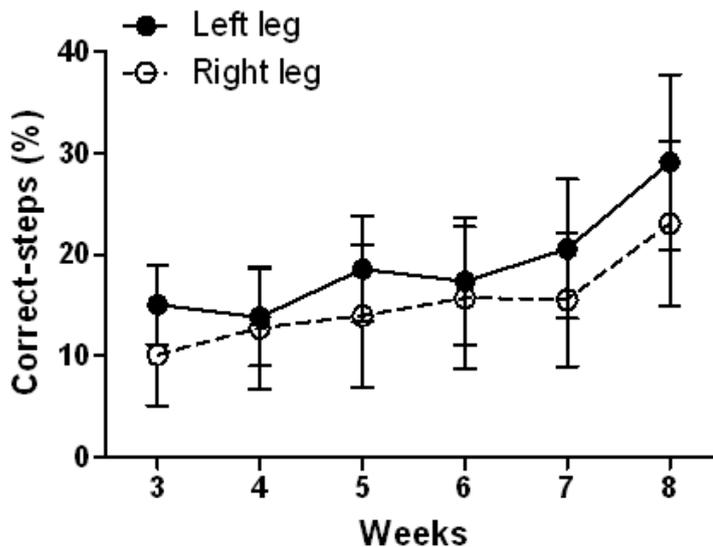
**Abbildung 13: Vergleich des linken und rechten Hinterbeins in der Behandlungsgruppe von DMSO/Liposom (Kontrollgruppe)**

In der DMSO/Liposom- Gruppe konnten in der sechsten ( $p=0,04$ ) und der siebten postoperativen Woche ( $p=0,048$ ) ein signifikantes Überwiegen des linken Beins ermittelt werden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerten +/- Standardabweichung dargestellt.



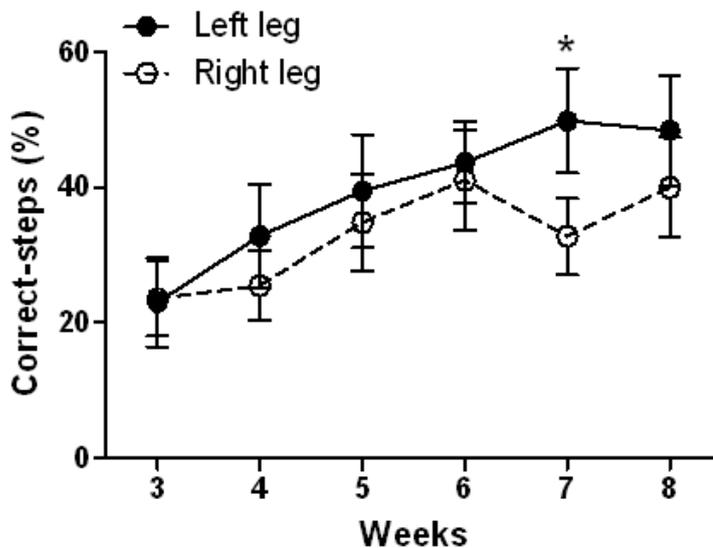
**Abbildung 14: Vergleich des linken und rechten Hinterbeins in der Behandlungsgruppe von Clodronat/Liposom**

Es konnte zu keinem Zeitpunkt des Testverfahrens ein signifikantes Überwiegen einer Seite in der Clodronat/Liposom- Gruppe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt.



**Abbildung 15: Vergleich des linken und rechten Hinterbeins in der Behandlungsgruppe von FTY/DMSO**

Es konnte zu keinem Zeitpunkt des Testverfahrens ein signifikantes Überwiegen einer Seite in der FTY/DMSO- Gruppe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt.



**Abbildung 16: Vergleich des linken und rechten Hinterbeins in der Behandlungsgruppe von FTY/Clodronat**

In der sechsten postoperativen Woche konnte einmalig ein signifikantes Überwiegen des linken Hinterbeins in FTY/Clodronat- Gruppe nachgewiesen werden. Zu allen anderen Zeitpunkten bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Hinterbeinen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit +/- Standardabweichung dargestellt.

### 3.4 FACS- Analyse

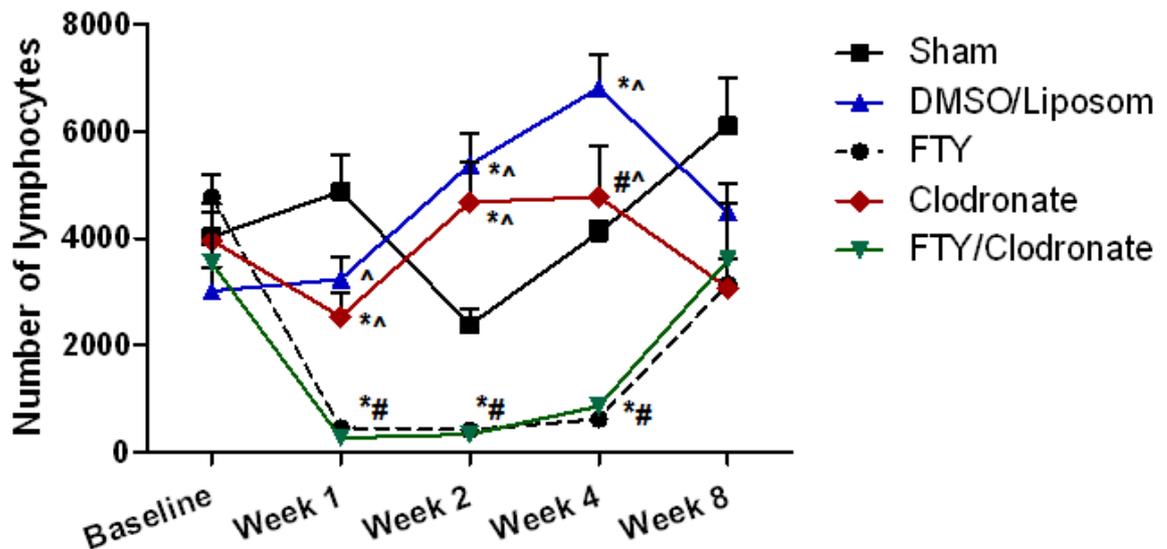
Zur Überprüfung, ob die Verabreichung von Clodronat und FTY zu einer entsprechenden Reduzierung in der Makrophagen- und Lymphozytenpopulation beitrug, wurden die

einzelnen Zellpopulationen über eine FACS-Analyse untersucht. Die Granulozyten wurden ebenfalls gefärbt, um alle Zellen voneinander unterscheiden zu können. In der präoperativen Blutuntersuchung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden, sodass man davon ausgehen konnte, dass kein Tier an einem unerkannten Infekt oder einer Immunsuppression litt.

### 3.4.1 Auswertung der Lymphozyten

In Abbildung 17 wird die Anzahl der Lymphozyten (y-Achse) zu den ermittelten Zeitpunkten präoperativ sowie eine, zwei, vier und acht Wochen nach der erfolgten Kontusion (x-Achse) dargestellt.

Eine Woche nach der Operation konnten weniger Lymphozyten in den Behandlungsgruppen FTY/DMSO ( $p < 0,001$ ), FTY/Clodronat ( $p < 0,001$ ) und Clodronat/Liposom ( $p < 0,005$ ) im Vergleich zur sham- Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In den mit FTY behandelten Gruppen (FTY/DMSO und FTY/Clodronat) konnte auch eine geringere Anzahl an Lymphozyten im Vergleich zur DMSO/Liposom ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ) und im Vergleich zur Clodronat/Liposom- Versuchsgruppe ermittelt werden ( $p = 0,016$ ;  $p = 0,007$ ). Die signifikant verringerte Lymphozytenzellzahl in den FTY/DMSO- und FTY/Clodronat- Gruppen war auch zwei Wochen nach der Operation im Vergleich zur sham-Kontrollgruppe ( $p = 0,008$ ;  $p = 0,005$ ) und den nicht mit FTY behandelten Gruppen ( $p < 0,001$ ) anhaltend. In der DMSO/Liposom und Clodronat/Liposom- Behandlungsgruppe konnten im Vergleich zur sham-Kontrollgruppe sogar erhöhte Lymphozytenzahlen nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ;  $p = 0,004$ ). Auch vier Wochen nach der Operation blieb eine signifikante Lymphozytenreduktion in den mit FTY behandelten Gruppen gegenüber den anderen Gruppen bestehen. Die DMSO/Liposom- Gruppe exprimierte außerdem mehr Lymphozyten als die sham-Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ) und die mit Clodronat behandelten Gruppen (Clodronat/Liposom + FTY/Clodronat;  $p = 0,04$ ). Letztlich in der achten Woche nach der Operation konnten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Gruppen nachgewiesen werden.

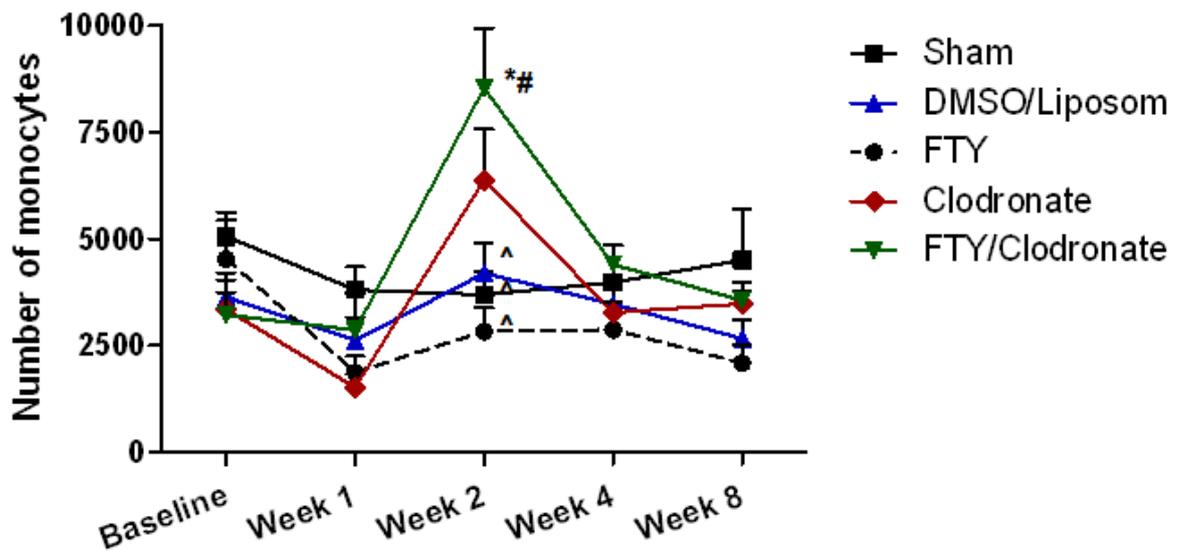


**Abbildung 17: Ermittelte Zellzahlen der Lymphozyten im zeitlichen Verlauf in den verschiedenen Behandlungsgruppen**

Insgesamt wurden in den Gruppen FTY/DMSO und FTY/Clodronat geringere Zellzahlen als in der Sham, der DMSO/Liposom und der Clodronat/Liposom- Behandlungsgruppe nachgewiesen. In der zweiten Woche zeigten die DMSO/Liposom, die Clodronat/Liposom sowie die FTY/Clodronat-Behandlungsgruppe höhere Zellzahlen als die sham- Kontrollgruppe. In der vierten Woche präsentierten sich höhere Zellzahlen in der DMSO/Liposom- Gruppe im Vergleich zur sham-Kontrolle und der Clodronat/Liposom- sowie der FTY/Clodronat- Behandlungsgruppe. In der achten Woche wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt. \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$ ; ^ $p < 0,05$  im Vergleich zu Sham, DMSO/Liposom und FTY/Clodronat. Die Werte sind als Mittelwert mit +/- Standardabweichung dargestellt.

### 3.4.2 Auswertung der Monozyten

Im Rahmen der Analyse der Monozyten wurden ausschließlich in der zweiten Woche postoperativ signifikant unterschiedliche Zellzahlen errechnet. In der kombiniert behandelten Gruppe FTY/Clodronat wurde eine höhere Zellzahl als in den Behandlungsgruppen von FTY/DMSO ( $p=0,003$ ), DMSO/Liposom ( $p=0,026$ ) und Sham ( $p=0,015$ ) nachgewiesen (Abbildung 18).

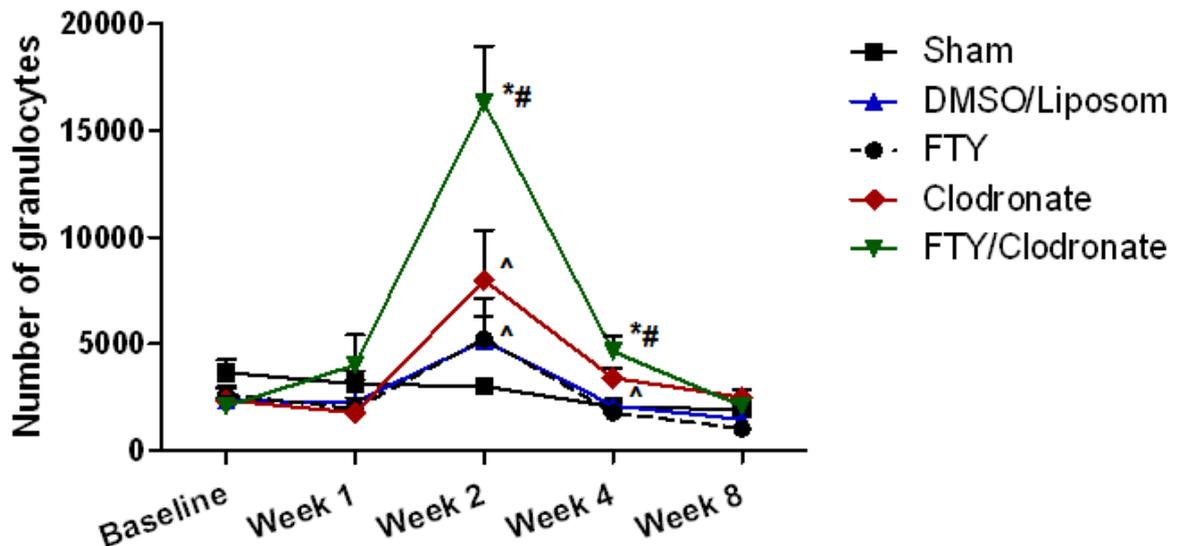


**Abbildung 18: Ermittelte Anzahl der Monozyten im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Behandlungsgruppen**

Es konnte ausschließlich in der zweiten Woche nach der Operation ein signifikanter Unterschied erkannt werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigt die FTY/Clodronat behandelte Gruppe eine höhere Zellzahl als alle anderen Gruppen. \*  $p < 0,05$ ; #  $p < 0,05$ ; ^  $p < 0,05$  im Vergleich zur Sham, DMSO/Liposom und FTY/DMSO- Gruppe. Die Werte sind als Mittelwert mit +/- Standardabweichung dargestellt.

### 3.4.3 Auswertung der Granulozyten

Im Rahmen der ermittelten Granulozyten-Zellzahlen wurden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in den Wochen zwei, vier und acht nach der Operation beobachtet. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Untersuchung präoperativ (Baseline) und in der ersten Woche postoperativ. In der zweiten Woche zeigten die mit FTY/Clodronat behandelten Tiere mehr Granulozyten als die Behandlungsgruppen von FTY/DMSO ( $p=0,001$ ), DMSO/Liposom ( $p=0,001$ ) und Clodronat/Liposom ( $p=0,033$ ) sowie die Sham-Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Diese erhöhten Zellzahlen für Granulozyten konnten auch noch in Woche vier nachgewiesen werden. Hier wurden in der behandelten Gruppe von FTY/Clodronat weiterhin erhöhte Zellzahlen im Vergleich zu den Behandlungsgruppen von FTY/DMSO ( $p < 0,001$ ), DMSO/Liposom ( $p=0,003$ ) und der Sham-Gruppe ( $p=0,002$ ) gefunden. In der achten Woche zeigten alle mit Clodronat behandelten Tiere (Clodronat/Liposom + FTY/Clodronat) eine höhere Granulozytenzahl als die Tiere aus der FTY/DMSO- Behandlungsgruppe ( $p=0,019$ ) (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Ermittelte Anzahl der Granulozyten im zeitlichen Verlauf in den verschiedenen Behandlungsgruppen.**

Insgesamt zeigte die mit FTY/Clodronat behandelte Gruppe ab Woche zwei nach der Operation höhere Zellzahlen als die anderen Versuchsgruppen (FTY, DMSO/Liposom, Sham). \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,005$   $\wedge p < 0,05$  im Vergleich zur Sham, DMSO/Liposom und FTY/Clodronat- Gruppe. Die Ergebnisse sind in Form von Mittelwerten +/- Standardabweichung dargestellt.

### 3.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Horizontale Rückenmarksschnitte der einzelnen Behandlungsgruppen wurden immunhistochemisch gefärbt. Linksbündig ist das rostrale Ende des Rückenmarks dargestellt. Im zentralen Bereich verläuft der Zentralkanal umgeben von der grauen Substanz, die wiederum von der weißen Substanz des Rückenmarks umgeben ist. Etwa mittig dargestellt ist die (außer in der sham-Kontrollgruppe) zugefügte Läsionsstelle in Form einer Höhlenbildung des Rückenmarks zu sehen.

Die im Folgenden dargestellten Abbildungen zeigen exemplarisch einen der Mehrzahl der Tiere entsprechenden repräsentativen Rückenmarksschnitt der jeweiligen Behandlungsgruppe. In den folgenden Tabellen ist zur Übersicht die Aufteilung der Tiere nach der ermittelten Fluoreszenz dargestellt.

**Tabelle 5: Auflistung der Versuchstiere nach Proteoglykan Fluoreszenz Färbung**

Proteoglykane positiv (+)	Proteoglykane mäßig (+/-)	Proteoglykane negativ (-)	Anzahl der Tiere	Gruppe
4/9		5/9	9	FTY/Clodronat
2/8	1/8	5/8	8	Clodronat/Liposom
5/8	1/8	2/8	8	DMSO/Liposom
1/8	4/8	3/8	8	Fingolimod/DMSO
		8/8	8	Sham

In der Tabelle 5 zeigt sich, dass etwas mehr als die Hälfte der Tiere der FTY/Clodronat- Gruppe keine Proteoglykanfärbung aufwiesen, die restlichen Tiere exprimierten diese jedoch sehr stark. In der Clodronat/Liposom-Versuchsgruppe überwogen Proteoglykan-negativ gefärbte Schnitte. In der DMSO/Liposom und der FTY/DMSO-Versuchstiergruppe exprimierten die Mehrzahl der Tiere eine starke bis moderate Menge an Proteoglykanen. In der Sham-Kontrollgruppe war kein Hinweis auf eine vermehrte Proteoglykanexpression sichtbar.

**Tabelle 6: Auflistung der Versuchstiere nach GFAP Fluoreszenz Färbung**

GFAP positiv (+)	GFAP mäßig (+/-)	GFAP negativ (-)	Anzahl der Tiere	Gruppe
4/9	2/9	3/9	9	FTY/Clodronat
	3/8	5/8	8	Clodronat/Liposom
4/9	3/9	2/9	9	DMSO/Liposom
3/8	3/8	2/8	8	Fingolimod/DMSO
		8/8	8	Sham

In der Tabelle 6 zeigt sich ähnlich zu der Fluoreszenzfärbung der chondroitinsulfathaltigen Proteoglykane, dass eine leichte Mehrheit der Tiere aus der FTY/Clodronat- Behandlungsgruppe keine erhöhte GFAP-Färbung exprimierten. In der Clodronat/Liposom-Versuchsgruppe war dieses Ergebnis deutlicher. Dort zeigten die Tiere kaum oder gar keine Fluoreszenz. In der DMSO/Liposom- und der FTY/DMSO- Versuchsgruppe überwog eine mäßige bis starke Fluoreszenz für GFAP. In der Sham-Kontrollgruppe war kein Hinweis auf eine Mehranreicherung von GFAP sichtbar.

Zum einen wurde eine Aufnahme der GFAP/Alexa 488- Antikörperfärbung in einer Belichtungszeit von 1/4,5 sek. bei 40-facher Vergrößerung zur Darstellung reaktiver Astrozyten (Astrogliose), die eine Verletzung des Rückenmarks signalisieren, angefertigt. Zum anderen wurde eine Aufnahme der CS-56/Alexa 594- Antikörperfärbung in einer Belichtungszeit von 1/2 sek. bei 40-facher Vergrößerung zur Visualisierung der chondroitinsulfathaltigen Proteoglykane aufgenommen.

### 3.5.1 Fingolimod/Clodronat

In der mit FTY/Clodronat- behandelten Gruppe konnte um die Läsionsstelle herum eine deutliche Mehranreicherung des GFAP-Antikörpers im Vergleich zum restlichen Rückenmarksgewebe erkannt werden (Abbildung 20 A'). In der Färbung der Chondroitinsulfate war im Vergleich zur Monotherapie mit FTY/DMSO und der Kontrollgruppe nur eine leichte Anreicherung des CS-56-Antikörpers zu erkennen (Abbildung 20 A).

### 3.5.2 Clodronat/Liposom

In der mit Clodronat/Liposom behandelten Gruppe konnte im Vergleich zu allen anderen Gruppen keine sichtbare Mehranreicherung des GFAP-Antikörpers im Bereich der Läsionsstelle oder im restlichen Rückenmarksgewebe gefunden werden (Abbildung 20 B'). Eine Chondroitinsulfatfärbung war im Bereich der Läsionsstelle sowie in geringer Menge im kaudalen Bereich des zentralen Rückenmarks zu erkennen (Abbildung 20 B).

### 3.5.3 Fingolimod

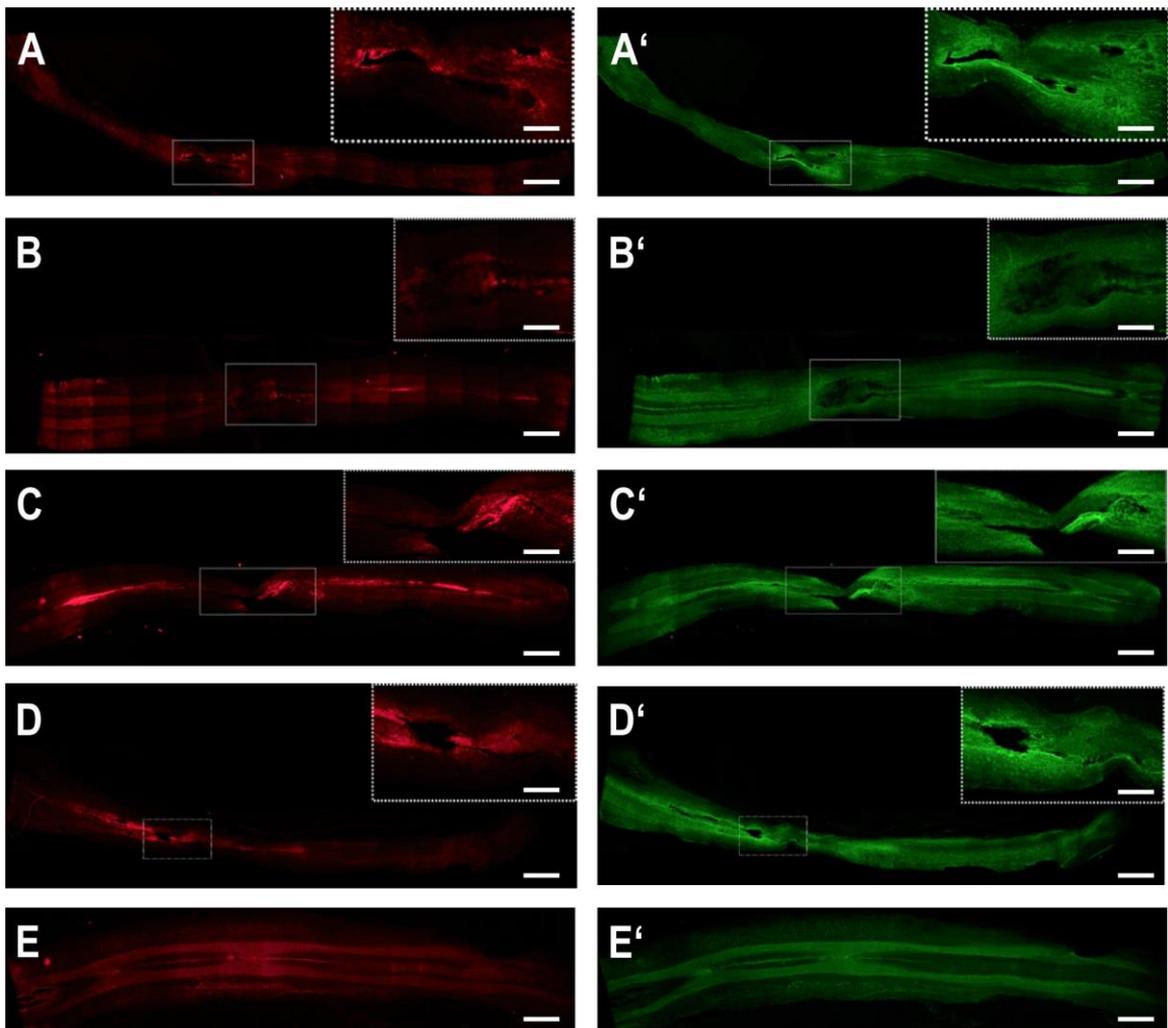
In der mit FTY/DMSO-behandelten Gruppe ist zum einen eine Mehranreicherung des GFAP-Antikörpers im Bereich der Läsionsstelle erkennbar (Abbildung 20 C'). Zum anderen war zusätzlich eine deutliche Mehranreicherung von Chondroitinsulfat-Proteoglykanen im Bereich der Läsionsstelle und in großen Teilen des hier abgebildeten zentralen Bereichs des Rückenmarks zu erkennen (Abbildung 20 C). Die dargestellte Mehranreicherung war im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen deutlich erhöht und konnte in der FTY/DMSO-Versuchsgruppe in der Mehrzahl der untersuchten Versuchstiere nachgewiesen werden.

### 3.5.4 DMSO/Liposom

In der Mehrzahl der mit DMSO/Liposom-behandelten Tiere war eine Mehranreicherung des GFAP-Antikörpers im Bereich der Läsionsstelle sowie im rostralen Bereich des Rückenmarks und weit über die Läsion hinaus erkennbar (Abbildung 20 D'). Diese stimmte mit der CS-56-Antikörperfärbung überein und entsprach einer Anreicherung von chondroitinsulfathaltigen Proteoglykanen (Abbildung 20 D).

### 3.5.5 Sham

In der Sham- Gruppe war keine Verletzung des Rückenmarks zu erkennen. Eine leichte Mehranreicherung von GFAP und Chondroitinsulfat im Sinne einer normalen physiologischen Färbung an Proteoglykanen und Astrozyten war im Bereich des Zentralkanals zu erkennen (Abbildung 20 E/E'). In der Sham- Kontrollgruppe war ein unauffälliges Rückenmark sichtbar. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Verletzung oder Entzündungsreaktion in den durchgeführten immunhistochemischen Färbungen.



**Abbildung 20: Repräsentative Darstellung der horizontalen Rückenmarksschnitte von Thorakalsegment 6-11: A, A' FTY/Clodronat; B, B' Clodronat/Liposom; C, C' FTY/DMSO; D, D' DMSO/Liposom; E, E' sham.** Chondroitinsulfat-Proteoglykane wurden durch den CS-56 Antikörper (A, B, C, D, E) im roten Kanal (Alexa594 als Sekundärantikörper, Belichtungszeit 1/2sek) dargestellt, wohingegen reaktive Astrozyten durch die GFAP-Färbung (A', B', C', D', E') im grünen Kanal (Alexa 488 als Sekundärantikörper, Belichtungszeit 1/4,5sek) abgebildet werden. Maßstabsbalken: 500 µm. Der mit unterbrochenen Strichen dargestellte Bereich stellt den Ort der Rückenmarksverletzung dar. Dieser wurde in der Anlage in Vergrößerung dargestellt. Maßstabsbalken: 250 µm.

## 4.0 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten zeigte sich ein zunehmender Fokus auf die sekundäre zellvermittelte Antwort nach Rückenmarksverletzungen und die Beeinflussung dieser Mechanismen wie die Einwanderung von Immunzellen in die Läsionsstelle, die Expression von Chondroitinsulfaten und die Ausschüttung von Transmittersubstanzen wie beispielsweise Antikörper und Immunsuppressiva. Dadurch wurden bereits in vielen experimentellen Studien verbesserte neurologische Ergebnisse festgestellt. Ein durchgreifender Erfolg, der zu einer standardisierten Therapie nach erfolgtem Trauma geführt hat, ist zum aktuellen Zeitpunkt jedoch ausstehend und verdeutlicht die Komplexität der Vorgänge auf Zellebene und das immer noch unvollständige Verständnis der Zusammenhänge von allen ablaufenden Reaktionen. In dieser Arbeit zeigte sich eine verbesserte motorische Funktion der Hinterbeine nach einer Rückenmarksverletzung in den mit Clodronat/Liposom behandelten Versuchstieren. Eine Kombinationstherapie von Clodronat/Liposom und FTY/DMSO zeigte im Vergleich zur Monotherapie mit Clodronat/Liposom keine signifikant verbesserte motorische Funktion im Horizontalen Leiter Test und im BBB *open-field locomotor* Verhaltenstest. In der Blutanalyse konnte nachgewiesen werden, dass die Therapie mit FTY/DMSO eine Reduktion der Lymphozyten im Blut hervorruft. Eine Verminderung der Anzahl der Monozyten in den mit Clodronat/Liposom behandelten Versuchstieren konnte laborchemisch nicht gezeigt werden. Entgegen dieser Annahme kam es in der zweiten postoperativen Woche in den mit Clodronat/Liposom behandelten Versuchstieren zu einer Monozytenerhöhung. Weiterhin konnte in der zweiten postoperativen Woche eine Erhöhung der Granulozyten festgestellt werden. In der Immunfluoreszenzbeurteilung der Rückenmarksschnitte konnte eine Verminderung von Chondroitinsulfat in den mit Clodronat/Liposom behandelten Versuchsgruppen nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe und den mit FTY/DMSO behandelten Gruppen war im Vergleich hierzu eine erhöhte Anzahl an Chondroitinsulfat exprimiert. Die Expression von GFAP war nur in der mit Clodronat/Liposom behandelten Versuchsgruppe vermindert.

## 4.1. Regeneration nach erfolgter Substanzapplikation

### 4.1.1 Einfluss von Fingolimod

FTY wurde intraperitoneal in einer Dosierung von 0,3mg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von zwei Wochen appliziert. Entsprechend den bekannten pharmakologischen und auf Zellebene vermittelten Eigenschaften von FTY, eine Sequestration der T-Lymphozyten in den Lymphknoten zu verursachen, führte FTY bei einer bereits therapeutisch getesteten Dosierung (Kahan, 1998; Norimatsu et al., 2012) dazu, dass die mit FTY behandelten Tiere eine fast vollständige Lymphozytendepletion über den Applikationszeitraum von zwei Wochen erfuhren. Der Effekt der Lymphozytendepletion war allerdings auch noch in der vierten postoperativen Woche nachweisbar, obwohl keine weitere Medikamentengabe erfolgt war. Dies kann zum einen an einer über die Dauer des Applikationszeitraumes hinausgehenden Wirkung liegen, wobei Kahan (1998) eine Halbwertszeit von 12-25h nach intravenöser bzw. 12-29h nach oraler Applikation beschreibt. Zum anderen kann die bis zur vierten postoperativen Woche bestehende Lymphopenie durch eine verlangsamte Auswanderung der Lymphozyten aus den Lymphknoten oder durch eine Veränderung der Homöostase nach erfolgtem Trauma bedingt sein. Ob diese Beobachtung einen positiven Effekt auf die Regeneration genommen hat, kann durch die vorliegende Studie nicht abschließend geklärt werden und ist anhand der festgestellten Ergebnisse eher unwahrscheinlich, da die mit FTY behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO/Liposom keine signifikante Verbesserung der motorischen Funktion zeigten. Im Vergleich zu anderen Studien wurde in den Verhaltenstests im Vergleich zur Kontrollgruppe keine verbesserte motorische Regeneration nachgewiesen. Dies könnte durch die applizierte Substanzmenge von 0,3mg/kg Körpergewicht bedingt sein. In den Untersuchungen von Kahan (1998) wurde jedoch eine relevante Immunsuppression, die dem therapeutischen Nutzen überwiegt, ab einer Dosierung von 0,1-0,3mg/kg Körpergewicht beschrieben. Norimatsu et al. (2012) zeigten wiederum eine verbesserte motorische Funktion in einer Dosierung von 3mg/kg Körpergewicht, welche oral appliziert wurde. Des Weiteren könnte die Lösung in DMSO zu einer verminderten Regeneration geführt haben. Jacob und dela Torre (2009) konnten allerdings eine verbesserte neurologische Rehabilitation nach Gehirnschädigung unter einer Therapie mit DMSO

nachweisen. Sie zeigten unter anderem eine Reduktion des zerebralen Ödems, eine verminderte Ischämie und Inflammation nach einem Gehirnschaden. Ebenfalls konnte in einem Modell für Rückenmarksverletzung unter Monotherapie mit DMSO eine moderate Verbesserung der motorischen Funktion nachgewiesen werden (Zileli et al., 1988), sodass DMSO in den 70ern sogar als Therapeutikum nach Rückenmarksverletzung galt (Kajihara et al., 1973; de la Torre et al., 1975). Auch in einer Studie mit Zellkulturmedien wurde eine Lösung von FTY in DMSO von Miron und Kollegen (2010) untersucht. In dieser konnte eine verbesserte Remyelinisierung nach Demyelinisierung, wie sie nach einer Schädigung des Rückenmarks auftreten kann, nachgewiesen werden (Miron et al., 2010). Ein Unterschied zu den oben erwähnten Studien ist die intraperitoneale Applikationsweise im Vergleich zu einer oralen oder intravenösen Applikationsform bei Kahan (1998), Norimatsu und Kollegen (2012) und in der Studie von Chiba und Kollegen (1998). Der Nachteil an der intraperitonealen Applikation ist die verminderte Sterilität, da die Haut mit Fell nicht vollständig steril desinfiziert werden kann. Die Methode war jedoch einfach zu handhaben und ohne starke Stressauslösung für die Tiere durchführbar. Nur vier Tiere entwickelten an der Einstichstelle eine Infektion (siehe Tabelle 2 Ausschlussgründe). Ein anderer Aspekt könnten die Umgebungsbedingungen darstellen. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden bei 21°C, 50%± 5% Luftfeuchtigkeit, einem 12h Tag-Nacht-Wechsel sowie freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. In den Untersuchungen von Zhang et al. (2009) wurden die Versuchstiere beispielsweise bei 23-28°C und 60-75% Luftfeuchtigkeit gehalten. In den anderen oben erwähnten Veröffentlichungen fehlen hierzu genauere Angaben. Durch die erfolgte Blutanalyse mittels FACS ist jedoch ersichtlich, dass FTY in dieser Arbeit zu einer Lymphozytendepletion im Blut bzw. Sequestration der Lymphozyten in den peripheren Lymphknoten geführt hat, wie sie bereits in anderen Experimenten beschrieben wurde (Chiba et al., 1998), sodass man von einem effektiven Einsatz des Medikamentes ausgehen kann.

#### 4.1.2 Einfluss von Clodronat

In der durchgeführten Untersuchung wurde in Liposomen eingekapseltes Clodronat unmittelbar postoperativ sowie am 1., 3. und 6. postoperativen Tag in einer Dosierung von 10mg/2ml Flüssigkeit, intraperitoneal appliziert. Die erzielten Ergebnisse sind mit den von

Popovich et al. (1999) kongruent, obwohl in der damaligen Studie eine intravenöse tägliche Applikation über 7 Tage erfolgte. Diese konnten außerdem eine Monozyten- und Makrophagendepletion bei bereits einmaliger Applikation des Medikamentes über einen Monat in der Milz und der Leber nachweisen. Iannotti et al. (2011) konnten mit den in dieser Untersuchung übernommenen Methoden, eine Applikation am 1., 3. und 6. Tag postoperativ sowie einer intraperitonealen Verabreichung von Clodronat in Liposomen vergleichbare Ergebnisse erzielen. Auch in ihrer Untersuchung kam es durch die Verabreichung von Clodronat zu einer erhöhten motorischen Regeneration im experimentellen Modell einer Rückenmarksverletzung. Außerdem konnte eine makrophagenspezifische Apoptose durch das in Liposomen eingekapselte Medikament nachgewiesen werden (van Rooijen und Hendrikx, 2010). In den hier erhobenen FACS-Daten war im Vergleich zur präoperativen Blutkontrolle kein Unterschied in den Wochen eins, vier und acht nach der Operation in der Anzahl der Blutmonozyten erkennbar. Ausschließlich in der zweiten Woche nach der Kontusion war in den mit Clodronat bzw. FTY/Clodronat behandelten Tieren eine Veränderung, jedoch in Form einer signifikanten Monozytenerhöhung, erkennbar. In Zusammenschau der Ergebnisse von Popovich und Kollegen (1999); van Rooijen und Hendrikx (2010) und Iannotti und Kollegen (2011) scheint Clodronat nicht auf die blutständigen phagozytären Zellen zu wirken, sondern spezifisch auf die gewebeständigen Makrophagen.

Die Population der Makrophagen unterteilt sich in M1, bzw. sekundäre und M2-Makrophagen. Vom 1. bis 7. Tag nach einer Verletzung des Rückenmarks liegen M1- und M2-Makrophagen in fast gleichem Verhältnis an der Läsionsstelle vor. Nach 14 Tagen steigt jedoch die Anzahl der M1- Makrophagen an und verbleibt bis zu einem Monat auf diesem Niveau. Die M1-Makrophagen synthetisieren und schütten Zytokine, reaktive Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen aus, welche zu einer Beschädigung und einer Apoptose der Neuronen und Gliazellen führen können (Block et al., 2007). Gleichzeitig bauen sie zerstörtes Gewebe im Bereich der Läsionsstelle ab (Kigerl et al., 2009). Im Gegensatz dazu unterstützen M2- Makrophagen die Angiogenese und den Aufbau der extrazellulären Matrix um gleichzeitig jede zellzerstörende Immunantwort zu unterdrücken. In der Veröffentlichung von Goerdts und Orfanos (1999)

werden diese Zellen als alternative Makrophagen beschrieben. Sie exprimieren im Vergleich zu den direkt aktivierten M1- Makrophagen andere Oberflächenrezeptoren und sind keine primär phagozytären Zellen. Vielmehr kommt es durch die Anwesenheit dieser Zellen und ihrer Rezeptoren zur Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen wie Th1- Helferzellen, einer Herunterregulation von Entzündungsreaktionen, einer erhöhten Angiogenese und der Wachstumsförderung von langen Axonen (Kigerl et al., 2009). Die in dieser Arbeit aufgetretene Erhöhung der Monozyten in der zweiten postoperativen Woche könnte also durch eine Aktivierung und einer vermehrten Differenzierung von Monozyten in alternative M2- Makrophagen entsprechen. Dabei scheint Clodronat einen Einfluss auf die Differenzierung in die Zellpopulation der M2- Makrophagen zu haben, denn die nachgewiesene Monozytenerhöhung tritt nur in den mit Clodronat behandelten Tieren auf.

Bei Betrachtung der zeitlich entsprechenden Ergebnisse des Verhaltenstestes kommt es ab der dritten postoperativen Woche in den mit Clodronat behandelten Versuchsgruppen zu einem stetigen Anstieg der motorischen Funktion, welcher sich auch gegenüber der Kontrollgruppe sowie der monotherapeutischen Gruppe, welche mit FTY/DMSO behandelte wurde, signifikant verbessert darstellt und bis zum Versuchsende anhielt. Die Monozyten hielten sich dabei in den mit Clodronat/Liposom und FTY/Clodronat behandelten Gruppen sowie in den anderen Gruppen auf einem niedrigen Level. Die Lymphozyten verhielten sich mit Ausnahme der mit FTY/DMSO behandelten Gruppen im Weiteren stabil. Die Granulozyten sanken nach der zweiten postoperativen Woche in allen Gruppen aber insbesondere in der mit Clodronat behandelten Gruppe auf eine niedrigere Zellzahl ab (von 6000-8000 auf das Niveau der nicht mit Clodronat behandelten Versuchsgruppen auf etwa 4000). Anhand dieses Verlaufs ist von einem antiinflammatorischen Einfluss auf das geschädigte Gewebe auszugehen. Dieser könnte durch die M2- Makrophagen bedingt sein und durch die Suppression der M1- Makrophagen durch Clodronat unterstützt werden.

#### 4.1.3 potentielle Interaktion von Fingolimod und Clodronat

Insgesamt zeigte die Kombinationsbehandlung von FTY und Clodronat keine signifikante Verbesserung der motorischen Funktion im Vergleich zur Versuchsgruppe, die mit Clodronat/Liposom behandelt wurde. Abgesehen von der 6. Woche postoperativ zeigten

die ausschließlich mit Clodronat/Liposom behandelten Tiere eine verbesserte motorische Funktion im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der mit Clodronat/Liposom in Monotherapie und der kombiniert behandelten Gruppe.

Obwohl die Pharmakokinetik der Medikamente sich nicht ähnelt (Pharma,Novartis,2018; Pharma,Aliud,2017) und der Abbau von FTY über die Leber durch die Leukotrien-B(4) omega-hydroxylase 1 (CYP4F2) und die Ausscheidung von Clodronat unmetabolisiert über die Niere erfolgt, ist eine gegenseitige Inhibition in der Wirkung der Medikamente auf Zellebene denkbar. Wenn die Anzahl der Lymphozyten und somit auch der zytotoxischen T-Lymphozyten durch FTY reduziert wird, indem diese Zellen in den sekundären lymphatischen Organen sequestriert werden (Yoshino et al., 2011), werden Makrophagen möglicherweise eher in M2 Makrophagen differenziert. Diese Zellen stellen keine primär phagozytären Zellen dar und tragen andere Oberflächenrezeptoren, wodurch sie Wachstumsprogramme durch Ausschüttung von G-CSF auslösen und zur Geninduktion in Neuronen beitragen (Goerdts und Orfanos, 1999; Kigerl et al., 2009). Andererseits können durch die Makrophagen keine Th1-Lymphozyten aktiviert werden, wie es normalerweise geschieht (Goerdts und Orfanos, 1999), denn diese werden durch FTY in den Lymphknoten sequestriert. Es könnte möglich sein, dass sich die beiden Medikamente in Kombinationsbehandlung negativ beeinflusst haben und dadurch die Ergebnisse der anderen Untersuchungen zu FTY am Modell der Ratte nicht reproduziert werden konnten.

## 4.2 Granulozyten als potentielle regenerative Induktoren

Granulozyten werden im Rahmen einer traumatischen Rückenmarksverletzung bereits 6 Stunden nach dem Trauma im Gewebe nachgewiesen und stellen somit die ersten einwandernden inflammatorischen Zellen an der Verletzungsstelle dar. Nach 24 Stunden ist die höchste Anzahl dieser Zellen im Gewebe nachzuweisen. Sie führen zur initialen Entzündungsreaktion durch die Produktion von Sauerstoffradikalen und Proteasen und dadurch zur Zerstörung von Neuronen, Gliazellen und Endothelzellen (Dyck et al., 2018). Bisher ist kein Versuchsaufbau bekannt, der die Kombination der beiden getesteten Substanzen in Bezug auf die Auswirkungen auf Granulozyten untersucht hat. Die in den hier erhobenen FACS-Ergebnissen festgestellten, erhöhten Granulozytenzahlen in allen

behandelten Gruppen sowie der Kontrollgruppe legen nahe, dass in der zweiten Woche nach erfolgter Kontusion, neben der initialen Immunantwort, eine weitere Entzündungsreaktion, die primär granulozytengesteuert zu sein scheint, stattfindet. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den von Shi und Kollegen (2017) erhobenen Daten dahingehend überein, dass Granulozyten einen Teil der proinflammatorischen Zellpopulation darstellen und Neuroinflammation über die Expression von reaktiven Sauerstoffmolekülen und die Produktion von Zytokinen auslösen. Diese Zytokinproduktion und der Einfluss der Granulozyten scheint jedoch auch positive Effekte auf die Regeneration zu haben. So wurde unter der Applikation von G-CSF eine verbesserte Angiogenese mit einer erhöhten Anzahl an neuen Blutgefäßen in der grauen und weißen Substanz und damit verbunden eine verbesserte motorische Hinterbeinfunktion nachgewiesen (Wallner et al., 2015). Die Kombination beider Substanzen (Clodronat/Liposom und FTY/DMSO) zeigt im Vergleich zur Monotherapie eine erhöhte Granulozytenanzahl, möglicherweise durch eine Erhöhung des G-CSF, im Blut. Das könnte bei reaktiver Anregung der Produktion von Granulozyten zum einen durch die Lymphozytendepletion durch FTY und zum anderen durch die Makrophagendepletion durch Clodronat geschehen. Dabei scheint sich die Zelldepletion durch beide Medikamente zu potenzieren, denn die Granulozytenerhöhung der kombiniert behandelten Tiere war über den gesamten Untersuchungszeitraum höher als die addierten Werte beider monotherapeutisch behandelten Gruppen. Ein Effekt der Pharmaka könnte demnach die Granulozyten- induzierte zytokinabhängige Angiogenese im Rückenmark nach Verletzung darstellen, die bezüglich der Regeneration schwerer wiegt als die inhibitorisch beschriebene inflammatorische Zytokinproduktion. Dieser Effekt scheint weiterhin abhängig vom temporären Vorliegen der Zellen im Gewebe zu sein. Normalerweise stellen neutrophile Granulozyten die erste rekrutierte Zellpopulation nach einer Gewebeverletzung dar. Sie werden innerhalb von einigen Stunden nach dem Trauma rekrutiert (Kolaczowska und Kubes, 2013) und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie Makrophagen-anlockende Proteine und IL-8 (Yin et al., 2010). Nach zwei Wochen jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass sich das Milieu an der Verletzungsstelle im Vergleich zum Akutzeitpunkt stark verändert hat. Es bleibt zu untersuchen, ob es dadurch nicht mehr zu einer massiven Zytokinproduktion durch die Granulozyten, sondern über

einen G-CSF gesteuerten Mechanismus zur Steigerung der Angiogenese mit erhöhtem Regenerationspotential kommt.

### 4.3. Vergleich der immunhistochemischen Untersuchungen

#### 4.3.1 Auswirkungen auf Mikrogliazellen und Astrozyten

Gliazellen wie Mikroglia tragen zur Interaktion zwischen Neuronen bei und zählen zu den Makrophagen-ähnlichen Zellen im ZNS, die über eine Gen- und Proteinexpression für den Abbau von Zellmaterial und Gewebereparatur sowie Zellproliferation sorgen (Li et al., 2019). Astrozyten stellen eine der Hauptpopulationen im erwachsenen Gehirn dar. Sie entstehen aus Gliazellen in der Ventrikulärzone. Sie übernehmen verschiedene Funktionen wie die Synapsenbildung und die Unterstützung der synaptischen Kontakte und neuronalen Interaktionen. Sie dienen weiterhin dem Aufrechterhalt der Ionenkonzentrationen und der Energiebereitstellung des Gehirngewebes (Gonzalez-Perez und Lopez-Virgen, 2015). Im Rahmen einer traumatischen Schädigung, wie sie bei einer Rückenmarksquetschung auftritt, kommt es zu einem raschen Untergang von Gliazellen (Ji et al., 2013). Astrozyten können durch GFAP immunhistochemisch angefärbt werden, um eine Mehranreicherung im Sinne einer Astroglieose nachzuweisen (Song et al., 2016). Die in dieser Arbeit durchgeführte immunhistochemische Färbung konnte eine Mehranreicherung von GFAP in der Kontrollgruppe sowie in der mit FTY/DMSO behandelten Gruppe im Vergleich zu den mit Clodronat/Liposom behandelten Gruppen nachweisen. Zusätzlich besteht ein Unterschied zwischen der mit Clodronat/Liposom-behandelnden Gruppe (Monotherapie) zu der FTY/Clodronat- Gruppe (Kombinationsbehandlung). In der Monotherapiegruppe zeigt sich eine stärker verminderte Fluoreszenz für GFAP als in der Kombinationsgruppe.

Eine abweichende Fluoreszenz der GFAP-Antikörperfärbung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen lässt vermuten, dass eine unterschiedliche Anzahl an reaktiven Astrozyten im Rückenmarksgewebe der unterschiedlichen Tiere vorlag.

So scheint, dass die Clodronat- Behandlung zu einer reduzierten Fluoreszenz in der mit Clodronat/Liposom behandelten und der mit FTY/Clodronat behandelten Versuchsgruppe führt. Im Gegensatz dazu findet sich mit der in dieser Arbeit gewählten immunhistochemischen Färbung eine erhöhte Fluoreszenz von GFAP in der Kontrollgruppe und der mit FTY/DMSO behandelten Versuchsgruppe.

### 4.3.2 Auswirkungen auf Chondroitinsulfate

Chondroitinsulfate sind Bestandteil der extrazellulären Matrix, welche Neuronen umgibt und zur Stabilität im ZNS beitragen (Rhodes und Fawcett, 2004). Sie inhibieren die Migration von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und ihre Differenzierung in demyelinisierten Bereichen des zentralen Nervensystems im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen und führen dadurch zu einer verminderten Remyelinisierung (Kuboyama et al., 2017). In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass die Menge der chondroitinsulfathaltigen Proteoglykane durch verschiedene Substanzen reduziert werden kann, sodass es zu einer verbesserten neurologischen Funktion kommt. Dies wurde für Protamin (Kuboyama et al., 2017) und Chondroitinase ABC (Corvetti, 2005; James et al., 2015; Cheng et al., 2015) nachgewiesen. In dieser Studie sollte unter anderem der Einfluss von Clodronat und FTY auf Chondroitinsulfate untersucht werden. Da sich Chondroitinsulfate auch im normalen, unbeschädigten Gewebe befinden, wurden die fluoreszenzmikroskopischen Schnittbilder mit der Sham-Kontrollgruppe verglichen.

Die mit FTY behandelte Gruppe zeigte wie die mit DMSO/Liposom behandelte Kontrollgruppe keine klare Verminderung, sondern vielmehr eine vermehrte Expression von chondroitinsulfathaltigen Proteoglykanen im Läsionsgewebe und der Umgebung. In einer Studie von Angyal und Kollegen (2010) konnte unter der Behandlung mit FTY keine Reduktion der Anzahl an Proteoglykanen in einem Modell einer Proteoglykan-induzierten Arthritis nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zum Einfluss von FTY auf insbesondere chondroitinsulfathaltige Proteoglykane im Modell einer Rückenmarksverletzung oder neurodegenerativen Erkrankung sind nicht bekannt. In den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen der Fluoreszenzbilder zeigt sich ebenfalls kein Hinweis auf eine Verminderung der Proteoglykane durch FTY.

In der weiteren Betrachtung der Bildanalyse zeigt sich, dass die meisten mit Clodronat/Liposom behandelten Tiere eine verminderte Anzahl an Chondroitinsulfaten exprimierten (6/8). In der mit FTY/DMSO behandelten Gruppe und in der Kontrollgruppe mit DMSO/Liposom war in der Mehrzahl der Tiere eine verstärkte Expression von Chondroitinsulfat nachweisbar (5/8 und 6/8). In der mit FTY/Clodronat behandelten Kombinationsgruppe war ein gemischtes Ergebnis zu erkennen. Die eine Hälfte der Tiere

exprimierte vermehrt und die andere Hälfte vermindert Chondroitinsulfat. Anhand dieser Daten stellt sich die Frage, ob Clodronat, neben der erwiesenen Wirkung auf Makrophagen, Einfluss auf die Anzahl der Proteoglykane, insbesondere der Chondroitinsulfate, nimmt. Denn eine Reduktion der Chondroitinsulfate durch FTY in der FTY/Clodronat Behandlungsgruppe kann durch die Ergebnisse der monotherapeutisch behandelten Gruppe mit FTY/DMSO ausgeschlossen werden. Da die Mehrheit der Tiere in der Clodronat/Liposom behandelten Gruppe ebenfalls eine erniedrigte Expression von Chondroitinsulfaten und GFAP aufwies (durch GFAP werden insbesondere reaktive Astrozyten angefärbt) und Astrozyten die maßgeblichen Zellen für die Produktion von chondroitinsulfathaltigen Proteoglykanen darstellen, stellt eine Verminderung beider Immunfluoreszenzfärbungen in der mit Clodronat/Liposom behandelten Gruppe eine Reduktion der reaktiven Astrozyten im Gewebe dar.

Weiterhin ist eine Beeinflussung der Medikamente in ihrem gegenseitigen Abbau unwahrscheinlich, da Clodronat überwiegend über die Niere und FTY über die Leber abgebaut wird (Pharma, Aliud, 2017; Pharma, Novartis, 2018). In einem Hemisektionsmodell konnten Tachi und Kollegen (2015) in der dritten postoperativen Woche eine natürliche Erhöhung der Anzahl der Chondroitinsulfate im Bereich der Läsionsstelle nachweisen. Ab der dritten postoperativen Woche zeigte sich in den Verhaltenstest in dieser Arbeit ebenfalls ein signifikanter Unterschied der ermittelten motorischen Funktion zwischen den mit Clodronat/Liposom behandelten Gruppen und der DMSO/Liposom Kontrollgruppe sowie der mit FTY/DMSO behandelten Gruppe. Grosso und Kollegen (2014) konnten unter der Behandlung mit Clodronat eine verminderte Kavitationsbildung und Reduktion der Läsionsgröße im Bereich des Rückenmarks nachweisen. In dieser Studie wurde Clodronat jedoch in Kombination mit Rolipram und Chondroitinase angewendet. Letztere reduziert neben der Makrophagendepletion durch Clodronat die Anzahl der Proteoglykane nachgewiesenermaßen bereits als Monotherapeutikum. In einem Studienmodell für rheumatoide Arthritis scheint Clodronat die patellaren Proteoglykane sogar zu schützen (Čeponis et al., 2001). Eine Untersuchung dieses Zusammenhangs im Rahmen einer neurodegenerativen Erkrankung oder einer Rückenmarksverletzung wurde nicht durchgeführt. Aktuell gibt es keine vorliegende Untersuchung, die einen Einfluss von

Clodronat auf chondroitinsulfathaltige Proteoglykane nachgewiesen hat. In dieser Arbeit zeigt sich ein Hinweis auf die Einflussnahme von Clodronat auf die Anzahl der Chondroitinsulfate und eine dadurch verbesserte neurologische und motorische Funktion nach erfolgter Rückenmarksverletzung.

Makrophagen werden durch das Milieu, welches Proteoglykane, insbesondere CSPG's, produzieren, überwiegend in M1- Makrophagen mit proinflammatorischem Phänotyp differenziert, welche für den Gewebeschaden und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen verantwortlich sind (Dyck et al., 2018). Durch eine Einflussnahme auf die Anzahl der CSPG's durch Clodronat scheint es dadurch zu einer Verminderung der M1- Makrophagen und zu einer verbesserten neurologischen und motorischen Funktion zu kommen. Die zusätzlich positiven Effekte auf die Regeneration neben der primären Inflammation, wurden bereits beschrieben (Goerdts und Orfanos, 1999; Kigerl et al., 2009). Einen Zusammenhang zwischen einem chondroitinsulfathaltigen Proteoglykan, dem NG2- Proteoglykan, und Makrophagen konnte auch bereits hergestellt werden. Dabei führte eine Reduktion des NG2- Proteoglykans primär zu einer reduzierten Makrophageninfiltration in die Läsionsstelle und einer, durch eine verminderte Inflammation bedingte, reduzierten Demyelinisierung. Im zeitlichen Verlauf kam es durch ein Fehlen von NG2-Proteoglykan jedoch zu einer verminderten Remyelinisierung. Diese Erkenntnis zeigt, dass nach der akuten Inflammation eine durch chondroitinsulfathaltige Proteoglykane geförderte Remyelinisierung und die Rekrutierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen durch Makrophagen stattfindet (Kucharova und Stallcup, 2017). Dieses Studiendesign wurde hingegen mit knochenmarkstransplantierten *Knockout*-Mäusen mit vollständig eradizierten peripheren Makrophagen durchgeführt. Dabei wurde nur das NG2- Proteoglykan betrachtet. Der Einfluss und der Zusammenhang zwischen Makrophagen und der Vielzahl der anderen Proteoglykane blieben unbeachtet. In der Studie von da Cunha und Kollegen (2017) konnte wiederum gezeigt werden, dass unterschiedliche Chondroitinsulfat-Proteoglykane zu einem divergenten Einfluss auf Makrophagen und die vermittelte inflammatorische Antwort in Form einer Zytokinexpression führen.

In der in dieser Arbeit durchgeführten Färbung konnte nicht zwischen den unterschiedlichen Chondroitinsulfat-Proteoglykanen differenziert werden. Der Mechanismus, der scheinbar

durch eine Depletion der Makrophagen zu einem reduzierten Fluoreszenznachweis in der Bildanalyse führt, bleibt ungeklärt und bietet Raum für weitere Studien mit dem Ziel dieser Fragestellung.

## 4. 4 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer potentiell verbesserten Regeneration im Sinne einer verbesserten motorischen Funktion nach einer Rückenmarkskontusion nach einer Kombinationsbehandlung mit FTY und Clodronat.

Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass sich FTY und Clodronat in Kombination nur begrenzt in ihrer regenerativen Wirkung ergänzen und Synergieeffekte aufweisen. Lediglich zu einem Zeitpunkt der Untersuchung (Woche 6 postoperativ) konnte im horizontalen Leiter- Test und im Sub-BBB ein verbessertes motorisches Ergebnis der FTY/Clodronat-Kombinationsgruppe nachgewiesen werden. Zu allen übrigen Zeitpunkten zeigten die ausschließlich mit Clodronat/Liposom behandelten Tiere eine verbesserte motorische Funktion im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen und es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der mit Clodronat/Liposom in Monotherapie und der kombiniert behandelten Gruppe.

Eine verbesserte motorische Funktion durch die Behandlung mit FTY/DMSO wie sie in den Untersuchungen von Miron und Kollegen (2010) und Norimatsu und Kollegen (2012) nachgewiesen wurde, konnte in diesem Versuch nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu, führte eine Behandlung mit in Liposomen eingekapseltem Clodronat zu einer verbesserten motorischen Funktion der Hinterbeine nach erfolgter Rückenmarkskontusion. Die Ergebnisse von Popovich et al. (1999) konnten reproduziert werden auch wenn sich die Behandlung nicht in der durchgeführten Blutanalyse widerspiegelte.

Es sind noch viele Untersuchungen und das Zusammentragen medizinischer Informationen von Studienergebnissen nötig, um letztendlich ein für die Betroffenen und Behandelnden zufriedenstellendes Ergebnis zu erzielen. Insgesamt stellt die Therapie der Rückenmarksverletzungen, insbesondere der Kontusionsverletzungen, die Forschung, durch die Komplexität des ZNS, der Vorgänge auf Zellebene, den Einfluss der Umgebung sowie die Abhängigkeit von individuellen Faktoren, dem Zugang zur medizinischen

Versorgung mit schnellem Therapiebeginn und zu adäquaten Behandlungsmöglichkeiten, weiterhin vor große Schwierigkeiten.

Ein Ansatzpunkt für neue Forschungsziele könnte in der Beeinflussung der primären Granulozytenantwort sowie der Granulozyten im weiteren zeitlichen Verlauf nach einem Trauma liegen, denn die mit Clodronat/Liposom behandelten Versuchsgruppen bzw. insbesondere die kombiniert behandelte Versuchsgruppe zeigte einen deutlichen Anstieg der Granulozytenpopulation in der zweiten postoperativen Woche. Die motorische Funktion dieser Versuchstiere in den Verhaltenstests war signifikant erhöht.

Ein anderer vielversprechender Aspekt scheint die gegenseitige Beeinflussung von Makrophagen und Chondroitinsulfat-Proteoglykanen zu sein, denn die Behandlung mit Clodronat zeigte in der Immunfluoreszenzfärbung eine verminderte Anzahl der chondroitinsulfathaltigen Proteoglykane im Bereich der Läsionsstelle. Dadurch könnte zum einen die Migration von M2-Makrophagen erleichtert (Kigerl et al., 2009), und zum anderen eine vermehrte Einwanderung von Oligodendrozyten in die Läsionsstelle erfolgen (Kuboyama et al., 2017), welche zu einer verstärkten Remyelinisierung führen kann.

## Literaturverzeichnis

Aktas,O.,J. Ingwersen,B., Kieseier,P. Küry,R. Hohlfeld,R. und Hartung,H.-P. (2011) 'Orales Fingolimod bei Multipler Sklerose', *Nervenarzt* 2011, pp. 215–225.

Anada,Y., Igarashi,Y. und Kihara,A. (2007) 'The immunomodulator FTY720 is phosphorylated and released from platelets', *European Journal of Pharmacology*, 568(1–3), pp. 106–111.

Angyal,A., Egelston,C., Kobezda,T., Olasz,K., László,A., Glant,T.T. und Mikecz,K. (2010) 'Development of proteoglycan-induced arthritis depends on T cell-supported autoantibody production, but does not involve significant influx of T cells into the joints.', *Arthritis research & therapy*. BioMed Central, 12(2), p. R44.

Baba,T., Ishizu,A., Iwasaki,S., Suzuki,A., Tomaru,U., Ikeda,H., Yoshiki,T. und Kasahara,M. (2006) 'CD4+/CD8+ macrophages infiltrating at inflammatory sites: a population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype', *Blood*, 107(5), pp. 2004–2012.

Beattie,M.S., Li,Q., und Bresnahan,J.C. (2000) 'Cell death and plasticity after experimental spinal cord injury', in *Progress in brain research*, pp. 9–21.

Block,M.L., Zecca,L.U. und Hong,J.-S. (2007) 'Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms.', *Nature reviews. Neuroscience*, 8(1), pp. 57–69.

Bossy-Wetzel,E., Newmeyer,D.D. und Green,D.R. (1998) 'Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization.', *The EMBO journal*, 17(1), pp. 37–49.

Bradbury,E.J., Moon,L.D.F., Popat,R.J., King,V. R., Bennett,G.S., Patel,P.N., Fawcett,J.W. und McMahon,S.B. (2002) 'Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury', *Nature*, 416(6881), pp. 636–640.

Brinkmann,V. (2009) 'FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system', *British Journal of Pharmacology*, 158(5), pp. 1173–1182.

Brinkmann,V. und Lynch,K.R. (2002) 'FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transplantation and autoimmunity.', *Current opinion in immunology*, 14(5), pp. 569–575.

Cao,Q., Zhang,Y.P., Iannotti C., DeVries,W. H., Xu,X.M., Shields,C.B. und Whittlemore,S.R. (2005) 'Functional and electrophysiological changes after graded traumatic spinal cord injury in adult rat', *Experimental Neurology*, 191(Suppl. 1).

Carson,M.J., Reilly,C.R., Sutcliffe,J.G. und Lo,D. (1998) 'Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells.', *Glia*, 22(1), pp. 72–85.

Cecchini,M.G., Dominguez,M.G., Mocci,S., Wetterwald,A., Felix,R., Fleisch,H., Chisholm,O., Hofstetter,W., Pollard,J.W. und Stanley,E.R. (1994) 'Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse.', *Development (Cambridge, England)*, 120(6), pp. 1357–1372.

Čeponis,A., Waris,E., Mönkkönen,J., Laasonen,L., Hyttinen,M., Solovieva,S.A., Hanemaaijer,R., Bitsch,A. und Konttinen,Y.T. (2001) 'Effects of low-dose, noncytotoxic, intraarticular liposomal clodronate on development of erosions and proteoglycan loss in established antigen-induced arthritis in rabbits', *Arthritis and Rheumatism*, 44(8), pp. 1908–1916.

Chamberlain,J.D., Deriaz,O., Hund-Georgiadis,M., Meier,S., Scheel-Sailer,A., Schubert,M., Stucki,G und Brinkhof,M.W. (2015) 'Epidemiology and contemporary risk profile of traumatic spinal cord injury in Switzerland', *Injury Epidemiology*. *Injury Epidemiology*, 2(1), p. 28.

Cheng,C.-H., Lin,C.-T., Lee,M.-J., Tsai,M.-J., Huang,W.-H., Huang,M.-C., Lin,Y.-L., Chen,C.-J., Huang,W.-C. und Cheng,H. (2015) 'Local Delivery of High-Dose Chondroitinase ABC in the Sub-Acute Stage Promotes Axonal Outgrowth and Functional Recovery after Complete Spinal Cord

Transection', *Plos One*, 10(9), p. e0138705.

Chiba,K., Yoshiki,Y., Yumi,M., Hirotohi,K., Takafumi,K., Makio,O. und Yukio,H. (1998) 'FTY720, a Novel Immunosuppressant, Induces Sequestration of Circulating Mature Lymphocytes by Acceleration of Lymphocyte Homing in Rats. I. FTY720 Selectively Decreases the Number of Circulating Mature Lymphocytes by Acceleration of Lymphocyte Homing Kenj', *The Journal of Immunology*, (21).

Chiba,K. und Adachi,K. (2012) 'Sphingosine 1-phosphate receptor 1 as a useful target for treatment of multiple sclerosis', *Pharmaceuticals*, 5(5), pp. 514–528.

Corvetti,L. (2005) 'Degradation of Chondroitin Sulfate Proteoglycans Induces Sprouting of Intact Purkinje Axons in the Cerebellum of the Adult Rat', *Journal of Neuroscience*, 25(31), pp. 7150–7158.

Crowe,M.J.,Bresnahan,J.C., Shuman,S.L. ,Masters,J.N. und Beattie,M.S. (1997) 'Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys.', *Nature medicine*, 3(1), pp. 73–76.

da Cunha,A.L., Aguiar,J.A.K., Correa da Silva,F.S.und Michelacci,Y.M. (2017) 'Do chondroitin sulfates with different structures have different activities on chondrocytes and macrophages?', *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, pp. 1019–1031.

Deogracias,R., Yazdani,M., Dekkers,M.P.J., Guy,J., Ionescu,M.C.S., Vogt,K.E. und Barde,Y.-A. (2012) 'Fingolimod, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, increases BDNF levels and improves symptoms of a mouse model of Rett syndrome.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35), pp. 14230–14235.

Dyck,S., Kataria,H., Alizadeh,A., Santhosh,K.T., Lang,B., Silver,J. und Karimi-Abdolrezaee,S. (2018) 'Perturbing chondroitin sulfate proteoglycan signaling through LAR and PTP $\sigma$  receptors promotes a beneficial inflammatory response following spinal cord injury', *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), pp. 1–26.

Emery,E., Aldana,P., Bunge,M.B., Puckett,W., Srinivasan,A., Keane,R.W., Bethea,J. und Levi,A.D.O. (1998) 'Apoptosis after traumatic human spinal cord injury', *Journal of Neurosurgery*, 89(6), pp. 911–920.

Faden,A.I. und Holaday,J.W. (1981) 'A role for endorphins in the pathophysiology of spinal cord injury.', *Advances in biochemical psychopharmacology*, 28, pp. 435–446.

Faden,A.I. und Salzman,S. (1992) 'Pharmacological strategies in CNS trauma.', *Trends in pharmacological sciences*, 13(1), pp. 29–35.

Fawcett,J.W. (2006) 'The glial response to injury and its role in the inhibition of CNS repair.', *Advances in experimental medicine and biology*, 557, pp. 11–24.

Finetti,F., Cassioli,C. and Baldari,C.T. (2017) 'Transcellular communication at the immunological synapse: a vesicular traffic-mediated mutual exchange', *F1000Research*, 6(0), p. 1880.

Finley,A., Chen,Z., Esposito,E., Cuzzocrea,S., Sabbadini,R. und Salvemini,D. (2013) 'Sphingosine 1-Phosphate Mediates Hyperalgesia via a Neutrophil-Dependent Mechanism', *PLoS ONE*, 8(1), pp. 1–9.

Foster,C.A., Howard,L.M., Schweitzer,A., Persohn,E., Hiestand,P.C., Balatoni,B., Reuschel,R., Beerli,C., Schwartz,M. und Billich,A. (2007) 'Brain Penetration of the Oral Immunomodulatory Drug FTY720 and Its Phosphorylation in the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Consequences for Mode of Action in Multiple Sclerosis', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(2), pp. 469–475.

Frediani,B. und Bertoldi,I. (2015) 'Clodronate: New directions of use', *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 12(2), pp. 97–108.

Galtrey,C.M., Asher,R.A., Nothias,F. und Fawcett,J W. (2007) 'Promoting plasticity in the spinal cord

with chondroitinase improves functional recovery after peripheral nerve repair', *Brain*, 130(4), pp. 926–939.

Galtrey, C.M. und Fawcett, J.W. (2007) 'The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system', *Brain Research Reviews*, 54(1), pp. 1–18.

Goerdts, S. und Orfanos, C.E. (1999) 'Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells.', *Immunity*. Elsevier, 10(2), pp. 137–142.

Gogolla, N., Caroni, P., Luthi, A. und Herry, C. (2009) 'Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure', *Science*, 325(5945), pp. 1258–1261.

Gonzalez-perez, O. und Lopez-virgen, V. (2015) 'HHS Public Access', 2(2), pp. 115–117.

Grosso, M.J., Matheus, V., Clark, M., van Rooijen, N., Iannotti, C.A. und Steinmetz, M.P. (2014) 'Effects of an Immunomodulatory Therapy and Chondroitinase After Spinal Cord Hemisection Injury', *Neurosurgery*, 75(4), pp. 461–471.

Gruner, J.A., Yee, A.K. und Blight, A.R. (1996) 'Histological and functional evaluation of experimental spinal cord injury: Evidence of a stepwise response to graded compression', *Brain Research*, 729(1), pp. 90–101.

Hackett, A.R. und Lee, J.K. (2016) 'Understanding the NG2 Glial Scar after Spinal Cord Injury.', *Frontiers in neurology*. Frontiers Media SA, 7, p. 199.

Hall, E.D., Andrus, P.K., Smith, S.L., Oostveen, J.A., Scherch, H.M., Lutzke, B.S., Raub, T.J., Sawada, G.A., Palmer, J.R., Banitt, L.S. und Tustin, J.S. (1996) 'Neuroprotective efficacy of microvascularily-localized versus brain-penetrating antioxidants.', *Acta neurochirurgica. Supplement*, 66, pp. 107–113.

Hall, E.D. und Springer, J.E. (2004) 'Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal.',

*NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(1), pp. 80–100.

Hall,E.D. (1989) 'Free radicals and CNS injury.', *Critical care clinics*, 5(4), pp. 793–805.

Hartung,H.-P., Khatri,B.O., Montalban,X., Pelletier,J., Capra,R., Gallo,P., Izquierdo,G., Tiel-wilck,K., Vera,A.D., Jin,J., Stites,T., Wu,S. und Aradhye,S. (2010) 'Oral Fingolimod or Intramuscular Interferon for Relapsing Multiple Sclerosis'.

Hla,T. (2004) 'Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(5), pp. 513–520.

Hume,D.A., Ross,I.L., Himes,S.R., Sasmono,R.T., Wells,C.A. und Ravasi,T. (2002) 'The mononuclear phagocyte system revisited.', *Journal of leukocyte biology*, 72(4), pp. 621–627.

Iannotti,C.A., Clark,M., Horn,K.P., van Rooijen,N., Silver,J. und Steinmetz,M.P. (2011) 'A combination immunomodulatory treatment promotes neuroprotection and locomotor recovery after contusion SCI', *Experimental Neurology*. Elsevier Inc., 230(1), pp. 3–15.

Jacob,S. und dela Torre,J. (2009) 'Pharmacology of DMSO in Cardic and CNS Damage.', *Pharmacological Rep*, 61, pp. 225–235.

Jaillard,C., Harrison,S., Stankoff,B., Aigrot,M.S., Calver,A.R., Duddy,G., Walsh,F.S., Pangalos, M.N., Arimura,N., Kaibuchi,K. und Zalc,B. und Lubetzki,C. (2005) 'Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival.', *The Journal of neuroscience* 25(6), pp. 1459–1469.

James,N.D., Shea,J., Muir,E.M., Verhaagen,J., Schneider,B.L. und Bradbury,E.J. (2015) 'Chondroitinase gene therapy improves upper limb function following cervical contusion injury.', *Experimental neurology*. Elsevier B.V., 271, pp. 131–135.

Ji,R-R., Temugin,B. und Nedergaard,M. (2013) 'Glia and pain: is chronic pain a gliopathy?', *Pain*. NIH Public Access, 154 Suppl(0 1), pp. S10-28.

Van Kaer,L., Parekh,V.V., Postoak,J.L. und Wu,L. (2017) 'Role of autophagy in MHC class I-restricted antigen presentation', *Molecular Immunology*.

Kahan,B.D. (1998) 'FTY720: A new immunosuppressive agent with novel mechanism(s) of action', *Transplantation Proceedings*, 30(5), pp. 2210–2213.

Kajihara,K., Kawanaga,H., De la Torre,J.C. und Mullan,S. (1973) 'Dimethyl sulfoxide in the treatment of experimental acute spinal cord injury.', *Surgical neurology*, 1(1), pp. 16–22.

Kawano,H., Kimura-Kuroda,J., Komuta,Y., Yoshioka,N., Li,H.P., Kawamura,K., Li,Y. und Raisman,G. (2012) 'Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system.', *Cell and tissue research*, 349(1), pp. 169–180.

Kigerl,K.A., Gensel,J.C., Ankeny,D.P., Alexander,J. K., Donnelly,D.J. und Popovich,P.G. (2009) 'Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord.', *The Journal of neuroscience* 29(43), pp. 13435–13444.

Kimura,T., Sato,K., Malchinkhuu,E., Tomura,H., Tamama,K., Kuwabara,A., Murakami,M. und Okajima,F. (2003) 'High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(7), pp. 1283–1288.

Kono,M., Belyantseva,I.A., Skoura,A., Frolenkov,G.I.,Starost,M.F., Dreier,J.L.,Lidington,D., Bolz,S.S., Friedman,T.B., Hla,T. und Proia,R.L. (2007) 'Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice', *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), pp. 10690–10696.

Krishna,V., Andrews,H., Jin,X., Yu,J., Varma, A., Wen,X. und Kindy,M. (2013) 'A contusion model of

severe spinal cord injury in rats.', *Journal of visualized experiments : JoVE*, 78(August), pp. 1–5.

Kuboyama,K., Tanga,N., Suzuki,R., Fujikawa,A. und Noda,M. (2017) 'Protamine neutralizes chondroitin sulfate proteoglycan-mediated inhibition of oligodendrocyte differentiation', *PLOS ONE*. Edited by M. Stangel. Public Library of Science, 12(12), p. e0189164.

Kucharova,K. and Stallcup,W.B. (2017) 'Distinct NG2 proteoglycan-dependent roles of resident microglia and bone marrow-derived macrophages during myelin damage and repair.', *PloS one*. Public Library of Science, 12(11), p. e0187530.

Kuwana,M., Okazaki,Y., Kodama,H., Izumi,K., Yasuoka,H., Ogawa,Y., Kawakami,Y. und Ikeda,Y. (2003) 'Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation.', *Journal of leukocyte biology*, 74(5), pp. 833–845.

de la Torre,J.C., Kawanaga,H.M., Johnson,C.M., Goode,D.J., Kajihara,K. und Mullan,S. (1975) 'Dimethyl sulfoxide in central nervous system trauma.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 243, pp. 362–389.

Laffleur,B., Debeaupuis,O., Dalloul,Z. und Cogné,M. (2017) 'B Cell Intrinsic Mechanisms Constraining IgE Memory', *Frontiers in Immunology*, 8(November).

Lee,K.D., Chow,W.N., Sato-Bigbee,C., Graf,M.R., Graham,R. S., Colello,R.J., Young,H.F. und Mathern,B.E. (2009) 'FTY720 reduces inflammation and promotes functional recovery after spinal cord injury.', *Journal of neurotrauma*, 26(12), pp. 2335–2344.

Li,H-Y., Huang,M., Luo,Q-Y., Hong,X., Ramakrishna,S. und So,K.-F. (2019) 'Lycium barbarum (Wolfberry) Increases Retinal Ganglion Cell Survival and Affects both Microglia/Macrophage Polarization and Autophagy after Rat Partial Optic Nerve Transection', *Cell Transplantation*, p. 096368971983518.

Lopes,C.T., Gallo,A.P., Palma,P.V.B., Cury,P.M. und Bueno,V. (2008) 'Skin allograft survival and

analysis of renal parameters after FTY720 + tacrolimus treatment in mice.', *Transplantation proceedings*, 40(3), pp. 856–860.

Lou,J., Lenke,LG., Ludwig,F.J. und O'Brien,M.F. (1998) 'Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury.', *Spinal cord*, 36(10), pp. 683–690.

De Luca,C. und Papa,M. (2017) 'Matrix Metalloproteinases, Neural Extracellular Matrix, and Central Nervous System Pathology', in *Progress in molecular biology and translational science*, pp. 167–202.

Maity,B., Sheff,D. und Fisher,R.A. (2013) 'Immunostaining: detection of signaling protein location in tissues, cells and subcellular compartments.', *Methods in cell biology*, 113, pp. 81–105.

Mehling,M., Kappos,L. und Derfuss,T. (2011) 'Fingolimod for Multiple Sclerosis: Mechanism of Action, Clinical Outcomes, and Future Directions', *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 11(5), pp. 492–497.

Metz,G. und Whishaw,I. Q. (2009) 'The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application.', *Journal of visualized experiments : JoVE*, (28), pp. 2–5.

Miron,V.E., Ludwin,S.K., Darlington,P.J., Jarjour,A., Soliven,B., Kennedy,T. E. und Antel,J.P. (2010) 'Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices.', *The American journal of pathology*, 176(6), pp. 2682–2694.

Norimatsu,Y., Ohmori,T., Kimura,A., Madoiwa,S., Mimuro,J., Seichi,A., Yatomi,Y., Hoshino,Y. und Sakata,Y. (2012) 'FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms.', *The American journal of pathology*. Elsevier Inc., 180(4), pp. 1625–1635.

Novgorodov,A.S., El-Alwani,M., Bielawski,J., Obeid,L.M. und Gudz,T.I. (2007) 'Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration.', *FASEB*

*journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(7), pp. 1503–1514.

Oudega,M. (2012) 'Molecular and cellular mechanisms underlying the role of blood vessels in spinal cord injury and repair.', *Cell and tissue research*, 349(1), pp. 269–288.

Paugh,S.W., Payne,S.G., Barbour,S.E., Milstien,S. und Spiegel,S. (2003) 'The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2.', *FEBS letters*, 554(1–2), pp. 189–193.

Pearse,D.D., Pereira,F.C.,Marcillo,A.E., Bates,M.L., Berrocal,Y.A., Filbin,M.T.und Bunge,M.B. (2004) 'cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury', *Nat Med*, 10(6), pp. 610–616.

PHARMA,A.(2017) 'Zoledronsäure 4 mg / 5ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionssuspension'.

Pharma,N.(2018) 'Fachinformation(Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels)GILENYA 0.5 mg Hartkapseln', *Rote Liste*.

Pizzorusso,T., Medini,P., Berardi,N., Chierzi,S., Fawcett,J.W. und Maffei,L. (2002) 'Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex.', *Science (New York, N.Y.)*, 298(5596), pp. 1248–1251.

Popovich,P.G., Guan,Z., Wei,P., Huitinga,I., van Rooijen,N. und Stokes,B.T. (1999) 'Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury', *Experimental Neurology*, 158(2), pp. 351–365.

Rhodes,K. E. und Fawcett,J.W. (2004) 'Chondroitin sulphate proteoglycans: Preventing plasticity or protecting the CNS?', *Journal of Anatomy*, 204(1), pp. 33–48.

van Rooijen,N. und Hendriks,E. (2010) 'Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 605, pp. 189–203.

Rosen,H. und Goetzl,E.J. (2005) 'Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network.', *Nature reviews. Immunology*, 5(7), pp. 560–570.

Rossignol,S., Schwab,M., Schwartz,M. und Fehlings,M.G. (2007) 'Spinal Cord Injury: Time to Move?', *Journal of Neuroscience*, 27(44), pp. 11782–11792.

de Ruyter,E.J., Ooft,M.L., Devriese,L.A. und Willems,S.M. (2017) 'The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis', *OncolImmunology*. Taylor & Francis, 6(11), p. e1356148.

Scheff,S.W., Saucier,D.A. und Cain,M.E. (2002) 'A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score.', *Journal of neurotrauma*, 19(10), pp. 1251–1260.

Schwab,M.E. (2004) 'Nogo and axon regeneration', *Current Opinion in Neurobiology*, 14(1), pp. 118–124.

Shi,J., Ke,Q., Lin,J., Zheng,Y., Wu,S., Huang,Z. und Lin,W. (2017) 'T1R1/T1R3 Taste Receptor Suppresses Granulocyte-Mediated Neuroinflammation After Spinal Cord Injury', *Journal of Neurotrauma*, p. neu.2016.4952.

Shijo,T., Warita,H., Suzuki,N., Kitajima,Y., Ikeda,K., Akiyama,T., Ono,H., Mitsuzawa,S., Nishiyama,A., Izumi,R. und Aoki,M. (2018) 'Aberrant astrocytic expression of chondroitin sulfate proteoglycan receptors in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis', *Journal of Neuroscience Research*, 96(2), pp. 222–233.

Shuman,S.L., Bresnahan,J.C. und Beattie,M.S. (1997) 'Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats', *Journal of Neuroscience Research*, 50(5), pp. 798–808.

Skoura,A., Sanchez,T., Claffey,K., Mandala,S.M., Proia,R.L. und Hla,T. (2007) 'Essential role of sphingosine 1 – phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina', *The Journal*

*of Clinical Investigation*, 117(9), pp. 2506–2516.

Song,I. und Dityatev,A. (2018) 'Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons.', *Brain research bulletin*, 136, pp. 101–108.

Song,Z-P., Xiong,B-R., Guan,X-H., Cao,F., Manyande,A., Zhou,Y-Q., Zheng,H. und Tian,Y.-K. (2016) 'Minocycline attenuates bone cancer pain in rats by inhibiting NF- $\kappa$ B in spinal astrocytes.', *Acta pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group, 37(6), pp. 753–762.

Stirling,D.P., Khodarahmi,K., Liu,J., McPhail,L.T., McBride,C.B., Steeves,J.D., Ramer,M.S. und Tetzlaff,W. (2004) 'Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury.', *The Journal of neuroscience* 24(9), pp. 2182–2190.

Tachi,Y., Okuda,T., Kawahara,N., Kato,N., Ishigaki,Y. und Matsumoto,T. (2015) 'Expression of hyaluronidase-4 in a rat spinal cord hemisection model', *Asian Spine Journal*, 9(1), pp. 7–13.

Theilmeyer,G., Schmidt,C.,Herrmann,J., Keul,P., Schäfers,M., Herrgott,I., Mersmann,J., Larman,J., Hermann,S., Stypmann,J., Schober,O., Hildebrand,R., Heusch,G., Haude,M., von Wnuck Lipinski,K., Herzog,C., Schmitz,M., Erbel,R. und Chun,J.B. (2006) 'High-Density Lipoproteins and Their Constituent, Sphingosine-1-Phosphate, Directly Protect the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury In Vivo via the S1P3 Lysophospholipid Receptor', *Circulation*, 114(13), pp. 1403–1409.

Wallner,S., Peters,S., Pitzer,C., Resch,H., Bogdahn,U. und Schneider,A. (2015) 'The Granulocyte-colony stimulating factor has a dual role in neuronal and vascular plasticity.', *Frontiers in cell and developmental biology*. Frontiers Media SA, 3, p. 48.

Wang,W.,Graeler,M.H. und Goetzl,E.J. (2005) 'Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for*

*Experimental Biology*, 19(12), pp. 1731–1733.

Watanabe,R. und Kakizaki,M. (2017) 'Extracellular matrix in the CNS induced by neuropathogenic viral infection', *Neuropathology*, 37(4), pp. 311–320.

Woller,N., Saborowski,M., Ostroumov,D., Fekete-Drimusz,N. und Kühnel,F. (2017) 'CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 75(4), pp. 689–713.

Wu,F., Liu,L. und Zhou,H. (2017) 'Endothelial cell activation in central nervous system inflammation', *Journal of Leukocyte Biology*, 101(5), pp. 1119–1132.

Yam-Puc,J.C., Zhang,L., Zhang,Y. und Toellner,K.-M. (2018) 'Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation', *F1000Research*, 7, p. 429.

Yin,Y., Cui,Q., Li,Y., Irwin,N., Fischer,D., Harvey,A-R. und Benowitz,L.I. (2003) 'Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration.', *The Journal of neuroscience* 23(6), pp. 2284–2293.

Yoshino,T., Tabunoki,H., Sugiyama,S., Ishii,K., Kim,S.U. und Satoh,J.-I. (2011) 'Non-phosphorylated FTY720 Induces Apoptosis of Human Microglia by Activating SREBP2', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 31(7), pp. 1009–1020.

Zerhouni,E. (2004) 'PTEN Deletion Enhances the Regenerative Ability of Adult Corticospinal Neurons', *Science*, 13(9), pp. 1075–1081.

Zhang,J., Zhang,A., Sun,Y., Cao,X. und Zhang,N. (2009) 'Treatment with immunosuppressants FTY720 and tacrolimus promotes functional recovery after spinal cord injury in rats.', *The Tohoku journal of experimental medicine*, 219(4), pp. 295–302.

Ziegler-Heitbrock,L. (2007) 'The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation.', *Journal of leukocyte biology*, 81(3), pp. 584–592.

Zileli,M., Ovül,I. und Dalbasti,T. (1988) 'Effects of methyl prednisolone, dimethyl sulphoxide and naloxone in experimental spinal cord injuries in rats.', *Neurological research*, 10(4), pp. 232–235.

<https://www.istockphoto.com/de/foto/maus-skelett-gm478763863-36032540>

<http://www.presysin.com/Products/Infinite-Horizon-Impactor.aspx>

## Danksagung

Ich danke Barbara Grimpe für die Idee und Verwirklichung meiner Arbeit, für die Bereitstellung der Materialien und der guten Betreuung über alle Jahre hinweg. Außerdem danke ich Michael Gliem für die Durchführung und Bedienung des FACS-Gerätes und der Unterstützung bei allen meinen Fragen zur Auswertung und Analyse. Ich danke Daniel Pape für die gute Zusammenarbeit bei den Versuchen und der gegenseitigen Unterstützung bei unseren Versuchen, der gemeinsamen Tiernachsorge, den Operationen und den Verhaltenstests. Ich danke Birgit Blumenkamp für die Hilfe bei der Bereitung der FACS-Proben und Aufbereitung der Zellen für die Analyse sowie der Bereitstellung der Materialien hierfür und der Beantwortung meiner Fragen. Weiterhin möchte ich mich bei Owen Y. Chao für die Berechnung der Statistik bedanken.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich über die Zeit meines Studiums finanziell und emotional unterstützt haben.