

**Ein mechanischer Mikrokonnektor zur  
Förderung der Regeneration nach  
Rückenmarkverletzung:  
Elektrophysiologische Analyse des  
therapeutischen Effekts und kombinatorische  
Chondroitinase ABC Behandlung**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Julia Sarah Krebbers**

aus Duisburg

Düsseldorf, Dezember 2020

aus dem Labor für Molekulare Neurobiologie der Neurologischen Klinik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Hans Werner Müller

2. Prof. Dr. Christine Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2021

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Estrada, Veronica; **Krebbers, Julia**; Voss, Christian; Brazda, Nicole; Blazyca, Heinrich; Illgen, Jennifer; Seide, Klaus; Jürgens, Christian; Müller, Jörg; Martini, Rudolf; Trieu, Hoc Khiem; Müller, Hans Werner (2018): Low-pressure micro-mechanical re-adaptation device sustainably and effectively improves locomotor recovery from complete spinal cord injury. In: *Communications biology* 1, S. 205. DOI: 10.1038/s42003-018-0210-8.

**Krebbers, Julia**; Brazda, Nicole; Estrada, Veronica; Voss, Christian; Ribas, Vinicius Toledo; Seide, Klaus; Trieu, Hoc Khiem; Lingor, Paul; Müller, Hans Werner (2015): A mechanical microconnector to improve regeneration after spinal cord injury: Characterization of the therapeutic effect by tracing studies. Posterbeitrag auf der Jahrestagung der Society for Neuroscience, Chicago, USA, Programmnr. 226.12.

# I Inhaltsverzeichnis

<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>vi</b>
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>viii</b>
<b>IV</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>ix</b>
<b>V</b>	<b>Verwendete Einheiten.....</b>	<b>xi</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung/Summary .....</b>	<b>1</b>
1.1	Zusammenfassung .....	1
1.2	Summary.....	3
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
2.1	Rückenmarkverletzungen .....	5
2.2	Mögliche Therapiestrategien .....	6
2.3	Das mechanische Mikrokonnectorsystem (mMS) .....	9
2.4	Elektrophysiologie als diagnostische Methode.....	10
2.5	Chondroitinase ABC .....	14
2.6	Fasertrakte des Rückenmarks.....	15
2.7	Zielsetzung der Arbeit.....	20
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>21</b>
3.1	Versuchstiere .....	21
3.2	Puffer, Lösungen und Antikörper .....	22
3.2.1	Puffer und Lösungen .....	22
3.2.2	Antikörper .....	24
3.3	Operationsprotokolle.....	25
3.3.1	Komplettläsion des Rückenmarks.....	25
3.3.2	Implantation des mechanischen Mikrokonnectorsystems.....	26
3.3.3	Operationen für elektrophysiologische Messungen .....	27
3.3.4	Retranssektion .....	28
3.3.5	Applikation von Substanzen.....	28
3.3.5.1	Applikation von Substanzen über das Mikrokanalsystem des mMS.....	29
3.3.5.2	Injektion von Substanzen kaudal und rostral der Läsion.....	29
3.3.6	Tierversorgung .....	30
3.4	Elektrophysiologische Messungen .....	30
3.5	Lokomotorischer Test .....	35
3.6	Perfusion und Gewebeaufbereitung .....	36
3.6.1	Perfusion .....	36
3.6.2	Gewebeaufbereitung .....	37
3.6.2.1	Nachfixierung und Einbettung in Gelatine .....	37
3.6.2.2	Schneiden am Gefriermikrotom.....	37
3.7	Immunhistochemische Färbungen .....	38
3.8	Axonquantifizierung .....	39
3.9	Statistik .....	41

<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1 Elektrophysiologie als diagnostische Methode.....	43
4.1.1 Motorisch evozierte Potentiale (MEPs) gesunder Tiere.....	43
4.1.2 Somatosensorisch evozierte Potentiale (SSEPs) gesunder Tiere.....	44
4.2 MEPs sind nach mMS Implantation wieder vorhanden.....	45
4.3 Nach Retranssektion des Rückenmarks ist kein MEP messbar .....	52
4.4 SSEPs lassen sich innerhalb von sechs Monaten nach Verletzung nicht nachweisen ..	53
4.5 mMS Implantation führt zu einer verbesserten Lokomotorik .....	53
4.6 MEP Amplituden und Lokomotorik korrelieren nicht .....	55
4.7 Kombinatorische Anwendung von mMS und Chondroitinase ABC.....	57
4.7.1 Die Kombinationsbehandlung führt nicht zu einem signifikanten Zuwachs an regenerierenden Axonen.....	57
4.7.2 Die Kombinationsbehandlung führt nicht zu einer Verbesserung der Lokomotorik ..	62
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>64</b>
5.1 Elektrophysiologie.....	64
5.1.1 Elektrophysiologische Messungen am gesunden Tier.....	64
5.1.1.1 Motorisch evozierte Potentiale gesunder Tiere .....	64
5.1.1.2 Somatosensorisch evozierte Potentiale gesunder Tiere.....	70
5.1.2 Elektrophysiologische Messungen am lädierten Tier.....	71
5.1.2.1 Motorisch evozierte Potentiale lädierter Tiere .....	71
5.1.2.2 Somatosensorisch evozierte Potentiale lädierter Tiere .....	74
5.1.2.3 Automutilation – Verlust von Tieren .....	75
5.2 Lokomotorik nach Rückenmarkverletzung .....	75
5.3 Motorisch evozierte Potentiale und lokomotorische Erholung.....	77
5.4 Kombination von mMS und Chondroitinase ABC.....	78
<b>6 Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>	<b>81</b>
<b>VI Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>VII Inhaltlicher Anteil an Publikationen.....</b>	<b>92</b>
<b>VIII Anhang .....</b>	<b>94</b>
A.1. Analysezertifikat Chondroitinase ABC.....	94
A.2. mBBB nach Estrada et al. (2014) .....	95
A.3. mBBB Protokollblatt.....	96
<b>IX Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>97</b>
<b>X Danksagung .....</b>	<b>98</b>

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Therapieansätze nach Rückenmarkverletzung	8
Abbildung 2:	Das mechanische Mikrokonnectorsystem (mMS)	10
Abbildung 3:	Messung eines elektrophysiologischen Signals	11
Abbildung 4:	Messung eines an der Muskelfaser wandernden Aktionspotentials	12
Abbildung 5:	Summenaktionspotential einer motorischen Einheit	13
Abbildung 6:	ChABC stimulierte Plastizität nach Rückenmarkverletzung	14
Abbildung 7:	Anatomie des Rückenmarks von Ratte und Mensch	16
Abbildung 8:	Implantation des mMS	26
Abbildung 9:	Verschiedene Applikationsweisen der Substanzen ins Rückenmark	28
Abbildung 10:	Zeitpunkte der MEP und SSEP Messungen in Abhängigkeit der Anästhesietiefe	31
Abbildung 11:	Bauplan 8-poliger DIN-Stecker	32
Abbildung 12:	Prinzip der Unterdrückung von Störsignalen mittels eines Differenzverstärkers	32
Abbildung 13:	Analysierte Parameter somatosensorisch und motorisch evozierter Potentiale	33
Abbildung 14:	Darstellung der elektrophysiologischen Messungen	34
Abbildung 15:	Zeitplan der elektrophysiologischen Messungen	35
Abbildung 16:	Analyse aller Axonpopulationen: Umwandlung in Binärbild	40
Abbildung 17:	Analyse aller Axonpopulationen: <i>region of interest</i>	41
Abbildung 18:	Motorisch evozierte Potentiale (MEPs) eines gesunden Tieres vor der Rückenmarkläsion	44
Abbildung 19:	Somatosensorisch evozierte Potentiale (SSEPs) eines gesunden Tieres vor der Rückenmarkläsion	45
Abbildung 20:	Motorisch evozierte Potential (MEPs) vor und eine Woche bzw. sechs Monate nach Rückenmarkverletzung	46
Abbildung 21:	Anzahl der Tiere bei denen MEPs nach längerer Zeit der Erholung messbar sind	47
Abbildung 22:	Latenzen der MEPs von mMS behandelten und unlädierten Tieren	50
Abbildung 23:	Amplituden der MEPs von mMS behandelten und unlädierten Tieren	51
Abbildung 24:	MEPs in mMS behandelten Tieren	51
Abbildung 25:	MEPs nach Retranssektion	52
Abbildung 26:	Somatosensorisch evozierte Potentiale (SSEPs) nach Rückenmarkverletzung	53
Abbildung 27:	Ergebnisse des lokomotorischen Tests	55
Abbildung 28:	Korrelation von mBBB-Werten und MEPs	56
Abbildung 29:	Repräsentative Bilder der anti-TUJ Färbung und binäre Bilder der Pixelanalyse pro Gruppe	58
Abbildung 30:	Quantifizierung neuronaler Fasern im Lumen des mMS fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung	59
Abbildung 31:	Serotonerge Fasern fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung	60

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 32: Katecholaminerge Fasern fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung. ....	61
Abbildung 33: Sensorische Fasern im Lumen des mMS fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung. ....	62
Abbildung 34: Lokomotorik (mBBB) fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung. ....	63

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Trakte des Rückenmarks. ....	18
Tabelle 2: Zusammensetzung der experimentellen Gruppen. ....	21
Tabelle 3: Puffer und Lösungen. ....	22
Tabelle 4: Primärantikörper. ....	24
Tabelle 5: Sekundärantikörper. ....	24
Tabelle 6: MEPs der mMS-Tiere nach zwei bis sechs Monaten. ....	48
Tabelle 7: Amplituden und Latenzen der MEPs unlädierter Tiere bei vergleichbarer Stimulationsstärke wie bei den mMS-Tieren. ....	49
Tabelle 8: Vergleich der Latenz- und Amplitudenmittelwerte gesunder Tiere mit mMS- Tieren bei vergleichbaren Stimulationsstärken. ....	49

## IV Abkürzungen

5HT	5 Hydroxytryptamin (Serotonin)
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BBB	Lokomotorischer Test nach Basso, Beattie und Bresnahan (1995)
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BMEP	<i>Brainstem-derived motor evoked potential</i> (vom Hirnstamm stammendes MEP) nach Schlag et al. (2001)
BSA	Bovines Serumalbumin
CERJ	Centre d'Elevage René Janvier
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
ChABC	Chondroitinase ABC
CMAP	<i>Compound muscle action potential</i> (Muskelsummenaktionspotential)
CMEP	<i>Corticomotor evoked potential</i> (kortikales MEP) nach Schlag et al. (2001)
CS-56	Klon für Chondroitinsulfat-Proteoglykan Antikörper
CS-GAG	Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykane
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
CST	Kortikospinaler Trakt
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
dest.	Destilliert
DS	Eselserum
EtOH	Ethanol
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
i.p.	Intraperitoneal
IQR	Interquartilsabstand
mBBB	Modifizierter BBB
MEP	Motorisch evoziertes Potential
MLR	<i>Mesencephalic locomotor region</i>
mMS	mechanisches Mikrokonnectorsystem
MPSS	Methylprednisolon Natriumsuccinat
MUAP	<i>Motor unit action potential</i>
N	Tieranzahl
N1 bzw. N2	Erster bzw. zweiter negativer Peak
N <sub>2</sub> O	Distickstoffmonoxid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid

## IV Abkürzungen

NMDA	N-Methyl-D,L-Aspartat
NT-3	Neurotrophin-3
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P1	Erster positiver Peak
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pen	Penicillinase
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNS	Peripheres Nervensystem
pulv.	Gepulvert
Re-TX	Retranssektion
RMV	Rückenmarkverletzung
ROI	<i>Region of interest</i>
s.c.	Subkutan
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SSEP	Somatosensorisch evoziertes Potential
Th	Thorakalwirbel
TH	Tyrosinhydroxylase
TUJ1	Klon für neuronal class III beta-tubulin Antikörper, wird synonym für neuronal class III beta-tubulin verwendet
TX	Komplette Transektion des Rückenmarks
wpo	Wochen nach Rückenmarkverletzung
ZNS	Zentrales Nervensystem

## V Verwendete Einheiten

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μV	Mikrovolt
C	Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
kdyn	Kilodyn
kg	Kilogramm
L	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
mbar	Millibar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
rpm	Umdrehungen pro Minute
U	Unit

# 1 Zusammenfassung/Summary

## 1.1 Zusammenfassung

Eine Rückenmarkverletzung hat meist schwerwiegende Folgen für die Betroffenen. Sie führt in der Regel zu irreparablen Schäden wie Lähmungen und Beeinträchtigungen der Sensibilität. Eine komplette Durchtrennung des Rückenmarks führt zu einer Retraktion der Rückenmarkstümpfe und einer Gewebelücke. Diese wird ausgefüllt von Narbengewebe. Letzteres sorgt als eine Art Barriere dafür, dass Axone nicht über die Läsionsstelle hinauswachsen können. Es sind vermehrt inhibitorische Chondroitinsulfat-Proteoglykane mit ihr assoziiert, die das Wachstum von Axonen verhindern. Um das Läsionsareal zu überbrücken wurde eine neuartige Therapieform entwickelt, bei dem die Rückenmarkstümpfe durch ein mechanisches Mikrokonnectorsystem (mMS) verbunden werden (Brazda et al. 2013). In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde der Erfolg dieser neuartigen mMS-Therapie in einer Langzeitstudie über einen Zeitraum von sechs Monaten im Rattenmodell getestet und deren Einfluss auf die motorische und sensorische Rekonnectivität hin untersucht. Voraussetzung dazu war die Etablierung einer modifizierten Methode zur Messung von elektrophysiologischen Potentialen. Zusätzlich wurde ein kombinatorischer Ansatz von mMS und dem Enzym Chondroitinase ABC (ChABC) getestet. ChABC sollte dabei der Spaltung von wachstumsinhibitorischen Chondroitinsulfat-Proteoglykanen der Narbe dienen und somit zu einer verbesserten axonalen Regeneration beitragen. Zwei unterschiedliche Applikationsweisen wurden getestet: 1. Injektion von ChABC in das Rückenmark kaudal und rostral des mMS und 2. Infusion von ChABC über das interne Mikrokanalsystem des mMS direkt in das Läsionsgebiet. Als Kontrollenzym diente Penicillinase. Der Einfluss der mMS-Implantation beziehungsweise der Kombination aus mMS und ChABC auf die axonale Regeneration und Lokomotorik nach Rückenmarkverletzung wurde im Rahmen einer fünföchigen Pilotstudie untersucht.

Der Erfolg der Therapie mit dem mMS konnte bestätigt werden. Zunächst wurden die elektrophysiologischen Messungen motorisch (MEPs) und somatosensorisch evozierter Potentiale (SSEPs) am gesunden Tier erfolgreich etabliert. Nach einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks auf Ebene des Thorakalwirbels 8 und anschließender Implantation des mMS konnten nach zwei bis sechs Monaten nach Operation MEPs detektiert werden. Im Vergleich dazu wurden in Ratten mit einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks ohne anschließende Behandlung keine MEPs gemessen. Der Unterschied im Auftreten von MEPs zwischen den beiden Gruppen ist statistisch signifikant. Die motorische Rekonnectivität konnte mit einer Retranssektion des Rückenmarks und danach ausbleibenden MEPs verifiziert werden. Zudem konnte eine Tendenz zu einer verbesserten Lokomotorik beobachtet werden. Eine Korrelation von motorischer Rekonnectivität und funktioneller Erholung konnte nicht festgestellt

werden. Eine sensorische Rekonnektivität, gemessen anhand von SSEPs, konnte nicht nachgewiesen werden.

Die zusätzliche Behandlung mit ChABC zeigte keinen synergistischen Effekt von mMS und ChABC auf die axonale Regeneration und Lokomotorik der Ratte fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung, gleich welcher Applikationsmethode. Das mMS erreichte schon allein eine Besserung, die nicht durch die Gabe von ChABC gesteigert werden konnte. Dies wurde sowohl für die axonale Regeneration aller neuronaler Fasern im Lumen des mMS beobachtet (anti-TUJ1), wie auch für die einzelnen Faserpopulationen: serotonerge (anti-5HT), katecholaminerge (anti-TH) und sensorische Fasern (*calcitonin gene-related peptide*, anti-CGRP). Serotonerge und katecholaminerge Fasern wurden ebenfalls kaudal des mMS verglichen, auch hier konnte kein Unterschied festgestellt werden. Auch in der Lokomotorik fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung und mMS Behandlung konnte keine signifikante Verbesserung mit zusätzlicher Gabe von ChABC beobachtet werden.

Abschließend ist zu sagen, dass das mMS eine erfolgsversprechende Therapie auf dem Weg zur Heilung von Querschnittlähmung bietet. Es zeigt in vielen Bereichen eine Verbesserung nach Rückenmarkverletzung. Neben dem Gewebeerhalt, der Regeneration von Axonen über die Läsion mit erfolgreicher Myelinisierung, Angiogenese und einer verbesserten Lokomotorik (Estrada et al. 2018b), konnte mit dieser Promotionsarbeit zusätzlich eine erfolgreiche motorische Rekonnektivität bestätigt werden. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass die Kombination aus mMS und ChABC nicht erfolgsversprechend ist, könnte dennoch die Kombination des mMS mit anderen Wirkstoffen zum verbesserten Therapieerfolg führen. Das mMS bietet dazu eine gute Grundlage, denn mittels des internen Mikrokanalsystems können zusätzliche Medikamente leicht an den Läsionsort gebracht werden.

### 1.2 Summary

A spinal cord injury usually has serious consequences for those affected. It typically leads to irreparable damage such as paralysis and impaired sensitivity. A complete transection of the spinal cord leads to retraction of the spinal cord stumps and a tissue gap. This will be filled by scar tissue. As a kind of barrier, the latter prevents axons from growing beyond the lesion site. Increased levels of inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) are associated with it, which prevent the growth of axons. In order to bridge the lesion site, a novel form of therapy has been developed in which the spinal cord stumps are connected by a mechanical microconnector system (mMS) (Brazda et al. 2013). In the present doctoral thesis, the success of this novel mMS therapy was tested in a long-term study over a period of six months in a rat model and its influence on motor and sensory resectivity was investigated. A requirement for this was the establishment of a modified method for measuring electrophysiological potentials. Additionally, a combinatorial approach of mMS and the enzyme chondroitinase ABC (ChABC) was tested. ChABC should thereby cleave growth-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans of the scar and thus contribute to an improved axonal regeneration. Two different application methods were tested: 1. Injection of ChABC into the spinal cord caudal and rostral of the mMS and 2. Infusion of ChABC through the internal microchannel system of the mMS directly into the lesion area. Penicillinase served as control enzyme. The influence of mMS implantation and the combination of mMS with ChABC on axonal regeneration and locomotor function after spinal cord injury was investigated in a five-week pilot study.

The success of the therapy with the mMS could be confirmed. First, the electrophysiological measurements: motor evoked potentials (MEPs) and somatosensory evoked potentials (SSEPs) were successfully established in the healthy animal. After a complete transection of the spinal cord at the level of the thoracic vertebra 8 and subsequent implantation of the mMS, MEPs could be detected two to six months after surgery. In comparison, no MEPs were measured in rats with a complete transection of the spinal cord without subsequent treatment. The difference in the occurrence of MEPs between the two groups is statistically significant. Motor resectivity could be verified by retranssection of the spinal cord and subsequent absence of MEPs. In addition, a tendency towards improved locomotor function was observed. A correlation of motor reconnection and functional recovery could not be shown. A sensory resectivity, measured by SSEPs, could not be proven.

The additional treatment with ChABC showed no synergistic effect of mMS and ChABC on axonal regeneration and locomotor function of the rat five weeks after spinal cord injury, no matter which application method was used. The mMS alone achieved an improvement, which could not be increased by the administration of ChABC. This was observed for the axonal regeneration of all neuronal fibres in the lumen of the mMS (anti-TUJ1) as well as for the individual fibre populations: serotonergic (anti-5HT),

catecholaminergic (anti-TH) and sensory fibres (*calcitonin gene-related peptide*, anti-CGRP). Serotonergic and catecholaminergic fibres were also compared caudally of the mMS, again no difference was found. Also, in the locomotor system five weeks after spinal cord injury and mMS treatment no significant improvement with additional administration of ChABC could be observed.

In conclusion, the mMS offers a promising therapy on the way to curing paraplegia. It shows an improvement in many areas after spinal cord injury. In addition to tissue preservation, regeneration of axons beyond the lesion with successful myelination, angiogenesis and improved locomotor function (Estrada et al. 2018b), this doctoral study also confirmed successful motor reconnection. Even if it could be shown that the combination of mMS and ChABC is not promising, the combination of mMS with other active substances could still lead to an improved therapeutic success. The mMS offers a good basis for this, because by means of the internal microchannel system additional drugs can be easily brought to the lesion site.

## 2 Einleitung

### 2.1 Rückenmarkverletzungen

Verletzungen des Rückenmarks führen meist zu irreparablen Schäden und anhaltenden funktionellen Ausfällen. Eine Läsion des Rückenmarks bewirkt die Durchtrennung supraspinaler neuronaler Verbindungen, so dass willkürliche Bewegungen und sensorische Empfindungen permanent gestört werden. Neben der Querschnittlähmung kann es je nach Höhe der Verletzung mitunter zu schweren Störungen von Atmung, Kreislauf, Thermoregulation, Verdauung und der Sexualfunktion kommen (Wallesch et al. 2005). Außerdem leidet der Patient oft unter Spasmen und Schmerzen und vor allem die psychische Belastung ist enorm (Adams und Hicks 2005; Hadjipavlou et al. 2016). Eine Verletzung des Rückenmarks des thorakalen bzw. lumbalen Bereichs führt zu Lähmungen der Beine, was als Paraplegie bezeichnet wird. Läsionen des zervikalen Bereichs führen zusätzlich zu Lähmungen der Hände und Arme, der Tetraplegie, so dass mitunter nur der Kopf bewegt werden kann. Rückenmarkverletzungen gehören trotz langjähriger intensiver Forschung noch immer zu den Verletzungen, die momentan nicht heilbar sind (Sofroniew 2018; Ramer et al. 2014; Bradbury und Burnside 2019). Im Gegensatz zu Verletzungen des peripheren Nervensystems (PNS) können Nervenfasern des zentralen Nervensystems (ZNS) nur in geringem Maße regenerieren (Kandel et al. 2000). Lange Zeit wurde sogar angenommen, dass Nervenfasern im ZNS gar nicht dazu in der Lage wären. Dieses Dogma, erstellt von Ramon y Cajal (Ramon y Cajal 1928) konnte u. a. um 1980 von David, Richardson und Aguayo widerlegt werden (Richardson et al. 1980; David und Aguayo 1981). In ihrer Arbeit überbrückten sie Bereiche vom Hirnstamm und Rückenmark mit einem Stück eines peripheren Nervens in welchen Neurone des ZNS einwachsen konnten. Sie konnten somit zeigen, dass die Nervenzellen des ZNS sehr wohl in der Lage zur Regeneration sind, wenn sie in eine Umgebung gebracht werden, in der das Auswachsen der Axone begünstigt wird. Diese Erkenntnis eröffnete eine Reihe neuer Therapieansätze. Bevor hier auf diese Therapieansätze näher eingegangen wird, erfolgt zunächst eine Erläuterung was auf pathophysiologischer Ebene nach einer Verletzung des Rückenmarks geschieht.

Eine Verletzung, zum Beispiel eine Quetschung des Rückenmarks bei einem Sturz, führt zunächst zu primären Schädigungen, dies sind die unmittelbaren Schäden aufgrund der mechanischen Einwirkung auf das Gewebe. Des Weiteren treten jedoch auch sekundäre Schädigungen auf, die im Zeitraum nach dem eigentlichen Sturz folgen und wodurch meist ein größerer Gewebeschaden entsteht. Diese Reihe von Prozessen können in eine akute, subakute, intermediäre und chronische Phase eingeteilt werden. In der akuten Phase kommt es zu axonalen und vaskulären Rissen, Einblutung und Freisetzung von zum Teil toxischen Zellbestandteilen. Die Gefäße werden

durchlässig und es bilden sich Ödeme. Folglich nimmt das Gewebe an Volumen zu, die Blutgefäße werden komprimiert und es entsteht eine Ischämie. Entzündliche Prozesse werden eingeleitet und letztlich folgt der apoptotische und nekrotische Zelltod an der Läsionsstelle. In der Subakuten Phase können sich Zysten bilden. Der Läsionskern ist umgeben von reaktiven Astrozyten, Fibroblasten und inflammatorischen Zellen. Der distale Teil des Axons wird nicht mehr versorgt und die Wallersche Degeneration beginnt. Dabei werden der distale Teil des Axons und die Myelinscheiden abgebaut (Ahuja und Fehlings 2016; Rowland et al. 2008; Wallesch et al. 2005).

Der proximale Teil der Nervenzelle ist ebenfalls betroffen. Die Zelle kann gänzlich absterben oder es kommt zu Veränderungen im Neuron wie z. B. dem Zurückziehen des proximalen Axonteils und dem Anschwellen des Zellkörpers (Kandel et al. 2000). Zusätzlich werden inhibitorische Proteoglykane in den Verletzungsbereich freigesetzt. In der intermediären bzw. chronischen Phase hat sich ein Bereich mit wachstumshemmenden Substanzen um den Kernbereich der Läsion gebildet. Die Wallersche Degeneration hält an. Noch intakte Neurone können teilweise wieder remyelinisiert werden. Nach ein bis zwei Jahren ist die Bildung der sekundären Schädigungen abgeschlossen und die neurologischen Funktionsstörungen soweit stabil (Rowland et al. 2008; Wallesch et al. 2005; Ahuja und Fehlings 2016).

## 2.2 Mögliche Therapiestrategien

Es gibt verschiedene Gründe, warum es nach Rückenmarkverletzung so schwerlich zu einer Heilung kommt. In diesem Abschnitt wird erläutert, welche Probleme vorliegen und welche Lösungsansätze dafür bereits entwickelt worden sind. Die anschließende Darstellung folgt dabei Übersichtsarbeiten von Sofroniew (2018), Bradbury und Burnside (2019) und Courtine und Sofroniew (2019) (siehe auch Abbildung 1).

Folgende Problematiken treten nach Verletzung des Rückenmarks auf:

1. Nach einer Rückenmarkverletzung kommt es zu einer Unterbrechung des intakten gesunden Gewebes durch den mit anderen Zellen und extrazellulären Bestandteilen gefüllten Läsionsbereich. Es bildet sich eine Regenerationsbarriere, die Narbe, und es fehlen zelluläre Leitstrukturen. Vor allem im Menschen entsteht zusätzlich eine Zyste, einem hauptsächlich mit Flüssigkeit gefüllten Hohlraum des Rückenmarks.
2. Extrinsische wachstumshemmende Faktoren im und um den Bereich der Verletzung bilden eine Regenerationsbarriere. Axone können somit nicht über die Läsionsstelle hinauswachsen. An diesem Prozess sind reaktive Astrozyten beteiligt. Sie bilden zum einen eine barriereartige Struktur, die den Läsionskern von noch erhaltenem Gewebe trennt, was auch als Glia Narbe bezeichnet wird. Zum anderen schütten sie extrazelluläre Matrixbestandteile aus, wie Chondroitinsulfat-

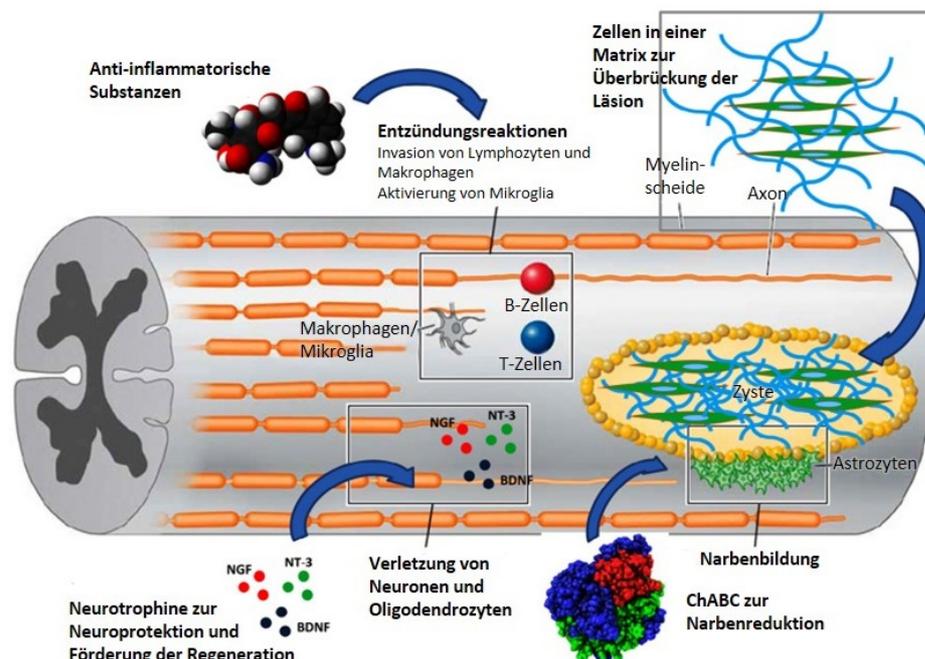
Proteoglykane (CSPGs), die inhibitorisch auf das Wachstum von Neuronen wirken. Neben Astrozyten werden CSPGs ebenfalls von Stromazellen (z. B. Fibroblasten), oligodendritischen Vorläuferzellen, inflammatorischen Zellen und anderen Zelltypen gebildet. Fibroblasten produzieren außerdem vermehrt Kollagen, eine weitere Substanz der extrazellulären Matrix. Kollagen ist Bestandteil der fibrösen Narbe im Läsionskern, die ebenfalls das Wachstum von Axonen hemmt. Zudem sind weitere inhibitorische Faktoren z. B. Myelin-assoziierte Proteine wie Nogo A mit dem Läsionsgebiet assoziiert.

3. Ein weiteres Problem ist der Mangel an intrinsischen und extrinsischen Faktoren, die eine axonale Regeneration fördern würden. Intrinsische Faktoren sind zelleigene Faktoren wie Gene, die nach einer Verletzung hoch- oder runterreguliert werden, und die damit verbundenen Signalwege. Extrinsische Faktoren sind Faktoren, die von außen auf die Nervenzelle einwirken und von anderen Zellen in den Extrazellularraum abgegeben werden. Beispielsweise können Neurotrophine wie BDNF und NT-3 als extrinsische Faktoren die Regeneration des Axons begünstigen.
4. Problematisch kann auch die immunologische Reaktion auf die Rückenmarkverletzung sein. Zum einen entsteht eine Trauma-induzierte Autoimmunität und zum anderen sind Reparaturmechanismen gestört. So findet der Switch von proinflammatorischen M1-Makrophagen zu Reparatur-assoziierten M2-Makrophagen nicht im ausreichenden Maße statt. Der Makrophagen-Phänotyp nach Rückenmarkverletzung ist daher vor allem M1 geprägt.

So wie es mehrere Prozesse gibt, die bei einer Verletzung ablaufen, gibt es mindestens ebenso viele Angriffspunkte für mögliche Therapien. Therapeutische Ansätze zu den genannten Problematiken sind zum Beispiel:

1. Implantate, welche die Lücke im Rückenmark überbrücken. Das können Matrices, Gele, Stützstrukturen oder auch Zellen sein.
2. Substanzen, die inhibitorische Faktoren blockieren, abbauen oder deren Bildung verhindern. Ansätze dafür sind die Spaltung von CSPGs mittels Chondroitinase ABC, die Inhibition der Kollagensynthese mittels Gelatoren (Klapka et al. 2005) und die Blockierung von Myelin-assoziierten Proteinen mit Antikörpern.
3. Mehrere genetische Regulatoren des Axonwachstums wurden identifiziert und sind Gegenstand von Therapieversuchen. Involvierte Signalwege sind über PTEN, mTOR, STAT3 und Weitere. Als ein weiterer Ansatz werden fehlende extrinsische Faktoren zugesetzt z. B. durch Applikation von Wachstumsfaktoren bzw. Zellen, die solche sezernieren. Das können Schwann-Zellen, Stammzellen (Schira et al. 2012) oder sogar aus Vorläuferzellen gebildete unreife Astrozyten (*progenitor-derived immature astrocytes*) sein. Letztere erscheinen zunächst unerwünscht, jedoch existieren unterschiedliche Astrozyten Phänotypen. Neben

- den wachstumshemmenden Astrozyten, welche die barriereartige Struktur der Narbe bilden gibt es auch solche, die eine Regeneration von Axonen fördern.
- Die Regulierung des Immunsystems, z. B. mittels Methylprednisolon Natriumsuccinat (MPSS) einem Kortikosteroid, das in einer klinischen Phase-III-Studie Erfolge zeigen konnte, findet beim Menschen Anwendung (Bracken et al. 1990). Jedoch steht MPSS heute auf Grund der hohen Nebenwirkungen im Verhältnis zu der geringen Wirkweise in der Kritik (Bowers et al. 2016) und wird nicht mehr routinemäßig verwendet (Huang et al. 2020). Es gibt weitere Phase-III-Studien wie z. B. mit Minocyclin, einem Antibiotikum, das auf viele Bereiche der sekundären Schädigungen wirken soll, u. a. soll es anti-entzündlich wirken (Shultz und Zhong 2017).



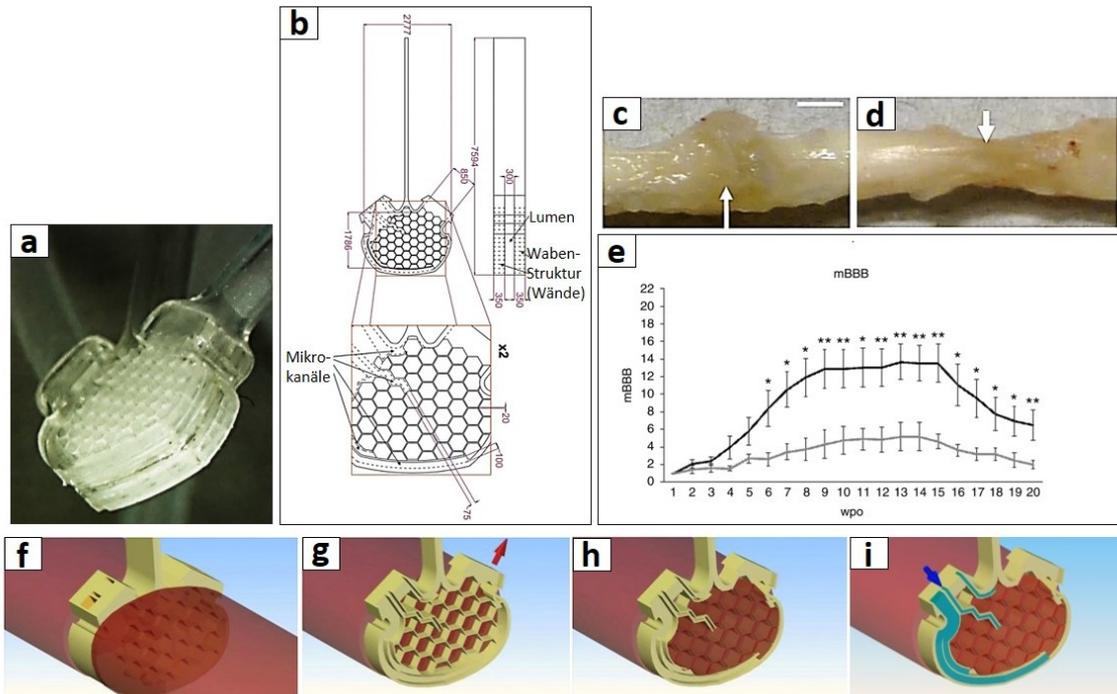
**Abbildung 1: Therapieansätze nach Rückenmarkverletzung.** Nach Verletzung des Rückenmarks kommt es zu einigen pathologischen Veränderungen. Dies sind 1. die Verletzung und der Verlust von Zellen im Läsionsbereich, 2. die Narbenbildung mit wachstumshemmenden Bestandteilen, 3. das Fehlen von extrinsischen und intrinsischen wachstumsfördernden Substanzen und 4. die Einleitung von Entzündungsreaktionen. Mögliche therapeutische Ansätze sind 1. die Implantation von Matrices und Zellen zur Überbrückung des Läsionsbereichs, 2. die Behandlung mit Substanzen zur Narbenreduktion (ChABC), 3. die Gabe von Neurotrophinen zur Neuroprotektion und als Wachstumsschub der verletzten Axone und 4. die Gabe von Anti-entzündlichen Substanzen. Abbildung modifiziert nach Silva et al. (2014).

Es werden noch weit mehr therapeutische Ansätze verfolgt, aber bisher konnte noch kein Mittel zur Heilung von Rückenmarkverletzungen gefunden werden (Sofroniew

2018; Ramer et al. 2014; Bradbury und Burnside 2019). Auf Grund der vielen verschiedenen Faktoren, die dabei eine Rolle spielen, ist ein kombinatorischer Ansatz verschiedener Therapien naheliegend. Zu beachten ist noch, dass eine Wiedererlangung von Funktionen nicht nur über eine Regeneration von Neuronen über die Läsionsstelle hinaus erfolgen muss. Vor allem bei Quetschungen des Rückenmarks, wo nur eine teilweise Durchtrennung des Rückenmarks erfolgt, kann auch eine neue Verschaltung über das Aussprossen von noch vorhandenen Axonen erfolgreich sein. Dabei könnten u. a. propriospinale Neurone eine wichtige Rolle spielen, die Segmente des Rückenmarks verbinden (Kandel et al. 2000; Flynn et al. 2011).

### 2.3 Das mechanische Mikrokonnektorsystem (mMS)

Bei einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks ist ein wesentliches Problem das Überbrücken der Läsionsstelle. Nach einer Durchtrennung des Rückenmarks ziehen sich die beiden Rückenmarkstümpfe zurück. Ziel in der hier verwendeten Behandlung ist es zunächst nach einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks, dieses wieder zu verbinden und so eine Regeneration der Neurone über die Läsionsstelle hinaus zu ermöglichen. In einer Kooperation dieser Arbeitsgruppe (Labor für Molekulare Neurobiologie) mit dem Institut für Mikrosystemtechnik an der Technischen Universität Hamburg-Harburg und der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Hamburg wurde im Zuge dessen ein Mikrokonnektorsystem (mMS) entwickelt (Brazda et al. 2013; Estrada et al. 2018b). Das mMS besteht aus Polymethylmethacrylat (PMMA). Zunächst angepasst an die Ratte ist es so groß wie der Durchschnitt des Rückenmarks ca. 1,8 x 2,8 mm und 1 mm dick (siehe Abbildung 2). Seine dem Rückenmark zugewandten Wände bestehen aus einer Wabenstruktur, was eine bestmögliche Stabilität gewährleistet. Zwischen diesen Wänden ist ein Hohlraum vorhanden, das Lumen des mMS. Durch die Wabenstruktur werden mit Hilfe eines Vakuums die beiden Rückenmarkstümpfe in das Lumen des mMS hineingezogen. Damit ist wieder eine Verbindung der beiden Rückenmarkstümpfe vorhanden. Ein Vorteil des mMS bietet ein internes Mikrokanalsystem worüber zusätzlich Therapeutika direkt in das Lumen, also den Ort der Verletzung gebracht werden können. Die Verwendung des mMS zeigte bisher sehr erfolgreiche, vielversprechende Ergebnisse im präklinischen Model der Ratte. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem mMS zu einem verbesserten Gewebeerhalt, einem vermehrten Auswachsen von Axonen, einer Myelinisierung, zur Angiogenese und zu einer verbesserten Lokomotorik führt (Estrada et al. 2018b; Brazda et al. 2013). Um u. a. zu zeigen, dass die im Offenfeld ermittelte verbesserte Lokomotorik von einer physiologisch intakten axonalen Verbindung herrührt und um zusätzlich die sensorische Rekonnektivität zu überprüfen, werden im Zuge dieser Arbeit elektrophysiologische Studien durchgeführt. Zudem wird die Kombination mit einer anderen Substanz, der Chondroitinase ABC getestet.



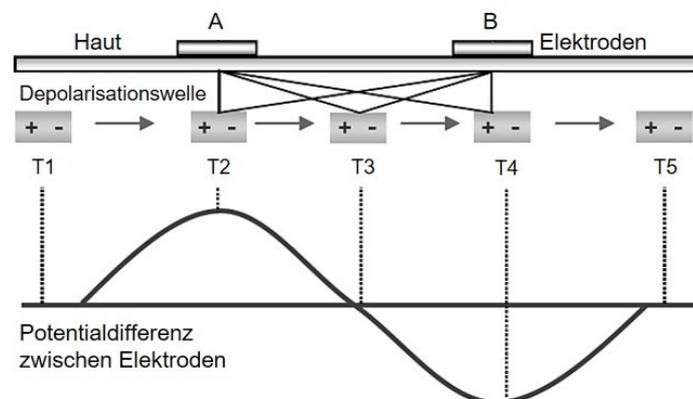
**Abbildung 2: Das mechanische Mikrokonnektorsystem (mMS).** Das mMS ist ein Implantat aus Polymethylmethacrylat, welches das Rückenmark nach einer kompletten Durchtrennung zusammenhält. Es besteht aus zwei wabenstrukturierten Flächen mit einem Hohlraum, dem Lumen, dazwischen (a, b). Unter Vakuum wird das Gewebe des Rückenmarks in das mMS hereingezogen und durch das System stabilisiert (f – h). Über ein internes Mikrokanalsystem können zusätzlich Substanzen appliziert werden (i). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass es zu einem verbesserten Gewebeerhalt führt (c, d). Außerdem wurde in einer Langzeitstudie eine signifikante Verbesserung in der Lokomotorik im Gegensatz zu komplett lädierten Kontrolltieren festgestellt. wpo = Wochen nach Rückenmarkverletzung, mBBB = modifizierter BBB, alle Maße in (b) gegeben in  $\mu\text{m}$ , Maßstab für (c, d) in (c) = 1 mm. (b – d) und (f – i) übersetzt nach Brazda et al. (2013), (e) aus Estrada et al. (2018b).

## 2.4 Elektrophysiologie als diagnostische Methode

Elektrophysiologische Messungen werden sowohl in der Diagnostik, als auch bei der Prognose von Rückenmarkverletzungen eingesetzt (Wallesch et al. 2005). Hierbei kann grob zwischen zwei verschiedenen Messungen unterschieden werden: den motorisch evozierten Potentialen (MEPs) und den somatosensorisch evozierten Potentialen (SSEPs) (Wallesch et al. 2005; Milnik 2009). Bei den MEPs wird der motorische Kortex stimuliert und in der Peripherie, zum Beispiel an einem Muskel oder direkt am Rückenmark, abgeleitet. Bei den SSEPs wird in der Peripherie stimuliert, z. B. an einem Nerven des Hinterbeins, und dann am somatosensorischen Bereich des Kortexes das korrespondierende Signal aufgezeichnet. Nach einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks ist eine Messung dieser Potentiale nicht mehr möglich, da zwischen

Gehirn und Muskel keine funktionelle neurophysiologische Verbindung mehr besteht. Nach der Regeneration von Nervenfasern über die Läsion hinaus und einer erfolgreichen Übertragung der Signale auf den Muskel (bei MEPs) bzw. an das Gehirn (bei SSEPs) sollte dies elektrophysiologisch zu messen sein. Bei inkompletten Läsionen kommt es zu MEPs unterschiedlicher Amplitude, Latenz und Dauer und daher kann anhand dessen, der Schädigungsgrad nach Rückenmarkverletzung bestimmt werden (Wallesch et al. 2005).

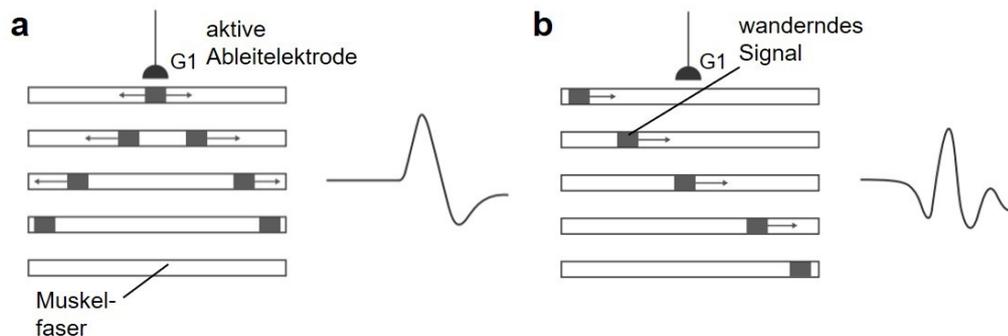
Motorisch und somatosensorisch evozierte Potentiale können mittels transkranieller Magnetstimulation oder einer direkten elektrischen Stimulation über subkutane Nadel- und Oberflächenelektroden ausgelöst werden (Milnik 2009; Bischoff und Dengler 2018; Verdú et al. 2003; Schlag et al. 2001). Die Ableitung der resultierenden Potentiale wird im Folgenden anhand der MEPs näher erläutert. Sie kann über Oberflächenelektroden (Milnik 2009; Bischoff und Dengler 2018) oder Nadelelektroden (Verdú et al. 2003; Schlag et al. 2001) erfolgen. Wird über einen großen Bereich des Muskels gemessen, besteht das MEP aus den aufsummierten Summenaktionspotentialen vieler motorischer Einheiten. Um dies genauer zu erläutern wird zunächst der isolierte Fall betrachtet, die Messung eines an der Muskelfaser verlaufenden Aktionspotentials. Bei der Ableitung wird die Potentialdifferenz zwischen zwei Elektroden über die Zeit abgebildet (siehe Abbildung 3). Zu beachten ist, auch in der vorliegenden Arbeit, dass ein Ausschlag der Kurve nach oben in den meisten elektrophysiologischen Messungen als Negativ definiert wird (Homma et al. 2010; Milnik 2009; Schlag et al. 2001).



**Abbildung 3: Messung eines elektrophysiologischen Signals.** Durch Vergleich der Potentiale an den beiden Elektroden A und B entsteht ein bipolares Signal. Abbildung modifiziert nach Kumar und Mital (1996).

Ist noch kein Aktionspotential an den Elektroden A und B vorhanden, ist die Potentialdifferenz gleich null (T1). Läuft ein Aktionspotential über die Muskelfaser, wird es an Elektrode A als erstes detektiert. Da an Elektrode B die Depolarisationswelle noch nicht angekommen ist, besteht eine Potentialdifferenz und es kommt somit zum Aus-

schlag der Kurve (T2). Wandert das Aktionspotential weiter zwischen die Elektroden A und B, ist keine Potentialdifferenz vorhanden und das aufgenommene Signal somit gleich null (T3). Bei der weiteren Fortleitung des Aktionspotentials gelangt es an den Ort wo sich die Elektrode B befindet. Hierbei besteht nun wieder eine Potentialdifferenz zwischen den Elektroden und da sich der Bezugspunkt nicht geändert hat, schlägt die Kurve nach unten aus (T4). Läuft das Aktionspotential weiter, ist die Potentialdifferenz wieder gleich null (T5). Somit entsteht aus dem monophasen Aktionspotential ein typisch bipolares Signal (Kumar und Mital 1996; Freiwald et al. 2007; Konrad 2011). In dem vorgestellten Beispiel liegen die Elektroden eng beieinander. Es werden aber auch Messungen durchgeführt, bei denen die aktive Elektrode über dem Muskel liegt und die Referenzelektrode an einem möglichst inerten Bereich, wie z. B. der Sehne. Auch hier wird die Differenz der Potentiale dargestellt, die Signale sehen jedoch je nach Ableitungsort entweder bi- oder triphasisch aus (Abbildung 4) (Preston und Shapiro 2013).

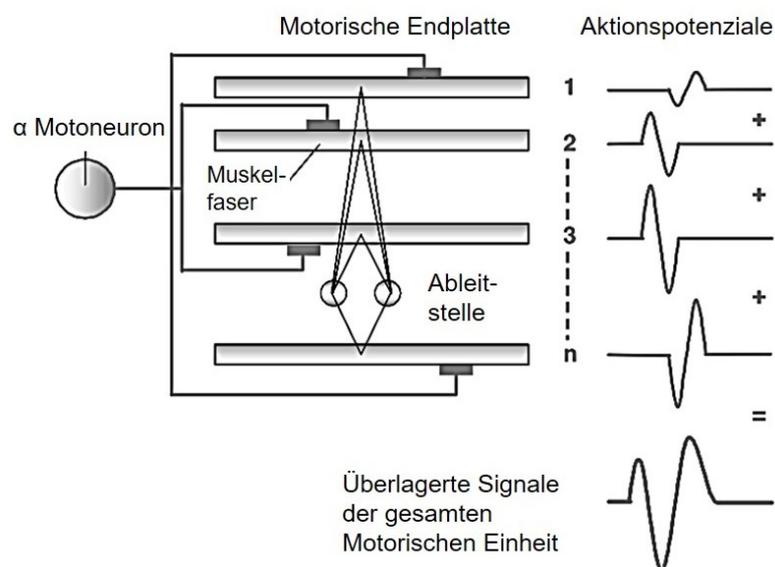


**Abbildung 4: Messung eines an der Muskelfaser wandernden Aktionspotentials.** Je nach Ort der aktiven Elektrode und Entstehungsort des Aktionspotentials an der Muskelfaser entstehen verschiedene Signalformen. Bei genauer Platzierung der Elektrode über der motorischen Endplatte wird ein biphasisches Signal gemessen (a). Bei Platzierung etwas entfernt von der motorischen Endplatte wird ein triphasisches Signal gemessen (b). Abbildung ergänzt nach Preston und Shapiro (2013).

Ein biphasisches Signal entsteht, wenn die Elektrode genau über dem Ort der muskulären Endplatte positioniert wird. Ein triphasisches Signal entsteht, wenn die Elektroden etwas entfernt vom Ort der Depolarisation platziert werden (Preston und Shapiro 2013). Da an der Referenzelektrode mitunter auch Potentiale vorkommen, ist es eher schwierig, einen Ort zu finden der wirklich inert ist und trotzdem in einer gewissen Nähe, um Störsignale über einen differentiellen Verstärker rausfiltern zu können (siehe auch Abbildung 12 in Abschnitt 3.4).

Eine komplette motorische Einheit besteht aus einem Motoneuron und dessen innerverten Muskelfasern. Jedoch wird eine Muskelfaser immer nur von einem Motoneuron innerviert (Bear et al. 2018). Wäre nur eine motorische Einheit isoliert aktiv, würde dies

zur Abbildung eines Summenaktionspotentials der einzelnen Muskelfasern dieser führen, dem *motor unit action potential* (MUAP) (siehe Abbildung 5). Da aber die Muskelfasern eines Motoneurons, die Muskelfasern eines anderen Motoneurons überlappen (Kandel et al. 2000), wird bei der Ableitung am Muskel die Summation der MUAPs gemessen (Konrad 2011; Kamen und Caldwell 1996). Dieses zu messende Signal wird auch allgemein, egal ob am Motorkortex oder z. B. dem Ischiasnerven gereizt wird, als *compound muscle action potential* (CMAP = Muskelsummenaktionspotential) bezeichnet. In dieser Arbeit, wie auch in manchen anderen Arbeiten (García-Alías et al. 2003; Redondo-Castro et al. 2016; Oria et al. 2008), wird das vom Kortex stammende Signal als MEP und das von einer Ischiasnervstimulation hervorgerufene Signal als CMAP bezeichnet.

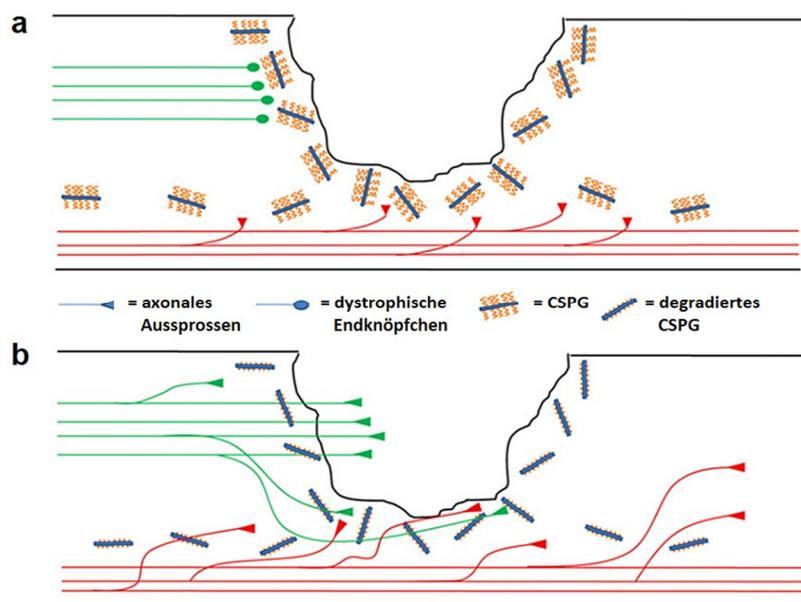


**Abbildung 5: Summenaktionspotential einer motorischen Einheit.** Ein Motoneuron innervert mehrere Muskelfasern, dies wird als motorische Einheit bezeichnet. Die Aktionspotenziale erreichen die Elektroden zu unterschiedlichen Zeitpunkten und sind näher oder weiter von diesen entfernt. Aus diesen mehreren Einzelpotenzialen entsteht ein Summenaktionspotential. Graubild nach Konrad (2011) modifiziert nach Basmajian und Luca (1985).

Evozierte Potentiale finden auch im Tier zu diagnostischen Zwecken Anwendung (Takeoka et al. 2011; Verdú et al. 2003; Morris et al. 2017). In dieser Arbeit werden diese ebenfalls genutzt, um den Erfolg der hier angewandten Therapie bestimmen zu können. Die Messungen sind für Verletzungen am Rückenmark in der Ratte nicht standardisiert, und die in der Literatur beschriebenen Messmethoden sind zum Teil sehr heterogen. Die hier dargestellten elektrophysiologischen Messungen wurden im Laufe dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe neu aufgebaut. Angelehnt wurden sie an die Arbeiten von Schlag et al. (2001), jedoch in der Methodik etwas abgewandelt (siehe Abschnitt 3.4).

## 2.5 Chondroitinase ABC

Neben dem mechanischen Mikrokonnectorsystem (mMS) wird in dieser Arbeit die zusätzliche Therapie mit dem Enzym Chondroitinase ABC (ChABC) getestet. Wie beschrieben werden nach einer Verletzung des Rückenmarks vermehrt Stoffe gebildet, die das Wachstum von Axonen erschweren (Bradbury und Burnside 2019). Solche inhibitorischen Stoffe sind zum Beispiel Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPGs). Im sich entwickelndem ZNS sind sie als negatives Wachstumssignal (Wang et al. 2008) hilfreich für die Wegfindung von Axonen (Faissner und Steindler 1995; Fukuda et al. 1997; Bradbury und Carter 2011). Sie sind ein wesentlicher Bestandteil perineuraler Netze wo sie zur synaptische Stabilität beitragen (Bartus et al. 2012; García-Alías und Fawcett 2012; Bradbury und Carter 2011). Nach einer Verletzung werden sie hochreguliert und verhindern die Regeneration oder das Aussprossen von Neuronen und haben somit einen negativen Effekt auf die Heilung von Rückenmarkverletzungen (Bartus et al. 2012; García-Alías und Fawcett 2012; Lemons et al. 1999) (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: ChABC stimulierte Plastizität nach Rückenmarkverletzung.** Nach einer Rückenmarkverletzung kommt es zu einer erhöhten Bildung von wachstumshemmenden Chondroitinsulfat-Proteoglykanen (CSPGs) (a). Die Behandlung mit ChABC und die damit verbundene Abspaltung von Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykan-Ketten vom Kernprotein führt zu verstärktem Auswachsen von Axonen in und um das Läsionsareal (b). Abbildung modifiziert nach Bartus et al. (2012).

CSPGs bestehen aus einem Kernprotein mit mehreren Polysaccharid-Seitenketten, den Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykanen (CS-GAGs) (Kjellén und Lindahl 1991). Diese sind für die inhibitorische Wirkung der CSPGs auf das Wachstum von Axonen verantwortlich (Wang et al. 2008; Zuo et al. 1998; Fidler et al. 1999). Das bakterielle

Enzym ChABC katalysiert die Abspaltung der CS-GAGs vom Kernprotein (Yamagata et al. 1968). Mehrere Wissenschaftler konnten bisher zeigen, dass ChABC einen positiven Effekt auf die Regeneration und das Aussprossen von Axonen hat und zu einer funktionellen Erholung führt (Bradbury et al. 2002; Moon et al. 2001; Davies et al. 1999). ChABC wurde auch in kombinatorischen Studien bisher erfolgreich verwendet (García-Alfías und Fawcett 2012; Fouad et al. 2005; Zhang et al. 2013) und soll ebenfalls in dieser Arbeit mit dem mMS kombiniert werden.

In Vorarbeiten von Valentina Antoni (2012) konnte gezeigt werden, dass CSPGs auch nach kompletter Transsektion des Rückenmarks und anschließender Implantation des mMS vorhanden sind. Eine immunhistochemische Färbung gegen CSPGs (CS-56) zeigte, dass eine Akkumulation der CSPGs um das mMS stattfindet. Die Infusion von ChABC über das interne Mikrokanalsystem des mMS führte zur Degradation der CSPGs, was zum einen durch die fehlende Markierung von intakten CSPGs und zum anderen durch die positive Markierung von abgespaltenen CS-GAG-Ketten gezeigt werden konnte. Die Infusion mit einer Kontrollsubstanz, der Penicillinase, führte zu keiner Abspaltung der CS-GAG-Ketten. Um zu überprüfen, ob die zusätzliche Anwendung von ChABC einen Effekt auf das axonale Wachstum in oder über das mMS hinaus hat, wurde in dieser Arbeit die Kombination von ChABC und mMS auf die axonale Regeneration hin untersucht. Der Beobachtungszeitpunkt entsprach dabei fünf Wochen.

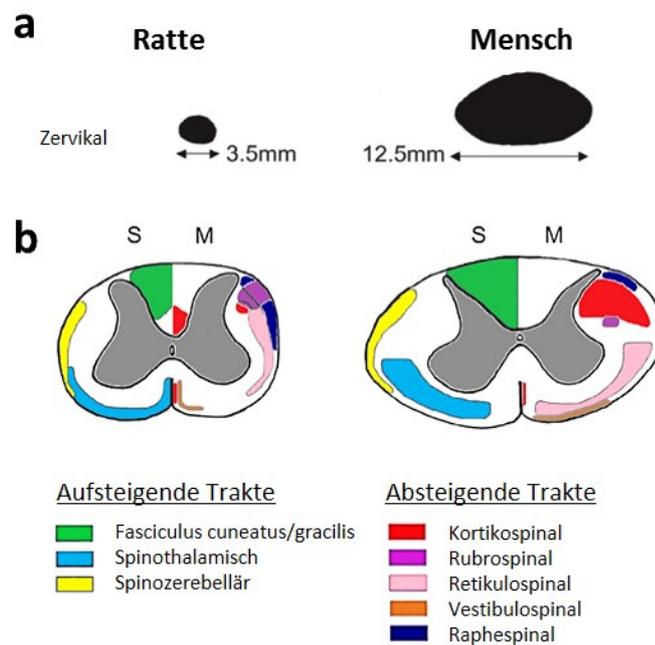
### 2.6 Fasertrakte des Rückenmarks

Im Rückenmark verlaufen mehrere Fasertrakte bzw. Bahnen. Diese können in absteigende und in aufsteigende Trakte eingeteilt werden. Zu den absteigenden Trakten gehören u. a. der kortikospinale, rubrospinale, retikulospinale, vestibulospinale und raphespinale Trakt. Zu den aufsteigenden Trakten gehören der Fasciculus cuneatus und gracilis, der spinothalamische und der spinozerebelläre Trakt. Weitere Trakte, wie z. B. der tektospinale Trakt, werden nicht näher betrachtet, da sie für diese Arbeit weniger relevant erscheinen (vgl. zu diesem und folgendem Absatz Silva et al. 2014 und Watson et al. 2009).

Die Fasertrakte verlaufen in der weißen Substanz des Rückenmarks an ähnlichen Positionen in Ratte und Mensch (siehe Abbildung 7). Jedoch gibt es einen wesentlichen Unterschied, der kortikospinale Trakt teilt sich beim Menschen in einen dorsolateralen und einen ventromedialen Teil. Bei der Ratte gibt es zusätzlich einen dorsomedialen Teil des kortikospinalen Traktes. Der Querschnitt des Rückenmarks des Menschen ist zudem größer.

Die Fasertrakte des Rückenmarks kreuzen zum großen Teil auf die andere Seite, so dass z. B. die Bewegung der rechten Extremität von der linken Gehirnhälfte ausgelöst wird. Kreuzungspunkte sind an verschiedenen Stellen im Hirnstamm oder im Rücken-

mark vorhanden. Die meisten absteigenden Bahnen sind motorische und die aufsteigenden sensorische Bahnen (vgl. hier und im Weiteren, wenn nicht anders gekennzeichnet Trepel 2017). Im Folgenden werden die einzelnen Trakte näher beschrieben (für eine Übersicht der Trakte, ihrer Transmitter und Funktionen siehe auch Tabelle 1). Der kortikospinale Trakt übermittle Signale der Motorik. Dabei ist er beim Menschen vor allem wichtig für die Feinmotorik, die über die distale Extremitätenmuskulatur gesteuert wird. Er wird auch aufgrund der Vorwölbung in Form einer Pyramide in der Medulla oblongata als Pyramidenbahn bezeichnet. Sein Ursprung liegt v. a. im Motor-kortex und er projiziert auf Neurone des Vorderhorns des Rückenmarks. Von da findet eine Verschaltung zu den Muskeln statt.



**Abbildung 7: Anatomie des Rückenmarks von Ratte und Mensch.** Im oberen Teil, ist die Form und Größe des zervikalen Rückenmarks der einzelnen Spezies dargestellt (a). Im unteren Teil sind die auf- und absteigenden Fasertrakte im Querschnitt des Rückenmarks dargestellt (b). S = sensorische Trakte, M = motorische Trakte. Abbildung modifiziert nach Silva et al. (2014) adaptiert nach Hodgetts et al. (2009).

Als extrapyramidale Systeme beeinflussen der rubrospinale, vestibulospinale und retikulospinale Trakt die Motorik der Rumpf- und Extremitätenmuskulatur. Deren Ursprung liegt im Hirnstamm, im speziellen im Nucleus ruber, Nucleus vestibularis und in der Formatio reticularis. Sie projizieren ebenfalls in das Vorderhorn des Rückenmarks. Über sie wird u. a. die Körperhaltung kontrolliert (Schmidt 2010).

Der rubrospinale Trakt beeinflusst den Tonus der distalen Extremitätenmuskulatur. Beim Menschen ist er schwach ausgebildet, reicht nur bis zum zervikalen Rückenmark (Trepel 2017) und seine Funktion wird eher vom kortikospinalen Trakt übernommen

(Kandel et al. 2000). Der vestibulospinale und retikulospinale Trakt sind vor allem für die groben Bewegungen von Rumpf und proximalen Extremitäten verantwortlich. Sie ermöglichen nach einer Verletzung des kortikospinalen Trakts noch die Beweglichkeit der distalen Extremitäten, da sie die Motorneurone dieser mitinnervieren (vgl. hier und im Weiteren, wenn nicht anders gekennzeichnet Trepel 2017).

Neben den absteigenden motorischen Bahnen verlaufen ebenfalls aufsteigende sensorische Bahnen im Rückenmark. Diese sind der Fasciculus cuneatus und Fasciculus gracilis (Hinterstrang), der spinothalamische (sensibler Vorderseitenstrang) und der spinozerebelläre Trakt (Kleinhirnseitenstrang).

Über den spinothalamischen Trakt, auch als sensibler Vorderseitenstrang bezeichnet, werden Informationen wie Schmerz, Temperatur und grobe Druck- und Tastempfindungen übertragen. Er hat seinen Ursprung in den Laminae I – II des Hinterhorns und kreuzt auf Höhe des Ursprungssegments auf die kontralaterale Seite. Es erfolgt eine Projektion in den Nucleus ventralis posterior im Thalamus, von wo eine Verschaltung zum sensorischen Bereich der Großhirnrinde stattfindet.

Weitere aufsteigende sensorische Bahnen sind die Hinterstrangbahnen, bestehend aus dem Fasciculus cuneatus und gracilis. Der Fasciculus cuneatus führt fast ausschließlich Impulse der oberen Extremitäten und der Fasciculus gracilis der unteren Extremitäten zum Gehirn. Sie leiten beide exterozeptive Signale der Berührung der Haut und propriozeptive Signale über die Lage des Rumpfes und der Extremitäten weiter. Diese Bahnen kreuzen im Rückenmark nicht auf die andere Seite und im Rückenmark findet ebenfalls keine Verschaltung statt. Sie haben ihren Ursprung in den Spinalganglien und bilden den zentralen Ast der sensorischen Neurone. Sie projizieren in der Medulla oblongata im Nucleus cuneatus und gracilis auf ein zweites Neuron. Die Fasern dieses Neurons kreuzen dann auf die kontralaterale Seite und projizieren in den Thalamus (Nucleus ventralis posterior) und von da über die Verschaltung auf ein drittes Neuron zum sensorischen Bereich der Großhirnrinde.

Ein weiterer sensibler Trakt ist der spinozerebelläre Trakt (die Kleinhirnseitenstrangbahn). Er sendet propriozeptive Signale des Bewegungsapparates an das Kleinhirn weiter. Sein Ursprung liegt in den Laminae V – VII des Hinterhorns. Diese Signale sind wichtig für die Funktion des Kleinhirns als wesentliches Zentrum für Koordination.

Es sind noch weitere absteigende Bahnen bekannt, welche auf die Zellen der sensorischen Trakte projizieren und somit auf die Übertragung von Schmerzen Einfluss nehmen können. Dies wird übermittelt von Serotonin, Noradrenalin (Trepel 2017) und Dopamin (Watson et al. 2009). Der Ursprung dieser Bahnen liegt in den Raphekernen (serotonerg), dem Nucleus coeruleus (noradrenerg) (Trepel 2017) und in Teilen des Hypothalamus und Thalamus (dopaminerge A11 Zellen) (Watson et al. 2009). Die Raphekerne und der Nucleus coeruleus liegen in der Formatio reticularis des Hirnstammes (Trepel 2017).

**Tabelle 1: Trakte des Rückenmarks.** Eine Zusammenfassung der Trakte des Rückenmarks mit deren prominenten Transmittersubstanzen und Funktionen. (<sup>1</sup>Du Beau et al. 2012, <sup>2</sup>Trepel 2017, <sup>3</sup>Schmidt 2010, <sup>4</sup>Kim et al. 2017, <sup>5</sup>Watson et al. 2009, <sup>6</sup>Sharples et al. 2014, <sup>7</sup>Broman 1994, <sup>8</sup>Paxinos 2015, <sup>9</sup>Kandel et al. 2000).

	Trakt	Transmitter	Funktionen
<b>Absteigend</b>	<b>Kortikospinal</b>	Glutamat <sup>1</sup>	Feinmotorik der distalen Extremitäten <sup>2</sup>
	<b>Rubrospinal</b>	Glutamat <sup>1</sup>	Kontrolle der Körperhaltung <sup>3</sup> ; Tonus der distalen Extremitäten <sup>2</sup>
	<b>Vestibulospinal</b>	Glutamat <sup>1</sup>	Kontrolle der Körperhaltung <sup>3</sup> ; grobe Bewegung des Rumpfs und proximalen Teils der Extremitäten <sup>2</sup>
	<b>Retikulospinal</b>	Glutamat und Glycin oder GABA <sup>1</sup>	Initiierung der Bewegung und Kontrolle der Geschwindigkeit der Bewegung; Kontrolle der Körperhaltung <sup>3</sup> ; grobe Bewegung des Rumpfs und proximalen Teils der Extremitäten <sup>2</sup>
	<b>Coeruleospinal</b>	Noradrenalin <sup>2,4</sup>	Modulation des Schmerzes <sup>2</sup> ; Modulation der Lokomotorik <sup>4</sup>
	<b>Raphespinal</b>	Serotonin <sup>2,4,5</sup>	Modulation des Schmerzes <sup>2</sup> ; Modulation der Lokomotorik <sup>5</sup>
	<b>A11 Zellgruppe</b>	Dopamin <sup>5,6</sup>	Modulation des Schmerzes <sup>5</sup> ; Modulation der Lokomotorik <sup>6</sup>
<b>Aufsteigend</b>	<b>Fasciculus cuneatus und Fasciculus gracilis (Hinterstrang)</b>	Glutamat, Substanz P, CGRP <sup>7</sup>	Tastsinn, feine Berührungs- und Vibrationswahrnehmung <sup>2</sup> ; Leitung propriozeptiver Signale der Muskeln und Gelenke <sup>2</sup>
	<b>Spinothalamisch (Vorderseitenstrang)</b>	Substanz P <sup>5</sup> ; Glutamat und noch weitere Neuropeptide <sup>8</sup>	Schmerz, Temperatur, grobe Druck- und Tastempfindung <sup>2</sup>
		Glutamat, Substanz P, CGRP <sup>9</sup>	Sensibles 1. Neuron auf 2. Neuron im Rückenmark <sup>9</sup>
<b>Spinozerebellär (Kleinhirnseitenstrang)</b>	Glutamat <sup>3</sup>	Leitung propriozeptiver Signale der Muskeln und Gelenke ans Kleinhirn; wichtig für Koordination <sup>2</sup>	

Neben dem Einfluss dieser Bahnen auf die Schmerzwahrnehmung wird von ihnen ebenfalls die Motorik moduliert. Sie sollen die Erregbarkeit der Motoneurone herabsetzen und dadurch die Reaktionsfähigkeit verändern (Kandel et al. 2000).

Neben den beschriebenen Trakten gibt es weitere Fasern im Rückenmark, die propriospinalen Neurone. Dies sind Interneurone, die entweder innerhalb eines Segmentes (*short propriospinale interneurons*) oder aber auch über Segmente hinweg Verbindungen schaffen (*long propriospinal interneurons*). Durch sie werden sogenannte Mustergeneratoren (*central pattern generator*) bzw. Reflexe vermittelt. Die lokomotorischen Mustergeneratoren führen zu einer automatisierten rhythmischen, alternierenden Lokomotorik (Kandel et al. 2000). So kann zum Beispiel ein Huhn, dessen Kopf abgetrennt wurde und deren Kontrolle von kortikalen Bereichen fehlt, immer noch weiterlaufen. Es wurde festgestellt, dass über eine passive Bewegung des Beines in Katzen nach einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks Schreitbewegungen ausgelöst werden können, was die Rolle von propriozeptiven Reflexen nahelegt. Die Mustergeneratoren werden durch den sensorischen Eingang stark moduliert. Die Initiierung der Lokomotorik erfolgt normalerweise über die Aktivierung der MLR (*mesencephalic locomotor region*). Diese projiziert in die Formatio reticularis, von wo glutamaterge Neurone im retikularen Trakt zu den Mustergeneratoren im Rückenmark verlaufen und so letztendlich die Lokomotorik auslösen (Kandel et al. 2000). Neurotransmitter, die unter Beteiligung propriospinaler Schaltkreise während der Lokomotorik eine Schlüsselrolle spielen sind vor allem Serotonin (5HT), N-Methyl-D,L-Aspartat (NMDA) und Dopamin (Conta und Stelzner 2009).

### 2.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Diagnose einer kompletten Querschnittlähmung ist gravierend, denn es gibt immer noch keine Therapien, die zur vollständigen Genesung des Patienten führen. Die Motorik und Sensorik sind gestört, wodurch es zu Lähmungen und Beeinträchtigungen der Sensibilität kommt. Bei einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks gehören zu den wesentlichen Problemen die Ausbildung einer Regenerationsbarriere und das Fehlen zellulärer Leitstrukturen. Der Läsionsbereich beinhaltet vermehrt inhibitorische Chondroitinsulfat Proteoglykane (CSPGs), die das Auswachsen von Axonen beeinträchtigen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die elektrophysiologische Analyse nach Anwendung einer neuartigen Therapie im Rattenmodell, bei der das Läsionsareal nach Rückenmarkverletzung durch ein mechanisches Mikrokonnectorsystem (mMS) überbrückt wird. Voraussetzung dafür ist zunächst die Etablierung einer modifizierten Methode zur elektrophysiologischen Messung von Motorik und Sensorik. Im Anschluss wird neben dem mMS in einem kombinatorischen Ansatz das Enzym Chondroitinase ABC (ChABC) getestet, das CSPGs spaltet, wodurch sie weniger inhibitorisch auf regenerierende Axone wirken.

In dieser Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Führt die Behandlung mit dem mMS zur motorischen und sensorischen Rekonnektivität?
2. Lässt sich eine Korrelation zwischen motorischer Rekonnektivität und funktionaler Erholung finden?
3. Führt die Kombination von mMS und ChABC zu einem synergistischen Therapieeffekt auf Axonregeneration und Lokomotorik?

Im Folgenden werden die Materialien und Methoden dazu aufgeführt, es erfolgt die Darstellung der Ergebnisse, die in der darauffolgenden Diskussion näher erläutert und im Kontext der Literatur diskutiert werden. Zu guter Letzt werden in einer Schlussfolgerung die Ergebnisse zu den hier beschriebenen Fragestellungen in Bezug gesetzt und ein kurzer Ausblick gegeben.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

Es wurden adulte weibliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 250 g – 320 g verwendet. Die Ratten wurden von JANVIER LABS bezogen und in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben in Düsseldorf (ZETT) bei einer Temperatur von 21 °C und Luftfeuchtigkeit von 50 % ± 5 % in Gruppenkäfigen gehalten. Den Ratten stand keimfreies Wasser und pelletiertes Trockenfutter *ad libitum* zur Verfügung. Der Tag-Nacht-Zyklus betrug 12 Stunden. Alle Experimente wurden nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (LANUV - Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, NRW). Die Zusammensetzung der experimentellen Gruppen kann der Tabelle 2 entnommen werden.

**Tabelle 2: Zusammensetzung der experimentellen Gruppen.** \*Verluste entstanden entweder durch Automutilation oder durch nicht auswertbares Gewebe, genaueres ist dem Ergebnis- und Methodenteil zu entnehmen. mMS = mechanisches Mikrokonnektorsystem, TX = komplette Transsektion des Rückenmarks, ChABC = Chondroitinase ABC, Pen = Penicillinase.

	Gruppe	Tieranzahl/Gruppe (nach Verlusten*)	Endzeitpunkte
<b>Langzeitstudie mMS</b>	TX + mMS	N = 5 (3)	5 bis 6 Monate
	TX	N = 5 (4)	
<b>Kurzzeitstudie mMS + ChABC</b>	TX + mMS	N = 5	5 Wochen
	TX + mMS + ChABC Injektion kaudal und rostral des mMS	N = 5 (4)	
	TX + mMS + Pen Injektion kaudal und rostral des mMS	N = 5 (4)	
	TX + mMS + ChABC Applikation via mMS ins Lumen	N = 5	
	TX + mMS + Pen Applikation via mMS ins Lumen	N = 5 (4)	

## 3.2 Puffer, Lösungen und Antikörper

### 3.2.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen/Reagenzien	Zusammensetzung/Hersteller
Kodan® Tinktur forte, farblos, Hautantiseptikum	Schülke & Mayr GmbH
Bepanthen® Augensalbe	Bayer AG
Rimadyl®-Lösung	Rimadyl® (50 mg/ml Carprofen, Pfizer Inc.) in isotonischer Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG) im Verhältnis 1:20
Gelastyp® resorbierbarer hämostatischer Gelatineschwamm	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Ferrosan Medical Devices A/S
Histoacryl® Gewebekleber	B. Braun Melsungen AG
Paladur®	Paladur® Pulver (Kulzer GmbH) wurde in ein Gefäß vorgelegt und Paladur® Lösung (Kulzer GmbH) hinzugeben, sodass eine zähe Masse entstand. Diese konnte verwendet werden. Die Aushärtung erfolgte in ca. 10 Minuten.
Phosphatpuffer (PB), 0,2 M, pH 7,4	2000 ml destilliertes (dest.) H <sub>2</sub> O + 12 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (Merck KGaA) + 45,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wasserfrei (Merck KGaA)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 10-fach, pH 7,4	0,5 L dest. H <sub>2</sub> O + 0,5 L 0,2 M PB + 90 g NaCl
BSA ( <i>in vivo</i> )	Probumin® Bovine Serum Albumin, Millipore Corporation
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 0,02 M mit 0,1 % BSA, pH 7,1, steril, für <i>in vivo</i> Anwendung	60 ml PBS (0,1 M) wurden mit 240 ml dest. H <sub>2</sub> O verdünnt. Der pH-Wert wurde mit einem Tropfen 5 M NaOH auf pH 7,1 eingestellt. Von diesem Puffer wurden 50 ml mit 0,05 g BSA ( <i>in vivo</i> ) versetzt und steril filtriert. Die Penicillinase Lösung wurde direkt angesetzt und für die ChABC Lösung wurde der Puffer aliquotiert und bis zur Weiterverwendung für fünf Tage bei 4°C gelagert.

### 3 Materialien und Methoden

Chondroitinase ABC Lösung (1 U/ $\mu$ l)	Chondroitinase ABC (aus <i>Proteus vulgaris</i> ) wurde als Lyophilisat [AMS Biotechnology (Europe) Limited, AMS.E1028-02, Lot-Nr. CFP-0018, Analysezertifikat siehe Anhang A.1] in 36 $\mu$ l sterilem PBS (0,02 M mit 0,1 % BSA, pH 7,0) gelöst, um eine Lösung von 1 U/ $\mu$ l zu erhalten. Die ChABC Lösung wurde in passende Aliquote portioniert (ein Aliquot pro OP Tag) und bei -20°C gelagert. Die OPs erfolgten in den vier aufeinanderfolgenden Tagen unmittelbar nach der Rekonstitution.
Penicillinase Lösung (Kontrolle für ChABC, daher angepasst an ChABC => 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	In dem Lyophilisat der Chondroitinase ABC (ChABC) waren 17,89 $\mu$ g ChABC was einer Unit von 3,6 entsprach. Somit waren in der ChABC Lösung 0,5 $\mu$ g ChABC pro $\mu$ l. Um den gleichen Proteingehalt an Penicillinase zu erhalten wurden die 2,3 mg des Penicillinase Stocks in 4600 $\mu$ l sterilem PBS (0,02 M mit 0,1 % BSA, pH 7,1) gelöst. Penicillinase (aus <i>Bacillus cereus</i> ) wurde als Lyophilisat (Sigma-Aldrich, P0389-1KU) bezogen.
Paraformaldehydlösung (PFA), 4 % pH 7,4	40 g PFA (Paraformaldehyd; Merck KGaA, 1.04005) wurde in 250 ml dest. H <sub>2</sub> O gegeben. Fünf Tropfen 5 M NaOH wurden hinzugefügt und auf 60 °C erhitzt. Als die Lösung klar war wurde sie filtriert und zu 250 ml H <sub>2</sub> O und 500 ml 0,2 M PB gegeben. Der pH-Wert wurde kontrolliert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.
Natrium-Citrat-Puffer, 10 mM, pH 8,5	2.94 g Tri-Natrium-Citrat Dihydrat + 1000 ml H <sub>2</sub> O, der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt
Gelatine Lösung, 12 % mit 0,1 % Natriumazid	12 g Gelatine (Difco Laboratories Inc.) wurden in 100 ml 0,1 M PB unter Wärmezufuhr gelöst (nicht gekocht). Die Lösung wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Es wurden 100 mg Natriumazid zugefügt.
Saccharose Lösung, 30 % mit 0,1 % Natriumazid	30 g Saccharose wurden zu 100 ml mit 0,1 M PB aufgefüllt. 100 mg Natriumazid wurden hinzugefügt und gerührt bis alles gelöst war.
BSA für Immunhistochemie	Albumin Fraktion V $\geq$ 98 %, pulv., für die Molekularbiologie, Carl Roth GmbH + Co. KG
DS (Eselserum)	Sigma-Aldrich Corporation
Triton X-100, 10 %	Sigma-Aldrich Corporation
DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol)	1:10000 (Roche Diagnostics GmbH) in PBS
Sudan Black	Fluka
Immu-Mount™	Thermo Fisher Scientific Inc.

### 3.2.2 Antikörper

Tabelle 4: Primärantikörper

Primär-antikörper	Wirt	Antigen, Antikörperart	Konzentration	Hersteller
anti-Serotonin (5HT)	Kaninchen	Serotonin (5HT = 5-Hydroxytryptamin), polyklonal	1:40	BioLogo, SE-100
anti-TUJ1	Maus	<i>Neuronal class III <math>\beta</math>-tubulin</i> (TUJ1), monoklonal	1:1000	Covance, MMS-435P
anti-TH	Kaninchen	Tyrosinhydroxylase, polyklonal	1:750	Abcam, ab112
anti-CGRP	Ziege	<i>Calcitonin gene-related peptide</i> , polyklonal	1:1500	AbD Serotec, 1720-9007
anti-GFAP	Maus	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (GA5), monoklonal	1:1000	Millipore, MAB3402

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Wirt	Konzentration	Hersteller
anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488	Esel	1:500	Invitrogen Molecular Probes, A-21206
anti-Maus Alexa Fluor® 594	Esel	1:500	Invitrogen Molecular Probes, A-21203
anti-Ziege Alexa Fluor® 594	Esel	1:500	Invitrogen Molecular Probes, A-11058
anti-Maus Alexa Fluor® 647	Esel	1:500	Invitrogen Molecular Probes, A-31571

### 3.3 Operationsprotokolle

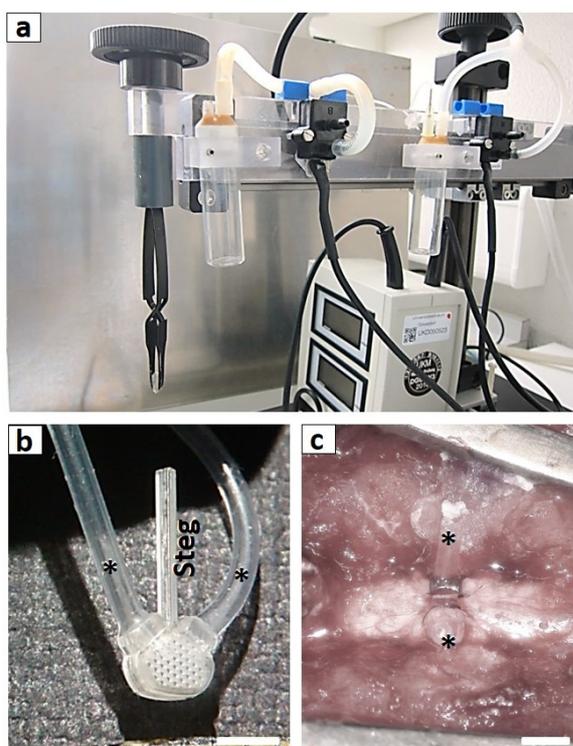
In dieser Studie wurde das Modell der Komplettläsion des Rückenmarks in Höhe des Thorakalwirbels 8 (Th8) verwendet. Anschließend erfolgte die Implantation des mechanischen Mikrokonnectorsystems (mMS) (Brazda et al. 2013; Brazda et al. 2016). Als Kontrolle diente eine Komplettläsion des Rückenmarks, ohne Implantation des mMS. Zur Behandlung der Läsionsnarbe wurde in einem zweiten kombinatorischen Versuchsansatz das Enzym Chondroitinase ABC zusätzlich zur Implantation des mMS verwendet (mMS + ChABC). Als Kontrolle diente hierbei die Gabe von Penicillinase (mMS + Pen). Im Folgenden werden die einzelnen Operationen erläutert.

#### 3.3.1 Komplettläsion des Rückenmarks

Die Operation erfolgte unter Inhalationsnarkose mittels Isofluran (2 – 3 %) in einem O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>O Gemisch (0,7:1,4 Liter/Minute). Die Ratte wurde zunächst gewogen und subkutan (s.c.) 0,5 ml einer Rimadyl®-Lösung (5 mg/kg des Schmerzmittels Carprofen in isotonischer Kochsalzlösung) injiziert. Anschließend wurde sie vom Nacken bis zur Hüfte rasiert und die Haut mit Kodan® Antiseptikum desinfiziert. Um einer Unterkühlung vorzubeugen, wurde die Ratte auf einem Heizkissen (37 °C) platziert. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen® Augensalbe bedeckt. Wenn kein Zwischenzehenreflex mehr vorhanden war, konnte mit der Operation begonnen werden. Die Haut wurde durch einen Schnitt auf Höhe der Wirbel Th5 bis Th11 geöffnet. Es erfolgten je ein Schnitt links und rechts parallel zur Wirbelsäule von den Wirbeln Th6 bis Th10. Mit einem Spreizer wurden die Muskeln von der Wirbelsäule gespreizt. Bindehaut und Muskelgewebe wurde an den Wirbeln Th7 bis Th9 entfernt. Es erfolgte eine Laminektomie an Th8 und Th9, wobei zunächst die Dornfortsätze und danach vorsichtig die Wirbelbögen mit einer Rongeur entfernt wurden. Danach wurde der Körper der Ratte an dem Wirbel Th7 angehoben und fixiert um störende Atembewegungen zu minimieren. Unter binokularer Beobachtung wurde die Dura mittig, transversal mittels einer Augenschere geöffnet. Mit Hilfe eines Rückenmarkhakens wurde das Rückenmark ca. 2 mm aus der Dura heraus angehoben und mittels einer spitzen Schere komplett durchtrennt. Es wurde mit zwei Spateln die Rückenmarkstümpfe etwas auseinandergehalten und kontrolliert ob die komplette Durchtrennung des Rückenmarks erfolgreich war. Überschüssiges Blut wurde zur besseren Sicht mit Watte entfernt. Starke Blutungen wurden mit einem resorbierbaren Gelatineschwamm (Gelastyp®) und/oder kalter Kochsalzlösung gestillt. Die Dura wurde mit 3 Knoten wieder zusammengenäht (Ethilon 9-0 Faden, Ethicon EH7448G). Das Rückenmark wurde mit Fettgewebe aus dem Nacken bedeckt und mit einem Tropfen Gewebekleber (Histoacryl®) fixiert. Abschließend wurden die Muskeln (Vicryl 4-0 Faden, Ethicon V494H) und die Haut (Ethilon 4-0 Faden, Ethicon EH7824H) wieder vernäht. Zum Flüssigkeitsausgleich wurden 5 ml isotonischer Kochsalzlösung s.c. gespritzt.

#### 3.3.2 Implantation des mechanischen Mikrokonnektorsystems

Zur Adaptation der zwei Stümpfe nach einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks wurde das mechanische Mikrokonnektorsystem (mMS) zwischen die entstandenen Rückenmarkstümpfe implantiert (nach Brazda et al. 2013, ein Video dazu siehe Brazda et al. 2016). Dazu wurde das mMS mit einer dafür gebauten Vorrichtung stereotaktisch in die Läsionsstelle eingeführt (siehe Abbildung 8). Die Vorrichtung bestand aus einer Kreuzpinzette, die das mMS an seinem Steg festhielt und Justierträgern, womit eine Positionierung des mMS mechanisch vorgenommen werden konnte. So erfolgte eine genaue Platzierung des mMS in die Läsionsstelle. Die zwei Schläuche des mMS wurden lateral der Wirbelsäule zur Stabilisierung an die nächstliegenden Muskeln genäht. Der Steg des mMS wurde entfernt. Die Dura wurde unter binokularer Beobachtung mit 2 Knoten über dem mMS vernäht (Ethilon 9-0 Faden, Ethicon EH7448G).



**Abbildung 8: Implantation des mMS.** Mit einer eigens dafür vorgesehenen Apparatur (a) wurde das mechanische Mikrokonnektorsystem (b) zwischen die Stümpfe des komplett durchtrennten Rückenmarks implantiert (c). Sternchen = Schläuche. Maßstab = 2 mm.

Zur besseren Abdichtung wurde Fettgewebe aus dem Nacken über das mMS und das Rückenmark gelegt. Ein Schlauch des mMS wurde abgeklemmt und der andere mit dem Unterdruckgerät verbunden. Ein Unterdruck von 250 – 350 mbar wurde für 10 Minuten angelegt. Dadurch wurde das Rückenmark in das Lumen des mMS ge-

saugt und war bei der erfolgreichen Anwendung leicht im mMS sichtbar (siehe auch schematische Darstellung in Abbildung 2f – h). Nachdem die Druckwerte wieder auf null gesunken waren, wurden die Schläuche knapp am mMS abgeschnitten, das Nahtmaterial an den nächstliegenden Muskeln entfernt, das Rückenmark vollständig mit Fettgewebe aus dem Nacken bedeckt und mittels Gewebekleber (Histoacryl®) fixiert. Abschließend wurden Muskeln (Vicryl 4-0 Faden, Ethicon V494H) und Haut (Ethilon 4-0 Faden, Ethicon EH7824H) vernäht. Zum Flüssigkeitsausgleich wurden 5 ml isotonische Kochsalzlösung s.c. gespritzt.

#### 3.3.3 Operationen für elektrophysiologische Messungen

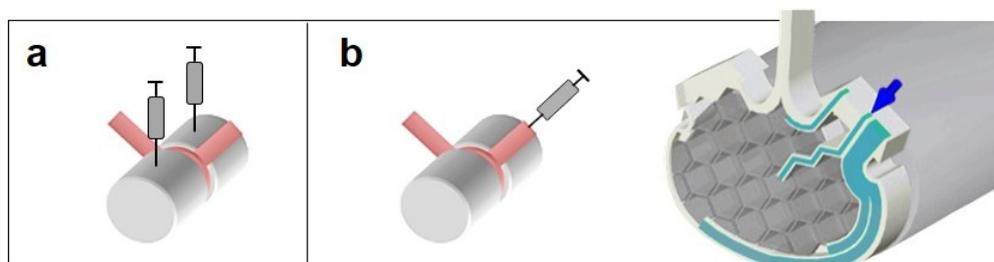
Im Vorfeld der elektrophysiologischen Messungen wurden Schrauben in den Schädel der Ratten implantiert. Die elektrophysiologischen Messungen und dazugehörige Operationen basieren mit einigen Änderungen auf den Arbeiten von Schlag et al. (2001). Die Implantation der Schrauben erfolgte unter Injektionsnarkose unter Gabe von 55 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 5 mg/kg Körpergewicht Xylazin intraperitoneal (i.p.) (im Fall eines zusätzlichen Tieres 65 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin, i.p.). Um einer Unterkühlung vorzubeugen, wurde die Ratte auf einem Heizkissen (37 °C) platziert und der Kopf in einem Stereotaxiegerät fixiert. Der Schädel wurde rasiert und die Haut mit Kodan® Antiseptikum desinfiziert. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen® Augensalbe bedeckt. Die Haut wurde durch einen Schnitt an der Schädelmittellinie etwas neben der Sagittalnaht geöffnet. Sie wurde mit einem Spreizer aufgehalten und das Gewebe über dem Schädel entfernt. Mittels eines Stereotaxiegerätes wurden die Koordinaten zur Implantation der Schrauben ermittelt (kontralaterale-Schraube: 2,4 mm lateral, 2 mm posterior zu Bregma, 1 mm tief; posteriore-Schraube: 0 mm lateral, 1,5 mm posterior zu Lambda, 1 mm tief. Zusätzliches Tier: kontralaterale-Schraube: 2 mm lateral, 2,5 mm posterior zu Bregma, 1 mm tief; posteriore-Schraube: 0 mm lateral, 1,5 mm posterior zu Lambda, 1,5 mm tief). Die Koordinaten der posterioren-Schrauben und die Koordinate der kontralateralen-Schraube bei dem zusätzlichen Tier wurden gewählt basierend auf den Angaben von Schlag et al. (2001). Die Koordinate der kontralateralen-Schraube der anderen Tiere wurde leicht verändert und gewählt basierend auf der Position des somatosensorischen und motorischen Kortex des rechten Hinterbeines nach Paxinos und Watson (2007) sowie Hall und Lindholm (1974). Gewählt wurde diese neue Koordinate, da sie genauer über dem somatosensorischen Bereich des Hinterbeines liegt. Dadurch könnte die Messung von SSEPs eventuell besser gelingen. An den Koordinaten wurde mit einem Bohrer mit einem Durchmesser von 1 mm durch die Schädeldecke gebohrt. Dann wurden kleine Schrauben (Schaft-Durchmesser = 1,15 – 1,3 mm) ca. 1 mm tief eingedreht. Abschließend wurde die Haut (Ethilon 4-0 Faden, Ethicon EH7824H) vernäht. Zum Flüssigkeitsausgleich wurden 5 ml isotonische Kochsalzlösung s.c. gespritzt.

#### 3.3.4 Retranssektion

Drei Tage vor Perfusion der Tiere erfolgte eine Retranssektion des Rückenmarks 4 mm kaudal der vorangegangenen Läsion. Die Operation erfolgte mit Ausnahme der Position der Transsektion wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Die Haut wurde durch einen Schnitt auf Höhe der Wirbel Th6 bis Th12 geöffnet. Es erfolgten je ein Schnitt links und rechts parallel zur Wirbelsäule von den Wirbeln Th6 bis Th12. Mit einem Spreizer wurden die Muskeln von der Wirbelsäule gespreizt. Bindehaut und Muskelgewebe wurden vorsichtig im Bereich der vorherigen Läsion entfernt. Es erfolgte eine Laminektomie an den Wirbeln Th10 und Th11. Danach wurde der Körper der Ratte an dem Wirbel Th7 angehoben und fixiert um störende Atembewegungen zu minimieren. Unter binokularer Beobachtung wurde die Dura 4 mm kaudal der vorherigen Läsion, mittig, transversal mittels einer Augenschere geöffnet. Mit Hilfe eines Rückenmarkshakens wurde das Rückenmark ca. 2 mm aus der Dura heraus angehoben und mittels einer spitzen Schere komplett durchtrennt. Es wurde mit zwei Spateln die Rückenmarkstümpfe etwas auseinandergehalten und kontrolliert ob die erneute komplette Durchtrennung des Rückenmarks erfolgreich war. Überschüssiges Blut wurde zur besseren Sicht mit Watte entfernt. Starke Blutungen wurden mit einem resorbierbaren Gelatineschwamm (Gelastyp<sup>®</sup>) und/oder kalter Kochsalzlösung gestillt. Das Zusammennähen und die weitere Versorgung des Tieres erfolgten wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

#### 3.3.5 Applikation von Substanzen

Die Applikation der Chondroitinase ABC (ChABC) und Penicillinase (Kontrolle) erfolgte auf zwei unterschiedliche Arten. Zum einen durch Injektionen in das Rückenmark kaudal und rostral der Läsion. Zum anderen über das interne Mikrokanalsystem des mMS (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Verschiedene Applikationsweisen der Substanzen ins Rückenmark.** Chondroitinase ABC und dessen Kontrolle, die Penicillinase, wurden entweder kaudal und rostral zum mMS (rot) injiziert (a) oder über das interne Mikrokanalsystem des mMS direkt in die Läsion gebracht (b). Schema in Anlehnung an Brazda et al. (2013).

Bei beiden Applikationsweisen wurden ChABC oder Penicillinase akut, unmittelbar nach der Implantation des mMS injiziert. Die Injektionsmethoden wurden an die Arbeit von Valentina Antoni (2012) angelehnt.

### 3.3.5.1 Applikation von Substanzen über das Mikrokanalsystem des mMS

Nach dem Einsetzen des mMS in das Rückenmark, als die Druckwerte wieder auf null gesunken waren (siehe Abschnitt 3.3.2), wurde das Fettgewebe über dem mMS entfernt. Der vordere Schlauch, der mit dem Unterdruckgerät verbunden war, wurde knapp über dem mMS abgeschnitten. Der hintere Schlauch wurde 1,5 bis 2 cm hinter dem mMS abgeschnitten. Die Applikation von 1  $\mu$ l Substanz (entweder ChABC oder Penicillinase; 0,1 U/ $\mu$ l) erfolgte wie nachfolgend beschrieben: Es wurden zunächst 5  $\mu$ l Olivenöl und dann 1,5  $\mu$ l der Substanz in eine 10  $\mu$ l Hamiltonspritze gezogen. Das Olivenöl diente hierbei nur als Sichtkontrolle und wurde nicht mit injiziert. Mit einem Stereotaxiegerät wurde die Spritze in Position gebracht, in das hintere Schlauchende eingeführt und der Schlauch-Spritzenübergang mit heißem Wachs versiegelt. Als Schutz des Tieres wurde zuvor ein Tuch unter die Verklebungsstelle gelegt. Dann wurde 1  $\mu$ l der Lösung appliziert. Die Spritze wurde vorsichtig gelöst, der Schlauch kürzer geschnitten, das Nahtmaterial an den nächstliegenden Muskeln entfernt und beide verbliebenen Enden der Schläuche des mMS erst mit etwas Blut und dann mit Gewebekleber versiegelt (siehe Abbildung 8c). Das Rückenmark wurde wie in den anderen Rückenmarkoperationen vollständig mit Fettgewebe aus dem Nacken bedeckt und fixiert. Das Zusammennähen und die weitere Versorgung des Tieres erfolgten ebenfalls wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

### 3.3.5.2 Injektion von Substanzen kaudal und rostral der Läsion

Nach der Implantation des mMS, als die Druckwerte wieder auf null gesunken waren (siehe Abschnitt 3.3.2), wurde das Fettgewebe über dem mMS entfernt. Beide Schläuche des mMS wurden knapp über dem mMS abgeschnitten, das Nahtmaterial an den nächstliegenden Muskeln entfernt und die beiden verbliebenen Enden der Schläuche des mMS erst mit etwas Blut und dann mit Gewebekleber versiegelt (Abbildung 8c). Die Applikation von je 1  $\mu$ l Substanz (entweder ChABC oder Penicillinase; 0,1 U/ $\mu$ l) kaudal und rostral des mMS erfolgte wie nachfolgend beschrieben: Es wurden zunächst 5  $\mu$ l Olivenöl und dann 2,5  $\mu$ l der Substanz in eine 10  $\mu$ l Hamiltonspritze mit aufgesetzter Glaskapillare gezogen. Das Olivenöl diente hierbei nur als Sichtkontrolle und wurde nicht mit injiziert. Mit einem Stereotaxiegerät wurde die Spritze in Position gebracht. Die Injektion der Substanz (ChABC oder Penicillinase) erfolgte in 1 mm Abstand kaudal und rostral der Läsion und medial des Rückenmarks. Die Injektionstiefen betragen 0,6, 1,0, 1,4, und 1,8 mm. Es wurden je 0,25  $\mu$ l pro Injektionstiefe injiziert und 1 Minute bis zum nächsten Injektionsschritt gewartet. Nach erfolgreicher Injektion

sowohl kaudal als auch rostral wurde das Rückenmark vollständig mit Fettgewebe aus dem Nacken bedeckt und fixiert. Abschließend erfolgten das Zusammennähen und die weitere Versorgung des Tieres wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

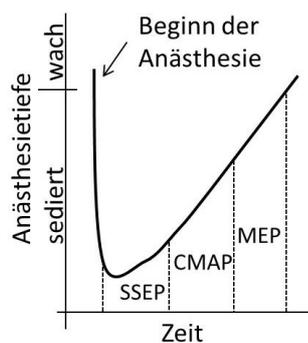
#### 3.3.6 Tierversorgung

Bei den Operationen am Rückenmark wurden den Ratten für drei Tage 0,5 ml einer Rimadyl®-Lösung (5 mg/kg des Schmerzmittels Carprofen in isotonischer Kochsalzlösung) s.c. injiziert und für eine Woche vorbeugend ein Antibiotikum (0,1 ml Baytril®, 2,5 % orale Lösung, Bayer) oral verabreicht. Außerdem wurde bei einem starken Gewichtsverlust (mehr als 20 g pro Tag) und bei Blut im Urin 5 ml isotonische Kochsalzlösung s.c. injiziert. Da die Ratten zu einer eigenständigen Entleerung der Blase nach der kompletten Läsion des Rückenmarks nicht im Stande waren, wurden die Blasen mehrmals täglich manuell entleert.

#### 3.4 Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologischen Messungen wurden im Laufe dieser Arbeit im Labor für Molekulare Neurobiologie neu etabliert und an die Messungen von Schlag et al. (2001) angelehnt. Sie erfolgten unter Injektionsnarkose durch Gabe von 55 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 5 mg/kg Körpergewicht Xylazin intraperitoneal (i.p.) (im Fall eines zusätzlichen Tieres 65 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin, i.p.). Für die elektrophysiologischen Messungen ist eine konstante Körpertemperatur wichtig, da diese Einfluss auf die Messergebnisse hat. Außerdem soll einer Unterkühlung vorgebeugt werden. Daher wurde die Ratte auf einer Wärmeplatte (37 °C, *medium heating plate with built-in RTD sensor*, 15x25 cm, World Precision Instruments) platziert, die mit einem automatischen Temperaturregler (*animal temperature controller ATC1000*, World Precision Instruments) verbunden war. Mittels einer rektalen Sonde wurde stets die aktuelle Temperatur der Ratte ermittelt und die Temperatur der Wärmeplatte automatisch angepasst. Dabei handelte es sich um eine rauscharme Apparatur mit geringer elektromagnetischer Strahlung, die für elektrophysiologische Messungen geeignet ist. Der Kopf der Ratte wurde in einem Stereotaxiegerät fixiert. Der Schädel wurde rasiert und die Haut mit Kodan® Antiseptikum desinfiziert. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen® Augensalbe bedeckt. Die Haut wurde durch einen Schnitt an der Schädelmittellinie etwas neben der Sagittalnaht geöffnet. Sie wurde mit einem Spreizer aufgehalten und das Gewebe über dem Schädel entfernt. Es wurde darauf geachtet, dass die Schrauben frei von Gewebe waren und kein Kontakt untereinander durch Gewebeflüssigkeit zu Stande kam. Fand eine Ablösung der Schrauben aus dem Schädel statt, wurde das Loch mittels eines Prothesenkunststoffes (Paladur®) verschlossen. Unter Bestimmung der entsprechenden Koordinaten wurde erneut ein Loch gebohrt und die Schraube wieder in den Schädel eingedreht.

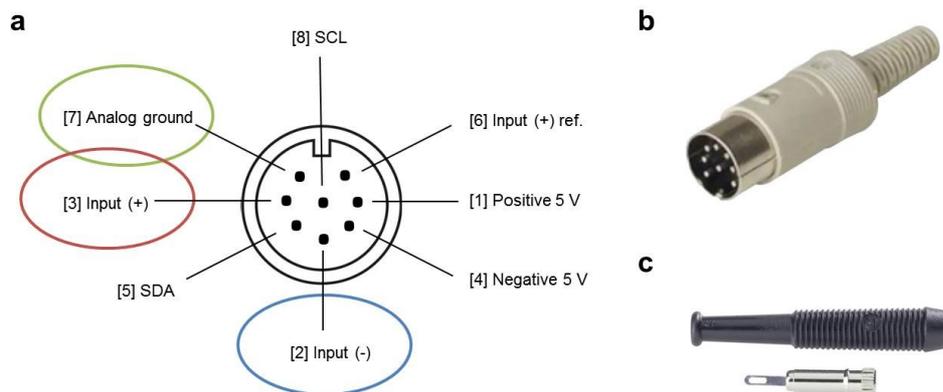
Es wurden immer zuerst SSEPs (somatosensorische Potentiale), dann CMAPs (Muskelsummenaktionspotentiale) und schließlich unter leichter Narkose MEPs (motorisch evozierte Potentiale) aufgenommen (Abbildung 10). CMAPs sind im Allgemeinen Muskelsummenaktionspotentiale die am Muskel gemessen werden (siehe auch Kapitel 2.4). In dieser Arbeit werden mit CMAPs die Signale bezeichnet, die durch eine Stimulation am Ischiasnerv ausgelöst werden. Diese Signale sind nach kompletter Durchtrennung des Rückenmarks immer noch messbar und können so für die richtige Positionierung der Ableitelektroden der MEP Messung verwendet werden. Da die Narkosetiefe die Messergebnisse beeinflussen kann (Zandieh et al. 2003), wurde stets auf diese geachtet. Beobachtet wurden Reflexe (Lid-, Korneal- und Beuge- bzw. Zwischenzehenreflex der vorderen und hinteren Extremitäten), Atmung (Tiefe und Frequenz) und Bewegung der Barthaare. Eine Messung der MEPs erfolgte erst nach Wiederauftreten dieser Reflexe, unregelmäßiger Atmung und Zucken der Barthaare. So sollte auch bei dem zusätzlichen Tier die Narkosetiefe trotz anderer Anfangsdosis mit den anderen Tieren vergleichbar sein.



**Abbildung 10: Zeitpunkte der MEP und SSEP Messungen in Abhängigkeit der Anästhesietiefe.**

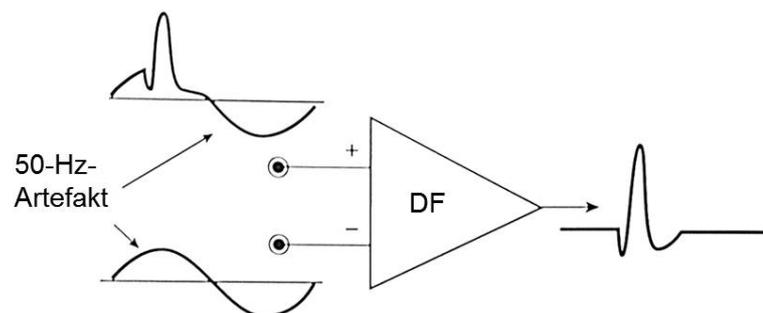
Da die Narkosetiefe die Messergebnisse beeinflussen kann (Zandieh et al. 2003), wurden immer zuerst SSEPs, dann CMAPs und zuletzt unter einer leichten Sedierung MEPs aufgenommen. Der Kurvenverlauf der Anästhesietiefe ist hier schematisch dargestellt und muss nicht dem tatsächlichen Verlauf entsprechen.

Die Messapparatur bestand aus einem Datenerfassungsgerät mit integriertem Stimulator und Verstärker (PowerLab® 26T, ADInstruments) und einem daran angeschlossenen Laptop. Die Messungen wurden mit dem Programm LabChart® (ADInstruments) gesteuert und aufgezeichnet. Für die SSEP und MEP Messungen wurden folgende Filter verwendet: *mains*-Filter (= Netzfilter, filtert alle 50-Hz-Störungen heraus) und ein Bandpassfilter von 10 – 2000 Hz. Für die CMAP Messungen wurde auch der *mains*-Filter und außerdem ein Tiefpassfilter von 2 kHz verwendet. Bei der CMAP Messung handelt es sich um eine *Single-ended* Messung, wobei die Differenz zwischen Signal und Erdungselektrode gemessen wird. Hierzu wurde der analoge Eingang am PowerLab® genutzt. Um eine Verbindung mit den Elektroden herzustellen wurde ein Adapter nach Anleitung und Rücksprache mit ADInstruments selbst zusammengebaut. Ein 8-poliger DIN-Rundstecker wurde dabei mit drei Miniatur-Laborbuchsen (Durchmesser 2 mm) über Kabel verbunden und verlötet. Ein genauer Bauplan ist der Abbildung 11 zu entnehmen. Damit konnten Plus-, Minus- und Erdungselektrode (MLA1204, ADInstruments) an den analogen Eingang des PowerLabs® angeschlossen werden.



**Abbildung 11: Bauplan 8-poliger DIN-Stecker.** Für die CMAP Messungen wurde ein Adapter für den analogen Eingang am PowerLab® hergestellt. Ein 8-poliger DIN-Stecker (b) wurde über Kabel mit je drei Miniatur-Laborbuchsen (c) nach dem Schema in (a) verbunden und verlötet. Eingänge sind: Pluselektrode = [3] *Input (+)*, Minuselektrode = [2] *Input (-)* und Erdungselektrode = *Analog ground*.

MEPs und SSEPs wurden über den Bio Amp Eingang aufgenommen. Dieser enthält einen differentiellen Eingang, wobei die Differenz zwischen positivem und negativem Eingang aufgenommen wird. Dies minimiert das sonst auftretende Rauschen. Eine Möglichkeit der Rauschunterdrückung ist das Prinzip des Differenzverstärkers. Es beruht darauf, dass die an Plus- und Minuselektrode vorliegenden Störsignale mittels Subtraktion der beiden Eingänge entfernt werden. Dadurch kommt das an der Pluselektrode zu messende Signal besser zur Darstellung (siehe Abbildung 12).



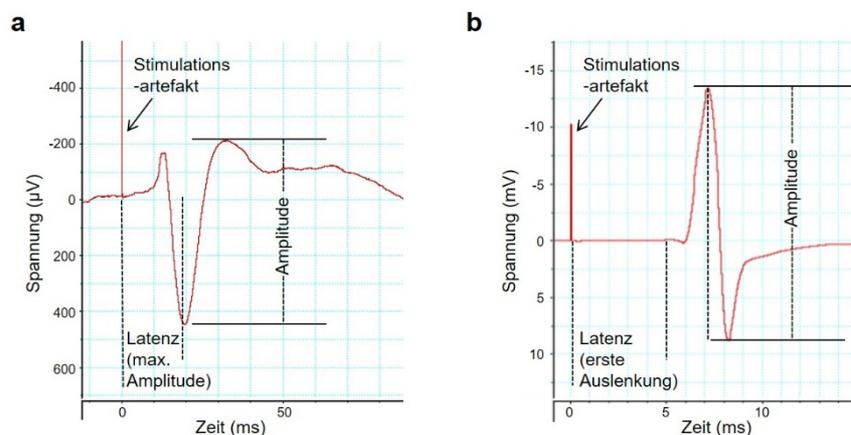
**Abbildung 12: Prinzip der Unterdrückung von Störsignalen mittels eines Differenzverstärkers.** Störsignale, hier dargestellt ein 50-Hz-Wechselstromartefakt, die an zwei Elektroden vorliegen, werden mittels Subtraktion der beiden Eingänge entfernt. Das an der Pluselektrode zu messende Signal kommt besser zur Darstellung. Differenzverstärker = DF. Abbildung nach Bischoff und Dengler (2018).

Eine Verwendung des Bio Amp Einganges war aus gerätetechnischen Gründen für die Messung der CMAPs nicht sinnvoll, denn der Bio Amp Eingang des PowerLab® 26T

hat nur höchstens einen Verstärkungsbereich von  $\pm 20$  mV, was für die CMAPs mit maximalen Amplituden von im Mittel 50 mV zu niedrig war.

Alle verwendeten Nadelelektroden sind monopolar mit einer Dicke von 29 Gauge (MLA1204, ADInstruments). Die Schrauben im Schädel wurden mittels eines Drahtes kontaktiert, der um die Schrauben gewickelt wurde. Dabei war nur der Teil des Drahtes unisoliert, der Kontakt zu den Schrauben hatte. Die Erdungselektrode, eine Nadelelektrode (MLA1204, ADInstruments), wurde subkutan am Rückgrat in Höhe der Hüfte angebracht (im Fall eines zusätzlichen Tieres s.c. am Nacken).

Für die SSEPs erfolgte die Stimulation mittels Nadelelektroden am rechten Hinterfuß, mit dem Minuspol am Fußgelenk und dem Pluspol s.c. unter dem Fuß (siehe Abbildung 14b). Es wurde ein 100  $\mu$ s langer Puls verwendet mit einer Intensität von 3 mA. Bei der Stimulation ist ein Drehen des Fußes zu beobachten. Die Aufnahme erfolgte mit dem positiven Pol an der linken, kontralateralen-Schraube (über dem somatosensorisch/motorischen Kortex des rechten Hinterbeines) und dem negativen Pol an der posterioren-Schraube (über dem Zerebellum). Die Stimuli wurden in einem Intervall von einer Minute gegeben. Zur Auswertung wurden mehrere Kurven gemittelt (15 – 23). Es wurden die Latenz, die Zeit von Gabe des Stimulus bis zum maximalen Ausschlag der Kurve und die Peak-zu-Peak Amplitude ausgewertet (Abbildung 13a).

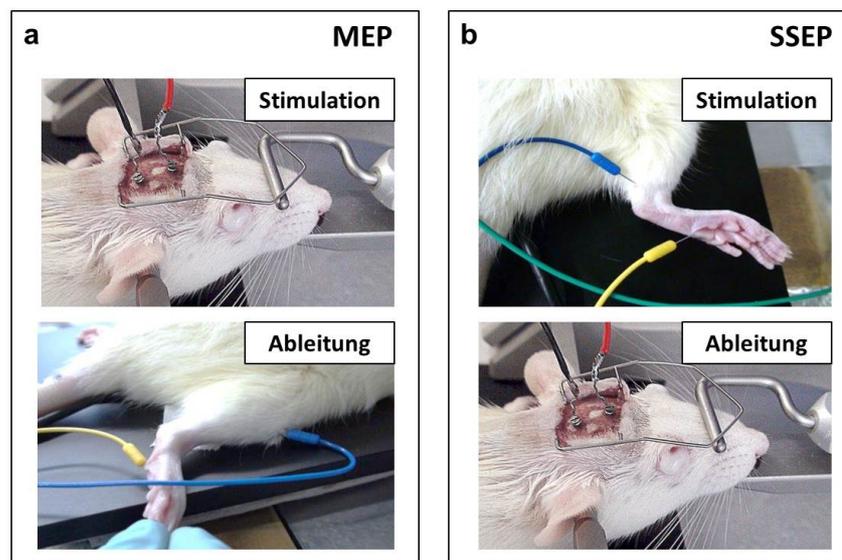


**Abbildung 13: Analysierte Parameter somatosensorisch und motorisch evozierter Potentiale.** Analysiert wurden die Parameter Latenz und Amplitude. Dabei entspricht die Amplitude der Spannungsdifferenz zwischen dem höchsten und niedrigsten gemessenen Ausschlag der Kurve. Bei den SSEPs entspricht die Latenz je analysierten Peak, der Zeit, gemessen von Gabe des Stimulus bis zum maximalen Ausschlag der Kurve (a). Bei den MEPs entspricht die Latenz, der Zeit, gemessen von Gabe des Stimulus bis zur ersten Ablenkung der Kurve (b).

Um die richtige Position der Ableitelektroden für die MEP Messung sicher zu stellen, wurde zusätzlich eine CMAP Messung durchgeführt. Dazu wurde der rechte Ischiasnerv gereizt und an derselben Stelle wie beim MEP, rechts am *musculus tibialis anterior* abgeleitet. Stimuliert wurde mit Nadelelektroden im Bereich des ertastbaren Ober-

schenkelansatzes, mit dem Pluspol proximal und dem Minuspol distal zur Körpermitte. Der Puls hatte eine Dauer von 100  $\mu$ s und die Stimulationsintensität wurde ausgehend von 0,2 mA in jeweils 0,2 mA Schritten soweit erhöht bis ein Signal gemessen wurde, das in seiner Amplitude nicht weiter zunahm.

Als die Atmung der Ratte unregelmäßiger wurde und die Barthaare anfangen zu zittern, wurde mit der MEP Messung begonnen. Dazu erfolgte die Stimulation am linken Kortex, mit dem Pluspol an der kontralateralen-Schraube und dem Minuspol an der posterioren-Schraube (siehe Abbildung 14a). Die Aufnahme der MEPs erfolgte rechts, mit Nadelelektroden an der breitesten Stelle des *musculus tibialis anterior* (Minuspol) und der Referenz s.c. unter dem Fuß (Pluspol).

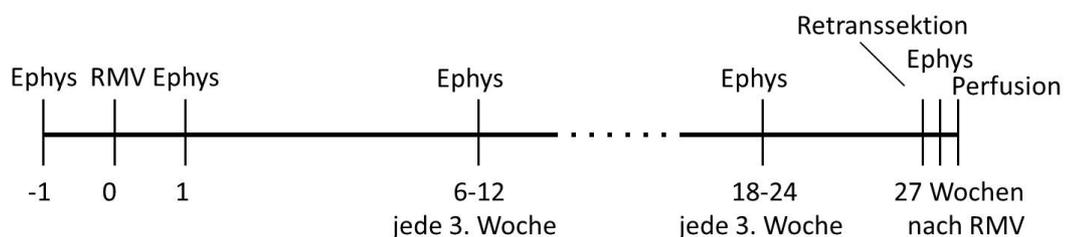


**Abbildung 14: Darstellung der elektrophysiologischen Messungen.** Bei den MEPs wird ein Stimulus am Schädel gegeben und am *musculus tibialis anterior* des kontralateralen Beins abgeleitet (a). Bei den SSEPs wird am Fußgelenk stimuliert und am kontralateralen Schädel abgeleitet (b). (SSEP = somatosensorisch evoziertes Potential, MEP = motorisch evoziertes Potential).

Die Stimulationsintensität wurde von 1 mA an sukzessive um jeweils 1 mA erhöht, bis die supramaximale Stimulationsstärke erreicht wurde. Eine supramaximale Stimulation bedeutet, dass noch bis zu einer 20 % höheren Stärke stimuliert wird, als die Stärke bei der die höchste Amplitude gemessen wurde (Milnik 2009). Da Körperbewegungen zu falsch positiven Ergebnissen (durch Bewegung der Nadelelektroden) führen können, wurden die korrespondierenden Signale nicht in die Analyse der lädierten Tiere aufgenommen. Die Signale der gesunden Tiere sind in ihrer Amplitude wesentlich größer, so dass eine kleine Bewegung der Elektroden kaum ins Gewicht fällt. Daher werden die MEPs bei diesen Stimulationsstärken mit aufgeführt. Zudem wurde hierbei der Mittelwert der Amplituden und Latenzen von mindestens drei Messungen pro Stimulationsstärke gebildet. Für den Vergleich von gesunden zu lädierten Tieren wurden

hingegen nur solche MEPs für die Auswertung herangezogen, bei denen die Stimulationsstärke mindestens 1 mA vor der Auslösung des Körperzuckens lag. Der Schwellenwert zur Erkennung von Signalen lag bei 15  $\mu$ V, um eine klare Abhebung zum Hintergrundrauschen sicher zu stellen. Stark verrauschte Messungen oder Signale, die außerhalb des eingestellten Verstärkungsbereichs lagen, flossen nicht in die Wertung mit ein. War Letzteres der Fall wurde der Verstärkungsbereich angepasst. Ausgewertet wurden unter anderem die Amplituden und Latenzen der Signale. Die Amplituden entsprechen der Potentialdifferenz vom niedrigsten zum höchsten Ausschlag des Signals. Die Latenz der MEPs beschreibt die Zeit von der Gabe des Stimulus bis zum ersten Ausschlag der Kurve (siehe Abbildung 13b). Zusätzlich wurde die Leitgeschwindigkeit des MEPs bis zum Muskel berechnet, indem die Strecke durch die Latenz geteilt wurde. Die Strecke vom Kortex zum Muskel wurde mittels eines Fadens bestimmt. Die Strecke wurde zur besseren Handhabung in drei Bereiche aufgeteilt, die anschließend addiert wurden. Die erste Distanz wurde von der kontralateralen Schraube (Pluspol) am Kortex bis zum Rücken auf Höhe der Hüfte bestimmt. Die zweite Distanz wurde von dieser Stelle bis zum Stimulationsort des CMAPs am Ischiasnerv gemessen und die dritte Distanz von dort bis zur Elektrode am Muskelbauch des *musculus tibialis anterior* ermittelt.

Der Zeitplan der elektrophysiologischen Messungen ist der Abbildung 15 zu entnehmen. Drei Tage vor der Perfusion wurde eine Retranssektion des Rückenmarks kaudal der Läsion durchgeführt. Eine letzte elektrophysiologische Messung erfolgte ein bis zwei Tage nach der Retranssektion.



**Abbildung 15: Zeitplan der elektrophysiologischen Messungen.** Zeitpunkte der elektrophysiologischen Messungen (Ephys) in Wochen vor bzw. nach einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks (RMV). Drei Tage vor der Perfusion wurde das Rückenmark 4 mm kaudal der Läsion erneut komplett durchtrennt (Retranssektion). Wiederum ein bis zwei Tage später wurden nochmals elektrophysiologische Messungen durchgeführt.

### 3.5 Lokomotorischer Test

Parallel zu den elektrophysiologischen Messungen nach mMS Implantation und zum Endzeitpunkt der kombinatorischen Behandlung von mMS und ChABC, wurde ein Test zur Überprüfung der Lokomotorik der Hinterbeine durchgeführt. Dabei wurde ein modi-

fizierter BBB (mBBB) angewandt. Dieser beruht auf dem BBB nach Basso, Beattie und Bresnahan (1995) und wurde von Antri et al. (2002) und Estrada et al. (2014) weiterentwickelt. Der BBB ist eher für partielle Läsionen geeignet und der mBBB auch für komplett lädierte Tiere. Nach Estrada et al. wurde der mBBB von Antri et al. dahingehend abgewandelt, dass im Bereich von Level 4 (plantares Aufsetzen des Hinterfußes ab einem mBBB-Wert von 11) noch weitere Veränderungen der Lokomotorik bzw. Kombinationen aufgenommen wurden (siehe Anhang A.2 für die Skala und A.3 für ein Protokoll des hier angewandten mBBBs). Kurz, bei diesem Test werden die Ratten nacheinander in ein Offenfeld gesetzt und ihre Lokomotorik gemäß einer 22 Punkte Skala bewertet. Beobachtet wurde über einen Zeitraum von 4 Minuten, die Auswertung geschah geblendet im Nachgang über eine Videoaufnahme, die aufgrund der Verblindung von der technischen Assistentin Nicole Schuster und dem Praktikanten Pedro Saraiva durchgeführt wurde. Die Skala des mBBBs kann in vier Level eingeteilt werden. Level 1 (mBBB-Wert von 0 – 1) entspricht dabei keiner Bewegung bzw. nur einer äußerst schwachen Bewegung eines Gelenkes der Hinterbeine (Hüft-, Knie oder Fußgelenk). Ein Tier zeigt nach einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks, wie hier geschehen, direkt nach der Läsion einen mBBB-Wert von 0, also keine Bewegung der Hinterbeine. In Level 2 (mBBB-Wert von 2 – 9) kommt es zu ersten rhythmischen Bewegungen der Hinterbeine und einer Platzierung des Fußes mit dessen dorsaler Seite. In Level 3 (mBBB-Wert von 10 – 11) kann das Tier die Hinterbeine alternierend bewegen, den Fuß dorsal platzieren und gelegentlich sein Gewicht unterstützen. In Level 4 (mBBB-Wert von 11 – 22) unterstützt das Tier vermehrt sein Gewicht und/oder es kann die Füße mit der plantaren Seite aufsetzen. Je nach Häufigkeit des Auftretens (gelegentlich oder frequent) und Ausmaß (Amplitude) der Bewegung gibt es enger gefasste Abstufungen in der Skala (siehe Anhang A.2).

## 3.6 Perfusion und Gewebeaufbereitung

### 3.6.1 Perfusion

Nach Gabe einer tödlichen Dosis von Pentobarbital wurden die Ratten perfundiert. Die transkardiale Perfusion wurde zunächst mit eiskaltem PBS für 2 Minuten und dann mit eiskaltem 4%igem PFA für 13 – 15 Minuten durchgeführt (Pumpleistung 25 rpm, 505S Watson-Marlowe). Danach wurde die Wirbelsäule heraus präpariert und für 24 Stunden in PFA, bei 4°C nachfixiert. Zur weiteren Bearbeitung wurde die Wirbelsäule bei 4°C in PBS gelagert.

### 3.6.2 Gewebeaufbereitung

#### 3.6.2.1 Nachfixierung und Einbettung in Gelatine

Das Rückenmark wurde explantiert und über Nacht bei 4°C in 4 % PFA nachfixiert (Tag 1). Dann wurde der Bereich des Rückenmarks mit der Läsion (ca. 1,5 cm) herausgeschnitten und unter Bewegung in 30%iger Saccharose Lösung (mit 0,1 % Natriumazid) über Nacht bei 4°C inkubiert (Tag 2). Am folgenden Tag wurde das Rückenmarkstück in 12%iger Gelatine Lösung (mit 0,1 % Natriumazid) überführt und bei 37°C über Nacht inkubiert (Tag 3). An Tag 4 wurde das Rückenmarkstück in Gelatine eingebettet. Dazu wurde zunächst etwas flüssige Gelatine in eine Plastikform gegossen und abgewartet bis sie fest wurde (ca. 15 Minuten bei 4°C oder ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur). Dann wurde das Rückenmarkstück aus der warmen Gelatinelösung genommen und nach einer kurzen Abkühlungszeit von ungefähr einer Minute auf die fest gewordene Gelatine gelegt. Danach wurde vorsichtig Tropfen für Tropfen das Rückenmarkstück mit flüssiger, abgekühlter Gelatine Lösung eingebettet. Die Form wurde dann bei -20°C für ca. 5 – 10 Minuten inkubiert, bis die Gelatine noch nicht gefroren, aber komplett fest war. Der Gelatineblock wurde vorsichtig aus der Form gelöst, getrimmt und bei 4°C über Nacht in 4%iger PFA Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Block in 30%ige Saccharose Lösung (mit 0,1 % Natriumazid) überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann konnte weiter verfahren werden, oder der Gelatineblock konnte weiterhin in 30%iger Saccharose Lösung (mit 0,1 % Natriumazid) bei 4°C gelagert werden.

#### 3.6.2.2 Schneiden am Gefriermikrotom

Auf dem Sockel des Gefriermikrotoms wurde ein zusätzlicher Sockel aus OTC (*optimal cutting temperature compound*) gebildet und nach vollständigem Festfrieren, mit dem Messer des Gefriermikrotoms (C-Messer) eine glatte Oberfläche geschaffen. Dann wurde das zuvor in 30%iger Saccharose Lösung (mit 0,1 % Natriumazid) gelagerte Gelatine-Rückenmarkstück auf den Sockel gelegt und mittels 30%iger Saccharose Lösung der untere Bereich des Blockes umbettet. Als alles komplett festgefroren war, konnte mit dem Schneiden begonnen werden. Das Rückenmark wurde bei einer Temperatur von -25 °C und einer Schnittdicke von 50 µm sagittal geschnitten. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel in PBS + 0,2 % Natriumazid überführt und abschließend bei 4 °C gelagert. Da in manchen Fällen das mMS ganz oder teilweise beim Schneiden herausbrach, fehlte in diesen Schnitten der Läsionsteil und daher konnten solche Schnitte nicht für die axonale Auswertung mit einbezogen werden.

### 3.7 Immunhistochemische Färbungen

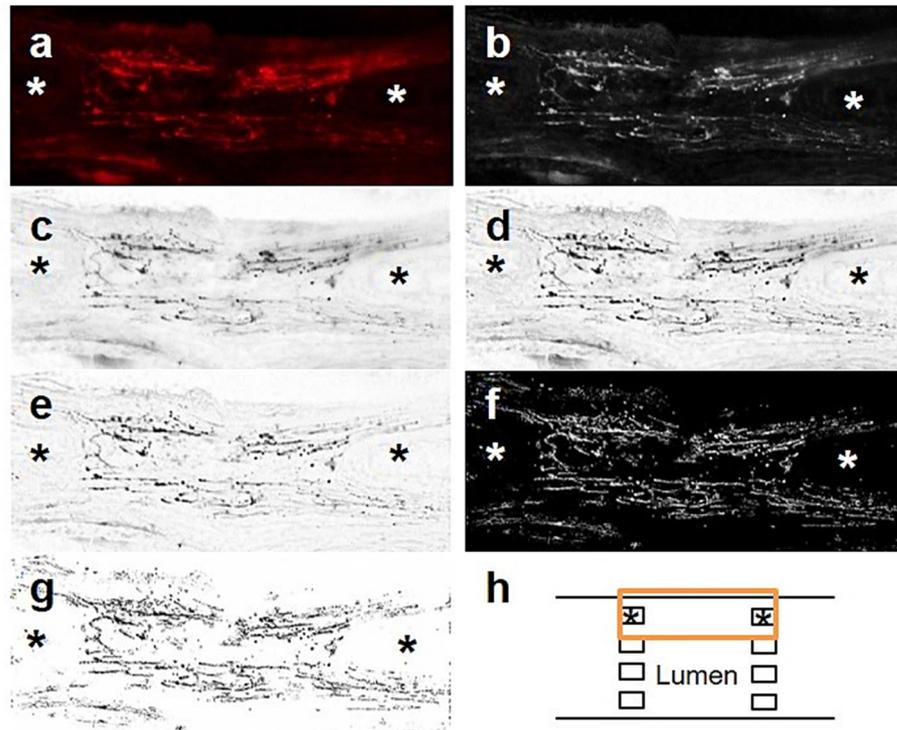
Das am Gefriermikrotom geschnittene Gewebe wurde frei schwimmend immunhistochemisch gefärbt. Es wurden Doppel- bzw. Dreifachfärbungen wie folgt durchgeführt: anti-5HT und anti-TUJ1 sowie anti-TH, anti-CGRP und anti-GFAP (verwendete Antikörper siehe Abschnitt 3.2.2). Um unspezifisches Färben auszuschließen wurden in Negativkontrollen die Erstantikörper ausgespart. Als Positivkontrolle diente der Bereich des Rückenmarks kaudal bzw. rostral der Läsion wo intakte Axone zu erwarten waren. Für die immunhistochemischen Färbungen der in Gelatine eingebetteten Gewebeschnitte wurde eine Antigendemaskierung durchgeführt. Hierzu wurde Natrium-Citrat-Puffer im Ofen auf 80 °C erwärmt. Die Gewebeschnitte wurden zwei Mal für fünf Minuten in 0,1 M PB (pH 7,4) gewaschen. Danach wurden sie in den Natrium-Citrat-Puffer überführt und im Ofen für 30 Minuten inkubiert. Dann wurde der Natrium-Citrat-Puffer mit den Gewebeschnitten aus dem Ofen genommen und für 30 Minuten ruhend bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach drei Mal fünf minütigem Waschen in PBS (1-fach, pH 7,4) wurde mit der immunhistochemischen Färbung begonnen.

Die Gewebeschnitte wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Eselserum (DS) und Rinderserumalbumin (BSA) geblockt und mit dem Detergens Triton X-100 permeabilisiert (Blocklösung = 2 % BSA, 5 % DS und 0,1 % Triton X-100 in PBS). Danach erfolgte die Erstantikörperinkubation bei 4 °C über Nacht mit den Antikörpern anti-Serotonin (5HT) (1:40, Wirt: Kaninchen) und anti-TUJ1 (1:1000, Wirt: Maus) bzw. anti-TH (1:750, Wirt: Kaninchen), anti-CGRP (1:1500, Wirt: Ziege) und anti-GFAP (1:1000, Wirt: Maus) in Blocklösung. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte für die Dreifachfärbung (TH/CGRP/GFAP) noch für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bei der Doppelfärbung (5HT/TUJ1) erfolgte dieser Schritt nicht. Alle Gewebeschnitte wurden dann 3 Mal für 5 Minuten gewaschen und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur mit der Zweitantikörperlösung inkubiert. Diese bestand für die 5HT/TUJ1-Färbung aus anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 und anti-Maus Alexa Fluor® 594 Antikörpern und für die TH/CGRP/GFAP-Färbung aus anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488, anti-Ziege Alexa Fluor® 594 und anti-Maus Alexa Fluor® 647 Antikörpern (je 1:500, Wirt: Esel) mit jeweils DAPI (1:10000) in PBS. Nach erneutem 3-maligem 5-minütigem Waschen mit PBS wurden die Gewebeschnitte dehydriert [2 Minuten 50 % Ethanol (EtOH), 2 Minuten 70 % EtOH]. Zur Reduzierung von Autofluoreszenz erfolgte eine Inkubation in 0,3%igem Sudan Black für 7 Minuten. Danach wurden die Gewebeschnitte rehydriert (10-faches eintauchen in 70 % EtOH und 50 % EtOH) und nachfolgend zweimal in 0,1 M PB für je 5 Minuten gewaschen. Nach dem Aufziehen der Schnitte auf Objektträger (HistoBond®, Marienfeld) wurden sie bei Raumtemperatur getrocknet, mit Immu-Mount™ eingedeckelt und die Deckgläser nach einer Trockenzeit von 30 Minuten mit Nagellack abgedichtet.

### 3.8 Axonquantifizierung

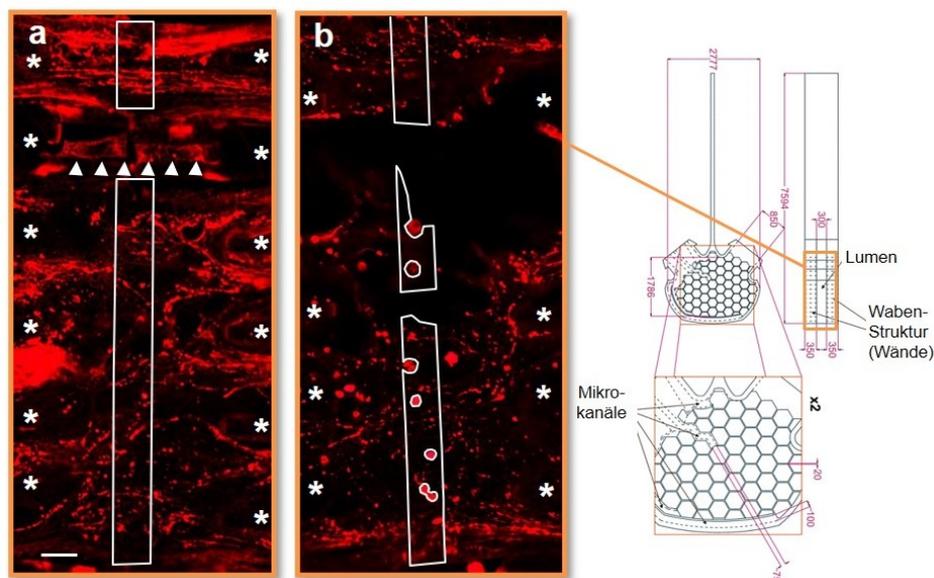
Für die Axonquantifizierung der anti-TH, anti-5HT und anti-CGRP positiven Fasern wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnitte am Fluoreszenzmikroskop (Nikon Diaphot 300) geblindet, also ohne Kenntnis der Behandlung, ausgezählt. Es wurde die Anzahl der Axonfragmente in vier parasagittalen Schnitten jedes Tieres von der gleichen anatomischen Region um die Mittellinie herum bestimmt. Dabei wurden jeweils in zwei Bereichen der Schnitte, im Lumen und kaudal des mMS, die markierten axonalen Fasern gezählt.

Aufgrund der zum Teil großen Menge an anti-TUJ1 positiven Fasern konnten diese nicht per Hand ausgezählt werden. Daher wurde dazu eine Analyse der Pixeldichte verwendet. Dazu wurden zunächst die Gewebeschnitte im Bereich der Läsion am Fluoreszenzmikroskop (BZ-8000, Keyence) mit gleichbleibenden Parametern ab fotografiert. Da der Bereich sehr groß war, wurden Einzelbilder mit 20x-Objektiv mit der Mosaik Scan Funktion des Mikroskops aufgenommen und mittels der *Merge*-Funktion des BZ Analyzer Programms (Keyence) zusammengeführt. Die Bilder wurden für die Bestimmung der Pixeldichte im Programm ImageJ in mehreren Schritten zu binären Bildern umgewandelt (modifiziert nach Heller 2014). Im Folgenden wird dies kurz erläutert und der entsprechende Makrocode in Klammern angegeben. Zunächst erfolgte eine Darstellung nur des roten Kanals (`setRGBWeights(1, 0, 0);`). Dann wurde das Bild in 8-Bit konvertiert und invertiert (`run("8-bit"); run("Invert");`). Für ein scharfes Bild wurde der Filter *Unsharp Mask* verwendet (`run("Unsharp Mask...", "radius=10 mask=0.50");`). Als nächstes wurde der Hintergrund reduziert (`run("Subtract Background...", "rolling=25 light");`) und zur Erstellung eines binären Bildes der *Auto Local Threshold Bernsen* verwendet (`run("Auto Local Threshold", "method=Bernsen radius=3 parameter_1=50 parameter_2=0");`) welches zuletzt noch invertiert wurde (`run("Invert");`) (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16: Analyse aller Axonpopulationen: Umwandlung in Binärbild.** Die Rohbilder der anti-TUJ1 Färbung (a) werden in 8-bit konvertiert (b), dann invertiert (c) und geschärft (d). Der Hintergrund wurde reduziert (e) und ein binäres Bild erstellt (f) welches zuletzt nochmals invertiert wurde (g). In Orange ist in (h) anhand eines sagittalen Schnitts durch das Rückenmark schematisch dargestellt um welchen Ausschnitt es sich bei den Einzelbildern (a – g) handelt. Sternchen = Wand der Wabenstruktur des mMS.

Da anti-TUJ1 gegen nervenzellenspezifisches  $\beta$ -III-Tubulin gerichtet ist, färbt es alle Axone. Es erfolgt keine Unterscheidung zwischen regenerierten und noch vorhandenen Fasern. Um sicherzustellen, dass hier nur regenerierte Fasern in die Analyse mit einfließen, wurde ein Bereich des Lumens mit festem Abstand zu den Wänden des mMS analysiert (siehe Abbildung 17, *region of interest* = ROI). In diesem Bereich des Lumens ist davon auszugehen, dass es sich nur um regenerierte Axone handelt.



**Abbildung 17: Analyse aller Axonpopulationen: region of interest.** Bei der Pixelanalyse der anti-TUJ1 Färbung wurde ein schmaler Bereich im Lumen des mMS zur Auswertung herangezogen. In (a) ist ein intakter Schnitt mit Wahl des *region of interest* (weiße Rechtecke) dargestellt. Der Teil des mMS, wo eine Verbindung zwischen den beiden Hälften des mMS besteht (Pfeilköpfe), wurde für die Analyse ausgespart. Bei manchen Schnitten fehlten Gewebeteile, diese wurden nicht zur Auswertung herangezogen (b). Auch rundliche Strukturen starker Fluoreszenz wurden ausgespart. Sternchen = Wand der Wabenstruktur des mMS. Ausrichtung: oben – dorsal, unten – ventral, links – rostral, rechts – kaudal. Maßstab = 100  $\mu$ m. Schemazeichnung rechts modifiziert nach Brazda et al. (2013).

Wurde der zu analysierende Bereich (ROI) von Teilen des mMS durchbrochen oder fehlte etwas vom Gewebe bzw. waren rundliche Strukturen gefärbt, wurden diese Bereiche dem ROI abgezogen. Der ROI wurde dann an das binäre Bild angelegt und die Pixeldichte (schwarze Pixel im Verhältnis zur Gesamtzahl an Pixeln) bestimmt.

### 3.9 Statistik

Für den statistischen Vergleich zwischen den Gruppen wurden die Programme Sigmastat und GraphPad Prism verwendet.

Für den Vergleich der Gruppen hinsichtlich des Auftretens von motorisch evozierten Potentialen (MEPs) wurde der Exakte Test nach Fisher genutzt. Bei normalverteilten Werten und dem Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde der T-Test angewandt. Waren die Daten nicht normalverteilt wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die Korrelation zwischen mBBB-Werten und den Amplituden der MEPs wurde eine Rangkorrelation nach Spearman genutzt.

Bei der Axonquantifizierung der ChABC-Studie wurden die einzelnen Werte pro Schnitt je Tier auf Normalverteilung getestet (Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnov-

Test). Bei Normalverteilung wurden diese je Tier gemittelt und bei nicht vorliegender Normalverteilung der Median gebildet. Diese Werte wurden wiederum auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und auf Gleichheit der Varianzen (Levene-Test) überprüft. Da dies nicht gegeben war wurde mit diesen Werten über die Gruppen hinweg ein statistischer Vergleich mittels des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Der Test auf Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen der mBBB-Werte nach ChABC Behandlung war dagegen positiv und somit wurde für den Vergleich dieser Werte eine *One-way ANOVA* verwendet.

Generell wurden Unterschiede als statistisch signifikant angesehen bei einem p-Wert  $\leq 0,05$ . Dargestellte Mittelwerte sind mit Standardabweichung (SD) oder mit dem Standardfehler der Mittelwerte angegeben (SEM). Für Mediane wird der Interquartilsabstand (IQR) zwischen der 25 %- und der 75 %-Quartile aufgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Elektrophysiologie als diagnostische Methode

Wie auch beim Menschen können elektrophysiologische Messungen an der Ratte zur Diagnostik bei Rückenmarkverletzungen genutzt werden (Wallesch et al. 2005; Takeoka et al. 2011; Verdú et al. 2003; Morris et al. 2017). Da diese Methodik vor Ort neu aufgebaut und im Vergleich zur Literatur etwas abgewandelt wurde, werden im Folgenden zunächst die Messungen an den gesunden Tieren vor Rückenmarkverletzung aufgezeigt.

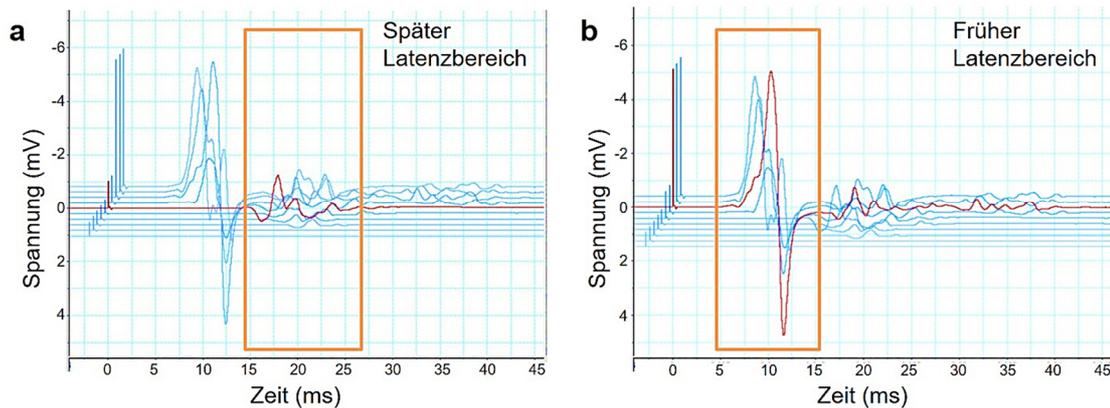
#### 4.1.1 Motorisch evozierte Potentiale (MEPs) gesunder Tiere

Bei den motorisch evozierten Potentialen wurde ein Stimulus am Schädel in Höhe des motorischen Bereiches gegeben und die korrespondierende Antwort am kontralateralen Muskel, in diesem Fall am rechten *musculus tibialis anterior*, abgeleitet.

Im gesunden Tier konnten ab einer Reizintensität von 3 mA MEPs ausgelöst werden (durchschnittlicher Schwellenreiz  $3,75 \pm 0,96$  mA SD, N = 4).

Die MEPs sehen je nach Reizintensität in ihrer Latenz unterschiedlich aus. Sie können in zwei Latenzbereiche eingeteilt werden (siehe Abbildung 18). Bei niedrigen Reizintensitäten (2 – 3 mA über Schwellenreiz) erschienen zunächst bipolare, zum Teil polyphasische Signale mit hohen Latenzen ( $16,7 \pm 1,9$  ms SD, N = 4). Als die Reizintensität jedoch weiter erhöht wurde (3 – 4 mA über den Schwellenreiz,  $7,25 \pm 1,0$  mA SD, N = 4), konnte zusätzlich ein bipolares Signal mit niedriger Latenz gemessen werden ( $5,3 \pm 0,8$  ms SD, N = 4). Außerdem kam es bei weiterer Erhöhung der Reizintensität zusätzlich zu Signalen mit noch höheren Latenzen (ca. 25 bis zu 40 ms). Letztere können von den Signalen des 17-ms-Bereichs jedoch nicht klar unterschieden werden, da die oft polyphasischen Signale des 17-ms-Bereichs manchmal bis in den späteren Bereich andauern. Es ist nicht eindeutig wo der eine Latenzbereich endet und der andere anfängt. Eine Bestimmung der Latenz ist somit für den sehr hohen Zeitbereich schwierig und die späteren Signale von 25 bis zu 40 ms Latenz wurden daher nicht weiter ausgewertet. Bei einer mittleren Distanz von 20,5 cm zwischen der Stimulation am Schädel und der Ableitung am Muskel ergibt sich eine Leitgeschwindigkeit von 39 m/s für den frühen Zeitbereich des MEPs und 12 m/s für den späten Zeitbereich des MEPs.

Mit steigender Reizintensität nahmen die Amplituden der MEPs zu. Bei supramaximaler Reizung, 20 % über der maximalen Reizung, lagen die Amplituden bei 0,4 – 1,7 mV für den späten Latenzbereich (durchschnittlich  $1,0 \pm 0,6$  mV SD, N = 4) und bei 9,8 – 28,8 mV für den frühen Latenzbereich (durchschnittlich  $16,0 \pm 8,7$  mV SD, N = 4).



**Abbildung 18: Motorisch evozierte Potentiale (MEPs) eines gesunden Tieres vor der Rückenmarkläsion.** Dargestellt sind Messungen am *musculus tibialis anterior* nach Stimulation des Kortex mit steigenden Reizintensitäten um ein Intervall von jeweils 1 mA (blau, unterste Kurve 1 mA, oberste 10 mA Stimulationsstärke). Zur besseren Übersicht sind die Kurven versetzt voneinander dargestellt. Ab Reizintensitäten von 3 mA konnten in diesem Tier MEPs ausgelöst werden. Diese können nach der Latenz in zwei Bereiche eingeteilt werden. (a) Bei niedrigen Reizintensitäten (3 – 6 mA) wurden MEPs mit langen Latenzen gemessen (durchschnittlich hier 16 ms, rote Kurve = 6 mA). (b) Bei höheren Reizintensitäten (7 – 10 mA) wurden zusätzlich MEPs mit kurzen Latenzen gemessen (durchschnittlich hier 5 ms, rote Kurve = 8 mA). Außerdem kam es bei Erhöhung der Reizintensität (ab 7 mA) zusätzlich zu Signalen mit noch längeren Latenzen (bis zu 40 ms). Ein maximaler Ausschlag wurde hier bei einer Reizintensität von 8 mA (b, rot) erreicht.

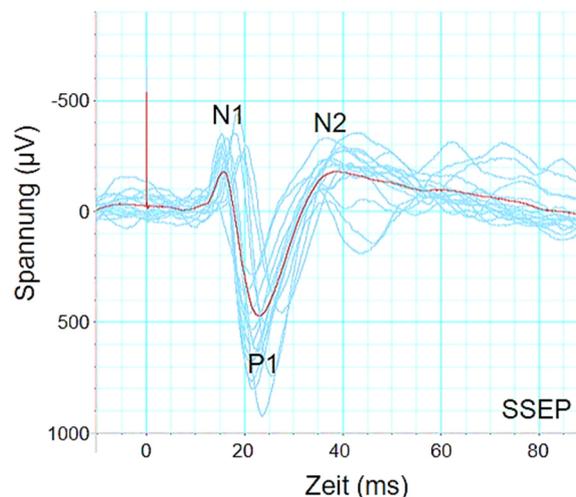
Vor Rückenmarkverletzung, im gesunden Zustand, konnten in allen Tieren MEPs gemessen werden.

#### 4.1.2 Somatosensorisch evozierte Potentiale (SSEPs) gesunder Tiere

Bei den somatosensorisch evozierten Potentialen wurde ein Stimulus in der Peripherie gegeben, hier am rechten Hinterfuß des Tieres, was zu einer leichten Drehung bzw. Zucken des Hinterfußes führte. Die Ableitung erfolgte über dem somatosensorischen Bereich der kontralateralen Hemisphäre.

Ein repräsentatives SSEP ist in Abbildung 19 dargestellt. Die gemessenen SSEPs zeigen drei Peaks auf: N1, P1 und N2 (N = negativ, P = positiv). Die Peak Latenz beträgt für N1:  $15 \pm 4$  ms SD, für P1:  $22 \pm 2$  ms SD und für N2:  $41 \pm 11$  ms SD Die mittlere Peak-zu-Peak Amplitude beträgt  $436 \pm 145$   $\mu$ V SD (N = 8).

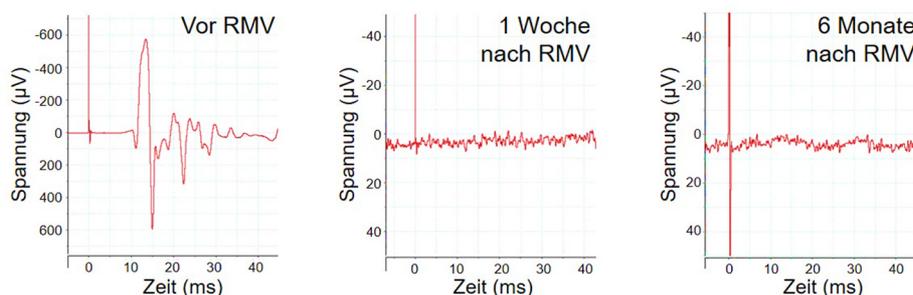
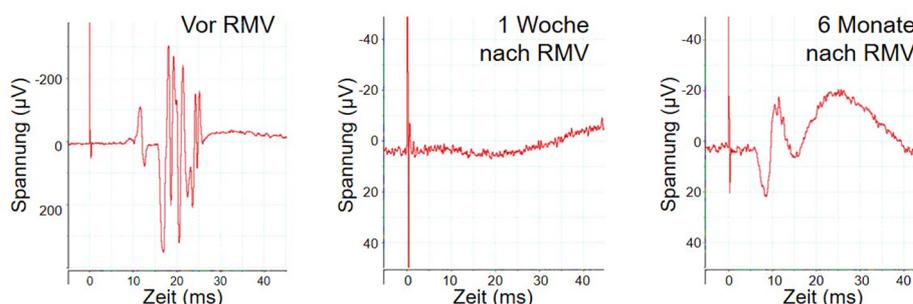
Vor Rückenmarkverletzung, im gesunden Zustand, konnten in allen Tieren SSEPs gemessen werden.



**Abbildung 19: Somatosensorisch evozierte Potentiale (SSEPs) eines gesunden Tieres vor der Rückenmarkläsion.** Dargestellt sind Einzelmessungen gleicher Reizintensität (blau) und die darüber gemittelte Kurve (rot) von SSEPs aufgenommen am Kortex nach Reizung am Fußgelenk. Die SSEPs bestehen aus drei prominenten Peaks: N1, P1 und N2 (N = negativ, P = positiv). Die Latenz der Einzelmessungen von Peak N1 ist ungefähr konstant, die Amplitude variiert. Bei Peak P1 und N2 variieren Latenz und Amplitude.

## 4.2 MEPs sind nach mMS Implantation wieder vorhanden

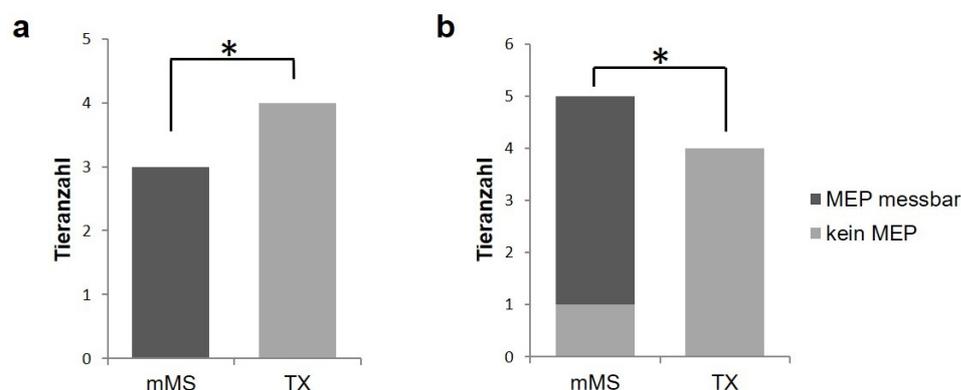
Unmittelbar nach der kompletten Durchtrennung des Rückenmarks an Thorakalwirbel 8 erhielten die Tiere der Testgruppe (mMS-Gruppe) eine Implantation des mechanischen Mikrokonnektorsystems (mMS). Als Kontrolle dienten Tiere, die nur eine komplette Transektion des Rückenmarks ohne anschließende mMS-Implantation erhielten (TX-Gruppe). Nach der kompletten Durchtrennung des Rückenmarks waren die im gesunden Zustand noch zu messenden MEPs in allen Tieren beider Gruppen nicht mehr vorhanden (siehe Abbildung 20). In drei (von je nach Zeitpunkt vier bzw. drei) Tieren der mMS-Gruppe konnten jedoch nach zwei bis sechs Monaten nach Rückenmarkverletzung wieder MEPs gemessen werden. Im Gegensatz dazu konnte in keinem Tier der TX-Gruppe MEPs gemessen werden. Um auszuschließen, dass ein Ausbleiben von MEPs nicht von einer falschen Elektrodenplatzierung herrührte, wurde zusätzlich zu jeder Messung die Auslösung von Muskelsummenaktionspotentialen nach Ischiasnervreizung überprüft (CMAPs). Zu jedem Messzeitpunkt konnten CMAPs nach einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks gemessen werden. Dieser Abschnitt der Arbeit wurde teilweise im Vorhinein publiziert, jedoch werden in dieser Arbeit die Kriterien der Auswertung enger gefasst und andere Beispiele der motorisch evozierten Potentiale dargestellt (Estrada et al. 2018b; Krebbers et al. 2015).

Komplette Transsektion:mMS behandelte Tiere:

**Abbildung 20: Motorisch evozierte Potential (MEPs) vor und eine Woche bzw. sechs Monate nach Rückenmarkverletzung.** Vor Rückenmarkverletzung (RMV) waren deutliche MEPs zu messen. Nach einer Woche nach Rückenmarkverletzung waren in denselben Tieren, sowohl in den Kontrolltieren, als auch in den mit dem mMS behandelten Tieren keine MEPs vorhanden. Nach zwei bis sechs Monaten konnten jedoch in mMS-Tieren wieder MEPs gemessen werden. Zu beachten sind die unterschiedlichen Maßstäbe vor und nach Rückenmarkverletzung.

Da ein Tier der TX-Gruppe und ein Tier der mMS-Gruppe frühzeitig nach ca. acht bzw. sieben Wochen auf Grund von Automutilation eingeschláfert werden mussten, reduzierte sich die Tieranzahl der TX und der mMS-Gruppe auf jeweils N = 4. Bis zu diesen Zeitpunkten zeigten beide Tiere, sowie die anderen Tiere beider Gruppen, keine MEPs nach Rückenmarkverletzung. Die beiden Tiere wurden daher nicht zur weiteren Auswertung herangezogen. Die MEPs in den jeweiligen Tieren der mMS-Gruppe traten erstmalig nach 9, 18 und 24 Wochen auf. Bei dem vierten Tier der mMS-Gruppe war kein MEP messbar, jedoch fand die letzte Messung nach 20 Wochen nach Rückenmarkverletzung statt, da dieses Tier ebenfalls auf Grund von Automutilation eingeschláfert werden musste. Bei diesem Tier fehlen dementsprechend die letzten beiden Messungen nach 21 und 24 Wochen nach Rückenmarkverletzung. Werden die Kriterien sehr eng gefasst und nur Tiere in die Auswertung mit eingeschlossen, bei denen bis 24 Wochen nach Rückenmarkverletzung Messungen durchgeführt werden konnten,

zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Auftreten der MEPs zwischen der mMS- und TX-Gruppe (Exakter Test nach Fisher, p-Wert = 0,029, siehe Abbildung 21a).



**Abbildung 21: Anzahl der Tiere bei denen MEPs nach längerer Zeit der Erholung messbar sind.** Bei einer Auswertezeit von 24 Wochen nach Rückenmarkverletzung zeigten insgesamt drei Tiere, die mit dem mMS behandelt wurden, in einem Zeitraum von zwei bis sechs Monaten nach Rückenmarkverletzung erstmalig MEPs. In den vier unbehandelten komplett lädierten Tieren der Kontrollgruppe (TX) konnten jedoch keine MEPs gemessen werden. Der Anteil der Beobachtungen: MEP messbar bzw. nicht messbar unterscheidet sich signifikant zwischen den beiden Gruppen mMS und TX (Exakter Test nach Fisher, \* p-Wert = 0,029) (a). Es wurden weitere Tiere zur Auswertung herangezogen, ein Tier der mMS-Gruppe, wobei der Versuch vorzeitig in Woche 20 beendet werden musste und ein zusätzliches Tier einer anderen vergleichbaren Studie (Woche 21 nach Rückenmarkverletzung). Auch dann ist der Anteil der Beobachtungen: MEP messbar bzw. nicht messbar signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen mMS und TX (Exakter Test nach Fisher, \* p-Wert = 0,048) (b).

Es wurde auf Grund des Verlustes von Tieren ein mMS-Tier zusätzlich aus einer anderen Studie zum Vergleich herangezogen. Dabei handelte es sich um ein Einzeltier einer Experimentalgruppe, bei der die restlichen Tiere schon vor den elektrophysiologischen Messungen verstarben. Bei diesem Tier wurde nur ein Zeitpunkt (21 Wochen nach Rückenmarkverletzung) elektrophysiologisch untersucht. Außerdem hatten die Erdungs- und Stimulationselektroden geringfügig andere Koordinaten (siehe Seite 27), was aber durch eine Änderung der Stimulationsstärke vermutlich ausgeglichen werden konnte. Die Amplituden liegen zumindest in einem ähnlichen Bereich wie in den Tieren der Ursprungsstudie (siehe Abbildung 23). Die Narkose wurde mit einer minimal höheren Dosis eingeleitet, jedoch wurde in einer ähnlichen Narkosetiefe mit den Messungen begonnen. Ansonsten waren nahezu alle Parameter gleich (gleiche Operateurin, Experimentatorin, Labor). Bei dem Vergleich der beiden Gruppen TX und mMS inklusive des zusätzlichen Tieres kommt es weiterhin zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mMS und TX (Exakter Test nach Fisher, p-Wert = 0,029, je N = 4). Werden alle Tiere zur Auswertung herangezogen – für die mMS-Gruppe einschließlich des zusätzlichen Tieres und des Tieres mit einer kürzeren Überlebenszeit von 20

Wochen – zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Auftreten der MEPs (Exakter Test nach Fisher, p-Wert = 0,048, siehe Abbildung 21b).

Die Parameter Amplitude und Latenz der MEPs der mMS-Tiere sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Aufgezeigt werden die maximalen Amplituden und korrespondierenden Latenzen der Signale bei Stimulationsstärken, die kein Zucken des ganzen Körpers auslösten. Der Mittelwert der maximalen Amplitude ist  $28 \pm 10 \mu\text{V}$  SD (N = 4) und der Mittelwert der Latenz  $8,4 \pm 1,9 \text{ ms}$  SD (N = 3). Dies entspricht einer Leitgeschwindigkeit von ca. 25 m/s bis zum *musculus tibialis anterior*. Für die Berechnung des Latenzmittelwertes und der Leitgeschwindigkeit wurde das zusätzliche Tier nicht mit herangezogen, da unterschiedliche Stimulationskoordinaten zu anderen Latenzen führen könnten. Die Signale höherer Stimulationsstärken wurden vernachlässigt, da Bewegungen des Körpers zu einer Bewegung der Ableitungselektroden am Muskel führen können. Dies würde zu einem falsch positiven Signal und somit einer Verfälschung der Ergebnisse führen.

**Tabelle 6: MEPs der mMS-Tiere nach zwei bis sechs Monaten.** Aufgezeigt werden die maximalen Amplituden und korrespondierenden Latenzen der Signale bei Stimulationsstärken, die kein Zucken des ganzen Körpers auslösten. Das zusätzliche Tier (Nr. mMS 4) wurde für die Bildung des Mittelwertes der Latenz nicht herangezogen, da unterschiedliche Stimulationskoordinaten diese beeinflussen könnten.

Tiernummer	maximale Amplitude ( $\mu\text{V}$ )	Latenz (ms)
mMS 1	21	10,3
mMS 2	39	6,5
mMS 3	18	8,5
mMS 4	34	11,8
Mittelwert	28	8,4
Standardabweichung	10	1,9

Für einen Vergleich der MEP Parameter der mit dem mMS behandelten Tiere nach Rückenmarkverletzung mit Tieren ohne Rückenmarkverletzung wurden die Daten erneut ausgewertet. Somit wurden bei den gesunden Tieren, wie bei den mMS-Tieren, nur solche Signale ausgewertet, deren Stimulationsstärke nicht zu einer Bewegung des ganzen Körpers führte. Die korrespondierenden Latenzen und maximalen Amplituden der gesunden Tiere sind, aufgeteilt nach frühem und spätem Latenzbereich, der Tabelle 7 zu entnehmen. Die maximalen Amplituden liegen bei  $532 \pm 528 \mu\text{V}$  SD für den frühen Latenzbereich ( $7,8 \pm 1,4 \text{ ms}$  SD) und bei  $1375 \pm 1066 \mu\text{V}$  SD für den späten Latenzbereich ( $16,5 \pm 1,4 \text{ ms}$  SD).

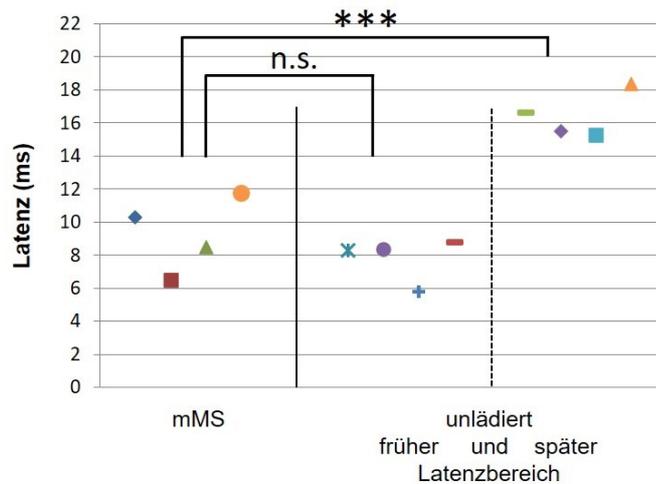
**Tabelle 7: Amplituden und Latenzen der MEPs unlädierter Tiere bei vergleichbarer Stimulationsstärke wie bei den mMS-Tieren.**

Tiernummer	früher Latenzbereich		später Latenzbereich	
	maximale Amplitude ( $\mu\text{V}$ )	Latenz (ms)	maximale Amplitude ( $\mu\text{V}$ )	Latenz (ms)
unlädiert I	188	8,3	2907	16,7
unlädiert II	23	8,4	1289	15,5
unlädiert III	744	5,8	724	15,3
unlädiert IV	1175	8,8	579	18,4
Mittelwert	532	7,8	1375	16,5
Standardabweichung	528	1,4	1066	1,4

Bei Vergleich der Latenzen der mMS-Tiere mit den unlädierten Tieren (Tabelle 8, Abbildung 22) scheint es, als wären die wiederauftretenden MEPs der mMS-Tiere den Signalen des frühen Latenzbereiches zuzuordnen. Ein statistischer Vergleich der Latenzen der MEPs der mMS-Tiere mit den Latenzen des frühen und späten Zeitbereichs der gesunden Tiere zeigt, dass ein signifikanter Unterschied besteht (einfache ANOVA,  $p\text{-Wert} \leq 0,001$ ). Die Post-hoc Analyse mittels der Holm-Sidak Methode zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Latenzen der MEPs der mMS und der gesunden Tiere für den späten Zeitbereich (mMS vs. gesund spät:  $p\text{-Wert} \leq 0,001$ ). Im Vergleich dazu gibt es zum frühen Latenzbereich der gesunden Tiere keinen signifikanten Unterschied (mMS vs. gesund früh:  $p\text{-Wert} = 0,619$ ).

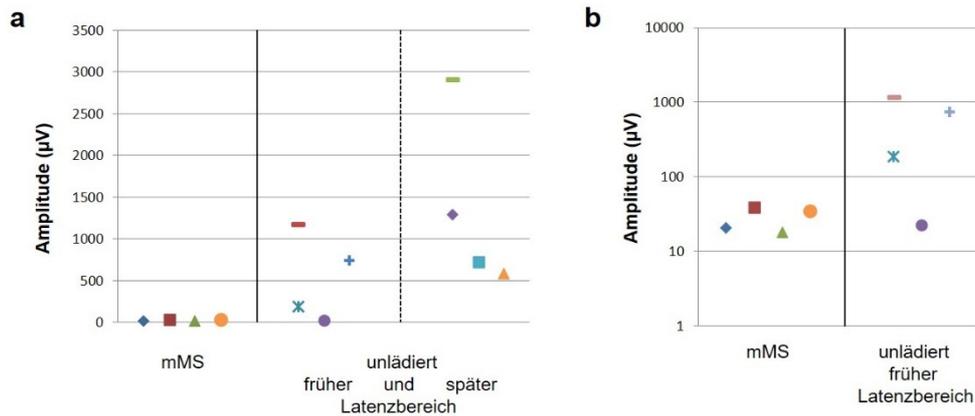
**Tabelle 8: Vergleich der Latenz- und Amplitudenmittelwerte gesunder Tiere mit mMS-Tieren bei vergleichbaren Stimulationsstärken.**

	Gesunde Tiere		mMS-Tiere
	früher Latenzbereich	später Latenzbereich	
Latenzen (ms $\pm$ SD)	7,8 $\pm$ 1,4	16,5 $\pm$ 1,9	8,4 $\pm$ 1,9
Amplituden ( $\mu\text{V}$ $\pm$ SD)	532 $\pm$ 528	1375 $\pm$ 1066	28 $\pm$ 10



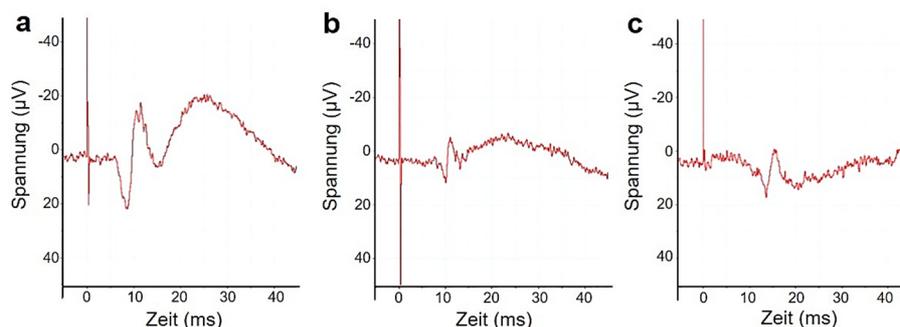
**Abbildung 22: Latenzen der MEPs von mMS behandelten und unlädierten Tieren.** Die MEPs wurden ausgelöst bei vergleichbaren Stimulationsstärken. Ein Punkt steht für je ein Tier. Bemerke, ein mMS-Tier hatte geringfügig andere Stimulationskoordinaten als die anderen Tiere (orangener Punkt, für Statistik nicht mit einbezogen, einfache ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach der Holm-Sidak Methode \*\*\*  $p\text{-Wert} \leq 0,001$ , n. s. = nicht signifikant  $p\text{-Wert} = 0,619$ ).

Die Amplituden der MEPs der mMS-Tiere sind im Gegensatz zu denen der unlädierten Tiere sehr gering (siehe Tabelle 8). Wenn jedoch die MEPs des frühen Latenzbereiches betrachtet werden fällt auf, dass zumindest bei einem bzw. zwei unlädierten Tieren die Amplituden in einem ähnlichen Bereich liegen (Abbildung 23). Insgesamt besteht bei den Amplituden der unlädierten Tiere eine sehr große Spannweite bzw. Standardabweichung (siehe Tabelle 7). Ein statistischer Vergleich der Amplituden der MEPs der mMS-Tiere mit den Amplituden des frühen und späten Zeitbereichs der gesunden Tiere zeigt keinen signifikanten Unterschied (einfache ANOVA,  $p\text{-Wert} \leq 0,100$ ). Jedoch ist die Power des Tests mit 0,312 weit unter den erforderlichen 0,800 und das Ergebnis damit eher nicht zu betrachten, da es weniger wahrscheinlich ist, einen Unterschied festzustellen, auch wenn ein Unterschied existieren würde (falsch negativ, Fehler 2. Art).



**Abbildung 23: Amplituden der MEPs von mMS behandelten und unlädierten Tieren.** Die MEPs wurden ausgelöst bei vergleichbaren Stimulationsstärken. Ein Punkt entspricht dem maximalen Amplitudenwert je eines Tieres. Beachte, ein mMS-Tier hatte geringfügig andere Stimulationskoordinaten als die anderen Tiere (orangefarbener Punkt). Beachte zudem, dass die Amplituden der mMS-Tiere im Vergleich zu den gesunden Tieren in einem anderen Maßstabsbereich liegen und somit in der linken Abbildung nicht ablesbar sind (a). Die Werte der mMS-Gruppe im Vergleich zu den Werten des frühen Zeitbereichs der unlädierten Tiere sind daher nochmals logarithmisch dargestellt (b).

Noch anzumerken ist, dass nach dem ersten klaren Peak in den MEPs der mMS behandelten Tiere bei manchen Messungen noch ein zweiter Ausschlag der Kurve zu erkennen ist (siehe Abbildung 24). Dieses Signal erscheint als lange Welle und folgt unmittelbar auf den ersten Ausschlag der Kurve wodurch die Latenz nur ungefähr, als Ende des ersten Peaks, bestimmt werden kann ( $16,6 \pm 3,6$  ms SD). Die Amplitude der zweiten Welle beträgt im Mittel  $24 \pm 11$  µV SD.

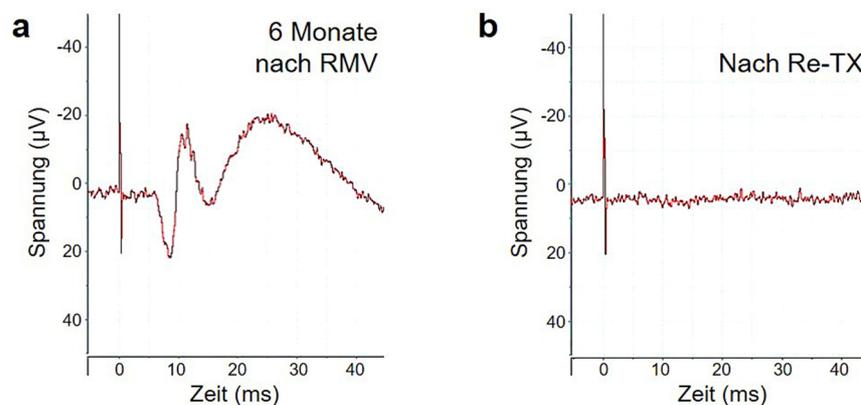


**Abbildung 24: MEPs in mMS behandelten Tieren.** Beispielhaft sind MEPs von drei mit dem mMS behandelten Tiere dargestellt. Es ist in jedem Tier ein klarer früher Peak zu beobachten. Zusätzlich ist in (a) daran anschließend, eine weitere Auslenkung der Kurve zuerkennen. In (b) ist diese schwächer und in (c) kaum vorhanden.

Bei den elektrophysiologischen Messungen ist aufgefallen, dass die Hinterbeine ab einem bestimmten Zeitpunkt nach Rückenmarkverletzung nicht mehr gleichmäßig angewinkelt neben den Körper gelegt werden konnten. Es konnte zeitgleich immer nur ein Hinterbein angewinkelt werden, vermutlich aufgrund von stark verkürzten Sehnen. Dies wurde bei fünf von sechs Tieren notiert. Bei einem Tier wurde eine starke Biegung der Wirbelsäule nach links festgestellt. Die Verkürzung der Sehnen wurde erstmalig nach 12 Wochen nach Rückenmarkverletzung beobachtet und durchschnittlich nach  $21 \pm 5,6$  Wochen SD (N = 5).

### 4.3 Nach Retranssektion des Rückenmarks ist kein MEP messbar

Um zu zeigen, dass die gemessenen MEPs von der Signalübertragung der axonalen Verbindung im Rückenmark herrührten, wurde drei Tage vor Perfusion in den drei Tieren der Ursprungsstudie, die zuvor ein regeneriertes MEP zeigten, eine Retranssektion des Rückenmarks 4 mm kaudal der vorangegangenen Läsion durchgeführt. In allen drei Tieren waren nach der Retranssektion keine MEPs mehr messbar (siehe Abbildung 25, gemessen wurde ein bis zwei Tage nach Retranssektion). Dieser Abschnitt wurde ebenfalls im Vorfeld publiziert und ist Teil der zuvor erwähnten Veröffentlichungen (Estrada et al. 2018b; Krebbers et al. 2015). In dieser Arbeit wird jedoch ein anderes Beispiel der motorisch evozierten Potentiale vor und nach Retranssektion dargestellt.



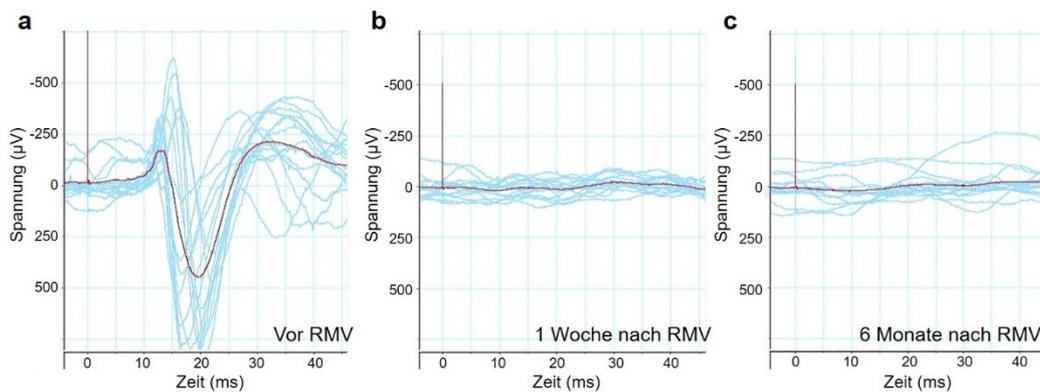
**Abbildung 25: MEPs nach Retranssektion.** Nach zwei bis sechs Monaten nach Rückenmarkverletzung konnte in einigen mMS behandelten Tieren wieder ein MEP gemessen werden (a). Das gemessene MEP war nach erneuter kompletter Durchtrennung des Rückenmarks (Re-TX) 4 mm kaudal der vorherigen Läsion nicht mehr zu messen (N = 3) (b). RMV = Rückenmarkverletzung.

Nur bei einer weiteren Erhöhung der Stimulationsstärke, so dass sich der ganze Körper bewegt, sind Signale von maximal 200 µV zu beobachten. Diese stammen vermutlich

von der Bewegung der Elektroden. Wenn die Elektroden manuell bewegt werden kommt es infolge dessen ebenfalls zu einem Ausschlag der Kurve. Deshalb wurden für die Auswertung der Signale lädierter Tiere und korrespondierender Signale gesunder Tiere nur solche Signale ausgewertet, die bei Stimulationsstärken ausgelöst wurden, die zu keiner Bewegung des ganzen Körpers führten. Eine Kontraktion des *musculus tibialis anterior* konnte nicht beobachtet werden.

#### 4.4 SSEPs lassen sich innerhalb von sechs Monaten nach Verletzung nicht nachweisen

Vor Rückenmarkverletzung, im gesunden Zustand, konnten in allen Tieren nach Reizung am Fuß somatosensorische Potentiale am Kortex gemessen werden (siehe Abschnitt 4.1.2 auf Seite 44 und Abbildung 26a). Es wurde nach Rückenmarkverletzung über die Zeit mehrmals versucht SSEPs zu messen, jedoch konnte in keinem Tier [Kontrolle (TX) oder mMS] über einen Zeitraum von einer Woche bis 6 Monaten nach Rückenmarkverletzung SSEPs detektiert werden (Abbildung 26b und c).



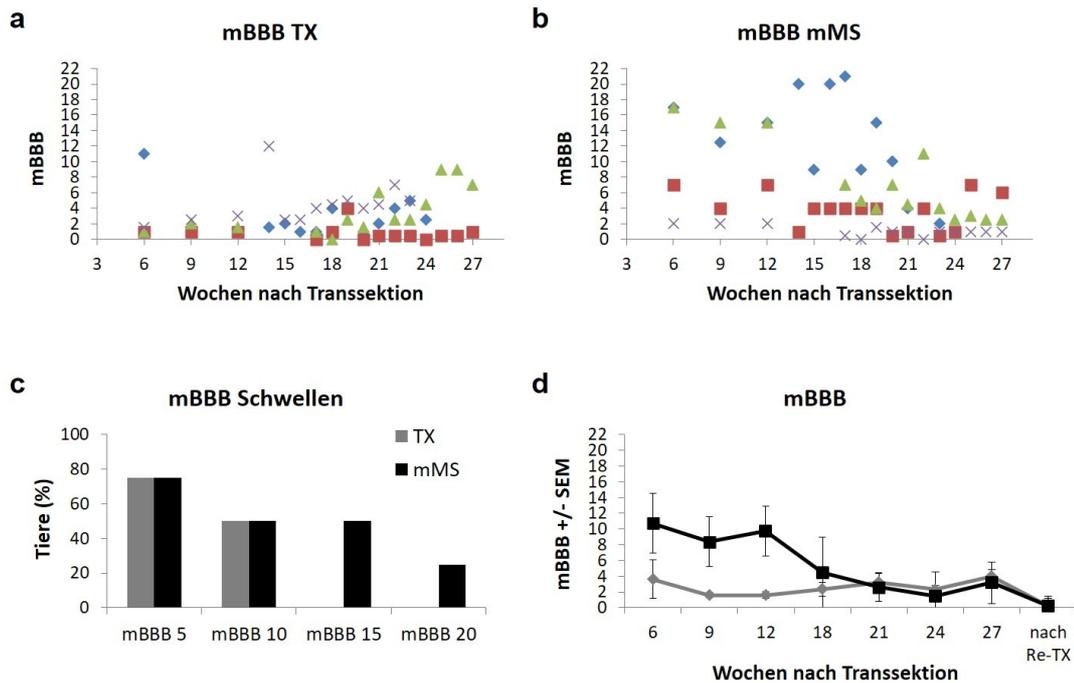
**Abbildung 26: Somatosensorisch evozierte Potentiale (SSEPs) nach Rückenmarkverletzung.** Dargestellt sind Einzelmessungen gleicher Reizintensität (blau) und die darüber gemittelte Kurve (rot) jeweils vor (a) und eine Woche (b) bzw. sechs Monate (c) nach Rückenmarkverletzung (RMV) plus mMS Behandlung. Sowohl bei Kontrolltieren (TX) als auch bei mMS-Tieren waren bis zu 6 Monate nach Rückenmarkverletzung in Höhe des Thorakalwirbels 8 keine SSEPs am Schädel messbar (b, c). In denselben Tieren waren diese vor der Rückenmarkverletzung vorhanden (a).

#### 4.5 mMS Implantation führt zu einer verbesserten Lokomotorik

Im Verlauf dieser Studie wurden parallel zu den elektrophysiologischen Messungen Verhaltenstests zur Überprüfung der Lokomotorik der Tiere nach Rückenmarkverletzung durchgeführt. Wie auch schon in anderen Studienteilen zur Testung des mMS dieses Labors (Estrada et al. 2018b) wurden die Tiere im Offenfeld mit Hilfe des

mBBBs (modifizierter BBB, basierend auf dem BBB nach Basso, Beattie und Bresnahan 1995, modifiziert von Antri et al. 2002 und Estrada et al. 2014) entsprechend ihrer Lokomotorik bewertet. Alle Tests wurden geblendet durchgeführt. Getestet wurde erstmalig sechs Wochen nach Rückenmarkverletzung vor der elektrophysiologischen Messung und dann jeweils am selben Tag vor den elektrophysiologischen Messungen. Die mBBB-Werte der Tiere der TX-Gruppe lagen über dem gesamten Zeitraum unter einem Wert von 10, bis auf zwei Ausnahmen. Zwei Tiere zeigten an Woche sechs und vierzehn jeweils einen mBBB-Wert von 11 und 12 (siehe Abbildung 27a). Höhere mBBB-Werte wurden in der TX-Gruppe jedoch nicht erreicht. In den mMS behandelten Tieren wurden hingegen vermehrt mBBB-Werte über 10 erreicht (siehe Abbildung 27b). Ein mBBB-Wert von 10 bedeutet, dass neben den alternierenden Bewegungen der Hinterbeine und dem dorsalen (nicht plantaren) Platzieren der Hinterfüße das Tier zusätzlich gelegentlich sein Gewicht unterstützen kann. Zwei von vier Tieren der mMS-Gruppe erreichten im Gegensatz zu der TX-Gruppe einen mBBB-Wert von mindestens 15 (Abbildung 27c). Hierbei kommt es häufiger zur rechts-links Alternierung der Hinterbeine, einer vermehrten Gewichtsunterstützung und/oder einem plantaren Aufsetzen der Hinterfüße. Die beiden Tiere hier bewegten das linke und rechte Bein frequent und konsistent alternierend und konnten in 51 – 94 % der Schritte ihr Gewicht unterstützen. Eines dieser mMS-Tiere erreichte einen Spitzenwert von 21. Sowohl in der mMS wie auch der TX-Gruppe konnte jedoch keines der Tiere mit der plantaren Seite des Fußes auftreten, sondern wenn es zur Gewichtsunterstützung kam, dann nur über die dorsale Seite des Fußes und/oder des Knies.

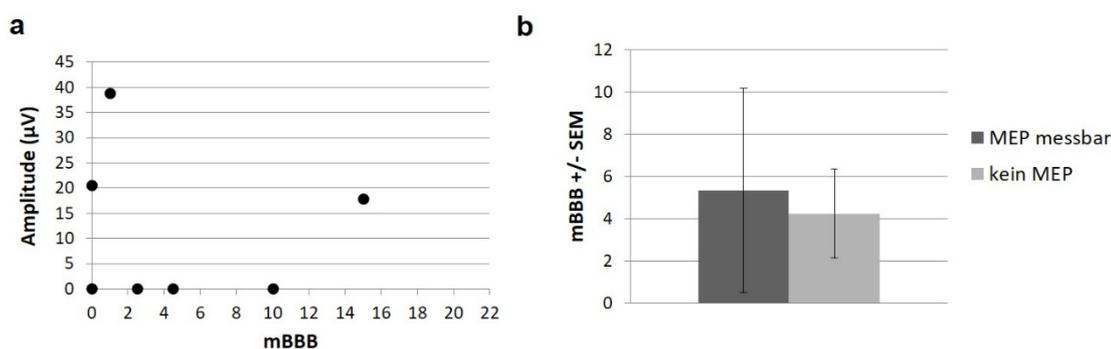
Der Vergleich der Mittelwerte der beiden Gruppen (mMS vs. TX) zeigt einen Trend zu einem verbesserten mBBB in der mMS-Gruppe in den Wochen 6, 9 und 12 nach Rückenmarkverletzung (Abbildung 27d). Dieser Unterschied ist nicht signifikant (6 Wochen nach Rückenmarkverletzung: T-Test, p-Wert = 0,163; je 9 und 12 Wochen nach Rückenmarkverletzung: Mann-Whitney-U-Test, p-Wert = 0,057). Zu beachten ist jedoch, die geringe Tieranzahl von N = 4 je Gruppe, die zum Beispiel in Woche 6 nach Rückenmarkverletzung zu einer statistischen Power von nur 0,175 im Gegensatz zu einer geforderten Power von 0,8 führt. Die Wahrscheinlichkeit ist somit hoch einen Unterschied zwischen den Gruppen nicht zu erkennen, auch dann, wenn ein Unterschied vorhanden wäre. Zwischen Woche 12 und Woche 21 kam es zu einem Abfall der mBBB-Werte der mMS-Gruppe auf das Niveau der mBBB-Werte der TX-Gruppe (mBBB 1,5 – 4). Nach Retranssektion fielen die Werte insgesamt auf  $0,25 \pm 0,11$  SEM (N = 6).



**Abbildung 27: Ergebnisse des lokomotorischen Tests.** Dargestellt sind die mBBB-Werte der Kontrolltiere mit einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks (a) und die mBBB-Werte der mit dem mMS implantierten Tiere über die Zeit (b). Jeder Punkt entspricht dem mBBB-Wert eines Tieres zu einem Zeitpunkt. Die mBBB-Werte desselben Tieres sind mittels gleichartiger Markierung gekennzeichnet. Unten links sind Schwellenwerte dargestellt, bei wie viel Prozent der jeweiligen Gruppe ein entsprechender mBBB erreicht bzw. überschritten werden konnte (c). Unten rechts sind die Mittelwerte der mBBB-Werte der mMS-Gruppe denen der TX-Gruppe im Verlauf der Zeit gegenübergestellt. Zu keinem der beobachteten Zeitpunkte besteht ein statistisch signifikanter Unterschied. Zu beachten ist jedoch, dass eine Tieranzahl von  $N = 4$  sehr gering und die statistische Power zumindest für Woche 6 weit unter den geforderten 0,8 liegt.

#### 4.6 MEP Amplituden und Locomotorik korrelieren nicht

Am Morgen vor den elektrophysiologischen Messungen wurden die mBBB-Werte als Maß der Locomotorik der Tiere im Offenfeld ermittelt. Die MEP Amplituden wurden diesen gegenübergestellt. Wurde kein MEP gemessen wurde eine Amplitude von null vergeben. Eine Korrelation ist der Abbildung 28 zu entnehmen. Es wurde keine statistische Beziehung zwischen den mBBB-Werten und den MEP Amplituden festgestellt (Rangkorrelation nach Spearman,  $p$ -Wert = 0,602). Wenn die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt werden, je nachdem ob ein MEP messbar oder nicht messbar war, zeigt sich ein Trend zu höheren mBBB-Werten für die Tiergruppe bei denen ein MEP gemessen werden konnte. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant, wobei die statistische Power mit 0,050 sehr weit unter den geforderten 0,8 liegt. Eine höhere Tieranzahl könnte vermutlich auch hier mehr Aufschluss geben.



**Abbildung 28: Korrelation von mBBB-Werten und MEPs.** Aufgetragen sind die entsprechenden MEP Amplituden gegen die einzelnen mBBB-Werte, ermittelt kurz vor der elektrophysiologischen Messung (a). Es gibt keine signifikanten Beziehungen zwischen MEP Amplituden und mBBB (Rangkorrelation nach Spearman,  $p$ -Wert = 0,602). Der Mittelwert der mBBB-Werte der Tiere bei denen ein MEP messbar war ist leicht erhöht im Gegensatz zu den Tieren bei denen kein MEP messbar war (b). Die mBBB-Werte in den Tieren besitzen jedoch eine große Varianz. Der Unterschied ist nicht signifikant (T-Test,  $p$ -Wert = 0,829), wobei zudem beachtet werden muss, dass die statistische Power des Testes weit unter den geforderten 0,8 liegt.

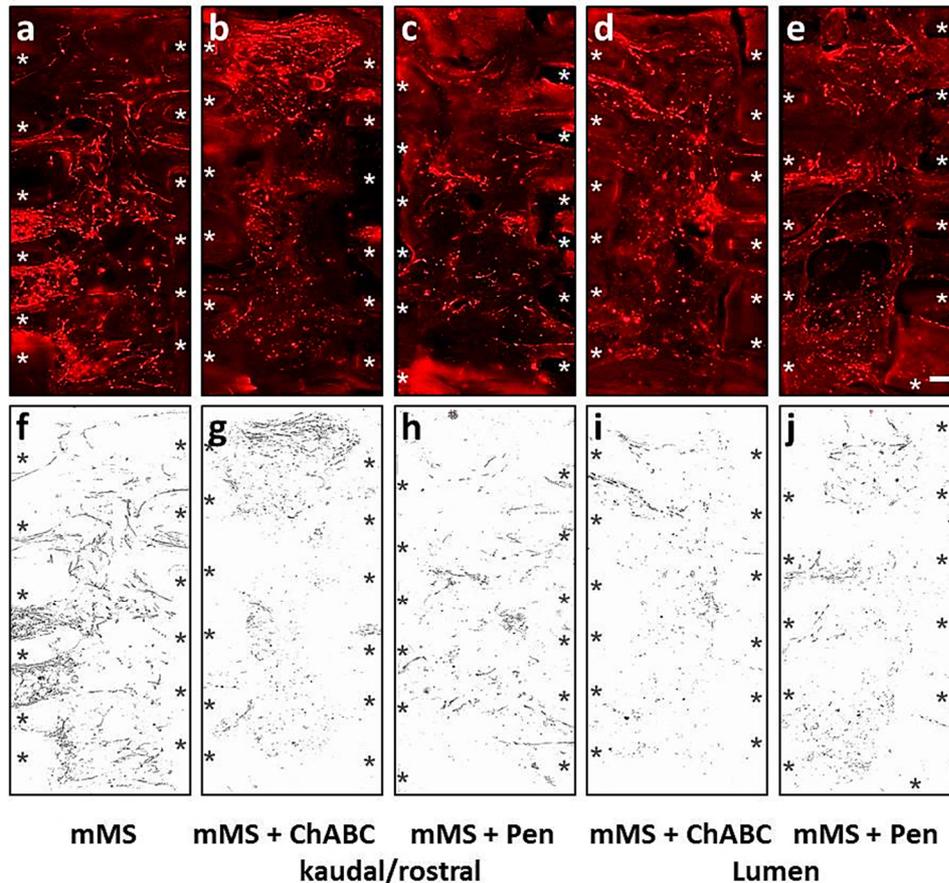
## 4.7 Kombinatorische Anwendung von mMS und Chondroitinase ABC

In diesem Teil der Arbeit wurde zusätzlich zur Behandlung mit dem mMS das Enzym Chondroitinase ABC (ChABC) als Therapie verwendet. Der Erfolg der Therapie wurde hier als Pilotexperiment anhand des axonalen Wachstums fünf Wochen nach ChABC Behandlung bestimmt. Als Kontrolle diente die Behandlung mit dem mMS alleine und zusätzlich als zweite Kontrolle, die Gabe von Penicillinase (Pen). Dabei wurden zwei verschiedene Applikationswege getestet, die Injektion kaudal und rostral des mMS und die Applikation über das interne Mikrokanaalsystem in das Lumen des mMS.

### 4.7.1 Die Kombinationsbehandlung führt nicht zu einem signifikanten Zuwachs an regenerierenden Axonen

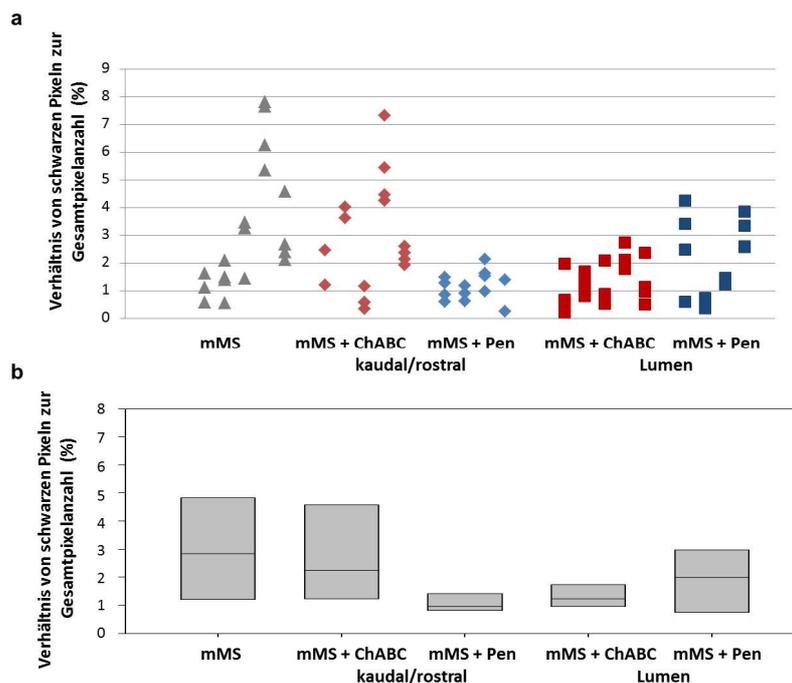
Es wurde zum einen die Gesamtzahl an regenerierten Axonen analysiert und zum anderen unterschiedliche Axonpopulationen. Die Bestimmung der Gesamtanzahl an Axonen erfolgte über die immunhistochemische Färbung von nervenzellenspezifischem  $\beta$ -III-Tubulin (anti-TUJ1). Die unterschiedlichen axonalen Populationen, die untersucht wurden waren serotonerge Fasern (anti-5HT), katecholaminerge Fasern (anti-TH) als u. a. absteigende motorische Fasern und *calcitonin gene-related peptide*-positive Fasern (anti-CGRP) als aufsteigende sensorische Fasern. Zudem verwenden manche Interneurone Serotonin und Dopamin als Transmitter, die dann ebenfalls mit anti-5HT und anti-TH markiert wurden (Conta und Stelzner 2009) (siehe auch Kapitel 2.6 Fasertrakte des Rückenmarks). Alle immunhistochemischen Färbungen waren positiv, denn in dem Teil des Rückenmarks, wo noch intakte Fasern vorhanden waren (rostral der Läsion für anti-TH, anti-5HT und anti-TUJ1 und kaudal der Läsion für anti-CGRP und ebenfalls anti-TUJ1) wurden diese angefärbt. Die Negativkontrollen, also die Aussparung der Primärantikörper, führten zu keinen Färbungen.

Zur allgemeinen Analyse regenerierter Axone durch das Lumen des mMS wurden die neuronalen Fasern mittels anti-TUJ1 markiert und über eine Pixelanalyse ausgewertet. In Abbildung 29 sind repräsentative Färbungen für die einzelnen Gruppen (1. mMS, 2. mMS + ChABC Injektion kaudal und rostral des mMS, 3. mMS + Penicillinase Injektion kaudal und rostral des mMS, 4. mMS + ChABC ins Lumen des mMS, 5. mMS + Penicillinase ins Lumen des mMS) dargestellt.



**Abbildung 29: Repräsentative Bilder der anti-TUJ Färbung und binäre Bilder der Pixelanalyse pro Gruppe.** Abgebildet ist jeweils das Lumen des mMS in einem sagittalen Schnitt ähnlich wie in Abbildung 17. Anti-TUJ1 = rot (a – e) bzw. in den binären Bildern = schwarz (f – j). mMS = mechanisches Mikrokonnektorsystem, ChABC = Chondroitinase ABC, Pen = Penicillinase. Sternchen = Wand der Wabenstruktur des mMS. Ausrichtung: oben – dorsal, unten – ventral, links – rostral, rechts – kaudal. Maßstab in (e) für alle Bilder = 100 µm

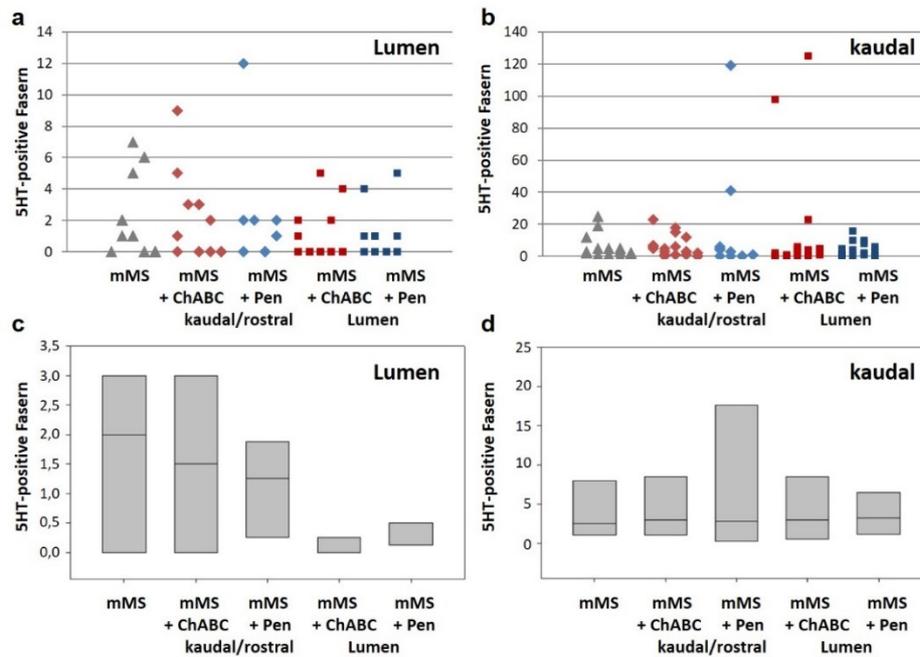
Der Median der mMS-Gruppe betrug 2,83 % schwarze Pixel im Verhältnis zur Gesamtpixelanzahl des untersuchten Bereichs mit einem Interquartilsabstand (IQR) von 2,59 % schwarzen Pixeln (siehe Abbildung 30). Der Median der mMS-ChABC-Gruppen betrug bei der Injektion kaudal und rostral des mMS 2,24 % mit einem IQR von 2,68 % und bei der Applikation über das mMS 1,22 % mit einem IQR von 0,51 %. Bei Injektion der Kontrolle, der Penicillinase, kaudal und rostral des mMS betrug der Median 0,96 % mit einem IQR von 0,45 % und bei der Applikation über das mMS 1,98 % mit einem IQR von 1,94 %. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert = 0,202).



**Abbildung 30: Quantifizierung neuronaler Fasern im Lumen des mMS fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung.** Dargestellt ist der Prozentsatz an schwarzen Pixeln an der Gesamtpixelanzahl in der Mitte des Lumens des mMS. Schwarze Pixel entsprechen dabei den anti-TUJ1 gefärbten neuronalen Fasern. (a) Jeder Punkt entspricht dem Wert eines Gewebeschnittes. Die Werte einzelner Tiere sind auf gleicher Höhe der X-Achse dargestellt. (b) Boxplot mit Medianen und 25 %- und 75 %-Quartilen je Gruppe, bestimmt aus den Mittelwerten der einzelnen Tiere. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert = 0,202). mMS = mechanisches Mikrokonnektorsystem, ChABC = Chondroitinase ABC, Pen = Penicillinase.

Neben der Gesamtzahl der neuronalen Fasern wurden außerdem einzelne Faserpopulationen im Lumen sowie kaudal des mMS analysiert (siehe Abbildung 31). Die Anzahl an serotonergen Fasern (anti-5HT) im Lumen der mMS-Gruppe betrug im Median 2,00 mit einem Interquartilsabstand (IQR) von 3,00. Der Median an serotonergen Fasern im Lumen der mMS-ChABC-Gruppen betrug bei der Injektion kaudal und rostral des mMS 1,50 mit einem IQR von 3,00 und bei der Applikation über das mMS 0,00 mit einem IQR von 0,13. Bei Injektion der Kontrolle, der Penicillinase, kaudal und rostral des mMS betrug der Median 1,25 mit einem IQR von 1,25 und bei der Applikation über das mMS 0,50 mit einem IQR von 0,25. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert = 0,300). Kaudal des mMS wurden ebenfalls 5HT-positive Fasern ausgezählt. Der Median betrug für die mMS-Gruppe 2,50 mit einem IQR von 4,75. Nach zusätzlicher Injektion von ChABC kaudal und rostral des mMS wurden im Median 3,00 5HT-positive Fasern gezählt mit einem IQR von 6,00. Bei der Applikation von ChABC über das mMS betrug der Median

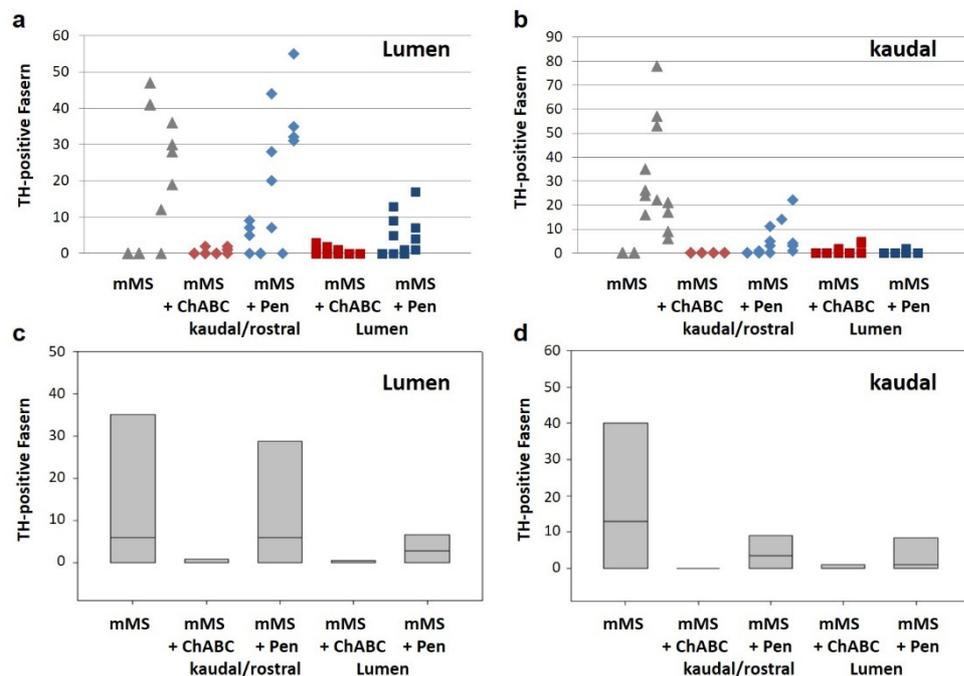
ebenfalls 3,0 mit einem IQR von 5,25. Bei Injektion der Kontrolle kaudal und rostral des mMS wurden im Median 2,75 Fasern gezählt (IQR = 12,75) und bei der Applikation über den mMS 3,25 (IQR = 4,75). Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in der Anzahl an serotonergen Fasern kaudal des mMS (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert = 0,998).



**Abbildung 31: Serotonerge Fasern fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung.** Dargestellt ist die Anzahl an 5HT-positiven Fasern im Lumen des mMS (a, c) und kaudal des mMS (b, d). In den oberen Streudiagrammen entspricht jeder Punkt dem Wert eines Gewebeschnittes. Die Werte einzelner Tiere sind auf gleicher Höhe der X-Achse dargestellt. In den unteren Boxplots sind die Mediane und 25 %- und 75 %-Quartile je Gruppe dargestellt. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Kruskal-Wallis-Test, Lumen: p-Wert = 0,300, kaudal: p-Wert = 0,998). mMS = mechanisches Mikrokonnektorsystem, ChABC = Chondroitinase ABC, Pen = Penicillinase.

Zudem wurden die katecholaminergen Fasern im Lumen und kaudal des mMS ausgezählt, die durch immunhistochemische Färbungen von Tyrosin Hydroxylase (TH) sichtbar gemacht wurden (siehe Abbildung 32). Der Medianwert der mMS-Gruppe im Lumen des mMS betrug 6,00 mit einem Interquartilsabstand (IQR) von 32,00 Fasern. Der Median der mMS-ChABC-Gruppen betrug bei der Injektion kaudal und rostral des mMS, sowie bei der Applikation über das mMS 0,00 mit einem IQR von 0,50 Fasern. Bei Injektion der Kontrolle, der Penicillinase, kaudal und rostral des mMS betrug der Median 6,00 mit einem IQR von 26,38 und bei der Applikation über das mMS 2,75 mit einem IQR von 6,25 Fasern. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert = 0,415). Auch die kate-

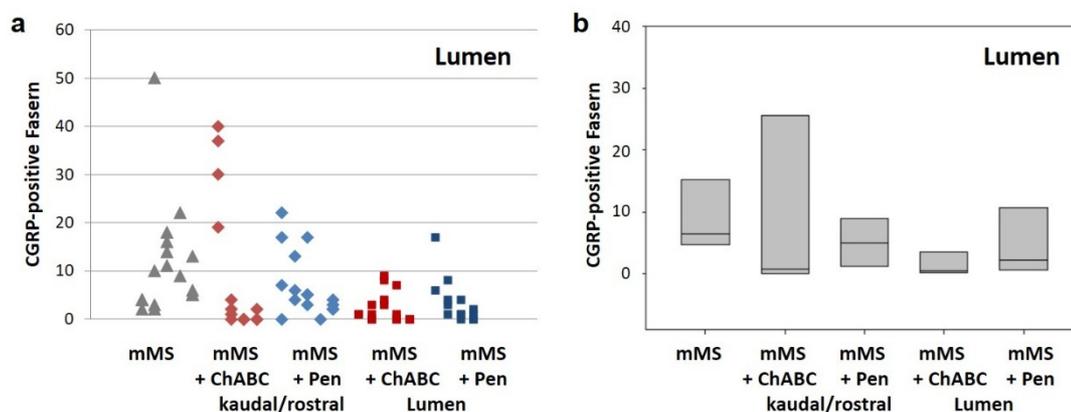
cholinergen Fasern wurden zusätzlich kaudal des mMS gezählt. Der Medianwert der mMS-Gruppe betrug 13,00 Fasern mit einem IQR von 32,50. Nach Injektion der ChABC kaudal und rostral des mMS wurden keine katecholaminergen Fasern kaudal des mMS beobachtet. Nach der Applikation von ChABC über das mMS wurden nur sehr wenige Fasern entdeckt, was zu einem Medianwert von 0,00 führte (IQR = 0,50). Nach der Injektion von Penicillinase kaudal und rostral des mMS wurden im Median 3,50 Fasern gezählt (IQR = 6,50). Nach der Applikation von Penicillinase über das mMS war der Medianwert 1,00 (IQR = 6,25). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an katecholaminergen Fasern kaudal des mMS festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert = 0,172).



**Abbildung 32: Katecholaminerge Fasern fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung.** Dargestellt ist die Anzahl an TH-positiven Fasern im Lumen des mMS (a, c) und kaudal des mMS (b, d). In den oberen Streudiagrammen, entspricht jeder Punkt dem Wert eines Gewebeschnittes. Die Werte einzelner Tiere sind auf gleicher Höhe der X-Achse dargestellt. In den unteren Boxplots sind die Mediane und 25 %- und 75 %-Quartile je Gruppe dargestellt. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Kruskal-Wallis-Test, Lumen: p-Wert = 0,415, kaudal: p-Wert = 0,172). mMS = mechanisches Mikrokonnectorsystem, ChABC = Chondroitinase ABC, Pen = Penicillinase.

Als sensorische Faserpopulation wurden *calcitonin gene-related peptide*-positive Fasern im Lumen des mMS ausgezählt (anti-CGRP, siehe Abbildung 33). Der Medianwert der mMS-Gruppe betrug 6,50 mit einem IQR von 10,00. Nach Injektion von ChABC kaudal und rostral des mMS betrug der Median 0,75 (IQR = 17,50) und nach Applikation über das mMS 0,50 (IQR = 1,88). Nach der Injektion von Penicillinase

konnten im Median 5,00 CGRP-positive Fasern (IQR = 5,63) im Lumen des mMS gezählt werden. Nach Applikation von Penicillinase über das mMS betrug der Median 2,25 (IQR = 7,50). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an CGRP-positiven Fasern im Lumen des mMS zwischen den Gruppen festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert = 0,190).



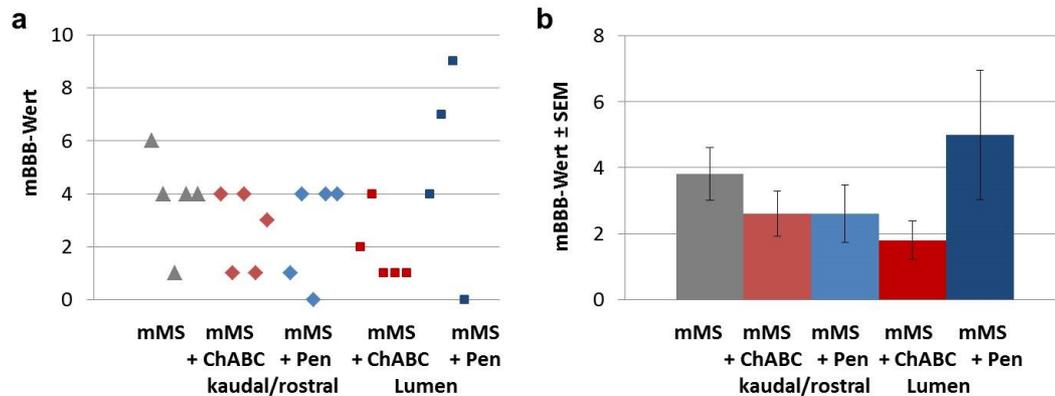
**Abbildung 33: Sensorische Fasern im Lumen des mMS fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung.** Dargestellt ist die Anzahl an *calcitonin gene-related peptide* positiven Fasern (anti-CGRP) im Lumen des mMS. In dem Streudiagramm entspricht jeder Punkt dem Wert eines Gewebeschnittes. Die Werte einzelner Tiere sind auf gleicher Höhe der X-Achse dargestellt (a). In dem Boxplot sind die Mediane und 25 %- und 75 %-Quartile je Gruppe dargestellt (b). Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert = 0,190). mMS = mechanisches Mikrokonnectorsystem, ChABC = Chondroitinase ABC, Pen = Penicillinase.

Es konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen ausschließlicher Behandlung mit mMS und kombinatorischer Behandlung mit ChABC in der Anzahl an Axonen, sowohl für alle neuronalen Fasern (anti-TUJ1), wie auch für die einzelnen untersuchten Faserpopulationen (anti-5HT, anti-TH und anti-CGRP) festgestellt werden, gleich welcher Applikationsweise.

#### 4.7.2 Die Kombinationsbehandlung führt nicht zu einer Verbesserung der Lokomotorik

Am Endzeitpunkt, fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung und Behandlung mit dem mMS und/oder ChABC bzw. deren Kontrolle der Penicillinase wurde die Lokomotorik der Tiere mittels des mBBB-Tests bewertet (siehe Abbildung 34). Im Mittel erreichten die Tiere, die nur mit dem mMS behandelt wurden, einen mBBB-Wert von  $3,80 \pm 0,80$  SEM. Die zusätzliche Injektion von ChABC kaudal und rostral des mMS führte zu einem mBBB-Wert von  $2,60 \pm 0,68$  SEM und die Applikation über das mMS zu einem mBBB-Wert von  $1,80 \pm 0,58$  SEM. Die Injektion von Penicillinase führte zu einem

mBBB-Wert von  $2,60 \pm 0,87$  SEM und die Applikation über das mMS zu einem mBBB-Wert von  $5,00 \pm 1,96$  SEM. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (*One-way ANOVA*, p-Wert = 0,251).



**Abbildung 34: Lokomotorik (mBBB) fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung.** Fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung wurde der mBBB als lokomotorischer Test durchgeführt. Die mBBB-Werte der einzelnen Tiere sind in (a), die Mittelwerte je Gruppe ( $\pm$  SEM) sind im Abbildungsteil (b) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (*One-way ANOVA*, p-Wert = 0,251). mMS = mechanisches Mikrokonnektorsystem, ChABC = Chondroitinase ABC, Pen = Penicillinase.

## 5 Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war die elektrophysiologische Analyse nach Anwendung einer neuartigen Therapie, bei dem das Läsionsareal nach Rückenmarkverletzung durch ein mechanisches Mikrokonnectorsystem (mMS) überbrückt wird. Dazu wurden zunächst elektrophysiologische Messungen im gesunden Tier vor Ort erfolgreich etabliert. In dieser Arbeit konnte erstmalig eine motorische Rekonnectivität zwei bis sechs Monate nach kompletter Durchtrennung des Rückenmarks in Höhe des Thorakalwirbels 8 mit anschließender mMS Behandlung nachgewiesen werden. Eine sensorische Rekonnectivität konnte in diesem Zeitraum nach Läsion nicht gezeigt werden. Eine Korrelation zwischen motorischer Rekonnectivität und Lokomotorik wurde nicht festgestellt. In einem Pilotexperiment wurde neben dem mMS in einem kombinatorischen Ansatz das Enzym Chondroitinase ABC (ChABC) getestet, welches CSPGs spaltet, wodurch sie weniger inhibitorisch auf regenerierende Axone wirken. Dabei konnten keine synergistischen Effekte auf die Axonregeneration und Lokomotorik festgestellt werden. Die Ergebnisse werden im Folgenden näher betrachtet und in Bezug zur Literatur gesetzt.

### 5.1 Elektrophysiologie

#### 5.1.1 Elektrophysiologische Messungen am gesunden Tier

Elektrophysiologische Messungen können als diagnostische Methode nach Rückenmarkverletzung genutzt werden (Wallesch et al. 2005). Bei einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks sollten keine Signale mehr vorhanden sein, da die Verbindung zwischen Gehirn und Muskel unterbrochen ist. Wenn eine Regeneration von Neuronen über die Läsion stattfindet und letztendlich zur Innervation von Muskeln führt, sollte dies zu messen sein. Die Methodik der elektrophysiologischen Messungen wurde vor Ort neu aufgebaut und im Vergleich zur Literatur etwas abgewandelt. Allgemein ist vorweg zu sagen, dass mit den hier verwendeten Methoden erfolgreich evozierte Potentiale (MEPs und SSEPs) im gesunden Tier gemessen werden konnten. Im Folgenden werden zunächst die Signale gesunder Tiere genauer betrachtet.

##### 5.1.1.1 Motorisch evozierte Potentiale gesunder Tiere

Bei den motorisch evozierten Potentialen (MEPs) wird ein Stimulus am Schädel in Höhe des motorischen Kortex gegeben und das korrespondierende Signal, das MEP, am Muskel abgeleitet. In dieser Arbeit wurde das MEP am *musculus tibialis anterior*, dem vorderen Schienbeinmuskel, gemessen. In allen Tieren waren MEPs im gesunden Zustand, vor der Rückenmarkverletzung, messbar. Die MEPs sehen in ihrer Latenz und Amplitude je nach Stimulationsstärke unterschiedlich aus. Es fällt auf, dass es zwei Latenzbereiche gibt in denen Signale auftreten. Einen frühen Bereich mit niedri-

gen Latenzen (ca. 5 ms), wo Signale erst bei höheren Reizstärken erscheinen und einen späten Bereich mit hohen Latenzen (ca. 17 ms), wo Signale auch schon bei niedrigen Reizstärken auftreten (siehe Abbildung 18). Des Weiteren treten bei noch höheren Reizstärken zusätzlich noch spätere Signale auf (ca. 25 bis zu 40 ms), die jedoch nicht in jedem Tier vorhanden waren bzw. nicht immer vom zweiten Latenzbereich unterschieden werden konnten.

Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass andere Wissenschaftler ähnliche Beobachtungen machen und motorisch evozierte Potentiale messen, die sie in einen frühen (5 – 8 ms) und späten Latenzbereich (ca. 15 ms) einteilen (Schlag et al. 2001; Redondo-Castro et al. 2016; Jang et al. 2011). Es scheint, dass Signale in diesen beiden Bereichen zunächst mittels unterschiedlicher Stimulationsmethoden ausgelöst werden können. Durch eine monopolare Stimulation, wobei eine Elektrode am motorischen Kortex und die andere am Gaumen angebracht wird, werden in erster Linie Signale des frühen Latenzbereiches ausgelöst (Schlag et al. 2001; Shiau et al. 1992; Zappulla et al. 1988; Ryder et al. 1991). Durch eine bipolare Stimulation, mit einer Platzierung beider Elektroden am Schädel, werden Signale des zweiten, späten Latenzbereiches ausgelöst (Schlag et al. 2001; Shiau et al. 1992; Ryder et al. 1991). Wenn jedoch die Signalstärken erhöht werden, können bei sowohl der monopolarer, als auch der bipolaren Stimulation zusätzlich Signale des jeweils anderen Latenzbereiches gemessen werden (Schlag et al. 2001; Redondo-Castro et al. 2016). Dies kann in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Bei der hier angewandten Stimulation mit zwei Elektroden am Schädel, erscheinen bei niedrigen Stimulationsintensitäten zunächst Signale mit hohen Latenzen und bei Erhöhung der Reizstärke kommen zusätzlich Signale mit niedrigen Latenzen hinzu.

Wie kommen diese unterschiedlichen Latenzen zustande? Unterschiedliche Zeitspannen, die ein Signal braucht um am Muskel anzukommen bzw. eine Antwort im Muskel hervorzurufen, können durch mehrere Faktoren bestimmt werden. Auf zellulärer Ebene betrachtet führen erstens längere Axone bzw. ein längerer Weg, den ein Signal überwinden muss, zu größeren Latenzen. So ist der Weg zum Vorderbein z. B. kürzer als der Weg zum Hinterbein und somit die Latenzen von MEPs der Muskeln des Hinterbeines größer. Zweitens haben der Myelinisierungsgrad und die Dicke der Axone Einfluss auf die Leitgeschwindigkeit. Eine vermehrte Myelinisierung und/oder eine Verdickung der Axone führen aufgrund einer verbesserten Isolierung und einem geringeren Widerstand zu einer schnelleren Übertragung. Drittens verliert ein Signal an Zeit je öfter es auf andere Neurone verschaltet wird. Bei der Innervation des Muskels erhöht zudem die Übertragung an der motorischen Endplatte und Weiterleitung an der Muskelfaser die Latenz des Signals (Kandel et al. 2000). Auf anatomischer Ebene weisen MEPs mit unterschiedlichen Latenzen auf die Aktivierung unterschiedlicher Fasertrakte hin. Fasertrakte der motorischen Bahnen auf die Muskeln sind der kortikospinale, rubrospinale, vestibulospinale, retikulospinale und der tektospinale Trakt

(Schmidt und Schaible 2006), wobei der tektospinale Trakt in den zervikalen Bereich projiziert und der Kontrolle von Hals, Rumpf und Schultern dient (Bear et al. 2018) und sich bei den Messungen am *musculus tibialis anterior* vermutlich nicht widerspiegelt. Eine Modulation der Lokomotorik findet außerdem noch über den coerulespinalen und raphespinalen Trakt und über die Fasern der A11 Zellgruppe statt (Kim et al. 2017; Watson et al. 2009; Sharples et al. 2014; siehe Abschnitt 2.6 Fasertrakte des Rückenmarks).

Ein Vergleich der hier erfolgten MEP Messungen der Ratte mit der Literatur z. B. zu Schlag et al. (2001) legt nahe, dass es sich zumindest bei dem Signal des späten Latenzbereichs um Signale des kortikospinalen Traktes handeln könnte. Die hier gemessenen Latenzen von  $16,7 \pm 1,9$  ms SD ähneln denen von Schlag et al. bezeichneten CMEPs (*corticomotor evoked potential*,  $18,5 \pm 1,3$  ms SD). Bei einem direkten Vergleich der Latenzen ist jedoch zu beachten, dass in der Arbeit von Schlag et al. die Latenzen anders definiert wurden. Bei Schlag et al. ist die Latenz die Zeit von Gabe des Stimulus bis zum ersten Peak des Signals. In dieser Arbeit ist die Latenz die Zeit bis zur ersten Auslenkung der Kurve, da die Analyse der MEPs der Analyse am Menschen angelehnt wurde (Milnik 2009). Außerdem wurden die Koordinaten in dieser Arbeit etwas abgewandelt (siehe Abschnitt 3.3.3). Dies könnte ein Grund für die kleine Abweichung der Latenzmittelwerte von 1,8 ms sein. Mittels einer dorsalen Hemisektion, die nur den dorsalen kortikospinalen Trakt durchtrennt, konnten Schlag et al. zeigen, dass die CMEPs verschwinden und somit vermutlich einen kortikalen Ursprung haben. Die Zellkörper der Neurone dieses Trakts liegen vor allem in motorischen Kortexgebieten (Schmidt und Schaible 2006). Bei den CMEPs, wie auch in dieser Arbeit, lag der Stimulationsort über diesem kortikalen Bereich. Zudem ist die Leitgeschwindigkeit der CMEPs von 10 m/s bei Schlag et al. ein Indiz für einen kortikalen Ursprung. Direkt stimulierte kortikospinale Neurone übertragen Signale mit einer Geschwindigkeit von 5 bis 19 m/s (Mediratta und Nicoll 1983). Die späte MEP Komponente in dieser Arbeit liegt mit 12 m/s ebenfalls in diesem Bereich, was die These des kortikalen Ursprungs der späten MEP Komponente zusätzlich unterstützt.

Die hier gemessenen MEPs des frühen Zeitbereiches ( $5,3 \pm 0,8$  ms SD) ähneln den von Schlag et al. beschriebenen BMEPs ( $6,7 \pm 0,4$  ms SD). Schlag et al. argumentieren, dass es sich bei den BMEPs um Signale handelt, die ihren Ursprung im Hirnstamm haben (BMEP = *brainstem-derived motor evoked potential*). Erstens, da durch die andere Anordnung der Elektroden, mit einer Elektrode an der Basis des Hirnstamms, der Hirnstamm direkt gereizt werden könnte. Zweitens, da die Signale nicht durch die Durchtrennung des Hinterstrangs des Rückenmarks aufgehoben wurden. Bei dieser Läsionsart sind die Trakte, die dem Hirnstamm entspringen noch intakt. Da in dieser Arbeit direkt am Kortex gereizt wurde und nicht wie bei den BMEP Messungen zwischen Gaumen und Zerebellum, könnten die in der vorliegenden Arbeit gemessenen frühen Signale auch einen anderen Ursprung haben. Aufgrund eines Auftretens

erst bei höheren Stimulationsstärken wäre eine Reizung von benachbarten Gebieten, mitunter bis zum Hirnstamm jedoch ebenfalls denkbar. Schlag et al. dokumentieren zudem bei den CMEPs ebenfalls Potentiale im frühen Latenzbereich (5 – 7 ms) nach einer hohen Reizintensität. Bei Schlag et al. erscheinen die frühen Signale jedoch erst bei höheren Stimulationsstärken als in dieser Arbeit (ca. 7 mA vs. 13 mA). Dies könnte mitunter an den verschiedenen Elektrodenpositionen am Kortex und/oder an unterschiedlichen Narkosetiefen liegen. Schlag et al. nehmen aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen dem frühen Anteil des CMEPs und dem BMEPs ebenfalls an, dass es sich dabei um Signale des Hirnstammes handeln könnte. Jedoch verwerfen die Autoren alle CMEPs, die ein frühes Signal aufzeigen, denn sie befürchten eine Verwechslung von dem späten, vermutlich wahren kortikalen Anteil des CMEPs, mit den späten Signalen, die manchmal bei ihren BMEP Messungen auftreten. Diese späten Signale der BMEP Messungen sind laut Schlag et al. sehr inkonsistent in ihrem Auftreten, manchmal sind sie vorhanden und manchmal nicht. Ihr Ursprung ist nicht geklärt, einen kortikalen Ursprung schließen Schlag et al. jedoch aus, da sie nicht bei allen Tieren nach der Durchtrennung des CST verschwinden. Schlag et al. berichten, dass die späten Signale des BMEPs jedoch nie ohne das Signal des frühen Zeitbereiches auftreten. Dies ist in dieser Arbeit nicht der Fall, die Signale des späten Zeitbereiches sind bei niedrigen Stimulationsstärken auch ohne Potentiale im frühen Latenzbereich vorhanden. Die frühen Signale erscheinen erst bei höheren Reizstärken. Es spricht daher eher dafür, dass es sich in dieser Arbeit bei den Signalen des späten Zeitbereiches, zumindest bei den niedrigen Stimulationsintensitäten, um Signale handelt, die vom Kortex stammen. Der Stimulationsort in dieser Arbeit liegt über dem motorischen Kortex und nicht am Hirnstamm wie bei der Messung der BMEPs. Folglich sollte erst eine erhöhte Stimulationsstärke den Hirnstamm erreichen, was mit den elektrophysiologischen Messungen konform ist.

Schlag et al. sind nicht die einzigen, die eine Auftrennung des MEPs in unterschiedliche Latenzbereiche aufzeigen. Redondo-Castro et al. (2016) berichten in ihrer Arbeit ebenfalls von den wie hier auftretenden frühen und späten MEP Komponenten. Sie bezeichnen die unterschiedlichen Latenzbereiche als N1 Peak (niedrige Latenz, 5 – 8 ms) und polyphasischen N2 Peak (hohe Latenz, ca. 15 ms). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen MEPs ( $5,3 \pm 0,8$  ms SD und  $16,7 \pm 1,9$  ms SD) liegen also in dem Latenzbereich der N1 und N2 MEP Komponenten. Auch Redondo-Castro et al. legen mit ihrer Studie nahe, dass die N2 Komponente, also die Signale des späten Latenzbereichs, einen kortikalen Ursprung haben. Nach einer Ablation des sensomotorischen Kortex ist die N2 Komponente verschwunden, die N1 Komponente bleibt jedoch erhalten. Außerdem ist die N2 Komponente nach einer Läsion des dorsalen Funiculus, also einer teilweisen Durchtrennung des kortikospinalen Trakts, stark in ihrer Amplitude reduziert. Die N1 Komponente ist nur leicht verändert.

Sun et al. (2000) messen ebenfalls ein frühes MEP. Sie vermuten, dass an dem frühen MEP mehrere Signalwege beteiligt sind. Sie gingen der Frage nach der Herkunft des frühen MEPs mittels verschiedener Läsionsarten nach, die jeweils andere Teile der weißen Substanz verschonten. Bei diesen Läsionen wurden entweder die ventrale, die ventrolaterale, die laterale oder die dorsolaterale weiße Substanz ausgespart, da dort verschiedene motorische Trakte verlaufen (vestibulo-, retikulo- und rubrospinaler Trakt, Watson und Harvey 2009; siehe auch Abbildung 7). Jedoch waren bei allen Läsionen die MEP Amplituden gleichermaßen drastisch reduziert. Dieses Ergebnis legt nahe, dass kein bestimmter Bereich und somit axonaler Trakt des Hirnstammes allein verantwortlich für die frühe Komponente des MEPs ist. Adamson et al. (1989) führten ähnliche Läsionsexperimente durch und maßen MEPs direkt im Rückenmark. Sie legen nahe, dass zum großen Teil der retikulospinale Trakt an dem MEP beteiligt ist, jedoch auch andere Hirnstammtrakte dazu beitragen.

Auch weitere Arbeiten legen nahe, dass MEPs mit einer niedrigen Latenz (5 – 8 ms) ihren Ursprung im Hirnstamm haben, wohingegen MEPs mit einer hohen Latenz (ca. 15 ms) ihren Ursprung im Kortex haben (Gruner et al. 1993; Sun et al. 2000; Gruner et al. 1993; Kalderon und Fuks 1996; Kamida et al. 1998). Die in dieser Arbeit gemessenen MEPs zeigen eine gute Übereinstimmung zu den in der Literatur beschriebenen MEPs auf. Trotz unterschiedlicher Methoden der MEP Stimulation (z. B. Ort und Art der Stimulation, unterschiedlich verwendeter Narkotika) werden doch Signale in ähnlichen Latenzbereichen gemessen.

Die MEP Amplituden hingegen variieren sehr stark zwischen einzelnen Studien. Die Amplituden der MEPs in dieser Studie unterscheiden sich z. B. stark von den Amplituden der Potentiale bei Schlag et al. (2001). Hier haben die MEPs mit hohen Latenzen Amplituden von  $1,0 \pm 0,6$  mV SD, bei Schlag et al. haben die CMEPs Amplituden von nur  $0,027 \pm 0,009$  mV SD. Bei den niedrigen Latenzen treten in dieser Arbeit Amplituden von  $16,0 \pm 8,7$  mV SD auf, bei Schlag et al. sind die Amplituden der BMEPs jedoch nur  $0,103 \pm 0,37$  mV SD groß. Die Amplituden sind somit in dieser Arbeit um ein Vielfaches höher als in der Arbeit von Schlag et al., bei den MEPs mit hohen Latenzen um ein 37faches und bei den MEPs mit niedrigen Latenzen sogar um ein 155faches.

Redondo-Castro et al. (2016) messen bei Stimulationsstärken von 30 bis 40 mA für den N1 Peak eine Amplitude von im Mittel 40 mV. Diese Reizintensitäten wurden in der vorliegenden Arbeit nicht getestet. In dieser Arbeit wurde bis zur supramaximalen Stimulation gereizt, was einer Stimulationsstärke je nach Tier von 8 bis 18 mA entsprach. Bei Redondo-Castro et al. sieht es für den N1 Peak so aus, als ob sie ebenfalls ein Plateau maximaler Stimulation erreichten. Für den N2 Peak werden bei 40 mA Reizung Amplituden von 4 bis 8 mV gezeigt, dabei ist eine maximale Stimulation evtl. aber noch nicht erreicht worden. Die maximalen Amplituden des N1 Peaks sind in der Arbeit von Redondo-Castro et al. somit um das 2,5fache und des N2 Peaks um mindestens das 4fache größer als die Amplituden in der vorliegenden Arbeit.

Die Amplituden der N1 und N2 Komponenten der Arbeit von Redondo-Castro et al. scheinen zwar höher als die Amplituden in dieser Arbeit zu sein, aber nicht in einem solchen Maße abzuweichen wie von den Amplituden der MEPs bei Schlag et al. (2001). Die Amplituden der MEPs bei Schlag et al. sind um ein Vielfaches kleiner. Gründe für die abweichenden Amplituden liegen vermutlich an der unterschiedlichen Methodik der elektrophysiologischen Messungen. Redondo-Castro et al. verwendeten ein anderes Narkosemittel (Natrium-Pentobarbital) und stimulierten mittels Nadelelektroden subkutan am Schädel. Für eine Stimulation über die subkutanen Nadelelektroden ist im Gegensatz zu den implantierten Schrauben mit höheren Stimulationsstärken zu rechnen um MEPs gleicher Amplitude auszulösen, da der Schädel bei der subkutanen Stimulation noch als Widerstand überwunden werden muss. Es ist auch keine genaue Stimulation des Hinterbeins zu erwarten, da die Nadeln nicht stereotaktisch über dem entsprechenden motorischen Bereich gesetzt wurden. Diese beiden letztgenannten Faktoren könnten die unterschiedlichen Stimulationsstärken in dieser und der Arbeit von Redondo-Castro et al. erklären, die nötig sind um ein supramaximales MEP auszulösen. Eine Verwendung des Anästhetikums Natrium-Pentobarbital in niedriger Dosierung (25 mg/kg, i. p.) könnte ein Grund für die dennoch höheren MEP Amplituden bei Redondo-Castro et al. sein, denn eine niedrige Dosis Pentobarbital blockiert die motorische Fortleitung nicht so sehr wie eine hohe Dosis Ketamin/Xylazin, wie z. B. von Schlag et al. verwendet wurde (Ketamin/Xylazin 75/10 mg pro kg Körpergewicht i. p.) (Oria et al. 2008). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Dosis an Ketamin/Xylazin war etwas niedriger (55/5 mg pro kg Körpergewicht, i. p.) und hatte vielleicht deshalb einen weniger blockierenden Effekt auf die MEPs als die von Schlag et al. verwendete Dosis.

Zusätzlich variieren die Amplituden auch innerhalb einer Studie. So sind die Varianzen der Amplituden sowohl innerhalb dieser Studie wie z. B. auch innerhalb der Studie von Schlag et al. (2001) hoch. Ein Grund dafür ist vermutlich die Narkosetiefe, denn die Amplituden der MEPs variieren mit Änderung dieser (Zandieh et al. 2003; Oria et al. 2008). Um die Narkosetiefe besser kontrollieren zu können müsste ein noch engmaschigeres Narkosemonitoring durchgeführt werden, mitunter mit einem zusätzlichen Experimentator, der die Narkose überwacht. Bei den Stimulationsstärken, die bei den gesunden Tieren zum Vergleich mit den lädierten Tieren herangezogen werden, sind die Varianzen noch größer als bei supramaximaler Stimulation (siehe Tabelle 7). Dies könnte neben der Narkosetiefe zusätzlich daran liegen, dass die Messung sich hier eben nicht in dem Bereich der supramaximalen Reizung, sondern nahe einem Schwellenbereich befindet, wo die Amplituden bei erhöhter Stimulation noch weiter zunehmen. Daher ist ein Vergleich der Amplituden am besten bei supramaximaler Stimulation durchzuführen. Dies war in der vorliegenden Arbeit aufgrund der Beeinflussung der Messung durch eine Bewegung des Körpers bei hohen Stimulationsstärken jedoch nicht möglich. Auch ein Einfluss der Körperbewegung auf die zuvor diskutierten, bei

supramaximalem Stimulus ausgelösten MEPs, kann nicht ausgeschlossen werden, jedoch geht der Effekt, der im niedrigen  $\mu\text{V}$ -Bereich liegt, vermutlich in den größeren, im  $\text{mV}$ -Bereich liegenden Signalen der gesunden Tiere unter (siehe dazu auch die Diskussion der Ergebnisse der Retranssektion in Kapitel 5.1.2.1).

Ein Vergleich von Amplituden mit bzw. innerhalb der Literatur ist schwierig, da sich zwischen verschiedenen Studien viele Parameter mit Einfluss auf die MEPs unterscheiden können. Es sollte darauf geachtet werden, welches Narkosemittel gewählt und bei welcher Narkosetiefe die Messung durchgeführt wurde (Oria et al. 2008; Zandieh et al. 2003). Zudem kann die elektrophysiologische Messung an sich die MEPs sowohl in Amplitude wie auch Latenz beeinflussen, je nachdem welche Messmethode benutzt wurde [Art der Elektroden, Reizort, Ableitort, Stimulationsfrequenz, Reizintensität, Filterung, Einzel- oder Mehrfachpulse (Milnik 2009; Redondo-Castro et al. 2016)]. Sind z. B. Anode und Kathode der Reizelektrode vertauscht kann das Signal je nach Abstand der Elektroden bis zu 1 ms verzögert sein (Milnik 2009). Die Referenzelektrode der Ableitung sollte besser an einem inerten Bereich, wie z. B. an einer Sehne angebracht werden (Milnik 2009) was für folgende Messungen geändert werden sollte. Des Weiteren gibt es viele andere Faktoren, welche die Signale beeinflussen können, wie z. B. das Alter und die Körpertemperatur des Organismus (Bischoff und Dengler 2018). Eine Temperaturabnahme pro Grad Celsius führt zu einer Verzögerung von 0,2 ms bzw. einer Verminderung der Leitgeschwindigkeit von 1,5 bis 2,5 m/s (Bischoff und Dengler 2018). Dementsprechend sollte auf diese Parameter bei einem Vergleich von evozierten Potentialen geachtet werden.

### 5.1.1.2 Somatosensorisch evozierte Potentiale gesunder Tiere

Bei den somatosensorisch evozierten Potentialen (SSEPs) wird ein Stimulus am Fuß gegeben und das korrespondierende Signal, das SSEP, am somatosensorischen Kortex abgeleitet. In allen Tieren waren SSEPs im gesunden Zustand vor Rückenmarkverletzung messbar. Die SSEPs im gesunden Tier zeigen drei prominente Ausschläge. Zunächst einen negativen (N1), gefolgt von einem positiven (P1) und wieder einem negativen Peak (N2). Auch in der Literatur ist dies ebenfalls an Ratten beschrieben worden (Schlag et al. 2001; Cloud et al. 2012; Vipin et al. 2016; Teh et al. 2018; Bazley et al. 2011). Andere Arbeiten beschreiben noch weitere Peaks wie z. B. Stienen et al. (2003), die zeigen, dass die SSEPs je nach Stimulations- und Ableitort unterschiedlich aussehen können.

Zusammenfassend erscheint die hier angewandte Methodik zur Bestimmung von MEPs und SSEPs in gesunden Tieren geeignet zu sein. In allen Tieren konnten vor Läsion evozierte Potentiale gemessen werden. Die hier verwendete Methode bietet den Vorteil, dass sie die Messung sensorischer und motorischer Potentiale verbindet. Somit konnten Tiere geschont und nur halb so oft narkotisiert werden, bzw. weniger

Tiere eingesetzt werden, als wenn die Messung von MEPs und SSEPs getrennt stattgefunden hätte.

### 5.1.2 Elektrophysiologische Messungen am lädierten Tier

Die zuvor an gesunden Tieren etablierte Methode wurde im Folgenden an Tieren mit einer kompletten Transsektion des Rückenmarks angewendet. Nach dieser ist zunächst mit einem vollständigen Verschwinden der evozierten Potentiale zu rechnen. Zur Verifizierung, dass die Elektroden für die Messung von MEPs richtig gesetzt wurden, erfolgte deshalb ebenfalls eine Messung von Muskelsummenaktionspotentialen nach Ischiasnervreizung (CMAPs). In allen Fällen waren CMAPs zu messen und eine richtige Elektrodenplatzierung war damit gegeben. Da die Schrauben für die Messung von SSEPs implantiert wurden und SSEPs im gesunden Zustand zu messen waren, war eine Verifizierung der Elektrodenplatzierung bei der SSEP Messung im lädierten Tier nicht notwendig.

#### 5.1.2.1 Motorisch evozierte Potentiale lädierter Tiere

Nach einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks in Höhe des Thorakalwirbels 8 waren die im gesunden Zustand zu messenden MEPs zunächst nicht mehr vorhanden. Auch bis zu sechs Monaten nach Rückenmarkverletzung kam es nicht zur spontanen Wiederherstellung der MEPs in den komplett lädierten, unbehandelten Tieren. Die Implantation des mMS hingegen war erfolgreich. Nach mMS Implantation konnte im Gegensatz zu den Kontrolltieren nach zwei bis sechs Monaten wieder ein motorisch evoziertes Potential gemessen werden. Es besteht ein signifikanter Unterschied im Auftreten von MEPs zwischen der Kontroll- und mMS-Gruppe gleich wie streng die Auswahlkriterien gelegt werden (Abbildung 20 und Abbildung 21). Dies bedeutet, dass es in den mMS-Tieren nicht nur zum Auswachsen von Axonen über die Läsion hinaus kam (Brazda et al. 2013; Estrada et al. 2018b), sondern auch zu einer funktionellen Verschaltung bis in den Schienbeinmuskel (*musculus tibialis anterior*).

Die Retranssektion legt dies zusätzlich nahe. Sie wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich bei den gemessenen MEPs nicht nur um Artefakte handelt, die z. B. durch Volumenleitung oder Stimulation von Bahnen, die im Rückenmark über der Läsion ihren Ursprung haben, hätten entstehen können. Solche Bahnen können benachbarte Muskeln innervieren (z. B. der axialen Spinalmuskulatur oder des Rumpfhautmuskels) und Störsignale im *musculus tibialis anterior* auslösen (Takeoka et al. 2011; Gruner et al. 1993). Bei der Retranssektion wurde 4 mm kaudal der Läsion erneut das Rückenmark und somit regenerierte Axone komplett durchtrennt. Bei hohen Stimulationsstärken kam es zum Ausschlag der Kurve im  $\mu\text{V}$ -Bereich, jedoch auch zu einer Bewegung des ganzen Körpers des Tieres. Der Ausschlag der Kurve kann durch die Bewegung der Elektroden bei der Körperbewegung hervorgerufen worden sein.

Werden die Elektroden manuell bewegt kommt es ebenfalls zu einem Ausschlag der Kurve. Eine Kontraktion des *musculus tibialis anterior* konnte nicht beobachtet werden. Ein Effekt der Stimulation benachbarter Muskeln, deren Innervierung über Bahnen verläuft, die dem Rückenmark oberhalb der Läsion entsprungen sind, kann bei den hohen Stimulationsstärken nicht ausgeschlossen werden. Vermutlich sind solche Bahnen ursächlich für die Bewegung des Körpers verantwortlich. Dementsprechend wurden für die Analysen der Signale lädierter Tiere und den korrespondierenden Signalen gesunder Tiere nur Signale in die Analyse mit aufgenommen, die nicht zu einer Bewegung des ganzen Körpers führten. Andere Autoren sind ähnlich vorgegangen (Shiau et al. 1992). Bei niedrigeren den Messungen in den lädierten Tieren entsprechenden Stimulationsstärken konnten nach der Retranssektion keine MEPs mehr gemessen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass zuvor in den mMS behandelten Tieren eine intakte physiologische Verbindung mittels regenerierter Fasern über die Läsionsstelle hinaus bestanden hat. Demnach scheinen die im BBB und mBBB ermittelten lokomotorischen Verbesserungen nach mMS Implantation nicht ausschließlich auf Reflexen oder z. B. einer verbesserten sensorischen Modulation des *central pattern generators* zu beruhen (Brazda et al. 2013; Estrada et al. 2018b), sondern auf einer funktionellen axonalen Kontrolle des Gehirns. Auch eine vermehrte axonale Regeneration über die Läsionsstelle hinaus legt dies nahe (Estrada et al. 2018b, siehe dazu auch Abschnitt 5.2).

Entsprechen die MEPs der mMS behandelten Tiere denen der gesunden Tiere? Kam es zu einer Regeneration gleicher axonaler Bahnen? Oder kam es zu einer neuen Verschaltung und anderen Signalwegen? Die wiederauftretenden MEPs der mMS-Tiere nach Läsion könnten mit einer Latenz von  $8,4 \pm 1,9$  ms SD den Fasertrakten des frühen Latenzbereiches gesunder Tiere ( $7,8 \pm 1,4$  ms SD) entsprechen. Ein statistischer Vergleich der Latenzen zeigt keinen signifikanten Unterschied für den frühen, wohl aber für den späten Latenzbereich. Wie in Abschnitt 5.1.1.1 erwähnt, legen viele Studien nahe, dass die frühen Signale ihren Ursprung im Hirnstamm haben und nicht vom Kortex stammen (Gruner et al. 1993; Sun et al. 2000; Gruner et al. 1993; Calderon und Fuks 1996; Kamida et al. 1998). Regenerierte Fasern nach Rückenmarkverletzung und mMS Behandlung sind z. B. serotonerge- und katecholaminerge Fasern und Axone des kortikospinalen Trakts (CST) (Estrada et al. 2018). Serotonin kommt in den Fasern des raphespinalen Traktes (Trepel 2017) und zudem in Fasern des propriospinalen Systems (Conta und Stelzner 2009) vor. Katecholamine sind in den Fasern des coerulespinalen Traktes (Noradrenalin), der A11 Zellgruppe (Dopamin) (Trepel 2017; Watson et al. 2009) und ebenso in den Fasern des propriospinalen Systems (Dopamin) (Conta und Stelzner 2009) vorhanden. Die Fasern des CST sind glutamaterg. Sie sind zu einem großen Anteil dünn (Durchmesser 90 %  $< 4 \mu\text{m}$ , 2 % = 10 – 20  $\mu\text{m}$ , Schmidt und Schaible 2006) und unmyelinisiert (60 % markhaltig, 40 % marklos, Kahle und Frotscher 2018) und deren Leitungsgeschwindigkeit ist entsprechend langsam (Sun et

al. 2000; Schmidt und Schaible 2006). Ein Beitrag des CST zu dem frühen klaren Peak des regenerierten MEPs ist daher aufgrund der kurzen Latenzzeit eher unwahrscheinlich. Andererseits könnte die Welle nach dem ersten Ausschlag des MEPs dennoch auf einen Beitrag des kortikalen Traktes am regenerierten MEP hinweisen. Mit ca. 17 ms Latenz könnte die Welle nach dem ersten klaren Peak dem späten und evtl. kortikalen Anteil des MEPs eines gesunden Tieres entsprechen (ebenfalls ca. 17 ms, siehe auch Diskussion in Kapitel 5.1.1.1). Die Erscheinung eher als Welle im Gegensatz eines bzw. mehrerer klarer Peaks, könnte daran liegen, dass von den normalerweise markhaltigen Fasern einige bereits mehr und andere weniger bzw. noch nicht myelinisiert sind. Dementsprechend würde es Fasern mit vielen unterschiedlichen Leitgeschwindigkeiten geben, was zu einer Verbreiterung der Kurve bzw. einem Verschmelzen der einzelnen Peaks eines polyphasischen MEPs führen könnte. Denkbar ist auch eine Beteiligung von dünnen, noch nicht oder nur teilweise myelinisierten Fasern, die dem Hirnstamm entspringen. Eine Aussprossung noch intakter Axone des Hirnstammes oberhalb der Läsion und zusätzliche Verschaltung auf andere regenerierte Neurone ist ebenfalls möglich. Beide letztgenannten Wege würden zu einer verzögerten Reizantwort des frühen MEP Anteils führen, die ebenfalls der späten Welle entsprechen könnte. Demzufolge ist es nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen welche Fasertrakte an der späten Komponente bzw. Welle des regenerierten Potentials beteiligt sind. Es wäre interessant, neben den bereits untersuchten, noch weitere Faserbahnen zu analysieren, insbesondere solche, die dem Hirnstamm entspringen, wie z. B. den retikulospinalen Trakt. Für eine Übersicht der Fasertrakte siehe Abschnitt 2.6.

Läsionen, welche die intermediäre graue Substanz und den medialen Teil des lateralen Funiculus zerstören haben großen Einfluss auf MEPs (Sun et al. 2000; Adamson et al. 1989). Der retikulospinale Trakt, der mit diesen Gebieten überlappt (Peterson et al. 1975) ist wichtig für die Initiierung der Lokomotorik (Schmidt 2010) und manche Autoren legen nahe, dass er bei der Entstehung von MEPs beteiligt sein könnte (Fehlings et al. 1988; Adamson et al. 1989). Außerdem trägt er zum propriospinalen System bei (Valverde 1966; Shapovalov 1975). Interessanterweise wird das MEP in den Arbeiten von Adamson et al. (1989) nach einer versetzt bilateralen Hemisektion an T4 bis T6 zwar in seiner Amplitude reduziert, jedoch nicht komplett unterdrückt. Daher stellen sie die Hypothese auf, dass auch propriospinale Fasern an dem MEP beteiligt sein könnten. Verschaltungen über propriospinale Neurone wären hier ebenfalls als Signalweg denkbar. Dabei könnte eine Verschaltung auf verschiedensten Ebenen des Rückenmarks stattfinden, sowohl vor als auch nach der Läsionsstelle (Flynn et al. 2011). Es könnte eine Regeneration der propriospinalen Neurone über die Läsion hinaus stattgefunden haben. Um dies zu testen wurden erste Pilotexperimente durchgeführt und Methoden etabliert, die aber nicht Teil dieser Arbeit sind (Krebbers et al. 2015).

Die Behandlung mit dem mMS führt zu einer Wiederherstellung von motorisch evozierten Potentialen. Jedoch sind sie in ihrer Amplitude sehr klein, was zunächst auf eine

eher geringe axonale Rekonnektivität zum *musculus tibialis anterior* hinweisen könnte. Die Amplituden der MEPs in den lädierten Tieren liegen alle in einem ähnlichen Bereich ( $28 \pm 10 \mu\text{V SD}$ ). Die Amplituden der MEPs in den gesunden Tieren, bei korrespondierenden Stimulationsstärken, variieren jedoch sehr stark (früher Latenzbereich:  $532 \pm 528 \mu\text{V SD}$ , später Latenzbereich:  $1375 \pm 1066 \mu\text{V SD}$ ). So ist die Amplitude zumindest in einem gesunden Tier in einem ähnlichen Amplitudenbereich wie die Signale in den mMS-Tieren (Abbildung 23). Die Variation der Amplituden macht es schwierig sie zwischen den behandelten und den gesunden Tieren zu vergleichen. Ein Grund für die Abweichung wird in der Höhe der Stimulationsintensität gesehen. Bei Reizstärken, bei denen sich nicht der ganze Körper bewegt, befinden sich die MEPs in einem Schwellenbereich. Bei höherer Stimulation werden mehr Muskelfasern aktiv und die Amplituden der MEPs nehmen zu. Die Amplitude wird zudem durch die Narkosetiefe beeinflusst (Zandieh et al. 2003; Oria et al. 2008) und dadurch schwanken die Amplituden zwischen den Tieren und auch innerhalb der Messung eines Tieres. Ein Vergleich der Amplituden ist dementsprechend nur am Punkt supramaximaler Reizung, an dem alle Fasern aktiv sind sinnvoll und zusätzlich sollte die Narkose genau beobachtet werden. Für eine Auswertung der Amplitude wäre eine Trennung von SSEP und MEP Messungen vermutlich besser, denn SSEPs und MEPs des frühen Zeitbereichs sollten möglichst beide unter tiefer Narkose durchgeführt werden und kortikale MEPs des späten Zeitbereichs unter leichter Narkose (Zandieh et al. 2003). Da diese Messungen sehr aufwendig sind, können sie nur schwer in der Zeit, in der das Tier in tiefer Narkose liegt durchgeführt werden. Die Messung von MEPs und SSEPs in unterschiedlichen Tieren hätten den weiteren Vorteil, dass die Koordinaten am Kortex entsprechend genauer für die Sensorik und die Motorik gesetzt werden könnten. Damit würden weniger große Stimulationsstärken zur Auslösung der MEPs benötigt werden und diese würden möglicherweise nicht mit Bewegungen des Körpers kollidieren.

### 5.1.2.2 Somatosensorisch evozierte Potentiale lädierter Tiere

In den unbehandelten komplett lädierten Tieren, wie auch in den Tieren die mit dem mMS behandelt wurden, konnte sowohl direkt eine Woche nach der Rückenmarkverletzung, wie auch bis zu sechs Monate nach Rückenmarkverletzung kein somatosensorisches Potential gemessen werden. Ob es sich hierbei um eine Messungenauigkeit handelt oder ein echtes Ausbleiben der Sensorik ist bei Ratten schwer zu bestimmen. Aufgrund der Automutilation bei ein paar Tieren könnte vermutet werden, dass SSEPs zu messen sein sollten. Die SSEPs sind jedoch schon im gesunden Tier sehr klein in ihrer Amplitude und liegen im  $\mu\text{V}$ -Bereich (siehe Abschnitt 4.1.2) und sind daher stark von Rauschen betroffen. Dem wird eine sich wiederholende Messung gegenübergesetzt, um durch Mittelung der Signale, das SSEP vom Rauschen abzuheben. Aufgrund der geringen Zeit, die zur Verfügung stand MEPs und SSEPs während einer Narkose zu messen, konnten in diesem Fall jedoch nicht viele Kurven gemittelt werden. Es

könnte auch argumentiert werden, dass durch die wiederholte Reizung bei der Stimulation der MEPs die SSEPs negativ beeinflusst wurden. Schlag et al. konnten in ihrer Arbeit dem jedoch widersprechen in dem sie zeigten, dass auch nach wiederholten MEP Messungen im selben Tier die SSEPs nicht negativ beeinflusst werden. Die Amplitude hatte sogar eher den Trend höher zu sein, die Latenzen blieben unverändert (Schlag et al. 2001).

### 5.1.2.3 Automutilation – Verlust von Tieren

Leider kam es bei einigen Tieren zu so starker Automutilation, dass sie eingeschlüfert werden mussten. Ratten können nach einer Rückenmarkverletzung eine Dysästhesie bzw. im speziellen eine Parästhesie ausbilden (Zhang et al. 2001; Firouzi et al. 2015). Dabei kommt es zu Missempfindungen der Haut, die als Kribbeln, Ameisenlaufen oder Nadelstichgefühl empfunden werden (R20.2 nach ICD-10-GM 2020 Systematisches Verzeichnis 2019). Dies kam jedoch in gleichem Maße in beiden Gruppen zustande und es war keine Tendenz zu einer Gruppe zu beobachten (Kontrolle TX- vs. mMS-Gruppe).

## 5.2 Lokomotorik nach Rückenmarkverletzung

Parallel zu den elektrophysiologischen Messungen wurde die Lokomotorik der Hinterbeine mittels des mBBBs (Basso et al. 1995; Antri et al. 2002; Estrada et al. 2014) ab Woche sechs nach Rückenmarkverletzung bewertet. Es wurde der mBBB-Wert der Kontrollgruppe dem mBBB-Wert der mit dem mMS behandelten Gruppe gegenübergestellt (siehe Abbildung 27). Hier ist eine Tendenz zu einer verbesserten Lokomotorik nach Rückenmarkverletzung mit der Behandlung des mMS zu erkennen (Woche 6 bis 12 nach Rückenmarkverletzung). Tiere mit mMS erreichten höhere maximale mBBB-Werte als die komplett lädierten Kontrolltiere (mBBB-Wert von 21 vs. mBBB-Wert von 12). Im Durchschnitt wurde von den komplett lädierten Kontrolltieren ein mBBB-Wert von höchstens 4 erreicht, was einer schwachen, gelegentlich alternierenden Bewegung der Hinterbeine entspricht. Der im Mittel höchste erreichte mBBB-Wert der mMS-Gruppe ist 11, dabei kommt es zu stark ausgeprägten, konsistent alternierenden Bewegungen der Hinterbeine. Zusätzlich können die Tiere gelegentlich ihr Gewicht unterstützen (siehe Skala im Anhang A.2). Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen jedoch keine Signifikanzen zwischen den Gruppen auf, was vermutlich an der geringen Tieranzahl (N = 4 je Gruppe) und der damit zusammenhängenden geringen statistischen Power beruht. Wie in Estrada et al. (2018b) zu entnehmen ist, liegt bei einer höheren Tieranzahl ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen vor. Die Implantation des mMS führt zu einer verbesserten Lokomotorik im Vergleich zur komplett lädierten Kontrollgruppe. Was jedoch in beiden Arbeiten auffällt ist, dass die mBBB-Werte nach längerer Zeit nach Rückenmarkverletzung und Erholung wieder

abnehmen (zwischen Woche 12 bzw. 15 und 21 nach Rückenmarkverletzung) und sich dem Niveau der Kontrollgruppe angleichen. Verschiedene Gründe für diesen Abfall sind denkbar. Am nächstliegenden ist, dass er auf einer Veränderung auf Ebene der Muskeln oder Sehnen beruht, denn es wurde festgestellt, dass nach dieser Zeit vermutlich die Sehnen der Tiere stark verkürzen. Dies wurde erstmalig nach 12 Wochen bzw. im Durchschnitt nach 21 Wochen nach Rückenmarkverletzung beobachtet, was konform mit den Änderungen im mBBB ist (siehe Abbildung 27). Die Verkürzung der Sehnen an den Hinterbeinen hätte Einfluss auf die gesamte Lokomotorik und somit den mBBB-Wert. Für weitergehende Studien wäre daher eine Dehnung der Hinterbeine nützlich, damit der Abfall der mBBB Kurve, durch die Verkürzung der Sehnen ausgeschlossen werden kann. Der mBBB-Wert verschlechtert sich ungefähr zu dem Zeitpunkt, an dem sich die Messung der MEPs verbessert bzw. erstmals möglich ist (zwei bis sechs Monate nach mMS-Implantation). Daher scheint der Grund für den Abfall der mBBB-Kurve zunächst nicht an einer Verschlechterung in der axonalen Rekonnektivität vom Gehirn zum Muskel zu liegen. Es zeigte sich jedoch, dass die mBBB-Werte nicht mit den motorisch evozierten Potentialen korrelieren (siehe dazu nächstes Kapitel 5.3 Motorisch evozierte Potentiale und lokomotorische Erholung), daher kann eine eventuelle Verschlechterung der axonalen Rekonnektivität allein anhand der Messung der MEPs nicht ausgeschlossen werden. Auch in den Arbeiten von Guest et al. (2008) wurden Ratten nach einer kompletten Transsektion des Rückenmarks an Th9/10 und anschließender Behandlung mit olfaktorischen Hüllzellen (OECs) über einen längeren Zeitpunkt beobachtet. Der Verlauf der BBB-Werte über die Zeit ist ähnlich wie in den Arbeiten mit dem mMS. Die Tiere zeigten ebenfalls zunächst eine Verbesserung der Lokomotorik, aber dann einen Abfall der BBB-Werte nach Woche 12 nach Verletzung. Sie vermuteten, dass die Verschlechterung im BBB entweder von dem Absterben der OECs oder von einer Beeinträchtigung des renalen Systems herrühren könnte. Ein von ihnen entwickelter renaler Score, der den Schweregrad der renalen Beeinträchtigung widerspiegelt, korrelierte mit den BBB-Werten der OEC-behandelten Tiere. Sie beobachteten eine chronische Blasendehnung und die Bildung von Nierensteinen in allen Tieren. In einigen Tieren zeigte die postmortale Untersuchung der Nieren eine Nierenbeckenentzündung. In den Tieren der hier vorliegenden Arbeit wurde dies nicht explizit untersucht, jedoch konnten vereinzelt Nierensteine bei der manuellen Entleerung der Blase ertastet werden. Da jedoch keine quantitative Analyse vorgenommen wurde kann hier keine Aussage dazu getroffen werden.

Noch erwähnenswert ist, dass sich der BBB-Wert in der Arbeit von Guest et al. nach einer Retranssektion des Rückenmarks nicht verringerte. Die in deren Arbeit verbesserte Lokomotorik scheint von anderen Veränderungen herzurühren und nicht von einer vermehrten Regeneration von supraspinalen Axonen. Eine Stärkung der Mustergeneratoren (*central pattern generators*) könnte dort eher eine Rolle spielen. In den Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Estrada et al. 2018b) konnte gezeigt werden, dass

kaudal der Läsion in den mMS behandelten Tieren signifikant mehr serotonerge und katecholaminerge Axone vorhanden sind als in den Tieren der TX-Gruppe. So genannte *good performer* (mBBB-Wert  $\geq 15$ ) zeigten zudem eine Tendenz zu mehr serotonergen und katecholaminergen Axonen kaudal der Läsion auf als so genannte *poor performer* (mBBB-Wert  $\leq 10$ ). Dies könnte eine Ursache für die verbesserte Lokomotorik sein, denn serotonerge und katecholaminerge Fasern sind an den Netzwerken des *central pattern generators* beteiligt (Kandel et al. 2000) und solche könnten ebenfalls, wie in der Arbeit von Guest et al., in den Tieren der mMS-Gruppe gestärkt worden sein. Es wurde in der Studie von Estrada et al. weiter festgestellt, dass in den *poor performer* zudem große Zysten vorhanden sind und dementsprechend vermutlich weniger erhaltenes Gewebe. Daher könnte der Unterschied in der Anzahl der Axone kaudal der Läsion auch auf die größere Anzahl von Zysten zurückzuführen sein. Dass die verbesserten mBBB-Werte nach Rückenmarkverletzung in dieser Arbeit jedoch nicht ausschließlich auf Reflexen oder der Verstärkung von Mustergeneratoren unterhalb der Läsion beruhen, legt u. a. das Ergebnis nach Retranssektion des Rückenmarks nahe. Die mBBB-Werte nach Retranssektion gingen im Gegensatz zu den Arbeiten von Guest et al. auf einen Wert von  $0,25 \pm 0,11$  SEM (N = 6) zurück. Eine verstärkte Regeneration des kortikospinalen Traktes (Estrada et al. 2018b) spricht ebenfalls für eine Beteiligung höher gelegener Zentren. Zudem ist ein starker Hinweis auf eine supraspinale Kontrolle nach mMS Implantation durch die elektrophysiologischen Messungen der MEPs gegeben.

### 5.3 Motorisch evozierte Potentiale und lokomotorische Erholung

An den gleichen Tagen, an denen elektrophysiologische Messungen durchgeführt wurden, wurde die Lokomotorik der Hinterbeine mittels des mBBBs im Offenfeld bestimmt. Wenn diese Werte mit den Amplituden der MEPs in Korrelation gesetzt werden, zeigt sich jedoch, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern nach der Rangkorrelation nach Spearman besteht. Dies erscheint im ersten Moment fragwürdig, es muss aber bedacht werden, dass hier nur MEPs des *musculus tibialis anterior* gemessen werden. Der mBBB spiegelt hingegen die Aktivität vieler Muskeln wider. Eine Kontraktion des *musculus tibialis anterior* bewirkt die Extension des Fußes, also ein Anziehen des Fußes nach oben. Eigentlich müsste dies auch im mBBB-Wert, als Bewegung des Fußgelenkes wiederzufinden sein. Eine Korrelation zur MEP Amplitude ist dennoch nicht gegeben.

Andere Arbeiten zeigen ebenfalls, dass der BBB als Ursprungstest des mBBBs nicht mit der MEP Amplitude korreliert (Sun et al. 2000). Warum dies so ist, ist noch unklar. Redondo-Castro et al. (2016) beobachteten wie in dieser Arbeit eine frühe und späte MEP Komponente (N1 und N2, siehe Seite 67). Sie fanden heraus, dass die N2 Kom-

ponente (später Latenzbereich) nach unterschiedlich schweren Kontusionen (100 kdyn und 200 kdyn) in gewissem Maße mit den Hinterbein Bewegungen (BBB) korreliert. Zwischen der N1 Komponente (früher Latenzbereich) und der motorischen Funktion des Hinterbeins besteht jedoch keine Korrelation. Die N1 Komponente war merklich reduziert an Tag 14 und 28 und verschwand nach 42 Tagen nach Kontusion (100 kdyn und 200 kdyn), trotz der Fähigkeit der Tiere die Hinterbeine zu bewegen (BBB von ca. 10 und 14). Die in dieser Arbeit nach kompletter Läsion und mit dem mMS behandelten Tiere gemessenen MEPs liegen in dem gleichen Latenzbereich der N1 Komponente. Im Gegensatz dazu fanden García-Alfás et al. (2003) heraus, dass nach verschiedenen schweren photochemischen Rückenmarkverletzungen eine Korrelation zwischen den BBB-Werten und der MEP Amplitude besteht. Hohe BBB-Werte korrespondieren mit hohen MEP Amplituden. Nur in dem BBB Bereich von 10 bis 15 sind keine MEPs vorhanden, was nach García-Alfás et al. darauf hinweist, dass die MEPs empfindlicher auf die Verletzung reagieren als die Lokomotorik. Die Werte sind jedoch nicht direkt mit den Werten in dieser Arbeit zu vergleichen. In dieser Arbeit wurde der mBBB und nicht der BBB durchgeführt. Der Bereich über einem BBB-Wert von 15, wo Garcia et al. vermehrt MEPs messen, die mit dem BBB korrelieren, wird vom mBBB Test nicht abgedeckt (Basso et al. 1995; Antri et al. 2002; Estrada et al. 2014). Zudem ist die von García-Alfás et al., aber auch von Redondo-Castro et al. (2016), genutzte elektrophysiologische Methode nicht die gleiche wie in dieser Arbeit.

Es ist noch unklar warum in manchen Arbeiten, wie auch dieser, die Lokomotorik der Hinterbeine nicht mit den MEP Amplituden korreliert. Weiterhin denkbar wäre ein Effekt der Anästhesie auf die MEP Amplituden (Zandieh et al. 2003; Oria et al. 2008) oder zumindest in dieser Arbeit, eine zu geringe Tieranzahl um einen signifikanten Unterschied im mBBB zwischen den Tieren mit und ohne messbarem MEP feststellen zu können (statistische Power unter 0,8, siehe Abbildung 28).

### 5.4 Kombination von mMS und Chondroitinase ABC

Es konnte bisher im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Implantation des mechanischen Mikrokonnectors (mMS) zu einer funktionellen axonalen Verschaltung auf den Schienbeinmuskel (*musculus tibialis anterior*) führt. Da die Verbesserung jedoch noch nicht dem gesunden Zustand der Tiere entspricht wurde zusätzlich in Kombination mit dem mMS eine zweite Therapie mit Chondroitinase ABC (ChABC) getestet. Durch die Applikation von ChABC, werden wachstumshemmende Proteoglykane abgebaut, die vermehrt nach Rückenmarkverletzung gebildet werden (Bartus et al. 2012; García-Alfás und Fawcett 2012; Lemons et al. 1999). Beobachtet wurde nach fünf Wochen und als Kontrolle diente Penicillinase. Es wurde die Applikation auf zwei unterschiedliche Arten getestet: 1. Über die Injektion von ChABC jeweils 1 mm rostral und kaudal des mMS und 2. Die Applikation von ChABC über das interne

Mikrokanalsystem des mMS direkt in das Lumen. Jede Injektion besaß dabei eine ChABC Aktivität von 0,1 U. Mit beiden Applikationsarten bewirkte ChABC jedoch keine zusätzliche Verbesserung zum mMS. Das mMS erreichte schon allein eine Besserung, die nicht durch die Gabe von ChABC potenziert werden konnte. Dies wurde sowohl für die axonale Regeneration aller neuronaler Fasern im Lumen des mMS beobachtet (anti-TUJ1), wie auch für die einzelnen Faserpopulationen: serotonerge (anti-5HT), katecholaminerge (anti-TH) und sensorische Fasern (*calcitonin gene-related peptide*, anti-CGRP). Kaudal des mMS konnte ebenfalls kein Unterschied in der Anzahl an serotonergen und katecholaminergen Fasern festgestellt werden. Auch in der Lokomotorik fünf Wochen nach Rückenmarkverletzung und mMS Behandlung konnte keine signifikante Verbesserung mit zusätzlicher Gabe von ChABC beobachtet werden. Die mBBB-Werte entsprachen dabei den mBBB-Werten, die auch von Dr. Veronica Estrada beobachtet werden konnten (Estrada et al. 2018b). Für die Lokomotorik ist der Zeitpunkt von fünf Wochen jedoch vermutlich zu früh um signifikante Unterschiede sehen zu können, denn selbst zu der Kontrollgruppe mit Komplettranssektion konnte in der Auswertung von Dr. Veronica Estrada kein Unterschied zu den mMS implantierten Tieren zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden. Erst nach sechs Wochen nach Rückenmarkverletzung kam es zu signifikanten Unterschieden zwischen den Tieren mit und ohne mMS Implantation.

Warum kam es jedoch zu keiner zusätzlichen Verbesserung der axonalen Regeneration? Hier stellt sich zunächst die Frage, ob ChABC erfolgreich CS-GAG-Ketten in den Tieren abgespalten hat? Das kann in diesem Fall bei einer Überlebenszeit von fünf Wochen jedoch nicht festgestellt werden. Die hier genutzte ChABC hat bei 37°C ein Halbwertszeit von 4 Tagen (AMSBIO 2016), nach fünf Wochen tritt der Effekt daher nicht mehr ein und abgespaltene CS-GAG-Ketten sind nicht mehr nachweisbar (García-Alías et al. 2008). Für eine erfolgreiche CS-GAG Abspaltung spricht aber, dass die Wirkung zum einen in der Arbeit von Valentina Antoni in Kombination mit dem mMS gezeigt werden (Antoni 2012) und zum anderen in zahlreichen anderen Studien nachgewiesen werden konnte (Bradbury et al. 2002; Moon et al. 2001; Tom et al. 2009). In diesen Studien wurde zwar die ChABC von Seikagaku verwendet, die nicht mehr vertrieben wird, jedoch konnte auch für den Ersatz, für die in dieser Arbeit verwendete ChABC von AMSBIO, eine ebenso erfolgreiche Wirkung gezeigt werden (Di Wu et al. 2015; Xu et al. 2015).

In vielen Studien wird ChABC wiederholt injiziert bzw. über einen längeren Zeitpunkt infundiert (Huang et al. 2006; Fouad et al. 2005). Dabei ist der akute Start der Behandlung, unmittelbar nach Verletzung des Rückenmarks, wie hier geschehen am erfolgreichsten (García-Alías et al. 2008). Tom et al. (2009) zeigten, dass aber auch eine alleinige Injektion akut nach der Rückenmarkverletzung zu einer axonalen Verbesserung führen kann. Sie benutzen eine ähnliche Dosierung der ChABC wie in dieser Arbeit, jedoch keine Komplettläsion des Rückenmarks. Trotzdem könnte eine sich

wiederholende Injektion bzw. Infusion von ChABC unter Umständen besser sein als die einmalige Verabreichung, denn dann wäre das Zeitfenster für eine Regeneration über die Läsionsstelle hinaus bzw. die Bildung von neuen Synapsen größer. Den Tieren sollte hier aber eine sich wiederholende Operation erspart werden. Manche Wissenschaftler lösten dies über eine genetische Einbringung von ChABC, wodurch das Enzym direkt vor Ort von Zellen gebildet werden kann (Jin et al. 2011; Zhao et al. 2011). Jedoch ist fragwürdig, ob dies später am Menschen Anwendung findet. Eine andere Lösung war die Entwicklung einer ChABC mit einer besseren Stabilität. Lee et al. (2010) entwickelten eine thermostabile ChABC, die für sechs Wochen stabil ist. Ein anderer Ansatz ist, dass nicht die inhibitorischen CS-GAG-Ketten mittels ChABC abgespalten werden, sondern dass der Signalweg worüber CSPGs auf das Axon wirken, gehemmt wird. Dies kann z. B. über die Blockierung der CSPG Rezeptoren auf den Neuronen geschehen (Lang et al. 2015; Fisher et al. 2011).

Der Test der zwei unterschiedlichen Applikationsarten, also zum einen die Injektion kaudal und rostral des mMS ins Rückenmark und zum anderen eine Infusion über das interne Mikrokanalsystem des mMS direkt in die Läsion zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Axonregeneration und in der Lokomotorik. Zu letzterem ist zu bemerken, dass die Verteilung von Substanzen wie z. B. ChABC über das mMS zuvor in anderen Arbeiten erfolgreich getestet wurde (Antoni 2012; Brazda et al. 2013). Zumindest für die erstere Applikationsweise konnten Tom und Houlé (2008) zeigen, dass ChABC zu einem vermehrten Auswachsen von Axonen führen kann. Sie kombinierten ChABC mit einem peripheren Nervenimplantat. Die Applikation der ChABC über eine Infusion per Minipumpe (Houle et al. 2006) und die Injektion ins Rückenmark führten dabei zu ähnlichen Ergebnissen. Somit hatte die Methode der Injektion an sich in ihren Arbeiten keinen stärkeren oder schwächeren Effekt auf das zusätzliche Auswachsen von Axonen nach ChABC Verabreichung. Im Gegensatz zu ihrer Arbeit jedoch, kam es in dieser zu keiner signifikanten Verbesserung im Axonwachstum im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit dem mMS. Es sollte aber Folgendes Beachtung finden.

Bei Vergleich der BBB-Werte zu anderen Studien fällt auf, dass die BBB-Werte mit mMS Behandlung schon per se recht hoch sind. Tatsächlich sind die BBB-Werte von 10 bis 10,5 nach alleiniger Behandlung mit dem mMS (Estrada et al. 2018b) schon höher als die BBB-Werte nach ausschließlicher ChABC Behandlung nach einer kompletten Durchtrennung des Rückenmarks. Dabei liegen die mittleren BBB-Werte bei 2 bis 6 (Huang et al. 2006; Bai et al. 2010). Selbst bei kombinatorischen Anwendungen von ChABC mit anderen Substanzen, wie z. B. Clenbuterol oder dem Zusatz von Schwann-Zellen, olfaktorischen Hüllzellen (OECs) und Matrigel kommt es mit ChABC zwar zu synergistischen Effekten (mittlerer BBB-Wert: 4 – 7), aber nicht über die BBB-Werte hinaus, die das mMS schon alleine erreicht (Bai et al. 2010; Fouad et al. 2005).

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte mittels elektrophysiologischer Messungen gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem mechanischen Mikrokonnectorsystem (mMS) nach der kompletten Durchtrennung des Rückenmarks an Thorakalwirbel 8 zu einer motorischen Rekonnectivität führt. Nach zwei bis sechs Monaten nach Rückenmarkverletzung waren ausschließlich in mMS behandelten Tieren wieder motorisch evozierte Potentiale messbar. Eine sensorische Rekonnectivität konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Beteiligung regenerierter (absteigender motorischer) Axone an der motorischen Rekonnectivität konnte durch Retranssektion des Rückenmarks verifiziert werden, denn nach erneuter Durchtrennung des Rückenmarks waren die zuvor zu messenden MEPs nicht mehr vorhanden. Eine Korrelation zwischen motorischer Rekonnectivität und funktionaler Erholung konnte jedoch nicht aufgezeigt werden. Die zusätzliche Gabe von Chondroitinase ABC unmittelbar nach der Implantation des mMS führte zu keinem synergistischen Therapieeffekt, sowohl in Hinblick auf die axonale Regeneration als auch bezüglich der Lokomotorik der Tiere. Das mMS erreichte schon allein eine Besserung in der Axonregeneration und Lokomotorik, die durch die Gabe von ChABC nicht weiter potenziert werden konnte.

Das mMS scheint eine vielversprechende Behandlung auf dem Weg zur Heilung von Rückenmarkverletzungen zu sein. Neben dem Gewebeerhalt, der Regeneration von Axonen über die Läsion mit erfolgreicher Myelinisierung, Angiogenese und einer verbesserten Lokomotorik, konnte mit dieser Arbeit auch eine erfolgreiche axonale Rekonnectivität bestätigt werden (Estrada et al. 2018b). Das mMS hat viel Potential und ist durch das interne Mikrokanalsystem gut zur Kombination mit anderen Therapien geeignet. Eine resorbierbare Variante des mMS wurde inzwischen ebenfalls entwickelt (Voss et al. 2014) und 3D Druckvarianten, die auf die spezielle Geometrie der Rückenmarkläsion angepasst werden sollen, sind in Planung. Momentan befindet sich das mMS in der Erforschung im Minischwein (Estrada und Müller 2019; Estrada et al. 2018a), als höhere Spezies, bevor es Eingang in erste klinische Studien am Menschen finden kann.

## VI Literaturverzeichnis

- Adams, M.M.; Hicks, A.L. (2005): Spasticity after spinal cord injury. In: *Spinal Cord* 43 (10), S. 577–586. DOI: 10.1038/sj.sc.3101757
- Adamson, J.; Zappulla, R.A.; Fraser, A.; Ryder, J.; Malis, L.I. (1989): Effects of selective spinal cord lesions on the spinal motor evoked potential (MEP) in the rat. In: *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 74 (6), S. 469–480. DOI: 10.1016/0168-5597(89)90038-5
- Ahuja, C.S.; Fehlings, M. (2016): Concise Review. Bridging the Gap: Novel Neuroregenerative and Neuroprotective Strategies in Spinal Cord Injury. In: *Stem cells translational medicine* 5 (7), S. 914–924. DOI: 10.5966/sctm.2015-0381
- AMSBIO (2016): Chondroitinase ABC for Neuroscience Research. Hg. v. AMS Biotechnology (Europe) Ltd. Online verfügbar unter [http://www.amsbio.com/brochures/chondroitinaseabc\\_flyer.pdf](http://www.amsbio.com/brochures/chondroitinaseabc_flyer.pdf)
- Antoni, V. (2012): Einsatz eines mikromechanischen Verbindungselements und Chondroitinase ABC im verletzten Rückenmark der Ratte. Masterarbeit. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. Labor für Molekulare Neurobiologie
- Antri, M.; Orsal, D.; Barthe, J.-Y. (2002): Locomotor recovery in the chronic spinal rat. Effects of long-term treatment with a 5-HT<sub>2</sub> agonist. In: *European Journal of Neuroscience* 16 (3), S. 467–476. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2002.02088.x
- Bai, F.; Peng, H.; Etlinger, J.D.; Zeman, R.J. (2010): Partial functional recovery after complete spinal cord transection by combined chondroitinase and clenbuterol treatment. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460 (3), S. 657–666. DOI: 10.1007/s00424-010-0852-y
- Bartus, K.; James, N.D.; Bosch, K.D.; Bradbury, E.J. (2012): Chondroitin sulphate proteoglycans: key modulators of spinal cord and brain plasticity. In: *Exp. Neurol.* 235 (1), S. 5–17. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.08.008
- Basmajian, J.V.; Luca, C.J. de (1985): Muscles alive. Their functions revealed by electromyography. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins
- Basso, D.M.; Beattie, M.S.; Bresnahan, J.C. (1995): A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. In: *J. Neurotrauma* 12 (1), S. 1–21. DOI: 10.1089/neu.1995.12.1
- Bazley, F.A.; All, A.H.; Thakor, N.V.; Maybhate, A. (2011): Plasticity associated changes in cortical somatosensory evoked potentials following spinal cord injury in rats. In: *Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society 2011*, S. 2005–2008. DOI: 10.1109/IEMBS.2011.6090564
- Bear, M.F.; Connors, B.W.; Paradiso, M.A.; Engel, A.K. (2018): Neurowissenschaften. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Bischoff, C.; Dengler, R. (Hg.) (2018): EMG, NLG. Elektromyografie, Elektroneurografie. Unter Mitarbeit von G. Deuschl, H. Hellriegel, W.J. Schulte-Mattler, P.P. Urban und H.C. Hopf. 4., aktualisierte und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (RRN Referenz-Reihe Neurologie Methoden)

- Bowers, C.A.; Kundu, B.; Hawryluk, G.W.J. (2016): Methylprednisolone for acute spinal cord injury. An increasingly philosophical debate. In: *Neural regeneration research* 11 (6), S. 882–885. DOI: 10.4103/1673-5374.184450
- Bracken, M.B.; Shepard, M.J.; Collins, W.F.; Holford, T.R.; Young, W.; Baskin, D.S.; Eisenberg, H.M.; Flamm, E.; Leo-Summers, L.; Maroon, J. (1990): A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. In: *The New England journal of medicine* 322 (20), S. 1405–1411. DOI: 10.1056/NEJM199005173222001
- Bradbury, E.J.; Burnside, E.R. (2019): Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. In: *Nature communications* 10 (1), S. 3879. DOI: 10.1038/s41467-019-11707-7
- Bradbury, E.J.; Carter, L.M. (2011): Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. In: *Brain Res. Bull.* 84 (4-5), S. 306–316. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2010.06.015
- Bradbury, E.J.; Moon, L.D.F.; Popat, R.J.; King, V.R.; Bennett, G.S.; Patel, P.N.; Fawcett, J.W.; McMahon, S.B. (2002): Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. In: *Nature* 416 (6881), S. 636–640. DOI: 10.1038/416636a
- Brazda, N.; Estrada, V.; Voss, C.; Seide, K.; Trieu, H.K.; Müller, H.W. (2016): Experimental strategies to bridge large tissue gaps in the injured spinal cord after acute and chronic lesion. In: *JoVE* (110). DOI: 10.3791/53331
- Brazda, N.; Voss, C.; Estrada, V.; Lodin, H.; Weinrich, N.; Seide, K.; Müller, J.; Müller, H.W. (2013): A mechanical microconnector system for restoration of tissue continuity and long-term drug application into the injured spinal cord. In: *Biomaterials* 34 (38), S. 10056–10064. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.057
- Broman, J. (1994): Neurotransmitters in subcortical somatosensory pathways. In: *Anatomy and embryology* 189 (3), S. 181–214. DOI: 10.1007/bf00239008
- Cloud, B.A.; Ball, B.G.; Chen, B.K.; Knight, A.M.; Hakim, J.S.; Ortiz, A.M.; Windebank, A.J. (2012): Hemisection spinal cord injury in rat: the value of intraoperative somatosensory evoked potential monitoring. In: *J. Neurosci. Methods* 211 (2), S. 179–184. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.024
- Conta, A.C.; Stelzner, D.J. (2009): Chapter 12 - The Propriospinal System. In: Charles Watson, George Paxinos und Gulgun Kayalioglu (Hg.): *The Spinal Cord*. San Diego: Academic Press, S. 180–190
- Courtine, G.; Sofroniew, M.V. (2019): Spinal cord repair. Advances in biology and technology. In: *Nat. Med* 25 (6), S. 898–908. DOI: 10.1038/s41591-019-0475-6
- David, S.; Aguayo, A.J. (1981): Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. In: *Science* 214 (4523), S. 931–933. DOI: 10.1126/science.6171034
- Davies, S.J.; Goucher, D.R.; Doller, C.; Silver, J. (1999): Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. In: *J. Neurosci* 19 (14), S. 5810–5822. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-14-05810.1999

- Di Wu; Klaw, M.C.; Connors, T.; Kholodilov, N.; Burke, R.E.; Tom, V.J. (2015): Expressing Constitutively Active Rheb in Adult Neurons after a Complete Spinal Cord Injury Enhances Axonal Regeneration beyond a Chondroitinase-Treated Glial Scar. In: *J. Neurosci* 35 (31), S. 11068–11080. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0719-15.2015
- Du Beau, A.; Shakya Shrestha, S.; Bannatyne, B.A.; Jalicy, S.M.; Linnen, S.; Maxwell, D.J. (2012): Neurotransmitter phenotypes of descending systems in the rat lumbar spinal cord. In: *Neuroscience* 227, S. 67–79. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.037
- Estrada, V.; Brazda, N.; Schmitz, C.; Heller, S.; Blazyca, H.; Martini, R.; Müller, H.W. (2014): Long-lasting significant functional improvement in chronic severe spinal cord injury following scar resection and polyethylene glycol implantation. In: *Neurobiol. Dis.* 67, S. 165–179. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.03.018
- Estrada, V.; Kaminski, N.; Ditz, C.; Hendricks, M.; Dollmann, L.; von Poblitzki, J.; Benhoefer, H.; Muench, M.; Schmelting, B.; Wiedermann, D.; Schira, J.; Link, A.; Vogel, A.; Hoehn, M.; Juergens, C.; Trieu, H.K.; Seide, K.; Mueller, H.W. (2018a): Combination of microconnector implantation and somatic stem cell (USSC) transplantation in the minipig: A preclinical translational model of complete thoracic spinal cord transection - Histological Outcome. In: *Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience 2018* (Programm No. 138.15.2018)
- Estrada, V.; Krebbers, J.; Voss, C.; Brazda, N.; Blazyca, H.; Illgen, J.; Seide, K.; Jürgens, C.; Müller, J.; Martini, R.; Trieu, H.K.; Müller, H.W. (2018b): Low-pressure micro-mechanical re-adaptation device sustainably and effectively improves locomotor recovery from complete spinal cord injury. In: *Communications biology* 1, S. 205. DOI: 10.1038/s42003-018-0210-8
- Estrada, V.; Müller, H.W. (2019): Micromechanical adaptation as a treatment for spinal cord injury. In: *Neural regeneration research* 14 (11), S. 1909–1911. DOI: 10.4103/1673-5374.259605
- Faissner, A.; Steindler, D. (1995): Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. In: *Glia* 13 (4), S. 233–254. DOI: 10.1002/glia.440130402
- Fehlings, M.G.; Tator, C.H.; Linden, R.D.; Piper, I.R. (1988): Motor and somatosensory evoked potentials recorded from the rat. In: *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 69 (1), S. 65–78. DOI: 10.1016/0013-4694(88)90036-3
- Fidler, P.S.; Schuette, K.; Asher, R.A.; Dobbertin, A.; Thornton, S.R.; Calle-Patino, Y.; Muir, E.; Levine, J.M.; Geller, H.M.; Rogers, J.H.; Faissner, A.; Fawcett, J.W. (1999): Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth. The major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. In: *J. Neurosci* 19 (20), S. 8778–8788. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-20-08778.1999
- Firouzi, M.S.; Firouzi, M.; Nabian, M.H.; Zanjani, L.O.; Zadegan, S.A.; Kamrani, R.S.; Rahimi-Movaghar, V. (2015): The effects of picric acid (2,4,6-trinitrophenol) and a bite-deterrent chemical (denatonium benzoate) on autotomy in rats after peripheral nerve lesion. In: *Lab animal* 44 (4), S. 141–145. DOI: 10.1038/labanimal.711

- Fisher, D.; Xing, B.; Dill, J.; Li, H.; Hoang, H.H.; Zhao, Z.; Yang, X.-L.; Bachoo, R.; Cannon, S.; Longo, F.M.; Sheng, M.; Silver, J.; Li, S. (2011): Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors. In: *J. Neurosci* 31 (40), S. 14051–14066. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1737-11.2011
- Flynn, J.R.; Graham, B.A.; Galea, M.P.; Callister, R.J. (2011): The role of propriospinal interneurons in recovery from spinal cord injury. In: *Neuropharmacology* 60 (5), S. 809–822. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.016
- Fouad, K.; Schnell, L.; Bunge, M.B.; Schwab, M.E.; Liebscher, T.; Pearse, D.D. (2005): Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. In: *J. Neurosci* 25 (5), S. 1169–1178. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3562-04.2005
- Freiwald, J.; Baumgart, C.; Konrad, P. (2007): Einführung in die Elektromyographie. Sport - Prävention - Rehabilitation. Balingen: Spitta (Spitta Fachbuchreihe Medizin)
- Fukuda, T.; Kawano, H.; Ohyama, K.; Li, H.P.; Takeda, Y.; Oohira, A.; Kawamura, K. (1997): Immunohistochemical localization of neurocan and L1 in the formation of thalamocortical pathway of developing rats. In: *J. Comp. Neurol* 382 (2), S. 141–152. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19970602)382:2<141::AID-CNE1>3.0.CO;2-3
- García-Alfás, G.; Fawcett, J.W. (2012): Training and anti-CSPG combination therapy for spinal cord injury. In: *Exp. Neurol.* 235 (1), S. 26–32. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.09.009
- García-Alfás, G.; Lin, R.; Akrimi, S.F.; Story, D.; Bradbury, E.J.; Fawcett, J.W. (2008): Therapeutic time window for the application of chondroitinase ABC after spinal cord injury. In: *Exp. Neurol.* 210 (2), S. 331–338. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.11.002
- García-Alfás, G.; Verdú, E.; Forés, J.; López-Vales, R.; Navarro, X. (2003): Functional and electrophysiological characterization of photochemical graded spinal cord injury in the rat. In: *J. Neurotrauma* 20 (5), S. 501–510. DOI: 10.1089/089771503765355568
- ICD-10-GM 2020 Systematisches Verzeichnis. Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision - German Modification (2019). Unter Mitarbeit von B. Graubner und T. Auhuber. 1. Auflage. Köln: Deutscher Ärzteverlag
- Gruner, J.A.; Wade, C.K.; Menna, G.; Stokes, B.T. (1993): Myoelectric evoked potentials versus locomotor recovery in chronic spinal cord injured rats. In: *J. Neurotrauma* 10 (3), S. 327–347. DOI: 10.1089/neu.1993.10.327
- Guest, J.D.; Herrera, L.; Margitich, I.; Oliveria, M.; Marcillo, A.; Casas, C.E. (2008): Xenografts of expanded primate olfactory ensheathing glia support transient behavioral recovery that is independent of serotonergic or corticospinal axonal regeneration in nude rats following spinal cord transection. In: *Exp. Neurol* 212 (2), S. 261–274. DOI: 10.1016/j.expneurol.2008.03.010
- Hadjipavlou, G.; Cortese, A.M.; Ramaswamy, B. (2016): Spinal cord injury and chronic pain. In: *BJA Education* 16 (8), S. 264–268. DOI: 10.1093/bjaed/mkv073

- Hall, R.D.; Lindholm, E.P. (1974): Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. In: *Brain Research* 66 (1), S. 23–38. DOI: 10.1016/0006-8993(74)90076-6
- Heller, S. (2014): Anwendung von Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut und eines Polyethylenglykol-Biopolymers zur Regeneration nach chronischer Rückenmarkverletzung in der Ratte. Masterarbeit. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. Labor für Molekulare Neurobiologie
- Hodgetts, S.I.; Plant, G.W.; Harvey, A.R. (2009): Chapter 14 - Spinal Cord Injury. Experimental animal models and relation to human therapy. In: Charles Watson, George Paxinos und Gulgun Kayalioglu (Hg.): *The Spinal Cord*. San Diego: Academic Press, S. 209–237
- Homma, I.; Kugler, J.; Spatz, R.; Ebe, M. (2010): Leitfaden für die EEG-Praxis. Ein Bildkompendium. 3. neu bearb. dt. Aufl., [Nachdr.] / von J. Kugler und R. Spatz. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer
- Houle, J.D.; Tom, V.J.; Mayes, D.; Wagoner, G.; Phillips, N.; Silver, J. (2006): Combining an autologous peripheral nervous system "bridge" and matrix modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration beyond a hemisection lesion of the adult rat spinal cord. In: *J. Neurosci* 26 (28), S. 7405–7415. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1166-06.2006
- Huang, H.; Young, W.; Skaper, S.; Chen, L.; Moviglia, G.; Saberi, H.; Al-Zoubi, Z.; Sharma, H.S.; Muresanu, D.; Sharma, A.; El Masry, W.; Feng, S. (2020): Clinical Neurorestorative Therapeutic Guidelines for Spinal Cord Injury (IANR/CANR version 2019). In: *Journal of orthopaedic translation* 20, S. 14–24. DOI: 10.1016/j.jot.2019.10.006
- Huang, W.-C.; Kuo, W.-C.; Cherng, J.-H.; Hsu, S.-H.; Chen, P.-R.; Huang, S.-H.; Huang, M.-C.; Liu, J.-C.; Cheng, H. (2006): Chondroitinase ABC promotes axonal re-growth and behavior recovery in spinal cord injury. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349 (3), S. 963–968. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.08.136
- Jang, D.-K.; Park, S.-I.; Han, Y.-M.; Jang, K.-S.; Park, M.-S.; Chung, Y.-A.; Kim, M.-W.; Maeng, L.-S.; Huh, P.-W.; Yoo, D.-S.; Jung, S.-W. (2011): Motor-evoked potential confirmation of functional improvement by transplanted bone marrow mesenchymal stem cell in the ischemic rat brain. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, S. 238409. DOI: 10.1155/2011/238409
- Jin, Y.; Ketschek, A.; Jiang, Z.; Smith, G.; Fischer, I. (2011): Chondroitinase activity can be transduced by a lentiviral vector in vitro and in vivo. In: *J. Neurosci. Methods* 199 (2), S. 208–213. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2011.05.007
- Kahle, W.; Frotscher, M. (2018): Taschenatlas Anatomie, Band 3. Nervensystem und Sinnesorgane. 12., aktualisierte Auflage. Stuttgart, Stuttgart: Thieme; Georg Thieme Verlag KG
- Kalderon, N.; Fuks, Z. (1996): Severed corticospinal axons recover electrophysiologic control of muscle activity after x-ray therapy in lesioned adult spinal cord. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93 (20), S. 11185–11190. DOI: 10.1073/pnas.93.20.11185
- Kamen, G.; Caldwell, G.E. (1996): Physiology and interpretation of the electromyogram. In: *J Clin Neurophysiol* 13 (5), S. 366–384. DOI: 10.1097/00004691-199609000-00002

- Kamida, T.; Fujiki, M.; Hori, S.; Isono, M. (1998): Conduction pathways of motor evoked potentials following transcranial magnetic stimulation. A rodent study using a "figure-8" coil. In: *Muscle Nerve* 21 (6), S. 722–731. DOI: 10.1002/(sici)1097-4598(199806)21:6<722::aid-mus3>3.0.co;2-9
- Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M. (2000): Principles of neural science. 4th ed., international ed. New York: McGraw-Hill
- Kim, L.H.; Sharma, S.; Sharples, S.A.; Mayr, K.A.; Kwok, C.H.T.; Whelan, P.J. (2017): Integration of Descending Command Systems for the Generation of Context-Specific Locomotor Behaviors. In: *Frontiers in neuroscience* 11, S. 581. DOI: 10.3389/fnins.2017.00581
- Kjellén, L.; Lindahl, U. (1991): Proteoglycans. Structures and interactions. In: *Annual review of biochemistry* 60, S. 443–475. DOI: 10.1146/annurev.bi.60.070191.002303
- Klapka, N.; Hermanns, S.; Straten, G.; Masannek, C.; Duis, S.; Hamers, F.P.T.; Müller, D.; Zuschratter, W.; Müller, H.W. (2005): Suppression of fibrous scarring in spinal cord injury of rat promotes long-distance regeneration of corticospinal tract axons, rescue of primary motoneurons in somatosensory cortex and significant functional recovery. In: *Eur. J. Neurosci* 22 (12), S. 3047–3058. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04495.x
- Konrad, P. (2011): EMG-Fibel. Eine praxisorientierte Einführung in die kinesiologische Elektromyographie. 1.1. Aufl. Velamed Science in Motion
- Krebbers, J.; Brazda, N.; Estrada, V.; Voss, C.; Ribas, V.T.; Seide, K.; Trieu, H.K.; Lingor, P.; Müller, H.W. (2015): A mechanical microconnector to improve regeneration after spinal cord injury: Characterization of the therapeutic effect by tracing studies. Posterbeitrag bei der Jahrestagung der Society for Neuroscience. Chicago, USA (Programmnr. 226.12)
- Kumar, S.; Mital, A. (1996): Electromyography in ergonomics. Boca Raton: CRC Press
- Lang, B.T.; Cregg, J.M.; DePaul, M.A.; Tran, A.P.; Xu, K.; Dyck, S.M.; Madalena, K.M.; Brown, B.P.; Weng, Y.-L.; Li, S.; Karimi-Abdolrezaee, S.; Busch, S.A.; Shen, Y.; Silver, J. (2015): Modulation of the proteoglycan receptor PTP $\sigma$  promotes recovery after spinal cord injury. In: *Nature* 518 (7539), S. 404–408. DOI: 10.1038/nature13974
- Lee, H.; McKeon, R.J.; Bellamkonda, R.V. (2010): Sustained delivery of thermostabilized chABC enhances axonal sprouting and functional recovery after spinal cord injury. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107 (8), S. 3340–3345. DOI: 10.1073/pnas.0905437106
- Lemons, M.L.; Howland, D.R.; Anderson, D.K. (1999): Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation. In: *Exp. Neurol* 160 (1), S. 51–65. DOI: 10.1006/exnr.1999.7184
- Mediratta, N.K.; Nicoll, J.A. (1983): Conduction velocities of corticospinal axons in the rat studied by recording cortical antidromic responses. In: *J. Physiol. (Lond.)* 336, S. 545–561. DOI: 10.1113/jphysiol.1983.sp014597
- Milnik, V. (2009): Elektrophysiologie in der Praxis. Neurographie, evozierte Potenziale und EEG. 1. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer

- Moon, L.D.; Asher, R.A.; Rhodes, K.E.; Fawcett, J.W. (2001): Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. In: *Nat. Neurosci* 4 (5), S. 465–466. DOI: 10.1038/87415
- Morris, S.H.; Howard, J.J.; El-Hawary, R. (2017): Comparison of Motor-Evoked Potentials Versus Somatosensory-Evoked Potentials as Early Indicators of Neural Compromise in Rat Model of Spinal Cord Compression. In: *Spine* 42 (6), E326-E331. DOI: 10.1097/BRS.0000000000001838
- Oria, M.; Chatauret, N.; Raguer, N.; Córdoba, J. (2008): A new method for measuring motor evoked potentials in the awake rat: effects of anesthetics. In: *J. Neurotrauma* 25 (3), S. 266–275. DOI: 10.1089/neu.2007.0393
- Paxinos, G. (2015): The rat nervous system. Fourth edition. Amsterdam: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier
- Paxinos, G.; Watson, C. (2007): The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. London, Burlington, MA: Academic
- Peterson, B.W.; Maunz, R.A.; Pitts, N.G.; Mackel, R.G. (1975): Patterns of projection and branching of reticulospinal neurons. In: *Experimental brain research* 23 (4), S. 333–351. DOI: 10.1007/BF00238019
- Preston, D.C.; Shapiro, B.E. (2013): Electromyography and neuromuscular disorders. Clinical-electrophysiological correlations. Third edition. London: Elsevier Saunders
- Ramer, L.M.; Ramer, M.S.; Bradbury, E.J. (2014): Restoring function after spinal cord injury. Towards clinical translation of experimental strategies. In: *The Lancet Neurology* 13 (12), S. 1241–1256. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70144-9
- Ramon y Cajal, S. (1928): Degeneration and regeneration of the nervous system. Oxford, England: Clarendon Press (Degeneration and regeneration of the nervous system)
- Redondo-Castro, E.; Navarro, X.; García-Alías, G. (2016): Longitudinal Evaluation of Residual Cortical and Subcortical Motor Evoked Potentials in Spinal Cord Injured Rats. In: *J. Neurotrauma* 33 (10), S. 907–916. DOI: 10.1089/neu.2015.4140
- Richardson, P.M.; McGuinness, U.M.; Aguayo, A.J. (1980): Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. In: *Nature* 284 (5753), S. 264–265. DOI: 10.1038/284264a0
- Rowland, J.W.; Hawryluk, G.W.J.; Kwon, B.; Fehlings, M.G. (2008): Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies. Promise on the horizon. In: *Neurosurgical focus* 25 (5), E2. DOI: 10.3171/FOC.2008.25.11.E2
- Ryder, J.; Zappulla, R.; Nieves, J. (1991): Motor evoked potentials elicited from pyramidal stimulation and recorded from the spinal cord in the rat. In: *Neurosurgery* 28 (4), S. 550–558
- Schira, J.; Gasis, M.; Estrada, V.; Hendricks, M.; Schmitz, C.; Trapp, T.; Kruse, F.; Kögler, G.; Wernet, P.; Hartung, H.-P.; Müller, H.W. (2012): Significant clinical, neuropathological and behavioural recovery from acute spinal cord trauma by transplantation of a well-defined somatic stem cell from human umbilical cord blood. In: *Brain* 135 (2), S. 431–446. DOI: 10.1093/brain/awr222
- Schlag, M.G.; Hopf, R.; Redl, H. (2001): Serial recording of sensory, corticomotor, and brainstem-derived motor evoked potentials in the rat. In: *Somatosens Mot Res* 18 (2), S. 106–116. DOI: 10.1080/135578501012006219

- Schmidt, R.F. (2010): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie ; mit 85 Tabellen ; mit herausnehmbaren Repetitorium. 31., überarb. und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch)
- Schmidt, R.F.; Schaible, H.-G. (2006): Neuro-und sinnesphysiologie. Berlin: Springer
- Shapovalov, A.I. (1975): Neuronal organization and synaptic mechanisms of supraspinal motor control in vertebrates. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 72, S. 1–54. DOI: 10.1007/BFb0031545
- Sharples, S.A.; Koblinger, K.; Humphreys, J.M.; Whelan, P.J. (2014): Dopamine. A parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. In: *Frontiers in neural circuits* 8, S. 55. DOI: 10.3389/fncir.2014.00055
- Shiau, J.S.; Zappulla, R.A.; Nieves, J. (1992): The Effect of Graded Spinal Cord Injury on the Extrapyrmidal and Pyramidal Motor Evoked Potentials of the Rat. In: *Neurosurgery* 30 (1), S. 76–84. DOI: 10.1227/00006123-199201000-00014
- Shultz, R.B.; Zhong, Y. (2017): Minocycline targets multiple secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury. In: *Neural regeneration research* 12 (5), S. 702–713. DOI: 10.4103/1673-5374.206633
- Silva, N.A.; Sousa, N.; Reis, R.L.; Salgado, A.J. (2014): From basics to clinical. A comprehensive review on spinal cord injury. In: *Progress in neurobiology* 114, S. 25–57. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.002
- Sofroniew, M.V. (2018): Dissecting spinal cord regeneration. In: *Nature* 557 (7705), S. 343–350. DOI: 10.1038/s41586-018-0068-4
- Stienen, P.J.; Haberham, Z.L.; van den Brom, W.E.; Groot, H.N.M. de; Venker-Van Haagen, A.J.; Hellebrekers, L.J. (2003): Evaluation of methods for eliciting somatosensory-evoked potentials in the awake, freely moving rat. In: *J. Neurosci. Methods* 126 (1), S. 79–90. DOI: 10.1016/s0165-0270(03)00070-0
- Sun, T.; Schlag, M.G.; Hopf, R.; Shen, Q.; Redl, H. (2000): Brainstem-evoked muscle potentials. Their prognostic value in experimental spinal cord injury in the rat. In: *Somatosens Mot Res* 17 (4), S. 317–324. DOI: 10.1080/08990220020002024
- Takeoka, A.; Jindrich, D.L.; Muñoz-Quiles, C.; Zhong, H.; van den Brand, R.; Pham, D.L.; Ziegler, M.D.; Ramón-Cueto, A.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; Phelps, P.E. (2011): Axon Regeneration Can Facilitate or Suppress Hindlimb Function after Olfactory Ensheathing Glia Transplantation. In: *J. Neurosci.* 31 (11), S. 4298–4310. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4967-10.2011
- Teh, D.B.L.; Chua, S.M.; Prasad, A.; Kakkos, I.; Jiang, W.; Yue, M.; Liu, X.; All, A.H. (2018): Neuroprotective assessment of prolonged local hypothermia post contusive spinal cord injury in rodent model. In: *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 18 (3), S. 507–514. DOI: 10.1016/j.spinee.2017.10.066
- Tom, V.J.; Houlé, J.D. (2008): Intraspinal microinjection of chondroitinase ABC following injury promotes axonal regeneration out of a peripheral nerve graft bridge. In: *Exp. Neurol* 211 (1), S. 315–319. DOI: 10.1016/j.expneurol.2008.01.021
- Tom, V.J.; Kadakia, R.; Santi, L.; Houlé, J.D. (2009): Administration of chondroitinase ABC rostral or caudal to a spinal cord injury site promotes anatomical but not functional plasticity. In: *J. Neurotrauma* 26 (12), S. 2323–2333. DOI: 10.1089/neu.2009.1047

- Trepel, M. (2017): Neuroanatomie. Struktur und Funktion. 7. Auflage. München: Elsevier (Student consult)
- Valverde, F. (1966): The pyramidal tract in rodents. A study of its relations with the posterior column nuclei, dorsolateral reticular formation of the medulla oblongata, and cervical spinal cord. (Golgi and electron microscopic observations). In: *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 71 (3), S. 298–363
- Verdú, E.; García-Alías, G.; Forés, J.; López-Vales, R.; Navarro, X. (2003): Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. In: *Glia* 42 (3), S. 275–286. DOI: 10.1002/glia.10217
- Vipin, A.; Thow, X.Y.; Mir, H.; Kortelainen, J.; Manivannan, J.; Al-Nashash, H.; All, A.H. (2016): Natural Progression of Spinal Cord Transection Injury and Reorganization of Neural Pathways. In: *J. Neurotrauma* 33 (24), S. 2191–2201. DOI: 10.1089/neu.2015.4383
- Voss, C.; Estrada, V.; Brazda, N.; Schander, A.; Krebbers, J.; Weinrich, N.; Müller, J.; Seide, K.; Müller, H.W.; Trieu, H.K. (2014): Implant for the support of functional recovery in spinal cord trauma(paraplegia): biodegradability and integration of electrodes. In: *Biomed Tech* 2014; 59 (s1) © 2014 by Walter de Gruyter • Berlin • Boston. DOI: 10.1515/bmt-2014-4470
- Wallesch, C.-W.; Unterberg, A.; Dietz, V. (2005): Neurotraumatologie. Stuttgart: Thieme (RRN - Referenz-Reihe Neurologie)
- Wang, H.; Katagiri, Y.; McCann, T.E.; Unsworth, E.; Goldsmith, P.; Yu, Z.-X.; Tan, F.; Santiago, L.; Mills, E.M.; Wang, Y.; Symes, A.J.; Geller, H.M. (2008): Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth. In: *J. Cell. Sci* 121 (Pt 18), S. 3083–3091. DOI: 10.1242/jcs.032649
- Watson, C.; Harvey, A.R. (2009): Projections from the Brain to the Spinal Cord. In: Charles Watson, George Paxinos und Gulgun Kayalioglu (Hg.): *The Spinal Cord*: Elsevier, S. 168–179
- Watson, C.; Paxinos, G.; Kayalioglu, G. (Hg.) (2009): *The Spinal Cord*: Elsevier
- Xu, C.; Klaw, M.C.; Lemay, M.A.; Baas, P.W.; Tom, V.J. (2015): Pharmacologically inhibiting kinesin-5 activity with monastrol promotes axonal regeneration following spinal cord injury. In: *Exp. Neurol* 263, S. 172–176. DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.10.013
- Yamagata, T.; Saito, H.; Habuchi, O.; Suzuki, S. (1968): Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. In: *J. Biol. Chem.* 243 (7), S. 1523–1535
- Zandieh, S.; Hopf, R.; Redl, H.; Schlag, M.G. (2003): The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat. In: *Spinal Cord* 41 (1), S. 16–22. DOI: 10.1038/sj.sc.3101400
- Zappulla, R.A.; Hollis, P.; Ryder, J.; Moore, F.M.; Adamson, J.; Moustakis, W.; Malis, L.I. (1988): Noncortical origins of the spinal motor evoked potential in rats. In: *Neurosurgery* 22 (5), S. 846–852
- Zhang, C.; He, X.; Li, H.; Wang, G. (2013): Chondroitinase ABC plus bone marrow mesenchymal stem cells for repair of spinal cord injury. In: *Neural regeneration research* 8 (11), S. 965–974. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.11.001

- Zhang, Y.P.; Onifer, S.M.; Burke, D.A.; Shields, C.B. (2001): A topical mixture for preventing, abolishing, and treating autophagia and self-mutilation in laboratory rats. In: *Contemporary topics in laboratory animal science* 40 (2), S. 35–36
- Zhao, R.-R.; Muir, E.M.; Alves, J.N.; Rickman, H.; Allan, A.Y.; Kwok, J.C.; Roet, K.C.D.; Verhaagen, J.; Schneider, B.L.; Bensadoun, J.-C.; Ahmed, S.G.; Yáñez-Muñoz, R.J.; Keynes, R.J.; Fawcett, J.W.; Rogers, J.H. (2011): Lentiviral vectors express chondroitinase ABC in cortical projections and promote sprouting of injured corticospinal axons. In: *J. Neurosci. Methods* 201 (1), S. 228–238. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2011.08.003
- Zuo, J.; Neubauer, D.; Dyess, K.; Ferguson, T.A.; Muir, D. (1998): Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. In: *Exp. Neurol* 154 (2), S. 654–662. DOI: 10.1006/exnr.1998.6951

## VII Inhaltlicher Anteil an Publikationen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Manuskripten vorab publiziert:

1. Estrada, Veronica; **Krebbers, Julia**; Voss, Christian; Brazda, Nicole; Blazyca, Heinrich; Illgen, Jennifer; Seide, Klaus; Jürgens, Christian; Müller, Jörg; Martini, Rudolf; Trieu, Hoc Khiem; Müller, Hans Werner (2018): Low-pressure micro-mechanical re-adaptation device sustainably and effectively improves locomotor recovery from complete spinal cord injury. In: *Communications biology* 1, S. 205. DOI: 10.1038/s42003-018-0210-8.
2. **Krebbers, Julia**; Brazda, Nicole; Estrada, Veronica; Voss, Christian; Ribas, Vinicius Toledo; Seide, Klaus; Trieu, Hoc Khiem; Lingor, Paul; Müller, Hans Werner (2015): A mechanical microconnector to improve regeneration after spinal cord injury: Characterization of the therapeutic effect by tracing studies. Posterbeitrag auf der Jahrestagung der Society for Neuroscience, Chicago, USA, Programmnr. 226.12.

Publikation 1: Mein Eigenanteil an der Publikation erstreckt sich auf den elektrophysiologischen Abschnitt des Manuskripts: die Erhebung der elektrophysiologischen Daten (MEPs), inklusive der dazu notwendigen Operationen (Kompletttranssektion, mMS- und Schrauben-Implantationen und Retranssektion des Rückenmarks), die Auswertung und Darstellung der Daten (Abbildung 7) und das Schreiben des Manuskriptentwurfs des Material- und Methodenteils und des Ergebnisteils, der die elektrophysiologischen Daten beschreibt. Mein Entwurf wurde abschließend von Dr. Veronica Estrada und Prof. Dr. Hans Werner Müller editiert.

Publikation 2: Hier habe ich Vorergebnisse der Messung motorisch evozierter Potentiale nach mMS Behandlung der Publikation 1 auf einer wissenschaftlichen Konferenz im Posterformat vorgestellt. Zusätzlich wurden die Vorergebnisse und die Etablierung von Methoden zur Überprüfung dreier mutmaßlicher Mechanismen der supraspinalen Rekonnektivität nach mMS-Implantation gezeigt: (1) Sprossung der supraspinalen Axontrakte, insbesondere des kortikospinalen Traktes (CST), (2) die Regeneration von Interneuronen durch das mMS, und (3) Bildung zusätzlicher Projektionen von CST-Axonon auf rostral zur Läsion verlaufende Interneurone, wodurch eine neuartige interneuronale Brücke durch das mMS geschaffen werden könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurden Methoden von mir etabliert und getestet. Zum Zeitpunkt des Posterbeitrages war diese Studie noch nicht abgeschlossen.

Mein Eigenanteil an dem Poster erstreckt sich von der Konzeptentwicklung, der Etablierung der Methoden (AAV Markierung des CST, Markierung von Interneuronen mittels

Fluorogold, Messung von MEPs), über die Durchführung der Studie, Auswertung der Daten und die Darstellung der Studie im Posterformat.

Weitere eigene Veröffentlichungen mit Bezug zu dieser Arbeit aber keiner direkten Einbindung:

1. Wang, Xiaolong; **Krebbers, Julia**; Charalambous, Petar; Machado, Venissa; Schober, Andreas; Bosse, Frank; Müller, Hans Werner; Unsicker, Klaus (2015): Growth/differentiation factor-15 and its role in peripheral nervous system lesion and regeneration. In: *Cell Tissue Res.* 362 (2), S. 317–330. DOI: 10.1007/s00441-015-2219-3.
2. Voss, Christian; Estrada, Veronica; Brazda, Nicole; Schander, Andreas; **Krebbers, Julia**; Weinrich, Nils; Müller, Jörg; Seide, Klaus; Müller, Hans Werner; Trieu, Hoc Khiem (2014): Implant for the support of functional recovery in spinal cord trauma(paraplegia): biodegradability and integration of electrodes. In: *Biomed Tech* 2014; 59 (s1) © 2014 by Walter de Gruyter • Berlin • Boston. DOI: 10.1515/bmt-2014-4470.

## VIII Anhang

### A.1. Analysezertifikat Chondroitinase ABC



## Certificate of Analysis

**Product Name:** Chondroitinase ABC (from *Protease vulgaris*), Protease Free  
**Cat. Number:** AMS.E1028-02  
**EC Number:** 4.2.2.4  
**CAS Number:** 9024-13-9  
**Lot Number:** CFP-0018

Test	Specifications	Lot CFP-0018 Results	Test methods
<b>Appearance</b>	Dry white to off white lyophilized powder	Conforms	Visual inspection
<b>Unit size</b>	2 units	3.60 units	UV <sub>232nm</sub> (QC009)
<b>Protein content</b>	Report result	17.89 ug	Bradford (QC010)
<b>Specific activity</b>	≥ 100 units/mg protein	201.23 units/mg protein	--
<b>Bacterial Endotoxin</b>	Less than or equal to 200 EU per unit enzyme	< 1.39 EU/unit enzyme	LAL gel clot (QC003)
<b>Stabilizer</b>	Albumin free	Conforms	SDS-PAGE
<b>Min. shelf life</b>	2 years	2 years from 23 Mar 2012	--
<b>Contaminants</b>			
<b>Chondro-4-sulfatase</b>	Not detected	Not detected	Morgan Elson
<b>Chondro-6-sulfatase</b>	Not detected	Not detected	
<b>Protease</b>	Not detected	Not detected	UV <sub>252nm</sub> to detect any O.D. change
<b>Heparinase</b>	Not detected	Not detected	UV <sub>232nm</sub> to detect any O.D. change
<b>Heparitinase</b>	Not detected	Not detected	

**Unit definition:** One unit is defined as the amount of enzyme required to liberate 1µmole of unsaturated disaccharide from chondroitin sulfate C per min at 37°C, pH 8



<b>UK &amp; Rest of World</b> 184 Millon Park, Abingdon OX14 4SE, Oxon, UK Tel: +44 (0) 1235 825 200 Fax: +44 (0) 1235 820 482	<b>Switzerland</b> Centro Nord-Sud 2E CH-4984 Bleggio-Lugano Tel: +41 (0) 91 604 55 22 Fax: +41 (0) 91 605 17 85	<b>Deutschland</b> Bockenheimer Landstr. 17/19 60325 Frankfurt/Main Tel: +49 (0) 69 779099 Fax: +49 (0) 69 13376880	<b>North America</b> 23591 El Toro Rd, Suite #180 Lake Forest, CA 92630 Tel: + 1 000 987 0165 Fax: + 1 949 265 7703	<b>amsbio</b> info@amsbio.com www.amsbio.com AMS Biotechnology
--	--	---	---	---

## A.2. mBBB nach Estrada et al. (2014)

SCORE	GENERAL MOVEMENT	R-L ALTER-NATION	AMPLI-TUDE	BODY WEIGHT SUPPORT	PLANTAR FOOT PLACEMENT
Level 1					
0	No	-	-	-	-
1	Weak limb jerks	-	-	-	-
Level 2: rhythmic movements/dorsal foot placement					
2	Yes	No	Weak	-	-
3	Yes	No	Large	-	-
4	Yes	Occasional	Weak		
5	Yes	Occasional	Large		
6	Yes	Frequent	Weak		
7	Yes	Frequent	Large		
8	Yes	Consistent	Weak		
9	Yes	Consistent	Large		
Level 3: alternating movements/dorsal foot placement/occasional body weight support					
10	Yes	Yes	Weak	Occasional	-
11	Yes	Yes	Large	Occasional	-
Level 4: plantar foot placement					
11	Yes	Occasional	Large	No	Occasional
12	Yes	Occasional	Large	Occasional	Occasional
13	Yes	Occasional	Large	Occasional	Frequent
14	Yes	Occasional	Large	Frequent	No
14	Yes	Frequent	Large	No	Occasional
15	Yes	Occasional	Large	Frequent	Frequent
15	Yes	Frequent	Large	Occasional	No
15	Yes	Consistent	Large	No	Occasional
16	Yes	Frequent	Large	Occasional	Occasional
17	Yes	Frequent	Large	Frequent	No
18	Yes	Frequent	Large	Frequent	Occasional
19	Yes	Frequent	Large	Frequent	Frequent
20	Yes	Consistent	Large	Occasional	No
20	Yes	Consistent	Large	Occasional	Occasional
21	Yes	Consistent	Large	Occasional	Frequent
21	Yes	Consistent	Large	Frequent	No
21	Yes	Consistent	Large	Frequent	Occasional
22	Yes	Consistent	Large	Frequent	Frequent
22	Yes	Consistent	Large	Consistent	No
22	Yes	Consistent	Large	Consistent	Occasional
22	Yes	Consistent	Large	Consistent	Frequent

R-L: right-left; -: not present; consistent: observed in > 95 % of the step cycles; frequent: 51-94 %; occasional: < 50 %; no: 0 %.

## A.3. mBBB Protokollblatt

Tier \_\_\_\_\_ Datum \_\_\_\_\_ wpo \_\_\_\_\_ Scorer \_\_\_\_\_ Videos: ja / nein

Movement						Trunk position		Movement general		rate	R-L Alterations	Amplitude		weight supp. L	weight supp. R	Plantar paw placement L	Plantar paw placement R	tail position	Spasm		
Hip		Knee		Ankle		L	R	L	R			L	R						general	Amplitude	affected body parts
L	R	L	R	L	R	L	R	no	no	O	no	L	R	no	no	no	no	slack	no		hind limbs
<del>no</del>	no	no	no	no	no	mid		weak limb jerks	weak limb jerks	F	O	weak	weak	O	O	O	O	up	O	weak	tail
S	S	S	S	S	S			yes	yes	C	F	large	large	F	F	F	F	general movement	F	large	toes
E	E	E	E	E	E					C	C			C	C	C	C				

wpo = Wochen nach Operation, R = rechts, L = links;

S = geringfügig (*slightly*), E = extensiv; weight supp. = Gewichtsunterstützung;C = konsistent: beobachtet in > 95 % der Schrittzyklen, F = frequent: 51-94%, O = gelegentlich (*occasional*): < 50 %, No: 0 %

## **IX Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Julia Sarah Krebbers, an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## X Danksagung

Zum Abschluss möchte ich noch einigen Menschen meinen Dank aussprechen.

Vielen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Hans Werner Müller für die Begutachtung, Korrektur und Betreuung dieser Doktorarbeit im Labor für molekulare Neurobiologie. Ebenfalls vielen herzlichen Dank an Frau Prof. Dr. Christine Rose für die Begutachtung meiner Dissertation.

Dem DFG Graduiertenkolleg 1033 und dem Graduiertenkolleg iBrain (*Interdisciplinary Graduate School for Brain Research and Translational Neuroscience*) danke ich sehr für die finanzielle Unterstützung zur Erstellung dieser Doktorarbeit. Sie ermöglichten mir zudem in vielerlei Hinsicht über den Tellerrand zu schauen und meine Arbeit bei diversen Konferenzen, wie der Jahrestagung der *Society of Neuroscience* in Chicago und der *Summer School of Spinal Cord Injury and Neurotrauma* in Toledo zu präsentieren und mich mit internationalen Wissenschaftlern auszutauschen. Außerdem bin ich sehr dankbar für die Möglichkeit zur Teilnahme am Selma-Meyer-Mentoring und iGRAD Programm der HHU, wo ich u. a. durch zahlreiche Workshops viele außerfachliche Kompetenzen erwerben durfte.

Ein großer Dank gilt allen Mitgliedern des Labors für Molekulare Neurobiologie für ihr Feedback und die Unterstützung: Dr. Nicole Brazda, Dr. Veronica Estrada, Dr. Jessica Schira-Heinen, Dr. Frank Bosse, Dr. Federica Tundo-Lavalle, Silja Heller, Nicole Schuster, Marion Hendricks, Marcia Gasis, Nadine Hummel, Dr. Brigitte König, Dr. Katharina Schaepe und im großen Maße Pedro Saraiva.

Weiterhin danke ich den beteiligten Mitarbeitern des Instituts für Mikrosystemtechnik der Technischen Universität Hamburg-Harburg und des Berufsgenossenschaftlichen Klinikums Hamburg für die gute Kooperation und Bereitstellung des mMS.

Auch in der Arbeitsgruppe Neuroregeneration von Prof. Dr. Küry gilt mein Dank denen, die mich in der Zeit unterstützt haben. Vor allem danke ich Dr. Andre Heinen und Prof. Dr. Küry für die Bereitstellung der elektrophysiologischen Apparatur PowerLab® 26T.

Weiterhin danken möchte ich Frau Dr. Veronika Müller für die statistische Beratung.

Ein ganz großer Dank gilt meinen Freunden und meinem Bruder David Krebbers für die immer wieder aufbauenden Worte.

Doch was wäre diese Arbeit ohne die Unterstützung meiner Eltern: Gerda und Christian Krebbers? Für ihre Unterstützung, ihre aufbauenden Worte und dafür, dass sie immer für mich da waren, möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.