

Neurales *tissue engineering* zur Unterstützung anatomischer und funktioneller
Wiederherstellung nach akuter experimenteller Rückenmarksläsion der adulten Ratte

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Haktan Altinova

aus Köln

Berichter: Herr Privatdozent
Ph.D. B.Sc. Gary Brook

Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Hubert Korr

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Dezember 2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern und Geschwistern gewidmet

*„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
was gelöst werden will.“*

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	5
2	Einleitung	8
2.1	Verletzungen des Rückenmarks	8
2.1.1	Regeneration verhindernde zelluläre und molekulare Reaktionen im ZNS	9
2.1.2	Primäre und sekundäre Läsion, Narbenentstehung.....	9
2.1.3	Ansätze zur Suppression der Narbenentstehung	11
2.1.4	Maßgebliche Beteiligung reaktiver Astrozyten an der Glia Narbenbildung	12
2.1.5	Inhibitorische Wirkung von Oligodendrozyten und Myelin auf Wachstum	13
2.2	Olfaktorische Hüllzellen (<i>Olfactory ensheathing cells</i>).....	14
2.2.1	OHZ sind spezialisierte Gliazellen.....	15
2.2.2	Regeneration des Rückenmarks und Olfaktorische Hüllzellen	15
2.2.3	Implantation von OHZ in das RM querschnittsgelähmter Patienten.....	16
2.3	Strategien zur Überbrückung der Läsionshöhle nach RM-Trauma.....	18
2.3.1	Anforderungen an ein Brückenmaterial	18
2.4	Zielsetzung	20
2.4.1	Hypothesen dieser Dissertation.....	20
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Zellkultur: OHZ der adulten Ratte	21
3.2	Dreidimensionale Kollagen-Matrix	21
3.3	Versuchstiere.....	22
3.4	Anästhesie und Läsionsmodell	23
3.5	Implantation der Matricel-Matrix.....	24
3.6	Implantation des Spongostan.....	24
3.7	Verhaltensstudien	25
3.7.1	<i>Staircase</i> -Test.....	27
3.7.2	<i>Rearing</i> -Test	28
3.8	Perfusion der Tiere	30
3.9	Kryoschnitthanfertigung	30
3.10	Immunhistochemische Verfahren.....	31
3.10.1	Doppelimmunfluoreszenzfärbung.....	31
3.10.2	Die verwendeten Antikörper	32
3.11	Statistische Analyse.....	35
3.11.1	<i>Staircase</i> -Test.....	36
3.11.2	<i>Rearing</i> -Test	36

3.11.3	Immunhistochemie	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Verhaltensstudien	38
4.1.1	<i>Staircase</i> -Test	38
4.1.2	<i>Rearing</i> -Test	42
4.2	Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie	47
4.2.1	Axonale Reaktion und astrozytäre Antwort	47
4.2.2	Quantitative Analyse der Immunhistochemie	67
5	Diskussion	75
5.1	Aspekte der Verhaltensstudien	76
5.2	Morphologische Aspekte	80
5.3	Schlussfolgerungen	90
6	Literaturverzeichnis	91
7	Anhang	110
7.1	Tabellen der statistischen Ausarbeitung	110
7.2	Abkürzungen	124
7.3	Danksagung	126
7.4	Erklärung zur Datenaufbewahrung	128
7.5	Lebenslauf	129

1 Abstract

Neural tissue engineering for the promotion of anatomical and functional recovery after acute experimental spinal cord injury of the adult rat

Injuries to the spinal cord induce distinct changes at the lesion site. Over recent years, it has been shown that the hostile environment of the reactive, lesioned central nervous system inhibits axonal regrowth. This is in stark contrast to the lesioned peripheral nervous system which has a strong capacity for axon regeneration and functional recovery. In the present thesis, a tissue engineering strategy to promote orientated axonal regrowth and functional tissue repair has been investigated in an experimental animal model of acute spinal cord injury. After undergoing a mid-cervical (C4) dorsal laminectomy, adult female Lewis rats were subjected to a unilateral funiculotomy (involving a tissue resection of 1 - 2 mm). A novel, orientated, type I collagen matrix (either seeded or non-seeded with syngeneic olfactory ensheathing cells, OEC) was implanted into the lesion gap and the function of the ipsilateral fore-paw was monitored. At the end-point survival time of 5 months, animals were perfused and the lesion site dissected and processed for immunohistochemistry to demonstrate host astrocytic, axonal and dendritic responses using antibodies to glial fibrillary acidic protein (GFAP), growth associated protein-43 (Gap-43/B50), 200kDa phosphorylated neurofilament (NF200) and microtubule associated protein 2 (MAP-2).

The type I collagen matrix was found to be biocompatible and acted as a guidance system, supporting the longitudinally orientated regeneration of host axon. Integration of the OEC-seeded matrix was most successful, with both host astrocytic and axonal profiles crossing the graft-host interface and penetrating the implant to varying degrees. Surprisingly, host dendrites were also found to penetrate the implanted matrices, a so-far undescribed phenomenon. Furthermore, the interface between the matrix and dura mater was found to be a region of substantial tissue regrowth and orientated axon regeneration. Although implanted scaffolds supported improved motor performance of the ipsilateral fore-paw, there was no clear correlation between the extent of axon regeneration and the degree of functional recovery. It is likely, therefore, that implanted devices may exert hitherto unexpected beneficial effects on the lesioned central nervous system.

Zusammenfassung

Verletzungen im Rückenmark (RM) führen zu ausgeprägten Veränderungen im Läsionsgebiet. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass ein reaktives, wachstumsfeindliches Milieu das erfolgreiche Regenerieren lädierter Axone hemmt. Dieser Sachverhalt stellt einen Gegensatz zum peripheren Nervensystem (PNS) dar, welches eine ausgeprägte Kapazität zur Regeneration und funktionellen Erholung besitzt.

In der vorliegenden Dissertation wurde mit Hilfe eines experimentellen Tiermodells eine *tissue engineering* Strategie zur Förderung langstreckig-orientierten axonalen Wachstums und funktioneller Gewebereparaturmechanismen im akut lädierten RM untersucht. Nach Durchführung einer dorsalen Laminektomie des vierten zervikalen Halswirbels erhielten adulte weibliche Lewisratten eine unilaterale Funikulotomie (Resektion von 1 - 2 mm Gewebe). In die Läsionshöhle wurde sodann eine neue orientierte Typ-I-Kollagen-Matrix (entweder ohne oder besät mit syngenem olfaktorischen Hüllzellen, OHZ) implantiert und die motorische Funktion der ipsilateralen Pfote beobachtet. Nach einer Überlebenszeit von fünf Monaten wurden die Versuchstiere perfundiert, die Läsionszone reseziert und immunhistochemischen Untersuchungen unterzogen. Um die Reaktionen der nativen Astrozyten, Axone und Dendriten zu demonstrieren, wurden immunhistochemische Marker gegen GFAP, NF200, Gap-43 und Map-2 verwendet.

Die Typ-I-Kollagen-Matrizes waren biokompatibel und deren Kanäle fungierten bei der longitudinal orientierten axonalen Regeneration als Leitstrukturen. Es kam zu einer erfolgreichen Integration der OHZ-besäten Matrizes. Native Astrozyten und axonale Profile überbrückten die Grenzfläche zwischen nativem RM und Implantat. Sodann penetrierten sie in die Matrizes. Überraschenderweise traten auch native Dendriten in die implantierten Matrizes ein, was bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. Darüber hinaus wurde die Grenzfläche zwischen Dura mater und lateraler Matrixbereich als wesentlicher Ort der orientierten axonalen Regeneration entdeckt. Obwohl implantierte Matrizes die motorische Erholung der ipsilateralen Pfote unterstützten, konnte keine eindeutige Korrelation zwischen dem Ausmaß der axonalen Regeneration und dem Grad der funktionellen Erholung nachgewiesen werden.

Es ist daher wahrscheinlich, dass implantierte Materialien eine bisher unerwartet günstige Wirkung auf das lädierte Zentralnervensystem ausüben.

2 Einleitung

2.1 Verletzungen des Rückenmarks

Traumatische Verletzungen im RM führen in der Regel zu irreversiblen Ausfallerscheinungen unterhalb der Läsionsstelle. Der Läsion folgen motorische, sensorische und vegetative Funktionsausfälle (Becker *et al.* 2003).

Im PNS geht das Axon durch Waller'sche Degeneration distal der Läsion zugrunde und regeneriert mit Hilfe des erhaltenen proximalen Stumpfes unter Ausbildung eines Axonkegels. Hierdurch wird eine Reinnervation des Zielgebietes ermöglicht. Im Gegensatz dazu unterbleibt Regeneration nach Waller'scher Degeneration im lädierten RM weitgehend (Goldberg 2003; Buss *et al.* 2005). Diese Unfähigkeit der Neurone, im ZNS zu regenerieren, ist seit Anfang des letzten Jahrhunderts Gegenstand intensiver Forschung geworden. Seit Jahrzehnten versuchen Wissenschaftler, die zellulären und molekularen Mechanismen der fehlenden Regeneration zu verstehen, um dann entsprechend intervenieren zu können. Dabei ist das Verständnis der Pathophysiologie, die zellulären und molekularen Veränderung nach erfolgter Verletzung unabdingbar. Hierdurch wird es erst möglich, vorerst experimentell, an verschiedenen Stufen anzusetzen. Es haben sich tatsächlich vielfältige Modelle etabliert, um die Regenerationsforschung wesentlich voranzutreiben (McDonald und Becker 2003; Reier 2004; Rosenzweig und McDonald 2004; Talac *et al.* 2004). Der Einsatz von Antikörpern, Medikamenten, Implantation von Biomaterialien, Injektion verschiedener Zellpopulationen und Stammzellen in die Läsionshöhle (s. u.) treiben die neuroprotektive und neuroregenerative Wissenschaft kontinuierlich voran. Ein definitiver, bahnbrechender Erfolg steht bislang noch aus. Das ehrgeizige Ziel einer möglichen Heilung querschnittsgelähmter Patienten sollte daher konsequent weiter verfolgt werden.

2.1.1 Regeneration verhindernde zelluläre und molekulare Reaktionen im ZNS

2.1.2 Primäre und sekundäre Läsion, Narbenentstehung

Bei der Suche nach der Ursache der fehlenden Regeneration im ZNS konnte herausgefunden werden, dass ein wachstumsfeindliches Milieu den Regenerations- und Myelinisierungsvorgang von Axonen hemmt.

Kommt es zur Verletzung des RM, beispielsweise zu einer partiellen oder totalen Kontinuitätsunterbrechung nach scharfem Trauma, so wird diese als akutes Trauma, also primäre Verletzung, bezeichnet. Die neurologischen Defizite, die hierdurch konsekutiv entstehen, sind nicht nur die Folge der primären Verletzung (= akutes Trauma), sondern auch Folge von sich anschließenden Veränderungen im Läsionsgebiet, die zu sekundären Schäden führen (sekundäre Degeneration) (Becker *et al.* 2003; Jacobs und Fehlings 2003; Hall und Springer 2004; Schwab 2004; Hagg und Oudega 2006).

Nach einem akuten Trauma werden sofort läsionsinduzierte Mechanismen in Gang gesetzt, die mehrere Tage bis Wochen andauern. Es kommt zu Einblutungen, Ödembildung, Vasospasmen, Ischämien und folglich zur neuronalen/axonalen Nekrose. Über das verletzte Gefäßsystem und vom umgebenden Gewebe gelangen v.a. neutrophile Granulozyten, Mikroglia, nach deren Aktivierung differenziert zu Makrophagen, als erste Zellpopulationen in das Läsionsgebiet. Außerdem werden im Läsionsgebiet vermehrt Oligodendrozyten, oligodendrozytäre Vorläuferzellen (durch Zerfall von Axonen/Myelin), leptomeningeale Zellen (bei gleichzeitigem Vorliegen einer meningealen Verletzung) und v.a. reaktive Astrozyten in den Folgestunden/-tagen angetroffen (Fawcett und Asher 1999). Insbesondere die reaktiven Astrozyten dominieren im Bereich der Läsion (Abschnitt 2.1.4) (Eng 1985; Fawcett und Asher 1999).

Resultate der primären und sekundären Verletzung sind die Bildung einer Wundheilungsnarbe (Glianarbe), bindegewebige Umbauprozesse (= *connective tissue*) und das Entstehen einer Pseudozyste – *Syrinx* – (= *cystic cavity*) (Bartholdi und Schwab 1998; Tator 2002; Buss *et al.* 2007).

Man unterscheidet bei der Narbe im Wesentlichen zwei Formen, und zwar eine astroglöse Narbe im Periläsionsgebiet und eine fibröse Narbe im Zentrum der Läsion; beide getrennt durch eine akzessorische *Glia limitans* (s. Abb.1). Die astroglöse Narbe besteht v.a. aus reaktiven Astrozyten. Die fibröse Narbe hingegen besteht aus dichter extrazellulärer Matrix (EZM) und verschiedenen Zellen

mesenchymalen Ursprungs. Es konnte gezeigt werden, dass beide Formen der Narbe mit wachstumshemmenden Molekülen assoziiert sind. EZM-Proteine wie z. B. Chondroitinsulfat-Proteoglycane (CSPG), Semaphorine, Ephrine, Keratansulfat, Heparansulfat und Tenascin C sind Moleküle, die auf molekularer Ebene einen hemmenden Effekt auf spontane axonale Regeneration und unverzweigte Elongation ausüben.

Nicht zuletzt spielen auch zahlreiche Cytokine, (Entzündungs-) Mediatoren und Zellen der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr eine essentielle Rolle (Stichel und Müller 1998; Shearer und Fawcett 2001; Niclou *et al.* 2003; Silver und Miller 2004; Chan 2008).

Der periläsionäre reaktiv-astroglöse Bereich stellt einerseits eine physikalische und andererseits eine molekulare Barriere dar. Die im Läsionszentrum lokalisierte fibröse Narbe ist durch eine dichte EZM und einige zelluläre Elemente gekennzeichnet. Eine der wichtigsten Strukturkomponenten der fibrösen Narbe ist ein dichtes Netzwerk aus Typ-IV-Kollagen. Dieses Netzwerk der fibrotischen Narbe ist assoziiert mit CSPG und weiteren Wachstum inhibierenden Molekülen und fungiert somit als molekulare Barriere langstreckiger Regeneration axotomierter Fasern (Stichel und Müller 1998; Stichel *et al.* 1999; Silver und Miller 2004). Trotz der zahlreichen hemmenden Eigenschaften besitzt die Wundheilungsnarbe eine nicht unwesentliche, neuroprotektive Eigenschaft:

Mit ihrer Hilfe wird das umliegende gesunde vom lädierten RM isoliert. Die Isolierung trägt dazu bei, dass es nicht zu einer überschießenden, generalisierten Inflammation kommt (Faulkner *et al.* 2004). Der entstandene Schaden wird also lokal begrenzt und so eine weitere unkontrollierte zelluläre Degeneration/Nekrose verhindert (Silver und Miller 2004). Durch die Basallamina innerhalb der fibrösen Narbe und durch Retraktionen der Läsionsränder kommt es zur Verkleinerung der Läsionshöhle. Dies bedeutet eine Schadensbegrenzung. Die Organisation der Wunde wird weiterhin von neu einsprossenden Gefäßen begleitet, die letztlich der Versorgung des Narbengewebes mit Nährstoffen und dem Abtransport von Produkten des Metabolismus dienen.

So sinnvoll diese Organisation auch ist, letztlich stellt sie in physikochemischer Hinsicht auch eine Barriere dar. Zahlreiche Versuchsmodelle legen dar, dass es nach einer Axotomie sehr wohl spontane Regenerationsversuche innerhalb des ZNS gibt. Über kurze Strecken findet am Axonstumpf eine Aussprossung (= *Sprouting*)

statt. Interessanterweise kommt das *Sprouting* regelmäßig unmittelbar an der Grenzfläche zwischen Läsionsnarbe und Läsionshöhle zum abrupten Stillstand. Diese Beobachtung ließ das Narbengewebe innerhalb des ZNS zu einem wichtigen Forschungsschwerpunkt werden. Es wurde offenbar, dass die sprossenden Axone diese mechanische und molekulare Barriere nicht überwinden können (Stichel und Müller 1994; Schwab und Bartholdi 1996; Schwab 2002).

Zum Thema Wundheilungsnarbe existiert umfangreiche Literatur. Deswegen wird an dieser Stelle ein Überblick gegeben: Während sich die Arbeitsgruppe Silver/Miller *et al.* auf reaktive Astrozyten und die molekularen Bestandteile der astroglösen Narbe konzentrieren (Schema A der Abb. 1), legt die Arbeitsgruppe Stichel/Müller *et al.* Hauptaugenmerk auf die läsionsinduzierte zentrale fibrotische Narbenbildung mit den Hauptkomponenten der EZM Typ-IV-Kollagen, Laminin und Basallamina (Schema B der Abb. 1). Die Arbeitsgruppe Professor J. Fawcett hingegen fokussiert sich auch auf die astroglöse Narbe und deren unmittelbare Mikroumgebung. Hier spielen v.a. die molekularen Bestandteile (EZM) und die Einbeziehung meningealer Zellen im Läsionsbereich eine wesentliche Rolle (ebenso Schema A der Abb. 1, schwarze Pfeile) (Fawcett 2006).

2.1.3 Ansätze zur Suppression der Narbenentstehung

Einer der zahlreichen Ansätze zur Limitierung der sekundären Gewebedegeneration und Narbenentstehung ist die tierexperimentelle und auch klinische Verwendung des Glucocorticoids Methylprednisolon (MP). In Tiermodellen wurde MP vorzugsweise intravenös, aber auch in die Läsion, beispielsweise kombiniert mit Nanopartikeln, appliziert. Ebenso wurde MP systemisch verabreicht, nachdem OHZ in das akut lädierte RM der Ratte transplantiert wurden. Diese Strategien konnten positive Ergebnisse hinsichtlich der Regeneration sowie der Ödem- und Narbensuppression demonstrieren (Hurlbert 2000; Nash *et al.* 2002; Schmidt und Leach 2003; Hall und Springer 2004; Kim *et al.* 2009). Hinsichtlich des klinischen Alltags in Deutschland konnte sich MP aber nicht als unbedenkliche Therapiemethode etablieren. In diesem Zusammenhang sind unter anderem die pulmonalen Komplikationen und der unbefriedigende Nutzen eines systemischen MP-Schemas hervorzuheben (Bracken *et al.* 1984; 1990; 1997; Hurlbert 2000; Short *et al.* 2000; Suberviola *et al.* 2008).

Der Einsatz des Eisenchelators Dipyrityl im tierexperimentellen RM-Läsionsmodell erbrachte ebenfalls positive Ergebnisse in Hinblick auf die Reduktion der fibrotischen

Narbenbildung und die damit einhergehende Regeneration. Dipyridyl führte zur Hemmung des Schlüsselenzyms Prolyl-4-Hydroxylase, welches Eisen als Kofaktor benötigt. Hierdurch kam es zur Reduktion der Typ-IV-Kollagen Ablagerung im Zentrum der Läsion (Stichel und Müller 1998; Stichel *et al.* 1999). Andererseits muss angemerkt werden, dass Eisenchelatoren selbst einen anti-apoptotischen und neuroprotektiven Effekt besitzen (Zaman *et al.* 1999).

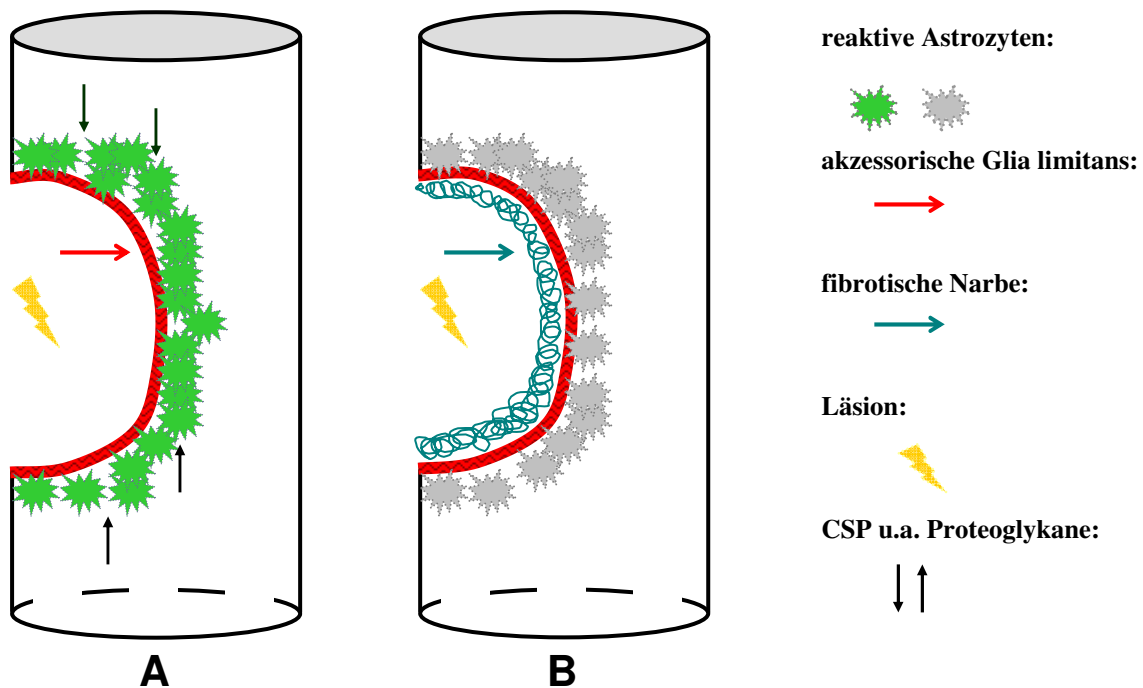


Abb. 1: Schematische Darstellung der Glianarbe im RM

Die Astrozyten sind in A grün markiert, wodurch das Hauptaugenmerk betont werden soll. In B sind sie grau dargestellt, um das Hauptaugenmerk auf die *Glia limitans* und v.a. auf die fibrotische Narbe zu lenken. Details siehe Abschnitt 2.1.2.

2.1.4 Maßgebliche Beteiligung reaktiver Astrozyten an der Glianarbenbildung

Gliazellen kommen überall im ZNS vor und gehören zu den nicht-neuronalen Zellen. Astrozyten sind sternförmige Zellen und bilden quantitativ den Hauptanteil an Gliazellen. Sie gehen u.a. eine enge Bindung mit den Blutgefäßen ein und sind so maßgeblich an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Darüber hinaus füllen sie zusammen mit anderen Gliazellen (Oligodendrozyten, Mikroglia) den gesamten nicht-neuronalen Raum aus und sind damit „Stützzellen“ der neuronalen Zellen.

Verletzungen innerhalb des ZNS führen im Bereich der Läsion zu einer massiven astrozytären Reaktion: Astrozyten hypertrophieren, teilen sich und sezernieren wachstumsinhibierende Moleküle. Ausdruck gesteigerter astrozytärer Prozesse ist eine erhöhte Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP). Läsionsinduziert

kommt es also zu einem Wechsel der morphologischen und funktionellen Eigenschaften der Astrozyten (Silver und Miller 2004).

Den CSPG, die im Läsionsgebiet von reaktiven Astrozyten und oligodendrozytären Vorläuferzellen sezerniert werden, wird eine besonders hemmende Funktion zugesprochen (siehe hierzu auch Abb. 1). Aus dieser Erkenntnis wurde ein neuer Forschungsansatz entwickelt. Demnach konnte gezeigt werden, dass durch Neutralisation des hemmenden Effektes der CSPG eine permissivere Umgebung für axonale Elongation geschaffen wird. Die Neutralisation erfolgte durch das proteolytische Enzym *Chondroitinase ABC* (Yick *et al.* 2000; Bradbury *et al.* 2002; Xiang *et al.* 2005; Galtrey und Fawcett 2007).

Die wachstumshemmende Eigenschaft reaktiver Astrozyten wird auch kontrovers diskutiert. Man geht davon aus, dass Astrozyten sowohl wachstuminduzierende als auch -inhibierende Eigenschaften besitzen. Nach einem Trauma dominieren im Läsionsgebiet wahrscheinlich die inhibierenden Astrozyten (Miller *et al.* 1986). Es gibt Beobachtungen, die zeigen, dass regenerierende Axone *in vitro* und *in vivo* astrozytenreiche Regionen penetrieren können. Die Mechanismen, die dazu führen, dass Astrozyten einerseits inhibierend und andererseits fördernd auf die axonale Regeneration wirken, sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung (Rudge und Silver 1990; Stichel und Müller 1998; Stichel und Müller 1998; Fawcett und Asher 1999; Lu *et al.* 2007).

2.1.5 Inhibitorische Wirkung von Oligodendrozyten und Myelin auf Wachstum

Nachdem lange bekannt war, dass axotomierte Fasern im ZNS an der Grenzfläche zur Läsion abrupt aufhören auszusprossen (Cajal 1928), wurden spezifische extrinsische Faktoren postuliert, die eine weitere Aussprossung und axonale Elongation blockieren.

Der Arbeitsgruppe von Professor M. E. Schwab gelang es Ende der 80er Jahre, das von Oligodendrozyten produzierte Myelin als einen der wesentlichen regenerationshemmenden Faktoren im ZNS zu identifizieren (Caroni und Schwab 1988; Schwab und Caroni 1988; Savio und Schwab 1989). Das Hauptprotein NI-35/250 (später als *NoGo-A* bezeichnet) wurde isoliert und ein entsprechender monoklonaler Antikörper IN-1 entwickelt (Schnell und Schwab 1993; Schwab 2004). *NoGo-A* ist ein spezifisch im ZNS vorkommendes Molekül und wird u.a. auf der Oberfläche von Oligodendrozyten exprimiert. Es besitzt zwei funktionelle Domänen.

Während die erste (= *NoGo66*) ein transmembranäres Ankerprotein darstellt und in weiteren *NoGo*-Isoformen zu finden ist, ist die zweite Domäne (= *Amino-NoGo*) spezifisch für *NoGo-A*. Die *NoGo66*-Domäne hemmt spezifisch das Axonwachstum. *Amino-NoGo* hingegen hemmt sowohl die Migration und Verteilung nicht-neuronaler Zellen im Bereich der ZNS-Läsion als auch das axonale Wachstum direkt (Fournier und Strittmatter 2001; McKerracher und Winton 2002). Tatsächlich konnte nach Einsatz des IN-1 in die RM-Läsion (kortikospinaler Trakt) von Ratten die neutralisierende Wirkung des Antikörpers demonstriert werden. Man beobachtete verstärktes *Sprouting* und axonale Elongation, einhergehend mit einer verbesserten Motorik der Versuchstiere in Verhaltenstests (Caroni und Schwab 1988; Savio und Schwab 1990; Schwab 1998; Gonzenbach und Schwab 2008). Erstaunlicherweise kam es nicht nur zum *Sprouting* lädierter Axone, sondern auch intakte, unladierte Fasern begannen auszusplassen. Dieser Sachverhalt führte zu der Annahme, dass der Versuch, axonale Regeneration zu fördern, wahrscheinlich auch intrinsische Reparaturmechanismen und Plastizität im ZNS stimuliert (McKerracher und Winton 2002).

Neben *NoGo-A* wurden ebenfalls MAG (Myelin assoziiertes Glykoprotein), OMgp (Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein) und andere Proteoglykane als hemmende Faktoren identifiziert (Schwab 2004). *NoGo-A*, MAG, OMgp binden an den Glykoproteinrezeptor NgR (= *NoGo-66*-Rezeptor) und entfalten ihre inhibitorische Wirkung, indem sie Signaltransduktionskaskaden in Gang setzen (Fournier *et al.* 2002; Barton *et al.* 2003; Gonzenbach und Schwab 2008).

Aus der Fülle der oben erwähnten inhibitorischen Myelin-Proteine ergeben sich therapeutisch potentielle Angriffspunkte, wie das Beispiel des AK gegen *NoGo-A* zeigt.

2.2 Olfaktorische Hüllzellen (*Olfactory ensheathing cells*)

In den vergangenen Jahren hat die Zellpopulation der olfaktorischen Hüllzellen (OHZ) für großes Aufsehen gesorgt. Sie sind Gegenstand intensiver Forschung, und die bisher erzielten tier-/humanexperimentellen Resultate geben Hoffnung auf einen möglichen therapeutischen Nutzen (Li *et al.* 1997).

2.2.1 OHZ sind spezialisierte Gliazellen

OHZ sind spezialisierte Gliazellen und stellen eine eigene Zellpopulation dar (Doucette 1995). Sie sind in der Mukosa der Nase, im *N. olfactorius* und in der Glomerularzellschicht des *Bulbus olfactorius* lokalisiert. Die primären Riechzellen der Nasenmukosa behalten ihre regenerative Fähigkeit das ganze Leben hindurch bei, und ihre Neuriten werden auf dem Weg zum *Bulbus* (als Teil des ZNS) von den OHZ umgeben (Li *et al.* 1998; Schwob 2002). Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, dass diese spezialisierten Zellen zwar die Axone umgeben, aber sie nicht myelinisieren, denn die Neuriten der Riechzellen sind unmyelinisiert.

Die genaue Funktion der OHZ ist nicht ganz geklärt, allerdings konnten *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass OHZ zum einen Eigenschaften von Schwann-Zellen (SZ) (= Typ-S-Zellen) und zum anderen Eigenschaften von Astrozyten (= Typ-A-Zellen) aufweisen, ohne eindeutig den beiden eigenständigen Populationen streng zugeordnet werden zu können (Barber und Lindsay 1982; Doucette 1990; Li *et al.* 1997; Bartolomei und Greer 2000). SZ werden nur im PNS, Astrozyten hingegen werden nur im ZNS angetroffen. Eine Differenzierung der OHZ konnte durch die Expression bestimmter Oberflächenantigene ermöglicht werden (Wewetzer *et al.* 2002). Typ-S-Zellen (*Schwann-like cells*) sind kräftig positiv für p75 und nur sehr schwach für GFAP. Typ-A-Zellen (*astrocytes-like cells*) hingegen sind kräftig positiv für GFAP, aber nicht für p75 (weitere Oberflächenmerkmale siehe Wewetzer *et al.* 2002). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass zellkulturell hoch-gereinigte p75-positive OHZ die axonale Regeneration in Tiermodellen unterstützen. Tatsächlich konnten Versuche nachweisen, dass Typ-S-Zellen – aber nicht Typ-A-Zellen – zur axonalen Myelinisierung befähigt sind. Zudem sind Typ-S-Zellen in der Lage, mit Astrozyten zu interagieren, wohingegen SZ in Anwesenheit von Astrozyten mit Hypertrophie reagieren und auch kaum in astrozytenreichen Umgebungen aufzufinden sind (Ramon-Cueto und Nieto-Sampedro 1992; Lakatos *et al.* 2000; Raisman 2001).

2.2.2 Regeneration des Rückenmarks und Olfaktorische Hüllzellen

In einem Rattenmodell transplantierten Li *et al.* (1997) OHZ in den akut lädierten kortikospinalen Trakt des RM und erhielten erstaunliche Ergebnisse. Es wurde gezeigt, dass OHZ langstreckig unverzweigte Regenerationsprozesse unterstützen.

Die im kranialen Bereich aussprossenden Fasern überbrückten den Läsionsbereich und einige Fasern erreichten sogar das kaudale RM Gewebe („bridging“). Diese Beobachtung wurde bei den Kontrollgruppen nicht gemacht. Hier kam es lediglich zur Aussprossung und terminalen Verzweigung. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass die Axone durch Typ-S-OHZ myelinisiert worden waren. Nachdem die Axone dann im kaudalen Bereich des RM eintraten, wurden sie weiter durch Oligodendrozyten myelinisiert. Zur Beurteilung der Funktion des Vorderlaufs wurden Verhaltenstests durchgeführt. Auch hier waren die OHZ-transplantierten Tiere in der motorischen Funktion des Vorderlaufes der Kontrollgruppe deutlich überlegen.

Es folgten weitere tierexperimentelle RM-Läsionsmodelle, bei denen modifizierte OHZ transplantiert wurden. Die Ergebnisse von Li *et al.* (1997) konnten bestätigt werden (Ramon-Cueto *et al.* 1998; Ramon-Cueto *et al.* 2000; Raisman 2001).

Allerdings werden diese Resultate z.T. auch kontrovers diskutiert (Takami *et al.* 2002). Die Arbeitsgruppe von Takami wählte die Kontusion als Läsionsmodus, wohingegen Li *et al.* (1997) eine unilaterale Mikroläsion des kortikospinalen Traktes in der Höhen C1 und C2 durchführten. Ob der Läsionsmodus hierbei eine ausschlaggebende Rolle spielt, ist noch unklar.

Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass das Merkmal der OHZ, periphere Neuriten der primären Riechzellen in der Nasenmukosa nach zentral zu „navigieren“ und dort eine adäquate Verknüpfung zustande bringen lassen, große Hoffnung weckt. Analog könnten nämlich OHZ axonale Regeneration im akut lädierten RM unterstützen (Radtke *et al.* 2008).

2.2.3 Implantation von OHZ in das RM querschnittsgelähmter Patienten

Letztlich konnten 2005 erfolgreich autologe OHZ-Implantationen am menschlichen RM durchgeführt werden. Hierbei biopsierte man unter endoskopischer Kontrolle die Nasenschleimhaut der gelähmten Patienten (im Bereich der *Concha nasalis superior*), kultivierte die gereinigten OHZ und injizierte diese nach zwei Wochen in die RM-Läsion. Die klinische Studie befand sich noch in der 1. Phase und endgültige Aussagen standen 2005 noch aus (Feron *et al.*). Aktuell wird der Drei-Jahres-Zwischenstand publiziert. Es kann vorab gesagt werden, dass klinisch und bildmorphologisch (Magnetresonanztomographie) keinerlei Komplikationen aufgetreten sind. Allerdings stehen motorische Funktionserholungen noch nicht im Vordergrund. Vielmehr soll zunächst die Unbedenklichkeit der OHZ Implantation

geprüft werden. Sollte sich die Transplantation von OHZ tatsächlich etablieren, so hat sie folgende Vorteile:

- OHZ sind gut verfügbar. Zwei Wochen vor dem eigentlichen neurochirurgischen Eingriff am RM wird die Nasenmukosa zur Zellgewinnung endoskopisch biopsiert. Nach Kultivierung der gereinigten OHZ findet eine Injektion der Zellsuspension in die Läsion statt.
- Eine postoperative immunsuppressive Therapie wird überflüssig, da es sich um autologes Zellmaterial handelt.

Die nach drei Jahren gezogene Bilanz zeigt, dass der Einsatz von autologen OHZ im menschlichen RM zunächst unbedenklich ist. Radiologische, neurophysiologische und klinische Untersuchungen untermauern dies (Feron *et al.* 2005; Mackay-Sim 2005; Mackay-Sim *et al.* 2008).

Positive Ergebnisse werden auch aus Lissabon (Portugal) berichtet. Auch hier wurden bereits 2001 im Rahmen klinischer Pilotuntersuchungen OHZ in das lädierte RM transplantiert. Operierte Patienten berichteten von sensorischen und sensiblen Sensationen, die so vor der OHZ-Implantation nicht vorhanden waren. Auch partielle funktionelle Erholung wurde angegeben (Lima *et al.* 2006). Über funktionelle Erholung der Motorik berichteten Mackay-Sim *et al.* (2008) noch nicht, wobei die in deren Tests geprüfte Fallzahl sehr klein war und folglich keine generalisierenden Aussagen zulässt (Mackay-Sim *et al.* 2008).

Außerdem muss erwähnt werden, dass die ersten humanen Transplantationen 2001 durch den Neurochirurgen Professor Huang in Peking (China) durchgeführt worden sind. Dieser transplantierte jedoch fetale OHZ, gewonnen aus abortierten humanen Feten (Huang *et al.* 2003). Nicht nur diese Tatsache führte zu weltweitem Aufsehen und Widerstand – sowohl in wissenschaftlichen als auch nicht-wissenschaftlichen Kreisen. Auch heute noch werden seine positiven Ergebnisse der funktionellen Erholung und seine Methode sowohl in wissenschaftlicher als auch ethischer Hinsicht kontrovers diskutiert. Der wissenschaftliche Charakter seiner Ergebnisse wird aberkannt (Watts 2005). Jedoch hat Professor Huang weltweit bereits mehr als 500 Patienten operiert, darunter Patienten mit Multipler Sklerose, Amyotropher Lateralsklerose (Prinjha *et al.*), Morbus Parkinson, RM-Trauma und apoplektische Patienten (Huang *et al.* 2003; Watts 2005; Huang *et al.* 2006a; Huang *et al.* 2006b).

Dieser Sachverhalt zeigt deutlich, dass nicht nur die molekularen und methodischen Grundlagen erkundet und definiert werden müssen, sondern auch im besonderen Umfang ein akzeptabler ethischer Rahmen definiert werden muss (Watts 2005).

Inwieweit die autologe OHZ-Implantation langfristig sicher ist und zur dauerhaften klinischen Verbesserung der Patienten beiträgt, werden Langzeitergebnisse zeigen.

2.3 Strategien zur Überbrückung der Läsionshöhle nach RM-Trauma

In den vergangenen Jahren wurden einige unterschiedliche Verfahren entwickelt, um die durch eine akute oder chronische RM-Läsion entstandene Läsionshöhle bzw. -lücke zu überbrücken. In den oberen Abschnitten ist noch nicht auf die Problematik der postläsionellen Pseudozyste eingegangen worden. Neben den bereits erwähnten inhibitorischen Molekülen der Mikroumgebung und der physikochemischen Barriere stellt auch die Läsionshöhle einen hemmenden Faktor der axonalen Regeneration dar. Aus der zustandekommenden Kontinuitätsunterbrechung der langen auf- und absteigenden Bahnsysteme des RM resultiert nicht nur ein funktioneller Ausfall, sondern auch eine für die aussprossenden Axone unüberwindbare Lücke zwischen kranialem und kaudalem RM. Um diese Hürde überwinden und die Gewebekontinuität wieder herstellen zu können, sind verschiedene Formen von Biomaterialien entwickelt worden. Im Folgenden soll abschließend näher auf Typ-I-Kollagen Biomaterialien eingegangen werden (weitere Biomaterialien s. Schmidt und Leach (2003)).

2.3.1 Anforderungen an ein Brückenmaterial

Um eine „Brücke“ in die Läsionshöhle einbringen zu können, wurden zunächst bestimmte Anforderungen an das Material gestellt. Das Material sollte idealerweise:

- nicht toxisch sein
- eine modifizierbare Struktur aufweisen
- im Stande sein, als Zellträger zu fungieren. Auch sollte ein Besäen mit Matrixmolekülen möglich sein (Rolle eines *Carrier*)
- immunologisch inert sein und keine Fremdkörperreaktion induzieren
- resorbierbar sein
- weich und elastisch sein, damit die Implantation atraumatisch ist und keine

weiteren iatrogenen Ausfälle verursacht werden (Geller und Fawcett 2002; Novikova *et al.* 2003).

Das Ziel einer Brückenimplantation ist es, regenerierende Axone kranial in das Material eintreten, passieren und kaudal wieder in das RM austreten zu lassen (genauso auch umgekehrt). Idealerweise sollte, auf der Basis einer morphologischen Veränderung, so eine funktionelle Erholung ermöglicht werden.

2.3.1.1 Dreidimensionaler Kollagenschwamm als Brücke

Typ-I-Kollagenschwämme sind in hohem Maße biokompatibel und erfüllen alle unter 2.3.1 genannten Anforderungen. Die innere dreidimensionale Struktur eines Brückengerüsts hat wesentlichen Einfluss auf das Migrationsverhalten umgebender Zellen. Aus diesem Grund wird die Herstellung von Schwämmen angestrebt, die eine definierte, regulierbare und homogene Porenstruktur aufweisen. Mit der sog. kontrollierten Gefriertrocknungstechnik ist dies gelungen. Während des Gefriervorganges „wachsen“ – vereinfacht dargestellt – Eiskristalle in den Kollagenschwamm ein und bilden so langstreckige, orientierte und homogene Poren mit einem variierbaren Durchmesser von 20 – 80 µm (Schoof *et al.* 2001; Bozkurt *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu besitzen handelsübliche Kollagenschwämme eine inhomogene und nicht orientierte Struktur. Weitere Vorteile des Kollagens sind u.a. seine gute Verfügbarkeit (aus Schweinen oder Kälbern), Resorbierbarkeit, Biokompatibilität, weiche Konsistenz, Elastizität, hämostatische Wirkung und Struktur, die eine Zellmigration zulässt. Die dreidimensionalen Poren ermöglichen eine Penetration von aussprossenden Axonen. Bei ihrer Elongation nutzen Axone diese als Leitschienen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass man diese Schwämme mit verschiedenen Zellpopulationen und/oder Wachstumsfaktoren besetzen kann (*Carrier-Funktion*). Erst kürzlich konnte u.a. in Hinblick auf die *Carrier-Funktion* für die in diesem Forschungsprojekt verwendeten orientierten Kollagenmatrizes eine hohe Zytokompatibilität demonstriert werden. Die Matrizes können problemlos mit einer Auswahl verschiedener neuronaler Zelltypen – z. B. OHZ, SZ, Astrozyten, neuronal differenzierte SH-SY5Y-Neuroblastomzellen und Hinterwurzel-Ganglienzellen – besät werden (Bozkurt *et al.* 2007; 2009; Mollers *et al.* 2009).

2.4 Zielsetzung

Mit der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, dass durch die Implantation der neuartigen Typ-I-Kollagen-Matrix in das akut lädierte RM der Ratte langstreckig orientierte axonale Regeneration und Elongation gefördert werden. Hierbei soll außerdem nachgewiesen werden, dass solche Tiere mit einem Implantat den Tieren ohne Implantat überlegen sind. Darüber hinaus wird postuliert, dass die Kombination aus dem o.g. Biomaterial und hoch-gereinigter OHZ mit einer Förderung der axonalen Regeneration, einer Unterstützung intrinsischer Reparaturmechanismen und einer Erholung motorischer Funktionen einhergeht. Durch kombinierte Betrachtung sowohl von Verhaltensstudien als auch morphologischer Aspekte soll gezeigt werden, dass die biomaterial-implantierten Tiere den Kontrolltieren überlegen sind.

2.4.1 Hypothesen dieser Dissertation

- Die neu entwickelte Matricel-Matrix (MM) allein und kombiniert mit OHZ, unterstützt langstreckig-orientierte axonale Regeneration.
- Die MM ist biokompatibel und ihr Einsatz im Tiermodell ist unbedenklich.
- Im Laufe der postoperativen Verhaltensbeobachtung kommt es implantatvermittelt zur funktionellen Erholung der linken Pfote in den Gruppen MM+OHZ, MM allein. Die Griffhäufigkeit mit der linken Pfote im *Staircase*-Test sollte in diesen beiden Gruppen statistisch signifikant (s.s.) häufiger als in den beiden Kontrollgruppen Läsion allein und Spongostan sein. Gleiches sollte für den *Rearing*-Test gelten. Die Kontaktrate und Landerate mit der linken Pfote sollte im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen s.s. höher sein.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur: OHZ der adulten Ratte

Die Gewinnung und kulturelle Weiterverarbeitung der OHZ von adulten, weiblichen Lewisratten (Körpergewicht von ca. 200 – 300 g), erfolgte nach den bereits zuvor beschriebenen Protokollen (Ramon-Cueto und Nieto-Sampedro 1992; Barnett *et al.* 1993; Alexander *et al.* 2002). Um eine Abstoßungsreaktion der implantierten OHZ zu verhindern, wurden zum einen die OHZ aus Inzuchtstämmen gewonnen und zum anderen auch Inzucht-Lewisratten implantiert. N=10 Inzucht-Lewisratten dienten der OHZ Gewinnung.

Die frischen Spender-OHZ wurden aus der braunen, oberflächlichen Nervenschicht und der Glomerularschicht des *Bulbus olfactorius* gewonnen. Zellseparation zur Gewinnung der hoch-gereinigten p75-(NGF-Rezeptor) positiven OHZ wurde unter Zuhilfenahme von kommerziell erhältlichen magnetischen *Microbeads* durchgeführt (Firma Miltenyi Biotec, MiniMACS) (Vroemen und Weidner 2003). Zellkulturelle Arbeiten waren nicht Bestandteil dieser Dissertation, deswegen wird an dieser Stelle auf die Referenz Mollers *et al.* (2009) verwiesen.

3.2 Dreidimensionale Kollagen-Matrix

Dreidimensionale Biomaterialien, die auf Typ-I-Kollagen basieren, werden durch ein patentiertes Verfahren hergestellt (Schoof *et al.* 2001).

Implantationsstudien dieser Dissertation wurden mit Kollagenmatrizes durchgeführt, die durch die Firma Matricel GmbH (Kaiserstrasse 100, 52134 Herzogenrath, www.matricel.de/html/unternehmen.html) gespendet worden sind.

Bei der Herstellung der Matricel 3D-Matrizes (MM) gibt es im Vergleich zu der im oberen Abschnitt erwähnten allgemeinen Herstellung auf verschiedenen Produktionsstufen Unterschiede. Diese Modifikationen erfolgen auf Ebene der Vernetzungsmedien, Vernetzungsreagenzien und Denaturierungstemperaturen vor sowie nach Sterilisation der Matrizes. Während der sog. Gefriertrocknungstechnik kommt es zur Erstarrung, welche eine Kristallisation von Wasser nach sich zieht. Die auf diesem Weg entstehenden Eiskristalle „wachsen“ unidirektional durch die Kollagensuspension. Am Ende der Gefriertrocknung entsteht eine homogene und

poröse Mikrostruktur innerhalb der schwammartigen Matrix. Die so entstandenen Poren haben einen mittleren Durchmesser von 50 μm (Abb. 2).

Der Vorgang der Gefriertrocknung kann auf der Webseite www.matricel.com/html/plattformtechnologien.html nachvollzogen werden.

Nach umfangreichen *in-vitro*-Studien mit der MM konnten hier letztlich die *in-vivo*-Implantationsstudien durchgeführt werden.

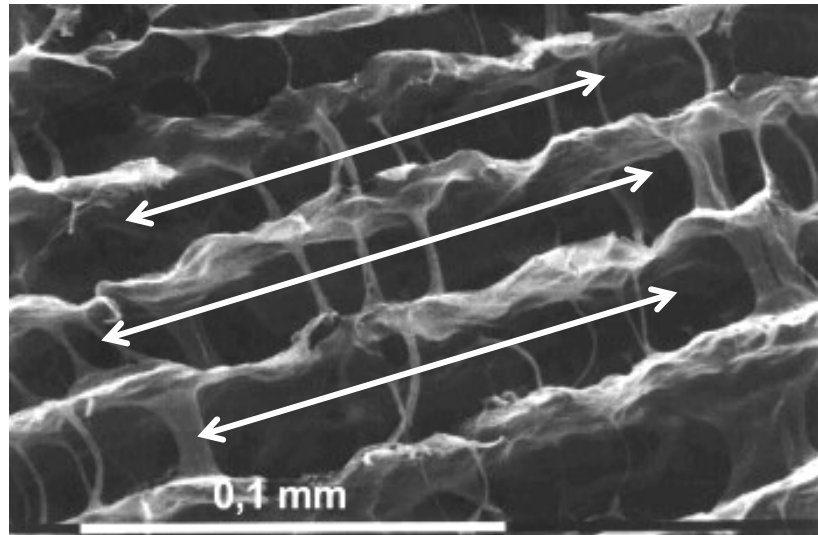


Abb. 2: Dargestellt ist die poröse rasterelektronenmikroskopische Mikrostruktur der MM. Durch die Gefriertrocknung entstehen feine Kanäle (weiße Pfeile), die elongierenden Axonen als Leitschiene dienen (Mit freundlicher Genehmigung www.matricel.de/html/plattformtechnologien.html#Vernetzung).

3.3 Versuchstiere

Für die durchgeführten Experimente wurden insgesamt N=46 weibliche, adulte Inzucht-Lewisratten (älter als 3 Monate) mit einem Körpergewicht zwischen 180 - 200 g verwendet. Diese Fallzahl wurde willkürlich gewählt. Auch die Zusammensetzung und die verschiedene Anzahl der Tiere innerhalb der Gruppen (siehe unten) waren willkürlich. Jeweils zwei Versuchstiere wurden in Plexiglaskäfigen (welche dem europäischen Standard der Tierhaltung entsprechen), bei einem 12:12 Stunden hell:dunkel Zyklus im Tierstall gehalten.

Den Tieren wurde nach der Einlieferung eine Eingewöhnungsphase von zwei Wochen gewährt, bevor überhaupt Diätmaßnahmen, präoperatives Training und anschließende operative Interventionen durchgeführt wurden. In diesen zwei Wochen hatten sie 24 Stunden *ad libitum* Zugang zu Trockenfutter (Firma *Sniff*) und Wasser.

Die Tierhaltung wurde gemäß der deutschen Gesetzgebung für Tierschutz durchgeführt. Sämtliche Tierversuche erfolgten nach Genehmigung der entsprechend zuständigen Landesbehörden und örtlichen Tierschutzbeauftragten (Bezirksregierung Köln, Aktenzeichen: 50.203.2-AC 23, 21/00).

3.4 Anästhesie und Läsionsmodell

Die adulten Lewisratten wurden intraoperativ einer hohen zervikalen Laminektomie und anschließend einer lateralen Funikulotomie unterzogen (Brook *et al.* 1997). Der Operationsmodus (ob nur eine Läsion gesetzt wurde, eine MM mit/ohne OHZ oder Spongostan implantiert wurde) wurde nach dem Zufallsprinzip durch den Operateur (Herr PD Dr. *rer. nat.* Brook) entschieden.

Die operativen Eingriffe wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Anästhesie wurde zuerst mit einem Inhalationsnarkotikum (Isofluran, Firma Forene) eingeleitet. Nach dieser leichten Narkose wurde eine tiefe Anästhesie mit einer intraperitonealen Chloralhydratinjektion (Sigma: 375 mg/kg Körpergewicht, in 0,9 %igem NaCl) durchgeführt. Darauf folgte eine Rasur des Nackenfells (Aesculap, Favorita II GT104), Desinfektion des Operationsgebietes mit 70 %igem Ethanol und entsprechende Operationslagerung der Ratte.

Nachdem der Hautschnitt gesetzt worden war, wurde das Operationsgebiet mit einem selbsthaltenden Wundspreizer offen gehalten. Unter Benutzung eines Operationsmikroskops der Firma Zeiss wurde das subkutane Fettgewebe in der Mittellinie gespreizt. Hierauf erfolgte die Durchtrennung des *M. trapezius* und der autochthonen Nacken-/Rückenmuskulatur. Unter Benutzung von Raspatorien wurden die Wirbel dargestellt. Es folgte das Aufsuchen der zervikalen Segmente 3 - 5, orientierend an den *Processus spinosi*. Der vierte Halswirbel wurde mit Hilfe einer Hohlmeißelzange anschließend laminektomiert. Nach Darstellung des dorsalen RM wurde die Dura inzidiert und diese zur Seite umgeklappt. Sodann wurde eine einfache, linksseitige laterale Funikulotomie, d.h. eine laterale Resektion eines 1 - 2 mm langen Stücks des RM durchgeführt. N=10 Versuchstiere erhielten eine einfache Läsion ohne weitere Implantationsschritte (Läsion allein Gruppe).

Stärkere Blutungen wurden mit Spongostan (Firma *Johnson&Johnson*), einem einfach erhältlichen resorbierbaren Gelatine-Hämostyptikum, gestillt.

Wenn keine weitere Maßnahme (z. B. MM Implantation) geplant war, wurde die Dura mit einer 10/0 Naht verschlossen. Mit resorbierbarem Nahtmaterial der Stärke 6/0

erfolgte anschließend der Verschluss der Muskelschichten. Die Hautnaht wurde mit 4/0 Catgut in Einzelknopfnahntechnik oder fortlaufend genäht.

Postoperativ wurden die Tiere für ca. zwei Stunden unter eine Infrarotlampe gelegt, um eine Unterkühlung zu vermeiden. Eine entsprechende analgetische und antibiotische Nachbehandlung war in keinem Fall nötig. Bereits nach zwei Stunden begannen die Versuchstiere zu trinken und Nahrung aufzunehmen.

3.5 Implantation der Matricel-Matrix

Nachdem weitere Versuchstiere eine ca. 1 - 2 mm große RM-Läsion erhalten hatten, wurde einer Gruppe eine MM, besät mit 40.000/µl OHZ-Suspension (Gruppe MM+OHZ N=14) implantiert und einer weiteren Gruppe eine unbesäte MM (Gruppe MM allein N=10). Die Größe der MM entsprach der Größe der Läsionshöhle.

Die MM ist mit einer Pinzette in die präformierte Läsionshöhle platziert worden. Dabei erfolgte die Platzierung der MM derart, dass die Längsachse der Matrixporen der Längsachse des RM entsprach, damit eine einwandfreie kraniale und kaudale Adaption der MM an die Schnittstellen des RM stattfinden konnte. Der Wundverschluss erfolgte nach dem Prinzip in Abschnitt 3.4.

3.6 Implantation des Spongostan

Eine zweite Kontrollgruppe von Versuchstieren erhielt das weiter oben beschriebene Hämostyptikum Spongostan (Firma *Johnson&Johnson*) als Implantat in die Läsionshöhle (Gruppe Spongostan; N=5). Wie bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben, handelt es sich beim Spongostan lediglich um ein kommerziell erhältliches, nicht-orientiertes resorbierbares Gelatine-Hämostase-Gerüst. Platziert wurde dieser Schwamm mit einer Pinzette. Das weitere Procedere der Operation entsprach der Beschreibung in 3.4.

Tab. 1: Überblick der Versuchstiere und der Gruppeneinteilung

<u>Gruppe</u>	<u>Anzahl Versuchstiere (N)</u>	<u>Ausgeschlossene Versuchstiere</u>	<u>Δ</u>
Läsion allein	10	5	5
Spongostan	5	1	4
Matricel-Matrix allein	10	3	7
Matricel-Matrix mit OHZ	14	2	12
<i>Intraoperativ verstorben</i>	7	7	0
Σ	46	18	28

Die Tabelle listet die in diesem Projekt verwendeten Versuchstiere auf: die Fallzahl pro Gruppe, die Anzahl der Tiere, die ausgeschlossen worden sind (entweder wegen intraoperativem Tod, histologisch gesicherter insuffizienter Läsion, histologisch gesicherter Dislokation des Implantates oder wegen eines mangelnden Trainingserfolges). Von den ursprünglich N=46 Versuchstieren blieben nach Ausschluss der verstorbenen und den übrigen Tieren N=28 Versuchstiere (Details in den entsprechenden Abschnitten).

3.7 Verhaltensstudien

Verhaltensstudien wurden als Blindversuch durchgeführt, d.h. dem Experimentator (H. Altinova) war nicht bekannt, nach welchem Modus welches Tier operiert worden war. Zwei verschiedene Verhaltensstudien dienten der Funktionsbeurteilung der linken Vorderpfote, da die Versuchstiere links lateral funikulotomiert worden waren. Insgesamt N=46 Lewisratten sind den beiden Verhaltensstudien nacheinander unterzogen worden (s. weiter unten). Entsprechend den oben beschriebenen operativen Maßnahmen wurden vier Gruppen gebildet:

- Läsion allein
- Läsion mit Spongostan
- Läsion mit MM allein (ohne OHZ)
- Läsion mit MM+OHZ.

Die beiden erstgenannten Gruppen dienten als Kontrollgruppen.

Nach der in Abschnitt 3.3 erklärten Eingewöhnungsphase von zwei Wochen wurden die Versuchstiere unter eine restriktive Diät von 12 g Trockenfutter (TF) gesetzt. Diese Diät wurde bis zum Ende des Versuches und bis zur Perfusion der Tiere beibehalten. Tatsächlich konnten verschiedene Forschungsgruppen in der

Vergangenheit zeigen, dass eine Futterrestriktion das Lernverhalten der Versuchstiere positiv beeinflusst (Montoya *et al.* 1991; Nikkhah *et al.* 1998; Yu und Mattson 1999; Mattson *et al.* 2002).

Nach der Eingewöhnungsphase von zwei Wochen begann das Training der Tiere. Bereits in der Eingewöhnungsphase wurden die Versuchstiere mit Futterpellets (FP) gefüttert. Diese FP spielten eine herausragende Rolle im *Staircase*-Test (3.7.1) und unterschieden sich insbesondere in Geruch und Größe von dem täglich verfütterten TF (Abb. 3). Die Tierpfleger wurden damit beauftragt, dass wenn sie den Tierstall betraten, die FP-Dose zu schütteln (auditiver Reiz) und die Versuchstiere anschließend mit diesen zu füttern (ca. 5 - 10 FP pro Käfig). Ziel war, einen Wiedererkennungseffekt im *Staircase*-Test zu erreichen (operante Konditionierung) und die Trainingsphase somit zu beschleunigen.

Die Trainingsphase, in der die Versuchstiere das gewünschte Verhalten erlernten, dauerte drei bis sechs Wochen. Es konnten in dieser Phase auch ausreichend präoperative Daten gesammelt werden. Anschließend wurden die o.g. chirurgischen Interventionen durchgeführt. Postoperativ einmal wöchentliche Verhaltenstests dienten der Funktionsprüfung der linken Vorderpfote und der Datenerhebung.



Abb. 3: Verwendete Futtersorten

Abgebildet ist das TF, welches die Tiere täglich bekamen (links im Bild). Rechts im Bild sind die FP dargestellt, die während des *Staircase*-Test gegriffen werden mussten.

3.7.1 *Staircase-Test*

Beim *Staircase*-Konstrukt handelt es sich um eine Box, die aus einer hinteren Metall- und einer vorderen Plexiglaskammer besteht (Abb. 4). Die Plexiglaskammer ist tunnelförmig und besitzt eine zentrale Plattform. In ihrem vorderen Abschnitt befinden sich rechts und links sieben stufige Treppen mit zentralen Einsenkungen zur Platzierung von FP. Es wurden pro Stufe vier FP platziert (insgesamt also 56 FP). Diese konnten vom Versuchstier nur dann aufgenommen werden, wenn es mit der rechten oder linken Pfote koordiniert zugriff. Die Konstruktion des *Staircase* ermöglichte es den Versuchstieren nicht, mit der linken Pfote auf die rechten Stufen zu greifen und umgekehrt. Allerdings konnten Versuchstiere die erste und zweite Stufe mit ihrer Zunge erreichen. Bei der Beobachtung der Tiere und der Datenerhebung wurde dieser Umstand berücksichtigt. Die koordinierte motorische Aufgabe musste von den Tieren während der Trainingsperiode erlernt werden. Innerhalb des Plexiglastunnels konnten keine Wendebewegungen gemacht werden, d.h. das Tier musste rückwärts aus dem Tunnel laufen, um wieder in die Metallkammer zu gelangen.

Der *Staircase*-Test eignet sich hervorragend zur Untersuchung der Vorderpfotengeschicklichkeit der Versuchstiere nach unilateraler Läsion im Bereich des RM (Montoya *et al.* 1991; Cregan *et al.* 1997; Nikkhah *et al.* 1998; Colbourne *et al.* 2000). Die Ratten wurden sowohl prä- als auch postoperativ für 15 Min. in die *Staircase*-Box gesetzt. Nach 15 Min. wurden dann die gefressenen FP rechts und links gezählt.

Die Versuchstiere sind vor der Operation dahingehend trainiert worden, innerhalb von 15 Min. so viele FP wie nur möglich zu ergreifen und zu fressen. Nur die gegriffenen und auch gefressenen FP wurden als erfolgreicher Griff gewertet. Diese objektiven Daten sind dann für die statistischen Berechnungen und graphischen Darstellungen verwendet worden.

Wenn ein Versuchstier vor der Operation nicht mindestens fünf FP (rechts und links separat) fraß, so musste dieses Tier aus dem gesamten Versuch ausgeschlossen werden, da in diesen Fällen kein Trainingserfolg unterstellt wurde. N=5 Versuchstiere erfüllten dieses Kriterium nicht und wurden daher aus dem gesamten Versuch ausgeschlossen (Gruppe Läsion allein N=3, Gruppe MM allein N=2, MM+OHZ N=2).

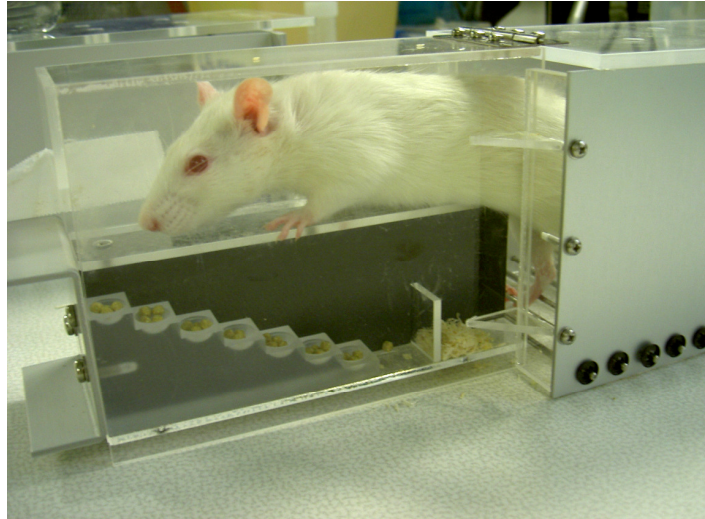


Abb. 4: Staircase-Box mit einem Verhaltenstier in der tunnelförmigen Vorderkammer

Aus der hinteren Metallkammer gelangt das Versuchstier in den Plexiglastunnel und versucht links oder rechts FP zu ergreifen. Sowohl in der Trainingsphase als auch während der postoperativen Datenerhebung mussten die Versuchstiere für 15 Min. im Staircase verweilen.

3.7.2 Rearing-Test

Der zweite Test, der zur Objektivierung der spontanen motorischen Pfotenfunktion diente, war der *Rearing-Test* (Schallert *et al.* 2000; Tillerson *et al.* 2001; Mattson *et al.* 2002). Die Verhaltenstiere wurden hierbei für drei Min. in einen stabilen, aufrechten Glaszylinder (26 cm Durchmesser, 42 cm Höhe) platziert. Auf Grund ihrer natürlichen Neugierde richteten sich die Ratten auf und begannen mit den Vorderpfoten die Glaswand zu explorieren (s. Abb. 5, B). Der spontane Gebrauch der rechten oder linken (auch simultan) Vorderpfote wurde mit einer Videokamera (VCR) (Sony DCR-HC16E, Mini-DV-Kassetten) aufgezeichnet. Ebenso wurde der Gebrauch der rechten oder linken (auch simultan) Vorderpfote bei der Landung aufgezeichnet. Damit man auch die schwierig zu differenzierenden Bewegungen der Versuchstiere an der hinteren Zylinderwand erfassen konnte, wurde hinter dem Glaszylinder ein Spiegel und die VCR in einem Winkel von ca. 30° zum Glaszylinder platziert. Später wurden die Videokassetten unter der Zeitlupenfunktion der VCR ausgewertet. Auch dieser Test ist einfach durchzuführen, objektiv und eignet sich zur quantitativen Beurteilung des spontanen und bevorzugten Gebrauchs der Vorderpfoten (Schallert *et al.* 2000).



Abb. 5 A, B: *Rearing-Test*

A) Während einer Verhaltensbeobachtungseinheit von drei Min. wurden mit einer vor dem Zylinder (weißer Pfeil) befindlichen VCR (gelber Stern) Aufnahmen gemacht. Die VCR stand mit einem Winkel von ca. 30° vor dem Glaszylinder. Die Aufnahmen wurden später in Zeitlupe ausgewertet.

B) Hier befindet sich ein Versuchstier im Glaszylinder zur Verhaltensbeobachtung. Es richtet sich spontan auf und beginnt die Zylinderwand neugierig zu explorieren. Die rechte Pfote (roter Kreis) befindet sich kurz vor dem Kontakt mit der Glaswand, während die linke bereits die Glaswand berührt.

Sowohl präoperativ als auch postoperativ wurden die Kontakt- und Landebewegungen separat für die linke Pfote, rechte Pfote und simultan aufgezeichnet.

Als Ausschlusskriterium wurde festgelegt: Wenn ein Versuchstier präoperativ nicht mehr als 20 Bewegungen an der Glaszylinderwand (rechte, linke und beide Vorderpfoten zusammen betrachtet) und wenn es nicht mehr als sechs Landungen (rechte, linke und beide Vorderpfoten zusammen betrachtet) durchführte, wurde dieses Tier aus dem *Rearing-Test* ausgeschlossen. Insgesamt drei Tiere wurden deswegen aus dem *Rearing-Test* ausgeschlossen (N=1 MM allein Tier, N=2 MM+OHZ Tiere). Ein präoperativer Ausschluss aus der Verhaltensstudie war nicht möglich, da die Kassetten erst nach Beendigung des gesamten Versuchs in einem Zug ausgewertet wurden (Blindversuch). Wenn bei der Auswertung in Zeitlupe eine Kontakt- oder Landebewegung nicht eindeutig erkannt wurde, so wurde die Bewegung nicht gezählt.

3.8 Perfusion der Tiere

Am Ende des Versuchs wurde den Versuchstieren eine terminale Chloralhydrat Dosis (2 ml/kg KG, i.p.) verabreicht. Nachdem alle Reflexe der Ratte erloschen waren, wurde der Thorax in der Mittellinie mit einer Schere eröffnet. Um die Lunge und das Herz einwandfrei darzustellen, wurden die kaudalen Rippen jeweils an den Seiten eingeschnitten und hochgeklappt. Eine stumpfe Kanüle der Perfusionsspritze wurde durch den rechten Ventrikel in den linken Ventrikel, sodann in die *Aorta ascendens* geschoben. Die Position der Kanüle wurde mit einer Klemme fixiert.

Durch das kardiovaskuläre System wurde langsam ein Volumen von 50 ml 0,9 % NaCl infundiert. Anschließend erfolgte die eigentliche Perfusion, indem 250 – 300 ml 4 % Paraformaldehyd (gelöst in eiskaltem 0,1 M Phosphatpuffer), unter Zuhilfenahme eines klinischen Infusionsbestecks infundiert wurde. Dieser Schritt dauerte 20 - 30 Min. Die erfolgreiche Perfusion konnte durch die Entfärbung der Augen, Leber, Extremitäten und zusätzlich durch die Kontraktion der Extremitäten kontrolliert werden.

Nach abgeschlossener Perfusion wurde die Wirbelsäule in ihrem gesamten Verlauf dargestellt, eröffnet und das RM kranial an der *Medulla oblongata* und soweit wie möglich kaudal durchtrennt. Einigen Versuchstieren wurde das Gehirn entnommen. Sämtliches Sektionsmaterial wurde zunächst für 4 - 24 Std. in 4 % PFA fixiert und anschließend in 20 % Saccharose gelöst in 0,1 M PBS für mindestens drei Tage im Kühlraum entwässert, bis die Gewebeschnitte angefertigt und diese dann bei -85°C für spätere Verarbeitungen gelagert wurden.

3.9 Kryoschnitthanfertigung

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden 30 µm dicke Kryoschnitte an einem CM 3050 Kryostaten der Firma Leica (Bensheim, Deutschland) angefertigt. Gewebeschnitte wurden sodann auf gekühlte Superfrost Plus Objektträger der Firma Langenbrinck aufgezogen und 30 Min. bei 37°C im Inkubator getrocknet, um im Anschluss eine immunhistochemische Färbung durchzuführen. Die Schnitte, die nicht sofort weiterverarbeitet worden sind, wurden bei Raumtemperatur zwei Std. getrocknet und bei -85°C bis zur späteren Weiterverarbeitung zwischengelagert. Auch diese Schnitte wurden vor der Immunhistochemie 30 Min. im Inkubator getrocknet.

3.10 Immunhistochemische Verfahren

3.10.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Alle nun folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt:

Die Schnitte wurden nach dem Trocknen drei mal fünf Min. in 0,1 M PBS gewaschen. Es folgte ein einstündiger Serumblock mit 3 % normalem Schafsserum (*Ngts*), gelöst in 1 % Triton X-100 und 0,1 M PBS. Hiernach wurden die Schnitte ohne PBS Waschschrift mit dem ersten AK über Nacht beladen (s. Tab. 2). Die Über-Nacht-Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer. Nach der Inkubation begann die weitere Färbung erneut mit drei 0,1 M PBS Waschschriften (jeweils drei Min.). Danach wurde im Dunkeln gearbeitet. Es folgte die Beladung mit dem zweiten AK (fluorchrom-konjugiert): „*Alexa 488 goat anti-rabbit IgG*“ und „*Alexa 594 goat anti-mouse IgG*“ – (beide in einer Verdünnung von 1 : 500) – gelöst in *ABD* (*Antibody Diluent*). Im Anschluss an eine zweistündige Inkubation folgten drei Waschschriften mit 0,1 M PBS. Dann wurden die Schnitte für drei Min. mit dem unspezifischen Zellkernmarker Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindol) gegengefärbt (Verdünnung 1 : 1000 in 0,1 M PBS). Die Färbung wurde mit drei 0,1 M PBS Waschschriften abgeschlossen, die Schnitte zum Schluss mit Fluoprep (Bio *Mérieux*) fixiert und eingedeckelt. Um die Fluoreszenzpräparate beurteilen, auswerten und fotografieren zu können, wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, *Axioplan*), verbunden mit einer Zeiss *AxioVision* CCD Kamera, verwendet. Die aufgenommenen Bilder wurden mit der Zeiss *AxioVision* 4.5 Software bearbeitet und modifiziert. Erforderliche Bearbeitungen des Kontrastes der Bilder wurden mit der Software *Adobe Photoshop* 7 durchgeführt. Bei histologisch eindeutigem Nachweis einer insuffizienten Läsion oder einer falschen Positionierung der MM (schlechte kraniale und kaudale Adaption an das RM Gewebe) wurden die jeweiligen Tiere aus der morphologischen Analyse und aus der Verhaltensbeobachtung ausgeschlossen.

3.10.2 Die verwendeten Antikörper

Für die Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurden die in Tab. 2 aufgeführten primären Antikörper verwendet:

Tab. 2: Überblick der verwendeten Antikörper

<u>Primärer Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
Monoklonale Antikörper		
<i>Growth associated protein-43</i> Gap-43/B50	Chemicon	1 : 2500
<i>Neurofilament 200kDa, phosphoryliert,</i> Klon NE14 NF200	Sigma	1 : 5000
<i>Microtubule associated protein 2</i> MAP-2	Sigma	1 : 1000
Polyklonale Antikörper		
Gap-43/B50	Chemicon	1 : 2500
<i>Glial fibrillary acidic protein</i> GFAP	DAKO	1 : 2000

3.10.2.1 Semiquantitative GFAP-Analyse

Um das Ausmaß der reaktiven Astrozytose beurteilen zu können, wurden aus den dorsalen, mittigen und ventralen Schnitten des RM aller Tiere (also erneut drei Schnitte pro Tier, Abschnitt 4.2.2.1 Schnittebene) an fünf verschiedenen Positionen, bei einer 20-fachen Vergrößerung Bilder angefertigt und gespeichert. Hierbei handelte es sich um Aufnahmen aus den Bereichen:

1. der unmittelbaren kranialen Grenzfläche zur Läsion, zum Spongostan oder zur MM, aber innerhalb der weißen Substanz,
2. kranialer Teil der Implantate,
3. mittlerer Teil der Implantate,
4. kaudaler Teil der Implantate und schließlich
5. der unmittelbaren kaudalen Grenzfläche zur Läsion, zum Spongostan oder zur MM, aber innerhalb der weißen Substanz.

Die 5 Lokalisationen sind in der schematischen Abb. 6 skizziert. Allerdings kam es in der Läsion allein Gruppe im Bereich der Läsion zur Bildung eines zystischen Hohlraums. Ebenso konnten in diesen Arealen Retraktionsprozesse beobachtet werden. Dieser Umstand führte dazu, dass keine überlappungsfreien Aufnahmen direkt in der Läsion gemacht werden konnten. Deswegen konnte nur die Gruppe Spongostan als Kontrolle dienen, wenn es darum ging, den Vergleich innerhalb der Implantate durchzuführen. In der Läsion allein Gruppe konnten also lediglich Aufnahmen im Bereich der kranialen und kaudalen Grenzfläche gemacht werden.

Die Aufnahmen wurden mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Dafür wurden die RGB-Bilder (*Red, Green, Blue*) in 8-Bit Bilder umgewandelt. Mit dem Programm können u.a. die mit Anti-GFAP gefärbten Areale (Pixel) in Prozent angegeben werden (semiquantitative Analyse). Dabei spielt die Intensität der Färbung keine Rolle. Lediglich die gefärbten Areale werden in Prozent angegeben; wobei der Prozentwert als Maß der reaktiven Astroglieose dient.

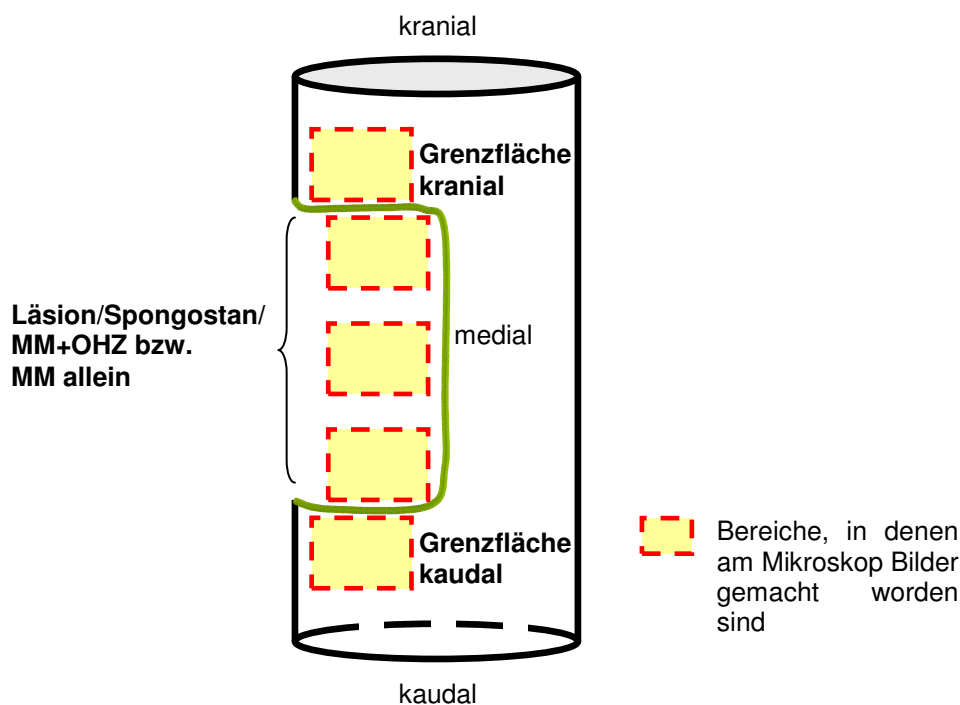


Abb. 6: Schematische Darstellung des lädierten RM

Es sind die fünf relevanten Positionen (rot gestrichelte gelbe Kästchen) demonstriert, die für die semiquantitative GFAP-Analyse am Mikroskop von Interesse waren. Die grüne Linie markiert die Grenzfläche zwischen der Läsion und dem nativem RM bzw. die Grenzfläche zwischen Implantat und RM. Zur besseren Übersicht enthält das Schema kein Implantat. Die Bilder wurden bei einer 20-fachen Vergrößerung angefertigt. Wichtig war hierbei, die unmittelbare Grenzfläche zum Implantat (kranial und kaudal) und die drei Positionen innerhalb des Implantates (kranial, mitte, kaudal) zu erfassen. Die Bilder wurden mit Hilfe der *ImageJ* Software ausgewertet.

3.10.2.2 Quantitative Auswertung Gap-43/B50-positiver Fasern

Gap-43/B50 wird als spezifischer Marker der axonalen Regeneration betrachtet (Oestreicher *et al.* 1997; Schmitt *et al.* 1999). Um die neu entstandenen Fasern in den verschiedenen Schnittebenen zu quantifizieren (ventral, mitte, dorsal), wurden die Gap-43-positiven Profile direkt am Zeiss Axioplan Mikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung gezählt. Es wurde an drei Positionen ausgewertet, und zwar im kranialen, mittleren und kaudalen Matrix-/Läsionsbereich. Kranial und kaudal wurde ein Abstand von 150 μm eingehalten, indem die Lichtquelle des Mikroskops (Durchmesser = 150 μm) eingeschaltet wurde (Abb. 7.1), und zwar derart, dass sie gerade noch gesehen wurde. Der untere bzw. obere Rand der Lichtquelle diente somit als virtuelle Linie (blau gestrichelt in Abb. 7.1 B), die sich beim Verschieben des Kreuztisches unter langsamer Bewegung des Einstellgriffs mitbewegte. Gezählt wurden nur die Axone, die die virtuelle Linie passierten. Axone, die die virtuelle Linie nicht erreichten bzw. die Linie nicht überschritten, wurden *nicht* gezählt.

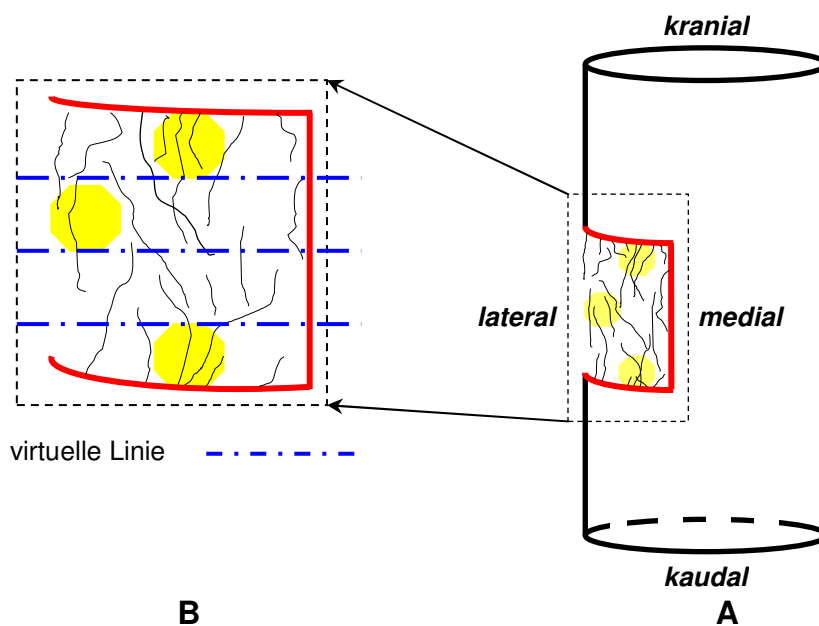


Abb. 7.1 A, B: Schematische Darstellung der Auswertung Gap-43/B50 und NF200-positiver Axone am Mikroskop

Die rote Markierung zeigt die Läsions- bzw. Implantatgrenze. Die gelben Oktaeder veranschaulichen schematisch das Licht des Mikroskops, wohingegen die schwarzen Linien Axone darstellen. A zeigt eine Übersicht der Läsion im RM. B stellt einen vergrößerten Abschnitt der Läsion bzw. der Implantate aus A dar. Zur besseren Übersicht beinhaltet das Schema kein Implantat. Die gelben Kreise zeigen die Positionen der schwach leuchtenden Mikroskoplampe, dessen (je nach Zählort) Ober-/Unterrand bei Verschiebung des Kreuztisches eine virtuelle Linie bildete (blau). Die Fasern, die diese Linie passierten (bei 40-facher Vergrößerung, Abstand 150 μm), wurden gezählt. Fasern, die die virtuelle Linie nicht durchquerten oder in dieser zum Stillstand kamen, wurden nicht gezählt.

3.10.2.3 Quantitative Auswertung der NF 200-positiven Fasern

Ein weiterer von uns verwendeter spezifischer Marker der axonalen Regeneration ist NF200. Das Zählen der NF200-positiven Axone erfolgte analog dem der Gap-43-positiver Profile (siehe Abs. 3.10.2.2 und Abb. 7.1).

Tab. 3: Tabellarische Darstellung der Schnittebenen und Positionen innerhalb der Läsion/Implantate für statistische Analysen

Schnittebene	Position innerhalb der Läsion bzw. des Implantates
<i>ventral</i>	kranial
	mitte
	kaudal
<i>mitte</i>	kranial
	mitte
	kaudal
<i>dorsal</i>	kranial
	mitte
	kaudal

Vereinfachte Darstellung der Schnittebenen und Analysepositionen (siehe auch Abb. 6, 7.1 und 7.2).

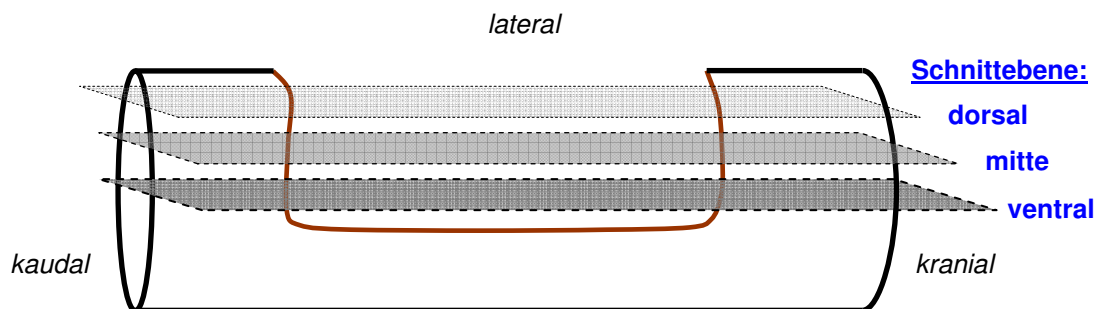


Abb. 7.2: Vereinfachte Skizze der Schnittebenen für die statistische Datenerhebung

Die rote Linie stellt die Läsion bzw. die Implantatposition im RM dar. Die drei Rechtecke demonstrieren Objektträger in den drei Ebenen. Aus den Schnittebenen wurden für die Gap-43-, NF200- und für die semiquantitative GFAP-Analysen Daten erhoben. Siehe auch Tab. 3.

3.11 Statistische Analyse

Sämtliche statistische Analysen wurden in explorativem Sinne mit Unterstützung der statistischen Softwarepakete SPSS, Version 13 und Graph Pad Prism, Version 5 (San Diego, CA, USA) durchgeführt. Als globales Signifikanzniveau für alle durchgeführten statistischen Testverfahren wurde $\alpha=5\%$ gewählt, d.h. p-Werte von

$p \leq 0.05$ können als statistisch signifikante (s.s.) Testresultate (bezogen auf das untersuchte Kollektiv) interpretiert werden und wurden jeweils in den entsprechenden Graphen mit einem Stern (*) markiert. Alle statistischen Analysen wurden in freundlicher Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. S. Stanzel (Institut für Medizinische Statistik – RWTH Aachen) nachbesprochen und korrigiert.

3.11.1 *Staircase-Test*

Präoperativ wurde für jedes Tier, separat für linke und rechte Pfote, die *maximale Performance* als Durchschnitt der zwei höchsten Werte gefressener FP (innerhalb der Trainingsphase) berechnet. Diese Werte wurden anschließend, separat für linke und rechte Pfote, durch den Mittelwert und den zugehörigen Standardfehler des Mittelwertes (SEM) zusammengefasst und graphisch dargestellt. Zum Vergleich der *maximalen Performance* zwischen linker und rechter Seite (für das Gesamtkollektiv) wurde der verbundene t-Test (t-Test für verbundene Stichproben) durchgeführt.

Postoperativ wurde die Anzahl der Linksgriffe für jeden der 13 Untersuchungszeitpunkte (präoperativ und 12 postoperative Wochen) und jede der vier Gruppen (Läsion allein, Spongostan, MM allein, MM+OHZ) wiederum durch den Mittelwert und den zugehörigen SEM zusammengefasst und entsprechend graphisch gegenübergestellt. Zur Analyse von Zeit- und Gruppeneffekten auf die Anzahl von Linksgriffen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen und Interaktion (Zielvariable: Anzahl der Linksgriffe; Einflussfaktor: Gruppe; Messwiederholungsfaktor: Zeit) durchgeführt. Nur im Falle von einem s.s. Testresultat in mit dem Interaktionseffekt (Zeit×Gruppe) korrespondierenden globalen F-Test (d.h. falls $p \leq 0.05$) wurden anschließend adäquate sinnvolle Paarvergleiche zwischen Gruppen, separat pro Zeitpunkt, mit Hilfe geeigneter *post-hoc* unverbundener t-Tests durchgeführt.

3.11.2 *Rearing-Test*

Sowohl präoperativ als auch postoperativ ermittelte Kontakt- und Landeraten wurden, separat für rechte Pfote, linke Pfote oder simultan, durch den Mittelwert und den zugehörigen SEM zusammengefasst und entsprechend visualisiert. Präoperativ erfolgten diese Berechnungen ausschließlich für das Gesamtkollektiv, postoperativ separat für jede der vier Gruppen und jeden der folgenden fünf

Untersuchungszeitpunkte: präoperativ, 1 Woche, 4 Wochen, 8 Wochen, 12 Wochen. Die präoperativ ermittelten Kontakt- und Landeraten wurden jeweils mit Hilfe des verbundenen t-Tests zwischen linker und rechter Pfote verglichen.

Postoperativ wurden insgesamt 6 separate zweifaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholungen und Interaktion (Einflussfaktor: Gruppe, Messwiederholungsfaktor: Zeit präoperativ, 1 Woche, 4 Wochen, 8 Wochen, 12 Wochen) zur Analyse von Zeit- und Gruppeneffekten auf die

- | | | | |
|----|----------------------|----|--------------------|
| a) | Kontaktrate links | d) | Landerate links |
| b) | Kontaktrate rechts | e) | Landerate rechts |
| c) | Kontaktrate simultan | f) | Landerate simultan |

durchgeführt. In jedem dieser sechs varianzanalytischen Modelle wurden nur im Falle von s.s. Testresultaten in den mit den beiden Haupteffekten (Gruppe, Zeit) oder dem Interaktionseffekt (Zeit×Gruppe) korrespondierenden globalen F-Tests (d.h. falls $p \leq 0.05$) anschließend adäquate sinnvolle Paarvergleiche zwischen Gruppen bzw. zwischen Zeitpunkten mit Hilfe geeigneter *post-hoc* t-Tests durchgeführt.

3.11.3 Immunhistochemie

Die erhobenen Werte der immunhistochemischen Parameter (Anzahl Gap-43-positiver Fasern, Anzahl NF200-positiver Fasern, reaktive Astrozytose) wurden jeweils durch den Median und den zugehörigen Interquartilsabstand (IQA) zusammengefasst und teilweise in parallelen *Boxplots* zwischen Gruppen, Positionen (kranial, mitte, kaudal) und Schnittebenen (ventral, mitte, dorsal) verglichen. Zum paarweisen Vergleich dieser drei immunhistochemischen Parameter zwischen den vier Gruppen (Läsion allein, Spongostan, MM allein, MM+OHZ) wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Rangsummentest (unverbundener Wilcoxon-Test; Mann-Whitney-Test, U-Test) durchgeführt. Für den paarweisen Vergleich dieser drei Parameter zwischen den drei Positionen oder den drei Schnittebenen (innerhalb jeder der vier Gruppen) wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben (verbundener Wilcoxon-Test) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Verhaltensstudien

Wie in Abschnitt 3.7 dargestellt, wurden für Verhaltensstudien der *Staircase*- und der *Rearing*-Test verwendet, um die Erholung der motorischen Funktion der linken Pfote quantitativ zu erfassen.

4.1.1 *Staircase*-Test

Der *Staircase*-Test stellt eine relativ einfache, objektive und unkomplizierte Methode zur Untersuchung koordinierter motorischer Funktionen des Vorderlaufs der Ratte dar.

Damit die Verhaltenstiere auch das gewünschte Verhalten, nämlich das koordinierte Greifen nach den FP in den Einsenkungen der Treppen zeigten (Abb. 4), wurden die Ratten trainiert. In der Trainingsphase und im Verlauf des gesamten Versuches wurden die Tiere unter eine restriktive Diät von 12 g TF/d gesetzt. Weitere Erläuterungen hierzu siehe Abschnitt 3.7.1. Bevor aber die ersten Trainingseinheiten durchgeführt worden sind, wurde deutlich, dass die Tageszeit der Verhaltensbeobachtung eine wesentliche Rolle spielte. Während sich die Tiere in den Morgen- und frühen Mittagstunden eher passiv verhielten, steigerte sich ihre Aktivität nach 16 Uhr. Aus diesem Grund wurden sämtliche Verhaltensbeobachtungen zwischen 16 und 20 Uhr durchgeführt.

Um die Effizienz des Trainings zu steigern und den Griff nach den FP zu beschleunigen, war es von großer Wichtigkeit, dass die Verhaltenstiere die FP erkannten. Hierfür wurde das Tierpflegepersonal gebeten, bei Betreten des Raumes die Dose mit den FP zu schütteln und die Tiere anschließend damit zu füttern. Tatsächlich reagierten alle zu diesem Projekt gehörigen Verhaltenstiere schon im Tierstall auf das auditive Signal, indem sie sich im Käfig aufrichteten und ungeduldig schnuppernd auf die Fütterung warteten. Dieser Konditionierungserfolg konnte bei den Versuchstieren anderer Projekte im Tierstall nicht beobachtet werden.

Das Greifen nach den FP konnte auf diesem Weg im *Staircase* wesentlich beschleunigt werden. In den ersten Trainingstagen zeigten die meisten Tiere im *Staircase* Zeichen von Stress, der sich v.a. durch Urinabgang, Apathie oder

„freezing“ äußerte. Um die Zurückhaltung der Tiere im *Staircase* zu durchbrechen, wurde das auditive Signal geboten und zusätzlich den Tieren ein FP in der Spitze einer anatomischen Pinzette vorgehalten. Die Tiere beschnupperten und fraßen sofort das zwischen der Pinzette befindliche FP. Auf diesem Weg wurde ein Wiedererkennungseffekt erzielt. Dadurch stiegen die Tiere auf die Plattform im Tunnel und griffen bereits innerhalb der ersten Woche nach den FP. Wurden o.g. Gesichtspunkte beachtet und während der Beobachtung eine ruhige Atmosphäre geschaffen, zeigten die Tiere keine Zeichen von Stress mehr.

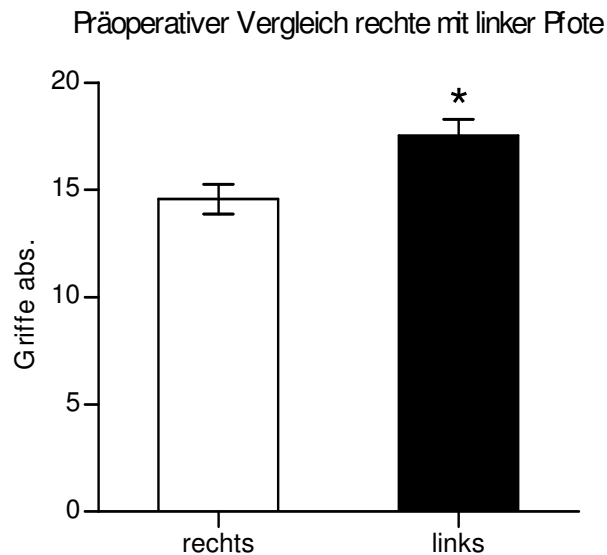
4.1.1.1 Quantitative Ergebnisse *Staircase*-Test

Um feststellen zu können, ob es präoperativ bei den Griffen nach den FP eine Seitendifferenz zwischen rechter und linker Pfote gab, wurden die präoperativen Daten für jedes Tier, separat für die linke und die rechte Pfote, die *maximale Performance* als Durchschnitt der zwei maximalen Anzahlen gefressener FP (also innerhalb der Trainingsphase) berechnet. Diese Werte wurden separat für linke und rechte Pfote durch den Mittelwert und den zugehörigen Standardfehler des Mittelwertes (SEM) zusammengefasst und in Graphik 1 gegenübergestellt. Zum Vergleich der *maximalen Performance* zwischen linker und rechter Seite (für das Gesamtkollektiv) wurde der verbundene t-Test (t-Test für verbundene Stichproben) durchgeführt.

Die Bildung des Mittelwertes der präoperativen Griffe jeweils mit rechts und links war möglich, weil die Tiere sich vor den Interventionen nicht unterschieden und somit als ein Kollektiv betrachtet werden konnten.

Durch den Test konnte gezeigt werden, dass Verhaltenstiere im *Staircase*-Test präoperativ s.s. häufiger (**p=0.002**) mit der linken Pfote (N=28, MW=17.54, SEM=0.75) gegriffen haben als mit der rechten Pfote (N=28, MW=14.57, SEM=0.69) (Graphik 1).

Eine Woche nach der Operation begannen die postoperativen Beobachtungen und wurden einmal wöchentlich über einen Zeitraum von 12 Wochen durchgeführt. Bereits in der ersten Woche zeigte sich jedoch, dass sich die Verhaltenstiere nach mehrfach gescheiterten Linksgriffen wegen der linksseitigen Funikulotomie überwiegend auf die FP der rechten Stufen konzentrierten. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Anzahl der FP auf den Stufen rechts um 50 % verringert.



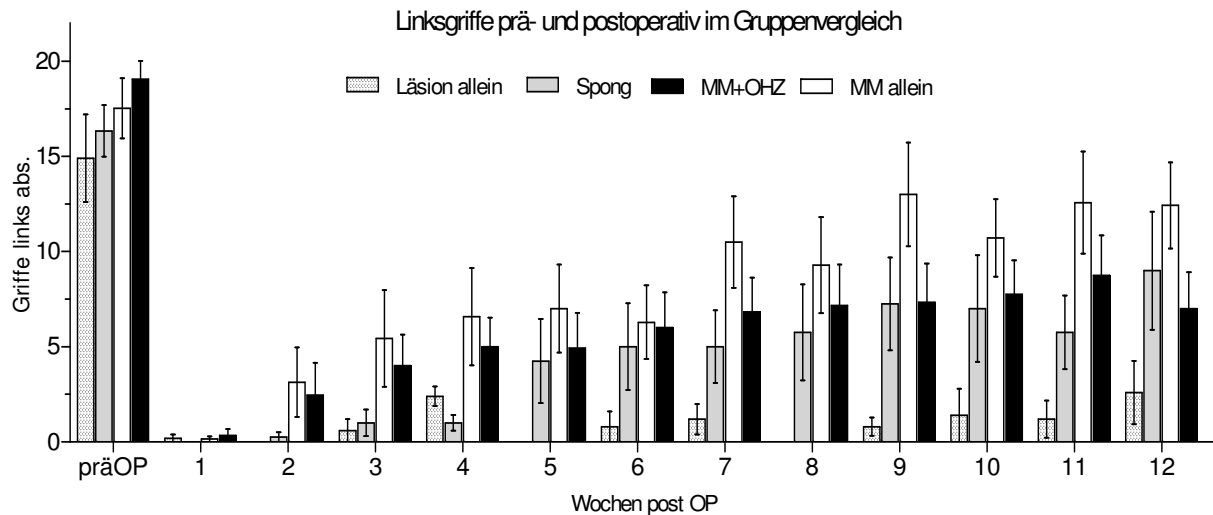
Graphik 1: Präoperativer Seitenvergleich der Griffe

Im *Staircase*-Test wurden präoperativ s.s. häufiger Links- (N=28, MW=17.54, SEM=0.75) (**p=0.002**; verbundener t-Test) als Rechtsgriffe (N=28, MW=14.57, SEM=0.69) durchgeführt.

Die an diesem Testtag gesammelten Daten wurden verworfen und der Test am selben Tag mit der reduzierten Menge auf den rechten Stufen wiederholt. Die Mengenreduktion auf den rechten Stufen trug dazu bei, dass die Motivation der Tiere anstieg, und sie gezwungen waren, auch Linksgriffe auszuführen, nachdem sie die rechtsseitigen FP weitgehend gefressen hatten. Aus diesem Grund sind postoperative Vergleiche der Anzahl gefressener FP zwischen rechter und linker Pfote leider nicht mehr sinnvoll. Daher wird im Folgenden nur Bezug auf die linksseitigen Griffe genommen.

Zur Beurteilung eines Gruppen- und Zeiteffektes auf die Anzahl der postoperativ ermittelten linksseitigen Griffe, erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen. Diese zeigte einen s.s. Zeiteffekt ($F_{12,22}=39.4$, **p=0.00065**), während die Gruppen keine s.s. Unterschiede in der postoperativ ermittelten Anzahl linksseitiger Griffe aufwiesen ($F_{3,22}=2.74$, $p=0.068$). Auch der Wechselwirkungseffekt zwischen Zeit und Gruppe auf die Anzahl der postoperativ ermittelten linksseitigen Griffe war s.s. ($F_{36,22}=1.7$; **p=0.01**) (Graphik 2).

Zusammenfassend konnten bezogen auf den *Staircase*-Test keine s.s. Unterschiede in der postoperativ ermittelten Anzahl linksseitiger Griffe zwischen den vier Gruppen gefunden werden konnte.



Graphik 2: Postoperative Griffe mit der linken Pfote, zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen und Interaktion

Dargestellt sind die in den ersten 12 postoperativen Wochen gegriffenen FP (Mittelwert und SEM) aller vier Gruppen (Einzelwerte Abs. 7.1). Man erkennt einen kontinuierlichen Anstieg der linksseitigen Grifftrate, v.a. in den Gruppen MM allein und MM+OHZ. Deutlich sieht man, dass es in der ersten postoperativen Woche in allen Gruppen zu einem „Einsturz“ der Griffe links kam. Interessanterweise kam es auch zu einem kontinuierlichen Anstieg der Grifftrate bei Spongostan-Tieren, während die Läsion allein Gruppe auf einem niedrigen Niveau blieb. Am Endpunkt (12. Woche) sieht man, dass MM allein Tiere tendenziell mehr FP griffen als alle anderen Gruppen. Erstaunlicherweise griffen Spongostan-Tiere hier tendenziell mehr FP als die MM+OHZ Gruppe. Trotz dieser graphischen Darstellung konnten (gemittelt über die Zeit) keine s.s. Unterschiede zwischen den vier Gruppen nachgewiesen werden ($F_{3,22}=2.74$, $p=0.068$). Allerdings besteht ein s.s. Zeiteffekt ($F_{12,22}=39.4$, $p=0.00065$).

4.1.1.2 Qualitative Beobachtungen während des *Staircase*-Test

Betrachtet man qualitative Gesichtspunkte der vorher/nachher Griffausführung, so ließ sich während der Verhaltensbeobachtung Folgendes erkennen:

Während in der Trainingsperiode die Tiere nach der Akklimatisation schnell, hastig und koordiniert nach den FP griffen und die rechten und linken Stufen innerhalb der 15 Min. weitestgehend leerten, zeigte sich postoperativ rechts (nicht lädierte Seite) weiterhin schnelles, hastiges Greifen. Die Qualität der Griffe mit der linken Pfote unterschied sich allerdings wesentlich im vorher/nachher Vergleich. Die Griffe waren protrahiert und Misserfolge in Form des Herunterfallens bereits gegriffene FP traten häufiger auf. Manchmal benutzten die Tiere die Plexiglaswand der *Staircase*-Konstruktion partiell als Hilfe, indem sie die gegriffenen FP an der Wand entlang hoch schoben, da ein FP nicht immer vollständig umschlossen werden konnte. Aus diesem Grunde erhöhte sich die Misserfolgsrate postoperativ. Auch versuchten die Tiere, mehr als ein FP zu umgreifen. Dabei „fegten“ sie mit der linken

Pfote über die FP und „schnappten“ verzögert zu. Diese Verhaltensweise war präoperativ nicht zu beobachten.

4.1.2 *Rearing-Test*

Der *Rearing-Test* wurde zur quantitativen Beurteilung von Asymmetrien der Vorderlaufbewegungen nach den Läsions- und Implantationsoperationen durchgeführt. Nachdem die Versuchstiere in einen Glaszylinder gesetzt wurden, begannen sie auf Grund ihrer natürlichen Neugierde die Zylinderwand mit ihren Pfoten zu explorieren. Dabei benutzten sie entweder die rechte, die linke oder beide Pfoten simultan. Gleiches galt für die Landebewegungen der Tiere nach einer vollständigen Aufrichtung. Mit der Landung wurde das Explorationsverhalten beendet. Wie in Abschnitt 3.7.2 erläutert, zeigten die Versuchstiere auch in diesem Test während der ersten Trainingstage Zeichen von Stress (*freezing*), die aber mit der Eingewöhnung rasch verschwanden. Die Bewegungen der Tiere wurden in der Testzeit von drei Min. mit einer VCR aufgezeichnet und anschließend in Zeitlupe unter den in Abschnitt 3.7.2 klar definierten Kriterien ausgewertet.

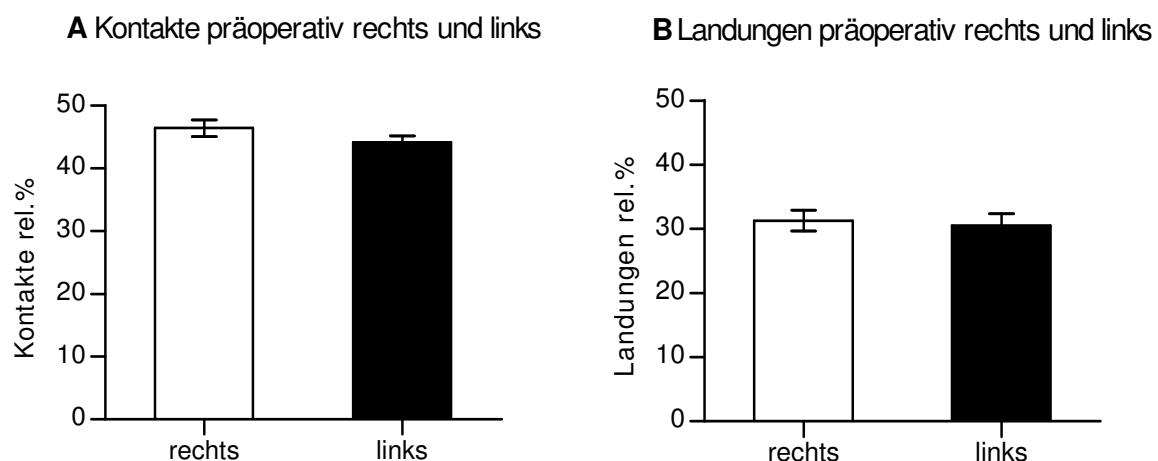
4.1.2.1 Statistische Auswertung des *Rearing-Test*

Im Folgenden werden die Bewegungen an der Glaszylinderwand sowie die Landebewegungen sowohl während der Trainingsphase als auch während des 12-wöchigen postoperativen Beobachtungszeitraums statistisch analysiert. Alle Daten im *Rearing-Test* sind als relative Kontakt- bzw. Landeraten wiedergegeben, denn jedes Tier zeigte eine variable Aktivität in der Testzeit. Um dennoch die verschiedenen Bewegungen und Landungen der einzelnen Tiere miteinander vergleichen zu können, wurden die absoluten Kontakt- und Landebewegungen des einzelnen Tiers in relative (%) Kontakt- und Landebewegungen umgerechnet. Diese Umrechnung erfolgte nach der Formel (wenn man den prozentualen Anteil der Kontakte mit der linken Pfote in Verhältnis zu den Kontakten mit der rechten Pfote und mit den Pfoten simultan z. B. in der Woche 1 (T1) setzen möchte):

$$\text{Kontaktrate links (T1) (in \%)} = \frac{\text{Kontakte links (T1)}}{(\text{Kontakte links (T1)} + \text{rechts (T1)} + \text{simultan (T1)})} \times 100.$$

Vergleiche zwischen den Gruppen erfolgten mit den arithmetischen Mittelwerten (und zugehörigen SEM) dieser relativen Daten.

Mit Hilfe eines verbundenen t-Tests wurde untersucht, ob es präoperative Seitenunterschiede in den Kontakt- bzw. Landebewegungen rechts vs. links gab (Graphik 3). Auch hierfür wurden – analog dem *Staircase*-Test – die relativen Daten der jeweiligen Kontakt- und Landeraten (Pfoten rechts vs. Pfoten links) als eine große Gruppe betrachtet, da die Tiere sich vor der operativen Intervention nicht unterscheiden sollten. Weder in Bezug auf die Zylinderwandkontakte (linke Pfote: N=25, MW=44.11, SEM=1.03; rechte Pfote: N=25, MW=46.37, SEM=1.32; $p=0.336$, verbundener t-Test) noch in Bezug auf die Landerate (linke Pfote: N=25, MW=30.47, SEM=1.83; rechte Pfote: N=25, MW=31.26, SEM=1.65; $p=0.789$, verbundener t-Test) konnten s.s. Unterschiede zwischen linker und rechter Pfote präoperativ nachgewiesen werden.



Graphik 3: Verbundener t-Test zur Prüfung einer bestehenden präoperativen Seitendifferenz

Der t-Test für verbundene Stichproben zeigte sowohl für die rel. Kontakt- (A) bzw. Landerate (B) keine s.s. Seitenunterschiede. A) Linke Pfote: N=25, MW=44.11, SEM=1.03; rechte Pfote: N=25, MW=46.37, SEM=1.32; $p=0.336$. B) Linke Pfote: N=25, MW=30.47, SEM=1.83; rechte Pfote: N=25, MW=31.26, SEM=1.65; $p=0.789$, verbundener t-Test). Im *Staircase*-Test war sehr wohl ein s.s. Unterschied nachgewiesen worden (Graphik 1).

Postoperativ wurden die vier Gruppen hinsichtlich der Bewegungsasymmetrien unter Berücksichtigung des Zeitfaktors im Explorations- und Landeverhalten miteinander verglichen. Dabei wurden lediglich die zu den Zeitpunkten präoperativ und 1. – 4. – 8. – 12. postoperativen Wochen erhobenen Daten verwendet. Dies war erforderlich, weil es in den übrigen Wochen wiederholt zu technischen Problemen bei der

Auswertung der Videokassetten kam, was zu einem Verlust einzelner Daten führte. Eine Varianzanalyse mit fehlenden Daten konnte nicht durchgeführt werden.

Für jede Bewegungsform (Kontakt- und Landerate rechts/links/simultan) wurde eine separate zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung und Interaktion durchgeführt (Einflussfaktor: Gruppe; Messwiederholungsfaktor: Zeit (präOP, 1. W, 4. W, 8. W, 12. W)).

Bei den Kontakten mit der rechten Pfote gab es lediglich einen s.s. Zeiteffekt, aber keine Gruppenunterschiede ($F_{4,21}=7.0$, $p<0.0001$, Gruppe $p=0.3118$ und Zeit×Gruppe $p=0.0377$). Erstaunlicherweise konnten auch keine Gruppenunterschiede bei den Linkskontakten festgestellt werden, lediglich ein s.s. Zeiteffekt ($F_{4,21}=19.19$, $p<0.0001$, Gruppe und Zeit×Gruppe $p<0.0001$). Simultankontakte mit der Zylinderwand zeigten einerseits s.s. Unterschiede in Zeit ($F_{4,21}=2.51$, $p=0.0481$), Gruppe ($F_{3,21}=3.9$, $p=0.0233$) und auch Zeit×Gruppe ($F_{12,21}=1.9$, $p=0.0465$). Der durchgeführte *post-hoc* t-Test zeigte die s.s. Unterschiede einmal in der vierten postoperativen Woche zwischen Spongostan vs. MM allein ($p<0.05$) und zwischen MM allein vs. MM+OHZ ($p<0.05$) sowie in der achten postoperativen Woche zwischen den Gruppen Läsion allein vs. Spongostan ($p<0.001$) und Läsion allein vs. MM allein ($p<0.05$), Läsion allein vs. MM+OHZ ($p<0.05$).

Bei den Landebewegungen mit der rechten Pfote konnte die Varianzanalyse für wiederholte Messungen einen s.s. Zeiteffekt ($F_{4,21}=3.5$, $p=0.0109$), keinen s.s. Gruppeneffekt ($p>0.6859$) und einen s.s. Effekt für die Interaktion Zeit×Gruppe ($F_{12,21}=2.5$, $p=0.0074$) zeigen. Entgegen den Erwartungen unterschieden sich die Gruppen hinsichtlich der Landerate mit der rechten Pfote nicht s.s. Auch bei den Landebewegungen mit der linken Pfote gab es interessanterweise keine s.s. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0.237$) (Zeit: $F_{4,21}=0.9$, $p=0.466$, Zeit×Gruppe: $p=1.124$). Die ausgeführten Landebewegungen simultan zeigten lediglich einen s.s. Unterschied über die Zeit ($F_{4,21}=2.5$, $p=0.0491$), jedoch keine s.s. Unterschiede zwischen den Gruppen und auch keinen s.s. Wechselwirkungseffekt (Gruppe: $p=0.2686$, Zeit×Gruppe: $p=0.3859$). Graphik 4 demonstriert die jeweiligen Kontakt- und Landeraten in den Gruppen. In Abs. 7.1 können die Einzeldaten nachvollzogen werden.

Insgesamt betrachtet konnte keine s.s. Überlegenheit im Sinne eines besseren Outcomes der MM allein- und MM+OHZ Gruppe verglichen mit den beiden Kontrollgruppen festgestellt werden. Obwohl in Graphik 4 an verschiedenen Stellen Unterschiede zwischen den Gruppen dargestellt werden, so sind diese in der Regel nicht s.s. (s. Erklärung der Graphik 4)

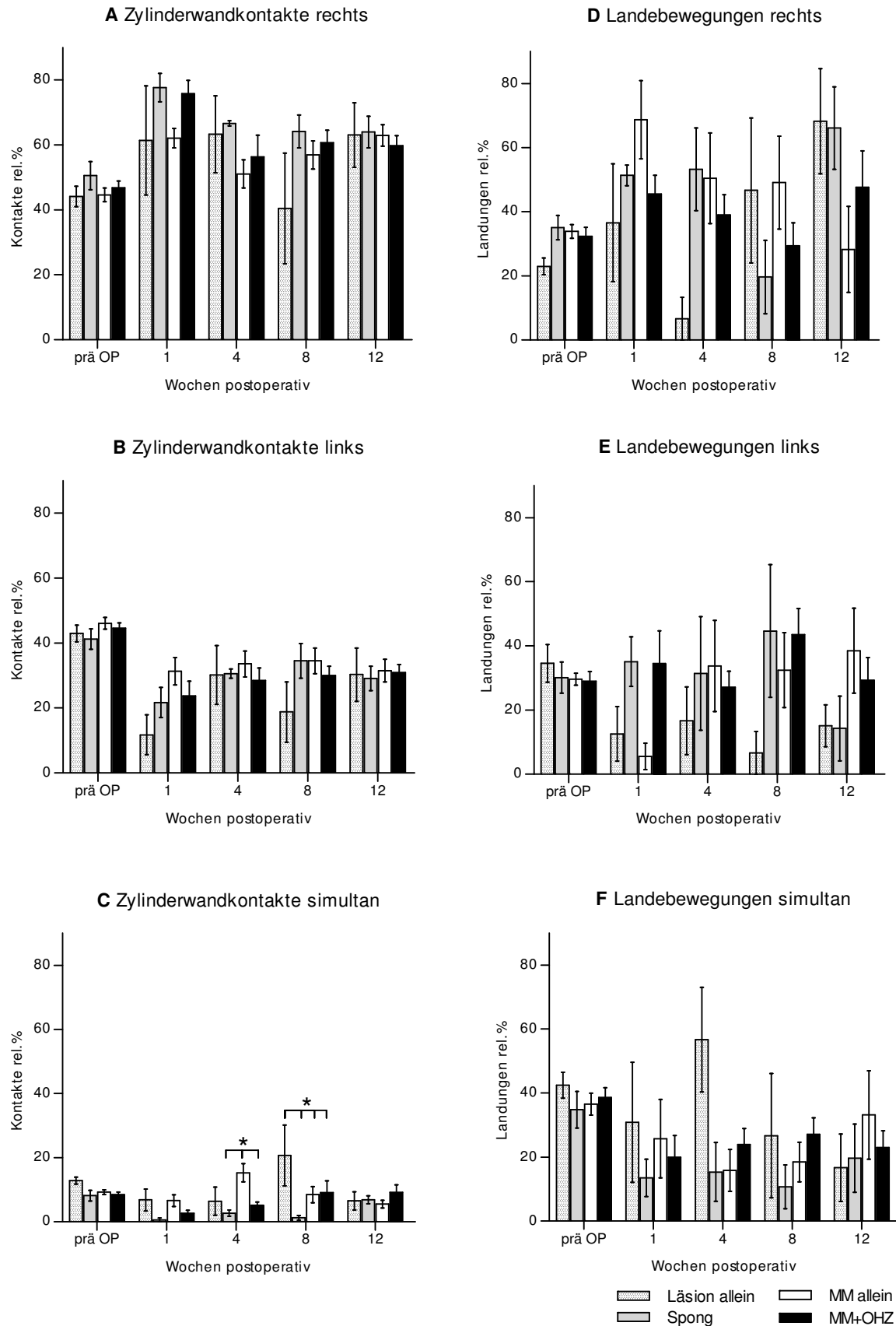
4.1.2.2 Qualitative Beobachtungen während des *Rearing*-Tests

Nachdem Verhaltenstiere in der postoperativen Phase in den Glaszylinder überführt wurden, zeigten sie besonders in der ersten Woche eine verminderte Aktivität.

Bei der Exploration der Zylinderwand fiel auf, dass die meisten Tiere unabhängig von der Gruppe Kontakte mit der linken Pfote vermieden. Besonders in den Landebewegungen (siehe Graphik 4 E) waren die Gruppen MM allein und MM+OHZ aktiver. Interessanterweise gab es auch hier viele Landungen mit der linken Pfote verglichen mit der Läsion allein Gruppe, auch wenn diese nicht s.s. waren.

Bei allen Tieren wurde deutlich, dass die linke Vorderpfote in ihrer Funktion beeinträchtigt war. In der aufrechten Position der Versuchstiere war erkennbar, dass eine Haltungsanomalie dieser Pfote vorlag. Sie war im Gelenk gebeugt und konnte nicht vollständig gestreckt werden. Erst der Kontakt mit der Zylinderwand führte zu einer vollständigen Streckung, bedingt durch die Verlagerung des Körpergewichts auf die affektierte Pfote. Außerdem wurde bei vielen Tieren – unabhängig von den Gruppen, aber besonders prominent in der Spongostan- und Läsion allein Gruppe – eine Spreizung der Fingerstrahlen beim Kontakt mit der Glaswand registriert. Ähnliche Beobachtungen wurden auch beim *Staircase*-Test gemacht. Hier wurden die FP nicht vollständig umschlossen.

4. Ergebnisse



Graphik 4, A-F: Vergleich der Bewegungsraten (Mittelwert und SEM) zwischen Gruppen zu den verschiedenen Testzeitpunkten postoperativ

Die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen und Interaktion ergab, dass es bei den Zylinderwandkontakten (gemittelt über die Zeit) keine s.s. Gruppenunterschiede in Bezug auf die Kontaktraten mit der rechten (A) und linken (B) Pfote gab (jeweils $p > 0.05$). Auch hinsichtlich der

Landeraten mit der rechten (D) und linken (E) Pfote konnten keine s.s. Gruppenunterschiede festgestellt werden. S.s. Gruppenunterschiede konnte lediglich bei den Simultankontakten mit der Zylinderwand durch die zweifaktorielle Varianzanalyse nachgewiesen werden. Der *post-hoc* t-Test zeigte diese Unterschiede einerseits in der vierten postOP Woche zwischen Spongostan vs. MM allein ($p<0.05$) und zwischen MM allein vs. MM+OHZ ($p<0.05$) und andererseits in der achten postOP Woche zwischen den Gruppen Läsion allein vs. Spongostan ($p<0.001$) und Läsion allein vs. MM allein ($p<0.05$), Läsion allein vs. MM+OHZ ($p<0.05$). In der achten postOP Woche haben Tiere der Läsion allein Gruppe im Vergleich zu allen drei anderen Gruppen s.s. mehr Landungen mit beiden Pfoten gehabt. Allerdings hat dieses Ergebnis keine klinische Relevanz.

Interessant sind folgende Aspekte: Betrachtet man die Kontaktraten der Gruppen in A, so wird ersichtlich, dass postoperativ tendenziell die Rechtskontakte auf einem hohen Niveau bleiben und nach der Operation zunehmen. Währenddessen nehmen die Kontakte v.a. in der ersten postOP Woche mit der linken Pfote (B) dezent ab und erreichen in allen Gruppen nicht mehr das Niveau der präOP Raten. Des Weiteren kann in D und E sehr gut gesehen werden, dass in der 12. postOP Woche die beiden Kontrollgruppen (Läsion allein und Spongostan) überaus viele Landungen mit der rechten Pfote machten (D) und dafür weniger Landungen mit der linken affektierten Pfote (E), was mit der klinischen Beobachtung korreliert. Dennoch sind die Ergebnisse ohne statistische Signifikanz. (Einzelwerte und Deskription des rm-ANOVA Abs. 7.1)

4.2 Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie

Insgesamt 32 RM der Versuchstiere standen zur Durchführung histomorphologischer Untersuchungen zur Verfügung (Läsion allein N=7, Spongostan N=5, MM allein N=8, MM+OHZ N=12). Nachdem sieben Versuchstiere aus der Verhaltensbeobachtung ausgeschlossen wurden (Abs. 3.7.1), mussten weitere vier Versuchstiere aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden: keine suffiziente Läsion sichtbar (auch aus der Verhaltensbeobachtung ausgeschlossen, da postoperativ kaum Beeinträchtigung der linksseitigen Pfotenfunktion, Läsion allein: N=2; Spongostan: N=1) und Dislokation der MM aus der Läsionshöhle nach der Implantation (MM allein: N=1). Nach Abzug dieser vier Tiere blieben N=28 übrig. Mit N=21 Tieren wurden die histomorphologischen Untersuchungen durchgeführt. N=3 MM allein- und N=4 MM+OHZ Tiere wurden für Querschnitte und andere Färbungen vorbehalten (nicht für dieses Projekt). Die Auswahl der MM allein Tiere und der MM+OHZ Tiere für die histomorphologischen Untersuchungen erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Verhaltensbeobachtungen, die in den oberen Abschnitten beschrieben worden sind, wurden über einen postoperativen Zeitraum von 12 Wochen durchgeführt. Die Verhaltenstiere überlebten jedoch 20 Wochen und repräsentieren somit einen längeren Zeitraum.

4.2.1 Axonale Reaktion und astrozytäre Antwort

Um die axonale Antwort und die Beziehung zur reaktiven Astrozytose nach Läsion und Implantation beurteilen zu können, wurden die in Tabelle 2 genannten Antikörper

untereinander kombiniert. Allgemein betrachtet, konnten in allen Versuchsgruppen sowohl Gap-43-positive- als auch NF200-positive Axone nachgewiesen werden. Dabei war es wichtig, zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen quantitativ zu differenzieren. Die Abb. 8-28 zeigen immer dieselbe Orientierung: oben entspricht kranial, unten kaudal, links im Bild ist immer die Läsion zu sehen.

4.2.1.1 Gruppe Läsion allein

Eine Läsion im Bereich des RM führt zur Bildung einer mit Flüssigkeit gefüllten Zyste. Die Unüberwindbarkeit einer Zyste/Läsionslücke durch regenerierende Axone wurde bereits in Abschnitt 2.1.2 beschrieben. Um der entstehenden Lücke entgegenzuwirken, war es u.a. Ziel dieses Projektes, ein poröses und biokompatibles Material als Brücke zwischen proximalem und distalem Läsionsstumpf zu implantieren.

In der Kontrollgruppe Läsion allein kam es erwartungsgemäß regelmäßig zur Bildung einer ausgedehnten Läsionszyste, die zu einer Kontinuitätsunterbrechung innerhalb der weißen Substanz führte. Zudem beobachteten wir in allen Präparaten Retraktions- und Schrumpfungsprozesse im Läsionsgebiet. Innerhalb der Läsionslücke und der Zyste wurden, wenn überhaupt, nur in Einzelfällen NF200- und Gap-43-positive Fasern beobachtet (Abb. 8, A-C Markierung **X** und D-I). Ebenso konnten in diesen scharf begrenzten Lücken kaum Dapi-positive Kerne detektiert werden (Abb. 8 C). Obwohl die Dapi-Kernfärbung unspezifisch ist, ist diese Beobachtung wichtig, denn in manchen histologischen Schnitten der MM allein-, MM+OHZ- und Spongostan-Tieren waren zwar keinerlei positive Fasern sichtbar, aber es konnten in solchen Fällen regelmäßig Dapi-positive Zellkerne registriert werden.

Im periläsionären Bereich waren geringe Spuren v.a. Gap-43-positiver Fasern erkennbar. Es handelte sich in dieser Region um Fragmente NF200- und auch Gap-43-positiver Fasern. Nur wenige zeigten orientiertes Wachstum. Unmittelbar am kranialen und kaudalen Läsionsstumpf konnten NF200-positive Axone nachgewiesen werden, die das entstandene Bindegewebe („*connective tissue*“) kurzstreckig als „Leitstruktur“ nutzten. Zwar konnten dort viele Fasern registriert werden, diese lagen aber gekräuselt, manchmal verwoben und endverzweigt beieinander. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei diesen Aussprossungen um von der Läsion verschont gebliebenes RM handelt („*sprouting of spared tissue*“). In der Läsionszone waren in

allen Schnittebenen massenhaft Makrophagen (unspezifische Hintergrundfärbung in der Immunfluoreszenzmikroskopie und auch sichtbar in der Lichtmikroskopie Abb. 10 E und I Pfeile, am Beispiel der Gruppe Spongostan), besonders häufig kaudal der Läsion, nachweisbar. Interessanterweise formten dichte Populationen von Makrophagen eine Art Leitschiene für vereinzelte Gap-43-positive Fasern, die offensichtlich durch die Zwischenräume der Makrophagen hindurch penetriert waren. Makrophagen konnten auch um die Läsion der Spongostan-Gruppe nachgewiesen werden, allerdings in einem geringeren Ausmaß. Bei den MM-implantierten Versuchstieren waren besonders in den weit ventralen Schnittebenen Makrophagen sichtbar (sowohl im als auch um den kaudalen MM Bereich). Wenn Makrophagen innerhalb der MM beobachtet wurden, dann befanden sie sich im kaudalen Abschnitt der Matrix.

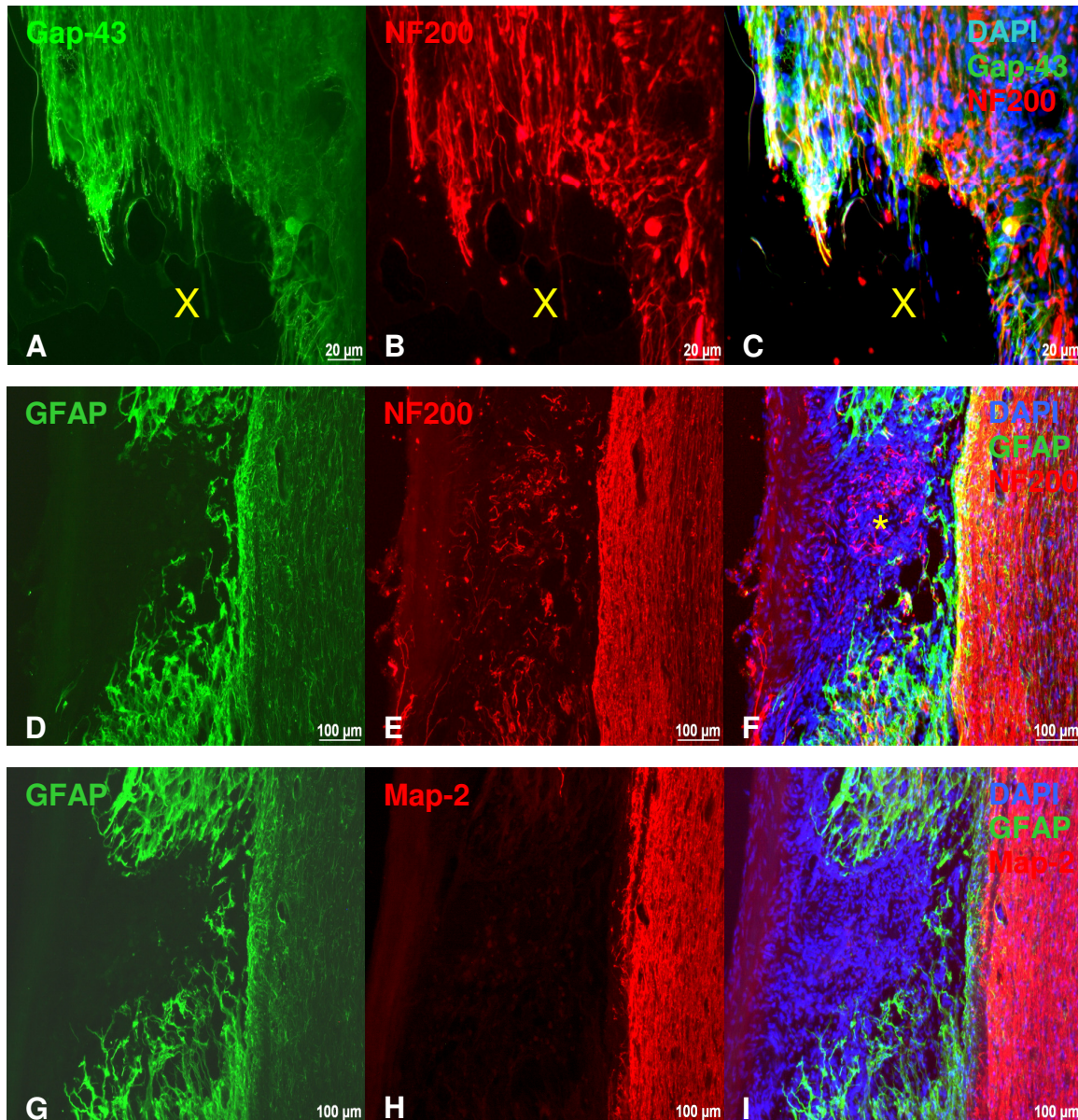


Abb. 8: Doppelimmunfluoreszenzbilder der Läsion allein Gruppe (A-I)

A-I demonstrieren das Läsionsgebiet. Deutlich ist in diesen Abbildungen zu erkennen, dass am kranialen und kaudalen Stumpf zwar viele positive (Gap-43 und NF200) Fasern aussprossen, diese aber die Läsionslücke nicht überbrücken. A-C zeigen den kranialen Anteil eines zystischen Hohlraums (gelbes X). Die von der weißen Substanz aussprossenden Fasern kommen zum abrupten Stillstand und überbrücken die Läsionslücke nicht. Die Dapi-Kernfärbung in F (auch I) zeigt eine hohe Zellularität (gelber Stern) innerhalb der Läsion, nicht jedoch in C. Die Anti-GFAP Färbung in D und G demonstrieren eine stärkere positive Reaktion im proximalen und distalen Stumpf der Läsion. In diesen Bereichen sind kaum Axone beobachtbar (F stellt die Überlagerung von D und E dar). Ebenso sind in H keine Dendriten zu verzeichnen, wobei gesagt werden muss, dass es sich hier um einen weit dorsalen Schnitt handelt.

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass die Läsionshöhle und -lücke eine unüberwindbare Barriere für aussprossende Axone darstellen. Ebenso sind in GFAP-positiven Bereichen kaum Gap-43- und NF200-positive Fasern zu erkennen. Weitere Details siehe 4.2.1.1.

4.2.1.2 Gruppe Spongostan

Bei der histologischen Betrachtung der Spongostan-Tiere fiel besonders die Struktur des Gelatineschwamms (Spongostan, Firma *Johnson&Johnson*) auf, denn

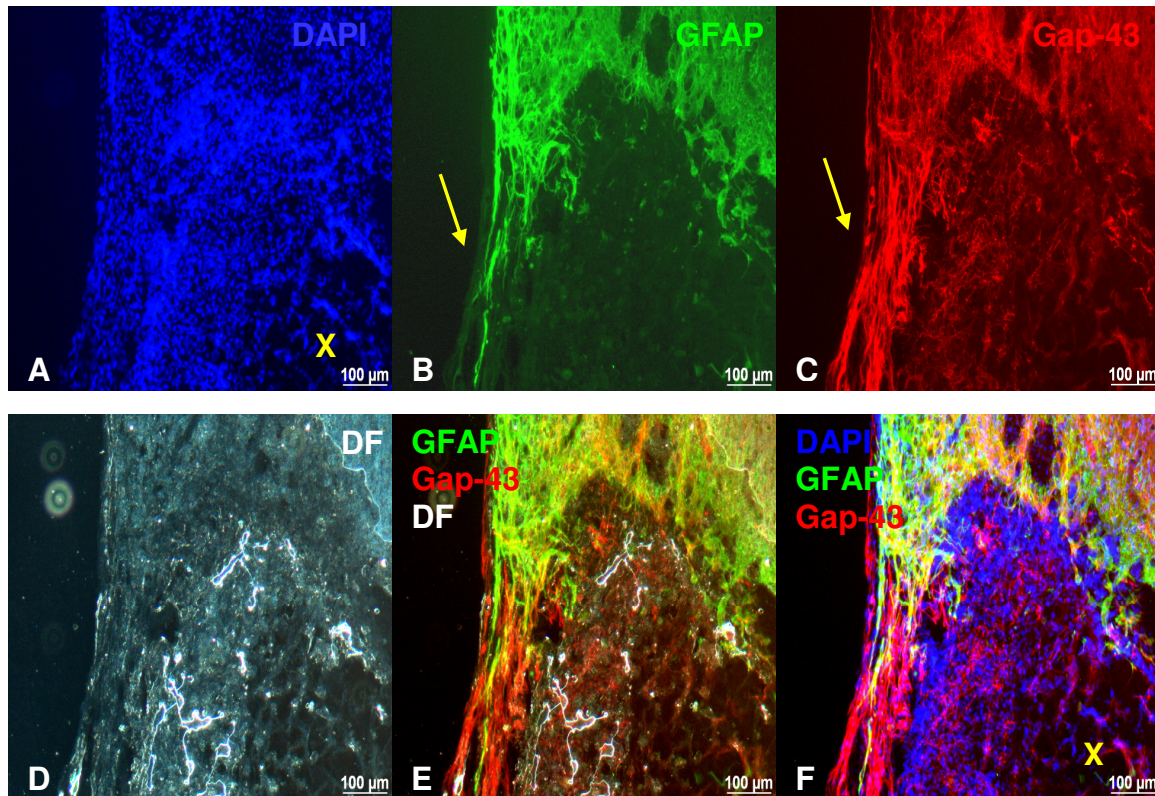


Abb. 9: A-F zeigen eine kraniale Übersicht in einem Spongostan-Tier. In B, E und F sieht man, dass aktivierte Astrozyten eher dürrig im Inneren des Spongostan vorkommen, wobei eine hohe Zellularität in A gesehen wird. C, E und F zeigen Wachstum von Gap-43-positiven Fasern um den lateralen Teil des Schwamms (gelbe Pfeile in B und C). Z.T. sind diese stellen kräftig GFAP-immunreaktiv. Das Phänomen des lateralen Faserwachstums wurde in Spongostan-Tieren selten beobachtet, hingegen häufig in MM allein- und MM+OHZ Tieren. A und F: in der Dapi Kernfärbung lassen sich reichlich Zellekerne erkennen, wobei die Dichte der Zellularität zum Zentrum hin (X) abnimmt. D demonstriert eine Dunkelfeldaufnahme zur Lokalisierung des Spongostan.

- verglichen mit der MM - konnte ein unorientiertes, durcheinander wirkendes, wolkiges Implantat erkannt werden (z. B. Abb. 9 und 10 B, C, D). In den meisten Schnitten wurde eine dünne Lücke im Bereich der medialen Grenzfläche von Schwamm zu nativem RM-Gewebe beobachtet. Offensichtlich kam es stellenweise zur Desintegration des Schwamms. In den Gewebebrücken zwischen Schwamm und nativem RM befanden sich reichlich reaktive Astrozyten (Abb. 10 A, D und Abb. 11 B, F). Während Fasern der Gruppen MM tendenziell von kranial und kaudal eindringen, versuchten NF200- und Gap-43-positive Fasern der Spongostan-Tiere überwiegend von medial einzudringen, was auch für GFAP-positive Prozesse gültig ist. Wenn Fasern von medial erfolgreich eingedrungen waren, entstand der Eindruck, als würden sie sich im Spongostan-Schwamm „verirren“ (z. B. Abb. 10 B, E und H). Lediglich Fragmente positiver Fasern waren sichtbar.

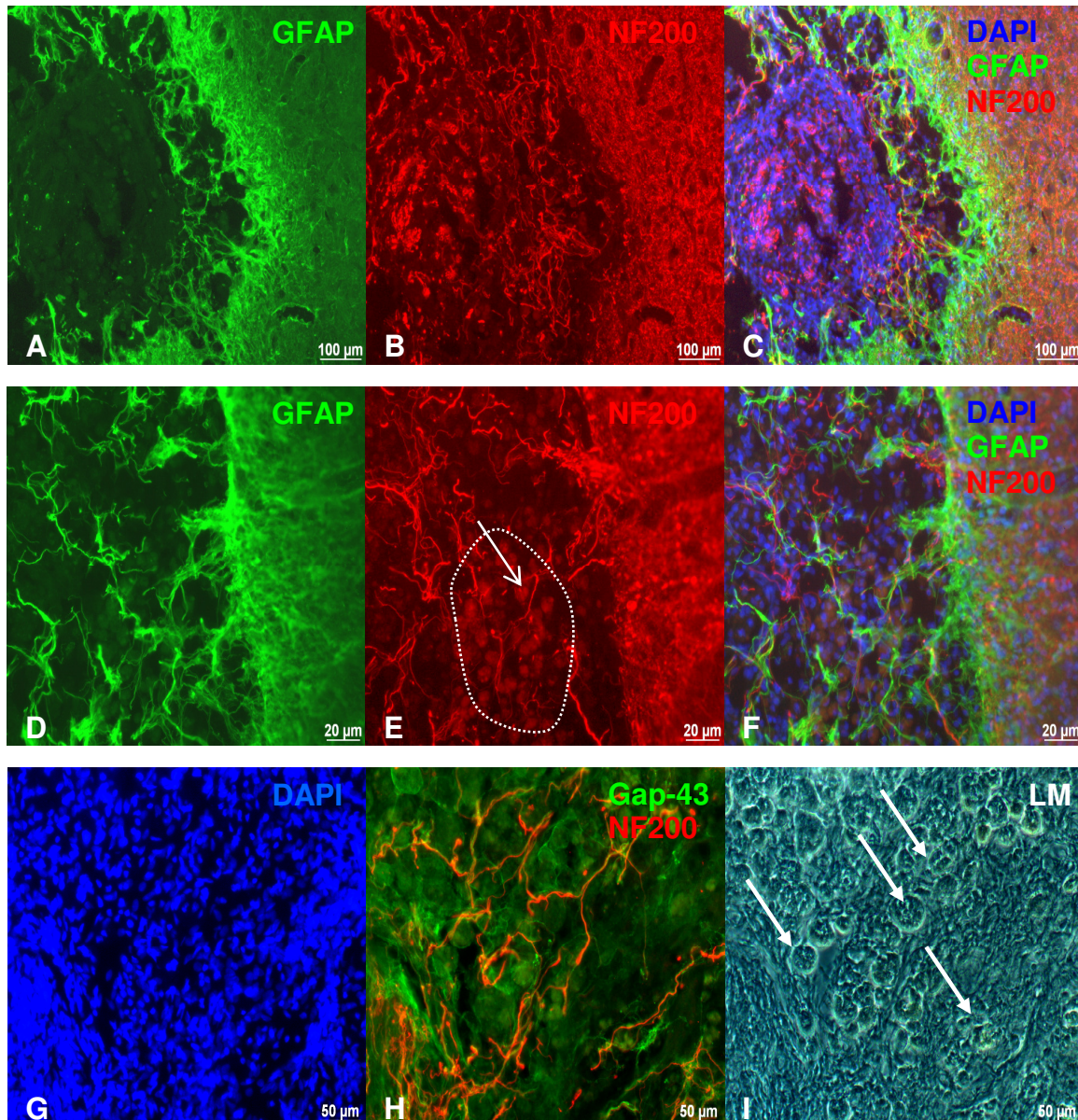


Abb. 10: Weitere Übersicht zu einer spongostan-implantierten Ratte

Die Randbereiche in A und B sind stark GFAP-positiv, innerhalb des Spongostans hingegen sind kaum aktivierte Astrozyten zu erkennen (A und C). Aber innerhalb der medialen Gewebebrücke (A und D) zeigen sich die Ausläufer GFAP-positiver Astrozyten. In B sind wenige NF200-positive Axone sichtbar. Vielmehr entsteht hier der Eindruck, als würden sich die Axone „verirren“. Es sind Fragmente NF200-positiver Axone zu erkennen. H zeigt einige Gap-43- und NF200-positive Axone innerhalb des Spongostans. In E handelt es sich um eine weit ventrale Schnittebene. Um den Schwamm sind einige orientierte NF200-positive Fasern zu sehen. Die unspezifische Hintergrundfärbung zeigt massenhaft Makrophagen (punktierte Kreis). Zwischen der Makrophagenkolonie ziehen vereinzelt NF200-positive Axone durch (Pfeil in E). Auch in der lichtmikroskopischen Darstellung (I) sind mit weißen Pfeilen Makrophagenumrisse demonstriert.

Es wurden nur wenige reaktive Astrozyten und Fasern im Zentrum des Schwamms nachgewiesen (z. B. Abb. 9 B, E und F). Hingegen waren die meisten NF200- und Gap-43-positiven Fasern an der weiter oben beschriebenen Grenzfläche zwischen Schwamm und nativem RM lokalisiert. Insgesamt betrachtet bildete sich in der Spongostan-Gruppe tendenziell eine stärkere reaktiv-astrozytäre Narbe. Der

Schwamm induzierte im Umgebungsgewebe die stärkste Astrozytose (Abb. 10 A, D und Abb. 11 B, F). Sowohl innerhalb der Läsion von Läsion allein Tieren als auch im Spongostan-Schwamm wurden kaum dendritische Strukturen in der Map-2 Färbung registriert (Abb. 8 H, I und Abb. 11 C, E, F).

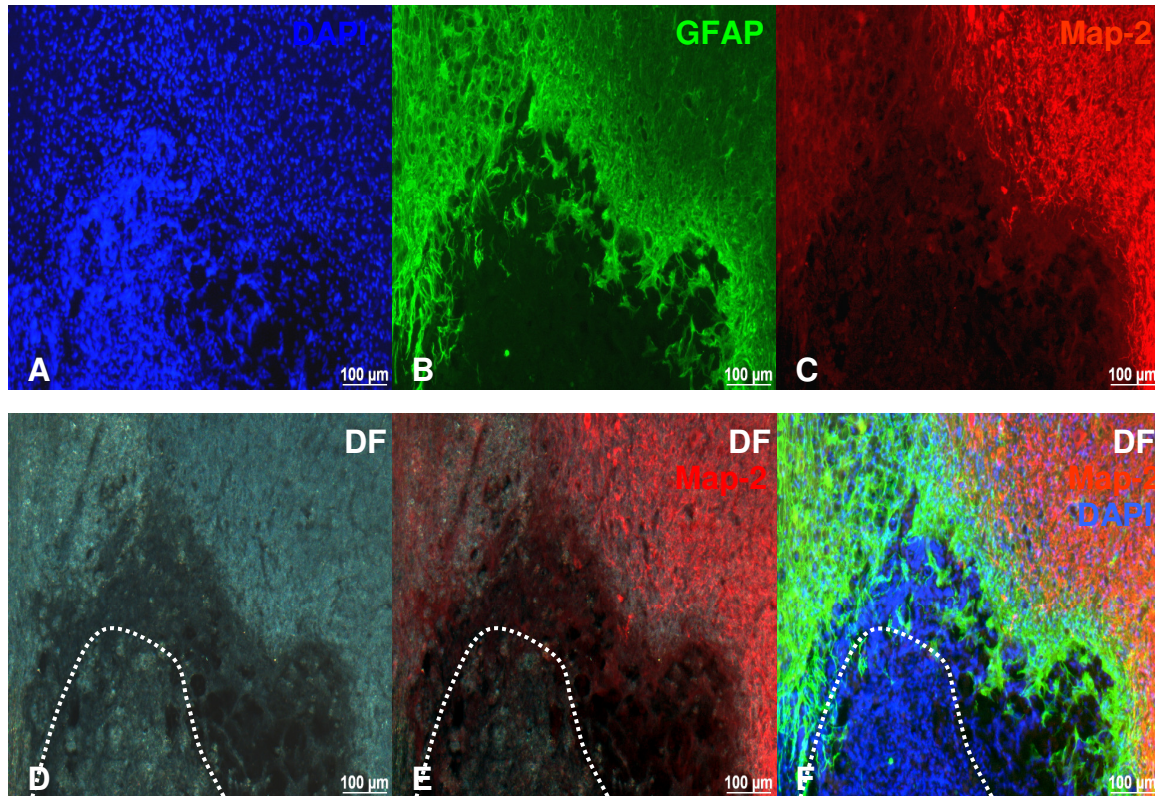


Abb. 11: Aufnahmen mit Hauptaugenmerk auf Map-2 positive Strukturen

C, E und F zeigen medial die graue Substanz des RM. Hier kam es kaum zu Wachstum Map-2 positiver Strukturen in Richtung des Spongostan-Schwamms. Ebenso ist in diesen drei Abbildungen keine Penetration von Dendriten sichtbar. Diese Beobachtung deckt sich mit der in Läsion allein Tieren. Die punktierte Linien in D-F markieren die Grenze zwischen dem Brückengewebe und geschrumpften Spongostan. Nebenbefund B und F: stark ausgeprägte GFAP-positive Reaktion um den Spongostan-Schwamm.

4.2.1.3 Gruppen MM allein und MM+OHZ

Die histologischen Bilder zeigten, dass die porös-orientierte Mikrostruktur der MM in beiden Gruppen axonales Wachstum unterstützte. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Wachstum durch eine orientierte Matrix sogar gefördert wird (Abs. 5.2). Nach fünf Monaten Überlebenszeit waren die Matrices sehr gut erhalten und integriert. Die poröse Struktur der MM konnte in den meisten Tieren noch deutlich identifiziert werden (Abb. 12 und 15). Die Implantate wurden demzufolge langsamen abgebaut. Nur in einem Fall registrierten wir die Entstehung einer Zyste im kranialen Abschnitt der MM (Abb. 20 *). Die Zystenbildung hinderte wachsende Fasern nicht daran in die MM über dünne Gewebebrücken zu gelangen. Regenerierende NF200-positive

Axone und Gap-43-positive Fasern nutzten die Kanäle als Leitschienen und folgten ihnen (Abb. 16 E, H und 17 B-F). Es fiel bereits vor der quantitativen Analyse auf, dass NF200- und Gap-43-positive Fasern besonders kranial und kaudal in die Matrices penetrierten, während das Zentrum der MM eine moderate Durchwachsung aufwies (Abb. 19). Ob es sich bei den Fasern um kranial ein- und kaudal ausgetretene Fasern oder von kaudal nach kranial aufgestiegene Fasern handelte, konnte an Hand der durchgeführten Färbungen nicht beurteilt werden.

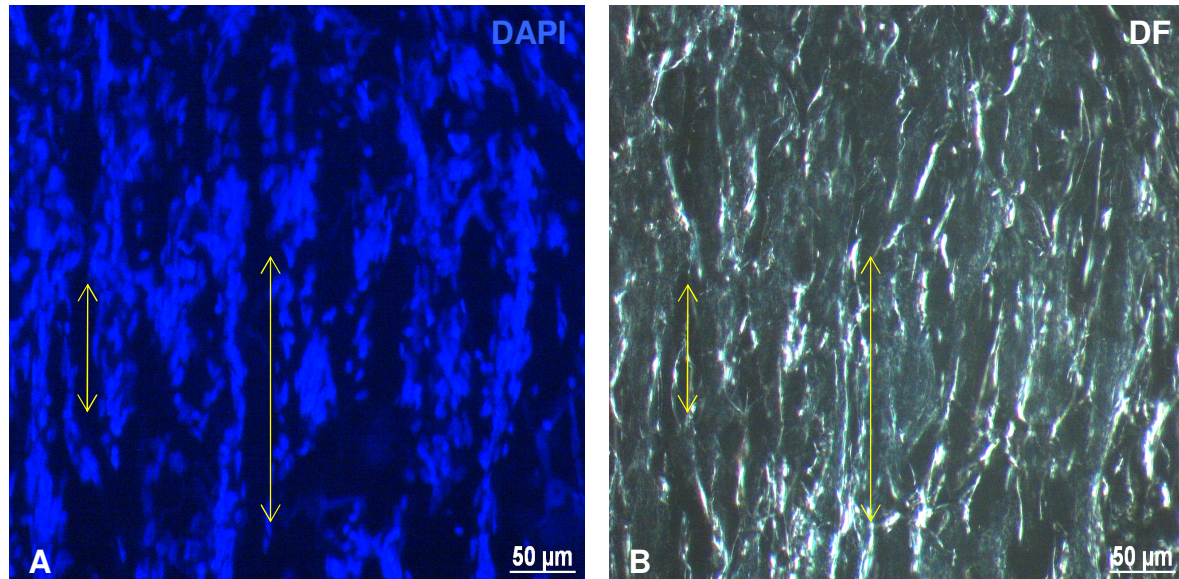


Abb. 12: Mikrostruktur der MM (A unspezifische Dapi-Kernfärbung, B Dunkelfeld)

Die feinen, longitudinal ausgerichteten Kanäle (gelben Pfeile) innerhalb der MM, dienen als Leitschienen für elongierende Axone und auch zellulären Elementen. Das Präparat ist aus einem Tier, dem eine MM mit OHZ implantiert worden ist. Die Zellkerne orientierten sich entsprechend der porösen Struktur der MM.

In vielen Fällen wurde Penetration von Fasern aus dem medial der MM gelegenen RM beobachtet (Abb. 18 B). Doch das Einwachsen von medial war eher moderat. Möglicherweise handelte es sich um das Einsprossen nicht lädierter Axone im Sinne eines kollateralen *Sprouting*. Axonbündel - langstreckig-orientiert - drangen in die MM ein. Besonders in dorsalen- und ventralen Schnittebenen konnten tendenziell die meisten Fasern beobachtet werden.

Versuchstiere mit einer MM in Kombination mit OHZ zeigten bildmorphologisch eine tendenziell bessere räumliche Verteilung der NF200 und Gap-43-positiven Fasern (Abb. 18-21). Hier wurden auch häufiger Fasern im Zentrum der MM und in allen drei Schnittebenen registriert.

Ein weiteres interessantes Phänomen war in den Gruppen MM allein und MM+OHZ sowie in allen drei Schnittebenen nachweisbar: Um die MM waren sowohl Gap-43-

und NF200-positive Axone, zwischen Dura mater und MM gewachsen (Abb. 13, B, C Pfeile, Abb. 14, 16 und 22).

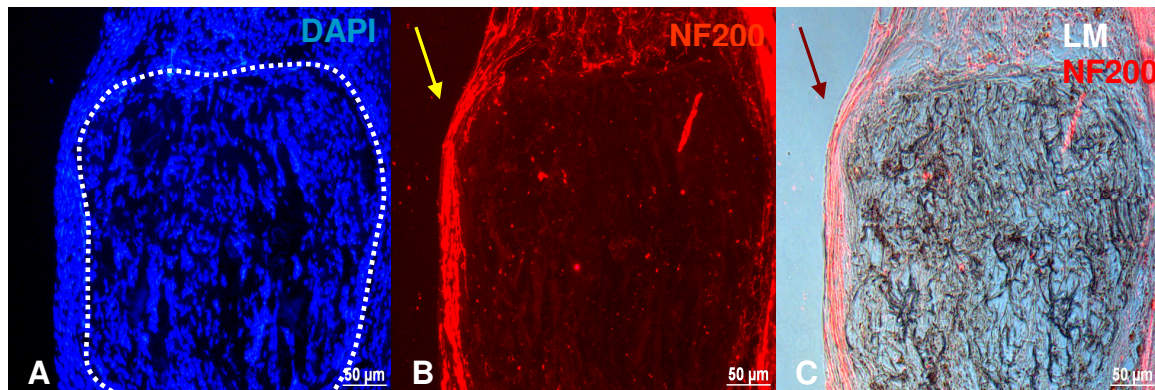


Abb. 13: Ausgezeichnete Integration der MM in das native RM (A, weiß gepunktete Markierung) Stellenweise ist noch die longitudinale Ausrichtung der Mikrostruktur der MM zu erkennen (auch C). Laterale Teil der MM in B und C (Pfeile): Axonbündel wuchsen in der lateralen Grenzzone zwischen Dura mater und RM um das Implantat, um kaudal wieder Anschluss an das native RM zu gewinnen. Innerhalb der MM sind hier wenig Axone zu dokumentieren (B).

In wenigen Schnitten wurde dies auch in Spongostan-Tieren beobachtet (Abb. 9 B und C), aber dort war im Gegensatz dazu die laterale Zone stark GFAP-positiv durchsetzt. Die laterale Grenzzone zwischen Dura und MM war in den meisten Fällen moderat bis gar nicht GFAP-immunreaktiv (z. B. Abb. 16 B, D, E und 22 D, E). GFAP-immunreaktive Bereiche waren an der Grenzfläche (kranial und kaudal) zwischen MM und nativem RM am stärksten ausgeprägt. Der kraniale und kaudale astroglöse Grenzbereich wurde von NF200- und Gap-43-positiven Fasern überbrückt („*bridging*“). Die Fasern traten dann in die MM ein (z. B. Abb. 19, 20, 23). Sowohl in der Gruppe MM allein als auch in der Gruppe MM+OHZ wurde vereinzelt beobachtet, dass operationsbedingt die Hinterwurzel (HW) lädiert wurde. In diesen Fällen wuchsen von kranial hauchfeine orientierte NF200- und Gap-43-positive Fasern in die MM (Abb. 15 und 25 A, B). Diese Beobachtung wurde in den beiden Kontrollgruppen nicht gemacht.

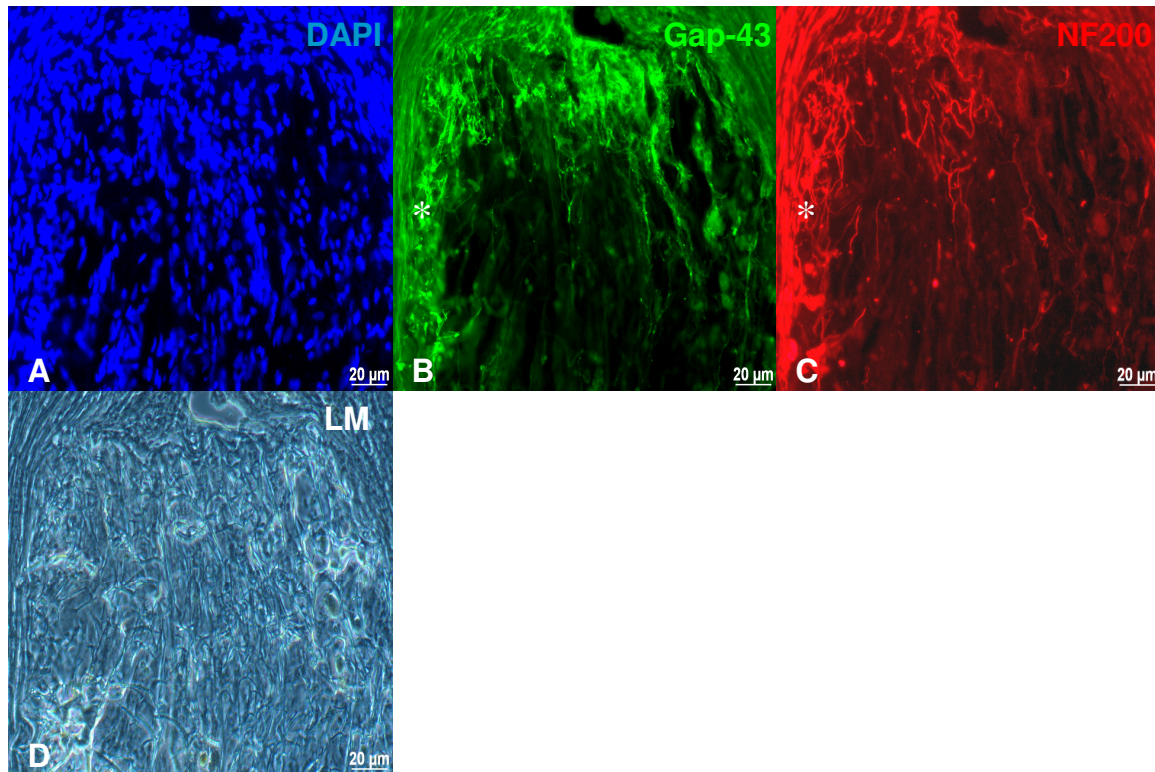


Abb. 14: MM allein induzierte das Eintreten Gap-43- (B) und NF200-positiven Fasern (C) von kranial und auch kaudal (hier nur kranial dargestellt). Die MM wurde im lateralen Bereich von Faserbündeln umschlossen (B, C *). NF200-positive Axone kranial (C) sind nicht gleichzeitig Gap-43-positiv. Zur Orientierung demonstriert D lichtmikroskopisch die Matrix.

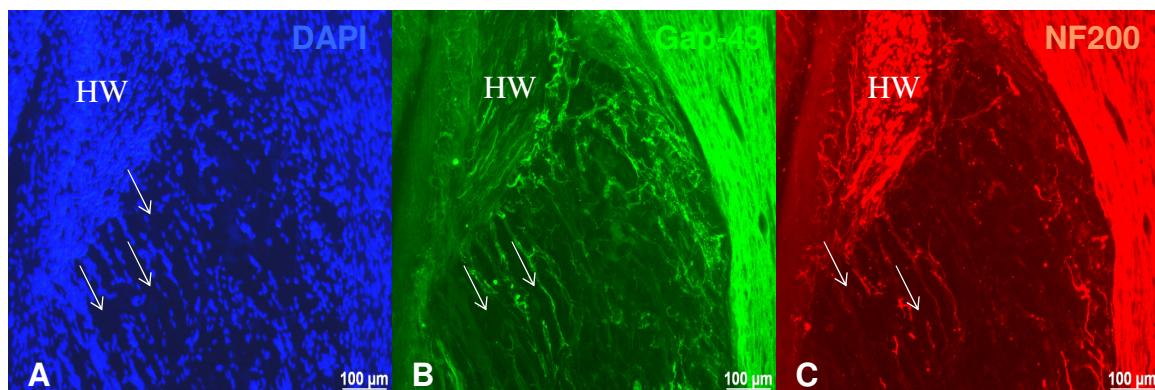


Abb. 15: Kraniolateral lag zufällig eine HW in enger Nachbarschaft zur MM, so dass wahrscheinlich hauchfeine HW-Fasern in die MM eindrangen. Diese Axone in Abb. C sind nicht alle mit Gap-43 in B assoziiert. Auch diese Fasern sind longitudinal ausgerichtet und folgten der Kanalstruktur der MM (weiße Pfeile demonstrieren die Mikrostruktur und den Verlauf der Kanäle/der Fasern).

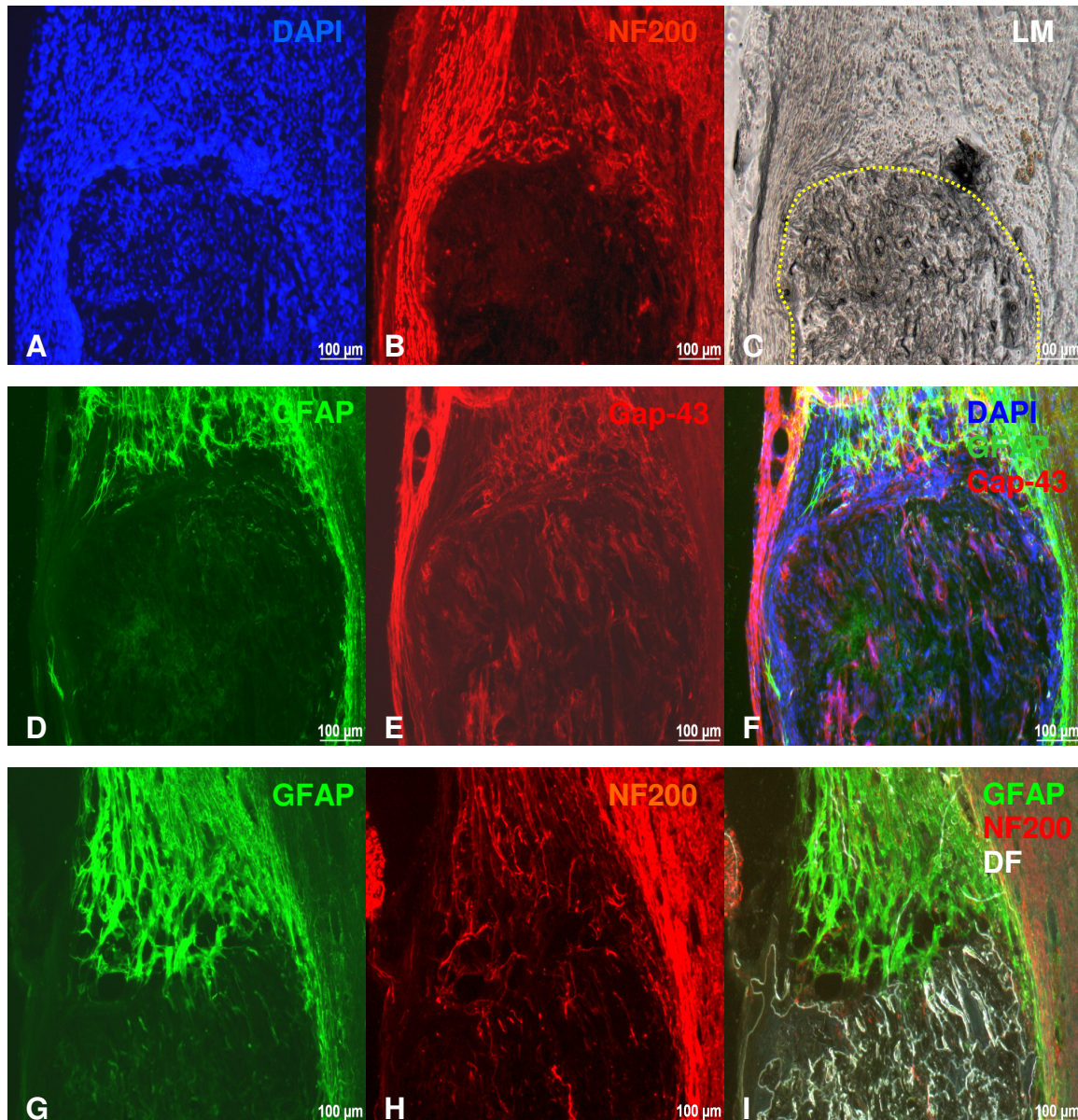


Abb. 16: Laterale Umschließung der MM

Sowohl in MM allein- als auch in MM+OHZ Tieren konnte die laterale Umschließung der MM beobachtet werden (A-F). C zeigt die Position des Implantates im RM (punktierte Markierung). Dabei wuchsen Axonbündel (B, C, E, F) um die MM und traten kaudal wieder in das native RM ein. Die Färbung gegen GFAP zeigt, dass der laterale Bereich kaum GFAP-positiv ist (D und F). Innerhalb der MM sind hier ebenso kaum GFAP-positive Astrozyten zu beobachten. Jedoch sind massenhaft Axone in der NF200-Färbung (H) sichtbar. Die stärksten Reaktionen sind im kranialen Implantatbereich zu registrieren (D, F, G, I). Die kraniale astrozytenreiche Gewebebrücke (G) und das Nebeneinander von Astrozyten und Axonen (H, I) kranial des Implantates sind hervorzuheben. In A und F ist eine hohe zelluläre Aktivität innerhalb der MM zu erkennen.

Die nun folgenden Abbildungen zeigen Doppelimmunfluoreszenzaufnahmen von MM+OHZ Tieren. Speziell in dieser Gruppe wuchsen die Axone innerhalb der MM deutlich gleichmäßiger. Sie penetrierten vom kranialen RM-Gewebe, über ein astrozytenreiches Grenzgewebe von kranial bzw. kaudal in die MM (Abb. 17-25). Bei Implantaten, die mit OHZ besät wurden, konnten wir qualitativ kaliberstarke, nicht stark verzweigte Axone dokumentieren (Abb. 17 B, C und 21 E-G). In den meisten

4. Ergebnisse

Fällen wurden Axone von Zellkernen umgeben. In Überlagerungsaufnahmen wurden diese engen räumlichen Kontakte zwischen Dapi-positiven Kernen und Axonen sichtbar (Abb. 20 E, F, 21 G und Abb. 22 I).

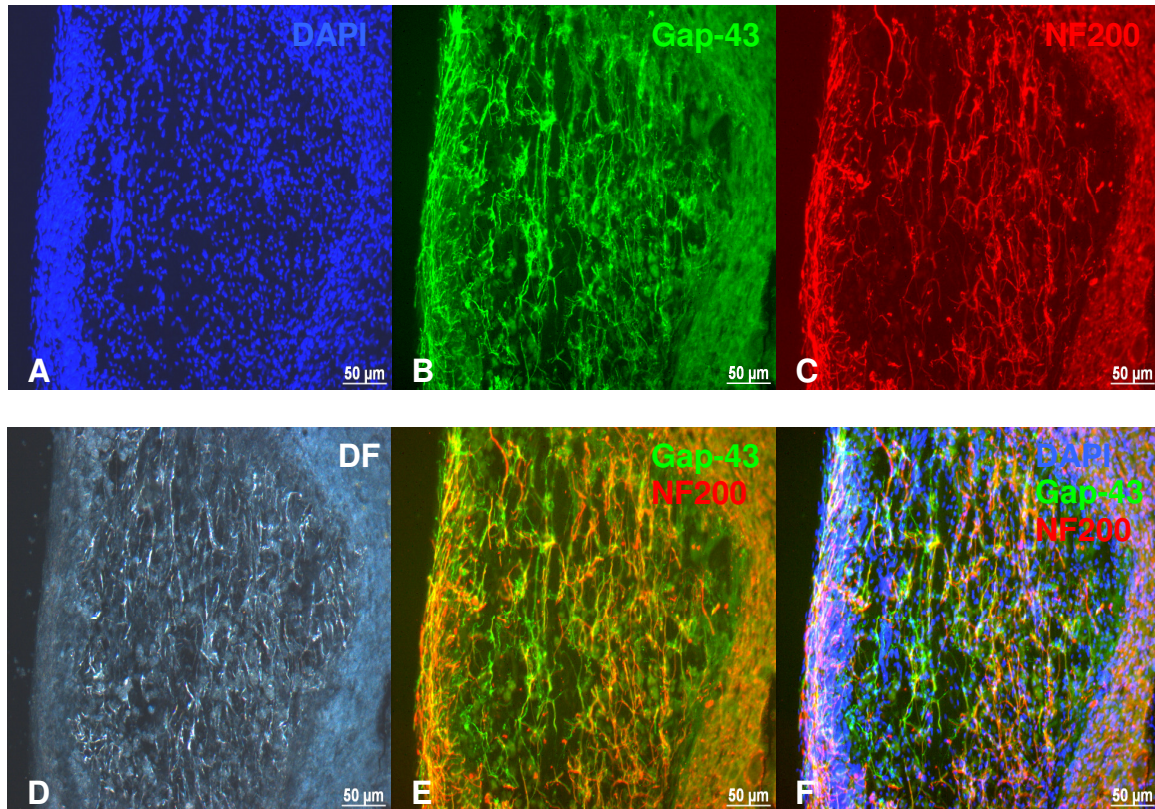


Abb. 17: Langstreckig-orientiertes Wachstum von Gap-43- und NF200-positiven Axonen

Offensichtlich wirkt sich das Besäen der MM mit OHZ positiv auf das Wachstum von Gap-43- und NF200-positiven Axonen aus. B, C, E und F zeigen, dass nicht nur um die MM Fasern wachsen, sondern massenhaft elongierte Fasern innerhalb der MM vorhanden sind. Überlagerungsaufnahmen (E, F) demonstrieren, dass nicht alle NF200-positiven Axone auch gleichzeitig Gap-43-positiv sind. Außerdem werden in F Fasern von Dapi-positiven Kernen umgeben. Eine ausgezeichnete Integration der MM mit ansatzweise erkennbarer Mikrostruktur zeigt die Dunkelfeldaufnahme (D).

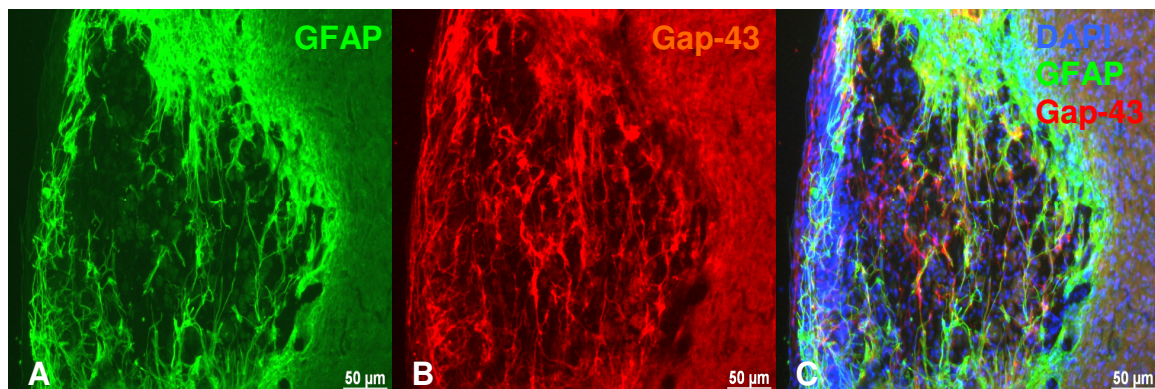


Abb. 18: Interessant ist auch, dass eine stärkere GFAP-positive Reaktion stattfand, v.a. kranial der MM (A). Dennoch waren die Fasern nicht daran gehindert, die MM über eine kraniale und kaudale GFAP-positive Gewebebrücke zu penetrieren (B und C).

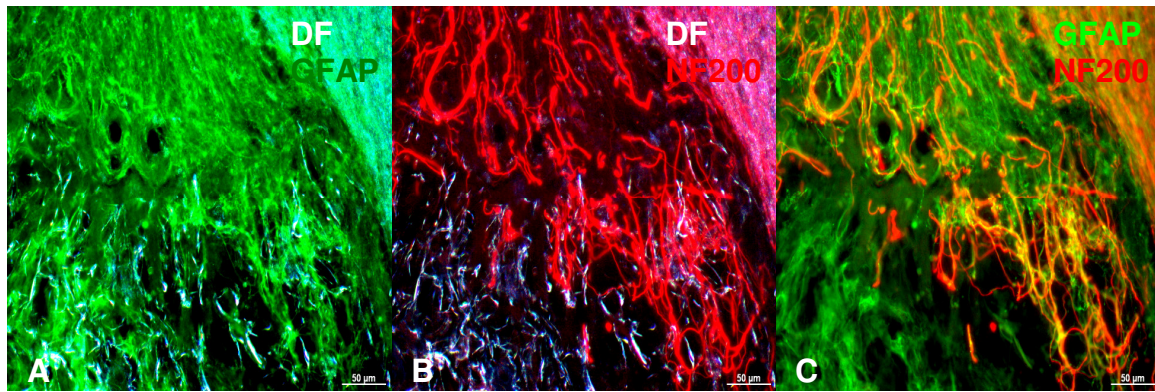


Abb. 19: Stärkere Vergrößerung eines kranialen Matrixbereiches

Eine astrozytenreiche Gewebebrücke kranial des Implantates (A) wurde durch NF200-positive Axone zum Übertritt in die Kanalstruktur der MM benutzt. Einige der Axone sind gewunden und machen einen sog. „U-Turn“ (B und C).

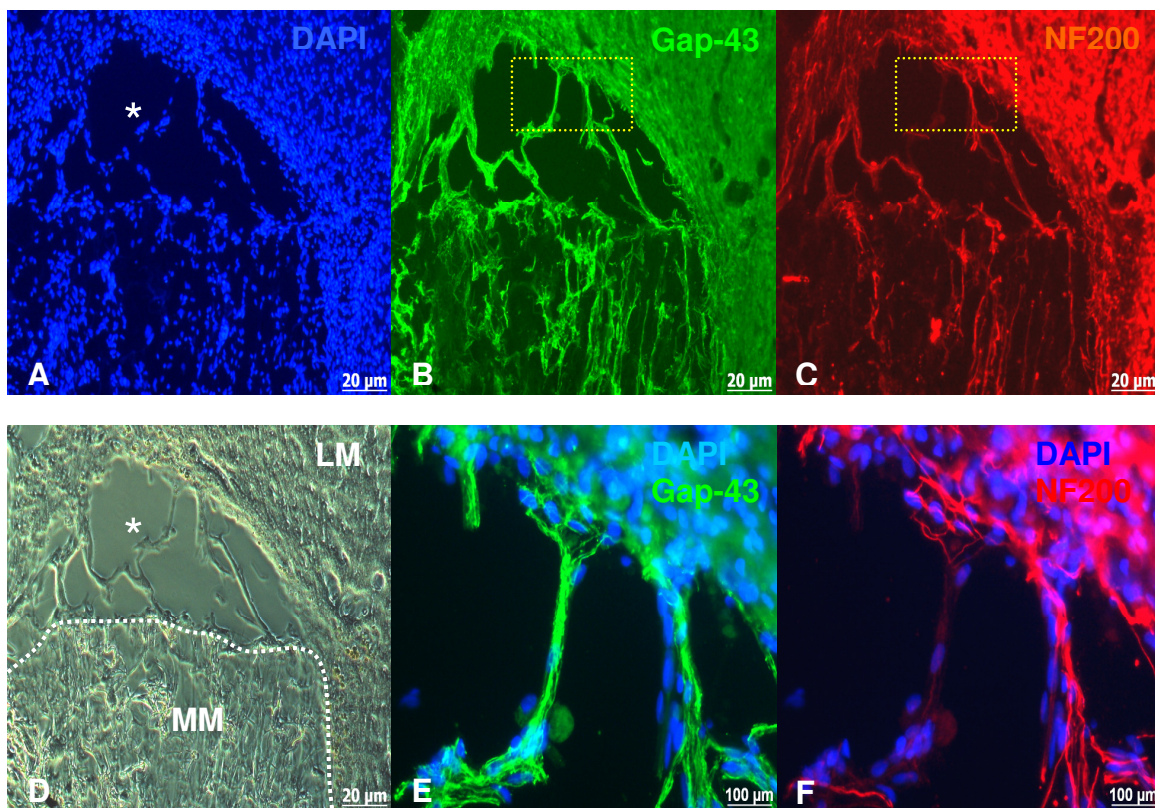


Abb. 20: Kleine Zyste im kranialen Bereich zwischen MM und RM

Im kranialen Bereich der MM kam es zur Bildung einer kleinen Zyste (* in A und D). Dennoch penetrierten Gap-43- und NF200-positive Axone, aber auch zelluläre Elemente, über feine Gewebebrücken in die MM (E und F 40-fach vergrößerter gelb punktierter Bereich aus B und C). Die Grenze der MM ist in D punktiert markiert und ist für die Abb. A-D gültig.

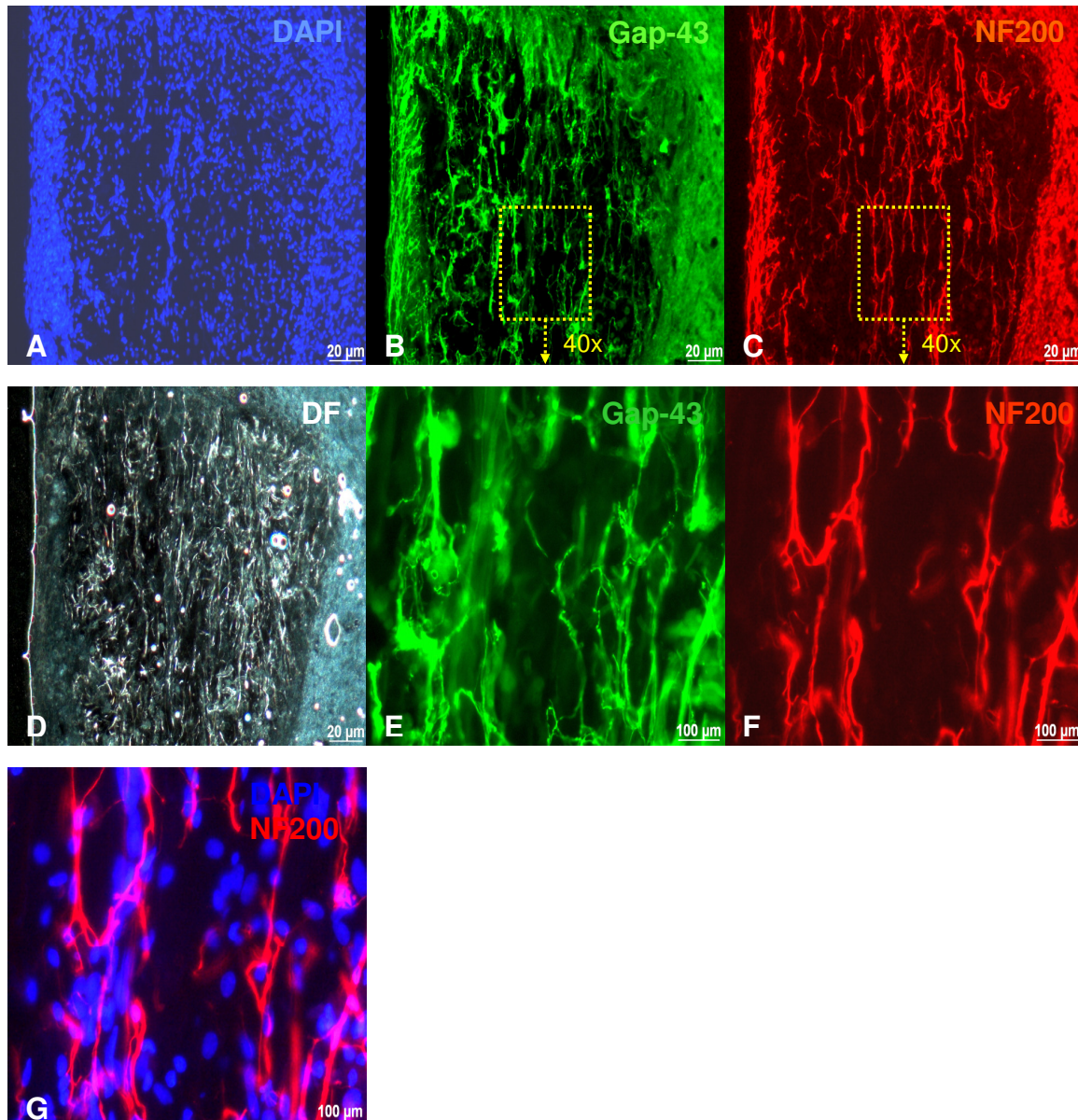


Abb. 21: Übersicht und Details eines MM+OHZ Implantates

Auch hier ist eine langstreckig orientierte Ausrichtung der Fasern zu beobachten. E, F und G stellen eine Vergrößerung der in B und C gelb markierten Bereiche dar (40-fache Vergrößerung). Beachte das Profil der Fasern verglichen mit den Fasern der andern Gruppen. Hier ist qualitativ ein Unterschied erkennbar. Die Axone sind kaliberstark, überwiegend nicht endverzweigt und werden umgeben von Dapi-positiven Zellkernen (G). A und D demonstrieren eine optimal integrierte Matrix ohne Nachweis einer zystischen Struktur. Ebenso ist in der Dapi-Kernfärbung eine hohe Zellularität erkennbar, besonders lateral der Matrix (A).

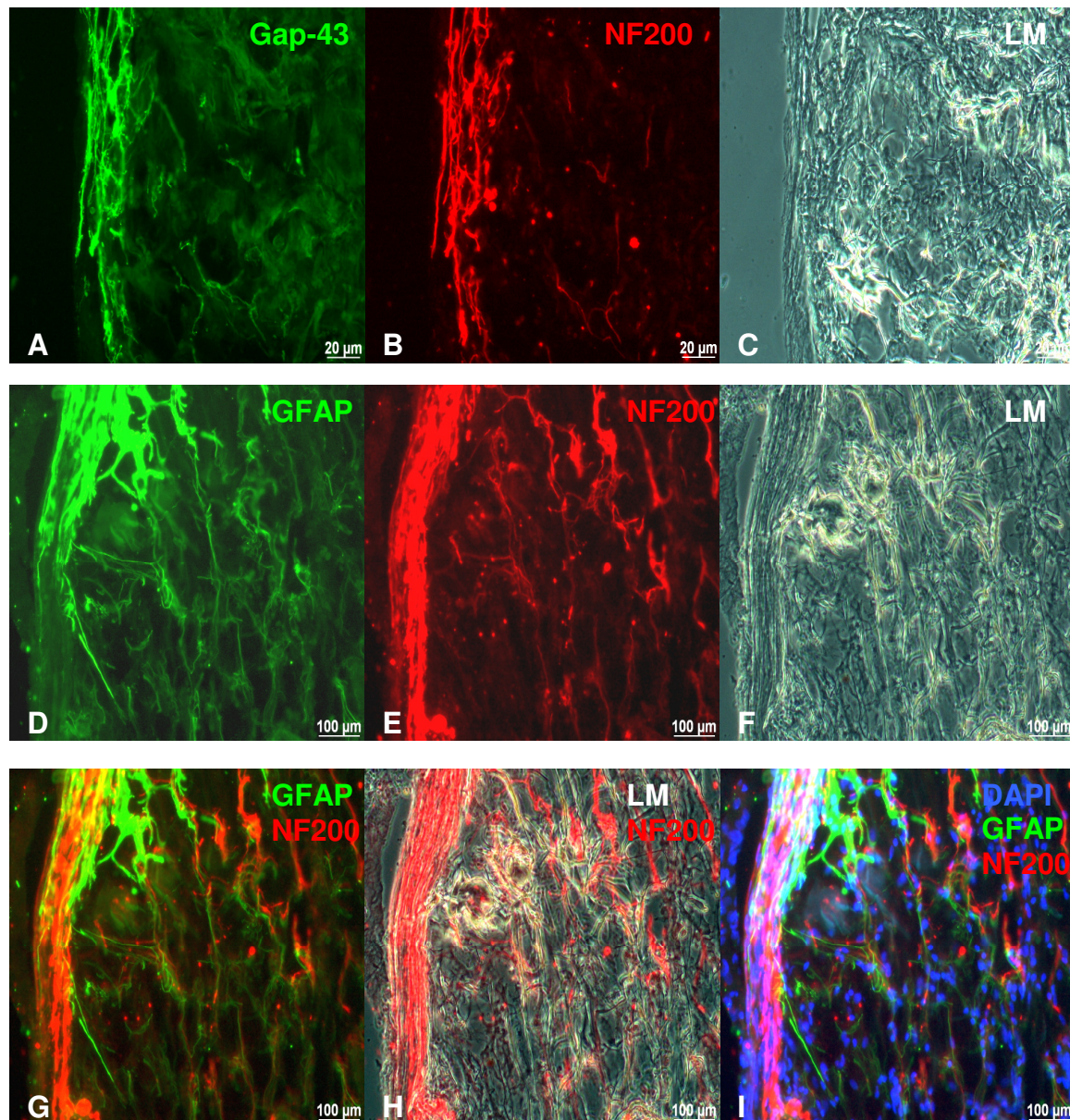


Abb. 22: Wachstum NF200- und Gap-43-positiver Axone um die MM

Diese Beobachtung wurde zwar bei der Gruppe Spongostan vereinzelt auch gemacht (Abb. 9), aber in der MM allein und besonders hier (MM+OHZ) ist sie prominent. Nahezu regelmäßig wuchsen Fasern um die MM (B, E, G, H und I). In C und besonders F kann man die Faserbündel in den lichtmikroskopischen Aufnahmen deutlich erkennen. D, E und G demonstrieren, dass diese lateralen Bereiche zwischen Dura mater und MM kaum GFAP-positiv und weiter kaudal gar nicht GFAP-positiv sind.

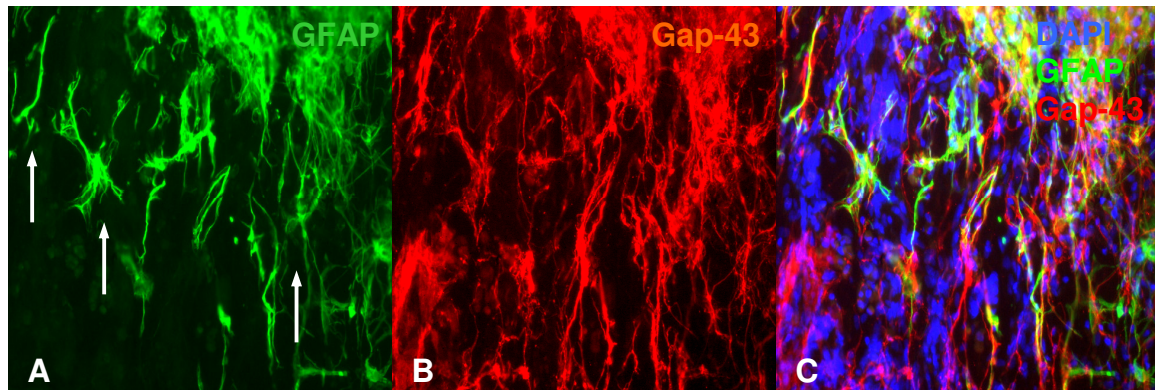


Abb. 23: Gap-43-positive Profile (B) zogen durch GFAP-reiche Areale (A) hindurch und folgten der Kanalstruktur der MM. C stellt die überlagerte Form mit der unspezifischen Dapi-Kernfärbung dar. Es sind langstreckig orientierte Fasern und wahrscheinlich Astrozytenfortsätze (Pfeil in A) erkennbar - umgeben von Dapi-positiven Zellkernen. Auch zelluläre Elemente wie z. B. Astrozyten nutzten die Kanalstruktur der MM.

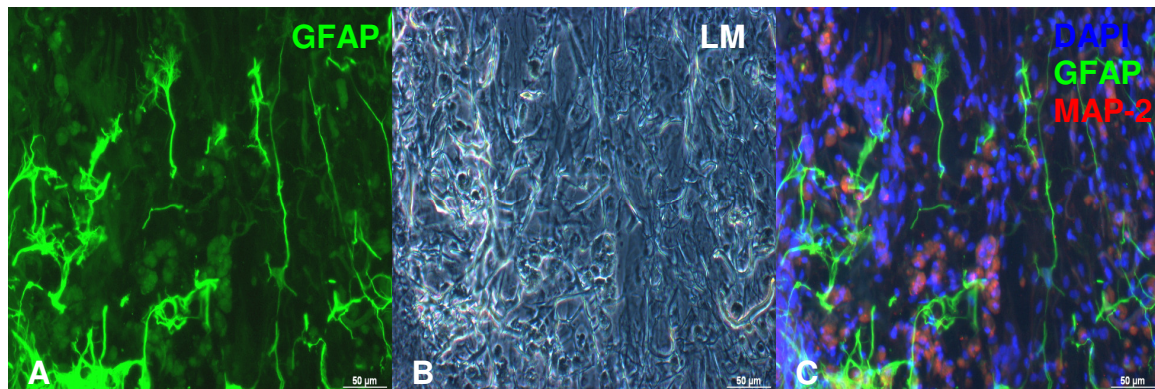


Abb. 24: Orientierung der GFAP-positiven Astrozyten

Ein weiteres Beispiel demonstriert die orientierten Astrozytenfortsätze (A, C), wie sie der Mikrostruktur (B) folgten. Abermals sei darauf hingewiesen, dass nicht nur Axone bzw. Fasern den longitudinalen Leitschienen folgen, sondern auch zelluläre Elemente.

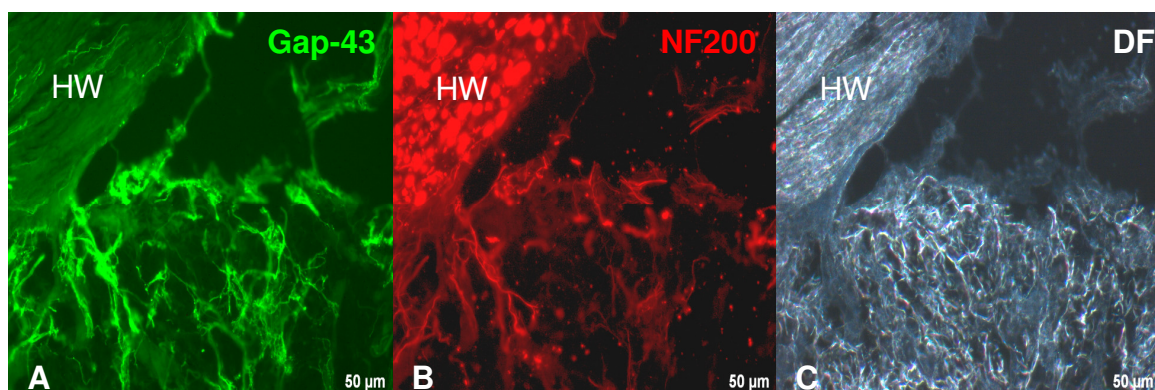


Abb. 25: Ausschnitt aus dem kranialen Teil einer MM+OHZ

Zufälliger örtlicher Kontakt zwischen HW und dem kranialen Teil der MM führte zur Penetration Gap-43- (A) und NF200 -positiver Fasern (B) in die MM. Auf diesem Weg ist auch eine Migration von SZ in die MM denkbar (siehe Abs. 5.2). C zeigt den Kontakt zwischen HW und MM in einer Dunkelfeldaufnahme.

4.2.1.4 Unterstützung von Dendritenpenetration durch MM

Durch den hohen Gehalt an Mikrotubuli in Dendriten neuronaler Zellen werden diese durch einen AK gegen Map-2 spezifisch darstellbar. Zwar wurden im Fall Map-2 keine quantitativen Daten erhoben, aber dennoch sollte im Rahmen dieses Projektes die Reaktionen der grauen Substanz qualitativ beurteilt werden. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass nur in den Gruppen MM+OHZ und MM allein Dendriten in die MM penetrierten (Abb. 26-28).

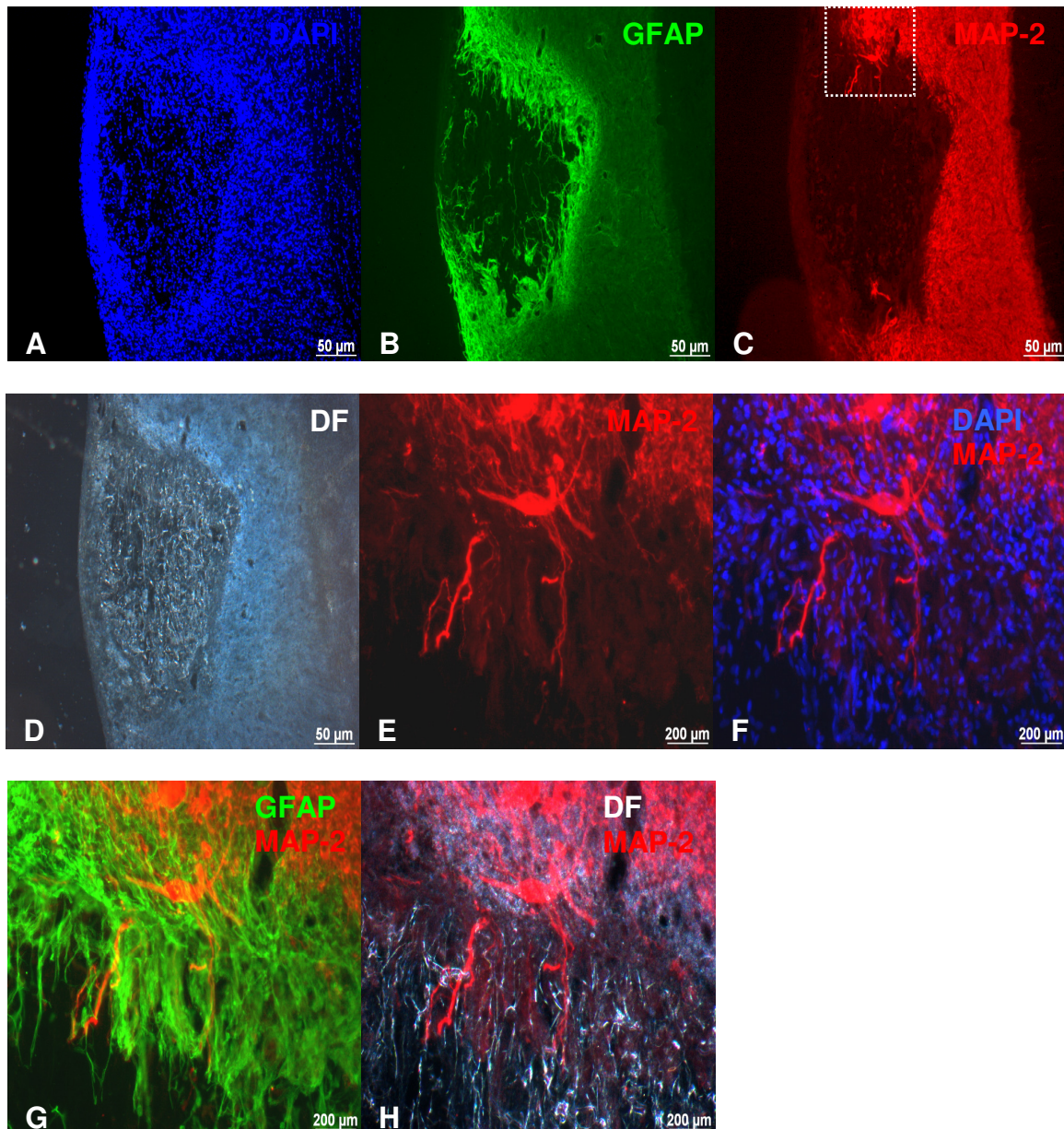


Abb. 26: Übersichtsaufnahmen der MM+OHZ Gruppe

In B und G ist ersichtlich, dass es um die Läsion zu einer stärkeren GFAP-positiven Reaktion kam. Vor allem die Grenzbereiche zwischen nativem RM und MM sind GFAP-immunreaktiv, wohingegen die Positivität zum Zentrum hin stark abnimmt. C zeigt in der Übersicht, dass von kranial Map-2 positive Dendriten einer neuronalen Zelle in die MM penetriert sind. Die weiß markierte Stelle in C wird in einer 40-fachen Vergrößerung in E-H demonstriert. Deutlich ist in E-H zu erkennen, dass eine neuronale Zelle ihre Fortsätze in die MM entsandte. Dabei benutzten MAP-2-positiven Profile die

GFAP-positive Gewebebrücke, um in die MM zu gelangen (G, H). Dass diese Profile sicher in die Kanalstruktur gelangen, zeigen E, G und H im Detail. A und D zeigen nebenbefundlich eine sehr gute Integration der MM in das native RM.

Dabei überbrückten auch sie, wie Gap-43- und NF200-positive Axone, GFAP-immunreaktive Grenzbereiche zwischen nativem RM und MM und drangen in die MM von kranial ein (tendenziell am häufigsten von kranial gesehen, in einigen Fällen auch von kaudal, Abb. 27 B, E, F). Offenbar werden auch Dendriten nicht an der Penetration in die Matrix durch astrozytenreiche Areale gehindert. Abb. 26 zeigt eine kranial gelegene Map-2 positive neuronale Zelle im RM, deren Fortsätze die Grenzschicht zwischen RM und MM überbrücken und der porösen Mikrostruktur der MM folgen.

Ob es sich bei den Fortsätzen um Dendriten sensorischer- oder motorischer Neurone handelt, bleibt unklar, denn zur weiteren Differenzierung wurden keine weiteren immunhistochemischen Marker verwendet. Außerdem kann nicht gesagt werden, ob es sich um regenerative oder plastische Prozesse handelt. Nachgewiesen wurde aber, dass die MM auch das Einwachsen dendritischer Strukturen erlaubte, was im Zusammenhang mit orientierten Biomaterialien zuvor in der Literatur nicht beschrieben wurde (Abs. 5.2). Dieser Effekt wurde bei keinem Versuchstier der Gruppe Läsion allein beobachtet. In der Spongostan-Gruppe waren vereinzelt Dendriten im Randgebiet des Schwamms zu erkennen, aber diese brachen regelmäßig die weitere Penetration an der Grenzfläche zwischen Schwamm und nativem RM abrupt ab (Abb. 11 C, E). Daher wurden auch hier keine dendritischen Strukturen innerhalb des Schwamms detektiert. Nur die MM unterstützte das Einwachsen von Dendriten. In manchen Fällen der Gruppe MM+OHZ war das Dendritenwachstum qualitativ stärker ausgeprägt als bei der Gruppe MM allein. Welche Rolle die OHZ in Zusammenhang dendritischer Strukturen spielen, bleibt vorerst unklar.

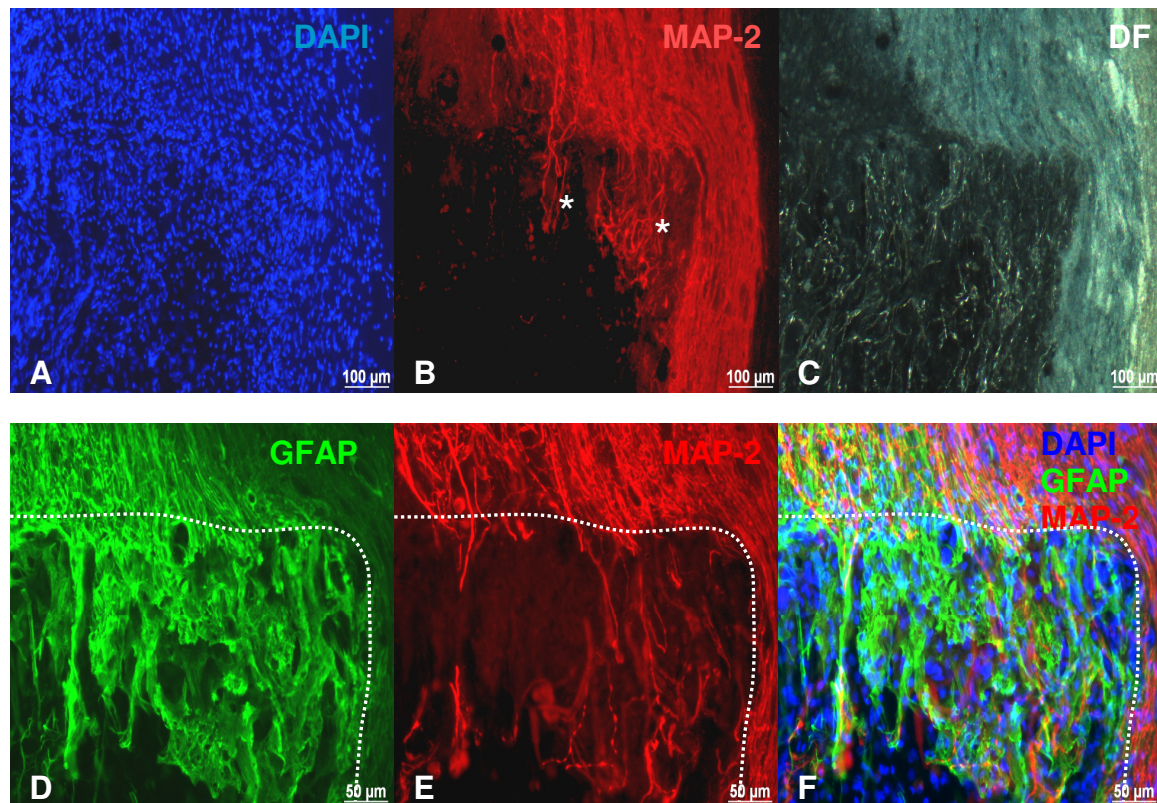


Abb. 27: Bündel MAP-2-positiver Dendriten (weiße Sterne in B) drängen vom kranialen Teil der grauen Substanz in die MM ein. Lediglich MM implantierte Tiere wiesen Penetration MAP-2-positiver Dendriten auf. D-F zeigen die Penetration dendritischer Strukturen von kranial in die MM (punktierter Markierung). Die kräftigen GFAP-positiven Bereiche kranial und kranio-medial in D und F wurden von Dendriten überbrückt. Man erkennt in E, dass viele Dendriten diese astrozytenreiche Brücke nutzten, um erfolgreich und orientiert in die MM einzutreten.

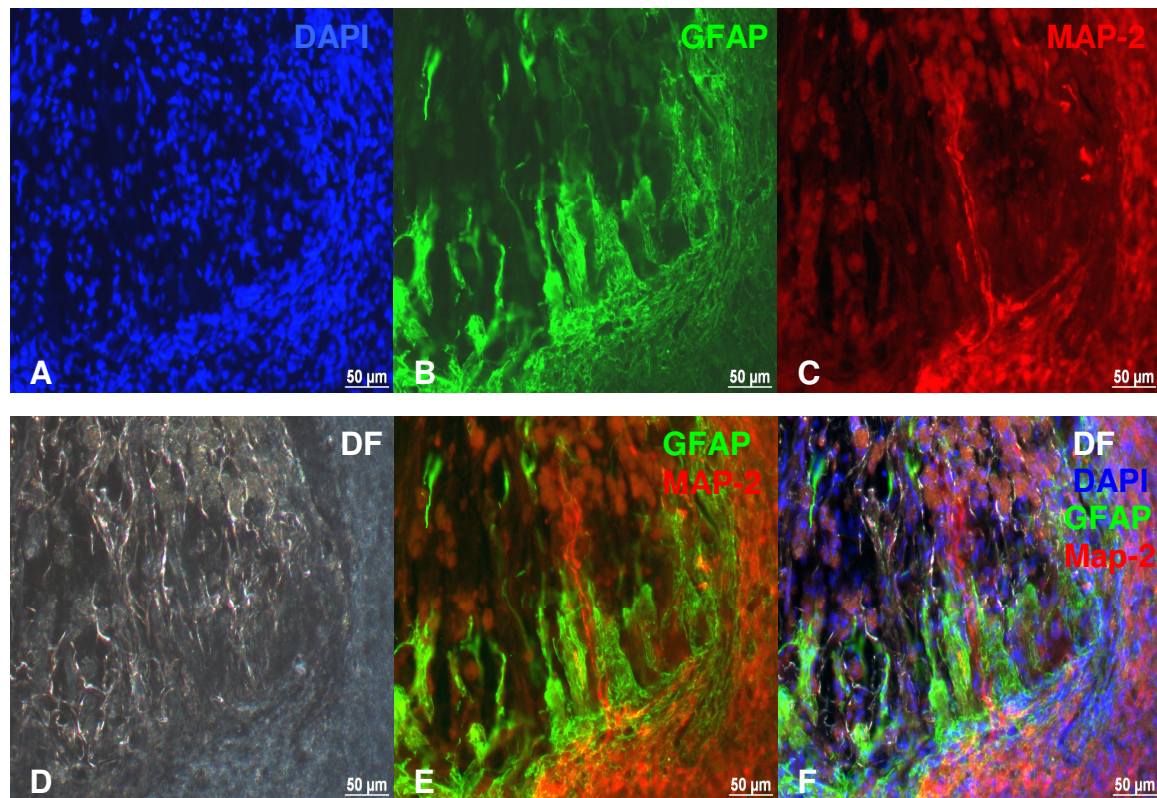


Abb. 28: C, E und F zeigen von kaudal einwachsende Dendriten aus der grauen Substanz des RM in einem MM allein Tier. Zudem ist zu beobachten, wie GFAP-positive Strukturen fingerförmig von kaudal in die MM hineinragen (B, E, F) und dazwischen Dendriten eindringen. A und D zeigen die Position der MM in einer Dapi-Kernfärbung und Dunkelfeldaufnahme.

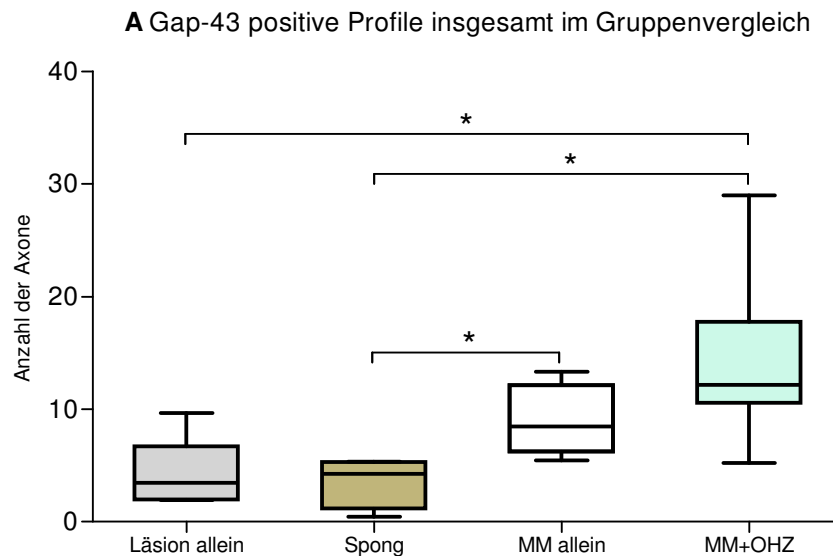
4.2.2 Quantitative Analyse der Immunhistochemie

4.2.2.1 Quantifizierung der Gap-43- und NF200 positiven Fasern

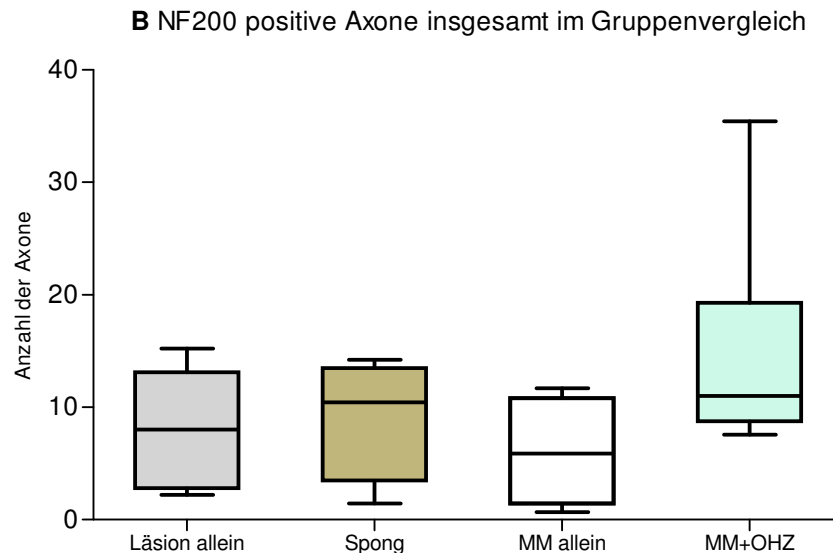
Statistische Daten wurden aus drei verschiedenen Positionen innerhalb der Läsion/Implantate (Abs. 3.10.2.3) und drei unterschiedlichen Schnittebenen erhoben (insgesamt neun Präparate pro Versuchstier). Abb. 7.1 und Abb. 7.2 und Tab. 3 demonstrieren die Regionen der Datenerhebung.

Mit dem Ziel eines Gesamtüberblickes wurden zunächst alle Daten der verschiedenen Schnittebenen zusammen beurteilt, um das höchste Vorkommen von Gap-43- und NF200-positiven Fasern in den Versuchsgruppen zu ermitteln. Dazu wurde für jedes Tier aus oben dargelegten Daten der verschiedenen Regionen der Mittelwert gebildet. Zum Vergleich der Gruppen wurde erst hiernach der Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt und die Mediane (mit den dazugehörigen IQA) in Boxplots graphisch aufgetragen. Im Anschluss wurden die Schnittebenen und die Abschnitte innerhalb der Implantate/Läsion separat betrachtet.

Die meisten Gap-43-positiven Profile waren in den Gruppen MM+OHZ und MM allein zu sehen. Hier bestanden zum Teil s.s. Unterschiede zu den Kontrollgruppen. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Kombination der MM mit OHZ (verglichen mit der MM allein Gruppe) zu keiner s.s. stärkeren Gap-43-positiven Antwort führte ($p=0.2019$; $U=8$). Tendenziell zeigte die MM+OHZ Gruppe quantitativ die meisten Gap-43-positiven Profile. Einen detaillierten Überblick der Ergebnisse verschafft Graphik 5 A und seine Erläuterung. Zusammenfassend induzierten sowohl die unbesäte MM allein als auch die mit OHZ besäte MM ein stärkeres Wachstum von Axonen.



Graphik 5, A: Im Mann-Whitney Test konnte gezeigt werden, dass kein s.s. ($p=0.1111$; $U=3$) Unterschied zwischen der Läsion allein- und MM allein Gruppe bestand. Hingegen bestand aber ein s.s. Unterschied zwischen der Läsion allein- und der MM+OHZ Gruppe ($p=0.0031$; $U=1$). Betrachtet man die Vergleiche zwischen der Kontrollgruppe Spongostan zu MM allein ($p=0.0286$; $U=0$) und MM+OHZ ($p=0.0172$; $U=1.5$), so konnten auch hier s.s. Unterschiede gezeigt werden. Die Implantation beider Matrices führte quantitativ zu einer s.s. stärkeren Gap-43-positiven Antwort. Interessanterweise induzierte die MM+OHZ keine s.s. höhere Gap-43-positive Wachstumsantwort ($p=0.2019$; $U=8$) als die MM allein Gruppe. Dennoch ist ein Trend in Richtung MM+OHZ zu erkennen. Der Vergleich zwischen den beiden Kontrollgruppen Läsion allein und Spongostan zeigte keinen s.s. Unterschied ($p=1.000$; $U=10$). Medianwerte mit zugehörigen IQA und N, siehe Abs. 7.1.



Graphik 5, B: Bei dem Vergleich zwischen Läsion allein und MM allein bestand kein s.s. Unterschied ($p=0.9048$; $U=9$). Auch wurde überraschend kein s.s. Unterschied zwischen Läsion allein und MM+OHZ ($p=0.162$; $U=10$) verzeichnet. Vergleicht man die MM allein- mit der Gruppe Spongostan, so zeigte die Spongostan-Gruppe tendenziell eine höhere NF200-positive axonale Antwort - diese war aber nicht s.s. ($p=0.4857$; $U=5$). Die MM+OHZ zeigte bei der axonalen Antwort keinen s.s. Unterschied ($p=0.6828$; $U=13$) zur Kontrollgruppe Spongostan. Die mit OHZ besäte MM induzierte offensichtlich kein stärkeres Axonwachstum im Vergleich zur unbesäten MM (allein), da der Vergleich beider zu keinem s.s. Ergebnis führte ($p=0.1051$; $U=6$). Zwischen den beiden Kontrollgruppen gab es keinen s.s. Unterschied ($p=0.9048$; $U=9$). Medianwerte mit zugehörigen IQA und N, siehe Abs. 7.1.

Betrachtet man die NF200 positiven Axone, so wurden auch hier tendenziell die meisten in der MM+OHZ Gruppe gebildet, wohingegen überraschend keine s.s. Unterschiede der MM+OHZ und MM allein Gruppe gegenüber den beiden Kontrollen nachgewiesen werden konnten (s. Graphik 5 B und Erläuterung).

Nach der Darstellung der Gap-43-positiven Profile und NF200-positiven Axone insgesamt folgen als nächstes Vergleiche in den drei Schnittebenen. Die Schnittebenenvergleiche innerhalb der Gruppen wurden mit Hilfe des verbundenen Wilcoxon-Tests durchgeführt. Ziel war das Erfassen möglicher Unterschiede in den Schnittebenen innerhalb der Gruppen (jeweils für Gap-43 und NF200 getrennt).

4.2.2.2 Schnittebenenvergleich Gap-43-positiver Profile

Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde in diesem Abschnitt auf graphische Darstellungen der zahlreichen Einzelrechnungen verzichtet. Die jeweiligen Deskriptionen (Median; IQA) sind in Abs. 7.1 tabellarisch aufgeführt. Der Vergleich zwischen den entsprechenden Schnittebenen in der Läsion allein Gruppe (N=5) ergab zwischen allen drei Ebenen keine s.s. Unterschiede in der Gap-43-positiven Antwort: Dorsal- vs. Mittelschnitte ($p=0.0625$; $W=15$), dorsal vs. ventral ($p=0.625$; $W=5$) und ventral vs. mitte ($p=0.8125$; $W=-3$).

In der MM allein Gruppe (N=4) waren ebenfalls alle 3 Schnittebenen gleichwertig. Es konnten keine s.s. Unterschiede für Gap-43-positive Profile nachgewiesen werden (dorsal vs. mitte $p=1$; $W=0$, dorsal vs. ventral $p=0.7127$; $W=3$ und ventral vs. mitte $p=0.625$; $W=4$). Gleiches galt für die MM+OHZ Gruppe (N=8). Bei den betreffenden acht Tieren waren alle drei Schnittebenen gleichwertig, ohne eine Präferenz für eine der Ebenen (dorsal vs. mitte $p=0.1953$; $W=20$, dorsal vs. ventral $p=0.7422$; $W=6$ und ventral vs. mitte $p=0.4609$; $W=-12$).

Auch in der Spongostan-Gruppe (N=4) ergab sich keine Präferenz für eine der Schnittebenen (dorsal vs. mitte $p=0.25$; $W=-8$, dorsal vs. ventral $p=0.8750$; $W=-2$ und ventral vs. mitte $p=0.625$; $W=4$).

Zusammenfassend wurden zwischen den drei Schnittebenen in den vier Versuchsgruppen in Bezug auf das Wachstum von Gap-43-positiven Fasern keine s.s. Unterschiede detektiert.

4.2.2.3 Schnittebenenvergleich NF200-positiver Axone

In der Läsion allein Gruppe waren alle drei Schnittebenen gleichwertig (dorsal vs. mitte $p=0.3125$; $W=9$, dorsal vs. ventral $p=1$; $W=1$ und ventral vs. mitte $p=0.5879$; $W=-5$). Gleiches traf abermals auf die MM allein Gruppe zu (dorsal vs. mitte $p=1$; $W=0$, dorsal vs. ventral $p=0.875$; $W=-2$ und ventral vs. mitte $p=0.375$; $W=-6$).

In der MM+OHZ Gruppe wurden keine Schnittebenenunterschiede festgestellt (dorsal vs. mitte $p=0.7422$; $W=6$, dorsal vs. ventral $p=0.9453$; $W=-2$ und ventral vs. mitte $p=0.1953$; $W=-20$).

In der Spongostan-Gruppe konnten ebenso keine s.s. Unterschiede in den 3 Schnittebenen beobachtet werden (dorsal vs. mitte $p=0.25$; $W=-8$; dorsal vs. ventral $p=0.375$; $W=-6$ und ventral vs. mitte $p=0.25$; $W=-8$).

Betrachtet man das Wachstum von NF200-positiven Axonen, so lassen sich analog den Ergebnissen aus Abs. 4.2.2.2 auch hier keine s.s. schnittspezifischen Unterschiede erkennen.

4.2.2.4 Positionen innerhalb der Läsion bzw. der Implantate – Gap-43-positive Profile

Bei der Untersuchung der Gap-43-positiven Profile in den drei Bereichen innerhalb der MM, des Spongostans und der Läsion (kranial/mitte/kaudal), wurde gezeigt, dass nur in der Gruppe MM+OHZ im kranialen Bereich der Matrix eine stärkere Gap-43-positive Antwort bestand (150 μm von der Matrix-RM Grenze). In der Läsion allein Gruppe existierten in diesen Bereichen keine s.s. Unterschiede (kranial vs. mitte $p=0.3125$; $W=-9$, kranial vs. kaudal $p=0.2785$; $W=-9$ und mitte vs. kaudal $p=1$; $W=-1$). Einen s.s. Unterschied in der MM allein Gruppe hinsichtlich der drei Sektoren innerhalb der MM gab es nicht (kranial vs. mitte $p=0.25$; $W=6$, kranial vs. kaudal $p=0.1975$; $W=8$ und mitte vs. kaudal $p=0.5807$; $W=-4$).

In der Gruppe MM+OHZ wurde eine s.s. stärkere Gap-43-positive Antwort im kranialen Bereich der MM (kranial vs. mitte **$p=0.0391$** ; $W=30$) nachgewiesen. Die übrigen Bereiche zeigten keine s.s. Unterschiede (kranial vs. kaudal $p=0.0547$; $W=28$, mitte vs. kaudal $p=0.8438$; $W=-4$).

In der Spongostan-Gruppe gab es keine s.s. Unterschiede (kranial vs. mitte $p=0.0975$; $W=10$, kranial vs. kaudal $p=1$; $W=-1$ und mitte vs. kaudal $p=0.0975$; $W=-10$).

4.2.2.5 Positionen innerhalb der Läsion bzw. der Implantate – NF200-positive Axone

In allen vier Gruppen konnten innerhalb der drei Positionen beim Wachstum von Axonen keine s.s. Unterschiede gesehen werden. Auch hier scheinen die Positionen kranial, mitte und kaudal gleichwertig zu sein.

Läsion allein Gruppe: kranial vs. mitte $p=0.125$; $W=-13$, kranial vs. kaudal $p=0.0625$; $W=-15$ und mitte vs. kaudal $p=0.6845$; $W=-4$.

MM allein Gruppe: kranial vs. mitte $p=0.0975$; $W=10$, kranial vs. kaudal $p=0.625$; $W=4$ und mitte vs. kaudal $p=0.875$; $W=-2$.

Gleiches gilt für die MM+OHZ Gruppe (kranial vs. mitte $p=0.1094$; $W=20$, kranial vs. kaudal $p=0.2188$; $W=16$ und mitte vs. kaudal $p=1$; $W=1$). Auch dort waren die Bereiche statistisch gleich, ebenso in der Spongostan-Gruppe (kranial vs. mitte $p=0.625$; $W=4$, kranial vs. kaudal $p=0.75$; $W=2$ und mitte vs. kaudal $p=0.5$; $W=-4$).

Ganz allgemein ist sowohl für die Gap-43- und die NF200-positiven Fasern festzuhalten, dass eine deutliche Tendenz zu stärkeren Faserbildung in kranialen Bereichen der MM und der Läsion bestand. An zweiter Stelle stand der kaudale Abschnitt. Wie bereits weiter oben beschrieben, wurden keine s.s. Ergebnisse erzielt, die diese Hypothese bestätigen könnten. Die statistische Quantifizierung zeigt, dass es beinahe in allen Gruppen zu einer ausgeglichenen Faserverteilung innerhalb der Läsion bzw. der Implantate kam. Lediglich in der Gruppe MM+OHZ war eine stärkere Faserantwort (Gap-43) im kranialen MM Bereich nachweisbar.

4.2.2.6 Quantifizierung der reaktiven Astrozytose

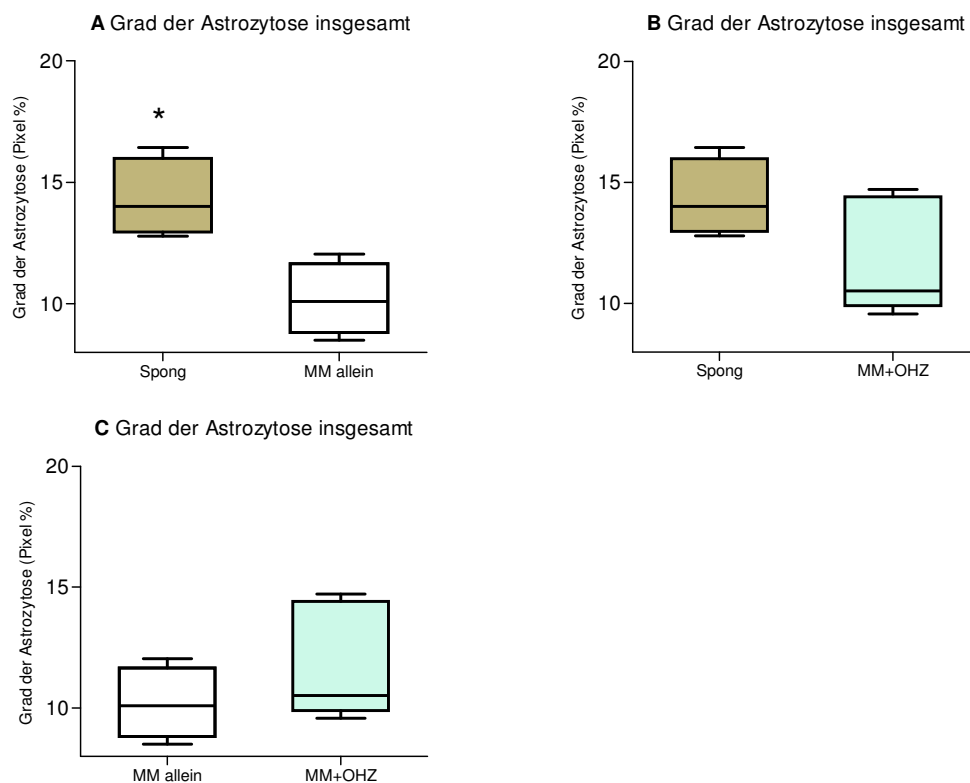
Die Methode zur Erfassung der reaktiven Astrozytose wurde bereits in Abschnitt 3.10.2.1 dargelegt. Wie zuvor erwähnt, drückt das Programm *ImageJ* lediglich die GFAP-positiven Regionen in Prozent aus. Dabei spielt die Intensität der Färbung keine Rolle.

Zunächst folgt auch im Falle der reaktiven Astrozytose (GFAP) eine zusammengefasste Darstellung, d.h. unabhängig von den Schnittebenen und den Positionen innerhalb der Implantate. Hierfür wurden die ermittelten Pixel (in %) aller Schnittebenen und Positionen innerhalb der Gruppen als ein Wert pro Versuchstier gemittelt betrachtet. Verglichen wurden die Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney Tests für unverbundene Stichproben.

4. Ergebnisse

In der Läsion allein Gruppe kam es im Bereich der Läsion zur Bildung eines Hohlraums. Ebenso konnten in diesen Arealen Schrumpfungsprozesse beobachtet werden. Dieser Umstand führte dazu, dass keine Möglichkeit für überlappungsfreie Aufnahmen bestand. Deswegen konnte für den Vergleich innerhalb der Implantate nur die Gruppe Spongostan als Kontrolle dienen. In der zusammengefassten Darstellung ist aus diesem Grund die Läsion allein Gruppe nicht aufgeführt.

Die GFAP-Quantifizierung konnte einen s.s. Unterschied zwischen den Gruppen Spongostan und MM allein nachweisen. Hierbei kam es zu einer insgesamt stärkeren astrozytären Antwort in der Spongostan-Gruppe ($p=0.0286$; $U=0$) (Graphik 6 A). Hingegen konnte der Vergleich zwischen den Gruppen Spongostan und MM+OHZ keine s.s. Unterschiede belegen ($p=0.1535$; $U=7$) (Graphik 6 B), obwohl die Astrozytenantwort in der Spongostan-Gruppe tendenziell stärker war. Offenbar führte die Besäung der MM mit OHZ nicht zu einer gleichzeitig höheren reaktiven Astrozytose (MM allein vs. MM+OHZ $p=0.3677$; $U=10$) (Graphik 6 C).

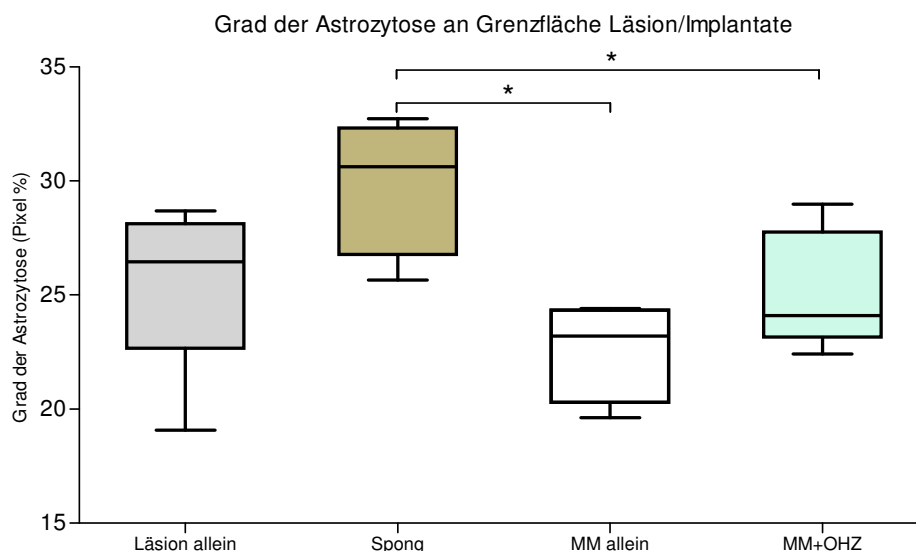


Graphik 6: Der Spongostan-Schwamm induzierte eine insgesamt s.s. stärkere Astrozytenantwort im Vergleich zur MM allein Gruppe ($p=0.0286$; $U=0$). S.s. Unterschiede im Grad der Glianarbenentstehung im übrigen Gruppenvergleich wurden nicht gefunden. In B wird ersichtlich, dass es tendenziell zu einer stärkeren Astrozytenantwort zwischen den Gruppen Spong und MM+OHZ kam. C vergleicht die Gruppen MM allein und MM+OHZ, wo die Astrozytenantwort durch die mit OHZ besäte MM tendenziell höher war. Medianwerte mit zugehörigen IQA und N, siehe Abs. 7.1.

4. Ergebnisse

Die kombinierte Betrachtung der kranialen- und kaudalen Grenzfläche zwischen nativem RM und Implantat (bzw. Läsion) konnte eine s.s. stärkere Astrogliose in der Spongostan-Gruppe verglichen mit der MM allein Gruppe (**p=0.0286**; U=0) und MM+OHZ Gruppe (**p=0.0162**; U=2) verzeichnen. Das bedeutet, dass die astroglöse Narbenentstehung nach Implantation des Spongostan im angrenzenden RM-Bereich quantitativ höher ist.

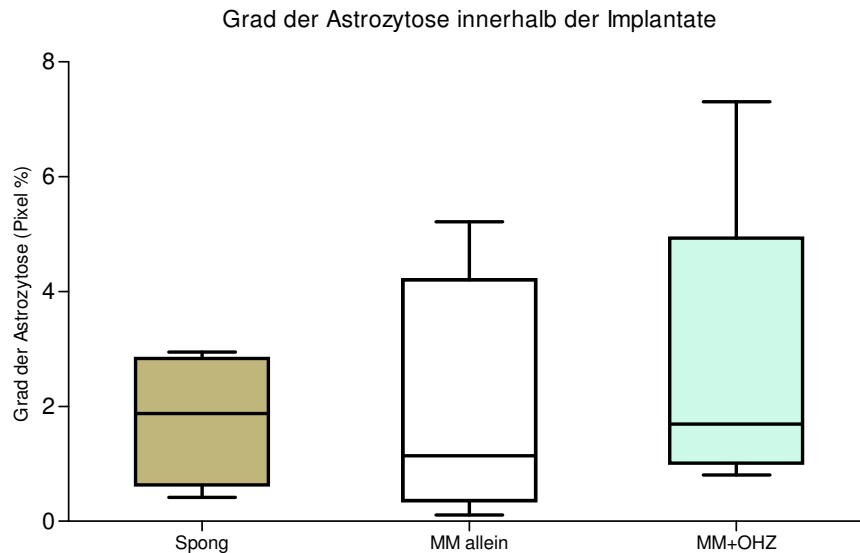
Es wurden keine s.s. Unterschiede zwischen den Gruppen Läsion allein vs. MM allein (p=0.1905; U=4), Läsion allein vs. MM+OHZ (p=0.5237; U=15) und MM allein vs. MM+OHZ (p=0.2828; U=9) nachgewiesen. Graphik 7 zeigt jedoch, dass die beiden Gruppen – MM allein und MM+OHZ – tendenziell die geringere Astrozytenantwort induzierten. Interessanterweise induzierte sogar die Läsion allein Gruppe tendenziell eine höhere reaktiv-astrozytäre Antwort als die beiden MM Gruppen (mit und ohne OHZ).



Graphik 7: Im Grenzgebiet zwischen RM und Implantat kam es um den Spongostan-Schwamm s.s. zu einer stärkeren Astrozytenantwort im Vergleich Spong vs. MM allein (**p=0.0286**; U=0) und Spong vs. MM+OHZ (**p=0.0162**; U=2). Hingegen ging die Implantation der MM mit oder ohne OHZ nicht mit einer s.s. höheren Glianarbenbildung um die Implantate einher, verglichen mit der Läsion allein Gruppe (Läsion allein vs. MM allein: p=0.1905; U=4, Läsion allein vs. MM+OHZ: p=0.5237; U=15). Offenbar induzierte die Besäung der MM mit OHZ ebenso keine s.s. höhere Astrozytenantwort um die Implantate, da der Vergleich MM allein vs. MM+OHZ s.s. keine Unterschiede detektierte: p=0.2828; U=9. Der Vergleich zwischen den beiden Kontrollgruppen Spongostan und Läsion allein zeigt ebenso keine s.s. Unterschiede: p=0.1905; U=4. Die Boxplots vermitteln den Eindruck, dass tendenziell die Gruppe MM allein die geringste Astrozytenantwort um die Implantate erzeugte, selbst geringer als in Läsion allein Tieren. Hierbei handelt es sich aber wie beschrieben um einen Trend. Medianwerte mit zugehörigen IQA und N, siehe Abs. 7.1.

Um den Grad der Astrozytose innerhalb der Implantate beurteilen zu können, wurden die drei Positionen vorerst für jedes Versuchstier gemittelt und die Mediane nach dem Rechenschritt dann in Form von Boxplots aufgetragen. Es stellte sich heraus,

dass es zwischen den Gruppen Spongostan, MM allein und MM+OHZ keine s.s. Unterschiede gab. Graphik 8 legt aber nahe, dass die Astrozytenantwort in der Gruppe Spongostan im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen tendenziell am stärksten war. Die entsprechenden p-Werte sind der Beschreibung der Graphik 8 zu entnehmen.



Graphik 8: Die Graphik verdeutlicht, dass es tendenziell zu einer stärkeren reaktiv-astrozytären Antwort in der Gruppe Spongostan kam. Ebenso trifft dies tendenziell auf die MM+OHZ Gruppe zu. Der Vergleich zwischen Spong vs. MM allein ($p=0.6857$; $U=6$) und Spong vs. MM+OHZ ($p=0.6868$; $U=13$) zeigte jedoch, dass es keine s.s. Unterschiede gab, so dass es nur bei einem Trend bleibt. Der Vergleich zwischen MM allein und MM+OHZ dokumentierte keine s.s. Unterschiede ($p=0.6868$; $U=13$). Medianwerte mit zugehörigen IQA und N, siehe Abs. 7.1.

Die Analyse der GFAP-positiven Bereiche in den drei Sektoren kranial, mitte und kaudal innerhalb der MM und des Spongostans ergab, dass es nur in der Gruppe MM+OHZ im kranialen Bereich der Matrix verglichen mit dem mittleren Bereich einen s.s. Unterschied gab (**$p=0.0234$** ; $W=32$). Im kranialen Bereich kam es zu einer s.s. stärkeren astrozytären Antwort als im mittleren Bereich. Die übrigen Positionen innerhalb der MM waren statistisch gleich (kranial vs. kaudal $p=0.5469$; $W=10$ und mitte vs. kaudal $p=0.0547$; $W=-28$). Innerhalb der MM allein Gruppe waren alle drei Positionen in der MM statistisch gleichwertig (kranial vs. mitte $p=0.125$; $W=10$, kranial vs. kaudal $p=0.125$; $W=10$ und mitte vs. kaudal $p=0.625$; $W=4$). Auch in der Kontrollgruppe Spongostan waren in allen drei Positionen innerhalb des Schwamms keine s.s. Unterschiede zu verzeichnen (kranial vs. mitte $p=0.25$; $W=6$, kranial vs. kaudal $p=0.375$; $W=6$ und mitte vs. kaudal $p=0.375$; $W=-6$).

5 Diskussion

Die eingangs formulierten Hypothesen dieser Dissertation wurden dahingehend geprüft, ob die Implantation der mittels *Bioengineering* entwickelten Kollagenmatrizes in eine experimentell durchgeführte Rückenmarksläsion zu einer optimalen Gewebeintegration, einem orientierten axonalen Wachstum und zu einer funktionellen Erholung führten. Meine Arbeit demonstriert, dass a) die Implantation von Kollagenmatrizes zu einer Integration in das native Rückenmark führte, b) die Kollagenmatrizes besät mit Zellen (OHZ) eine bessere Gewebeintegration als unbesäte aufzeigten, c) axonale Regeneration in besäten Kollagenmatrizes stärker war als in unbesäten und d) durch beide Matrizes, besäte und unbesäte, in gewissem Maße funktionelle Erholung eintrat. Hingegen war es nicht möglich, eine eindeutige Korrelation zwischen dem Ausmaß des axonalen Wachstums innerhalb der Matrix und dem Grad der funktionellen Erholung herzustellen. Auf Grund dieser Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Verhaltensbeobachtung und der immunhistochemischen Daten müssen alternative Mechanismen der funktionellen Erholung motorischer Defizite in Erwägung gezogen werden. Kompensationsmechanismen zur Maskierung tatsächlich vorhandener Bewegungsdefizite (Montoya *et al.* 1991; Kunkel-Bagden *et al.* 1993; Fouad *et al.* 2001) und strukturelle Plastizität (Fouad *et al.* 2001; Raineteau und Schwab 2001; Steward *et al.* 2003) sind hierbei denkbar.

Traumatische Verletzungen im Bereich der weißen Substanz des ZNS führen, wie bereits in Abschnitt 2 beschrieben, zu einer Degeneration von Axonen. Periläsionär findet eine Infiltration durch inflammatorische Zellen und Fibroblasten statt. Ferner wurde die Ausbildung eines Flüssigkeit gefüllten Hohlraums, einer Gliaarbe und die damit verbundene Ablagerung von narben-assoziierten Molekülen beschrieben. Diese stattfindenden Veränderungen im Bereich der Läsionszone führen zur Störung der Zytoarchitektur (Schwab und Bartholdi 1996; Pettigrew *et al.* 2001; Fawcett 2006). Die Kontinuitätsunterbrechung der auf- und absteigenden Fasersysteme, die Formation einer Läsionslücke in Kombination mit der Narbenbildung stellen unüberwindbare Barrieren für regenerierende und elongierende Axone dar. Durch die Implantation eines orientierten Typ-I-Kollagen-Biomaterials versuchte man in diesem

Projekt, einer derartigen Barriere entgegenzuwirken. Somit spielte die Sorgfalt während der Operation eine fundamentale Rolle: Eine insuffiziente und falsch orientierte Platzierung des Implantates hätte nämlich den erfolgreichen Wiedereintritt regenerierender Axone nicht zugelassen, denn die longitudinal orientierte Ausrichtung der porösen MM musste der longitudinalen Ausrichtung des RM (und damit der longitudinalen Elongation der regenerierenden Axone) angepasst sein. Nur dadurch war ein erfolgreiches Überbrücken der Läsionslücke möglich. Wenn die MM in falscher Orientierung implantiert worden wäre, so wäre das Eintreten longitudinal elongierender Axone in das feine Kanalsystem der MM verhindert worden. Dann hätte nämlich das Implantat eine mechanische Barriere dargestellt, ähnlich dem oben beschriebenen Beispiel einer zystischen Läsionshöhle.

5.1 Aspekte der Verhaltensstudien

In der Literatur werden für implantatinduzierte funktionelle Erholungen motorischer Defizite im Tiermodell zwei Verhaltenstests empfohlen, was in diesem Projekt erfüllt worden ist (Montoya *et al.* 1991; Kunkel-Bagden *et al.* 1993; Fouad *et al.* 2001).

Der *Staircase*-Test stellt eine einfache und v.a. objektive Methode zur Prüfung der motorischen Funktion der Vorderpfoten von Ratten dar. Damit aber Daten überhaupt erhoben werden können, müssen die Versuchstiere trainiert werden. Sie müssen eine feinmotorische und gezielte Greifbewegung ausführen, damit sie die FP in den Einsenkungen der Treppen des *Staircase*-Konstruktes ergreifen können. Diese Trainingsphase nahm in unserem Versuch vier bis sechs Wochen in Anspruch. Nach dieser Zeit waren die Tiere in der Lage, ohne Zeichen von Stress schnell und adäquat nach den FP im *Staircase* zu greifen. Der Vorteil dieser Trainingsphase war, dass alle Versuchstiere postoperativ das Verhalten bereits beherrschten. Im Vergleich dazu haben zwar andere Verhaltenstests eine deutlich kürzere Trainingsphase; dafür lernen aber Tiere auch noch in der eigentlichen Testphase, was die Versuchsergebnisse durchaus beeinflussen kann. Dieses Problem konnte in diesem Versuch umgangen werden, weil das Training zum Zeitpunkt der Operation abgeschlossen war und das gewünschte Greifverhalten stabil beherrscht wurde. Bei dem sog. *CatWalk* Test beispielsweise handelt es sich um einen gut geeigneten Lokomotionstest. Hier werden Versuchstiere nur eine Woche täglich zur

Akklimatisation präoperativ trainiert. Zum anderen kann das Laufmuster der Tiere analysiert werden (Hamers *et al.* 2001; Koopmans *et al.* 2005).

Die präoperativen Daten des *Staircase*-Tests indizierten eine Seitendifferenz: Versuchstiere griffen s.s. häufiger mit der linken Pfote als mit der rechten. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass bei Ratten ebenso Rechts- und Linkshändigkeit besteht. In einer Arbeit von Pence (2002) wurde untersucht, ob eine geschlechtsspezifische Seitendifferenz im Greifverhalten von Sprague-Dawley-Ratten bestand. Derartige geschlechtsspezifische Unterschiede wurden nicht nachgewiesen, allerdings war der Großteil der Versuchstiere rechtshändig, sodass postuliert wurde, dass auch bei Ratten die Händigkeit mit der humanen Händigkeit vergleichbar ist. Ebenso bestätigten Guven *et al.* (2003) eine Rechtshändigkeit bei Ratten, ähnlich wie bei Menschen. Der rechts/links Unterschied im *Staircase*-Test könnte damit begründet werden, dass der hier verwendete Inzuchtstamm überwiegend linkshändig war. Es müssten Daten spezifisch für Lewis-Ratten erhoben werden.

In allen drei implantierten Tiergruppen kam es zu einem positiven Trend hinsichtlich der motorischen Funktion der linken Pfote, wie aus Graphik 2 zu entnehmen. Zwar konnte zwischen den einzelnen Gruppen über 12 Wochen kein s.s. Unterschied detektiert werden, allerdings war der Zeitfaktor s.s. Für zukünftige Tests wird aus diesem Grund eine größere Fallzahl und eine homogene Gruppenaufteilung empfohlen, so dass vorhandene starke Unterschiede auch s.s. deutlich werden können. Der rapide Rückgang der Griffe mit der linken Vorderpfote in der ersten postoperativen Woche geht ebenfalls deutlich aus Graphik 2 hervor. Im Zeitraum der Beobachtung stiegen anschließend kontinuierlich die Griffe mit der linken Pfote an. Dieser Trend ist v.a. in der MM allein Gruppe und dann in der MM+OHZ Gruppe deutlich erkennbar. Interessanterweise ergab sich auch in der Spongostan-Gruppe ein kontinuierlicher Anstieg der Grifftrate mit der linken, affektierten Pfote. Dennoch erreichten die Gruppen MM allein und MM+OHZ ein tendenziell höheres Griffniveau und - bei Betrachtung der zweiten bis vierten postoperativen Wochen – darüber hinaus eine viel schnellere Erholung. Vergleicht man dazu die drei implantierten Gruppen mit der Läsion allein Gruppe, so ist zu erkennen, dass sich diese Gruppe demgegenüber sehr langsam und diskontinuierlich erholte, und dass dann die Griffhäufigkeit mit der linken Pfote auf einem niedrigen Niveau bestehen blieb.

Die Verhaltensanalysen einer Implantationsstudie von Liu *et al.* (1999), in der Brain-Derived-Neurotrophic Factor (*BDNF*) sezernierende Fibroblasten in das akut C4-lädierte RM implantiert worden waren, konnten nachweisen, dass es postoperativ zu einer funktionellen Erholung der Vorderpfote gekommen ist. Immunhistochemische Untersuchungen verdeutlichten ferner, dass diese motorische Besserung der Pfote auf neu entstandene rubrospinale Fasern zurückzuführen war (retrogrades *Tracing*).

Erwähnenswert ist noch, dass die gängigen Verhaltenstests keines der neuronalen Bahnsysteme spezifisch prüfen. In der gesunden Ratte folgen gezielte Greifbewegungen einem ganz bestimmten Bewegungsmuster. Dieses Bewegungsmuster wird durch komplexe neuronale Schaltkreise auf kortikaler, subkortikaler und spinaler Ebene geregelt. Impulse in die Peripherie werden aber v.a. über die absteigenden Bahnsysteme *Tr. corticospinalis* und *Tr. rubrospinalis* übermittelt. Geschickte und feinmotorische Bewegungen werden bevorzugt durch den *Tr. rubrospinalis* geleitet (Whishaw und Gorny 1996; Whishaw *et al.* 1997; 1998; Metz und Whishaw 2000). Somit stellt der *Staircase*-Test eine objektive, sensitive Methode zur Erfassung von feinmotorischen Bewegungsdefiziten dar (Montoya *et al.* 1991; Whishaw und Gorny 1996; Stackhouse *et al.* 2008). Sowohl im *Staircase*-Test als auch im *Rearing*-Test konnten deutliche Haltungsanomalien der linken Vorderpfote erkannt werden, wenn Versuchstiere versuchten, FP zu ergreifen oder die Zylinderwand zu explorieren. Die Pfote war in einer gebeugten, leicht pronierten Stellung, und die Fingerstrahlen waren zu einer „Faust“ geschlossen. Bei Kontakt mit der Zylinderwand kam es zur Spreizung der einzelnen Fingerstrahlen, was rechts nicht beobachtet wurde.

Die Verlangsamung im *Staircase*-Test, die Zunahme der Misserfolgrate beim Greifen und die kombinierte Beobachtung der Haltungsanomalie im *Rearing*-Test machen auch quantitativ/qualitativ kinematische Untersuchungen der Bewegungskomponenten für zukünftige Tests nötig (Stackhouse *et al.* 2008).

Der *Rearing*-Test stellt ebenso eine objektive, sehr einfach durchführbare Methode zur quantitativen Erfassung der bevorzugten Benutzung der Vorderpfoten dar. Es handelt sich um einen stark sensitiven Test zur Erfassung bestehender Asymmetrien zwischen den Vorderpfoten, wobei eher die grobmotorischen Funktionen im Vordergrund stehen. Ein weiterer Vorteil ist, dass Versuchstiere kein spezifisches

Verhalten erlernen müssen, sondern die Bewegungen im Glaszylinder spontane Explorationsbewegungen darstellen, welche sie auch in ihren Basiskäfigen immer wieder durchführen (Schallert *et al.* 2000; Tillerson *et al.* 2001; Stackhouse *et al.* 2008). In den ersten Testtagen zeigten die Versuchstiere Anzeichen von Stress (Urinabgang, *freezing*), die aber zügig durch eine ruhige Atmosphäre und nach der Akklimatisation der Tiere an die Umgebung durchbrochen werden konnte.

Im Vergleich zum *Staircase*-Test konnten im *Rearing*-Test keine eindeutigen Trends oder klinisch relevante Ergebnisse erzielt werden. Zwar konnten beispielsweise in der 12. postoperativen Woche in Graphik 4 E viele Landebewegungen mit der linken Pfote in den Gruppen MM allein und MM+OHZ durchgeführt werden, aber diese Landebewegungen waren im Gruppenvergleich nicht s.s. Im Vergleich dazu sieht man in den Linkskontakten postoperativ (Graphik 4 B) keinerlei Trends, die darauf hinweisen könnten, dass eine der Gruppen überlegen war. Da diese Ergebnisse insgesamt großen Schwankungen unterworfen waren, können sie auch lediglich mit gewisser Einschränkung interpretiert werden. Wie weiter oben beschrieben, transplantierten Liu *et al.* (1999) *BDNF* sezernierende Fibroblasten in das akut lädierte RM. Zur Beurteilung der funktionellen Erholung der affektierten Pfote wurde ebenfalls der *Rearing*-Test verwendet. Hier wurde beobachtet, dass alle behandelten Versuchstiere postoperativ zunächst wenige Kontakt- und Landebewegungen mit der affektierten Pfote durchführten, dafür bevorzugten sie aber die ipsilateral zur Läsion befindliche Pfote. Über den postoperativen Beobachtungszeitraum kam es dann bei *BDNF*-behandelten Tieren zu einem s.s. Anstieg der Kontakt- und Landeraten mit der kontralateral zur Läsion liegenden Pfote. Es wurde auch ein Anstieg der simultanen Kontakt- und Landebewegungen mit beiden Pfoten zur Unterstützung der affektierten Pfote registriert, wenn die Tiere die Bewegungen nicht unabhängig durchführen konnten. Ursprünglich erwarteten wir ähnliche Ergebnisse in unserem *Rearing*-Test. Im Rahmen dieses Projektes wurden die Verhaltenstiere nur für drei Min. im Glaszylinder beobachtet. Für weitere Projekte wird eine etwas längere Beobachtungszeit empfohlen, z. B. mindestens fünf Min. Wahrscheinlich wurden im *Rearing*-Test keine s.s. Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt, weil die Zeit der Beobachtung zu kurz war. Die meisten Verhaltenstiere bewegten sich postoperativ absolut betrachtet wenig, obwohl keine Zeichen von Stress vorhanden waren.

Auch hier wird für zukünftige Beobachtungseinheiten eine größere und homogene Fallzahl empfohlen.

5.2 Morphologische Aspekte

Um die Interaktionen nativer neuronaler Strukturen mit der implantierten MM allein und der mit OHZ besäten MM detektieren zu können, wurden immunhistochemische Verfahren mit spezifischen Markern verwendet (NF200, Gap-43, GFAP, MAP-2). NF200 ist ein spezifischer Marker und Indikator von Axonen (Dahl *et al.* 1988; Mansour *et al.* 1989; Skene 1989). Gap-43 wird ebenfalls u.a. von regenerierenden Axonen exprimiert, allerdings ist Gap-43 zwar ein mit Wachstum assoziiertes Protein, aber dessen erhöhte Expression weist nicht nur auf Regeneration hin. Entwicklung, Differenzierung, Synaptogenese und strukturelle Reorganisation gehen ebenso mit einer erhöhten Expression von Gap-43 einher (Skene 1989; Brook *et al.* 1998b). Gap-43 wird auch von zellulären Elementen wie Gliazellen, SZ und auch OHZ exprimiert. Bei der Beurteilung von immunhistologischen Aufzeichnungen muss diese Tatsache berücksichtigt werden.

Zur Erfassung der reaktiven Astrozytose wurde ein AK gegen GFAP verwendet. Als Ausdruck gesteigerter astrozytärer Prozesse wird GFAP im ZNS bei Verletzungen von reaktiven Astrozyten im hohen Maße exprimiert (Skene 1989; Silver und Miller 2004). MAP-2 ist ein spezifischer Marker neuronaler Dendriten (Bernhardt und Matus 1984).

In Abschnitt 2 wurde bereits ausführlich beschrieben, dass eine Läsion im Bereich des RM zur Formation einer Narbe führt. Hierbei spielt die Proliferation und Hypertrophie der Astrozyten zu reaktiven Astrozyten eine essentielle Rolle, denn sie bilden im Periläsionsgebiet als astrozytenreiche Glia Narbe einen Teil der Narbe (Dihne *et al.* 2001; Fitch und Silver 2008). Aktivierung von Astrozyten in der Läsionszone ziehen zum einen die Synthese einer neuen Basallamina und zum anderen die Sekretion von Chondroitinsulfatproteoglykanen nach sich. Hinsichtlich der Basallaminasynthese wurde ein enger Zusammenhang zwischen reaktiven Astrozyten und fibroblastoiden Zellen beschrieben. Das Zentrum der Läsion hingegen wurde durch Fibroblasten besetzt. In diesem Zusammenhang wird der Akkumulation des Wachstumsfaktors *Connective tissue growth factor* (CTGF) eine wichtige Rolle zugesprochen (Schwab *et al.* 2001).

Eine reaktiv-astrozytäre Antwort ist sicherlich wichtig zur Begrenzung des Schadens im nativen Gewebe, denn die Glianarbenbildung schützt das unmittelbar angrenzende Nervengewebe vor einer weiteren Expansion und Eskalation des Schadens. Gleichwohl sorgen aber die unmittelbare Umgebung und das Narbengewebe selbst zur Schaffung eines feindlichen Milieus für axonales Wachstum (Shearer und Fawcett 2001; Sofroniew 2005; Fawcett 2006). Zur quantitativen Erfassung dieser wichtigen Rolle der Astrozyten bei der Narbenentstehung, wurden in diesem Projekt GFAP-immunreaktive Regionen mit einer Anti-GFAP Färbung untersucht. Im Vorfeld dieser Untersuchungen wurde eine stärkere regenerative Kapazität NF200-positiver Fasern und Gap-43-positiver Profile in den implantierten Versuchsgruppen MM+OHZ und MM allein postuliert. Tatsächlich konnte demonstriert werden, dass es in MM+OHZ transplantierten Tieren zu einer tendenziell stärkeren Penetration NF200-positiver Axone kam und ebenso wurde eine s.s. stärkere Penetration Gap-43-positiver Fasern nachgewiesen. Diese waren überwiegend langstreckig, glatt und nicht endverzweigt. Dies wurde auch in den Implantaten der MM allein Gruppe beobachtet.

Folglich überbrückten Axone die Läsionslücke mit Hilfe der Implantate: vom kranialen Läsionsstumpf her kommend über eine reaktiv-astrozytenreiche, bindegewebige Umgebung in die implantierte MM, um dann kaudal Anschluss an das angrenzende native RM zu gewinnen und gleiches auch umgekehrt von kaudal nach kranial.

Ein weiteres Ziel war auch zu verifizieren, ob es in den RM-Ebenen dorsal/mitte/ventral und innerhalb der Matrices (kranial/mitte/kaudal) einen Unterschied in der Ausprägung der Regeneration gab. Unseres Wissens nach gibt es bisher keine publizierten Daten, die systematisch untersuchten, ob bestimmte Abschnitte eines Implantates axonale Regeneration stärker begünstigen. Wir stellten fest, dass es tendenziell eine stärkere regenerative Kapazität in den dorsalen, dann ventralen und moderat in den mittleren Schnittebenen gab. Außerdem beobachteten wir eine stärkere Penetration von Axonen im kranialen Matrixbereich. In der MM+OHZ Gruppe waren die Daten s.s. Tendenziall galt dies auch für die MM allein Gruppe. Im Vergleich dazu war die Ausprägung der axonalen Antwort im kaudalen Matrixbereich moderat, aber besser als im mittleren Matrixbereich. Ein Erklärungsansatz dieser Beobachtung könnte ein Mangel an Nährstoffen im Zentrum der Implantate sein. In dieser Arbeit wurden jedoch keine spezifischen Färbungen zur Darstellung von Neovaskularisationen in den Implantaten durchgeführt. Aus

diesem Grund kann an dieser Stelle auch keine definitive Aussage hinsichtlich der Nährstoffversorgung im mittleren Bereich der Implantate getroffen werden.

In einem Versuch von Xu *et al.* (1997) wurden SZ in die akute RM-Läsion implantiert, wobei Regeneration aus beiden Seiten – sowohl vom kranialen als auch kaudalen Läsionsstumpf – gefördert werden konnte. Allerdings war die kraniale Regenerationsantwort stärker. Als Läsionsmodell wurde in diesem Versuch eine komplette Durchtrennung des thorakalen RM gewählt. Ein Vergleich in Hinblick auf die dorsalen, mittleren und ventralen Schnittebenen ist nicht möglich, da entsprechende Referenzuntersuchungen in der Literatur nicht beschrieben sind. Auf jeden Fall wird für zukünftige Untersuchungen empfohlen, Regeneration in den Schnittebenen des RM zu evaluieren.

Eine weitere essentielle Beobachtung dieser Dissertation war, dass regenerierte Axone in der MM+OHZ- und MM allein Gruppen einen neuen Weg nahmen. Dabei zogen von kranial her Axonbündel um den lateralen Bereich der Implantate, an der Grenzfläche zwischen *Dura mater* und MM, um dann kaudal wieder an das native RM anzuschließen (Abb. 13, B und C, Abb. 14, B und C, Abb. 22). Wir interpretieren diese Beobachtung als tatsächlich stattgefundenene Regeneration anstelle von der Läsion verschont gebliebenes laterales RM-Gewebe (*spared tissue*). Zwei Argumente unterstützen diese These: a) In diesen lateralen Grenzflächen zwischen *Dura mater* und Implantaten konnten kaum GFAP-positive Zellen bzw. GFAP-positive Profile dokumentiert werden. Trotz der Abwesenheit GFAP-positiver Profile waren dennoch zahlreiche Axone in den o.g. Regionen gewachsen. b) Die Faserbündel waren häufig in den dorsalen und mittleren Schnittebenen zu beobachten. Es ist daher höchst unwahrscheinlich, dass bei diesem operativen Läsionsmodus (Abs. 3.4) Fasern verschont bleiben würden. Wenn wir solche Gewebebrücken nur in ventralen Schnittebenen beobachtet hätten, dann hätte es sich wahrscheinlich um intraoperativ verschont gebliebenes RM-Gewebe gehandelt. Um belegen zu können, dass die Grenzfläche zwischen *Dura mater* und Implantat eine tatsächlich günstige Route für axonale Regeneration darstellt, müssen zukünftig intensive Studien erfolgen. Das vereinzelte Wachstum am lateralen Rand der Implantate wurde ansatzweise nebenbefundlich von Ramón-Cueto (1998; 1998) und Ruitenberg *et al.* (2002) in Zusammenhang mit Biomaterialien erwähnt. Lediglich 2002 (Novikov *et al.*) wurde im Rahmen von Implantationsstudien mit Polyhydroxybutyrat und SZ das Phänomen der axonalen Regeneration um die

Implantate zwischen nativem Gewebe und *Dura mater* beschrieben. Novikov *et al.* schenken dieser Beobachtung jedoch eine geringe Aufmerksamkeit und folgerten, dass die ohne SZ besetzten Polyhydroxybutyrat-Implantate Regeneration *um* diese fördern, nicht jedoch *im* Inneren der Matrix (Novikov *et al.* 2002).

Wie weiter oben beschrieben, nahmen Axonbündel einen „ungewöhnlichen“ und „neuen“ Weg zwischen *Dura mater* und Implantat als Zeichen stattgefundener Regeneration. In einer Zusammenfassung von Steward *et al.* (2003) werden Kriterien definiert, die der diffizilen Unterscheidung zwischen tatsächlich regenerierten Axonen und solchen Axonen, die von der Läsion verschont geblieben sind (*sprouting of spared tissue*) und damit keinen Regenerationsprozess im eigentlichen Sinne darstellen, dienen. Die Kriterien werden v.a. für das RM vorgeschlagen, können aber auf das gesamte ZNS übertragen werden. Beispielsweise wird beschrieben, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Regeneration vorliegt, wenn Axone einen ungewohnten Weg in der unmittelbaren Umgebung des ZNS nehmen. Auch ist eine Regeneration sehr wahrscheinlich, wenn Axone ihren Ursprung am Läsionsstumpf bzw. in dessen unmittelbarer Nähe besitzen. Das gleiche gilt für Axone, die sich vom nativen ZNS entspringend in ein Fremdmaterial oder ein Implantat ausbreiten sowie für Axone, die vom nativen ZNS kommend in eine nicht-ZNS Umgebung, z. B. im Bereich der Narbe, im Läsionsbereich wachsen (Steward *et al.* 2003; Fouad und Pearson 2004). Alle diese Kriterien trafen auf unsere oben beschriebenen Beobachtungen zu, so dass hier mit hoher Wahrscheinlichkeit eine implantatvermittelte axonale Regeneration vorliegt.

Eine weitere neue Erkenntnis dieser Dissertation war die Entdeckung Map-2-positiver Dendriten innerhalb der MM, sowohl mit als auch ohne OHZ (Abb. 26-28). Diese bisher in Zusammenhang mit Biomaterialien in der Literatur unbeschriebene Beobachtung deutet darauf hin, dass nicht nur Bestandteile der weißen Substanz in die Matrix penetrieren können, sondern auch Strukturen der grauen Substanz. Ob es sich um Ausläufer sensibler-, motorischer- oder Interneurone handelte, bleibt an Hand der alleinigen Map-2-Färbungen unklar, denn zur weiteren Spezifizierung hätten weitere Färbungen durchgeführt werden müssen. Wahrscheinlich spielt auch die Reaktion der grauen Substanz im Rahmen intrinsischer Reparaturmechanismen, Regeneration und/oder struktureller Plastizität/*Remodelling* eine nicht unwesentliche Rolle. Eine Synaptogenese zwischen Strukturen der grauen und weißen Substanz kann in Betracht gezogen

werden. Diese könnte auch die starke Gap-43-positive Reaktion innerhalb der Implantate erklären, denn nicht nur Regeneration, sondern auch Synaptogenese und Differenzierung gehen mit einer erhöhten Gap-43-Expression einher (Verhaagen *et al.* 1989). Zur Untermauerung dieser Theorie wäre eine Anti-Synaptophysinfärbung erforderlich. Vermutlich fördert oder hemmt eine axodendritische Interaktion die Verbesserung funktioneller Defizite, was hier jedoch nicht eindeutig beantwortet werden kann.

Ob sich die o.g. Interaktion vorteilhaft oder nachteilig auswirkt, welche Rolle sie letztlich einnimmt und ob es sich hier um Regeneration neuronaler Zellen oder plastisches *Remodelling* handelt, kann mit diesen Färbungen nicht beantwortet werden, sollte aber in jedem Fall in zukünftigen Projekten näher verfolgt werden. Eine Erstbeschreibung wurde in dieser Arbeit durchgeführt.

Nach Geller und Fawcett (2002) bestehen nach Implantation eines Biomaterials in eine Läsion drei kritische Regionen:

- a) die Eintrittszone („*on-ramp*“)
- b) die Beschaffenheit des Materials („*surface*“) und
- c) die Austrittszone („*off-ramp*“).

Die größte Hürde stellt demnach die Eintrittszone der Implantate dar. Bis eingetretene Fasern die Austrittszone eines Materials erreichen, um Anschluss an das native RM zu gewinnen, vergeht einige Zeit. Hier sehen Geller und Fawcett (2002) eine weitere Problematik; bis nämlich die elongierenden Axone die Austrittszone erreichen, wird die Bildung der Gliaarbe und das Entstehen der akzessorischen *Glia limitans* weiter fortgeschritten sein. Somit würde das Narbengewebe einen erfolgreichen Wiedereintritt in das native RM stark einschränken.

Das Auftreten der stärksten axonalen Antwort im kranialen Implantatbereich im Rahmen unserer Untersuchungen und das eher moderate Auftreten von Axonen im kaudalen Matrixbereich könnte durchaus mit dieser Problematik des „*on*“ und „*off-ramp*“ erklärt werden. Hierzu kann aber nur von der Annahme ausgegangen werden, dass es sich im vorliegenden Versuch um absteigende Fasern handelte. Demnach wäre in unserem Fall der kraniale Bereich der Läsion das „*on-ramp*“ und der kaudale das „*off-ramp*“. Um eine definitive Aussage treffen zu können, hätte ein anterogrades

Tracing mit spezifischen Markern zur genauen Beschreibung der Fasersysteme durchgeführt werden müssen.

Durch Versuche von Plant *et al.* (2001) könnte der kranial/kaudal-Unterschied plausibel erklärt werden. Hier wurde der Einfluss von CSPG auf das Regenerationsverhalten von Nervenzellen im durchtrennten RM nach SZ-Implantation in die Läsion untersucht. Überraschend war das Ergebnis: An Hand von AK gegen CSPG wurde herausgefunden, dass die CSPG-Konzentration im kaudalen Grenzbereich zwischen Implantat und Läsionsstumpf höher war als die Konzentration kranial. Sie folgerten daraus, dass es sich um eine weitere molekulare Barriere handelt, die den erfolgreichen Wiedereintritt der neuen Axone in das native RM am kaudalen Läsionsstumpf verhindert. Mit dieser Erklärung wäre unsere Beobachtung, dass kranial quantitativ mehr Fasern im Implantat sichtbar waren als kaudal, sehr gut vereinbar. Um diese These jedoch zu untermauern, hätte man zusätzlich eine spezifische Färbung mit AK gegen CSPG machen müssen.

Ein weiterer Aspekt der morphologischen Untersuchungen war, dass es einen engen Zusammenhang zwischen GFAP-positiven Arealen und dem gleichzeitigen Auftreten von Axonen gab. Bei den Versuchstieren, die ein Implantat erhalten hatten, stellte das GFAP-immunreaktive Bindegewebe unmittelbar um die Implantate ein wichtiges Brückengewebe für NF200- und Gap-43-positive Axone dar. Um *in* die Matrices zu penetrieren, nutzten sie diese Brücken. In der vorliegenden Arbeit wurden die stärksten GFAP-immunreaktiven Regionen um die Läsionen bzw. Implantate beobachtet, und zwar unmittelbar an der Grenzfläche zwischen nativem RM und Implantat. Ferner wurden GFAP-positive Prozesse im Inneren der MM (v.a. im kranialen Matrixbereich und tendenziell kaudalen Matrixbereich) detektiert. Im Zentrum der MM war die GFAP-Expression tendenziell am geringsten. Bei solchen Tieren, die eine MM mit OHZ erhalten hatten, war die GFAP-Immunreaktivität im Inneren der Implantate tendenziell am stärksten.

Die GFAP-Immunreaktivität in der unmittelbaren Grenzzone zwischen RM und Implantat könnte als wichtiges Brückengewebe betrachtet werden (s.u.). Die stärkere GFAP-Immunreaktivität im Inneren der Matrices könnte als Indikator für eine optimale Integration des Implantates in das native RM und als besonders kompatible Struktur gedeutet werden. Demnach war die Integration der MM+OHZ am besten.

Joosten *et al.* (1995) implantierten in das akut-lädierte RM zwei verschiedene Kollagenmatrices und beobachteten in beiden Gruppen eine Beeinflussung der

Glioseausprägung um die Implantate. In beiden Gruppen kam es im Vergleich zu den Kontrollgruppen zur Reduktion der reaktiven Astrozytose in unmittelbarer Nähe zu den Implantaten. Daraus folgerten sie, dass Kollagenmatrizes vermutlich die Glianarbenbildung positiv beeinflussen. Aus Graphik 7 wird ersichtlich, dass solche Versuchstiere mit einer MM eine tendenziell geringere Astroglie im Vergleich zu den Kontrollen zeigten. Auch die Astroglie insgesamt (Graphik 6) indizierte eine reduzierte reaktiv-astrozytäre Antwort im Vergleich zu der Kontrollgruppe Spongostan. Somit kann auch hier gefolgert werden, dass die aus Typ-I-Kollagen bestehende MM die Glianarbenbildung vermutlich reduziert.

Betrachtet man die OHZ in Zusammenhang mit der reaktiv-astrozytären Antwort, so scheinen sie ebenso eine essentielle Rolle zu spielen (siehe weiter unten). Wahrscheinlich sezernieren sie in hohem Maße neurotrophe Faktoren (Ramon-Cueto und Avila 1998). Es besteht die Möglichkeit, dass auf molekularer Ebene Interaktionen zwischen den beiden Zellpopulationen Astrozyten/OHZ hergestellt werden, ähnlich der Interaktion zwischen SZ und OHZ (Ramon-Cueto und Avila 1998; Lakatos *et al.* 2000; Lakatos *et al.* 2003; Deumens *et al.* 2004; Cao *et al.* 2007). Es konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass SZ durch die Sekretion von supportiven Molekülen das Wachstum von Axonen im ZNS, trotz der Anwesenheit von Astrozyten in unmittelbarer Nähe, anregen (Adcock *et al.* 2004). Eine weitere bemerkenswerte Beobachtung war das Einwachsen von Fasern aus operationsbedingt lädierten HW in die MM (Ruitenbergh *et al.* 2002; 2003). Möglicherweise führte der zufällig enge Kontakt zwischen MM und lädierter HW zur Migration von SZ in die MM. In solchen Fällen sah man Gap-43-positive Konglomerate, neben feinen Gap-43- und NF200-positiven Axonen. Da auch zelluläre Elemente Gap-43 exprimieren, kann es sich bei den Konglomeraten um positive SZ oder aber auch Gliazellen (OHZ) gehandelt haben. Ganz allgemein muss in die Überlegungen einbezogen werden, dass in die Läsion aller Tiere SZ migriert sein können. Denn auch sie unterstützen im ZNS axonales Wachstum, wie oben bereits erwähnt (Wang *et al.* 1996; Brook *et al.* 1998a; Brook *et al.* 2000; Buss *et al.* 2007). Es darf ebenso nicht außer Acht gelassen werden, dass das von OHZ sezernierte NGF die Migration von SZ fördert (Li *et al.* 2004; Cao *et al.* 2007). Sicherlich waren weitere Zellpopulationen einbezogen (Mikroglia, Oligodendrozyten, Makrophagen). Die hohe Zellularität innerhalb der MM, obgleich unspezifisch, konnte durch die Dapi-Kernfärbung nachgewiesen werden. Diese spricht für eine starke

Reaktion und vermutlich auch Interaktion innerhalb der MM zwischen den Zellen. Welche zellulären und molekularen Interaktionen im Detail stattfanden, kann auf der Basis dieser Färbungen nicht geklärt werden.

Zuletzt darf nicht vernachlässigt werden, dass eine erhöhte GFAP-Konzentration nur auf eine Reaktivierung von Astrozyten auf die sezernierten Signalmoleküle der Läsionsumgebung hinweist. In der Literatur stellen reaktiv-astrozytenreiche Areale ein kontroverses Thema dar (McKeon *et al.* 1991; Giulian 1993; O'Toole *et al.* 2007; Rossi *et al.* 2007): Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte nachgewiesen werden, dass reaktive Astrozyten unter bestimmten Bedingungen sowohl fördernd als auch hemmend auf axonales Wachstum wirken können (Ridet *et al.* 1997; Fawcett und Asher 1999; Gimenez y Ribotta *et al.* 2001; Fawcett 2006). Dass reaktive Astrozyten axonales Wachstum unterstützen können, wurde bereits zuvor beschrieben (Kawaja und Gage 1991; Liberto *et al.* 2004). Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht geklärt. Unter *in vitro* Bedingungen fehlen viele der unter *in vivo* Bedingungen vorhanden Zellpopulationen und deren Syntheseprodukte. Festgehalten werden kann somit, dass aktivierte Astrozyten als duale Gruppe zu verstehen sind (Cao *et al.* 2004).

Übertragen auf den vorliegenden Versuch kann zusammengefasst werden, dass besonders in den kräftig GFAP-positiven Regionen eine starke axonale Antwort vorgefunden wurde. Offensichtlich übten hier Astrozyten einen supportiven Effekt auf regenerierende Axone aus. Ferner fungierten sie, wie weiter oben beschrieben, als astrozytenreiche Gewebebrücke für elongierende Axone, um in die Matrices zu penetrieren. Sie dienten also als Brücke zwischen nativem RM und dem Biomaterial. Des Weiteren sind eventuell die besser orientierten Astrozytenprofile (Abb. 23 A, Abb. 24, A und C) innerhalb der Implantate ein weiterer Indikator für eine gute Fremdmaterialintegration. Dieser Umstand unterstützt wahrscheinlich zusätzlich axonales Wachstum (Kawaja und Gage 1991; Brook *et al.* 2001). Dass astrozytenreiche Regionen durchaus penetrierbar für regenerierende Fasern in Zusammenhang mit Biomaterialien sind, zeigten in ähnlicher Weise wie wir Kataoka *et al.* (2004). Nach Durchführung einer kompletten RM-Läsion im adulten Rattenmodell implantierten sie Alginatschwämme in die Läsion. Auch sie erfassten axonale Regeneration in der Umgebung von GFAP-immunreaktiven Regionen, die Penetration von Axonen *und* reaktiven Astrozyten in die Alginatimplantate sowie das

Auftreten von Axonen und reaktiven Astrozyten Seite an Seite (Kataoka *et al.* 2004). Tatsächlich scheint sich das reaktiv-astrozytenreiche Bindegewebe bzw. Brückengewebe in unmittelbarer Umgebung von orientierten Implantaten günstig auf axonale Regeneration auszuwirken. Hier besteht unbedingt noch Forschungs- und Analysebedarf.

Schließlich soll noch ein wichtiger funktioneller Aspekt angeführt werden: Nicht nur Projektionen des *Nucleus ruber* befähigen Ratten zum gezielten und geschickten Greifen, sondern auch die der Pyramidenbahn (Whishaw und Gorny 1996; Whishaw *et al.* 1998). Nach Läsion des rubrospinalen Traktes können Ratten dennoch FP greifen, wenn auch deutlich weniger präzise. Deswegen wird ausdrücklich festgehalten, dass kein Verhaltenstest Bahnsysteme spezifisch prüft. In einem Versuch konnten Whishaw *et al.* (1998) zeigen, dass auch nach Unterbrechung *beider* Bahnsysteme gezieltes Greifen möglich ist. Somit kann postuliert werden, dass weitere absteigende Bahnsysteme die Vorderpfotenmotorik regulieren. Ob hier auch plastische Reorganisation neuronaler Netzwerke auf kortikaler und spinaler Ebene, spontane Erholung vom spinalen Schock, Erholung von operationsbedingter Überstreckung von Axonen, Aussprossung lädierter oder nicht lädierter Fasern und kontralateraler Bahnsysteme (Fouad *et al.* 2001; Raineteau und Schwab 2001; Steward *et al.* 2003) oder sogar eine aktivitäts-abhängige Plastizität im Bereich des RM (Wolpaw und Tennissen 2001; Wolpaw 2007) eine Rolle spielten, lässt sich nicht mit Sicherheit einem dieser Prozesse zuordnen. Eine Hypothese ist, dass funktionelle Erholung das kombinierte und interagierende Auftreten aller Prozesse plus Regeneration neben und miteinander erfordert.

Dass sich Aktivität und Bewegungsübungen positiv nach Implantation olfaktorischer Hüllzellen auswirken, zeigten Moon *et al.* (2006) in einem interessanten Versuch. Hier wurden Versuchsratten in Basiskäfigen gehalten und nach Implantationsversuchen mit solchen in modifizierten Käfigen verglichen, denen es möglich war, sich motorisch zu betätigen. Ihre Ergebnisse indizierten, dass motorische Übungen zur funktionellen Verbesserung führten. In zukünftigen Versuchen sollten Versuchstiere in sog. modifizierten Käfigen mit der Möglichkeit zu motorischen Übungen gehalten werden. Übertragen auf humane RM-Läsionen kann gefolgert werden, dass intensive rehabilitative Maßnahmen, physikalische Therapie und Training (speziell bezogen auf die Lokomotion) zu einer beachtlichen Besserung

von Ausfallerscheinungen unterhalb der Läsion führen. Durch diese werden neuroplastische Prozesse, sowohl auf spinaler als auch supraspinaler Ebene, in Gang gesetzt, die zu einer Förderung sensomotorischer Funktionen beitragen. Letztlich ist aber die genaue Bedeutung rehabilitativer Maßnahmen und physikalischer Therapie noch nicht ganz geklärt, und es besteht in diesem Zusammenhang Forschungsbedarf (Edgerton *et al.* 2004; Moon *et al.* 2006; Thuret *et al.* 2006; Rossignol *et al.* 2007). Übertragen auf die vorliegende Arbeit könnte die wöchentliche Verhaltensbeobachtung gleichzeitig als eine Art physikalische Therapie betrachtet werden, denn das gewünschte Verhaltensmuster im *Staircase*- und *Rearing*-Test wird auf stereotype Weise abgerufen (Girgis *et al.* 2007).

Abschließend wird eine viel versprechende *tissue engineering* Strategie zur Überbrückung der Läsionszone im RM nach akutem Trauma dargestellt. Erst kürzlich konnten Wissenschaftler erfolgreich selbst-zusammenfügende Nanofaser-Peptide als Überbrückungsgerüst anwenden. Hierbei wurde einerseits gezeigt, dass Nanofasern als Gerüst die Gliaarbenbildung und lokale Entzündungsreaktion reduzierten, und andererseits „verstrickten“ (*knitting*) diese hauchfeinen Fasern den kranialen und kaudalen Läsionsstumpf effektiv miteinander. Nach Injektion der Peptide in flüssiger Form lösten selbst-zusammenfügende Nanofasergerüste keine nennenswerte Immun- und Entzündungsreaktion im nativen Gewebe von Versuchstieren aus (Holmes *et al.* 2000). Ellis-Behnke *et al.* (2006) demonstrierten, dass Nanofasergerüste ein permissives Milieu für axonales Wachstum erzeugten, was wiederum mit Gewebereparatur des *Tr. opticus* in Hamstern einherging. Es konnten folglich Verbesserungen des Sehvermögens bei den Versuchstieren detektiert werden. Bemerkenswert ist, dass diese Nanofasergerüste keine feste Richtung besitzen, aber offensichtlich dennoch Regeneration und Gewebereparaturmechanismen induzieren. Wenn die Ausrichtung der Nanofasern (longitudinal orientiert) kontrolliert werden würde, könnte wahrscheinlich die Effizienz der Gewebereparaturstrategie potenziert werden. In einem akuten RM-Läsionsmodell der Maus wurde des Weiteren gezeigt, dass selbst-zusammenfügende Nanofasergerüste die Apoptose und die reaktive Astrozytose im Läsionsgebiet reduzierten. Sie unterstützten die Regeneration von Axonen, und Verhaltenstests dokumentierten eine moderate funktionelle Erholung motorischer Funktionen (Tysseling-Mattiace *et al.* 2008).

5.3 Schlussfolgerungen

- Die in diesem Projekt verwendeten Typ-I-Kollagen-Matrizes (MM) sind im hohen Maße biokompatibel.
- Eine exzellente Interaktion zwischen dem nativen RM und dem Fremdmaterial MM konnte auch nach Besäung mit OHZ beobachtet werden.
- Ferner wurde gezeigt, dass solche Matrizes mit OHZ die stärkste langstreckig-orientierte axonale Antwort induzierten. Allerdings ging die Induktion einer qualitativ und quantitativ starken axonalen Antwort nicht konsekutiv mit einer funktionellen Erholung einher.
- Regenerierende Axone schufen sich einen neuen Weg um die Implantate zwischen den Grenzflächen *Dura mater* und MM.
- Es wurde erstmals beobachtet, dass native Dendriten der grauen Substanz mit Typ-I-Kollagen-Matrizes interagierten. Im Zusammenhang mit Biomaterialien wurde diese Beobachtung in der Literatur bisher nicht beschrieben.
- Auf Grund der dargelegten Diskrepanz zwischen motorischer Funktion der linken Pfote und der immunhistochemischen Ergebnisse müssen alternative Mechanismen der funktionellen Erholung in Erwägung gezogen werden, die nicht-implantatvermittelte axonale Regeneration hervorrufen.

6 Literaturverzeichnis

1. Adcock, K. H., D. J. Brown, M. C. Shearer, D. Shewan, M. Schachner, G. M. Smith, H. M. Geller and J. W. Fawcett (2004). "Axon behaviour at Schwann cell - astrocyte boundaries: manipulation of axon signalling pathways and the neural adhesion molecule L1 can enable axons to cross." Eur J Neurosci 20(6): 1425-1435.
2. Alexander, C. L., U. F. Fitzgerald and S. C. Barnett (2002). "Identification of growth factors that promote long-term proliferation of olfactory ensheathing cells and modulate their antigenic phenotype." Glia 37(4): 349-364.
3. Barber, P. C. and R. M. Lindsay (1982). "Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes." Neuroscience 7(12): 3077-3090.
4. Barnett, S. C., A. M. Hutchins and M. Noble (1993). "Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb." Dev Biol 155(2): 337-350.
5. Bartholdi, D. and M. E. Schwab (1998). "Oligodendroglial reaction following spinal cord injury in rat: transient upregulation of MBP mRNA." Glia 23(3): 278-284.
6. Bartolomei, J. C. and C. A. Greer (2000). "Olfactory ensheathing cells: bridging the gap in spinal cord injury." Neurosurgery 47(5): 1057-1069.
7. Barton, W. A., B. P. Liu, D. Tzvetkova, P. D. Jeffrey, A. E. Fournier, D. Sah, R. Cate, S. M. Strittmatter and D. B. Nikolov (2003). "Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins." Embo J 22(13): 3291-3302.
8. Becker, D., C. L. Sadowsky and J. W. McDonald (2003). "Restoring function after spinal cord injury." Neurologist 9(1): 1-15.
9. Bernhardt, R. and A. Matus (1984). "Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons." J Comp Neurol 226(2): 203-221.

10. Bozkurt, A., G. A. Brook, S. Moellers, F. Lassner, B. Sellhaus, J. Weis, M. Woeltje, J. Tank, C. Beckmann, P. Fuchs, L. O. Damink, F. Schugner, I. Heschel and N. Pallua (2007). "In Vitro Assessment of Axonal Growth Using Dorsal Root Ganglia Explants in a Novel Three-Dimensional Collagen Matrix." Tissue Eng 13(12): 2971-2979.
11. Bozkurt, A., R. Deumens, C. Beckmann, L. Olde Damink, F. Schugner, I. Heschel, B. Sellhaus, J. Weis, W. Jahnen-Dechent, G. A. Brook and N. Pallua (2009). "In vitro cell alignment obtained with a Schwann cell enriched microstructured nerve guide with longitudinal guidance channels." Biomaterials 30(2): 169-179.
12. Bracken, M. B., W. F. Collins, D. F. Freeman, M. J. Shepard, F. W. Wagner, R. M. Silten, K. G. Hellenbrand, J. Ransohoff, W. E. Hunt, P. L. Perot, Jr. and et al. (1984). "Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury." Jama 251(1): 45-52.
13. Bracken, M. B., M. J. Shepard, W. F. Collins, T. R. Holford, W. Young, D. S. Baskin, H. M. Eisenberg, E. Flamm, L. Leo-Summers, J. Maroon and et al. (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." N Engl J Med 322(20): 1405-1411.
14. Bracken, M. B., M. J. Shepard, T. R. Holford, L. Leo-Summers, E. F. Aldrich, M. Fazl, M. Fehlings, D. L. Herr, P. W. Hitchon, L. F. Marshall, R. P. Nockels, V. Pascale, P. L. Perot, Jr., J. Piepmeier, V. K. Sonntag, F. Wagner, J. E. Wilberger, H. R. Winn and W. Young (1997). "Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study." Jama 277(20): 1597-1604.
15. Bradbury, E. J., L. D. Moon, R. J. Popat, V. R. King, G. S. Bennett, P. N. Patel, J. W. Fawcett and S. B. McMahon (2002). "Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury." Nature 416(6881): 636-640.

16. Brook, G. A., D. A. Houweling, R. G. Gieling, T. Hermanns, E. A. Joosten, D. P. Bar, W. H. Gispen, A. B. Schmitt, P. Leprince, J. Noth and W. Nacimiento (2000). "Attempted endogenous tissue repair following experimental spinal cord injury in the rat: involvement of cell adhesion molecules L1 and NCAM?" Eur J Neurosci 12(9): 3224-3238.
17. Brook, G. A., J. M. Lawrence and G. Raisman (2001). "Columns of Schwann cells extruded into the CNS induce in-growth of astrocytes to form organized new glial pathways." Glia 33(2): 118-130.
18. Brook, G. A., W. Nacimiento, A. S. Taheri, P. L. Woodhams and J. Noth (1997). "Axotomy-induced alterations in the red nucleus revealed by monoclonal antibody, Py, following a low thoracic spinal cord lesion in the adult rat." Spinal Cord 35(7): 474-481.
19. Brook, G. A., D. Plate, R. Franzen, D. Martin, G. Moonen, J. Schoenen, A. B. Schmitt, J. Noth and W. Nacimiento (1998a). "Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat." J Neurosci Res 53(1): 51-65.
20. Brook, G. A., A. B. Schmitt, W. Nacimiento, J. Weis, J. M. Schroder and J. Noth (1998b). "Distribution of B-50(GAP-43) mRNA and protein in the normal adult human spinal cord." Acta Neuropathol (Berl) 95(4): 378-386.
21. Buss, A., K. Pech, B. A. Kakulas, D. Martin, J. Schoenen, J. Noth and G. A. Brook (2007). "Growth-modulating molecules are associated with invading Schwann cells and not astrocytes in human traumatic spinal cord injury." Brain 130(Pt 4): 940-953.
22. Buss, A., K. Pech, D. Merkler, B. A. Kakulas, D. Martin, J. Schoenen, J. Noth, M. E. Schwab and G. A. Brook (2005). "Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the human spinal cord." Brain 128(Pt 2): 356-364.
23. Cajal, S. R. y. (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system, edited by May RM. London: Oxford University Press, 1928.

24. Cao, L., L. Liu, Z. Y. Chen, L. M. Wang, J. L. Ye, H. Y. Qiu, C. L. Lu and C. He (2004). "Olfactory ensheathing cells genetically modified to secrete GDNF to promote spinal cord repair." Brain 127(Pt 3): 535-549.
25. Cao, L., Y. L. Zhu, Z. Su, B. Lv, Z. Huang, L. Mu and C. He (2007). "Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor." Glia 55(9): 897-904.
26. Caroni, P. and M. E. Schwab (1988). "Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter." Neuron 1(1): 85-96.
27. Chan, C. C. (2008). "Inflammation: beneficial or detrimental after spinal cord injury?" Recent Pat CNS Drug Discov 3(3): 189-199.
28. Colbourne, F., D. Corbett, Z. Zhao, J. Yang and A. M. Buchan (2000). "Prolonged but delayed postischemic hypothermia: a long-term outcome study in the rat middle cerebral artery occlusion model." J Cereb Blood Flow Metab 20(12): 1702-1708.
29. Cregan, E. F., J. Peeling, D. Corbett, A. M. Buchan, J. Saunders, R. N. Auer, M. Gao, D. J. McCarthy, M. S. Eisman, T. M. Campbell, R. J. Murray, M. L. Stagnitto and G. C. Palmer (1997). "-(S)-Alpha-phenyl-2-pyridine-ethanamine Dihydrochloride-, a low affinity uncompetitive N-methyl-D-aspartic acid antagonist, is effective in rodent models of global and focal ischemia." J Pharmacol Exp Ther 283(3): 1412-1424.
30. Dahl, D., B. Labkovsky and A. Bignami (1988). "Neurofilament phosphorylation in axons and perikarya: immunofluorescence study of the rat spinal cord and dorsal root ganglia with monoclonal antibodies." J Comp Neurol 271(3): 445-450.
31. Deumens, R., G. C. Koopmans, C. G. Den Bakker, V. Maquet, S. Blacher, W. M. Honig, R. Jerome, J. P. Pirard, H. W. Steinbusch and E. A. Joosten (2004). "Alignment of glial cells stimulates directional neurite growth of CNS neurons in vitro." Neuroscience 125(3): 591-604.

32. Dihne, M., F. Block, H. Korr and R. Topper (2001). "Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury." Brain Res 902(2): 178-189.
33. Doucette, R. (1990). "Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system." Glia 3(6): 433-449.
34. Doucette, R. (1995). "Olfactory ensheathing cells: potential for glial cell transplantation into areas of CNS injury." Histol Histopathol 10(2): 503-507.
35. Edgerton, V. R., N. J. Tillakaratne, A. J. Bigbee, R. D. de Leon and R. R. Roy (2004). "Plasticity of the spinal neural circuitry after injury." Annu Rev Neurosci 27: 145-167.
36. Ellis-Behnke, R. G., Y. X. Liang, S. W. You, D. K. Tay, S. Zhang, K. F. So and G. E. Schneider (2006). "Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision." Proc Natl Acad Sci U S A 103(13): 5054-5059.
37. Eng, L. F. (1985). "Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes." J Neuroimmunol 8(4-6): 203-214.
38. Faulkner, J. R., J. E. Herrmann, M. J. Woo, K. E. Tansey, N. B. Doan and M. V. Sofroniew (2004). "Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury." J Neurosci 24(9): 2143-2155.
39. Fawcett, J. W. (2006). "Overcoming inhibition in the damaged spinal cord." J Neurotrauma 23(3-4): 371-383.
40. Fawcett, J. W. and R. A. Asher (1999). "The glial scar and central nervous system repair." Brain Res Bull 49(6): 377-391.
41. Feron, F., C. Perry, J. Cochrane, P. Licina, A. Nowitzke, S. Urquhart, T. Geraghty and A. Mackay-Sim (2005). "Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury." Brain 128(Pt 12): 2951-2960.

42. Fitch, M. T. and J. Silver (2008). "CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure." Exp Neurol 209(2): 294-301.
43. Fouad, K., V. Dietz and M. E. Schwab (2001). "Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors." Brain Res Brain Res Rev 36(2-3): 204-212.
44. Fouad, K. and K. Pearson (2004). "Restoring walking after spinal cord injury." Prog Neurobiol 73(2): 107-126.
45. Fournier, A. E., G. C. Gould, B. P. Liu and S. M. Strittmatter (2002). "Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin." J Neurosci 22(20): 8876-8883.
46. Fournier, A. E. and S. M. Strittmatter (2001). "Repulsive factors and axon regeneration in the CNS." Curr Opin Neurobiol 11(1): 89-94.
47. Galtrey, C. M. and J. W. Fawcett (2007). "The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system." Brain Res Rev 54(1): 1-18.
48. Geller, H. M. and J. W. Fawcett (2002). "Building a bridge: engineering spinal cord repair." Exp Neurol 174(2): 125-136.
49. Gimenez y Ribotta, M., V. Menet and A. Privat (2001). "The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS." Prog Brain Res 132: 587-610.
50. Girgis, J., D. Merrett, S. Kirkland, G. A. Metz, V. Verge and K. Fouad (2007). "Reaching training in rats with spinal cord injury promotes plasticity and task specific recovery." Brain 130(Pt 11): 2993-3003.
51. Giulian, D. (1993). "Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival." Glia 7(1): 102-110.
52. Goldberg, J. L. (2003). "How does an axon grow?" Genes Dev 17(8): 941-958.

53. Gonzenbach, R. R. and M. E. Schwab (2008). "Disinhibition of neurite growth to repair the injured adult CNS: focusing on Nogo." Cell Mol Life Sci 65(1): 161-176.
54. Guven, M., D. D. Elalmis, S. Binokay and U. Tan (2003). "Population-level right-paw preference in rats assessed by a new computerized food-reaching test." Int J Neurosci 113(12): 1675-1689.
55. Hagg, T. and M. Oudega (2006). "Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury." J Neurotrauma 23(3-4): 264-280.
56. Hall, E. D. and J. E. Springer (2004). "Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal." NeuroRx 1(1): 80-100.
57. Hamers, F. P., A. J. Lankhorst, T. J. van Laar, W. B. Veldhuis and W. H. Gispen (2001). "Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries." J Neurotrauma 18(2): 187-201.
58. Holmes, T. C., S. de Lacalle, X. Su, G. Liu, A. Rich and S. Zhang (2000). "Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds." Proc Natl Acad Sci U S A 97(12): 6728-6733.
59. Huang, H., L. Chen, H. Wang, H. Xi, C. Gou, J. Zhang, F. Zhang and Y. Liu (2006a). "Safety of fetal olfactory ensheathing cell transplantation in patients with chronic spinal cord injury. A 38-month follow-up with MRI." Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 20(4): 439-443.
60. Huang, H., L. Chen, H. Wang, B. Xiu, B. Li, R. Wang, J. Zhang, F. Zhang, Z. Gu, Y. Li, Y. Song, W. Hao, S. Pang and J. Sun (2003). "Influence of patients' age on functional recovery after transplantation of olfactory ensheathing cells into injured spinal cord injury." Chin Med J (Engl) 116(10): 1488-1491.
61. Huang, H., H. Wang, L. Chen, Z. Gu, J. Zhang, F. Zhang, Y. Song, Y. Li, K. Tan, Y. Liu and H. Xi (2006b). "Influence factors for functional improvement after olfactory

ensheathing cell transplantation for chronic spinal cord injury." Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 20(4): 434-438.

62. Hurlbert, R. J. (2000). "Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care." J Neurosurg 93(1 Suppl): 1-7.

63. Jacobs, W. B. and M. G. Fehlings (2003). "The molecular basis of neural regeneration." Neurosurgery 53(4): 943-948; discussion 948-950.

64. Joosten, E. A., P. R. Bar and W. H. Gispen (1995). "Collagen implants and cortico-spinal axonal growth after mid-thoracic spinal cord lesion in the adult rat." J Neurosci Res 41(4): 481-490.

65. Kataoka, K., Y. Suzuki, M. Kitada, T. Hashimoto, H. Chou, H. Bai, M. Ohta, S. Wu, K. Suzuki and C. Ide (2004). "Alginate enhances elongation of early regenerating axons in spinal cord of young rats." Tissue Eng 10(3-4): 493-504.

66. Kawaja, M. D. and F. H. Gage (1991). "Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor." Neuron 7(6): 1019-1030.

67. Kim, Y. T., J. M. Caldwell and R. V. Bellamkonda (2009). "Nanoparticle-mediated local delivery of Methylprednisolone after spinal cord injury." Biomaterials 30(13): 2582-2590.

68. Koopmans, G. C., R. Deumens, W. M. Honig, F. P. Hamers, H. W. Steinbusch and E. A. Joosten (2005). "The assessment of locomotor function in spinal cord injured rats: the importance of objective analysis of coordination." J Neurotrauma 22(2): 214-225.

69. Kunkel-Bagden, E., H. N. Dai and B. S. Bregman (1993). "Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats." Exp Neurol 119(2): 153-164.

70. Lakatos, A., S. C. Barnett and R. J. Franklin (2003). "Olfactory ensheathing cells induce less host astrocyte response and chondroitin sulphate proteoglycan

expression than Schwann cells following transplantation into adult CNS white matter." Exp Neurol 184(1): 237-246.

71. Lakatos, A., R. J. Franklin and S. C. Barnett (2000). "Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes." Glia 32(3): 214-225.

72. Li, Y., T. Carlstedt, C. H. Berthold and G. Raisman (2004). "Interaction of transplanted olfactory-ensheathing cells and host astrocytic processes provides a bridge for axons to regenerate across the dorsal root entry zone." Exp Neurol 188(2): 300-308.

73. Li, Y., P. M. Field and G. Raisman (1997). "Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells." Science 277(5334): 2000-2002.

74. Li, Y., P. M. Field and G. Raisman (1998). "Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells." J Neurosci 18(24): 10514-10524.

75. Liberto, C. M., P. J. Albrecht, L. M. Herx, V. W. Yong and S. W. Levison (2004). "Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes." J Neurochem 89(5): 1092-1100.

76. Lima, C., J. Pratas-Vital, P. Escada, A. Hasse-Ferreira, C. Capucho and J. D. Peduzzi (2006). "Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study." J Spinal Cord Med 29(3): 191-203; discussion 204-206.

77. Liu, Y., D. Kim, B. T. Himes, S. Y. Chow, T. Schallert, M. Murray, A. Tessler and I. Fischer (1999). "Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function." J Neurosci 19(11): 4370-4387.

78. Lu, P., L. L. Jones and M. H. Tuszynski (2007). "Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury." Exp Neurol 203(1): 8-21.

79. Mackay-Sim, A. (2005). "Olfactory ensheathing cells and spinal cord repair." Keio J Med 54(1): 8-14.
80. Mackay-Sim, A., F. Feron, J. Cochrane, L. Bassingthwaite, C. Bayliss, W. Davies, P. Fronek, C. Gray, G. Kerr, P. Licina, A. Nowitzke, C. Perry, P. A. Silburn, S. Urquhart and T. Geraghty (2008). "Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial." Brain 131(Pt 9): 2376-2386.
81. Mansour, H., A. Bignami, B. Labkovsky and D. Dahl (1989). "Neurofilament phosphorylation in neuronal perikarya following axotomy: a study of rat spinal cord with ventral and dorsal root transection." J Comp Neurol 283(4): 481-485.
82. Mattson, M. P., S. L. Chan and W. Duan (2002). "Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior." Physiol Rev 82(3): 637-672.
83. McDonald, J. W. and D. Becker (2003). "Spinal cord injury: promising interventions and realistic goals." Am J Phys Med Rehabil 82(10 Suppl): S38-49.
84. McKeon, R. J., R. C. Schreiber, J. S. Rudge and J. Silver (1991). "Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes." J Neurosci 11(11): 3398-3411.
85. McKerracher, L. and M. J. Winton (2002). "Nogo on the go." Neuron 36(3): 345-348.
86. Metz, G. A. and I. Q. Whishaw (2000). "Skilled reaching an action pattern: stability in rat (*Rattus norvegicus*) grasping movements as a function of changing food pellet size." Behav Brain Res 116(2): 111-122.
87. Miller, R. H., E. R. Abney, S. David, C. French-Constant, R. Lindsay, R. Patel, J. Stone and M. C. Raff (1986). "Is reactive gliosis a property of a distinct subpopulation of astrocytes?" J Neurosci 6(1): 22-29.

88. Mollers, S., I. Heschel, L. H. Damink, F. Schugner, R. Deumens, B. Muller, A. Bozkurt, J. G. Nava, J. Noth and G. A. Brook (2009). "Cytocompatibility of a novel, longitudinally microstructured collagen scaffold intended for nerve tissue repair." Tissue Eng Part A 15(3): 461-472.
89. Montoya, C. P., L. J. Campbell-Hope, K. D. Pemberton and S. B. Dunnett (1991). "The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats." J Neurosci Methods 36(2-3): 219-228.
90. Moon, L. D., J. L. Leasure, F. H. Gage and M. B. Bunge (2006). "Motor enrichment sustains hindlimb movement recovered after spinal cord injury and glial transplantation." Restor Neurol Neurosci 24(3): 147-161.
91. Nash, H. H., R. C. Borke and J. J. Anders (2002). "Ensheathing cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord." J Neurosci 22(16): 7111-7120.
92. Niclou, S. P., E. H. Franssen, E. M. Ehlert, M. Taniguchi and J. Verhaagen (2003). "Meningeal cell-derived semaphorin 3A inhibits neurite outgrowth." Mol Cell Neurosci 24(4): 902-912.
93. Nikkhah, G., C. Rosenthal, H. J. Hedrich and M. Samii (1998). "Differences in acquisition and full performance in skilled forelimb use as measured by the 'staircase test' in five rat strains." Behav Brain Res 92(1): 85-95.
94. Novikov, L. N., L. N. Novikova, A. Mosahebi, M. Wiberg, G. Terenghi and J. O. Kellerth (2002). "A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury." Biomaterials 23(16): 3369-3376.
95. Novikova, L. N., L. N. Novikov and J. O. Kellerth (2003). "Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury." Curr Opin Neurol 16(6): 711-715.

96. O'Toole, D. A., A. K. West and M. I. Chuah (2007). "Effect of olfactory ensheathing cells on reactive astrocytes in vitro." Cell Mol Life Sci 64(10): 1303-1309.
97. Oestreicher, A. B., P. N. De Graan, W. H. Gispen, J. Verhaagen and L. H. Schrama (1997). "B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system." Prog Neurobiol 53(6): 627-686.
98. Pence, S. (2002). "Paw preference in rats." J Basic Clin Physiol Pharmacol 13(1): 41-49.
99. Pettigrew, D. B., K. P. Shockley and K. A. Crutcher (2001). "Disruption of spinal cord white matter and sciatic nerve geometry inhibits axonal growth in vitro in the absence of glial scarring." BMC Neurosci 2: 8.
100. Plant, G. W., M. L. Bates and M. B. Bunge (2001). "Inhibitory proteoglycan immunoreactivity is higher at the caudal than the rostral Schwann cell graft-transected spinal cord interface." Mol Cell Neurosci 17(3): 471-487.
101. Prinjha, R., S. E. Moore, M. Vinson, S. Blake, R. Morrow, G. Christie, D. Michalovich, D. L. Simmons and F. S. Walsh (2000). "Inhibitor of neurite outgrowth in humans." Nature 403(6768): 383-384.
102. Radtke, C., M. Sasaki, K. L. Lankford, P. M. Vogt and J. D. Kocsis (2008). "Potential of olfactory ensheathing cells for cell-based therapy in spinal cord injury." J Rehabil Res Dev 45(1): 141-151.
103. Raineteau, O. and M. E. Schwab (2001). "Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury." Nat Rev Neurosci 2(4): 263-273.
104. Raisman, G. (2001). "Olfactory ensheathing cells - another miracle cure for spinal cord injury?" Nat Rev Neurosci 2(5): 369-375.
105. Ramon-Cueto, A. and J. Avila (1998). "Olfactory ensheathing glia: properties and function." Brain Res Bull 46(3): 175-187.

106. Ramon-Cueto, A., M. I. Cordero, F. F. Santos-Benito and J. Avila (2000). "Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia." Neuron 25(2): 425-435.
107. Ramon-Cueto, A. and M. Nieto-Sampedro (1992). "Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells." Neuroscience 47(1): 213-220.
108. Ramon-Cueto, A., G. W. Plant, J. Avila and M. B. Bunge (1998). "Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants." J Neurosci 18(10): 3803-3815.
109. Reier, P. J. (2004). "Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and translational neurobiology." NeuroRx 1(4): 424-451.
110. Ridet, J. L., S. K. Malhotra, A. Privat and F. H. Gage (1997). "Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function." Trends Neurosci 20(12): 570-577.
111. Rosenzweig, E. S. and J. W. McDonald (2004). "Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair." Curr Opin Neurol 17(2): 121-131.
112. Rossi, F., S. Gianola and L. Corvetti (2007). "Regulation of intrinsic neuronal properties for axon growth and regeneration." Prog Neurobiol 81(1): 1-28.
113. Rossignol, S., M. Schwab, M. Schwartz and M. G. Fehlings (2007). "Spinal cord injury: time to move?" J Neurosci 27(44): 11782-11792.
114. Rudge, J. S. and J. Silver (1990). "Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro." J Neurosci 10(11): 3594-3603.
115. Ruitenberg, M. J., G. W. Plant, C. L. Christensen, B. Blits, S. P. Niclou, A. R. Harvey, G. J. Boer and J. Verhaagen (2002). "Viral vector-mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord." Gene Ther 9(2): 135-146.

116. Ruitenbergh, M. J., G. W. Plant, F. P. Hamers, J. Wortel, B. Blits, P. A. Dijkhuizen, W. H. Gispen, G. J. Boer and J. Verhaagen (2003). "Ex vivo adenoviral vector-mediated neurotrophin gene transfer to olfactory ensheathing glia: effects on rubrospinal tract regeneration, lesion size, and functional recovery after implantation in the injured rat spinal cord." J Neurosci 23(18): 7045-7058.
117. Savio, T. and M. E. Schwab (1989). "Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth." J Neurosci 9(4): 1126-1133.
118. Savio, T. and M. E. Schwab (1990). "Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord." Proc Natl Acad Sci U S A 87(11): 4130-4133.
119. Schallert, T., S. M. Fleming, J. L. Leasure, J. L. Tillerson and S. T. Bland (2000). "CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury." Neuropharmacology 39(5): 777-787.
120. Schmidt, C. E. and J. B. Leach (2003). "Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration." Annu Rev Biomed Eng 5: 293-347.
121. Schmitt, A. B., S. Breuer, M. Voell, F. W. Schwaiger, C. Spitzer, K. Pech, G. A. Brook, J. Noth, G. W. Kreutzberg and W. Nacimiento (1999). "GAP-43 (B-50) and C-Jun are up-regulated in axotomized neurons of Clarke's nucleus after spinal cord injury in the adult rat." Neurobiol Dis 6(2): 122-130.
122. Schnell, L. and M. E. Schwab (1993). "Sprouting and regeneration of lesioned corticospinal tract fibres in the adult rat spinal cord." Eur J Neurosci 5(9): 1156-1171.
123. Schoof, H., J. Apel, I. Heschel and G. Rau (2001). "Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges." J Biomed Mater Res 58(4): 352-357.
124. Schwab, J. M., R. Beschorner, T. D. Nguyen, R. Meyermann and H. J. Schluesener (2001). "Differential cellular accumulation of connective tissue growth

factor defines a subset of reactive astrocytes, invading fibroblasts, and endothelial cells following central nervous system injury in rats and humans." J Neurotrauma 18(4): 377-388.

125. Schwab, M. E. (1998). "Regenerative Nerve Fiber Growth in the Adult Central Nervous System." News Physiol Sci 13: 294-298.

126. Schwab, M. E. (2002). "Repairing the injured spinal cord." Science 295(5557): 1029-1031.

127. Schwab, M. E. (2004). "Nogo and axon regeneration." Curr Opin Neurobiol 14(1): 118-124.

128. Schwab, M. E. and D. Bartholdi (1996). "Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord." Physiol Rev 76(2): 319-370.

129. Schwab, M. E. and P. Caroni (1988). "Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro." J Neurosci 8(7): 2381-2393.

130. Schwob, J. E. (2002). "Neural regeneration and the peripheral olfactory system." Anat Rec 269(1): 33-49.

131. Shearer, M. C. and J. W. Fawcett (2001). "The astrocyte/meningeal cell interface--a barrier to successful nerve regeneration?" Cell Tissue Res 305(2): 267-273.

132. Short, D. J., W. S. El Masry and P. W. Jones (2000). "High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective." Spinal Cord 38(5): 273-286.

133. Silver, J. and J. H. Miller (2004). "Regeneration beyond the glial scar." Nat Rev Neurosci 5(2): 146-156.

134. Skene, J. H. (1989). "Axonal growth-associated proteins." Annu Rev Neurosci 12: 127-156.

135. Sofroniew, M. V. (2005). "Reactive astrocytes in neural repair and protection." Neuroscientist 11(5): 400-407.
136. Stackhouse, S. K., M. Murray and J. S. Shumsky (2008). "Effect of cervical dorsolateral funiculotomy on reach-to-grasp function in the rat." J Neurotrauma 25(8): 1039-1047.
137. Steward, O., B. Zheng and M. Tessier-Lavigne (2003). "False resurrections: distinguishing regenerated from spared axons in the injured central nervous system." J Comp Neurol 459(1): 1-8.
138. Stichel, C. C. and H. W. Muller (1994). "Relationship between injury-induced astrogliosis, laminin expression and axonal sprouting in the adult rat brain." J Neurocytol 23(10): 615-630.
139. Stichel, C. C. and H. W. Muller (1998). "Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury." Prog Neurobiol 56(2): 119-148.
140. Stichel, C. C. and H. W. Müller (1998). "The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier." Cell Tissue Res 294(1): 1-9.
141. Stichel, C. C., H. Niermann, D. D'Urso, F. Lausberg, S. Hermanns and H. W. Muller (1999). "Basal membrane-depleted scar in lesioned CNS: characteristics and relationships with regenerating axons." Neuroscience 93(1): 321-333.
142. Suberviola, B., A. Gonzalez-Castro, J. Llorca, F. Ortiz-Melon and E. Minambres (2008). "Early complications of high-dose methylprednisolone in acute spinal cord injury patients." Injury 39(7): 748-752.
143. Takami, T., M. Oudega, M. L. Bates, P. M. Wood, N. Kleitman and M. B. Bunge (2002). "Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord." J Neurosci 22(15): 6670-6681.

144. Talac, R., J. A. Friedman, M. J. Moore, L. Lu, E. Jabbari, A. J. Windebank, B. L. Currier and M. J. Yaszemski (2004). "Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies." Biomaterials 25(9): 1505-1510.
145. Tator, C. H. (2002). "Strategies for recovery and regeneration after brain and spinal cord injury." Inj Prev 8 Suppl 4: IV33-36.
146. Thuret, S., L. D. Moon and F. H. Gage (2006). "Therapeutic interventions after spinal cord injury." Nat Rev Neurosci 7(8): 628-643.
147. Tillerson, J. L., A. D. Cohen, J. Philhower, G. W. Miller, M. J. Zigmond and T. Schallert (2001). "Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine." J Neurosci 21(12): 4427-4435.
148. Tysseling-Mattiace, V. M., V. Sahni, K. L. Niece, D. Birch, C. Czeisler, M. G. Fehlings, S. I. Stupp and J. A. Kessler (2008). "Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury." J Neurosci 28(14): 3814-3823.
149. Verhaagen, J., A. B. Oestreicher, W. H. Gispen and F. L. Margolis (1989). "The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats." J Neurosci 9(2): 683-691.
150. Vroemen, M. and N. Weidner (2003). "Purification of Schwann cells by selection of p75 low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve." J Neurosci Methods 124(2): 135-143.
151. Wang, Z. H., G. F. Walter and L. Gerhard (1996). "The expression of nerve growth factor receptor on Schwann cells and the effect of these cells on the regeneration of axons in traumatically injured human spinal cord." Acta Neuropathol 91(2): 180-184.
152. Watts, J. (2005). "Controversy in China." Lancet 365(9454): 109-110.

153. Wewetzer, K., E. Verdu, D. N. Angelov and X. Navarro (2002). "Olfactory ensheathing glia and Schwann cells: two of a kind?" Cell Tissue Res 309(3): 337-345.
154. Whishaw, I. Q. and B. Gorny (1996). "Does the red nucleus provide the tonic support against which fractionated movements occur? A study on forepaw movements used in skilled reaching by the rat." Behav Brain Res 74(1-2): 79-90.
155. Whishaw, I. Q., B. Gorny and J. Sarna (1998). "Paw and limb use in skilled and spontaneous reaching after pyramidal tract, red nucleus and combined lesions in the rat: behavioral and anatomical dissociations." Behav Brain Res 93(1-2): 167-183.
156. Whishaw, I. Q., N. C. Woodward, E. Miklyaeva and S. M. Pellis (1997). "Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies." Behav Brain Res 89(1-2): 167-177.
157. Wolpaw, J. R. (2007). "Spinal cord plasticity in acquisition and maintenance of motor skills." Acta Physiol (Oxf) 189(2): 155-169.
158. Wolpaw, J. R. and A. M. Tennissen (2001). "Activity-dependent spinal cord plasticity in health and disease." Annu Rev Neurosci 24: 807-843.
159. Xiang, S., W. Pan and A. J. Kastin (2005). "Strategies to create a regenerating environment for the injured spinal cord." Curr Pharm Des 11(10): 1267-1277.
160. Xu, X. M., A. Chen, V. Guenard, N. Kleitman and M. B. Bunge (1997). "Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord." J Neurocytol 26(1): 1-16.
161. Yick, L. W., W. Wu, K. F. So, H. K. Yip and D. K. Shum (2000). "Chondroitinase ABC promotes axonal regeneration of Clarke's neurons after spinal cord injury." Neuroreport 11(5): 1063-1067.

162. Yu, Z. F. and M. P. Mattson (1999). "Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: evidence for a preconditioning mechanism." J Neurosci Res 57(6): 830-839.

163. Zaman, K., H. Ryu, D. Hall, K. O'Donovan, K. I. Lin, M. P. Miller, J. C. Marquis, J. M. Baraban, G. L. Semenza and R. R. Ratan (1999). "Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin." J Neurosci 19(22): 9821-9830.

7 Anhang

7.1 Tabellen der statistischen Ausarbeitung

Zeit	Gruppe Läsion allein	Gruppe Spongostan	Gruppe MM allein	Gruppe MM+OHZ
<i>präoperativ</i>	MW: 14.9 SEM: 2.2 N = 5	MW: 16.33 SEM: 1.35 N = 4	MW: 17.52 SEM: 1.59 N = 7	MW: 19.04 SEM: 0.98 N = 12
<i>postOP 1</i>	MW: 0.2 SEM: 0.2 N = 5	MW: 0 SEM: 0 N = 4	MW: 0.14 SEM: 0.14 N = 7	MW: 0.33 SEM: 0.33 N = 12
<i>postOP 2</i>	MW: 0 SEM: 0 N = 5	MW: 0.25 SEM: 0.25 N = 4	MW: 3.14 SEM: 1.83 N = 7	MW: 2.45 SEM: 1.7 N = 11
<i>postOP 3</i>	MW: 0.6 SEM: 0.6 N = 5	MW: 1 SEM: 0.71 N = 4	MW: 5.43 SEM: 2.54 N = 7	MW: 4 SEM: 1.62 N = 12
<i>postOP 4</i>	MW: 2.4 SEM: 0.51 N = 5	MW: 1 SEM: 0.41 N = 4	MW: 6.57 SEM: 2.55 N = 7	MW: 5 SEM: 1.52 N = 12
<i>postOP 5</i>	MW: 0 SEM: 0 N = 5	MW: 4.25 SEM: 2.21 N = 4	MW: 7 SEM: 2.31 N = 7	MW: 4.92 SEM: 1.88 N = 12
<i>postOP 6</i>	MW: 0.8 SEM: 0.8 N = 5	MW: 5 SEM: 2.27 N = 4	MW: 6.29 SEM: 1.94 N = 7	MW: 6 SEM: 1.85 N = 12
<i>postOP 7</i>	MW: 1.2 SEM: 0.8 N = 5	MW: 5 SEM: 1.91 N = 4	MW: 10.5 SEM: 2.4 N = 6	MW: 6.82 SEM: 1.8 N = 12
<i>postOP 8</i>	MW: 0 SEM: 0 N = 5	MW: 5.75 SEM: 2.53 N = 4	MW: 9.29 SEM: 2.52 N = 7	MW: 7.17 SEM: 2.15 N = 12
<i>postOP 9</i>	MW: 0.8 SEM: 0.49 N = 5	MW: 7.25 SEM: 2.43 N = 4	MW: 13 SEM: 2.72 N = 6	MW: 7.33 SEM: 2.04 N = 12
<i>postOP 10</i>	MW: 1.4 SEM: 1.4 N = 5	MW: 7 SEM: 2.8 N = 4	MW: 10.71 SEM: 2.03 N = 7	MW: 7.75 SEM: 1.79 N = 12
<i>postOP 11</i>	MW: 1.2 SEM: 0.97 N = 5	MW: 5.75 SEM: 1.93 N = 4	MW: 12.57 SEM: 2.69 N = 7	MW: 8.75 SEM: 2.1 N = 12
<i>postOP 12</i>	MW: 2.6 SEM: 1.66 N = 5	MW: 5.75 SEM: 3.11 N = 4	MW: 12.43 SEM: 2.27 N = 7	MW: 7 SEM: 1.92 N = 12

Tab. 4: Aufgeführt sind die abs. gegriffenen FP im Staircase-Test präoperativ und über 12 Wochen postoperativ mit der linken Pfote innerhalb der 4 Gruppe. Diese Daten (MW $\pm$ SEM) präoperativ, postOP 1, 4, 8 und 12 wurden für die zweifaktorielle Varianzanalyse verwendet. Siehe auch Abs. 4.1.1.1, Graphik 2.

Zeit	Gruppe Läsion allein (N=5)	Gruppe Spongostan (N=4)	Gruppe MM allein (N=6)	Gruppe MM+OHZ (N=10)
<i>präoperativ</i>	MW: 44.18 SEM: 3.14	MW: 50.56 SEM: 4.34	MW: 44.63 SEM: 2.1	MW: 46.84 SEM: 2.04
<i>postOP 1</i>	MW: 61.43 SEM: 16.78	MW: 77.68 SEM: 4.39	MW: 62.07 SEM: 2.97	MW: 75.86 SEM: 4.06
<i>postOP 4</i>	MW: 63.33 SEM: 11.83	MW: 66.67 SEM: 0.86	MW: 51.12 SEM: 4.33	MW: 56.36 SEM: 6.68
<i>postOP 8</i>	MW: 40.48 SEM: 17.03	MW: 64.2 SEM: 5.06	MW: 56.95 SEM: 4.28	MW: 60.72 SEM: 3.84
<i>postOP 12</i>	MW: 63.11 SEM: 9.92	MW: 63.99 SEM: 4.9	MW: 62.98 SEM: 3.29	MW: 59.78 SEM: 3.1

Tab. 5: Aufgeführt sind die Kontaktraten mit der rechten Pfote im *Rearing*-Test. Diese Daten (MW $\pm$ SEM) wurden für die zweifaktorielle Varianzanalyse benutzt.

Zeit	Gruppe Läsion allein (N=5)	Gruppe Spongostan (N=4)	Gruppe MM allein (N=6)	Gruppe MM+OHZ (N=10)
<i>präoperativ</i>	MW: 42.99 SEM: 2.56	MW: 41.27 SEM: 3.14	MW: 46.09 SEM: 1.79	MW: 44.62 SEM: 1.6
<i>postOP 1</i>	MW: 11.73 SEM: 6.13	MW: 21.71 SEM: 4.67	MW: 31.33 SEM: 4.23	MW: 23.79 SEM: 4.47
<i>postOP 4</i>	MW: 30.22 SEM: 9.09	MW: 30.6 SEM: 1.4	MW: 33.59 SEM: 3.98	MW: 28.49 SEM: 3.83
<i>postOP 8</i>	MW: 18.81 SEM: 9.27	MW: 34.55 SEM: 5.34	MW: 34.55 SEM: 3.95	MW: 30.08 SEM: 2.79
<i>postOP 12</i>	MW: 30.32 SEM: 8.2	MW: 29.13 SEM: 3.76	MW: 31.5 SEM: 3.47	MW: 30.98 SEM: 2.39

Tab. 6: Aufgeführt sind die Kontaktraten mit der linken Pfote im *Rearing*-Test. Diese Daten (MW $\pm$ SEM) wurden für die zweifaktorielle Varianzanalyse benutzt.

Zeit	Gruppe Läsion allein (N=5)	Gruppe Spongostan (N=4)	Gruppe MM allein (N=6)	Gruppe MM+OHZ (N=10)
<i>präoperativ</i>	MW: 12.83 SEM: 1.09	MW: 8.17 SEM: 1.72	MW: 9.29 SEM: 0.72	MW: 8.55 SEM: 0.74
<i>postOP 1</i>	MW: 6.83 SEM: 3.39	MW: 0.61 SEM: 0.61	MW: 6.6 SEM: 1.78	MW: 2.7 SEM: 0.9
<i>postOP 4</i>	MW: 6.44 SEM: 4.39	MW: 2.73 SEM: 1.01	MW: 15.29 SEM: 2.84	MW: 5.15 SEM: 1.05
<i>postOP 8</i>	MW: 20.71 SEM: 9.48	MW: 1.25 SEM: 0.73	MW: 8.5 SEM: 2.54	MW: 9.2 SEM: 3.6
<i>postOP 12</i>	MW: 6.56 SEM: 2.81	MW: 6.88 SEM: 1.23	MW: 5.53 SEM: 1.16	MW: 9.24 SEM: 2.33

Tab. 7: Aufgeführt sind die Kontaktraten mit den Pfoten simultan im *Rearing*-Test. Diese Daten (MW $\pm$ SEM) wurde für die zweifaktorielle Varianzanalyse benutzt.

Zeit	Gruppe Läsion allein (N=5)	Gruppe Spongostan (N=4)	Gruppe MM allein (N=6)	Gruppe MM+OHZ (N=10)
<i>präoperativ</i>	MW: 22.96 SEM: 3.14	MW: 35.07 SEM: 3.8	MW: 33.85 SEM: 2.15	MW: 32.34 SEM: 2.84
<i>postOP 1</i>	MW: 36.57 SEM: 18.37	MW: 51.39 SEM: 3.23	MW: 68.71 SEM: 12.23	MW: 45.55 SEM: 5.85
<i>postOP 4</i>	MW: 6.67 SEM: 6.67	MW: 53.22 SEM: 12.89	MW: 50.43 SEM: 14.12	MW: 39.01 SEM: 6.33
<i>postOP 8</i>	MW: 46.67 SEM: 22.61	MW: 19.64 SEM: 11.43	MW: 49.11 SEM: 14.47	MW: 29.41 SEM: 7.15
<i>postOP 12</i>	MW: 68.22 SEM: 16.40	MW: 66.07 SEM: 12.84	MW: 28.29 SEM: 13.41	MW: 47.66 SEM: 11.31

Tab. 8: Aufgeführt sind die Landeraten mit der rechten Pfote im *Rearing*-Test. Diese Daten (MW $\pm$ SEM) wurden für die zweifaktorielle Varianzanalyse benutzt.

Zeit	Gruppe Läsion allein (N=5)	Gruppe Spongostan (N=4)	Gruppe MM allein (N=6)	Gruppe MM+OHZ (N=10)
<i>präoperativ</i>	MW: 34.59 SEM: 5.83	MW: 30.14 SEM: 4.89	MW: 29.63 SEM: 1.87	MW: 29.04 SEM: 3.02
<i>postOP 1</i>	MW: 12.57 SEM: 8.51	MW: 35.12 SEM: 7.74	MW: 5.56 SEM: 4.12	MW: 34.45 SEM: 10.22
<i>postOP 4</i>	MW: 16.67 SEM: 10.54	MW: 31.44 SEM: 17.72	MW: 33.75 SEM: 14.23	MW: 27.13 SEM: 4.97
<i>postOP 8</i>	MW: 6.67 SEM: 6.67	MW: 44.64 SEM: 20.7	MW: 32.45 SEM: 11.71	MW: 43.51 SEM: 8.19
<i>postOP 12</i>	MW: 15.11 SEM: 6.57	MW: 14.29 SEM: 10.1	MW: 38.51 SEM: 13.26	MW: 29.37 SEM: 7.04

Tab. 9: Aufgeführt sind die Landeraten mit der linken Pfote im *Rearing*-Test. Diese Daten (MW $\pm$ SEM) wurden für die zweifaktorielle Varianzanalyse benutzt.

Zeit	Gruppe Läsion allein (N=5)	Gruppe Spongostan (N=4)	Gruppe MM allein (N=6)	Gruppe MM+OHZ (N=10)
<i>präoperativ</i>	MW: 42.46 SEM: 4.08	MW: 34.79 SEM: 5.71	MW: 36.52 SEM: 3.38	MW: 38.62 SEM: 3.05
<i>postOP 1</i>	MW: 30.86 SEM: 18.77	MW: 13.49 SEM: 5.89	MW: 25.73 SEM: 12.26	MW: 20 SEM: 6.75
<i>postOP 4</i>	MW: 56.67 SEM: 16.33	MW: 15.34 SEM: 9.16	MW: 15.82 SEM: 6.51	MW: 23.87 SEM: 4.99
<i>postOP 8</i>	MW: 26.67 SEM: 19.44	MW: 10.72 SEM: 6.84	MW: 18.44 SEM: 6.21	MW: 27.09 SEM: 5.17
<i>postOP 12</i>	MW: 16.67 SEM: 10.54	MW: 19.65 SEM: 10.66	MW: 33.2 SEM: 13.81	MW: 22.97 SEM: 5.22

Tab. 10: Aufgeführt sind die Landeraten mit den Pfoten simultan im *Rearing*-Test. Diese Daten (MW $\pm$ SEM) wurden für die zweifaktorielle Varianzanalyse benutzt. Tab. 5-10, siehe auch Abs. 4.1.2.1 und Graphik 4.

7. Anhang

Table Analyzed	Kontaktrate rechts			
Two-way RM ANOVA	Matching by cols			
Source of Variation	% of total variation	P value		
Interaction	6,35	0,5454		
Time	16,35	P<0.0001		
Group	3,90	0,3118		
Subjects (matching)	21,5648	0,0377		
Source of Variation	P value summary	Significant?		
Interaction	ns	No		
Time	***	Yes		
Group	ns	No		
Subjects (matching)	*	Yes		
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	12	2500	200	0,91
Time	4	6300	1600	7,0
Group	3	1500	500	1,3
Subjects (matching)	21	8300	400	1,8
Residual	84	19000	230	
Number of missing values	0			

Table Analyzed	Kontaktrate links			
Two-way RM ANOVA	Matching by cols			
Source of Variation	% of total variation	P value		
Interaction	5,04	0,2622		
Time	25,75	P<0.0001		
Gruppe	4,78	0,4136		
Subjects (matching)	33,5914	P<0.0001		
Source of Variation	P value summary	Significant?		
Interaction	ns	No		
Time	***	Yes		
Gruppe	ns	No		
Subjects (matching)	***	Yes		
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	12	1063	88,54	1,253
Time	4	5424	1356	19,19
Gruppe	3	1008	335,8	0,9969
Subjects (matching)	21	7075	336,9	4,767
Residual	84	5936	70,67	
Number of missing values	0			

7. Anhang

Table Analyzed	Kontaktrate simultan			
Two-way RM ANOVA	Matching by cols			
Source of Variation	% of total variation	P value		
Interaction	14,98	0,0465		
Time	6,60	0,0481		
Gruppe	7,97	0,0233		
Subjects (matching)	14,3174	0,4333		
Source of Variation	P value summary	Significant?		
Interaction	*	Yes		
Time	*	Yes		
Gruppe	*	Yes		
Subjects (matching)	ns	No		
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	12	1103	91,94	1,894
Time	4	486,5	121,6	2,506
Gruppe	3	586,9	195,6	3,895
Subjects (matching)	21	1055	50,22	1,035
Residual	84	4077	48,54	
Number of missing values	0			
Bonferroni posttests				
Läsion allein vs Spog Gruppe	Läsion allein	Spog	Difference	95% CI of diff.
präOP	12,83	8,168	-4,662	-19.80 to 10.47
1	6,832	0,6100	-6,222	-21.36 to 8.914
4	6,444	2,728	-3,717	-18.85 to 11.42
8	20,71	1,250	-19,46	-34.60 to -4.328
12	6,564	6,878	0,3135	-14.82 to 15.45
Gruppe	Difference	t	P value	Summary
präOP	-4,662	0,9942	P > 0.05	ns
1	-6,222	1,327	P > 0.05	ns
4	-3,717	0,7925	P > 0.05	ns
8	-19,46	4,150	P<0.001	***
12	0,3135	0,06685	P > 0.05	ns
Läsion allein vs MM allein Gruppe	Läsion allein	MM allein	Difference	95% CI of diff.
präOP	12,83	9,287	-3,543	-17.21 to 10.12
1	6,832	6,602	-0,2303	-13.89 to 13.43
4	6,444	15,29	8,844	-4.818 to 22.51
8	20,71	8,503	-12,21	-25.87 to

7. Anhang

12	6,564	5,525	-1,039	1.452 -14.70 to 12.62
Gruppe	Difference	t	P value	Summary
präOP	-3,543	0,8370	P > 0.05	ns
1	-0,2303	0,05441	P > 0.05	ns
4	8,844	2,089	P > 0.05	ns
8	-12,21	2,884	P < 0.05	*
12	-1,039	0,2454	P > 0.05	ns
Läsion allein vs MM+OHZ Gruppe	Läsion allein	MM+OHZ	Difference	95% CI of diff.
präOP	12,83	8,551	-4,279	-16.64 to 8.079
1	6,832	2,704	-4,128	-16.49 to 8.230
4	6,444	5,151	-1,293	-13.65 to 11.07
8	20,71	9,201	-11,51	-23.87 to 0.8451
12	6,564	9,242	2,678	-9.680 to 15.04
Gruppe	Difference	t	P value	Summary
präOP	-4,279	1,118	P > 0.05	ns
1	-4,128	1,078	P > 0.05	ns
4	-1,293	0,3377	P > 0.05	ns
8	-11,51	3,007	P < 0.05	*
12	2,678	0,6994	P > 0.05	ns
Spog vs MM allein Gruppe	Spog	MM allein	Difference	95% CI of diff.
präOP	8,168	9,287	1,119	-13.45 to 15.68
1	0,6100	6,602	5,992	-8.573 to 20.56
4	2,728	15,29	12,56	-2.003 to 27.13
8	1,250	8,503	7,253	-7.311 to 21.82
12	6,878	5,525	-1,353	-15.92 to 13.21
Gruppe	Difference	t	P value	Summary
präOP	1,119	0,2480	P > 0.05	ns
1	5,992	1,328	P > 0.05	ns
4	12,56	2,783	P < 0.05	*
8	7,253	1,607	P > 0.05	ns
12	-1,353	0,2997	P > 0.05	ns
Spog vs MM+OHZ Gruppe	Spog	MM+OHZ	Difference	95% CI of diff.
präOP	8,168	8,551	0,3835	-12.96 to 13.73

7. Anhang

1	0,6100	2,704	2,094	-11.25 to 15.44
4	2,728	5,151	2,424	-10.92 to 15.77
8	1,250	9,201	7,951	-5.397 to 21.30
12	6,878	9,242	2,365	-10.98 to 15.71

Gruppe	Difference	t	P value	Summary
präOP	0,3835	0,09273	P > 0.05	ns
1	2,094	0,5063	P > 0.05	ns
4	2,424	0,5860	P > 0.05	ns
8	7,951	1,922	P > 0.05	ns
12	2,365	0,5717	P > 0.05	ns

MM allein vs
MM+OHZ

Gruppe	MM allein	MM+OHZ	Difference	95% CI of diff.
präOP	9,287	8,551	-0,7357	-12.39 to 10.92
1	6,602	2,704	-3,898	-15.55 to 7.754
4	15,29	5,151	-10,14	-21.79 to 1.514
8	8,503	9,201	0,6977	-10.95 to 12.35
12	5,525	9,242	3,717	-7.934 to 15.37

Gruppe	Difference	t	P value	Summary
präOP	-0,7357	0,2038	P > 0.05	ns
1	-3,898	1,080	P > 0.05	ns
4	-10,14	2,808	P < 0.05	*
8	0,6977	0,1933	P > 0.05	ns
12	3,717	1,030	P > 0.05	ns

Table Analyzed

Landerate rechts

Two-way RM ANOVA

Matching by cols

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	16,92	0,0074
Time	7,88	0,0109
Gruppe	1,89	0,6859
Subjects (matching)	26,4537	0,0052

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	**	Yes
Time	*	Yes
Gruppe	ns	No
Subjects (matching)	**	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	12	17190	1432	2,499
Time	4	8011	2003	3,495
Gruppe	3	1922	640,7	0,5006

7. Anhang

Subjects (matching)	21	26880	1280	2,233
Residual	84	48140	573,1	

Number of missing values 0

Table Analyzed **Landerate links**

Two-way RM ANOVA Matching by cols

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	11,79	0,1124
Time	2,24	0,4660
Gruppe	6,04	0,2370
Subjects (matching)	27,7224	0,0083

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Time	ns	No
Gruppe	ns	No
Subjects (matching)	**	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	12	8303	691,9	1,583
Time	4	1579	394,9	0,9031
Gruppe	3	4254	1418	1,526
Subjects (matching)	21	19520	929,3	2,126
Residual	84	36730	437,2	

Number of missing values 0

Table Analyzed **Landerate simultan**

Two-way RM ANOVA Matching by cols

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	8,87	0,3895
Time	6,84	0,0491
Group	4,44	0,2686
Subjects (matching)	22,0704	0,0885

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Time	*	Yes
Group	ns	No
Subjects (matching)	ns	No

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	12	5704	475,4	1,077

7. Anhang

Time	4	4400	1100	2,493
Group	3	2853	951,2	1,407
Subjects (matching)	21	14200	676,1	1,532
Residual	84	37070	441,3	
Number of missing values	0			

Tab. 11: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse.

Gruppen	Median (IQA)				p-Wert; U-Wert
	<i>Läsion allein</i> (N=5)	<i>Spongostan</i> (N=4)	<i>MM allein</i> (N=4)	<i>MM+OHZ</i> (N=8)	
<i>Läsion allein vs. MM allein</i>	3.44 (4.725)		8.44 (5.92)		p=0.111; U=3
<i>Läsion allein vs. MM+OHZ</i>	3.44 (4.725)			12.17 (7.22)	p= 0.0031 ; U=1
<i>Spongostan vs. MM allein</i>		4.22 (4.168)	8.44 (5.92)		p= 0.0286 ; U=0
<i>Spongostan vs. MM+OHZ</i>		4.22 (4.168)		12.17 (7.22)	p= 0.0172 ; U=1.5
<i>MM allein vs. MM+OHZ</i>			8.44 (5.92)	12.17 (7.22)	p=0.2019; U=8
<i>Läsion allein vs. Spongostan</i>	3.44 (4.725)	4.22 (4.168)			p=1; U=10

Tab. 12: Vergleich der Gruppen untereinander hinsichtlich der Gap-43-positiven Profile insgesamt (Abs. 4.2.2.1).

Gruppen	Median (IQA)				p-Wert; U-Wert
	<i>Läsion allein</i> (N=5)	<i>Spongostan</i> (N=4)	<i>MM allein</i> (N=4)	<i>MM+OHZ</i> (N=8)	
<i>Läsion allein vs. MM allein</i>	8 (10.335)		5.89 (9.417)		p=0.9048; U=9
<i>Läsion allein vs. MM+OHZ</i>	8 (10.335)			11 (10.527)	p=0.162; U=10
<i>Spongostan vs. MM allein</i>		10.45 (10.03)	5.89 (9.417)		p=0.4857; U=5
<i>Spongostan vs. MM+OHZ</i>		10.45 (10.03)		11 (10.527)	p=0.6828; U=13
<i>MM allein vs. MM+OHZ</i>			5.89 (9.417)	11 (10.527)	p=0.1091; U=6
<i>Läsion allein vs. Spongostan</i>	8 (10.335)	10.45 (10.03)			p=0.9048; U=9

Tab. 13: Vergleich der Gruppen untereinander hinsichtlich der NF200-positiven Axone insgesamt (Abs. 4.2.2.1).

Gruppe	Median (IQA)			N
	dorsal	mitte	ventral	
<i>Läsion allein</i>	4.67 (8.165)	1.33 (7.665)	3.67 (5.665)	5
<i>Spongostan</i>	2.335 (5.9175)	6.165 (6.583)	1.165 (5.3325)	4
<i>MM allein</i>	7.17 (19.255)	8 (6.912)	7.165 (5.58)	4
<i>MM+OHZ</i>	16.33 (9.495)	9.665 (14.92)	9.835 (18.505)	8

Gruppe	Vergleich	p-Wert; W-Wert
<i>Läsion allein (N=5)</i>	dorsal vs. mitte	p=0.0625; W=15
	dorsal vs. ventral	p=0.625; W=5
	mitte vs. ventral	p=0.8125; W=-3
<i>Spongostan (N=4)</i>	dorsal vs. mitte	p=0.25; W=-8
	dorsal vs. ventral	p=0.875; W=-2
	mitte vs. ventral	p=0.625; W=4
<i>MM allein (N=4)</i>	dorsal vs. mitte	p=1; W=0
	dorsal vs. ventral	p=0.7127; W=3
	mitte vs. ventral	p=0.625; W=4
<i>MM+OHZ (N=8)</i>	dorsal vs. mitte	p=0.1953; W=20
	dorsal vs. ventral	p=0.7422; W=6
	mitte vs. ventral	p=0.4609; W=-12

Tab. 14: Gap-43 positive-Fasern in den Schnittebenen (s. Abs. 4.2.2.2).

Gruppe	Median (IQA)			N
	dorsal	mitte	ventral	
<i>Läsion allein</i>	10.33 (7.005)	4 (10.005)	9.67 (14.34)	5
<i>Spongostan</i>	2.33 (7.752)	18.84 (17.835)	6.835 (13.172)	4
<i>MM allein</i>	5.165 (14.17)	1.5 (11.09)	7.17 (8.005)	4
<i>MM+OHZ</i>	12.33 (12.673)	12 (15)	15.17 (15.837)	8

Gruppe	Vergleich	p-Wert; W-Wert
<i>Läsion allein (N=5)</i>	dorsal vs. mitte	p=0.3125; W=9
	dorsal vs. ventral	p=1; W=1
	mitte vs. ventral	p=0.5879; W=-5
<i>Spongostan (N=4)</i>	dorsal vs. mitte	p=0.25; W=-8
	dorsal vs. ventral	p=0.375; W=-6
	mitte vs. ventral	p=0.25; W=-8
<i>MM allein (N=4)</i>	dorsal vs. mitte	p=1; W=0
	dorsal vs. ventral	p=0.875; W=-2
	mitte vs. ventral	p=0.375; W=-6
<i>MM+OHZ (N=8)</i>	dorsal vs. mitte	p=0.7422; W=6
	dorsal vs. ventral	p=0.9453; W=-2
	mitte vs. ventral	p=0.1953; W=-20

Tab. 15: NF200-positive Axone in den Schnittebenen (s. Abs. 4.2.2.3).

Gruppe	Median (IQA)			N
	<i>kranial</i>	<i>mitte</i>	<i>kaudal</i>	
<i>Läsion allein</i>	2 (5.17)	2 (7.5)	4.67 (6)	5
<i>Spongostan</i>	4.165 (5.33)	2.665 (3.4155)	5 (4.58)	4
<i>MM allein</i>	14 (8.247)	4.835 (10.67)	8.33 (5.503)	4
<i>MM+OHZ</i>	18.17 (14.66)	10.17 (9.007)	12.34 (7.5)	8

Gruppe	Vergleich	p-Wert; W-Wert
<i>Läsion allein (N=5)</i>	kranial vs. kaudal	p=0.2785; W=-9
	kranial vs. mitte	p=0.3125; W=-9
	mitte vs. kaudal	p=1; W=-1
<i>Spongostan (N=4)</i>	kranial vs. kaudal	p=1; W=-1
	kranial vs. mitte	p=0.0975; W=10
	mitte vs. kaudal	p=0.0975; W=-10
<i>MM allein (N=4)</i>	kranial vs. kaudal	p=0.1975; W=8
	kranial vs. mitte	p=0.25; W=6
	mitte vs. kaudal	p=0.5807; W=-4
<i>MM+OHZ (N=8)</i>	kranial vs. kaudal	p=0.0547; W=28
	kranial vs. mitte	p=0.0391 ; W=30
	mitte vs. kaudal	p=0.8438; W=-4

Tab. 16: Gap-43-positive Profile innerhalb der 3 Positionen (s. Abs. 4.2.2.4).

Gruppe	Median (IQA)			N
	<i>kranial</i>	<i>mitte</i>	<i>kaudal</i>	
<i>Läsion allein</i>	4 (9.165)	6.33 (11.005)	12 (11.665)	5
<i>Spongostan</i>	12.14 (14.667)	7.665 (9.332)	10.5 (10.912)	4
<i>MM allein</i>	7.67 (11.75)	4.165 (7.167)	3.67 (11.502)	4
<i>MM+OHZ</i>	14.67 (13.583)	12.83 (12.67)	11.83 (10.5)	8

Gruppe	Vergleich	p-Wert; W-Wert
<i>Läsion allein (N=5)</i>	kranial vs. kaudal	p=0.0625; W=-15
	kranial vs. mitte	p=0.125; W=-13
	mitte vs. kaudal	p=0.6845; W=4
<i>Spongostan (N=4)</i>	kranial vs. kaudal	p=0.75; W=2
	kranial vs. mitte	p=0.625; W=4
	mitte vs. kaudal	p=0.5; W=-4
<i>MM allein (N=4)</i>	kranial vs. kaudal	p=0.625; W=4
	kranial vs. mitte	p=0.0975; W=10
	mitte vs. kaudal	p=0.875; W=-2
<i>MM+OHZ (N=8)</i>	kranial vs. kaudal	p=0.2188; W=16
	kranial vs. mitte	p=0.1094; W=20
	mitte vs. kaudal	p=1; W=1

Tab. 17: NF200-positive Axone innerhalb der Positionen (s. Abs. 4.2.2.5).

Gruppen	Median (IQA)			p-Wert; U-Wert
	<i>Spongostan (N=4)</i>	<i>MM allein (N=4)</i>	<i>MM+OHZ (N=8)</i>	
<i>Spongostan vs. MM allein</i>	14.02 (3.02)	10.09 (2.85)		p=0.0286; U=0
<i>Spongostan vs. MM+OHZ</i>	14.02 (3.02)		10.52 (4.513)	P=0.1535; U=7
<i>MM allein vs. MM+OHZ</i>		10.09 (2.85)	10.52 (4.513)	P=0.3677; U10

Tab. 18: Vergleich der 3 Gruppen hinsichtlich der reaktiven Astrozytose insgesamt (s. Abs. 4.2.2.6).

Gruppen	Median (IQA)				p-Wert; U-Wert
	<i>Läsion allein</i> (N=5)	<i>Spongostan</i> (N=4)	<i>MM allein</i> (N=4)	<i>MM+OHZ</i> (N=8)	
<i>Läsion allein vs. MM allein</i>	26.46 (5.45)		23.2 (4.05)		p=0.1905; U=4
<i>Läsion allein vs. MM+OHZ</i>	26.46 (5.45)			24.10 (4.62)	p=0.5237; U=15
<i>Spongostan vs. MM allein</i>		30.62 (5.56)	23.2 (4.05)		p= 0.0286 ; U=0
<i>Spongostan vs. MM+OHZ</i>		30.62 (5.56)		24.10 (4.62)	p= 0.0162 ; U=2
<i>MM allein vs. MM+OHZ</i>			23.2 (4.05)	24.10 (4.62)	p=0.2828; U=9
<i>Läsion allein vs. Spongostan</i>	26.46 (5.45)	30.62 (5.56)			p=0.1905; U=4

Tab. 19: Vergleich der Gruppen untereinander hinsichtlich der reaktiven Astrozytose an der Grenze zwischen Läsion bzw. Implantat zum nativen RM (s. Abs. 4.2.2.6).

Gruppen	Median (IQA)			p-Wert; U-Wert
	<i>Spongostan</i> (N=4)	<i>MM allein</i> (N=4)	<i>MM+OHZ</i> (N=8)	
<i>Spongostan vs. MM allein</i>	1.880 (2.2032)	1.140 (3.8525)		p=0.6857; U=6
<i>Spongostan vs. MM+OHZ</i>	1.880 (2.2032)		1.692 (3.925)	P=0.6828; U=13
<i>MM allein vs. MM+OHZ</i>		1.140 (3.8525)	1.692 (3.925)	P=0.6828; U=13

Tab. 20: Reaktive Astrozytose innerhalb des Spongostan bzw. MM insgesamt (s. Abs. 4.2.2.6).

Gruppe	Median (IQA)			N
	<i>kranial</i>	<i>mitte</i>	<i>kaudal</i>	
<i>Spongostan</i>	2.775 (4.4405)	0.895 (1.6155)	1.59 (1.6925)	4
<i>MM allein</i>	2.685 (7.7405)	0.32 (1.2455)	0.415 (2.895)	4
<i>MM+OHZ</i>	2.595 (7.055)	1.165 (2.4475)	1.635 (4.68)	8

Gruppe	Vergleich	p-Wert; W-Wert
<i>Spongostan (N=4)</i>	kranial vs. kaudal	p=0.375; W=6
	kranial vs. mitte	p=0.25; W=6
	mitte vs. kaudal	p=0.375; W=-6
<i>MM allein (N=4)</i>	kranial vs. kaudal	p=0.125; W=10
	kranial vs. mitte	p=0.125; W=10
	mitte vs. kaudal	p=0.625; W=-4
<i>MM+OHZ (N=8)</i>	kranial vs. kaudal	p=0.5469; W=10
	kranial vs. mitte	p= 0.0234 ; W=32
	mitte vs. kaudal	p=0.0547; W=-28

Tab. 21: Vergleich der 3 Positionen (kranial/mitte/kaudal) innerhalb der Gruppen in der Matrix bzw. im Spongostan-Schwamm (s. Abs. 4.2.2.6).

7.2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABD	<i>Antibody Diluent</i>
Abs.	Abschnitt
AK	Antikörper
ANOVA, <i>rm</i>	<i>analysis of variance, repeated measure</i>
BDNF	<i>brain-derived-neurotrophic factor</i>
bes.	besonders
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglycane
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
d	Tag
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DF	Dunkelfeld
EZM	extrazelluläre Matrix
FP	Futterpellet
g	Gramm
Gap-43	<i>Growth-associated Protein 43</i>
GFAP	Gliales Fibrilläres Saures Protein
HW	Hinterwurzel
i.p.	intraperitoneal
IQA	Interquartilsabstand
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Läsion
LM	Lichtmikroskopie
M	Mol
<i>M.</i>	<i>Musculus</i>
Map-2	Mikrotubuli-assoziierte Protein 2
mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter

MM	Matricel-Matrix
MM+OHZ	Matricel-Matrix mit OHZ
MP	Methylprednisolon
MS	Microsoft
MW	Mittelwert
N.	<i>Nervus</i>
NF200	Neurofilament 200
<i>NgtS</i>	<i>normal goat Serum</i>
OEC	<i>Olfactory ensheathing cells</i>
o.g.	oben genannte
OHZ	Olfaktorische Hüllzellen
OP	Operation
OT	Objektträger
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PNS	peripheres Nervensystem
postOP	postoperativ
RM	Rückenmark
SEM	Standardfehler
s.o.	siehe oben
sog.	so genannte/r
Spong	Spongostan
s.s.	statistisch signifikant
s.u.	siehe unten
SZ	Schwann-Zelle
Tab.	Tabelle
TF	Trockenfutter
<i>Tr.</i>	<i>Tractus</i>
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vs.	<i>versus</i>
VCR	Videokamera
W	Woche(n)
ZNS	zentrales Nervensystem

7.3 Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. rer. nat. Gary A. Brook für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung meiner Dissertation. Ich danke ihm ferner dafür, dass er sich immer für mich und unsere anregenden Diskussionen, meine Fragen und Ideen Zeit nahm. Ich werde unsere fruchtbaren wissenschaftlichen Unterhaltungen wirklich sehr vermissen. Ich bewundere seine immer professionelle, kompetente und logische Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen und hoffe diese mir im Laufe der Jahre angeeignet zu haben. Ich habe während dieser Zeit viel von ihm hinsichtlich des wissenschaftlichen Arbeitens und kritischen Denkens gelernt. Aber vor allem bewundert habe ich immer wieder seine Fähigkeit, sich sehr über kleine Ergebnisse und Fortschritte zu freuen und sich am Mikroskop zu wundern. Ich werde einen Grundsatz nicht vergessen: Auch zu keinem erwünschten/erwarteten Ergebnis zu gelangen, ist ein Ergebnis. Es ist selten, in Zeiten des Publikationsdruckes und *Journal Impact Factors* ordentliche und „saubere“ Forschung zu betreiben, den Spaß an der Sache beizubehalten und dem Interesse nachzugehen, „was die Welt im Innersten zusammenhält“, gerade in der Medizin. Ich wünsche mir, in Zukunft weitere Projekte mit Herrn Dr. Brook durchführen zu können, denn mit ihm ist es möglich „saubere“, sachliche und spannende Forschung zu betreiben und äußerst komplexe Sachverhalte ein kleines Stückchen – Schritt für Schritt – zu lüften.

Herrn Dekan und Professor Dr. med. J. Noth danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen, ebenso für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Instrumente.

Ich bedanke mich ebenso bei Herrn Dr. rer. nat. S. Möllers, der mich besonders zu Beginn meiner Arbeit tatkräftig unterstützte und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Herr Dr. rer. nat. S. Stanzel vom Institut für Medizinische Statistik der RWTH Aachen danke ich für die unerschöpflichen Anregungen und Korrekturen des Statistikeils. Herrn Dr. rer. nat. R. Deumens (Universität Maastricht, NL) danke ich ebenso für die Unterstützung bei der statistischen Ausarbeitung.

Herrn J. Gerardo danke ich für die Unterstützung bei der Immunfluoreszenz und Herrn T. Führmann für die Beschaffung spezieller Publikationen.

Ich danke auch Herrn PD Dr. med. Sellhaus, obgleich ich ihn nicht näher kenne, denn er hat mich an Herrn Dr. Brook verwiesen. Dadurch erhielt ich die Möglichkeit, an diesem Projekt zu arbeiten und ihn näher kennen zu lernen.

Dem MTA-Laborteam ist mein besonderer Dank gewidmet. Ich danke herzlich für die Beantwortung meiner Fragen, für das geduldige Anlernen und das Training der Immunfluoreszenz-, DAB-Färbung und das Immunfluoreszenzmikroskopieren: Den Damen H. Kreuzkamp, C. Beckmann, K. Pech und S. Lecouturier. Ich danke auch dem Pflegepersonal des Institutes für Tierversuchskunde (RWTH Aachen) für die exzellente Kooperation. Die dortige Tierpflege besitzt meine tiefe Anerkennung.

Weiterhin bedanke ich mich bei den folgenden Personen. Diese werden den Grund für meine tiefe Dankbarkeit ohne Erklärung kennen:

Dres. med. M. Kever, V. Kuhl, H. Knott, J. S. P. Salgado, A. Jöres, P. Boor, T. I. Gerstung, L. Siam und T. Pukrop.

Ein großer Dank gilt Frau K. Schröer und Herrn Oberarzt Dr. med. J. Schröer (Abteilung Neurochirurgie EvKB) für die mühsame und aufwändige Endkorrektur.

Mit größtem Respekt und in tiefer Anerkennung danke ich den Versuchsratten und grundsätzlich allen Versuchstieren. Diese haben und hatten nie die Wahl.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner lieben Familie für die unerschöpfliche Unterstützung, für die Kraft und ihre warme Liebe, die sie mir so großzügig gespendet hat und spendet, danken. Ich danke für die bedingungslose Geduld und ihre Toleranz, die sie aufgebracht hat, da ich wegen meiner Laborarbeit immer wieder abwesend sein musste. Ihnen ist diese Promotionsarbeit in Liebe gewidmet.

7.4 Erklärung zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei mir, Haktan Altinova, Klinik für Neurochirurgie des Evangelischen Krankenhauses Bielefeld, Kantensiek 11, 33617 Bielefeld, hinterlegt sind.

7.5 Lebenslauf

Haktan Altinova

2. März 1980	Geburt in Köln
1986 – 1990	Besuch der Grundschule, Köln
1990 – 1999	Besuch der Heinrich-Böll-Gesamtschule, Köln
1999 – 2006	Studium der Humanmedizin, RWTH-Aachen
August 2002	Ärztliche Vorprüfung
August 2003	Erstes Staatsexamen
2003 – 2004	Famulaturen Innere Medizin, St. Agatha Krankenhaus, Köln Allgemeinchirurgie Atatürk Krankenhaus, Ankara (TR) Praxis Dr. med. G. Güsken, Internist, Köln Department of Pathology, Division Cytopathology Johns Hopkins University, Baltimore (USA)
August 2005	Zweites Staatsexamen
Oktober 2005 – Juni 2006	Praktisches Jahr Neurochirurgie, Universitätsklinikum, Aachen Allgemeinchirurgie, Universitätsklinikum, Aachen Innere Medizin, Hacettepe Universitätsklinikum, Ankara (TR)
November 2006	Drittes Staatsexamen
Januar 2007	Approbation als Arzt

August 2007 – Januar 2009	Wissenschaftlicher Assistent für Neurochirurgie, Universitätsmedizin Göttingen
Seit Februar 2009	Assistenzarzt für Neurochirurgie, Evangelisches Krankenhaus, Bielefeld – Bethel