

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Evaluierung von Biomarkern im Liquor cerebrospinalis
bei paraplegischen Hunden mit
Rückenmarksverletzung**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin

-Doctor medicinae veterinariae-

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Stefanie I. Wicha

Erlenbach am Main

Hannover 2016

Wissenschaftliche Betreuung:

PD Dr. Veronika Stein, PhD

Klinik für Kleintiere

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

1. Gutachterin:

PD Dr. Veronika Stein, PhD

2. Gutachter:

Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2016

Diese Dissertation wurde im Rahmen der Forschergruppe (FOR 1103) „Neurodegeneration und -regeneration bei ZNS-Erkrankungen des Hundes“ finanziell durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, FOR TI 309/4-2) unterstützt.

Für meine Familie

Ergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgenden Fachtagungen und Fachkongressen veröffentlicht.

Posterpräsentationen:

Wicha, S.I., Carlson, R., Tipold, A., Stein, V.M.:

Evaluation of cerebrospinal fluid biomarkers in paraplegic dogs with intervertebral disc herniation

Congress proceedings ESVN-ECVN Congress, S. 66-67

28th Annual Symposium of the ESVN-ECVN, "Movement disorders"

Amsterdam, 18.-19. September 2015

Wicha, S.I., Carlson, R., Tipold, A., Stein, V.M.:

Evaluation of cerebrospinal fluid biomarkers in paraplegic dogs with spinal cord injury

Proceeding of the Third International Workshop of Veterinary Neuroscience S. 23

Third International Workshop of Veterinary Neuroscience

Hannover, 14. Februar 2016

Vorträge:

Wicha, S.I., Carlson, R., Tipold, A., Stein, V.M.:

Evaluierung von Biomarkern im Liquor cerebrospinalis paraplegischer Hunde

Tierärztliche Praxis Kleintiere 1/2016: A3-A4

24. Jahrestagung der Fachgruppe

"Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik" der DVG

Berlin, 29.-30. Januar 2016

Auszeichnung mit dem 3. Preis des Schattauer-Verlags

Wicha, S.I., Carlson, R., Tipold, A., Stein, V.M.:

Does a panel of CSF biomarkers enhance the prognostic value in canine spinal cord injury?

Research Report at the Forum of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)

Denver, 8.-11. Juni 2016

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AUC	Area under the curve
Art. Nr.	Artikelnummer
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Best. Nr.	Bestellnummer
°C	Grad Celsius
C	Zervikales Rückenmarkssegment
CCL	Chemokine (C-C-Motif) Ligand
CCR	Chemokine (C-C-Motif) Rezeptor
CNS	Central nervous system
CSF	Cerebrospinal fluid/Liquor cerebrospinalis
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
g	Gramm
<i>g</i>	Standard-Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein/saures Gliafaserprotein
IVDH	Intervertebral disc herniation
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
Lfd. Nr.	Laufende Nummer
l	Liter
L	Lumbales Rückenmarkssegment
lum	lumbal

min	Minute
ml	Milliliter
mg	Milligramm
MIP-3β	Macrophage inflammatory protein-3β
MRT/MRI	Magnetresonanztomographie/Magnetic Resonance Imaging
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphate buffered saline/Phosphat-gepufferte Salzlösung
pg	Pikogramm
pH	Potentia Hydrogenii
Ref. Nr.	Referenznummer
ROC	Receiver operating characteristic
SCI	Spinal cord injury
sub	subokzipital
T	Thorakales Rückenmarkssegment
x	Multiplikationszeichen
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 BANDSCHEIBENVORFÄLLE	3
2.1.1 <i>Allgemeines</i>	3
2.1.2 <i>Pathogenese</i>	3
2.1.3 <i>Diagnose und Therapie</i>	5
2.1.4 <i>Prognose</i>	6
2.2 LIQUOR CEREBROSPINALIS	6
2.2.1 <i>Allgemeines und Funktion</i>	6
2.2.2 <i>Liquor-Produktion</i>	7
2.2.3 <i>Liquor-Zirkulation und -Absorption</i>	7
2.2.4 <i>Pathologische Veränderungen des Liquor cerebrospinalis</i>	8
2.3 BIOMARKER	8
2.3.1 <i>Strukturelle Biomarker</i>	9
2.3.1.1 <i>Tau-Protein</i>	9
2.3.1.2 <i>Saures Gliafaserprotein</i>	10
2.3.2 <i>Entzündliche Biomarker</i>	12
2.3.2.1 <i>Macrophage inflammatory protein-3β</i>	12
3 MATERIAL UND METHODEN	15
3.1 STUDIENPOPULATION	15
3.2 ENTNAHME UND UNTERSUCHUNG DES LIQUOR CEREBROSPINALIS	16
3.3 MATERIAL	18
3.4 METHODE	20
3.5 AUSWERTUNG	23
4 ERGEBNISSE	25
ABSTRACT	26
INTRODUCTION	27
MATERIAL AND METHODS	28
RESULTS	31

DISCUSSION	39
CONCLUSION	42
ACKNOWLEDGEMENT	42
REFERENCES	42
5 ÜBERGREIFENDE DISKUSSION	49
6 ZUSAMMENFASSUNG	59
7 SUMMARY.....	61
8 LITERATURVERZEICHNIS	63
9 ANHANG	73
9.1 PROTOKOLL UND LAYOUT DES TAU-PROTEIN-ELISA.....	73
9.2 PROTOKOLL UND LAYOUT DES MIP-3 β -ELISA	75
9.3 PROTOKOLL UND LAYOUT DES GFAP-ELISA.....	77
9.4 MESSWERTE	80
10 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	89
11 DANKSAGUNG	91

1 Einleitung

Diskopathien sind bei Hunden sehr häufige neurologische Erkrankungen (Fluehmann *et al.*, 2006). Bei hochgradigen neurologischen Defiziten ist die Prognosestellung oft schwierig und nicht verlässlich. Bei paraplegischen Hunden mit Verlust der Tiefensensibilität kommt es bei 52,1-78 % zu einer Regeneration der neurologischen Funktion (Aikawa *et al.*, 2012, Jeffery *et al.*, 2016, Olby *et al.*, 2003, Ruddle *et al.*, 2006, Scott & McKee, 1999). Aufgrund dieser weiten Streuung und Unsicherheit ist es notwendig, verlässliche prognostische Indikatoren zu entwickeln, die eine Regeneration der neurologischen Funktion vorhersagen können.

Hierbei ist die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis (CSF) von besonderem Interesse, denn durch die anatomische Nähe zum Rückenmark können Proteine und Metaboliten bei Verletzung in den CSF freigesetzt werden (Pouw *et al.*, 2009). Diese Freisetzung könnte das Ausmaß der Rückenmarksverletzung quantifizieren und somit die Prognosestellung des Patienten erleichtern.

Bei der biochemischen Analyse des CSF von Hunden mit Rückenmarksverletzungen konnte die Freisetzung einiger Proteine und Metaboliten identifiziert werden. Studien zeigten, dass die Konzentration des basischen Myelinproteins als möglicher prognostischer Indikator für eine Genesung bei Hunden mit Bandscheibenvorfällen angewendet werden könnte (Levine *et al.*, 2010, Witsberger *et al.*, 2012). Eine Kombinationsmessung mit der Creatinkinase-Aktivität im CSF konnte die prognostische Aussagekraft erhöhen (Witsberger *et al.*, 2012). Auch die Matrix-Metalloproteinase-9-Aktivität konnte mit einer größeren Wahrscheinlichkeit im CSF von paraplegischen Hunden mit Bandscheibenvorfällen gemessen werden (Levine *et al.*, 2006, Nagano *et al.*, 2011) und bei Hunden ohne Tiefenschmerz mit einer schlechten Prognose assoziiert werden (Nagano *et al.*, 2011).

Einen weiteren Ansatzpunkt für die Identifikation prognostischer Indikatoren im CSF stellt die zytologische Untersuchung dar. Studien zeigten, dass eine Pleozytose mit einem höheren Schweregrad neurologischer Defizite (Levine *et al.*, 2014, Srugo *et al.*, 2011) und mit einem schlechteren Therapieausgang in Verbindung gebracht werden kann (Chamisha *et al.*, 2015, Levine *et al.*, 2014, Srugo *et al.*, 2011). Auch eine hohe Anzahl an Makrophagen (Chamisha *et al.*, 2015, Srugo *et al.*, 2011) und ein Makrophagen:Monozyten-Verhältnis $\geq 0,73$ konnte mit einem schlechten Therapieausgang assoziiert werden (Chamisha *et al.*, 2015).

1 Einleitung

Trotz dieser Erkenntnisse ist der Einsatz von Biomarkern im CSF bei Hunden mit Bandscheibenvorfällen zum heutigen Zeitpunkt noch nicht verbreitet. Die Untersuchung auf das Vorhandensein des Tiefenschmerzes bei der neurologischen Untersuchung gibt bisher den deutlichsten Hinweis für die Einschätzung der Prognose des Patienten (Jeffery et al., 2016). Daher ist die Entwicklung neuer, zuverlässiger Biomarker ein wichtiger Ansatz, um die Prognose bei Hunden mit Rückenmarksverletzungen zu konkretisieren.

In vorliegender Arbeit wurde die Freisetzung von Tau-Protein, Macrophage inflammatory protein-3 β (MIP-3 β) und dem sauren Gliafaserprotein (GFAP) in den CSF paraplegischer Hunde mit akuter/subakuter und chronischer Rückenmarksverletzung untersucht. Es wurde überprüft, ob diese Substanzen den Schweregrad der Rückenmarksverletzung widerspiegeln und so als prognostische Indikatoren fungieren können. Des Weiteren wurden die Konzentrationen der Substanzen nach Punktion des CSF aus der Cisterna magna und dem lumbalen Subarachnoidalraum vergleichend untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 Bandscheibenvorfälle

2.1.1 Allgemeines

Die Inzidenz von Diskopathien in der Gesamtpopulation von Hunden liegt bei etwa 3,5 % (Bergknut *et al.*, 2012). Allerdings zeigen chondrodystrophe Rassen, zu denen beispielsweise Dackel, französische Bulldogge und Pekinese zählen, eine starke Prädisposition für diese Erkrankung (Bergknut *et al.*, 2012, Hansen, 1951, Priester, 1976). Diese Tiere leiden an einem Defekt der enchondralen Ossifikation, welcher neben dem rassetypischen Erscheinungsbild des disproportionalen Zwergwuchses unter anderen auch dazu führt, dass Bandscheiben schneller und frequenter degenerieren (Hansen, 1951, Olby *et al.*, 2004, Priester, 1976). Neben Rassedispositionen erhöht auch zunehmendes Alter die Inzidenz von Diskopathien (Hansen, 1951, Priester, 1976). Allerdings erreichen chondrodystrophe Rassen ihren Krankheitshöhepunkt bereits zwischen dem dritten und siebten Lebensjahr (Olby *et al.*, 2004), während nicht-chondrodystrophe Rassen vorwiegend erst zwischen dem sechsten und achten Lebensjahr erkranken (Priester, 1976).

2.1.2 Pathogenese

Verschiedene pathogenetische Prozesse können einem Bandscheibenvorfall zugrunde liegen. Die *Bandscheibenextrusion*, die auch als Hansen-Typ-I Vorfall bezeichnet wird, tritt besonders häufig bei chondrodystrophen Rassen auf (Hansen, 1952). Ursache ist eine chondroide Metamorphose des Nucleus pulposus, die bei diesen Rassen bereits in den ersten zwei Lebensjahren stattfindet (Sharp & Wheeler, 2005a). Sie führt zu einer Dehydrierung und dystrophischen Kalzifizierung des Nucleus pulposus (Jeffery *et al.*, 2013). Dieser Degenerationsprozess bedingt eine starke mechanische Belastung des Anulus fibrosus und es kann zum Einreißen und konsekutiv zum Vorfall von Bandscheibenmaterial in den Rückenmarkskanal kommen (Jeffery *et al.*, 2013). Besonders häufig treten Bandscheibenextrusionen in den thorakolumbalen Rückenmarkssegmenten (T3-L3) auf (Fluehmann *et al.*, 2006). Bis zu 80 % der Vorfälle beschränken sich sogar auf die Rückenmarkssegmente T11-L2 (Olby *et al.*, 2004).

2 Literaturübersicht

Bei *Bandscheibenprotrusionen* dagegen stehen Degenerationsprozesse des Anulus fibrosus im Vordergrund. Hierdurch kommt es zu einer Verdickung des Anulus fibrosus und zum Hineinragen der Bandscheibe in den Rückenmarkskanal (Jeffery et al., 2013). Auch am Nucleus pulposus können Degenerationsprozesse in Form einer fibrinoiden Metamorphose stattfinden (Sharp & Wheeler, 2005a). Bandscheibenprotrusionen kommen häufiger bei nicht-chondrodystrophen Rassen in höherem Alter vor und werden auch als Hansen-Typ-II Vorfälle bezeichnet (Hansen, 1952). Die häufigste Inzidenz wurde bei L1/2 gefunden (Cudia & Duval, 1997).

Neben den beiden beschriebenen Typen von Bandscheibenvorfällen kommen auch *traumatische Bandscheibenvorfälle* vor (Hansen, 1952). Durch die traumatische Einwirkung gelangt Nucleus pulposus-Material mit hoher Geschwindigkeit in den Rückenmarkskanal und kann das Rückenmark zu einem sehr variablen Schweregrad schädigen (Jeffery et al., 2013).

Bei einem Vorfall von Bandscheibenmaterial in den Rückenmarkskanal kommt es zur Kontusion und zur Kompression des Rückenmarks (Jeffery et al., 2013). Dieser Primärschaden kann durch eine Reihe ablaufender Sekundärprozesse potenziert werden (Anderson & Hall, 1993). Akute (Sekunden bis Minuten nach Verletzung), subakute (Minuten bis Wochen nach Verletzung) und chronische (Monate bis Jahre nach Verletzung) Prozesse der Sekundärschädigung können unterschieden werden (Oyinbo, 2011). Durch den mechanischen Schaden und die Kompression kann es zum neuronalen Zelltod kommen. Auch Vasospasmen, Ischämien und Gefäßschädigungen mit konsekutiven Hämorrhagien können eine direkte Folge der Verletzung sein und diese vergrößern (Zhou *et al.*, 2014). Ischämien können außerdem einen Kalziumeinstrom in die Neuronen auslösen, der durch Enzymaktivierungskaskaden zur Apoptose und zum Zelltod führen kann (Dumont *et al.*, 2001). Im Rahmen subakuter Sekundärschädigungen können Entzündungsprozesse aktiviert werden, die Apoptosen und axonale Demyelinisierung auslösen können (Oyinbo, 2011). Intramedulläre Kavitätenbildungen und Gliazellnarben können bei chronischen Sekundärschädigungen nach einer schweren Rückenmarksverletzung auftreten (Zhou *et al.*, 2014).

2.1.3 Diagnose und Therapie

Zur Diagnosestellung eines Bandscheibenvorfalls wird eine neurologische Untersuchung durchgeführt, wodurch die neuroanatomische Lokalisation und der Schweregrad der neurologischen Defizite erfasst werden kann. Neuroanatomisch kann das Rückenmark in vier Abschnitte differenziert werden: C1-C5, C6-T2, T3-L3 und L4-S3 (Sharp & Wheeler, 2005a). Während Läsionen in den beiden vorderen Segmenten zu einer Beeinträchtigung aller vier Gliedmaßen führen, sind ab dem dritten thorakalen Rückenmarkssegment lediglich die Hintergliedmaßen betroffen. Über die Prüfung der spinalen Reflextätigkeit kann dann die neuroanatomische Lokalisation der Schädigung festgelegt werden (Jaggy & Spiess, 2007). Zur graduellen Einteilung der neurologischen Defizite kann das Schema nach Sharp und Wheeler (2005) angewendet werden.

Grad 1: Schmerzhaftigkeit der Wirbelsäule ohne neurologische Ausfallserscheinungen

Grad 2: Gering- bis mittelgradige Parese, selbstständig gehfähig

Grad 3: Hochgradige Paraparese, nicht selbstständig gehfähig

Grad 4: Plegie mit erhaltenem Tiefenschmerz

Grad 5: Plegie ohne Tiefenschmerz

Um die genaue Ursache einer Rückenmarksläsion zu erfassen, sind häufig weiterführende bildgebende Verfahren wie Leerröntgen, Myelographie, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie notwendig (Tipold *et al.*, 2007). Die Magnetresonanztomographie stellt derzeit den Goldstandard in der Diagnostik dar (Robertson & Thrall, 2011), da sie neben der genauen Lokalisation und dem Schweregrad des Bandscheibenvorfalls auch eine Beurteilung des Rückenmarks erlaubt. So konnte in Studien das Vorhandensein von Hyperintensitäten und das Hyperintensitäts-Längenverhältnis (Quotient aus der Länge der Hyperintensität und der Länge des 2. Lendenwirbels) in den T2-gewichteten Sequenzen der Magnetresonanztomographie mit dem Therapieausgang assoziiert werden (Ito *et al.*, 2005, Levine *et al.*, 2009).

Bei milden neurologischen Defiziten ist eine konservative Therapieoption möglich. Hierbei ist die absolute Ruhighaltung über vier bis sechs Wochen essentiell, um eine Ausheilung des

2 Literaturübersicht

Anulus fibrosus zu erreichen (Coates, 2000, Sharp & Wheeler, 2005b). Beim Verlust der selbstständigen Gehfähigkeit, bei progressiver Verschlechterung oder Rezidiven der neurologischen Symptome ist jedoch eine chirurgische Therapie empfehlenswert (Coates, 2000). Bei der chirurgischen Versorgung thorakolumbaler Diskopathien wird eine Hemilaminektomie, eine Pedikuloektomie oder eine Laminektomie durchgeführt (Rytz *et al.*, 2007).

2.1.4 Prognose

Für die Prognosestellung ist der Grad der neurologischen Defizite vor einer chirurgischen Intervention entscheidend (Salger *et al.*, 2014). Auch wenn sich die Prognose mit zunehmenden neurologischen Defiziten verschlechtert, liegen bei paraplegischen Hunden mit intakter Tiefensensibilität noch Erfolgschancen bis 97,7 % für eine Genesung vor (Aikawa *et al.*, 2012). Bei paraplegischen Hunden ohne Tiefenschmerz bestehen dagegen Erfolgsaussichten nach chirurgischer Therapie zwischen 52,1 % und 78 % (Aikawa *et al.*, 2012, Jeffery *et al.*, 2016, Olby *et al.*, 2003, Ruddle *et al.*, 2006, Scott & McKee, 1999).

Experimentell konnte bei Hunden ein schlechterer Therapieausgang bei längerer Kompression gefunden werden (Carlson *et al.*, 2003). Dies konnte bei natürlichen auftretenden Bandscheibenvorfällen bisher nicht verifiziert werden. Allerdings benötigten Hunde mit länger bestehenden neurologischen Symptomen eine längere Rehabilitationszeit (Ferreira *et al.*, 2002). Bei perakuter Progression der neurologischen Symptomatik und Verlust der Gehfähigkeit in weniger als einer Stunde muss jedoch eine negativere Prognose gestellt werden (Scott & McKee, 1999).

Auch die neuroanatomische Lokalisation der Rückenmarksläsion hat prognostische Einflüsse. Läsionen der zervikalen und lumbalen Intumeszenz haben eine schlechtere Prognose als Läsionen in den Rückenmarkssegmenten von C1-C5 und T3-L3 (Tipold *et al.*, 2007).

2.2 Liquor cerebrospinalis

2.2.1 Allgemeines und Funktion

Das zentrale Nervensystem ist von drei Hirnhäuten umgeben: Dura mater, Arachnoidea und Pia mater (de Lahunta & Glass, 2009). Die Dura mater liegt der knöchernen Struktur direkt an und wird auch als Pachymeninx bezeichnet. Arachnoidea und Pia mater bilden die

2 Literaturübersicht

Leptomeninges (de Lahunta & Glass, 2009). Zwischen Arachnoidea und Pia mater befindet sich der subarachnoidale Raum, der die Cerebrospinalflüssigkeit enthält. Auch die Hirnventrikel und der Zentralkanal des Rückenmarks sind mit CSF gefüllt (de Lahunta & Glass, 2009).

Der CSF ist physiologisch eine klare, farblose, zell- und proteinarme Flüssigkeit (de Lahunta & Glass, 2009). Der CSF eines gesunden Hundes ist frei von Erythrozyten und nur bis zu 5 Leukozyten/ μ l gelten als physiologisch. Der Proteingehalt liegt etwa zwischen 10-40 mg/dl, wobei Albumin die Hauptfraktion darstellt (Di Terlizzi & Platt, 2006). Außerdem sind im CSF noch Elektrolyte, Enzyme und andere Substanzen enthalten (Di Terlizzi & Platt, 2006).

Der CSF schützt das Neuroparenchym bei Traumata, dient dem Transport von Nährstoffen und Neurotransmittern und ist neben dem zerebralen Blutfluss ein wichtiges Steuerglied in der Aufrechterhaltung eines konstanten intrakraniellen Drucks (de Lahunta & Glass, 2009, Di Terlizzi & Platt, 2006).

2.2.2 Liquor-Produktion

Der CSF entsteht durch Ultrafiltration des Blutes und aktiven Transport von Elektrolyten und Glucose (Di Terlizzi & Platt, 2006). Hauptproduktionsorte der Cerebrospinalflüssigkeit sind die Adergeflechte (Plexus choroidei) der beiden Seitenventrikel, des dritten und vierten Ventrikels (de Lahunta & Glass, 2009). Allerdings zeigen auch Studien, dass die Liquorproduktion im subarachnoidalen Raum des Hundes bis zu 58,5 % ausmachen kann (Sato *et al.*, 1975). Der Plexus choroideus besteht aus der stark vaskularisierten Tela choroidea und dem einschichtigen kubischen Plexusepithel. Die kubischen Ependymzellen bilden zahlreiche Kinozilien und Mikrovilli zur Vergrößerung der Oberfläche aus (de Lahunta & Glass, 2009).

Bei Hunden beträgt die Liquorproduktionsrate 0,047 ml/min, was 3-5-mal täglich eine vollständige Umwälzung des CSF erzeugt (de Lahunta & Glass, 2009).

2.2.3 Liquor-Zirkulation und -Absorption

Die Cerebrospinalflüssigkeit fließt von beiden Seitenventrikeln über die Foramina interventriculares in den dritten Ventrikel und von dort über den Aquaeductus mesencephali in den vierten Ventrikel. An der lateralen Apertur des vierten Ventrikels tritt der CSF in den subarachnoidalen Raum ein (Damkier *et al.*, 2013). Der Liquorfluss wird durch die Pulsation

2 Literaturübersicht

des Blutes im Plexus choroideus bedingt, was eine kaudale und kraniale Bewegung induziert. Die Hauptflussrichtung des CSF erfolgt jedoch nach kaudal (de Lahunta & Glass, 2009).

Die Hauptabsorption des CSF findet in arachnoidalen Fortsätzen, die in den Sinus venosus ragen, statt (Tripathi, 1977). Diese Granulationes arachnoideae ermöglichen einen unidirektionalen Abtransport des CSF in das venöse Blutgefäßsystem (Bell, 1995, de Lahunta & Glass, 2009). Am Rückenmark sind sie an den Spinalnervenzwurzeln lokalisiert. Ein weiterer Teil des CSF gelangt über die Gehirnnerven I, II und VIII, sowie die Spinalnerven in das lymphatische System (de Lahunta & Glass, 2009).

2.2.4 Pathologische Veränderungen des Liquor cerebrospinalis

Obwohl nicht jede neurologische Erkrankung zu Veränderungen im CSF führt, gilt die Untersuchung des CSF als sensitives Diagnostikum in der Überprüfung der neurologischen Gesundheit des Patienten (Di Terlizzi & Platt, 2009). Über Routineuntersuchungen erfassbare Veränderungen im CSF können jedoch häufig nur Hinweise auf spezifische Erkrankungen liefern (Chrisman, 1992). Erhöhungen der Zellzahl (Pleozytose) und der Proteinkonzentration sind Hauptanzeichen akuter und aktiver Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Reiber, 1998). Eine Pleozytose kann durch eine intrathekale Einwanderung von Leukozyten über die Blut-Hirn-Schranke entstehen, aber auch Folge iatrogenen Blutkontamination durch die Punktion sein (Di Terlizzi & Platt, 2009). Eine weitere Differenzierung der Leukozyten kann eine nähere Einschätzung der Erkrankung ermöglichen. So kann eine lymphozytäre Pleozytose beispielsweise auf eine virale Meningitis hinweisen (Wamsley & Alleman, 2004). Eine erhöhte Proteinkonzentration kann generell Ursache einer intrathekalen Produktion oder einer Störung der Blut-CSF-Schranke sein (Reiber & Peter, 2001). Eine genauere Analyse der Proteinfractionen, sowie die Art und Menge enthaltener Immunglobuline kann weitere Hinweise auf die zugrunde liegende neurologische Erkrankungen bieten (Reiber & Peter, 2001).

2.3 Biomarker

Biologische Marker (Biomarker) sind Substanzen, Strukturen oder biologische Prozesse, die objektiv und reproduzierbar gemessen werden können (Strimbu & Tavel, 2010). Sie können Indikatoren für physiologische oder pathologische Prozesse sein oder ermöglichen eine

Überwachung des Therapieverlaufs. Daher sollten sie über eine diagnostische oder prognostische Aussagekraft verfügen (Strimbu & Tavel, 2010). Biomarker für Rückenmarksverletzungen sollten nach dem Insult schnell in messbaren Konzentrationen in den CSF freigesetzt werden. Sie sollten in der Lage sein, den Schweregrad der Verletzung zu bestimmen und eine prognostische Aussagekraft ermöglichen, um so die Entscheidung über mögliche Therapieoptionen zu erleichtern (Cruz *et al.*, 2015).

2.3.1 Strukturelle Biomarker

Als strukturelle Biomarker werden Substanzen bezeichnet, die bei der Verletzung von Zellen freigesetzt werden können. Hierzu zählen Proteine des neuronalen und glialen Zytoskeletts, sowie zelluläre Metaboliten (Cruz *et al.*, 2015).

Im Folgenden soll nur auf zwei Substanzen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit relevant sind, eingegangen werden.

2.3.1.1 Tau-Protein

Das Tau-Protein gehört zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine und wurde von Weingarten *et al.* (1975) im porzinen Gehirn entdeckt. Im menschlichen Gehirn konnten sechs verschiedene Isoformen isoliert werden, welche durch posttranskriptionales Splicing aus demselben Gen entstehen (Buee *et al.*, 2000, Shahani & Brandt, 2002). Im caninen Gehirn konnten vier verschiedene Isoformen detektiert werden, die mit denen des menschlichen Gehirns homolog sind (Janke *et al.*, 1999).

Die Tau-Protein-Isoformen werden durch Kinasen phosphoryliert und durch Phosphatasen dephosphoryliert, was die Eigenschaften und die Funktionen des Tau-Proteins modifiziert (Buee *et al.*, 2000, Stoothoff & Johnson, 2005). Eine Funktion des Tau-Proteins ist, den Zusammenbau und die Stabilität von Mikrotubuli zu fördern (Shahani & Brandt, 2002). Außerdem scheint es eine Rolle im Neuritenwachstum und deren Stabilisierung zu spielen und für axonale Transportvorgänge bedeutend zu sein (Buee *et al.*, 2000, Shahani & Brandt, 2002, Stoothoff & Johnson, 2005). Tau-Proteine werden vorwiegend im axonalen Kompartiment von Neuronen exprimiert (Binder *et al.*, 1985, Schoenfeld & Obar, 1994). Durch diese Lokalisation sind Tau-Proteine vor allem in der weißen Substanz des zentralen Nervensystems vorhanden (Binder *et al.*, 1985, Schoenfeld & Obar, 1994).

2 Literaturübersicht

Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, die auch als Tauopathien zusammengefasst werden, werden Tau-Proteine hyperphosphoryliert oder abnormal phosphoryliert, was zum Verlust verschiedener Funktionen führt (Mietelska-Porowska *et al.*, 2014). Das Tau-Protein kann hierdurch die Bindungsfähigkeit zu Mikrotubuli verlieren und es kann, wie bei Morbus Alzheimer, zur Autopolymerisation und Anhäufung von Tau-Proteinen sowie zur Formation neurofibrillärer Bündel kommen (Jho *et al.*, 2010, Mietelska-Porowska *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2007).

Die Tau-Protein-Konzentration im CSF kann zur Diagnose von Morbus Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen herangezogen werden (Blennow *et al.*, 1995, Molinuevo *et al.*, 2014, Otto *et al.*, 1997). Zu einer Freisetzung von Tau-Proteinen in den CSF kann es auch bei Schlaganfallpatienten und Schädel-Hirn-Trauma-Patienten kommen (Hesse *et al.*, 2001, Wunderlich *et al.*, 2006, Zemlan *et al.*, 1999). Die Freisetzung des totalen (phosphorylierten und nicht-phosphorylierten) Tau-Proteins wurde hierbei auf eine axonale Schädigung zurückgeführt und konnte als Indikator für den Schweregrad und die Prognose verwendet werden (Hesse *et al.*, 2001, Wunderlich *et al.*, 2006, Zemlan *et al.*, 1999).

In der Cerebrospinalflüssigkeit von Hunden wurde Tau-Protein erstmalig von Tanaka *et al.* (2012) mit Hilfe eines ELISA nachgewiesen. Es wurden Liquorproben von gesunden Hunden, Hunden mit nekrotisierender Meningoenzephalitis und Hunden mit granulomatöser Meningoenzephalomyelitis untersucht. Hierbei zeigten Hunde mit nekrotisierender Meningoenzephalitis die höchsten Tau-Protein-Konzentrationen, was mit einem größeren Neuronenschaden assoziiert wurde (Tanaka *et al.*, 2012). Roerig *et al.* (2013) wies nach, dass Tau-Protein auch bei Hunden mit Rückenmarksverletzungen in den CSF freigesetzt wird. Der Schweregrad der neurologischen Defizite konnte mit der Tau-Protein-Konzentration im CSF korreliert werden und Tiere mit neurologischer Verbesserung wiesen eine signifikant niedrigere Tau-Protein-Konzentration auf (Roerig *et al.*, 2013).

2.3.1.2 Saures Gliafaserprotein

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) ist der Hauptbestandteil der intermediären Filamente von Astrozyten des zentralen Nervensystems (Eng, 1985). Die Isolierung gelang erstmals Eng *et al.* (1971) im Gehirn von Patienten mit Multipler Sklerose. Neben der Expression von GFAP in Astrozyten des zentralen Nervensystems, wird GFAP auch in peripheren Gliazellen, wie

2 Literaturübersicht

Schwann Zellen oder den enterischen Gliazellen exprimiert (Bianchini *et al.*, 1992, Kato *et al.*, 1990). Auch nicht-neuronale Zellen wie Fibroblasten oder Chondrozyten können GFAP enthalten (Hainfellner *et al.*, 2001, Kepes & Perentes, 1988). Die Expression von GFAP kann außerdem über Promotoren gesteuert werden und ist beispielsweise bei Verletzungen im zentralen Nervensystem gesteigert (Eng *et al.*, 2000, Middeldorp & Hol, 2011, Sofroniew, 2009).

Als Hauptbestandteil der intermediären Filamente gehört zu den Funktionen von GFAP die Form und Beweglichkeit der Astrozyten zu modulieren, indem es astrozytäre Fortsätze stabilisiert (Eng 2000). Auch bei der Proliferation von Astrozyten und bei der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke ist GFAP von Bedeutung. Außerdem scheint es die Myelinisierung und das Neuritenwachstum zu beeinflussen (Middeldorp & Hol, 2011). Eine entscheidende Rolle wird GFAP auch in Verbindung mit einer Schädigung des zentralen Nervensystems zugeschrieben (Sofroniew & Vinters, 2010). Die reaktive Astroglie, welche mit einer erhöhten GFAP-Expression verbunden ist, ist ein pathologisches Kennzeichen für erkranktes Nervengewebe im zentralen Nervensystem. Je nach Ausmaß des Schadens wird auch eine unterschiedlich starke Astroglie beschrieben, die zur Formation glialer Narben führen kann (Sofroniew, 2009, Sofroniew & Vinters, 2010). Moore und Oglesbee (2014) konnten immunhistochemisch eine vermehrte GFAP-Expression in der ependymalen Zellschicht des Rückenmarks von Hunden mit akuter Rückenmarksverletzung nachweisen. Im Rahmen der Astroglie kann es auch zu einer Freisetzung von GFAP in den CSF kommen (Giovannoni, 2006). Aufgrund dieses Zusammenhangs, sowie einer möglichen Freisetzung nach glialer Schädigung (Guez *et al.*, 2003, Hjalmarsson *et al.*, 2014), gilt GFAP als potentieller Biomarker bei Rückenmarksverletzungen. Studien konnten eine Freisetzung von GFAP in die Cerebrospinalflüssigkeit bei Menschen mit Rückenmarksverletzungen zeigen (Guez *et al.*, 2003, Kwon *et al.*, 2010, Winnerkvist *et al.*, 2007). Bei Hunden mit Rückenmarksverletzungen wurde die GFAP-Konzentration im CSF bisher nicht erhoben. In einer Studie von Sato *et al.* (2013) wurde GFAP allerdings als diagnostischer Biomarker im Serum von Hunden mit progressiver Myelomalazie beschrieben und die Autoren vermuteten eine GFAP-Freisetzung in das Serum aufgrund einer Verletzung der Blut-Rückenmarks-Schranke (Sato *et al.*, 2013).

2.3.2 Entzündliche Biomarker

Im Verlauf sekundärer Schädigungen nach Rückenmarksverletzungen werden Entzündungsmechanismen aktiviert. Entzündliche Mediatoren können in die Cerebrospinalflüssigkeit eintreten und potentiell den Schweregrad der zentralnervösen Schädigung quantifizieren (Cruz et al., 2015). Verschiedene Entzündungsmediatoren, die bei Hunden mit Rückenmarksverletzungen von Bedeutung sind, wurden bereits identifiziert (Spitzbarth *et al.*, 2012). Im Folgenden soll nur das im Zusammenhang mit dieser Arbeit relevante macrophage inflammatory protein-3 β betrachtet werden.

2.3.2.1 Macrophage inflammatory protein-3 β

Das macrophage inflammatory protein-3 β (MIP-3 β) gehört zur Gruppe der Chemokine. Chemokine sind chemotaktisch aktive Zytokine, die eine Zellmigration entlang eines Konzentrationsgefälles auslösen können. Dadurch kann die Immunzellmigration im Gewebe, sowie die Auswanderung von Immunzellen ins Blut reguliert werden (Griffith *et al.*, 2014). Grundsätzlich werden inflammatorische und homöostatische Chemokine differenziert. Inflammatorische Chemokine fördern Abwehrmechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität und fördern Entzündungsprozesse. Homöostatische Chemokine hingegen, zu denen auch MIP-3 β gezählt wird, werden kontinuierlich exprimiert und regulieren Reaktionen des Immunsystems (Nelson & Krensky, 2001).

Hauptaufgabe von MIP-3 β ist das „Homing“ von T-Zellen und dendritischen Zellen zum Lymphknoten (Griffith et al., 2014). Das Chemokin MIP-3 β wird auch als Chemokine (CC-Motif) Ligand 19 (CCL19) bezeichnet und kann ebenso wie CCL21 am CCR7 Rezeptor binden. Dieser Rezeptor wird von verschiedenen Immunzellen, wie dendritischen Zellen, B-Zellen und verschiedenen T-Zelltypen exprimiert (Forster *et al.*, 2008, Griffith et al., 2014, Yoshida *et al.*, 1997).

MIP-3 β scheint eine zentrale Rolle in Entzündungsprozessen des zentralen Nervensystems zu spielen. Eine basale MIP-3 β -Expression in den Hirnvenen gesunder Mäuse, sowie eine starke Hochregulierung bei Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis konnte durch in-situ-Hybridisierung gezeigt werden (Alt *et al.*, 2002). Auch in der Cerebrospinalflüssigkeit von Menschen konnte sowohl eine Basalsekretion, als auch eine

2 Literaturübersicht

Hochregulation bei Patienten mit Multipler Sklerose gefunden werden (Krumbholz *et al.*, 2007).

In einer Studie von Bartels *et al.* (2014) wurde MIP-3 β in der Cerebrospinalflüssigkeit von gesunden Hunden und Hunden mit neurologischen Erkrankungen gemessen. Bei Hunden mit entzündlichen und degenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems konnten signifikant höhere MIP-3 β -Werte im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. In dieser Studie konnten auch Zusammenhänge zwischen der MIP-3 β -Konzentration im CSF und dem Schweregrad neurologischer Defizite nach Bandscheibenvorfällen gezeigt werden. Somit lassen diese Ergebnisse auf eine Beteiligung des MIP-3 β bei Prozessen der Sekundärschädigung von Rückenmarksverletzungen schließen (Bartels *et al.*, 2014).

3 Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte zwischen Dezember 2012 und Juli 2015 in der Klinik für Kleintiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Alle Hunde der Studie wiesen aufgrund einer Rückenmarksverletzung in den Rückenmarkssegmenten T3-L3 eine Paraplegie der Hintergliedmaßen auf. Ein Körpergewicht von unter 20 kg wurde als Einschlusskriterium definiert. Rasse, Alter und Geschlecht der Hunde sowie Dauer der Lähmungserscheinungen wurden erfasst. Mittels Magnetresonanztomographie und Wirbelsäulenoperation wurde die exakte Lokalisation und Ätiologie der Rückenmarksverletzung verifiziert.

Insgesamt konnten 49 paraplegische Hunde in die Studie aufgenommen werden. Folgende Hunderassen waren betroffen: Dackel (24), französische Bulldogge (10), Mischling (7), Yorkshire Terrier (2), Jack Russell Terrier (1), Shih Tzu (1), Chihuahua (1), Havaneser (1), Bolonka Zwetna (1), West Highland White Terrier (1). Das Alter der Hunde reichte von 2 bis 16 Jahre (Median: 5 Jahre). Die Geschlechterverteilung innerhalb der Studie war wie folgt: 26,5 % (13/49) der Hunde waren männlich und 28,6 % (14/49) männlich-kastriert und 30,6 % (15/49) waren weibliche bzw. 14,3 % (7/49) weiblich-kastrierte Hunde.

Die Tiefensensibilität wurde im Rahmen der neurologischen Untersuchung bei allen Patienten vor der Operation überprüft, indem das Periost der Zehen der Hintergliedmaßen mit einer Klemme stimuliert wurde. Anhand der An- oder Abwesenheit einer Schmerzreaktion wurden die Patienten graduell nach Sharp und Wheeler (2005) eingeteilt. Einundzwanzig Hunde mit neurologischen Defiziten von Grad 4 und 28 Hunde mit Grad 5 wurden in die Studie aufgenommen (Tabelle 1).

Neben der Unterteilung der Hunde anhand ihrer neurologischen Defizite wurde eine weitere Gruppierung nach der Dauer der Lähmungserscheinungen vorgenommen. Sechsenddreißig Hunde mit einer akuten/subakuten Rückenmarksverletzung (≤ 28 Tage) und 13 mit chronischen Lähmungserscheinungen (> 28 Tage) konnten in die Studie eingeschlossen werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Anzahl (n) und Unterteilung der paraplegischen Hunde anhand der An- (Grad 4) und Abwesenheit (Grad 5) des Tiefenschmerzes gemäß Sharp und Wheeler (2005)

	Hunde mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung (n)	Hunde mit chronischer Rückenmarksverletzung (n)	Gesamtanzahl (n)
Grad 4	19	2	21
Grad 5	17	11	28
Gesamtanzahl (n)	36	13	49

Bei allen Patienten wurden nach der Wirbelsäulenchirurgie regelmäßig neurologische Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Bei Hunden mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung wurde eine Besserung des neurologischen Zustandes um mindestens einen Grad (Sharp & Wheeler, 2005) innerhalb von vier Wochen als Verbesserung gewertet. Diese Verbesserung konnte bei 25/36 Hunden verzeichnet werden. Bei 11/36 Hunden trat im genannten Zeitraum keine neurologische Verbesserung ein. Einer der Hunde mit ausbleibender Verbesserung zeigte eine Verschlechterung seiner neurologischen Symptome und musste aufgrund einer progressiven ascendierenden hämorrhagischen Myelomalazie euthanasiert werden. Bei Hunden mit chronischer Rückenmarksverletzung war im genannten Zeitraum keine Verbesserung zu erwarten, wodurch diese Hunde aus der statistischen Bewertung ausgeschlossen wurden.

Sieben gesunde Beagle dienten als Kontrollgruppe. Die Hunde waren zwischen 1 und 6 Jahren (Median: 2 Jahre) alt. Das Geschlechterverhältnis der Kontrollgruppe war recht ausgeglichen: Vier Hunde waren männlich, wovon einer kastriert war und drei Hunde waren weiblich, von denen ebenfalls einer kastriert war.

3.2 Entnahme und Untersuchung des Liquor cerebrospinalis

Zur Entnahme des CSF wurden die Patienten in Allgemeinanästhesie verbracht. Die Narkose wurde mittels geeigneter Injektionsnarkotika eingeleitet und über eine Inhalationsnarkose mit Isofluran fortgeführt. Die Entnahme der Cerebrospinalflüssigkeit erfolgte stets vor der

3 Material und Methoden

Wirbelsäulenoperation. Die Punktionsstellen wurden rasiert, gereinigt und desinfiziert. Die Punktion des Subarachnoidalraums erfolgte mittels steriler Spinalkanülen. Neben der subokzipitalen Liquorpunktion (siehe Abbildung 1) wurde der lumbale Subarachnoidalraum bei L4/5 bzw. L5/6 punktiert und der spontan ablaufende CSF mit Hilfe von sterilen Polystyrol-Röhrchen aufgefangen.



Abbildung 1: Subokzipitale Punktion des CSF

In den gewonnenen Proben wurde zunächst die Anzahl der Erythrozyten und Leukozyten sowie der Glukose- und Mikroproteingehalt erhoben und protokolliert. Im Anschluss wurden die Proben bei 2000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, in Polypropylen-Röhrchen überführt und bei -20 °C bis zur biochemischen Analyse eingefroren.

Zwei der 49 subokzipital gewonnenen Liquorproben wurden aufgrund von Blutkontaminationen von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Vierzehn lumbal gewonnene Liquorproben standen einer biochemischen Untersuchung zur Verfügung. Weitere Proben mussten aufgrund von zu geringen Probenvolumina oder vorhandener Blutkontaminationen ausgeschlossen werden. Alle subokzipital, sowie 3/6 der lumbal gewonnenen Liquorproben der Kontrollgruppe konnten biochemisch untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.3 Material

ELISA Kits

INNOTEST hTAU Ag (Katalog Nr. 81572)	Fa. Fujirebio Europe N.V., Gent, Belgien
ELISA Kit for Macrophage Inflammatory Protein 3 Beta (Katalog Nr. ABIN414227)	Fa. Uscn Life Science Inc., Wuhan, China
Human GFAP ELISA (Katalog Nr. RD192072200R)	Fa. BioVendor GmbH, Heidelberg, Deutschland

Geräte

Kühlschrank Comfort	Fa. Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlschrank Profi line	Fa. Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Tiefkühlschrank Comfort	Fa. Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank Premium NoFrost	Fa. Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
pH Meter, pH 300	Fa. Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, Deutschland
Wasserbad mit Einhängethermostat	Fa. Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Tischzentrifuge Rotina 35R	Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte, Typ MR 3001	Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland
Plattformschüttler Promax 1020	Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland
Reagenzglasschüttler Reax control	Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland
Synergy 2 Multi-Detektions-Reader	Fa. BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
Digital timer (EU 609-0135)	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

3 Material und Methoden

Laborbedarf

Pipettenspitzen:

10 µl (Kristall; Best. Nr. 702504)	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
200 µl (gelb; Best. Nr. 613-0240)	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
1000 µl (blau; Best. Nr. 2100610)	Fa. Ratiolab, Dreieich, Deutschland

Pipetten:

Transferpipette variabel, 10-200 µl	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Transferpipette variabel, 100-1000 µl	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettierhelfer, Handystep	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Transferpipette -8, 20-200 µl	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen 4 ml (Best. Nr. 55.532)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikro-Schraubröhre 2 ml, Polypropylen (Best. Nr.:72.694.006)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Belüftungsstopfen (Ref. Nr. 65772)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzflasche 250 ml, (Art. Nr. 711-6126)	Fa. Henry Schein, Hamburg, Deutschland
Zellstoff, (Art. Nr. 126021)	Fa. Praxisdienst, Longuich, Deutschland
Parafilm® M, 4 IN. X 250 FT. Roll	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bechergläser	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt; Deutschland
Magnetrührstäbchen, verschiedene Größen 90 715, -730, -751	Fa. H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland

3 Material und Methoden

PBS (phosphate-buffered saline) pH 7,4:

NaCl 8,00 g

KCl 0,20 g

Na₂HPO₄ 1,15 g

KH₂PO₄ 0,20 g

Aqua bidest. ad 1000 ml

Klinikbedarf

Spinalkanüle mit Quincke-Schliff 22 GA 1.50 IN (Ref. Nr. 405254) Fa. Becton Dickinson, Madrid, Spanien

Röhre 3,5 ml Polystyrol, steril (Best. Nr.55.484.001) Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Software

Gen5™ Datenanalyse-Software Fa. BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA

SAS Enterprise Guide 7.1 SAS Institute Inc., Cary, North Caroline, USA

GraphPad Prism 6 GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA

3.4 Methode

Alle potentiellen Biomarker wurden mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) bestimmt (Abbildung 2). Dieses antikörperbasierte Nachweisverfahren ermöglicht über graduelle Farbumschläge eine quantitative Bestimmung der Substanzen. Über photometrische Messungen kann die exakte Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgen.

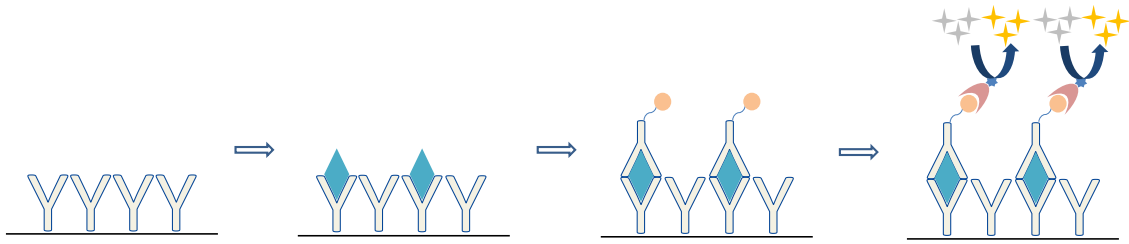


Abbildung 2: Prinzip der verwendeten ELISAs. Die ELISA-Platten sind mit einem Fangantikörper vorbeschichtet, der die zu untersuchende Substanz selektiv bindet. Durch Zugabe eines biotinylierten Detektionsantikörpers wird eine Bindung des mit Meerrettich-Peroxidase versehenen Streptavidin/Avidin ermöglicht. Das Substrat Tetramethylbenzidin wird durch die Meerrettich-Peroxidase enzymatisch umgesetzt, was einen Farbumschlag erzeugt.

Tau-Protein

Zur Bestimmung der Tau-Protein Konzentration im CSF wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA (INNOTEST hTAU Ag) der Firma Fujirebio (Gent, Belgien) verwendet. Dieser ELISA wurde für die Detektion von humanem, totem (phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem) Tau-Protein entwickelt. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben angewendet. (Protokoll siehe Anhang) Die Antikörperbindungen sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Der Standard des verwendeten ELISA reichte von 2500 pg/ml bis 50 pg/ml. Tanaka et al. (2012) evaluierte diesen ELISA für Hunde und legte ein Detektionsminimum von 18,7 pg/ml fest. Messwerte unterhalb dieses Wertes wurden als nicht messbar (0 pg/ml) gewertet. Werte oberhalb des Detektionsmaximums von 2500 pg/ml wurden mit Hilfe des mitgelieferten Reagenz verdünnt.

3 Material und Methoden

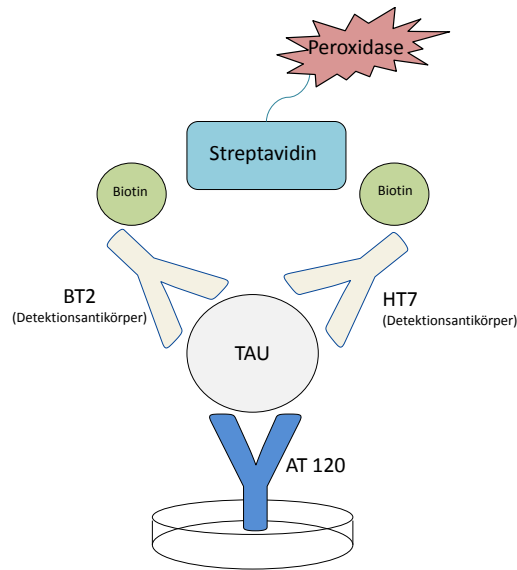


Abbildung 3: Antikörperbindungen des Tau-Protein-ELISA Die ELISA-Platten sind mit dem monoklonalen Fangantikörper AT 120 vorbeschichtet, der vorhandenes Tau-Protein in der Probe selektiv binden kann. Die zugegebenen anti-hTAU Antikörper BT2 und HT7 sind biotinyliert. Die Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase bindet an das Biotin und ermöglicht so die enzymatische Reaktion, die zu einem Farbumschlag führt.

Macrophage inflammatory protein-3 β (MIP-3 β)

Für die Bestimmung des MIP-3 β im CSF wurde ein ELISA der Firma Uscn Life Science Inc. (Wuhan, China) verwendet, der speziell zur Detektion von caninem MIP-3 β entwickelt wurde. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben angewendet. Ein detailliertes Protokoll befindet sich im Anhang. Die Standardreihe reichte von 1000 pg/ml bis 15,6 pg/ml. Bei Werten oberhalb des Detektionsmaximums wurden die gemessenen Proben mit 0,01 mol/l PBS (pH 7.0-7.2) verdünnt.

Saures Gliafaserprotein (GFAP)

Zur Bestimmung des GFAP wurde ein ELISA aus der Humanmedizin der Firma BioVendor GmbH (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Toda *et al.* (2007) validierte diesen ELISA für die Anwendung bei Hunden. Die Verdünnung des mitgelieferten Standards ermöglichte eine Standardreihe von 25 ng/ml bis 0,25 ng/ml. Bei Werten oberhalb des Detektionsmaximums erfolgte eine Verdünnung der Proben mit dem mitgelieferten Probenverdünner. Ein detailliertes Protokoll des verwendeten ELISAs befindet sich im Anhang.

3.5 Auswertung

Die spektrophotometrische Messung der ELISA-Platten wurde mit dem Synergy 2 Multi-Detektions-Reader (Fa. BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) durchgeführt und mittels Gen5™ Datenanalyse-Software (Fa. BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) ausgewertet. Durch Angabe der Sollkonzentrationen des Standards konnte eine Standardkurve (siehe Abbildung 4) erstellt werden, wodurch die Konzentrationen der Proben automatisch ermittelt werden konnten. Alle Probenmessungen erfolgten im Zweifachansatz. Der errechnete Mittelwert der Messungen wurde verwendet, wenn der Variationskoeffizient <20 % betrug. Bei Werten oberhalb dieses Prozentsatzes wurde die betroffene Probe erneut gemessen.

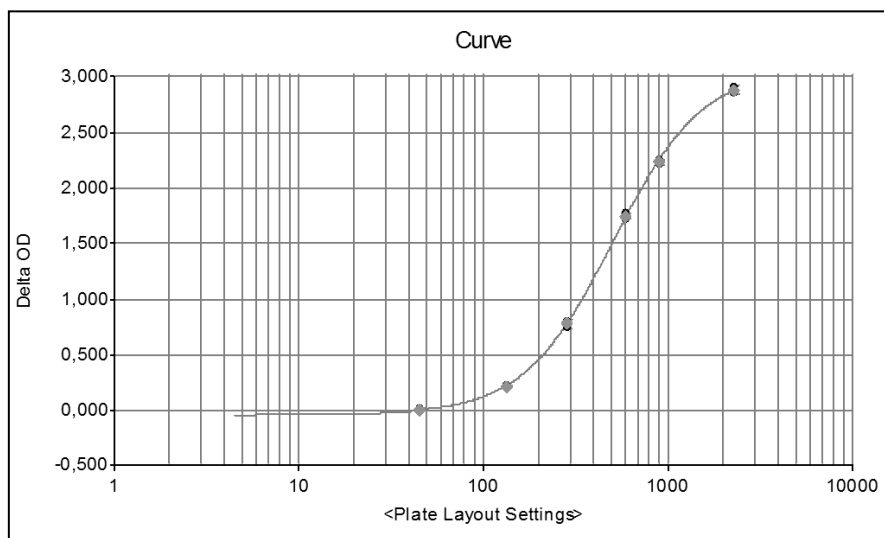


Abbildung 4: Standardkurve eines Tau-Protein-ELISA. Die optische Dichte (y-Achse) ist gegen die logarithmierte Konzentration des Tau-Proteins (x-Achse) aufgetragen. Über die optische Dichte der Proben kann die Tau-Protein-Konzentration exakt bestimmt werden.

Die statistische Auswertung wurde mit SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Caroline, USA) durchgeführt. Zunächst wurden alle Zahlenwerte auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) überprüft. Beim Vorliegen parametrisch verteilter Daten wurde ein t-Test angewendet. Wurde eine Normalverteilung der Daten abgelehnt, erfolgte die

3 Material und Methoden

Anwendung eines Kruskal-Wallis-Tests und eines Wilcoxon's two sample-Tests. Zudem wurde der Wilcoxon's signed rank-Test verwendet, um die Entnahmeorte des CSF zu vergleichen. Eine mögliche Korrelation der Tau-Protein-, MIP-3 β - und GFAP-Konzentrationen mit dem Schweregrad der neurologischen Defizite wurde mittels Pearson und Spearman Korrelationsanalyse überprüft. Zur Ermittlung derjenigen Tau-Protein-, MIP-3 β - und GFAP-Konzentration, die als Schwellenwert zur prognostischen Einschätzung des Patienten verwendet werden kann, wurde eine ROC-(Receiver Operating Characteristic)-Analyse einschließlich der Berechnung der AUC (area under the curve) durchgeführt. Der Schwellenwert wurde nach dem größtmöglichen Youden Index (Sensitivität+Spezifität-1) festgelegt. Zur Bestimmung einer prognostischen Aussagemöglichkeit einer Kombination der Substanzen wurde eine binäre logistische Regressionsanalyse durchgeführt.

4 Ergebnisse

Evaluation of cerebrospinal fluid tau protein, MIP-3 β and GFAP as potential prognostic indicators in paraplegic dogs with spinal cord injury

S.I. Wicha¹, R. Carlson¹, A. Tipold^{1,2}, V.M. Stein^{1*}

¹*Department of Small Animal Medicine and Surgery, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany*

²*Center for Systems Neuroscience, Hannover, Germany*

*Corresponding author: Tel: +49-511-953-6311

Email: veronika.stein@tiho-hannover.de (V.M. Stein)

Abstract

The prediction of a reliable prognosis can be challenging in paraplegic dogs with spinal cord injury (SCI), particularly when they lost nociception. The hypotheses should be proven that tau protein, MIP-3 β , and GFAP in cerebrospinal fluid reflect injury severity and correlate with functional outcome of dogs with SCI.

Concentrations of tau protein, MIP-3 β and GFAP were measured in cisternal and lumbar CSF samples using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) in 36 dogs with acute/subacute (≤ 28 days) and 13 dogs with chronic (> 28 days) SCI. The dogs were classified as grade 4 or grade 5 according to the presence ($n = 21$) or absence ($n = 28$) of deep pain perception (DPP) (Sharp & Wheeler, 2005). Samples of seven healthy dogs served as controls.

Paraplegic dogs with acute/subacute SCI had significantly ($p < 0.05$) higher tau protein and MIP-3 β concentrations in CSF compared to dogs with chronic paraplegia and to the control dogs. GFAP concentrations in cisternal CSF of dogs with acute/subacute SCI and grade 5 were significantly increased compared to the control dogs. In chronic SCI significantly elevated tau protein and MIP-3 β concentrations were detected in lumbar CSF compared to control dogs. Cisternal tau protein concentration above 43.70 pg/mL could predict a negative outcome with a sensitivity of 87.5 % and a specificity of 77.8 % (AUC 0.847; $p = 0.0161$) in deep pain negative dogs. Cisternal GFAP concentration above 3.35 ng/mL could predict negative outcome in dogs with grade 5 with a sensitivity and specificity of 57.1 % and 100.0 % respectively (AUC 0.7143; $p = 0.1797$).

In conclusion, tau protein, MIP-3 β and cisternal GFAP concentrations in CSF are able to reflect severity of neurological deficits after SCI in dogs. The cisternal CSF tau protein and GFAP concentrations may serve as prognostic indicators for improvement of neurological signs.

Keywords: Biomarker, spinal cord injury, canine, tau protein, MIP-3 β /CCL19, GFAP, prognosis

Introduction

Intervertebral disc herniation (IVDH) is a common neurological disorder in dogs and one of the most common causes of spinal cord injury (SCI) (Fluehmann et al., 2006). The definition of a reliable prognosis is challenging in paraplegic dogs, particularly when deep pain perception (DPP) is absent (Jeffery et al., 2013, Jeffery et al., 2016). The examination of cerebrospinal fluid (CSF) can be promising for a better outcome prediction due to a leakage of metabolites and proteins into the CSF subsequent to SCI (Pouw et al., 2009).

Some potential prognostic indicators for SCI in CSF of dogs are already identified, however further investigations are warranted (Chamisha et al., 2015, Levine et al., 2006, Levine et al., 2010, Nagano et al., 2011, Roerig et al., 2013, Srugo et al., 2011, Witsberger et al., 2012).

Tau protein is a microtubule-associated protein localized predominately in the axonal compartment of neuronal cells in the central nervous system (CNS) (Binder et al., 1985, Schoenfeld & Obar, 1994, Sergeant et al., 2005). In human medicine, tau protein serves as a biomarker for Alzheimer's disease and as a diagnostic tool in several neurodegenerative disorders called tauopathies (Blennow et al., 1995, Molinuevo et al., 2014, Otto et al., 1997). Furthermore, an elevation of total (phosphorylated and non-phosphorylated) tau protein in CSF was found in humans with traumatic brain injury and ischemic stroke associated with axonal damage (Hesse et al., 2001, Wunderlich et al., 2006, Zemlan et al., 1999). Roerig et al. (2013) measured total tau protein in the CSF of dogs with IVDH and could associate tau protein levels with the severity of neurological signs after SCI and concluded that tau protein may serve as a prognostic indicator of dogs with IVDH (Roerig et al., 2013).

Macrophage inflammatory protein-3 β (MIP-3 β), also known as (C-C motif) ligand 19 (CCL19) is able to react with CC chemokine receptor 7 (CCR7) which is expressed by semi-mature and mature dendritic cells and several types of B- und T cells (Forster et al., 2008, Yoshida et al., 1997). Furthermore, MIP-3 β is expressed in the blood brain barrier (Alt et al., 2002). In canine SCI, cytokine up-regulation seems to play an important role. The pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, TNF and TGF- β , were found to be up-regulated after SCI in dogs (Spitzbarth et al., 2011). MIP-3 β is classified as a homeostatic chemokine (Nelson & Krensky, 2001) with up-regulation in CNS inflammation (Krumbholz et al., 2007, Pashenkov

et al., 2003). Bartels et al. (2014) detected elevated MIP-3 β levels in CSF of dogs with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases including IVDH.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the major intermediate filament of mature astrocytes in the CNS and is important for astrocytic motility and structure (Eng, 1985, Eng et al., 2000). Astrocytes react to CNS injury with reactive astrogliosis, which leads to GFAP up-regulation and proliferation of astrocytes (Eddleston & Mucke, 1993, Sofroniew, 2009, Sofroniew & Vinters, 2010). In dogs with SCI GFAP up-regulation and de-novo-expression is present in spinal cord endymal layer (Moore & Oglesbee, 2014). Elevated GFAP levels in CSF were ascribed to glial cell injury and tissue destruction (Guez et al., 2003, Hjalmarsson et al., 2014) or reactive astrogliosis (Giovannoni, 2006). An elevation of GFAP levels in canine CSF was detected in dogs with necrotizing meningoencephalitis (Toda et al., 2007). To the authors knowledge GFAP was not measured before in CSF of dogs with SCI. However, Sato et al. (2013) detected elevated GFAP levels in serum of dogs with myelomalacia and assumed a release into serum as a consequence of blood-spinal cord barrier disruption.

The hypotheses should be proven in this prospective study were that tau protein, MIP-3 β , and GFAP a) are released into the CSF of dogs with SCI, b) their concentrations are associated with neurological signs, c) can be correlated with the functional outcome of dogs with SCI, and d) that a combination of the biomarkers could enhance the predictive value for improvement of neurological signs.

Material and Methods

Study population

Dogs with SCI of the Department of Small Animal Medicine and Surgery, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany were prospectively enrolled between Dec 2012 and Jul 2015. Dogs were included in the study when they were paraplegic due to a SCI in the T3-L3 spinal cord segments, a body weight of less than 20 kg and collection of CSF. Diagnosis of IVDH and vertebral fracture was confirmed in all dogs via Magnetic Resonance Imaging (MRI; Philips Medical Systems, 3.0 Tesla, Netherlands) and surgery. Dogs were classified according to the severity of their neurologic deficits using the grading system of Sharp and Wheeler (2005): spinal hyperesthesia without neurologic deficits (grade 1), ambulatory paraparesis (grade 2), non-ambulatory paraparesis (grade 3), paraplegia with intact DPP

4 Ergebnisse

(grade 4) and without DPP (grade 5). Forty-nine dogs fulfilled the inclusion criteria. Dogs with an acute/subacute (≤ 28 days; $n = 36$) and chronic (> 28 days; $n = 13$) SCI were included and their results evaluated separately.

Improvement of dogs with acute/subacute SCI of at least one grade according to Sharp and Wheeler (2005) within four weeks was defined as improvement of neurological signs. After this time-period new treatment strategies were studied in dogs without an improvement of neurological signs. In dogs with chronic SCI an improvement was not likely to occur, so these dogs were excluded of statistical analysis for an improvement of neurological signs. CSF samples of seven healthy Beagle dogs served as controls (animal experiment number: 33.9-42502-05-14A453).

Cerebrospinal fluid

CSF was obtained prior to decompressive surgery from the cerebellomedullary cistern and lumbar subarachnoidal space under general anesthesia. CSF from the cerebellomedullary cistern could be acquired in 34/36 acute/subacute and 13/13 chronic paraplegic dogs and from all seven control dogs. Biochemical analysis of lumbar CSF was possible in 11/36 acute/subacute and 3/13 chronic paraplegic dogs and 3/6 control dogs. The remaining samples needed to be excluded from the analysis due to blood contamination or too low sample volume. Routine examination (red and white blood cell count, glucose and protein concentration) of CSF was performed in all samples immediately after CSF acquisition. For further measurements, CSF was centrifuged for 10 minutes at $2.000 \times g$ and stored in polypropylene tubes at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Biochemical analysis

Tau protein, MIP-3 β , and GFAP were analyzed using Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA). Three commercially available kits were used according to the manufactures' instructions. Details on the specific assays are given below. CSF samples and antibody solutions were added to the pre-coated ELISA strips. In these ELISAs Streptavidin/Avidin horseradish peroxidase was provided to transfer the substrate tetramethylbenzidine. This change of color was stopped with sulfuric acid. The optical density was assessed spectrophotometrically at 450 nm (Biotek Synergy 2, Winooski, VT, USA) and plotted to sample concentration with the Gen 5 software package (Biotek, Winooski, VT, USA). All

4 Ergebnisse

samples were measured in a dual approach and the mean of measurements was used in case of a coefficient of variation below 20 %. Repeated measurement of CSF samples was performed when coefficient of variation was above 20 % as recommended in manufacturers' instructions. CSF was diluted for MIP-3 β and GFAP measurement 1:3 if concentrations were above the limit of detection.

For determination of tau protein concentrations in the collected CSF the INNOTEST hTAU Ag ELISA (Fujirebio Europe N.V., Ghent, Belgium) was used. This ELISA detects phosphorylated and non-phosphorylated human tau protein (total tau) and is validated for dogs with a detection limit of 18.5 pg/mL (Tanaka et al., 2012). Concentrations below this limit were assessed as 0 pg/mL.

The ELISA for the determination of canine MIP-3 β (Cloud-Clone Corporation, Houston, TX, USA) has a detection range of 15.6-1000 pg/mL. If the concentration of MIP-3 β in CSF was above the detection limit samples were diluted with 0.01 mol/L phosphate buffered saline (PBS; pH = 7.0-7.2).

The GFAP ELISA used (BioVendor, Heidelberg, Germany) specifically detects human GFAP. However, Toda et al. (2007) validated this ELISA for measurements in dogs. The provided detection range is 0.25-25 ng/mL.

Statistical Analysis

All data were analyzed using SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina). Normal distribution of all obtained data was tested with Kolmogorov-Smirnov normality test. Since in cisternal CSF concentrations the null hypothesis was confirmed, non-parametrical tests were used (Kruskal-Wallis and Wilcoxon's two sample tests). Lumbar CSF samples were consistent with a Gaussian distribution and parametrical t-test was used. For paired observations Wilcoxon's signed rank test was used. Cut-off values with corresponding sensitivity and specificity for negative outcome of dogs were assessed using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The cut-off that maximized the Youden Index (sensitivity + specificity - 1) was selected as optimal. A Pearson and Spearman correlation analysis was performed to test the correlation of biomarkers with severity of neurological deficits. To test all three CSF biomarkers together a binary logistic regression was used. A backward stepwise approach on the basis of the Wald's test was used for evaluation of the ability of the combination for outcome prediction. P-values <0.05 were considered to be

significant. For graphical representation of the results GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA) was used.

Results

Study population

Forty-nine paraplegic dogs were classified as grade 4 (n = 21) and grade 5 (n = 28) according to the presence or absence of DPP. The median age was 5 years (range 2-16 years). The most commonly affected breeds were Dachshund (24/49; 49.0 %) and French bulldog (10/49; 20.4 %). Detailed information about sex, breed, duration and cause of neurological signs is provided in Table 1. The control dogs consisted of seven healthy Beagle dogs with a median age of 2 years (range 1-6 years) of which 3 were male, 1 castrated male, 2 female, and 1 spayed female.

Table 1: Signalement, duration and severity of clinical signs of 49 dogs with spinal cord injury (SCI).

	n	%
Neurological deficits		
○ Grade 4		
Acute/subacute SCI	19	38.78
Chronic SCI	2	4.08
○ Grade 5		
Acute/subacute SCI	17	34.69
Chronic SCI	11	22.45
Sex		
○ Male	15	30.61
○ Male neutered	12	24.49
○ Female	15	30.61
○ Female spayed	7	12.24
Breed		
○ Dachshund	24	49.00
○ French Bulldog	10	20.41
○ Mixed breed	7	14.29
○ Others	8	16.33
Duration of paraplegia		
○ Acute (1-4 days)	29	59.18
○ Subacute (5-28 days)	7	14.29
○ Chronic (3-13 months)	13	26.53
Cause of SCI		
○ Intervertebral disc herniation	46	93.88
○ Vertebral fracture	3	6.12

4 Ergebnisse

Comparison of CSF biomarker concentrations in paraplegic and control dogs

In paraplegic dogs, tau protein was detectable in 31/47 cisternal and in 14/14 lumbar CSF samples as well as 3/7 cisternal and in 0/3 lumbar CSF samples of the control dogs. Median and range of tau protein concentrations are provided in table 2 and 3.

Table 2: Tau protein, MIP-3 β , and GFAP concentrations in dogs with SCI and control dogs in cisternally acquired CSF samples. Sample (n) volume restricted measurement of all biomarkers in some dogs. Data is provided as median (range).

	Tau protein (pg/mL)		MIP-3 β (pg/mL)		GFAP (ng/mL)	
	Acute/subacute SCI	Chronic SCI	Acute/subacute SCI	Chronic SCI	Acute/subacute SCI	Chronic SCI
Control	n=7 0 (0-35.7)		n=7 69.25 (0-120.4)		n=7 0.6 (0.4 - 1.1)	
Grade 4	n=17 36.5 (0-239.8)	n=13 24 (0-91.5)	n=14 165.4 (85.8-1013.5)	n=13 95.8 (0-461.2)	n=14 0.7 (0.3-38)	n=11 1.3 (0.3-12)
Grade 5	n=17 51.6 (0-323.8)		n=16 386.3 (40.8-1551.7)		n=14 1.8 (0.2-18)	

SCI = spinal cord injury, CSF = cerebrospinal fluid, MIP-3 β = macrophage inflammatory protein-3 β , GFAP = glial fibrillary acidic protein, pg = picogram, ng = nanogram, mL = milliliter

Tau protein concentrations were correlated with severity of neurological signs (cisternal: p=0.0326; lumbar: p=0.0129). Dogs with acute/subacute SCI had a significantly higher tau protein concentration compared to control dogs in both cisternal (grade 4: p=0.0431; grade 5: p=0.0368) and lumbar (grade 4: p=0.0203; grade 5: p=0.0179) CSF (Figure 1).

4 Ergebnisse

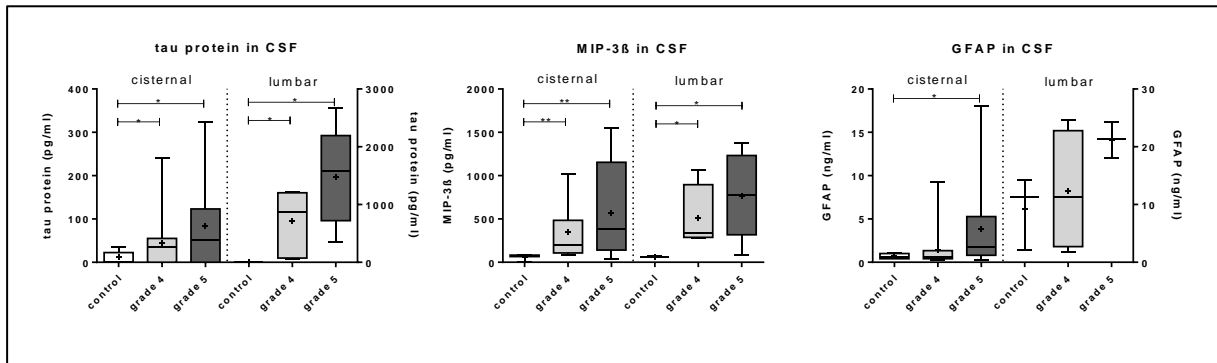


Figure 1: Comparison of tau protein, MIP-3 β , and GFAP concentrations in dogs with acute/subacute SCI and control dogs. Tau protein, MIP-3 β , and GFAP concentrations in paraplegic dogs with (grade 4) and without deep pain perception (DPP; grade 5). Cisternal and lumbar CSF tau protein and MIP-3 β concentrations are significantly higher in grade 4 and grade 5 compared to the control dogs. Cisternal CSF concentrations of GFAP in dogs with grade 5 are significantly higher than that of control dogs. No association was found for lumbar GFAP concentrations. Boxes display values from 25th to 75th percent quartile, line inside boxes indicate median, the endpoints of the vertical line indicate minimum and maximum. + indicate the mean and asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). MIP-3 β = macrophage inflammatory protein-3 β , GFAP = glial fibrillary acidic protein, CSF = cerebrospinal fluid, SCI = spinal cord injury, pg = picogram, ng = nanogram; mL = milliliter

In chronic SCI no significant differences were found between paraplegic dogs and control dogs in cisternal CSF ($p = 0.1403$). However, in lumbar CSF tau protein concentrations were significantly higher in paraplegic dogs compared to control dogs ($p = 0.0135$; Figure 2).

MIP-3 β was measurable in 41/43 cisternal and in 14/14 lumbar CSF samples of paraplegic dogs and in 6/7 cisternal and in 3/3 lumbar CSF samples of the control dogs. Median and range of MIP-3 β concentrations are listed in table 2 and 3.

4 Ergebnisse

Table 3: Tau protein, MIP-3 β , and GFAP concentrations in dogs with SCI and control dogs in lumbar CSF. Sample (n) volume restricted measurement of all biomarkers in some dogs. Data is provided as median (range).

	Tau protein (pg/mL)		MIP-3 β (pg/mL)		GFAP (ng/mL)	
	Acute/subacute SCI	Chronic SCI	Acute/subacute SCI	Chronic SCI	Acute/subacute SCI	Chronic SCI
Control	n=3 0 (0-0)		n=3 65.3 (60.4-73.2)		n=3 11.4 (2.2-14.2)	
Grade 4	n=6 879.5 (59.6-1224.4)	n=3 60.4 (44.2-66.7)	n=5 380.7 (283.3-1067.7)	n=3 204.3 (140.5-224.2)	n=4 11.4 (1.8-24.6)	n=3 14.2 (8.4-27.6)
Grade 5	n=5 1574 (348.8-2676.2)		n=6 780.5 (84.4-1373.5)		n=2 14.1 (12-16.2)	

SCI = spinal cord injury, CSF = cerebrospinal fluid, MIP-3 β = macrophage inflammatory protein-3 β , GFAP = glial fibrillary acidic protein, pg = picogram, ng = nanogram, mL = milliliter

In dogs with acute/subacute SCI, cisternal MIP-3 β was significantly higher in grade 4 ($p=0.0003$) and 5 ($p=0.0019$) compared to control dogs. In lumbar CSF corresponding results were found with significantly higher concentrations of MIP-3 β in grade 4 ($p=0.0396$) and grade 5 ($p=0.0215$) compared to control dogs. A correlation of MIP-3 β concentrations in cisternal and lumbar CSF with severity of neurological deficits was found (cisternal: $p=0.0005$; lumbar: $p=0.0288$; Figure 1).

In dogs with chronic SCI, no differences were found in MIP-3 β concentrations compared to the control dogs in cisternal CSF ($p=0.5508$). However, lumbar MIP-3 β concentrations were significantly elevated in paraplegic dogs compared to control dogs ($p=0.0370$; Figure 2).

4 Ergebnisse

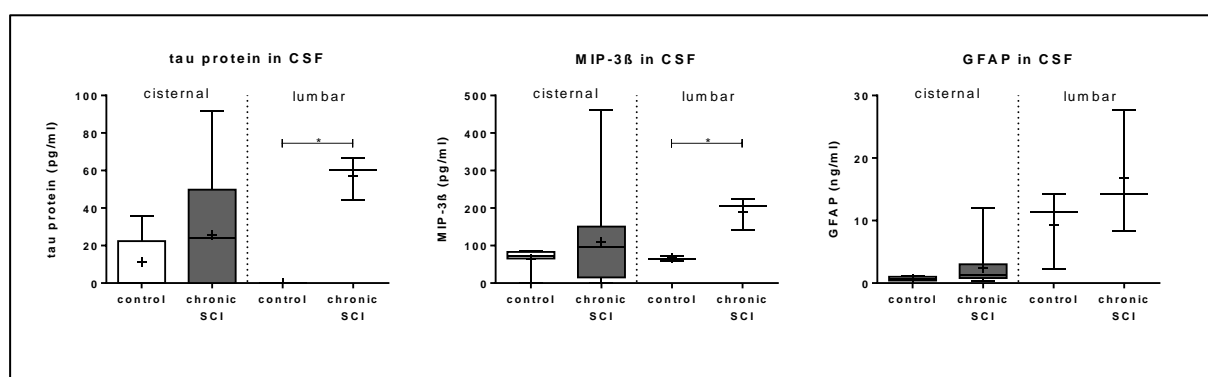


Figure 2: Comparison of tau protein, MIP-3 β , and GFAP concentrations in dogs with chronic SCI (grade 4 and 5) and control dogs. Lumbar CSF tau protein and MIP-3 β concentrations are significantly elevated compared to control dogs. Boxes display values from 25th to 75th percent quartile, line inside boxes indicate median, the endpoints of the vertical line indicate minimum and maximum. + indicate the mean and asterisks indicate statistically significant differences (* p <0.05; ** p <0.01). MIP-3 β = macrophage inflammatory protein-3 β , GFAP = glial fibrillary acidic protein, CSF = cerebrospinal fluid, SCI = spinal cord injury, pg = picogram, ng = nanogram; mL = mililiter

GFAP was measurable in all cisternal ($n = 39$) and all lumbar ($n = 9$) samples of paraplegic dogs and in all samples of control dogs (cisternal: $n = 7$; lumbar: $n = 3$). Median and range of GFAP concentrations are listed in table 2 and 3. In dogs with acute/subacute SCI, cisternal GFAP concentrations of dogs with grade 5 were significantly higher compared to the control dogs ($p=0.0253$). No significant differences were found for lumbar GFAP concentrations in paraplegic dogs compared to control dogs (Figure 1). Additionally, lumbar GFAP concentrations did not correlate with severity of neurological deficits ($p=0.5075$).

No difference in GFAP concentrations were found in the CSF of dogs with chronic SCI compared to the control dogs (Figure 2).

Comparison of CSF biomarker concentrations in acute/subacute and chronic SCI

Comparing tau protein concentrations in CSF of dogs with acute/subacute and chronic SCI, significantly lower lumbar tau protein concentrations were found in dogs with chronic SCI ($p=0.0014$). In cisternal CSF this difference was only found in paraplegic dogs without DPP (grade 5; $p=0.0415$; Figure 3).

4 Ergebnisse

MIP-3 β concentrations were significantly lower in dogs with chronic SCI compared to dogs with acute/subacute SCI in cisternal ($p=0.0017$) and in lumbar ($p=0.0066$) CSF (Figure 3).

GFAP concentrations did not vary between dogs with acute/subacute and chronic SCI ($p=0.6615$; Figure 3).

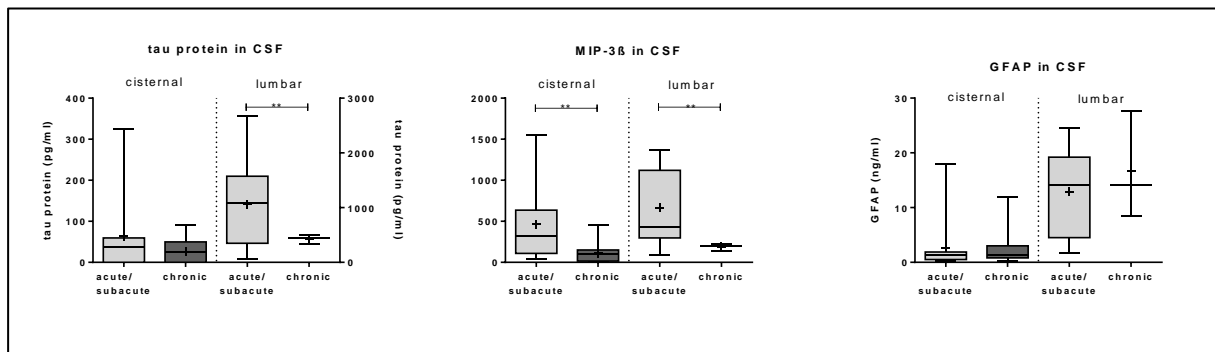


Figure 3: Comparison of tau protein, MIP-3 β , and GFAP concentrations in dogs with acute/subacute (grade 4 and 5) and chronic SCI (grade 4 and 5). Lumbar tau protein and cisternal and lumbar MIP-3 β CSF concentrations were significantly lower in dogs with chronic SCI compared to acute/subacute SCI. No difference was found in CSF GFAP concentrations. Boxes display values from 25th to 75th percent quartile, line inside boxes indicate median, the endpoints of the vertical line indicate minimum and maximum. + indicate the mean and asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). MIP-3 β = macrophage inflammatory protein-3 β , GFAP = glial fibrillary acidic protein, CSF = cerebrospinal fluid, SCI = spinal cord injury, pg = picogram, ng = nanogram; mL = milliliter

Comparison of biomarker concentrations in cisternal and lumbar CSF

Lumbar CSF tau protein, MIP-3 β and GFAP concentrations were significantly higher than cisternal CSF concentrations in dogs with acute/subacute SCI (Figure 4). In dogs with chronic SCI lumbar tau protein, MIP-3 β , and GFAP concentrations tended to be gradually higher than in cisternal CSF but a statistical analysis was prevented by too low sample numbers.

A difference in site of CSF acquisition was not detectable for tau protein and MIP-3 β concentrations of healthy Beagle dogs. However, lumbar GFAP concentrations of healthy Beagle dogs were also higher than cisternal concentrations (Table 2 and 3). A statistical analysis was not possible due to the low number of control dogs.

4 Ergebnisse

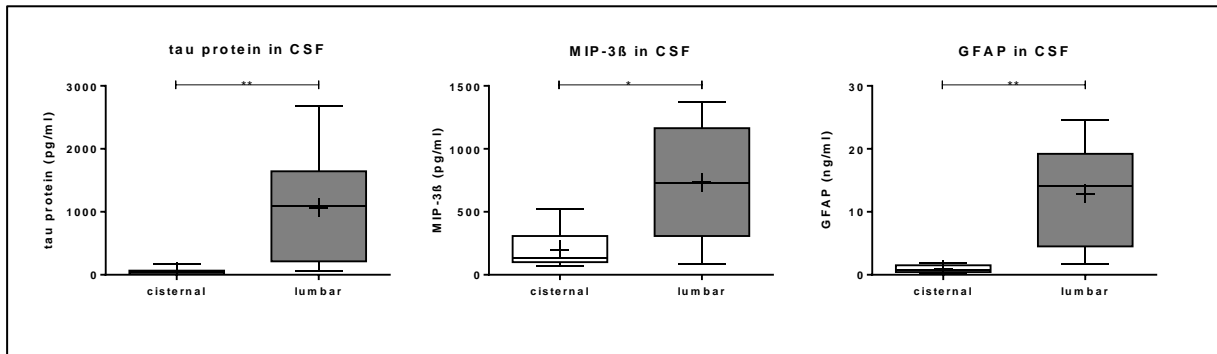


Figure 4: Comparison of CSF tau protein, MIP-3β, and GFAP concentrations from cisternal and lumbar puncture. Tau protein, MIP-3β and GFAP concentration of dogs with acute/subacute SCI (grade 4 and 5) were significantly higher in lumbar CSF compared to cisternal CSF samples. Boxes display values from 25th to 75th percent quartile, line inside boxes indicate median, the endpoints of the vertical line indicate minimum and maximum. + indicate the mean and asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). MIP-3β = macrophage inflammatory protein-3β, GFAP = glial fibrillary acidic protein, CSF = cerebrospinal fluid, SCI = spinal cord injury, pg = picogram, ng = nanogram; mL = milliliter

Comparison of CSF biomarker concentrations in paraplegic dogs with and without improvement of neurological signs

Dogs with a neurological improvement of at least one grade according to Sharp and Wheeler (2005) within four weeks after surgery tended to have lower tau protein, MIP-3β and GFAP concentrations in cisternal CSF than dogs that showed no improvement of neurological signs (Figure 5).

4 Ergebnisse

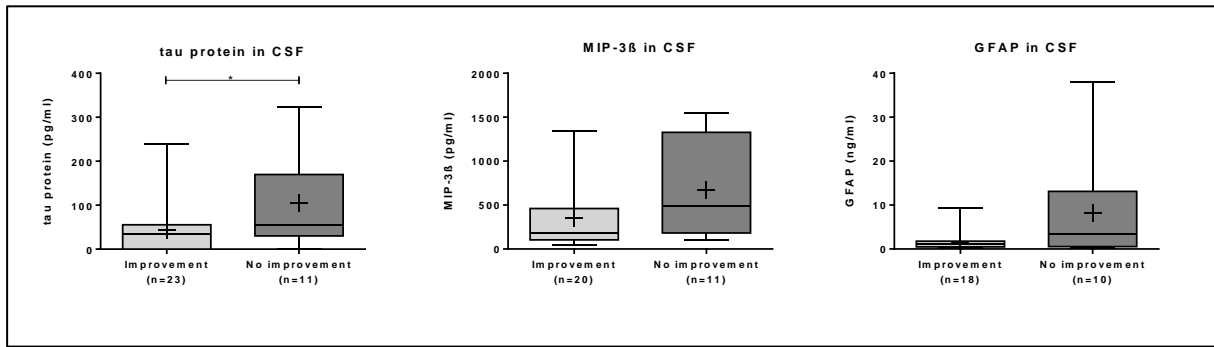


Figure 5: Comparison of CSF tau protein, MIP-3 β , and GFAP concentrations in paraplegic dogs (grade 4 and 5) with and without improvement of neurological signs. Cisternal CSF tau protein, MIP-3 β and GFAP concentrations were lower in dogs with improvement of neurological signs. However, a significant difference could only be detected for tau protein concentrations. Boxes display values from 25th to 75th percent quartile, line inside boxes indicate median, the endpoints of the vertical line indicate minimum and maximum. + indicate the mean and asterisks indicate statistically significant differences (* p <0.05; ** p <0.01). MIP-3 β = macrophage inflammatory protein-3 β , GFAP = glial fibrillary acidic protein, CSF = cerebrospinal fluid, SCI = spinal cord injury, pg = picogram, ng = nanogram; mL = milliliter

ROC analysis suggested cut-off values of all three biomarkers for negative outcome of neurological signs of which sensitivity, specificity, AUC and p-values are shown in table 4. Only cisternal tau protein concentrations were able to discriminate between dogs with and without improvement of neurological signs (grade 4 + 5: p =0.0359 and grade 5: p =0.0161; Table 4).

Table 4: Cut-off values with corresponding sensitivity and specificity of tau protein, MIP-3 β and GFAP suggested by ROC curve analysis that could predict negative outcome.

	Grade 4 + 5			Grade 5		
	Tau (pg/mL)	MIP-3 β (pg/mL)	GFAP (ng/mL)	Tau (pg/mL)	MIP-3 β (pg/mL)	GFAP (ng/mL)
Cut-off value	>49.15	>146.6	>3.35	>43.70	>580.6	>3.35
Sensitivity (%)	72.7	90.0	50.0	87.5	50.0	57.1
Specificity (%)	73.9	50.0	94.4	77.8	87.5	100.0
AUC	0.725	0.695	0.661	0.847	0.656	0.714
p-value	0.036	0.086	0.164	0.016	0.294	0.180

Tau = tau protein, MIP-3 β = macrophage inflammatory protein-3 β , GFAP = glial fibrillary acidic protein, pg = picogram, ng = nanogram, mL = milliliter, ROC = receiver operating characteristic, AUC = area under the curve

The combination of all the biomarkers did not increase the predictive value for an improvement of neurological signs ($R^2=0.3026/p=0.1208$).

Discussion

The estimation of a reliable prognosis in dogs with paraplegia is especially challenging when they lost DPP (Jeffery et al., 2013, Jeffery et al., 2016). The evaluation of prognostic indicators in canine CSF is promising due to a possible leakage of cellular proteins or metabolites into the CSF after SCI (Pouw et al., 2009). Several studies tried to evaluate CSF biomarkers for SCI with promising results (Chamisha et al., 2015, Levine et al., 2006, Srugo et al., 2011, Witsberger et al., 2012). Tau protein, MIP-3 β and GFAP are all substances that are released in case of tissue destruction. This study aimed to prove that a) tau protein, MIP-3 β , and GFAP are released into the CSF of dogs with SCI, b) concentrations reflect injury severity, c) can be correlated with the outcome of dogs with SCI, and d) that a combination of all three biomarkers could enhance the predictive value for an improvement of neurological signs.

The results of the current study verified a release of tau protein, MIP-3 β and GFAP into the CSF of dogs with SCI. This release can be due to physical damage (compression and contusion) of the spinal cord at the time of injury and during secondary injury processes. This secondary injury processes are originated by the initial impact to the spinal cord (Anderson & Hall, 1993). The disruption of the blood flow can lead to ischemia and/or hemorrhage. Other processes include electrolyte shift, edema, inflammation and formation of free radicals (Anderson & Hall, 1993, Zhou et al., 2014). This secondary wave of spinal cord injury can enlarge the lesion and the damage to the spinal cord (Oyinbo, 2011) and may also lead to further release of tau protein, MIP-3 β and GFAP into the CSF.

Tau protein is localized predominately in the axonal compartment of neuronal cells (Binder et al., 1985, Schoenfeld & Obar, 1994) and is thought to be a good marker of axonal damage (Hesse et al., 2001, Zemlan et al., 1999). Total tau protein release into the CSF is even thought to be proportional to the neurologic deficits after IVDH (Roerig et al., 2013). In the current study tau protein levels of dogs with acute/subacute SCI were significantly higher compared to healthy dogs and were correlated with injury severity. The release of tau protein is described to be rapid after human SCI and is already decreasing within the first 72 hours

4 Ergebnisse

post injury (Kwon et al., 2010). Correspondingly, we could find significantly lower lumbar tau protein concentrations in dogs with chronic SCI than in dogs with acute/subacute SCI, which is considered to be related to decompressive surgery performed several weeks prior to CSF acquisition. In dogs with chronic SCI the cisternal tau protein concentrations were very low, but lumbar tau protein concentrations were still elevated compared to the control dogs. This elevation can be considered to be due to neuronal cell death during chronic wave of secondary injury processes (Oyinbo, 2011). The ROC curve analysis suggested an optimal CSF cut-off value of > 43.70 pg/mL for tau protein in dogs with grade 5 with a sensitivity and specificity of 87.5 % and 77.8 % respectively, meaning that 87.5 % of the dogs with CSF tau protein concentration above this cut-off value did not show an improvement of neurological signs. CSF tau protein is therefore a significant and sensitive biomarker, particularly in dogs with grade 5 that can support prediction of improvement of neurological signs.

MIP-3 β is a cytokine that is expressed at the blood-brain-barrier (Alt et al., 2002). Several cytokines that are involved after CNS injury are identified. These cytokines can enhance inflammation and cell injury and can also be involved in tissue regeneration processes (Spitzbarth et al., 2012). In dogs with acute/subacute SCI significantly higher MIP-3 β concentrations in CSF were detected compared to the control dogs indicating the inflammatory response after SCI in dogs. The results of the current study corroborate with the findings of Bartels et al. (2014) who detected increased MIP-3 β concentrations in canine IVDH. Additionally, we measured significantly lower MIP-3 β concentrations in dogs with chronic SCI compared to dogs with acute/subacute SCI, which can be considered to be related to a down-regulation of MIP-3 β in chronic phase of SCI, as already shown for some pro-inflammatory cytokines (Spitzbarth et al., 2011, Spitzbarth et al., 2012). However, lumbar MIP-3 β concentrations of dogs with chronic SCI were still higher than the concentrations of control dogs. This indicates that slight inflammatory processes are still present in chronic SCI. Inflammatory processes are mostly present in the subacute phase (minutes to weeks after SCI) of secondary injury, however inflammation may overlap into chronic phase of SCI (Oyinbo, 2011). The ROC curve analysis suggested an optimal CSF cut-off value of > 580.6 pg/mL for MIP-3 β concentration in dogs with grade 5 with a sensitivity of 50.0 % and a specificity of 87.5 % meaning that if MIP-3 β concentration was below this value the percentage of functional recovery was 87.5 %.

4 Ergebnisse

GFAP is the major filament of differentiated astrocytes (Eng, 1985) that is up-regulated in astrocytes after CNS injury (Eddleston & Mucke, 1993, Sofroniew, 2009, Sofroniew & Vinters, 2010). In human SCI a severity dependent increase of the GFAP concentration in CSF was found (Guez et al., 2003, Kwon et al., 2010, Winnerkvist et al., 2007). The cisternal GFAP concentration was also correlated with the severity of neurological deficits in the current study. We could detect significantly higher cisternal GFAP levels in dogs with acute/subacute SCI and grade 5 compared to healthy dogs. By comparing CSF GFAP concentrations in dogs with grade 4 to control group no significant difference was detected, even though cisternal CSF concentrations of dogs with grade 4 tended to be higher than in the control group. No differences in GFAP levels in lumbar CSF could be detected. This can be due to a low number of lumbar taps. Moreover, lumbar GFAP concentrations of the control group tended to be higher than the concentration after cisternal CSF acquisition (Table 2 and 3). Kwon et al. (2010) described a longitudinal decrease of GFAP concentration within the first 72 hours after human SCI. Thus, GFAP concentration of dogs with chronic SCI should be lower than those of acute/subacute SCI. Surprisingly, no difference in GFAP levels between acute/subacute and chronic SCI were detected in the current study. Glial scar formation may occur after severe SCI. These scars are usually irreversible and GFAP is upregulated in those astrocytes (Sofroniew, 2009). A leakage of GFAP from astrogliosis and glial scars into the CSF (Giovannoni, 2006) could explain similar GFAP levels between acute/subacute and chronic SCI. The ROC curve analysis suggested an optimal CSF cut-off value of > 3.35 pg/mL for GFAP in dogs with grade 5. Although a sensitivity of only 57.14 % was reached the specificity reached 100 %, meaning that all dogs with a GFAP concentration below this cut-off value showed an improvement of neurological signs.

The results of the current study also revealed, that the site of CSF acquisition is fundamental in the interpretation of CSF analysis. Lumbar CSF tau protein, MIP-3 β and GFAP concentrations were significantly higher than cisternal concentrations in dogs with acute/subacute SCI. Furthermore, elevated levels of tau protein and MIP-3 β of dogs with chronic SCI compared to the healthy controls were only detectable in lumbar CSF. These findings are confirmed by Thomson et al. (1989) who detected higher total nucleated cell counts and protein concentrations in lumbar CSF of dogs with thoracolumbar IVDH compared to cisternal CSF samples due to the caudal direction of the CSF flow in the spinal

canal (de Lahunta & Glass, 2009, Thomson et al., 1989). Additionally, the release and expression of these substances is probably higher in the thoracolumbar segment, which can also explain the results of the current study.

Conclusion

In the current study it could be shown that tau protein, MIP-3 β , and GFAP are released into the CSF after SCI. The cisternal CSF tau protein and GFAP concentrations may serve as prognostic indicators for improvement of neurological signs in paraplegic dogs with SCI, especially in those that lost DPP. CSF tau protein and GFAP concentrations may also help to identify dogs that are unlikely to show functional improvement and therefore require new treatment strategies.

Acknowledgement

This study was funded by the German Research Foundation (DFG, FOR TI 309/4-2). The authors want to thank Dr. Rohn (Department of Epidemiology and Information Processing, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany) for assistance with the statistical analysis.

References

- Alt, C., M. Laschinger and B. Engelhardt, 2002: Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*, **32**, 2133-2144.
- Anderson, D. K. and E. D. Hall, 1993: Pathophysiology of spinal cord trauma. *Annals of Emergency Medicine*, **22**, 987-992.
- Bartels, J., B. G. Darrow, S. J. Schatzberg, L. Bu, R. Carlson and A. Tipold, 2014: MIP-3 β /CCL19 is associated with the intrathecal invasion of mononuclear cells in neuroinflammatory and non-neuroinflammatory CNS diseases in dogs. *BMC Veterinary Research*, **10**, 157.
- Binder, L. I., A. Frankfurter and L. I. Rebhun, 1985: The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *The Journal of Cell Biology*, **101**, 1371-1378.

- Blennow, K., A. Wallin, H. Agren, C. Spenger, J. Siegfried and E. Vanmechelen, 1995: Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Molecular and Chemical Neuropathology*, **26**, 231-245.
- Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte and P. R. Hof, 2000: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, **33**, 95-130.
- Chamisha, Y., I. Aroch, S. Kuzi, I. Srugo, T. Bdolah-Abram, O. Chai, M. M. Christopher, Y. Merbl, K. Rothwell and M. H. Shamir, 2015: The prognostic value of cerebrospinal fluid characteristics in dogs without deep pain perception due to thoracolumbar disc herniation. *Research in Veterinary Science*, **100**, 189-196.
- de Lahunta, A. and E. Glass, 2009: Cerebrospinal Fluid and Hydrocephalus. In: A. de Lahunta and E. Glass (eds.), *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*, 3rd edition, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 54-76.
- Eddleston, M. and L. Mucke, 1993: Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, **54**, 15-36.
- Eng, L. F., 1985: Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, **8**, 203-214.
- Eng, L. F., R. S. Ghirnikar and Y. L. Lee, 2000: Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, **25**, 1439-1451.
- Fluehmann, G., M. G. Doherr and A. Jaggy, 2006: Canine neurological diseases in a referral hospital population between 1989 and 2000 in Switzerland. *The Journal of Small Animal Practice*, **47**, 582-587.
- Forster, R., A. C. Davalos-Miszlitz and A. Rot, 2008: CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, **8**, 362-371.
- Giovannoni, G., 2006: Multiple sclerosis cerebrospinal fluid biomarkers. *Disease Markers*, **22**, 187-196.
- Guez, M., C. Hildingsson, L. Rosengren, K. Karlsson and G. Toolanen, 2003: Nervous tissue damage markers in cerebrospinal fluid after cervical spine injuries and whiplash trauma. *Journal of Neurotrauma*, **20**, 853-858.
- Hesse, C., L. Rosengren, N. Andreasen, P. Davidsson, H. Vanderstichele, E. Vanmechelen and K. Blennow, 2001: Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neuroscience Letters*, **297**, 187-190.

Hjalmarsson, C., M. Bjerke, B. Andersson, K. Blennow, H. Zetterberg, N. D. Aberg, B. Olsson, C. Eckerstrom, L. Bokemark and A. Wallin, 2014: Neuronal and glia-related biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke. *Journal of Central Nervous System Disease*, **6**, 51-58.

Janke, C., M. Beck, T. Stahl, M. Holzer, K. Brauer, V. Bigl and T. Arendt, 1999: Phylogenetic diversity of the expression of the microtubule-associated protein tau: implications for neurodegenerative disorders. *Molecular Brain Research*, **68**, 119-128.

Jeffery, N. D., A. K. Barker, H. Z. Hu, C. J. Alcott, K. H. Kraus, E. M. Scanlin, N. Granger and J. M. Levine, 2016: Factors associated with recovery from paraplegia in dogs with loss of pain perception in the pelvic limbs following intervertebral disk herniation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **248**, 386-394.

Jeffery, N. D., J. M. Levine, N. J. Olby and V. M. Stein, 2013: Intervertebral disk degeneration in dogs: consequences, diagnosis, treatment, and future directions. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **27**, 1318-1333.

Krumbholz, M., D. Theil, F. Steinmeyer, S. Cepok, B. Hemmer, M. Hofbauer, C. Farina, T. Derfuss, A. Junker, T. Arzberger, I. Sinicina, C. Hartle, J. Newcombe, R. Hohlfeld and E. Meinel, 2007: CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuroimmunology*, **190**, 72-79.

Kwon, B. K., A. M. Stammers, L. M. Belanger, A. Bernardo, D. Chan, C. M. Bishop, G. P. Slobogean, H. Zhang, H. Umedaly, M. Giffin, J. Street, M. C. Boyd, S. J. Paquette, C. G. Fisher and M. F. Dvorak, 2010: Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and biomarkers of injury severity in acute human spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, **27**, 669-682.

Levine, G. J., J. M. Levine, T. H. Witsberger, S. C. Kerwin, K. E. Russell, J. Suchodolski, J. Steiner and G. T. Fosgate, 2010: Cerebrospinal fluid myelin basic protein as a prognostic biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disk herniation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **24**, 890-896.

Levine, J. M., C. G. Ruaux, R. L. Bergman, J. R. Coates, J. M. Steiner and D. A. Williams, 2006: Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease. *American Journal of Veterinary Research*, **67**, 283-287.

Molinuevo, J. L., K. Blennow, B. Dubois, S. Engelborghs, P. Lewczuk, A. Perret-Liaudet, C. E. Teunissen and L. Parnetti, 2014: The clinical use of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: A consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimer's & Dementia*, **10**, 808-817.

4 Ergebnisse

- Moore, S. A. and M. J. Oglesbee, 2014: Spinal Cord Ependymal Responses to Naturally Occurring Traumatic Spinal Cord Injury in Dogs. *Veterinary Pathology*, **52**, 1108-1117.
- Nagano, S., S. H. Kim, S. Tokunaga, K. Arai, M. Fujiki and K. Misumi, 2011: Matrix metalloprotease-9 activity in the cerebrospinal fluid and spinal injury severity in dogs with intervertebral disc herniation. *Research in Veterinary Science*, **91**, 482-485.
- Nelson, P. J. and A. M. Krensky, 2001: Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity*, **14**, 377-386.
- Otto, M., J. Wiltfang, H. Tumani, I. Zerr, L. Maria, J. Kornhuber, T. Weber, H. A. Kretzschmar and S. Poser, 1997: Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt–Jakob disease. *Neuroscience Letters*, **225**, 210-212.
- Oyinbo, C. A., 2011: Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, **71**, 281-299.
- Pashenkov, M., M. Soderstrom and H. Link, 2003: Secondary lymphoid organ chemokines are elevated in the cerebrospinal fluid during central nervous system inflammation. *Journal of Neuroimmunology*, **135**, 154-160.
- Pouw, M. H., A. J. Hosman, J. J. van Middendorp, M. M. Verbeek, P. E. Vos and H. van de Meent, 2009: Biomarkers in spinal cord injury. *Spinal Cord*, **47**, 519-525.
- Roerig, A., R. Carlson, A. Tipold and V. M. Stein, 2013: Cerebrospinal fluid tau protein as a biomarker for severity of spinal cord injury in dogs with intervertebral disc herniation. *Veterinary Journal*, **197**, 253-258.
- Sato, Y., S. Shimamura, T. Mashita, S. Kobayashi, Y. Okamura, M. Katayama, H. Kamishina, R. Sato, Y. Uzuka and J. Yasuda, 2013: Serum glial fibrillary acidic protein as a diagnostic biomarker in dogs with progressive myelomalacia. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **75**, 949-953.
- Schoenfeld, T. A. and R. A. Obar, 1994: Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *International Review of Cytology*, **151**, 67-137.
- Sergeant, N., A. Delacourte and L. Buee, 2005: Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1739**, 179-197.
- Sharp, N. J. H. and S. J. Wheeler, 2005: Patient examination. In: *Small animal spinal disorders: diagnosis and surgery*, 2nd edition, Elsevier Mosby, Edinburgh, London, 19-33.

Smolek, T., A. Madari, J. Farbakova, O. Kandrak, S. Jadhav, M. Cente, V. Brezovakova, M. Novak and N. Zilka, 2015: Tau hyperphosphorylation in synaptosomes and neuroinflammation are associated with canine cognitive impairment. *The Journal of Comparative Neurology*, **524**, 874-895.

Sofroniew, M. V., 2009: Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, **32**, 638-647.

Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters, 2010: Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, **119**, 7-35.

Spitzbarth, I., W. Baumgartner and A. Beineke, 2012: The role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of spontaneous canine CNS diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **147**, 6-24.

Spitzbarth, I., P. Bock, V. Haist, V. M. Stein, A. Tipold, K. Wewetzer, W. Baumgartner and A. Beineke, 2011: Prominent microglial activation in the early proinflammatory immune response in naturally occurring canine spinal cord injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **70**, 703-714.

Srugo, I., I. Aroch, M. M. Christopher, O. Chai, L. Goralnik, T. Bdolah-Abram and M. H. Shamir, 2011: Association of cerebrospinal fluid analysis findings with clinical signs and outcome in acute nonambulatory thoracolumbar disc disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **25**, 846-855.

Stoothoff, W. H. and G. V. Johnson, 2005: Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1739**, 280-297.

Tanaka, N., M. Kitagawal, D. Ito, M. Okada, S. Ohta, K. Onol, H. Yamada and T. Wataril, 2012: Proceedings 24th Symposium ESVN-ECVN Trier, Germany 23rd–24th September 2011. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **26**, 823-852.

Thomson, C. E., J. N. Kornegay and J. B. Stevens, 1989: Canine intervertebral disc disease: Changes in the cerebrospinal fluid. *Journal of Small Animal Practice*, **30**, 685-688.

Toda, Y., N. Matsuki, M. Shibuya, I. Fujioka, S. Tamahara and K. Ono, 2007: Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-GFAP autoantibody in canine necrotising meningoencephalitis. *The Veterinary Record*, **161**, 261-264.

Winnerkvist, A., R. E. Anderson, L. O. Hansson, L. Rosengren, A. E. Estrera, T. T. Huynh, E. E. Porat and H. J. Safi, 2007: Multilevel somatosensory evoked potentials and cerebrospinal proteins: indicators of spinal cord injury in thoracoabdominal aortic aneurysm surgery. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, **31**, 637-642.

4 Ergebnisse

Witsberger, T. H., J. M. Levine, G. T. Fosgate, M. R. Slater, S. C. Kerwin, K. E. Russell and G. J. Levine, 2012: Associations between cerebrospinal fluid biomarkers and long-term neurologic outcome in dogs with acute intervertebral disk herniation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **240**, 555-562.

Wunderlich, M. T., H. Lins, M. Skalej, C. W. Wallesch and M. Goertler, 2006: Neuron-specific enolase and tau protein as neurobiochemical markers of neuronal damage are related to early clinical course and long-term outcome in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, **108**, 558-563.

Yoshida, R., T. Imai, K. Hieshima, J. Kusuda, M. Baba, M. Kitaura, M. Nishimura, M. Kakizaki, H. Nomiyama and O. Yoshie, 1997: Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 13803-13809.

Zemlan, F. P., W. S. Rosenberg, P. A. Luebke, T. A. Campbell, G. E. Dean, N. E. Weiner, J. A. Cohen, R. A. Rudick and D. Woo, 1999: Quantification of axonal damage in traumatic brain injury: affinity purification and characterization of cerebrospinal fluid tau proteins. *Journal of Neurochemistry*, **72**, 741-750.

Zhou, X., X. He and Y. Ren, 2014: Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, **9**, 1787-1795.

Zlotnik, A. and O. Yoshie, 2000: Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity*, **12**, 121-127.

5 Übergreifende Diskussion

Bei Hunden sind Bandscheibenvorfälle die Hauptursache für Rückenmarksverletzungen (Fluehmann et al., 2006). Die Vorhersage einer Regeneration der neurologischen Funktion ist bei paraplegischen Hunden, insbesondere bei solchen mit Verlust des Tiefenschmerzes, häufig schwierig und nicht verlässlich (Jeffery et al., 2013).

Verschiedene Studien befassten sich mit der Entwicklung von Biomarkern im CSF von Hunden mit Rückenmarksverletzungen (Chamisha et al., 2015, Levine et al., 2006, Levine et al., 2010, Srugo et al., 2011, Witsberger et al., 2012). In der vorliegenden Studie wurde der CSF paraplegischer Hunde mit akuter/subakuter und chronischer Rückenmarksverletzung durch biochemische Analysemethoden untersucht, um die prognostische Aussagekraft potentieller Biomarker zu überprüfen. Hierzu wurden die Hunde anhand ihrer neurologischen Defizite als Grad 4 (Paraplegie mit erhaltenem Tiefenschmerz) und Grad 5 (Paraplegie ohne Tiefenschmerz) gemäß Sharp und Wheeler (2005) eingeteilt und CSF aus der Cisterna magna und dem lumbalen Subarachnoidalraum entnommen. Mittels kommerziell erhältlicher ELISA wurden die Tau-Protein-, MIP-3 β - und GFAP-Konzentrationen in den jeweiligen Proben bestimmt. Eine vom Schweregrad der neurologischen Symptome abhängige Freisetzung dieser Substanzen und ihr Wert als prognostische Indikatoren wurden überprüft. Des Weiteren wurden mögliche Konzentrationsunterschiede in Abhängigkeit von dem Entnahmeort des CSF überprüft.

Die Anwendung des ELISA ermöglicht eine selektive und quantitative Messung der Substanzen im CSF. Um Störeinflüsse in der Methodik zu minimieren, wurden alle Proben im Zweifachansatz gemessen und nur Messwerte mit einem Variationskoeffizient von < 20 % verwendet. So konnte die Gefahr verringert werden, dass Pipettierfehler oder eine schlechte Durchmischung des Probenmaterials zu abweichenden Ergebnissen führen. Obwohl in der hier präsentierten Studie bei der Handhabung der CSF-Proben darauf geachtet wurde, war ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben nicht komplett zu vermeiden und ein Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studie ist nicht vollständig auszuschließen. Allerdings konnte eine Studie von Schoonenboom *et al.* (2005) zeigen, dass sich die Tau-Protein-Konzentration in humanem CSF über sechs Einfrier- und Auftauzyklen nicht veränderte.

5 Übergreifende Diskussion

Auch die unterschiedliche Lagerungsdauer des CSF von bis zu 3 Jahren könnte möglicherweise Einflüsse auf die Ergebnisse dieser Studie gehabt haben. Zumindest für Tau-Protein gibt es bereits Studien, die gezeigt haben, dass es auch bei Langzeit-Lagerung stabil ist (Schoonenboom et al., 2005).

Das Tau-Protein wird vor allem im axonalen Kompartiment der Neuronen exprimiert (Binder et al., 1985, Schoenfeld & Obar, 1994). Die Messung des totalen Tau-Proteins im CSF gilt als Quantifizierungsmöglichkeit einer axonalen Schädigung des zentralen Nervensystems (Hesse et al., 2001, Zemlan et al., 1999). Bei Menschen mit Rückenmarksverletzungen konnten Kwon et al. (2010) eine vom Schweregrad der neurologischen Defizite abhängige Freisetzung des Tau-Proteins in den CSF nachweisen. Auch Roerig et al. (2013) konnten eine Freisetzung des Tau-Proteins in den CSF von Hunden mit Bandscheibenvorfällen nachweisen. Auch hier konnte die Tau-Protein-Konzentration mit dem neurologischen Schweregrad der Defizite assoziiert werden (Roerig et al., 2013).

In die vorliegende Studie wurden nur paraplegische Hunde eingeschlossen, wobei Hunde mit akuten/subakuten und chronischen Rückenmarksverletzungen separat beurteilt wurden. Wie auch Roerig et al. (2013) zeigten, wiesen paraplegische Hunde mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung in vorliegender Studie im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere Tau-Protein-Konzentration im CSF auf, was vermutlich eine schwerwiegende axonale Schädigung im Rückenmark dieser Patienten widerspiegelt. Wie in vorherigen Studien (Kwon et al., 2010, Roerig et al., 2013) konnte auch in dieser Studie eine Korrelation der Tau-Protein-Konzentration mit dem Schweregrad der neurologischen Defizite gezeigt werden.

Auch die Tau-Protein-Konzentrationen von Hunden mit chronischer Rückenmarksverletzung waren im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, allerdings lediglich in lumbalem CSF. Chronische Sekundärschädigungsprozesse, wie Demyelinisierungen oder Apoptosen können auch Monate bis Jahre nach einer Rückenmarksverletzung ablaufen (Oyinbo, 2011). Diese Prozesse können einen weiteren Neuronenuntergang und axonalen Schaden verursachen (Oyinbo, 2011) und damit eine weitere Freisetzung des Tau-Proteins in den CSF bedingen. Studien von Thomson *et al.* (1989), Thomson *et al.* (1990) können herangezogen werden, um die höheren Tau-Protein-Konzentration im lumbalen CSF im Vergleich zum subokzipitalen

5 Übergreifende Diskussion

CSF zu erklären. Dem lumbalen CSF wird bei Hunden mit thorakolumbalen Diskopathie eine höhere Sensitivität gegenüber pathologischen Veränderungen zugeschrieben, was durch die kaudale Hauptflussrichtung des CSF erklärt wird (Thomson et al., 1989). Dieser Zusammenhang kann zudem als Erklärung für die alleinige Erhöhung der lumbalen MIP-3 β -Konzentration im CSF von Hunden mit chronischer Rückenmarksverletzung im Vergleich zur Kontrollgruppe herangezogen werden.

Bei Hunden mit chronischer Rückenmarksverletzung konnten in lumbalem CSF niedrigere Tau-Protein-Konzentrationen als bei Hunden mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen aus der Humanmedizin. In einer Studie von Kwon et al. (2010) konnte die höchste Tau-Protein-Konzentration zu Beginn der Untersuchung, acht Stunden nach Rückenmarksverletzung, gemessen werden und bereits in den ersten 72 Stunden danach wurde eine deutliche Abnahme der Tau-Protein-Konzentration im CSF festgestellt (Kwon et al., 2010). Als weitere Ursache kann angesehen werden, dass bei einem Großteil der Patienten mit chronischer Rückenmarksverletzung vor der Vorstellung in der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover bereits eine chirurgische Dekompression des Rückenmarks durchgeführt wurde. Daher bestand zum Zeitpunkt der CSF-Entnahme keine Kompression des Rückenmarks mehr und eine Verminderung des Ablaufs axonaler Schädigungsprozesse kann vermutet werden. Dies könnte die niedrigeren Tau-Protein-Konzentrationen im CSF von Hunden mit chronischer Rückenmarksverletzung erklären.

Für paraplegische Hunde ist die Entwicklung prognostischer Indikatoren ganz besonders interessant, da die Genesungsrate der Patienten mit zunehmendem Schweregrad sinkt (Salger et al., 2014) und bei Hunden ohne Tiefenschmerz stark variiert (Aikawa et al., 2012, Jeffery et al., 2016, Olby et al., 2003, Ruddle et al., 2006, Scott & McKee, 1999). Hier könnte die Tau-Protein-Konzentration eine Hilfestellung bieten. Bei paraplegischen Hunden ohne Tiefenschmerz (Grad 5) konnte mittels ROC-Analyse eine Tau-Protein-Konzentration von 43,7 pg/ml als Schwellenwert für ein negatives Therapieergebnis in subokzipitalem CSF ermittelt werden, die mit einer Sensitivität von 87,5 % und einer Spezifität von 77,78 % (AUC 0,847; p=0,016) eine prognostische Aussage ermöglicht. Dies bedeutet, dass beim Überschreiten des Schwellenwertes 87,5 % der Tiere keine Verbesserung der neurologischen

5 Übergreifende Diskussion

Symptomatik zeigten. Die subokzipitale Tau-Protein-Konzentration kann aus diesem Grund als signifikanter und sensitiver Biomarker eine prognostische Aussage ermöglichen. Trotz gleicher höchstgradiger neurologischer Defizite spiegelt eine niedrigere Tau-Protein-Konzentration eine geringere axonale Schädigung wider (Hesse et al., 2001, Zemlan et al., 1999), wodurch eine höhere Regenerationschance besteht. Auch Roerig et al. (2013) konnten die Tau-Protein-Konzentration mit der Genesungsrate von Hunden nach Bandscheibenvorfällen assoziieren und diese Ergebnisse konnten durch die vorliegende Studie bestätigt werden. Insbesondere bei Hunden ohne Tiefenschmerz könnte Tau-Protein als prognostischer Indikator eingesetzt werden.

Als homöostatisches Chemokin reguliert MIP-3 β die Immunantwort (Nelson & Krensky, 2001). Durch die Expression an der Blut-Hirn-Schranke (Alt et al., 2002) kann MIP-3 β leicht in den CSF übergehen. Die hier präsentierte Studie bestätigt die Ergebnisse von Bartels et al., 2014, die eine kontinuierliche Expression von MIP-3 β im CSF gesunder Hunde zeigten. Lediglich in einer Probe der Kontrollgruppe befand sich die MIP-3 β -Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Diese kontinuierliche Expression assoziierten Krumbholz et al. (2007) mit einer Immunüberwachungsfunktion von MIP-3 β im zentralen Nervensystem. Sie vermuteten, dass MIP-3 β eine Migration CCR7-positiver T-Zellen in das zentrale Nervensystem auslösen kann und das „Homing“ von Makrophagen und Monozyten im zentralen Nervensystem steuert (Krumbholz et al., 2007). Bei Menschen mit Multipler Sklerose und anderen neuroinflammatorischen Erkrankungen konnte eine vermehrte Expression von MIP-3 β in den CSF nachgewiesen werden (Krumbholz et al., 2007, Pashenkov *et al.*, 2003). Analog zu diesen Resultaten aus der Humanmedizin, konnten Bartels et al. (2014) auch im CSF von Hunden mit verschiedenen neuroinflammatorischen Erkrankungen eine erhöhte MIP-3 β -Expression finden. Auch Hunde mit Bandscheibenvorfällen wiesen im Vergleich zu gesunden Hunden erhöhte MIP-3 β -Konzentrationen auf, die sich mit steigendem Schweregrad der neurologischen Defizite erhöhten (Bartels et al., 2014).

Bei paraplegischen Hunden mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung konnten auch in dieser Studie signifikant höhere MIP-3 β -Konzentrationen in subokzipital gewonnenem CSF gefunden und die Ergebnisse von Bartels et al. (2014) somit bestätigt werden. Analog zu der

5 Übergreifende Diskussion

Erhöhung der MIP-3 β -Konzentration im subokzipitalen CSF wiesen auch die lumbalen MIP-3 β -Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere Werte auf. Eine Zytokinfreisetzung wird vor allem in der subakuten Phase der Sekundärschädigung (Minuten bis Wochen nach Verletzung) nach Rückenmarksverletzung beschrieben (Oyinbo, 2011), was die starke Expression von MIP-3 β in den CSF von Hunden mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung erklärt.

Hunde, die aufgrund chronischer Lähmungserscheinungen vorstellig wurden, litten seit über vier Wochen an einer Lähmung beider Hintergliedmaßen. Aus diesem Grund ist eine deutlich niedrigere Zytokinfreisetzung bei diesen Hunden zu erwarten. Dies konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden, da Hunde mit chronischer Rückenmarksverletzung signifikant niedrigere MIP-3 β -Konzentrationen aufwiesen als Hunde mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung. Die MIP-3 β -Expression von Hunden mit chronischer Rückenmarksverletzung erreichte allerdings nicht das Basalniveau der kontinuierlichen physiologischen Expression von MIP-3 β im CSF gesunder Hunde, sondern war noch graduell erhöht. In lumbalem CSF waren die MIP-3 β -Konzentrationen sogar signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse implizieren, dass das Chemokin MIP-3 β auch bei chronischer Rückenmarksschädigung eine vermehrte Expression aufweist, die vermutlich aufgrund der kaudalen Hauptflussrichtung des CSF (de Lahunta & Glass, 2009) nur in lumbalem CSF detektierbar ist.

Hunde mit neurologischer Verbesserung wiesen niedrigere MIP-3 β -Konzentrationen auf, allerdings erreichte dieser Unterschied nicht das Signifikanzniveau ($p=0,0862$). Wie Kwon et al. (2010) zeigten, unterliegt die Zytokinexpression im CSF des Menschen nach einer Rückenmarksverletzung zyklischen Schwankungen. Dies könnte auch auf die MIP-3 β -Expression in den CSF des Hundes zutreffen und die prognostische Aussagekraft dieses Biomarkers verfälschen. Mittels ROC-Analyse konnte bei Hunden mit Grad 5 bei einem Schwellenwert von $> 580,6$ pg/ml im subokzipitalen CSF mit einer Sensitivität von 50,0 % und einer Spezifität von 87,50 % ein negativer Therapieausgang abgeleitet werden. Hunde mit einer MIP-3 β -Konzentration unterhalb dieses Schwellenwertes haben aus diesem Grund eine hohe prozentuale Chance auf eine neurologische Verbesserung. Zur abschließenden Beurteilung von MIP-3 β als prognostischer Indikator müsste die zeitliche Freisetzung in den

5 Übergreifende Diskussion

CSF des Hundes zunächst evaluiert und anschließend in die Bewertung mit einbezogen werden.

Als Hauptbestandteil reifer Astrozyten wird GFAP im zentralen Nervensystem exprimiert (Eng, 1985, Eng et al., 2000), wobei physiologisch sind nicht alle Astrozyten GFAP-positiv sind (Sofroniew & Vinters, 2010). Astrozyten reagieren auf Verletzungen des zentralen Nervengewebes im Rahmen der reaktiven Astroglie mit vermehrter GFAP-Expression und Hypertrophie. Bei stärkerer Schädigung kommt es auch zur astrozytären Proliferation und zur Ausbildung glialer Narben (Sofroniew, 2009). Moore und Oglesbee (2014) konnten bei Hunden mit akuten Rückenmarksverletzungen histopathologisch einen dreifachen Anstieg der GFAP-Expression in der ependymalen Zellschicht nachweisen. In Studien aus der Humanmedizin konnten erhöhte GFAP-Konzentrationen im CSF außerdem auf die Nekrose von Gliazellen (Guez et al., 2003, Hjalmarsson et al., 2014) und die reaktive Astroglie (Giovannoni, 2006) zurückgeführt werden. Kwon et al. (2010) konnte bei Menschen mit Rückenmarksverletzungen eine vom Schweregrad der neurologischen Defizite abhängige Freisetzung von GFAP in den CSF nachweisen.

Auch in dieser Studie wiesen Hunde mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung eine vom Schweregrad abhängige Freisetzung von GFAP in den subokzipitalen CSF auf. Bei Hunden mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung mit Grad 4 war die GFAP-Konzentration im CSF im Vergleich zu den gesunden Kontrollhunden nur graduell erhöht und das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht, während Hunde mit Grad 5 signifikant höhere GFAP-Konzentrationen im subokzipitalen CSF aufwiesen. In den lumbal gewonnenen Liquorproben konnte kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen der Kontrollgruppe und Hunden mit akuten/subakuten Rückenmarksverletzungen gefunden werden. Eine mögliche Ursache könnte die sehr geringe Anzahl der lumbal gewonnenen Liquorproben der Kontrollgruppe (n = 3) und der paraplegischen Hunde (Grad 4: n = 4; Grad 5: n = 3) sein. Außerdem war die mediane GFAP-Konzentration der Kontrollgruppe nach lumbaler Punktion (Median: 11,4 ng/ml) höher als nach subokzipitaler Punktion (Median: 0,6 ng/ml). Derzeit sind keine Studien veröffentlicht, die die GFAP-Konzentration im CSF gesunder Hunde nach lumbaler Punktion erfasst haben. Daher ist es möglich, dass diese drei Proben nicht die physiologischen GFAP-Werte repräsentieren. Allerdings könnten auch verschiedene Prozesse

5 Übergreifende Diskussion

zu einem rostrokaudalen Anstieg der GFAP-Konzentration führen. Die Hauptflussrichtung des CSF ist nach kaudal gerichtet (de Lahunta & Glass, 2009) und es kommt zu einer rostrokaudalen Verlangsamung der Liquorflussgeschwindigkeit mit gleichzeitigem Anstieg der Proteinkonzentration (Di Terlizzi & Platt, 2009, Reiber, 1998). Die GFAP-Konzentration könnte damit - ähnlich der Proteinkonzentration im CSF - nach kaudal hin ansteigen. Eine andere mögliche Erklärung könnte eine lokale GFAP-Freisetzung in den CSF durch die lumbale Liquorpunktion sein. Während der Punktion des lumbalen Subarachnoidalraums kommt es in vielen Fällen zu einem Zucken der Rute (Di Terlizzi & Platt, 2009). Dieses Zucken entsteht durch eine Stimulation der Nervenwurzeln oder der Cauda equina mit der Kanüle (Di Terlizzi & Platt, 2009). Diese Stimulation könnte zu einer Freisetzung von GFAP in den CSF und somit einer höheren Konzentration führen.

Bei dem Vergleich akuter/subakuter und chronischer Rückenmarksverletzungen konnte kein signifikanter Konzentrationsunterschied von GFAP im CSF gefunden werden. Kwon et al. (2010) zeigten innerhalb der ersten 72 Stunden nach Rückenmarksverletzung bei Menschen einen deutlichen Abfall der GFAP-Konzentration im CSF. Bei Hunden mit einer länger als 28 Tage bestehenden chronischen Rückenmarksverletzung wären daher deutlich niedrigere GFAP-Konzentrationen zu erwarten. Bei hochgradigen Rückenmarksverletzungen kommt es jedoch zur Ausbildung glialer Narben, die in der Regel irreversibel sind (Sofroniew, 2009). Innerhalb dieser Narben weisen Astrozyten eine vermehrte GFAP-Expression auf (Sofroniew, 2009, Sofroniew & Vinters, 2010), die auch zu einer weiteren Freisetzung von GFAP in den CSF führen könnte. Dies könnte den fehlenden Unterschied in der GFAP-Konzentration im CSF von Hunden mit akuter/subakuter und chronischer Rückenmarksverletzung in dieser Studie erklären.

Die GFAP-Konzentrationen von Hunden mit neurologischer Verbesserung waren tendenziell niedriger als bei Hunden ohne Verbesserung. Dieser Unterschied erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau. Eine mögliche Erklärung könnte die niedrigere Probenanzahl sein, daher sollte das prognostische Potential dieses Biomarkers nochmals in einer größeren Population abschließend bewertet werden. Im Fall von GFAP konnten aufgrund des geringen Probenvolumens nicht alle Proben biochemisch analysiert werden. Die Liquorentnahme von ca. 1 ml/5 kg Körpergewicht gilt beim Hund als unbedenklich (Chrisman, 1992). Bei

5 Übergreifende Diskussion

chondrodystrophen Rassen wie Dackel oder französischer Bulldogge ist die Entnahme großer Volumina aufgrund des geringen Körpergewichts meist nicht möglich. Gerade diese Rassen haben jedoch die höchste Inzidenz von Diskopathien (Bergknut et al., 2012, Hansen, 1951, Priester, 1976) und sind dadurch eine Zielgruppe in der Entwicklung prognostischer Indikatoren. Mittels ROC-Analyse konnte bei Hunden mit Grad 5 bei einer GFAP-Konzentration von über 3,35 ng/ml mit einer Sensitivität von 50 % und einer Spezifität von 100 % ein negativer Therapieausgang vorhergesagt werden. Dies spiegelt sich darin wider, dass in dieser Studie alle Hunde mit einer GFAP-Konzentration unter 3,35 ng/ml eine neurologische Verbesserung zeigten. Obwohl das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde, könnte die GFAP-Konzentration von großem prognostischen Nutzen sein, was in einer größeren Population erneut evaluiert werden sollte.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Prüfung möglicher Konzentrationsunterschiede von Tau-Protein, MIP-3 β und GFAP nach subokzipitaler und lumbaler Liquor-Punktion. Für diesen Vergleich wurden nur paarweise gewonnene CSF-Proben von denselben Hunden statistisch getestet. Bei Hunden mit chronischen Rückenmarksverletzungen (n = 3) und den gesunden Hunden (n = 3) konnte ein Konzentrationsunterschied der untersuchten Substanzen aufgrund der geringen Probenanzahl gepaarter Liquorproben nicht statistisch untersucht werden. Bei Hunden mit akuten/subakuten Rückenmarksverletzungen waren die Konzentrationen aller drei Substanzen in den lumbal gewonnenen Liquorproben signifikant höher als in subokzipital gewonnenen Proben. Schon Thomson et al. (1989) zeigten, dass bei Hunden mit thorakolumbalen Bandscheibenvorfällen lumbal gewonnener CSF sensitiver gegenüber Veränderungen ist. In lumbal gewonnenen Liquorproben konnten sie bei einem höheren Prozentsatz der Patienten eine Erhöhung der Proteinkonzentration und eine Pleozytose nach thorakolumbalen Diskopathie finden (Thomson et al., 1989). Sie schlussfolgerten, dass die kaudale Hauptflussrichtung des CSF hierfür verantwortlich ist (Thomson et al., 1989), was auch bei den von uns gemessenen Substanzen vermutlich die Ursache der höheren Konzentrationen nach lumbaler Punktion darstellt.

Geeignete Biomarker für Rückenmarksverletzungen sollten direkt nach Verletzung in messbaren Konzentrationen in den CSF freigesetzt werden und die Schädigung quantifizieren können (Cruz et al., 2015). Alle drei Substanzen konnten bei Rückenmarksverletzungen in

5 Übergreifende Diskussion

erhöhten Konzentrationen gemessen werden und korrelieren mit dem Schweregrad der neurologischen Defizite. Daher können Tau-Protein, MIP-3 β und GFAP als Biomarker bei Hunden mit Rückenmarksverletzungen eingesetzt werden. Die subokzipitale Tau-Protein- und GFAP-Konzentration kann prognostische Hinweise liefern, insbesondere bei Hunden ohne Tiefenschmerz. Die Kombination der Biomarker konnte die prognostische Aussagekraft jedoch nicht erhöhen.

Zusammenfassend konnte diese Studie zeigen, dass Tau-Protein, MIP-3 β und GFAP im CSF von Hunden mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung in erhöhten Konzentrationen messbar ist und mit dem Schweregrad der neurologischen Defizite korreliert. Die Freisetzung des Tau-Proteins und des MIP-3 β war bei Hunden mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung deutlich höher als bei Hunden mit chronischer Rückenmarksverletzung. Zur Einschätzung der Prognose des Patienten kann die subokzipitale Tau-Protein- und GFAP-Konzentration eingesetzt werden.

6 Zusammenfassung

Stefanie Wicha: Evaluierung von Biomarkern im Liquor cerebrospinalis bei paraplegischen Hunden mit Rückenmarksverletzung

Bandscheibenvorfälle sind eine häufige Ursache für Rückenmarksverletzungen bei Hunden. Die Prognose dieser Patienten ist abhängig von der Schwere der Rückenmarksverletzung und den daraus resultierenden neurologischen Defiziten. Bei paraplegischen Hunden, insbesondere bei solchen ohne Tiefenschmerz, ist die Prognosestellung häufig schwierig und nicht verlässlich.

Tau-Protein, macrophage inflammatory protein-3 β (MIP-3 β) und das saure Gliafaserprotein (GFAP) sind potentielle Marker für Rückenmarksschädigungen. In dieser Studie sollte der Wert dieser Substanzen als Biomarker für Hunde mit Rückenmarkverletzungen evaluiert werden. Es sollte gezeigt werden, ob sie in der Lage sind, das Ausmaß der Schädigung zu quantifizieren und so eine prognostische Aussage ermöglichen. Weiter wurde überprüft, ob die prognostische Aussagekraft durch die Messung mehrerer Biomarker im Liquor cerebrospinalis (CSF) gesteigert werden kann.

Hierzu wurden die Tau-Protein-, MIP-3 β - und GFAP-Konzentrationen in subokzipitalem und lumbalem CSF 49 paraplegischer Hunde mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) untersucht. Hunde mit akuter/subakuter (≤ 28 Tage; n = 36) und chronischer (> 28 Tage; n = 13) Rückenmarksverletzung wurden anhand ihrer neurologischen Defizite als Grad 4 (Paraplegie mit vorhandenem Tiefenschmerz) und Grad 5 (Paraplegie ohne Tiefenschmerz) gemäß Sharp und Wheeler (2005) eingestuft. Eine neurologische Verbesserung wurde bei Hunden mit akuten/subakuten Rückenmarksverletzungen verzeichnet, wenn sie sich innerhalb der ersten vier Wochen nach der Operation um mindestens einen Grad besserten. Der CSF von sieben gesunden Hunden diente als Kontrolle.

Paraplegische Hunde mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung wiesen signifikant höhere Tau-Protein- und MIP-3 β -Konzentrationen als gesunde Hunde und Hunde mit chronischer Rückenmarksverletzung auf. Die GFAP-Konzentrationen von Hunden mit akuter/subakuter Rückenmarksverletzung und Grad 5 waren in subokzipitalem CSF im Vergleich zu gesunden Hunden signifikant erhöht. Es konnte jedoch kein entsprechender Unterschied in den

6 Zusammenfassung

lumbalen GFAP-Konzentrationen gefunden werden. Ebenso zeigten die GFAP-Konzentrationen bei Hunden mit akuter/subakuter und chronischer Rückenmarksverletzung keinen Unterschied. Paraplegische Hunde mit chronischer Rückenmarksverletzung wiesen signifikant höhere lumbale Tau-Protein- und MIP-3 β -Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Bei Hunden mit neurologischer Verbesserung, insbesondere bei solchen mit Grad 5, konnten signifikant niedrigere Tau-Protein-Konzentrationen in subokzipitalem CSF nachgewiesen werden. Dieser prädiktive Wert der Tau-Protein-Konzentration im CSF konnte durch eine Messung mehrerer Biomarker nicht erhöht werden.

Schlussfolgernd können alle drei Substanzen als Biomarker bei Hunden mit Rückenmarksverletzungen eingesetzt werden. Die Tau-Protein-Konzentration in subokzipitalem CSF kann eine Einschätzung der Prognose des Patienten ermöglichen. Eine statistische Korrelation der drei Biomarker konnte keine Erhöhung der prognostischen Aussagekraft hervorrufen.

7 Summary

Stefanie Wicha: Evaluation of cerebrospinal fluid biomarkers in paraplegic dogs with spinal cord injury

Intervertebral disc herniation is a common cause of spinal cord injuries (SCI) in dogs. The prognosis in these dogs is determined by the severity of SCI and the degree of neurological deficits. The prediction of a reliable prognosis can be challenging in paraplegic dogs, particularly when they lost nociception.

Tau protein, macrophage inflammatory protein-3 β (MIP-3 β) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) are potential markers of SCI. The aim of this study was to assess the value of these substances as cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers for dogs with SCI. Therefore, the potential of these markers to quantify the degree of spinal cord damage was evaluated and whether they could consequently serve as prognostic indicators. Additionally, a calculation of the combination of multiple CSF biomarkers was performed in order to assess whether this could enhance the predictive value.

The concentrations of tau protein, MIP-3 β and GFAP were measured in cisternal and lumbar CSF samples of 49 paraplegic dogs using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The dogs with acute/subacute (<28 days; n = 36) and chronic (>28 days; n = 13) SCI were classified according to the presence (grade 4) or absence (grade 5) of deep pain perception (Sharp & Wheeler, 2005). Outcome of dogs with acute/subacute SCI was monitored by neurological follow-up exams and was defined to be successful when an improvement of at least one grade was noted within four weeks after surgery. The CSF of seven healthy beagle dogs served as control.

Tau protein and MIP-3 β concentrations were significantly higher in paraplegic dogs with acute/subacute SCI compared to healthy dogs and to dogs with chronic SCI. GFAP concentration in cisternal CSF of dogs with acute/subacute SCI and grade 5 were significantly higher compared to healthy dogs. However, no difference in GFAP concentrations between paraplegic and healthy dogs was detected in lumbar CSF nor between dogs with acute/subacute and chronic SCI. Paraplegic dogs with chronic SCI had significantly elevated tau protein and MIP-3 β concentrations in lumbar CSF compared to control dogs. Dogs with

7 Summary

neurological improvement had significantly lower cisternal tau protein values, especially those without deep pain perception. This predictive value of CSF tau protein concentrations could not be enhanced by a combination of multiple CSF biomarkers.

In conclusion, tau protein, MIP-3 β and GFAP are potential biomarkers in dogs with SCI. The cisternal tau protein concentration may serve as a prognostic indicator in dogs with SCI. A combination of all three CSF biomarkers together could not enhance the prognostic accuracy.

8 Literaturverzeichnis

- Aikawa, T., H. Fujita, S. Kanazono, M. Shibata and Y. Yoshigae, 2012: Long-term neurologic outcome of hemilaminectomy and disk fenestration for treatment of dogs with thoracolumbar intervertebral disk herniation: 831 cases (2000-2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **241**, 1617-1626.
- Alt, C., M. Laschinger and B. Engelhardt, 2002: Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*, **32**, 2133-2144.
- Anderson, D. K. and E. D. Hall, 1993: Pathophysiology of spinal cord trauma. *Annals of Emergency Medicine*, **22**, 987-992.
- Bartels, J., B. G. Darrow, S. J. Schatzberg, L. Bu, R. Carlson and A. Tipold, 2014: MIP-3beta/CCL19 is associated with the intrathecal invasion of mononuclear cells in neuroinflammatory and non-neuroinflammatory CNS diseases in dogs. *BMC Veterinary Research*, **10**, 157.
- Bell, W. O., 1995: Cerebrospinal fluid reabsorption. A critical appraisal. 1990. *Pediatric Neurosurgery*, **23**, 42-53.
- Bergknut, N., A. Egenvall, R. Hagman, P. Gustas, H. A. Hazewinkel, B. P. Meij and A. S. Lagerstedt, 2012: Incidence of intervertebral disk degeneration-related diseases and associated mortality rates in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **240**, 1300-1309.
- Bianchini, D., I. De Martini, A. Cadoni, A. Zicca, M. Tabaton, A. Schenone, S. Anfosso, A. S. Akkad Wattar, D. Zacheo and G. L. Mancardi, 1992: GFAP expression of human Schwann cells in tissue culture. *Brain Research*, **570**, 209-217.
- Binder, L. I., A. Frankfurter and L. I. Rebhun, 1985: The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *The Journal of Cell Biology*, **101**, 1371-1378.
- Blennow, K., A. Wallin, H. Agren, C. Spenger, J. Siegfried and E. Vanmechelen, 1995: Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Molecular and Chemical Neuropathology*, **26**, 231-245.
- Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte and P. R. Hof, 2000: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, **33**, 95-130.
- Carlson, G. D., C. D. Gorden, H. S. Oliff, J. J. Pillai and J. C. LaManna, 2003: Sustained spinal cord compression: part I: time-dependent effect on long-term pathophysiology. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*, **85-a**, 86-94.

- Chamisha, Y., I. Aroch, S. Kuzi, I. Srugo, T. Bdolah-Abram, O. Chai, M. M. Christopher, Y. Merbl, K. Rothwell and M. H. Shamir, 2015: The prognostic value of cerebrospinal fluid characteristics in dogs without deep pain perception due to thoracolumbar disc herniation. *Research in Veterinary Science*, **100**, 189-196.
- Chrisman, C. L., 1992: Cerebrospinal fluid analysis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, **22**, 781-810.
- Coates, J. R., 2000: Intervertebral disk disease. *The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice*, **30**, 77-110.
- Cruz, C. D., A. Coelho, T. Antunes-Lopes and F. Cruz, 2015: Biomarkers of spinal cord injury and ensuing bladder dysfunction. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **82-83**, 153-159.
- Cudia, S. P. and J. M. Duval, 1997: Thoracolumbar intervertebral disk disease in large, nonchondrodystrophic dogs: a retrospective study. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **33**, 456-460.
- Dankier, H. H., P. D. Brown and J. Praetorius, 2013: Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiological Reviews*, **93**, 1847-1892.
- de Lahunta, A. and E. Glass, 2009: Cerebrospinal Fluid and Hydrocephalus. In: A. de Lahunta and E. Glass (eds.), *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*. 3rd edition, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 54-76.
- Di Terlizzi, R. and S. Platt, 2006: The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I – Function and composition. *The Veterinary Journal*, **172**, 422-431.
- Di Terlizzi, R. and S. R. Platt, 2009: The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part II – Analysis. *The Veterinary Journal*, **180**, 15-32.
- Dumont, R. J., D. O. Okonkwo, S. Verma, R. J. Hurlbert, P. T. Boulos, D. B. Ellegala and A. S. Dumont, 2001: Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology*, **24**, 254-264.
- Eng, L. F., 1985: Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, **8**, 203-214.
- Eng, L. F., R. S. Ghirnikar and Y. L. Lee, 2000: Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, **25**, 1439-1451.
- Eng, L. F., J. J. Vanderhaeghen, A. Bignami and B. Gerstl, 1971: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Research*, **28**, 351-354.

- Ferreira, A. J., J. H. Correia and A. Jaggy, 2002: Thoracolumbar disc disease in 71 paraplegic dogs: influence of rate of onset and duration of clinical signs on treatment results. *The Journal of Small Animal Practice*, **43**, 158-163.
- Fluehmann, G., M. G. Doherr and A. Jaggy, 2006: Canine neurological diseases in a referral hospital population between 1989 and 2000 in Switzerland. *The Journal of Small Animal Practice*, **47**, 582-587.
- Forster, R., A. C. Davalos-Misslitz and A. Rot, 2008: CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, **8**, 362-371.
- Giovannoni, G., 2006: Multiple sclerosis cerebrospinal fluid biomarkers. *Disease Markers*, **22**, 187-196.
- Griffith, J. W., C. L. Sokol and A. D. Luster, 2014: Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual Review of Immunology*, **32**, 659-702.
- Guez, M., C. Hildingsson, L. Rosengren, K. Karlsson and G. Toolanen, 2003: Nervous tissue damage markers in cerebrospinal fluid after cervical spine injuries and whiplash trauma. *Journal of Neurotrauma*, **20**, 853-858.
- Hainfellner, J. A., T. Voigtlander, T. Strobel, P. R. Mazal, A. S. Maddalena, A. Aguzzi and H. Budka, 2001: Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **60**, 449-461.
- Hansen, H. J., 1951: A pathologic-anatomical interpretation of disc degeneration in dogs. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, **20**, 280-293.
- Hansen, H. J., 1952: A pathologic-anatomical study on disc degeneration in dog, with special reference to the so-called enchondrosis intervertebralis. *Acta Orthopaedica Scandinavica. Supplementum*, **11**, 1-117.
- Hesse, C., L. Rosengren, N. Andreasen, P. Davidsson, H. Vanderstichele, E. Vanmechelen and K. Blennow, 2001: Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neuroscience Letters*, **297**, 187-190.
- Hjalmarsson, C., M. Bjerke, B. Andersson, K. Blennow, H. Zetterberg, N. D. Aberg, B. Olsson, C. Eckerstrom, L. Bokemark and A. Wallin, 2014: Neuronal and glia-related biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke. *Journal of Central Nervous System Disease*, **6**, 51-58.
- Ito, D., S. Matsunaga, N. D. Jeffery, N. Sasaki, R. Nishimura, M. Mochizuki, M. Kasahara, R. Fujiwara and H. Ogawa, 2005: Prognostic value of magnetic resonance imaging in dogs with paraplegia caused by thoracolumbar intervertebral disk extrusion: 77 cases (2000-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **227**, 1454-1460.

- Jaggy, A. and B. Spiess, 2007: Neurologische Untersuchung beim Kleintier. *Atlas und Lehrbuch der Kleintierneurologie*. 2. Auflage, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover, 1-37.
- Janke, C., M. Beck, T. Stahl, M. Holzer, K. Brauer, V. Bigl and T. Arendt, 1999: Phylogenetic diversity of the expression of the microtubule-associated protein tau: implications for neurodegenerative disorders. *Molecular Brain Research*, **68**, 119-128.
- Jeffery, N. D., A. K. Barker, H. Z. Hu, C. J. Alcott, K. H. Kraus, E. M. Scanlin, N. Granger and J. M. Levine, 2016: Factors associated with recovery from paraplegia in dogs with loss of pain perception in the pelvic limbs following intervertebral disk herniation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **248**, 386-394.
- Jeffery, N. D., J. M. Levine, N. J. Olby and V. M. Stein, 2013: Intervertebral disk degeneration in dogs: consequences, diagnosis, treatment, and future directions. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **27**, 1318-1333.
- Jho, Y. S., E. B. Zhulina, M. W. Kim and P. A. Pincus, 2010: Monte carlo simulations of tau proteins: effect of phosphorylation. *Biophysical Journal*, **99**, 2387-2397.
- Kato, H., T. Yamamoto, H. Yamamoto, R. Ohi, N. So and Y. Iwasaki, 1990: Immunocytochemical characterization of supporting cells in the enteric nervous system in Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, **25**, 514-519.
- Kepes, J. J. and E. Perentes, 1988: Glial fibrillary acidic protein in chondrocytes of elastic cartilage in the human epiglottis: An immunohistochemical study with polyvalent and monoclonal antibodies. *The Anatomical Record*, **220**, 296-299.
- Krumbholz, M., D. Theil, F. Steinmeyer, S. Cepok, B. Hemmer, M. Hofbauer, C. Farina, T. Derfuss, A. Junker, T. Arzberger, I. Sinicina, C. Hartle, J. Newcombe, R. Hohlfeld and E. Meinl, 2007: CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuroimmunology*, **190**, 72-79.
- Kwon, B. K., A. M. Stammers, L. M. Belanger, A. Bernardo, D. Chan, C. M. Bishop, G. P. Slobogean, H. Zhang, H. Umedaly, M. Giffin, J. Street, M. C. Boyd, S. J. Paquette, C. G. Fisher and M. F. Dvorak, 2010: Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and biomarkers of injury severity in acute human spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, **27**, 669-682.
- Levine, G. J., J. R. Cook, S. C. Kerwin, J. Mankin, J. F. Griffin, G. T. Fosgate and J. M. Levine, 2014: Relationships between cerebrospinal fluid characteristics, injury severity, and functional outcome in dogs with and without intervertebral disk herniation. *Veterinary Clinical Pathology*, **43**, 437-446.

8 Literaturverzeichnis

- Levine, G. J., J. M. Levine, T. H. Witsberger, S. C. Kerwin, K. E. Russell, J. Suchodolski, J. Steiner and G. T. Fosgate, 2010: Cerebrospinal fluid myelin basic protein as a prognostic biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disk herniation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **24**, 890-896.
- Levine, J. M., G. T. Fosgate, A. V. Chen, R. Rushing, P. P. Nghiem, S. R. Platt, R. S. Bagley, M. Kent, D. G. Hicks, B. D. Young and S. J. Schatzberg, 2009: Magnetic resonance imaging in dogs with neurologic impairment due to acute thoracic and lumbar intervertebral disk herniation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **23**, 1220-1226.
- Levine, J. M., C. G. Ruaux, R. L. Bergman, J. R. Coates, J. M. Steiner and D. A. Williams, 2006: Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease. *American Journal of Veterinary Research*, **67**, 283-287.
- Middeldorp, J. and E. M. Hol, 2011: GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, **93**, 421-443.
- Mietelska-Porowska, A., U. Wasik, M. Goras, A. Filipek and G. Niewiadomska, 2014: Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 4671-4713.
- Molinuevo, J. L., K. Blennow, B. Dubois, S. Engelborghs, P. Lewczuk, A. Perret-Liaudet, C. E. Teunissen and L. Parnetti, 2014: The clinical use of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: A consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimer's & Dementia*, 1-10.
- Moore, S. A. and M. J. Oglesbee, 2014: Spinal Cord Ependymal Responses to Naturally Occurring Traumatic Spinal Cord Injury in Dogs. *Veterinary Pathology*, **52**, 1108-1117.
- Nagano, S., S. H. Kim, S. Tokunaga, K. Arai, M. Fujiki and K. Misumi, 2011: Matrix metalloprotease-9 activity in the cerebrospinal fluid and spinal injury severity in dogs with intervertebral disc herniation. *Research in Veterinary Science*, **91**, 482-485.
- Nelson, P. J. and A. M. Krensky, 2001: Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity*, **14**, 377-386.
- Olby, N., T. Harris, J. Burr, K. Munana, N. Sharp and B. Keene, 2004: Recovery of pelvic limb function in dogs following acute intervertebral disc herniations. *Journal of Neurotrauma*, **21**, 49-59.
- Olby, N., J. Levine, T. Harris, K. Munana, T. Skeen and N. Sharp, 2003: Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **222**, 762-769.

- Otto, M., J. Wiltfang, H. Tumani, I. Zerr, L. Maria, J. Kornhuber, T. Weber, H. A. Kretschmar and S. Poser, 1997: Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt–Jakob disease. *Neuroscience Letters*, **225**, 210-212.
- Oyinbo, C. A., 2011: Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, **71**, 281-299.
- Pashenkov, M., M. Soderstrom and H. Link, 2003: Secondary lymphoid organ chemokines are elevated in the cerebrospinal fluid during central nervous system inflammation. *Journal of Neuroimmunology*, **135**, 154-160.
- Pouw, M. H., A. J. Hosman, J. J. van Middendorp, M. M. Verbeek, P. E. Vos and H. van de Meent, 2009: Biomarkers in spinal cord injury. *Spinal Cord*, **47**, 519-525.
- Priester, W. A., 1976: Canine intervertebral disc disease — Occurrence by age, breed, and sex among 8,117 cases. *Theriogenology*, **6**, 293-303.
- Reiber, H., 1998: Cerebrospinal fluid--physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Multiple Sclerosis*, **4**, 99-107.
- Reiber, H. and J. B. Peter, 2001: Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *Journal of the Neurological Sciences*, **184**, 101-122.
- Robertson, I. A. N. and D. E. Thrall, 2011: Imaging dogs with suspected disc herniation: pros and cons of myelography, computed tomography, and magnetic resonance. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, **52**, 81-84.
- Roerig, A., R. Carlson, A. Tipold and V. M. Stein, 2013: Cerebrospinal fluid tau protein as a biomarker for severity of spinal cord injury in dogs with intervertebral disc herniation. *Veterinary Journal*, **197**, 253-258.
- Ruddle, T. L., D. A. Allen, E. R. Schertel, M. D. Barnhart, E. R. Wilson, J. A. Lineberger, N. W. Klocke and T. W. Lehenbauer, 2006: Outcome and prognostic factors in non-ambulatory Hansen Type I intervertebral disc extrusions: 308 cases. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, **19**, 29-34.
- Rytz, U., F. Forterre, H. Schmökel and C. v. Werthern, 2007: Neurochirurgie. In: A. Jaggy (ed.), *Atlas und Lehrbuch der Kleintierneurologie*. 2. Auflage, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover, 199-229.
- Salger, F., L. Ziegler, I. C. Bottcher, G. Oechtering, P. Bottcher and T. Flegel, 2014: Neurologic outcome after thoracolumbar partial lateral corpectomy for intervertebral disc disease in 72 dogs. *Veterinary Surgery*, **43**, 581-588.
- Sato, O., E. A. Bering, Jr., M. Yagi, R. Tsugane, M. Hara, Y. Amano and T. Asai, 1975: Bulk flow in the cerebrospinal fluid system of the dog. *Acta Neurologica Scandinavica*, **51**, 1-11.

- Sato, Y., S. Shimamura, T. Mashita, S. Kobayashi, Y. Okamura, M. Katayama, H. Kamishina, R. Sato, Y. Uzuka and J. Yasuda, 2013: Serum glial fibrillary acidic protein as a diagnostic biomarker in dogs with progressive myelomalacia. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **75**, 949-953.
- Schoenfeld, T. A. and R. A. Obar, 1994: Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *International Review of Cytology*, **151**, 67-137.
- Schoonenboom, N. S., C. Mulder, H. Vanderstichele, E. J. Van Elk, A. Kok, G. J. Van Kamp, P. Scheltens and M. A. Blankenstein, 2005: Effects of processing and storage conditions on amyloid beta (1-42) and tau concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice. *Clinical Chemistry*, **51**, 189-195.
- Scott, H. W. and W. M. McKee, 1999: Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. *The Journal of Small Animal Practice*, **40**, 417-422.
- Shahani, N. and R. Brandt, 2002: Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, 1668-1680.
- Sharp, N. J. H. and S. J. Wheeler, 2005: Patient examination. In: *Small animal spinal disorders: diagnosis and surgery*, 2nd edition, Elsevier Mosby, Edinburgh, London, 19-33.
- Sharp, N. J. H. and S. J. Wheeler, 2005a: Functional anatomy. In: *Small animal spinal disorders: diagnosis and surgery*, 2nd edition, Elsevier Mosby, Edinburgh, London, 1-17.
- Sharp, N. J. H. and S. J. Wheeler, 2005b: Thoracolumbar disc disease. In: *Small animal spinal disorders: diagnosis and surgery*, 2nd edition, Elsevier Mosby, Edinburgh, London, 121-159.
- Sofroniew, M. V., 2009: Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, **32**, 638-647.
- Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters, 2010: Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, **119**, 7-35.
- Spitzbarth, I., W. Baumgartner and A. Beineke, 2012: The role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of spontaneous canine CNS diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **147**, 6-24.
- Srugo, I., I. Aroch, M. M. Christopher, O. Chai, L. Goralnik, T. Bdolah-Abram and M. H. Shamir, 2011: Association of cerebrospinal fluid analysis findings with clinical signs and outcome in acute nonambulatory thoracolumbar disc disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **25**, 846-855.

- Stoothoff, W. H. and G. V. Johnson, 2005: Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1739**, 280-297.
- Strimbu, K. and J. A. Tavel, 2010: What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, **5**, 463-466.
- Tanaka, N., M. Kitagawal, D. Ito, M. Okada, S. Ohta, K. Onol, H. Yamada and T. Wataril, 2012: Proceedings 24th Symposium ESVN-ECVN Trier, Germany 23rd–24th September 2011. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **26**, 823-852.
- Thomson, C. E., J. N. Kornegay and J. B. Stevens, 1989: Canine intervertebral disc disease: Changes in the cerebrospinal fluid. *Journal of Small Animal Practice*, **30**, 685-688.
- Thomson, C. E., J. N. Kornegay and J. B. Stevens, 1990: Analysis of cerebrospinal fluid from the cerebellomedullary and lumbar cisterns of dogs with focal neurologic disease: 145 cases (1985-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **196**, 1841-1844.
- Tipold, A., M. Bernardini and M. Kronberg, 2007: Rückenmark. In: A. Jaggy (ed.), *Atlas und Lehrbuch der Kleintierneurologie*. 2. Auflage, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover, 333-369.
- Toda, Y., N. Matsuki, M. Shibuya, I. Fujioka, S. Tamahara and K. Ono, 2007: Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-GFAP autoantibody in canine necrotising meningoencephalitis. *The Veterinary Record*, **161**, 261-264.
- Tripathi, R. C., 1977: The functional morphology of the outflow systems of ocular and cerebrospinal fluids. *Experimental Eye Research*, **25**, 65-116.
- Wamsley, H. and A. R. Alleman, 2004: Clinical pathology. In: S. R. Platt and N. Olby (eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology*. 3rd edition, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, 35-53.
- Wang, J. Z., I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal, 2007: Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *The European Journal of Neuroscience*, **25**, 59-68.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo and M. W. Kirschner, 1975: A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**, 1858-1862.
- Winnerkvist, A., R. E. Anderson, L. O. Hansson, L. Rosengren, A. E. Estrera, T. T. Huynh, E. E. Porat and H. J. Safi, 2007: Multilevel somatosensory evoked potentials and cerebrospinal proteins: indicators of spinal cord injury in thoracoabdominal aortic aneurysm surgery. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, **31**, 637-642.

8 Literaturverzeichnis

- Witsberger, T. H., J. M. Levine, G. T. Fosgate, M. R. Slater, S. C. Kerwin, K. E. Russell and G. J. Levine, 2012: Associations between cerebrospinal fluid biomarkers and long-term neurologic outcome in dogs with acute intervertebral disk herniation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **240**, 555-562.
- Wunderlich, M. T., H. Lins, M. Skalej, C. W. Wallesch and M. Goertler, 2006: Neuron-specific enolase and tau protein as neurobiochemical markers of neuronal damage are related to early clinical course and long-term outcome in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, **108**, 558-563.
- Yoshida, R., T. Imai, K. Hieshima, J. Kusuda, M. Baba, M. Kitaura, M. Nishimura, M. Kakizaki, H. Nomiyama and O. Yoshie, 1997: Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 13803-13809.
- Zemlan, F. P., W. S. Rosenberg, P. A. Luebbe, T. A. Campbell, G. E. Dean, N. E. Weiner, J. A. Cohen, R. A. Rudick and D. Woo, 1999: Quantification of axonal damage in traumatic brain injury: affinity purification and characterization of cerebrospinal fluid tau proteins. *Journal of Neurochemistry*, **72**, 741-750.
- Zhou, X., X. He and Y. Ren, 2014: Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, **9**, 1787-1795.

9 Anhang

9.1 Protokoll und Layout des Tau-Protein-ELISA

Versuchsprotokoll des Tau-Protein-ELISA

1. Alle Reagenzien und Liquorproben auf Raumtemperatur bringen und vor der Verwendung mit Hilfe des Reagenzglasschüttlers vermischen.
2. Herstellung der Konjugatlösung 1:
 - 100 µl Konjugat 1 mit 10 ml zugehörigem Konjugatverdünner vermischen;
 - 75 µl der Konjugatlösung 1 in jede Kavität pipettieren;
3. Auftragen des mitgelieferten Standards (STD), der Versuchskontrollen (VK hoch, VK niedrig) und der Proben im Doppelansatz:
 - Je 25 µl in die entsprechenden Kavitäten pipettieren;
 - Liquorproben unverdünnt auftragen oder bei Bedarf 1:2 mit Probenverdünner verdünnen;
 - Die Leerprobe enthält nur Probenverdünner;
 - Durch vorsichtiges Klopfen des Teststreifenhalters mischen;
4. Inkubation der mit Folie bedeckten ELISA-Platte für 14-18 Stunden (über Nacht) bei 25 ± 2 °C;
5. Herstellung der Konjugatlösung 2:
 - 120 µl Konjugat 2 mit 12 ml zugehörigem Konjugatverdünner vermischen;
6. Herstellung der Waschlösung:
 - 60 ml Waschlösung mit 1440 ml deionisiertem Wasser mischen;
7. Platte 5x mit Waschlösung waschen und Platte vorsichtig auf Zellstoff trocken klopfen;
8. 100 µl der Konjugatlösung 2 in jede Kavität pipettieren;
9. Inkubation der mit Folie bedeckten ELISA-Platte für 30 ± 3 Minuten bei 25 ± 2 °C;
10. Herstellung der Substratlösung:
 - 120 µl Substrat mit 12 ml Substratpuffer verdünnen;
11. Platte 5x mit Waschlösung waschen und Platte vorsichtig auf Zellstoff trocken klopfen;
12. 100 µl der Substratlösung in jede Kavität pipettieren;

9 Anhang

13. Lichtgeschützte Inkubation der ELISA-Platte für 30 ± 3 Minuten bei 25 ± 2 °C;
14. Abstoppen der Reaktion mit gebrauchsfertiger Stopplösung:
- 50 µl in jede Kavität pipettieren;
 - Dieselbe Reihenfolge wie beim Auftragen der Substratlösung einhalten;
15. Photometrische Auswertung innerhalb von 15 Minuten mit Hilfe des Synergy 2 Multi-Detektions-Readers (Fa.BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm und zugehöriger Software Gen5™ Datenanalyse-Software (Fa. BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)

Layout des Tau-Protein-ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1		Probe 1		Probe 9		Probe 17		Probe 25		Probe 33	
B	STD 2		Probe 2		Probe 10		Probe 18		Probe 26		Probe 34	
C	STD 3		Probe 3		Probe 11		Probe 19		Probe 27		Probe 35	
D	STD 4		Probe 4		Probe 12		Probe 20		Probe 28		Probe 36	
E	STD 5		Probe 5		Probe 13		Probe 21		Probe 29		Probe 37	
F	STD 6		Probe 6		Probe 14		Probe 22		Probe 30		Probe 38	
G	VK hoch		Probe 7		Probe 15		Probe 23		Probe 31		Probe 39	
H	VK niedrig		Probe 8		Probe 16		Probe 24		Probe 32		Leerprobe	

STD = Standard; VK = Versuchskontrolle

9.2 Protokoll und Layout des MIP-3 β -ELISA

Versuchsprotokoll des MIP-3 β -ELISA

1. Alle Reagenzien und Liquorproben auf Raumtemperatur bringen;
2. Den Standard (STD) mit 1 ml Standardverdünnungslösung rekonstruieren und für 10 Minuten bei Raumtemperatur durchmischen (Konzentration: 2000 pg/ml);
3. Erstellen der Standardreihe durch Verdünnungsstufen (1:2) mit der Standardverdünnungslösung (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 pg/ml)
4. Je 100 μ l jeder Standardkonzentration und der Liquorproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren;
 - Bei Verdünnung der Liquorproben Verwendung von 0,01 mol/l PBS (pH=7,0-7,2);
 - Die Leerprobe enthält nur Standardverdünnungslösung
5. ELISA-Platte mit Folie bedeckt für 2 Stunden bei 37 °C inkubieren;
6. Herstellung der Detektionsreagenzlösung A:
 - 120 μ l Detektionsreagenz A mit 12 ml Verdünnungslösung A vermischen;
7. Flüssigkeit aus den Kavitäten abpipettieren;
8. 100 μ l der Detektionsreagenzlösung A in jede Kavität pipettieren;
9. ELISA-Platte mit Folie bedeckt für 1 Stunde bei 37 °C inkubieren;
10. Herstellung der Waschlösung:
 - 20 ml Waschkonzentrat mit 580 ml destilliertem Wasser vermischen;
11. Herstellung der Detektionsreagenzlösung B:
 - 120 μ l Detektionsreagenz B mit 12 ml Verdünnungslösung B vermischen;
12. Platte 3x mit Waschlösung waschen und auf Zellstoff vorsichtig trocken klopfen;
13. 100 μ l der Detektionsreagenzlösung B in jede Kavität pipettieren;
14. ELISA-Platte mit Folie bedeckt für 30 Minuten bei 37 °C inkubieren;
15. Platte 5x mit Waschlösung waschen und auf Zellstoff vorsichtig trocken klopfen;
16. 90 μ l der gebrauchsfertigen Substratlösung mit sterilen Pipettenspitzen in jede Kavität pipettieren
17. ELISA-Platte mit einer neuen Folie bedeckt für 15-25 Minuten bei 37 °C lichtgeschützt inkubieren;

9 Anhang

18. 50 µl Stopplösung in jede Kavität hinzufügen; Dieselbe Reihenfolge wie beim Auftragen der Substratlösung einhalten;
19. Photometrische Auswertung innerhalb von 15 Minuten mit Hilfe des Synergy 2 Multi-Detektions-Readers (Fa. BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm und zugehöriger Software Gen5™ Datenanalyse-Software (Fa. BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)

Layout des MIP-3β-ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1		Probe 1		Probe 9		Probe 17		Probe 25		Probe 33	
B	STD 2		Probe 2		Probe 10		Probe 18		Probe 26		Probe 34	
C	STD 3		Probe 3		Probe 11		Probe 19		Probe 27		Probe 35	
D	STD 4		Probe 4		Probe 12		Probe 20		Probe 28		Probe 36	
E	STD 5		Probe 5		Probe 13		Probe 21		Probe 29		Probe 37	
F	STD 6		Probe 6		Probe 14		Probe 22		Probe 30		Probe 38	
G	STD 7		Probe 7		Probe 15		Probe 23		Probe 31		Probe 39	
H	Leerprobe		Probe 8		Probe 16		Probe 24		Probe 32		Probe 40	

STD = Standard

9.3 Protokoll und Layout des GFAP-ELISA

Versuchsprotokoll des GFAP-ELISA

1. Alle Reagenzien und Liquorproben auf Raumtemperatur bringen;
2. Lyophilisierten Standard mit 1ml Standardverdünnungslösung rekonstituieren und für 15 Minuten bei Raumtemperatur durchmischen (Konzentration: 25 ng/ml);
3. Versuchskontrollen (VK hoch, VK niedrig) mit 350 µl (für VK hoch) bzw. 400 µl (für VK niedrig) deionisiertem Wasser rekonstruieren und für 15 Minuten bei Raumtemperatur durchmischen;
4. Verdünnungsreihe zur Erstellung der jeweiligen Standardkonzentrationen:
 - Standard 1: Standardkonzentrat → 25 ng/ml
 - Standard 2: 300 µl Standard 1 + 450 µl Standardverdünnungslösung → 10 ng/ml
 - Standard 3: 300 µl Standard 2 + 300 µl Standardverdünnungslösung → 5 ng/ml
 - Standard 4: 300 µl Standard 3 + 300 µl Standardverdünnungslösung → 2,5 ng/ml
 - Standard 5: 300 µl Standard 4 + 450 µl Standardverdünnungslösung → 1 ng/ml
 - Standard 6: 300 µl Standard 5 + 300 µl Standardverdünnungslösung → 0,5 ng/ml
 - Standard 7: 300 µl Standard 6 + 300 µl Standardverdünnungslösung → 0,25 ng/ml
5. Vor dem Auftragen jeweilige Standardkonzentrationen verdünnen:
 - 100 µl je Standardkonzentration + 200 µl Standardverdünnungslösung
6. Vor dem Auftragen Versuchskontrollen und Liquorproben verdünnen:
 - 100 µl je Versuchskontrolle + 200 µl Verdünnungspuffer
 - 100 µl Liquor + 200 µl Verdünnungspuffer
 - Bei notwendiger Verdünnung der Liquorproben weitere Verdünnungsstufen mit Verdünnungspuffer erstellen;
 - Die Leerprobe enthält nur Standardverdünnungslösung
7. Je 100 µl Standard, Versuchskontrolle und Liquorprobe im Doppelansatz in die entsprechende Kavität pipettieren;
8. ELISA-Platte auf Plattformschüttler für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren;
9. Waschlösung vorbereiten:
 - 100 ml Waschlösungskonzentrat + 900 ml deionisiertes Wasser;
10. Platte 3x mit Waschlösung waschen und auf Zellstoff vorsichtig trocken klopfen;

9 Anhang

11. 100 µl der gebrauchsfertigen Lösung des Biotin-markierten Antikörpers in jede Kavität pipettieren;
12. ELISA-Platte auf Plattformschüttler für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren;
13. Platte 3x mit Waschlösung waschen und auf Zellstoff vorsichtig trocken klopfen;
14. 100 µl der gebrauchsfertigen Konjugatlösung in jede Kavität pipettieren;
15. ELISA-Platte auf Plattformschüttler für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren;
16. Platte 3x waschen und auf Zellstoff vorsichtig trocken klopfen;
17. 100 µl der gebrauchsfertigen Substratlösung in jede Kavität pipettieren;
18. ELISA-Platte im Dunkeln für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren;
19. 100 µl der Stopplösung in jede Kavität pipettieren; Dieselbe Reihenfolge wie beim Auftragen der Substratlösung einhalten;
20. Photometrische Auswertung innerhalb von 5 Minuten mit Hilfe des Synergy 2 Multi-Detektions-Readers (Fa. BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Referenzwellenlänge 630 nm und zugehöriger Software Gen5™ Datenanalyse-Software (Fa. BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)

9 Anhang

Layout des GFAP-ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1		VK hoch		Probe 7		Probe 15		Probe 23		Probe 31	
B	STD 2		VK niedrig		Probe 8		Probe 16		Probe 24		Probe 32	
C	STD 3		Probe 1		Probe 9		Probe 17		Probe 25		Probe 33	
D	STD 4		Probe 2		Probe 10		Probe 18		Probe 26		Probe 34	
E	STD 5		Probe 3		Probe 11		Probe 19		Probe 27		Probe 35	
F	STD 6		Probe 4		Probe 12		Probe 20		Probe 28		Probe 36	
G	STD 7		Probe 5		Probe 13		Probe 21		Probe 29		Probe 37	
H	Leerprobe		Probe 6		Probe 14		Probe 22		Probe 30		Probe 38	

STD = Standard, VK = Versuchskontrolle

9.4 Messwerte

Tabelle 2: Tau-Protein-, MIP-3 β - und GFAP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis (CSF) der Studienpopulation nach subokzipitaler (sub) und lumbaler (lum) Punktion.

Lfd. Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Grad	Verbes- serung	Klassifi- zierung	Tau sub (pg/ml)	Tau lum (pg/ml)	MIP-3 β sub (pg/ml)	MIP-3 β lum (pg/ml)	GFAP sub (ng/ml)	GFAP lum (ng/ml)
1	Dackel	10	w	4	ja	akut/ subakut	0,0	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
2	frz. Bulldogge	2	m	4	ja	akut/ subakut	0,0	n.v.	1013,5	n.v.	0,8	n.v.
3	Dackel	5	wk	4	ja	akut/ subakut	0,0	n.v.	102,5	n.v.	0,3	n.v.
4	Jack Russell Terrier	6	m	4	ja	akut/ subakut	46,7	n.v.	425,5	n.v.	9,3	n.v.
5	Dackel	10	m	4	ja	akut/ subakut	99,2	n.v.	319,1	n.v.	1,8	n.v.
6	frz. Bulldogge	2	w	4	ja	akut/ subakut	0,0	n.v.	107,3	n.v.	0,6	n.v.

9 Anhang

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Lfd. Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Grad	Verbes- serung	Klassifi- zierung	Tau sub (pg/ml)	Tau lum (pg/ml)	MIP-3β sub (pg/ml)	MIP-3β lum (pg/ml)	GFAP sub (ng/ml)	GFAP lum (ng/ml)
7	Mischling	2	mk	4	ja	akut/ subakut	n.v.	1224,4	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
8	Dackel	10	wk	4	ja	akut/ subakut	n.v.	907,3	n.v.	302,2	n.v.	n.v.
9	Dackel	7	mk	4	ja	akut/ subakut	24,1	59,6	108,5	380,7	1,4	1,8
10	Dackel	5	w	4	ja	akut/ subakut	239,8	n.v.	882,0	n.v.	0,4	n.v.
11	Mischling	6	mk	4	ja	akut/ subakut	36,5	n.v.	85,8	n.v.	0,4	n.v.
12	Havanese	2	m	4	ja	akut/ subakut	59,6	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
13	frz. Bulldogge	3	wk	4	ja	akut/ subakut	55,5	n.v.	357,6	n.v.	n.v.	n.v.
14	Bolonka Zwetna	5	m	4	ja	akut/ subakut	39,6	1198,4	97,4	283,3	0,5	17,4

9 Anhang

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Lfd. Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Grad	Verbes- serung	Klassifi- zierung	Tau sub (pg/ml)	Tau lum (pg/ml)	MIP-3β sub (pg/ml)	MIP-3β lum (pg/ml)	GFAP sub (ng/ml)	GFAP lum (ng/ml)
15	Mischling	4	mk	4	ja	akut/ subakut	43,4	851,7	112,2	1067,7	0,9	5,4
16	Chihuahua	6	w	4	ja	akut/ subakut	25,0	n.v.	129,1	n.v.	1,3	n.v.
17	Dackel	7	mk	4	nein	akut/ subakut	27,5	n.v.	201,7	n.v.	0,3	n.v.
18	Dackel	7	m	4	nein	akut/ subakut	0,0	78,1	n.v.	484,1	0,6	24,6
19	West Highland White Terrier	11	mk	4	nein	akut/ subakut	55,1	n.v.	873,0	n.v.	38,0	n.v.
20	Dackel	4	w	5	nein	akut/ subakut	169,7	1711,4	159,7	1099,0	0,8	n.v.
21	Mischling	3	mk	5	ja	akut/ subakut	0,0	n.v.	222,0	n.v.	1,8	n.v.

9 Anhang

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Lfd. Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Grad	Verbes- serung	Klassifi- zierung	Tau sub (pg/ml)	Tau lum (pg/ml)	MIP-3β sub (pg/ml)	MIP-3β lum (pg/ml)	GFAP sub (ng/ml)	GFAP lum (ng/ml)
22	Dackel	6	w	5	ja	akut/ subakut	0,0	n.v.	40,8	n.v.	n.v.	n.v.
23	Shih Tzu	13	mk	5	ja	akut/ subakut	55,5	1574,0	525,2	1373,5	1,9	16,2
24	Dackel	5	w	5	ja	akut/ subakut	208,1	n.v.	423,1	n.v.	1,7	n.v.
25	Dackel	5	w	5	ja	akut/ subakut	0,0	n.v.	1347,3	n.v.	1,9	n.v.
26	Dackel	4	w	5	ja	akut/ subakut	0,0	348,8	73,2	84,4	0,2	12,0
27	Dackel	5	wk	5	nein	akut/ subakut	30,2	n.v.	1326,8	n.v.	11,5	n.v.
28	Mischling	4	m	5	nein	akut/ subakut	306,5	n.v.	636,0	n.v.	6,7	n.v.

9 Anhang

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Lfd. Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Grad	Verbes- serung	Klassifi- zierung	Tau sub (pg/ml)	Tau lum (pg/ml)	MIP-3β sub (pg/ml)	MIP-3β lum (pg/ml)	GFAP sub (ng/ml)	GFAP lum (ng/ml)
29	frz. Bulldogge	3	w	5	nein	akut/ subakut	59,3	n.v.	100,6	n.v.	18,0	n.v.
30	Dackel	6	m	5	nein	akut/ subakut	323,8	n.v.	182,6	394,1	0,4	n.v.
31	frz. Bulldogge	4	mk	5	nein	akut/ subakut	55,0	n.v.	1551,7	n.v.	n.v.	n.v.
32	Dackel	5	w	5	nein	akut/ subakut	76,6	2676,2	349,6	1186,1	1,8	n.v.
33	Yorkshire Terrier	6	m	5	nein	akut/ subakut	51,6	n.v.	1550,6	n.v.	4,8	n.v.
34	Dackel	6	wk	5	ja	akut/ subakut	35,2	1094,0	n.v.	462,0	n.v.	n.v.
35	Dackel	8	w	5	ja	akut/ subakut	0,0	n.v.	472,1	n.v.	0,8	n.v.
36	Dackel	16	mk	5	ja	akut/ subakut	35,8	n.v.	133,5	n.v.	1,3	n.v.

9 Anhang

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Lfd. Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Grad	Verbes- serung	Klassifi- zierung	Tau sub (pg/ml)	Tau lum (pg/ml)	MIP-3β sub (pg/ml)	MIP-3β lum (pg/ml)	GFAP sub (ng/ml)	GFAP lum (ng/ml)
37	Dackel	4	mk	4	n.k.	chronisch	91,5	n.v.	98,7	n.v.	2,0	n.v.
38	frz. Bulldogge	4	w	4	n.k.	chronisch	45,7	60,4	128,8	224,2	1,0	14,2
39	Yorkshire Terrier	15	m	5	n.k.	chronisch	53,9	n.v.	225,4	n.v.	2,3	n.v.
40	Mischling		m	5	n.k.	chronisch	0,0	n.v.	0,0	n.v.	0,3	n.v.
41	Dackel	5	m	5	n.k.	chronisch	0,0	n.v.	0,0	n.v.	0,8	n.v.
42	Dackel	6	w	5	n.k.	chronisch	59,7	n.v.	461,2	n.v.	12,0	n.v.
43	Mischling	4	m	5	n.k.	chronisch	0,0	n.v.	41,0	n.v.	n.v.	n.v.
44	frz. Bulldogge	4	m	5	n.k.	chronisch	0,0	n.v.	0,0	n.v.	3,0	n.v.
45	frz. Bulldogge	3	wk	5	n.k.	chronisch	24,0	n.v.	95,8	n.v.	n.v.	n.v.
46	Dackel	4	m	5	n.k.	chronisch	27,1	n.v.	30,0	n.v.	0,4	n.v.
47	Dackel	7	w	5	n.k.	chronisch	0,0	44,2	55,3	204,3	0,8	8,4

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Lfd. Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Grad	Verbes- serung	Klassifi- zierung	Tau sub (pg/ml)	Tau lum (pg/ml)	MIP-3 β sub (pg/ml)	MIP-3 β lum (pg/ml)	GFAP sub (ng/ml)	GFAP lum (ng/ml)
48	frz. Bulldogge	3	mk	5	n.k.	chronisch	0,0	n.v.	138,7	n.v.	1,3	n.v.
49	frz. Bulldogge	3	wk	5	n.k.	chronisch	28,9	66,7	162,2	140,5	3,2	27,6

Lfd. Nr. = Laufende Nummer

Tau = Tau-Protein, MIP-3 β = macrophage inflammatory protein-3 β , GFAP = saures Gliafaserprotein

sub = subokzipital, lum = lumbal

m = männlich, mk = männlich-kastriert, w = weiblich, wk = weiblich-kastriert

pg = pikogramm, ng = nanogramm, ml = mililiter

n.k. = nicht klassifiziert

n.v. = nicht vorhanden (Liquorentnahme nicht möglich/Liquorvolumen für Messung nicht ausreichend)

9 Anhang

Tabelle 3: Tau-Protein, MIP-3 β - und GFAP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis (CSF) der Kontrollgruppe nach subokzipitaler (sub) und lumbaler (lum) Punktion

Lfd. Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Klassifizierung	Tau sub (pg/ml)	Tau lum (pg/ml)	MIP-3 β sub (pg/ml)	MIP-3 β lum (pg/ml)	GFAP sub (ng/ml)	GFAP lum (ng/ml)
50	Beagle	2	m	Kontrolle	0,0	n.v.	0,0	n.v.	1,0	n.v.
51	Beagle	1	mk	Kontrolle	22,4	n.v.	83,2	n.v.	0,4	n.v.
52	Beagle	2	w	Kontrolle	0,0	0,0	65,6	73,2	0,6	14,2
53	Beagle	2	w	Kontrolle	0,0	0,0	82,8	60,4	1,0	2,2
54	Beagle	3	wk	Kontrolle	35,7	0,0	85,1	65,3	1,1	11,4
55	Beagle	6	m	Kontrolle	21,2	n.v.	67,8	n.v.	0,6	n.v.
56	Beagle	2	m	Kontrolle	0,0	n.v.	71,1	n.v.	0,4	n.v.

Lfd. Nr. = Laufende Nummer

Tau = Tau-Protein, MIP-3 β = macrophage inflammatory protein-3 β , GFAP = saures Gliafaserprotein

sub = subokzipital, lum = lumbal

m = männlich, mk = männlich-kastriert, w = weiblich, wk = weiblich-kastriert

pg = pikogramm, ng = nanogramm, ml = mililiter

n.k. = nicht klassifiziert; n.v. = nicht vorhanden (Liquorentnahme nicht möglich)

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Subokzipitale Punktion des CSF 17

Abbildung 2: Prinzip der verwendeten ELISAs. Die ELISA-Platten sind mit einem Fangantikörper vorbeschichtet, der die zu untersuchende Substanz selektiv bindet. Durch Zugabe eines biotinylierten Detektionsantikörper wird eine Bindung des mit Meerrettich-Peroxidase versehenen Streptavidin/Avidin ermöglicht. Das Substrat Tetramethylbenzidin wird durch die Meerrettich-Peroxidase enzymatisch umgesetzt, was einen Farbumschlag erzeugt. 21

Abbildung 3: Antikörperbindungen des Tau-Protein-ELISA Die ELISA-Platten sind mit dem monoklonalen Fangantikörper AT 120 vorbeschichtet, der vorhandenes Tau-Protein in der Probe selektiv binden kann. Die zugegebenen anti-hTAU Antikörper BT2 und HT7 sind biotinyliert. Die Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase bindet an das Biotin und ermöglicht so die enzymatische Reaktion, die zu einem Farbumschlag führt. 22

Abbildung 4: Standardkurve eines Tau-Protein-ELISA. Die optische Dichte (y-Achse) ist gegen die logarithmierte Konzentration des Tau-Proteins (x-Achse) aufgetragen. Über die optische Dichte der Proben kann die Tau-Protein-Konzentration exakt bestimmt werden. 23

Tabellen:

Tabelle 1: Anzahl (n) und Unterteilung der paraplegischen Hunde anhand der An- (Grad 4) und Abwesenheit (Grad 5) des Tiefenschmerzes gemäß Sharp und Wheeler (2005)..... 16

Tabelle 2: Tau-Protein-, MIP-3 β - und GFAP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis (CSF) der Studienpopulation nach subokzipitaler (sub) und lumbaler (lum) Punktion..... 80

Tabelle 3: Tau-Protein, MIP-3 β - und GFAP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis (CSF) der Kontrollgruppe nach subokzipitaler (sub) und lumbaler (lum) Punktion 87

11 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Veronika Stein für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und ihre ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung. Ihre stets hilfsbereite Art, ihr offenes Ohr bei jeglichen Problemen, ihr Verständnis und ihre Motivation haben mich auf diesem Werdegang sehr unterstützt. Danke für diese tolle Betreuung!

Frau Prof. Dr. Andrea Tipold möchte ich herzlich für Ihre Hilfestellung bei wissenschaftlichen und praktischen Fragestellungen und für das Schaffen eines familiären Arbeitsumfeldes danken.

Frau Regina Carlson danke ich herzlich für Ihre tatkräftige Unterstützung im Labor.

Herrn Prof. Michael Fehr danke ich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. Karl Rohn möchte ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten danken.

Bei dem gesamten Team der Neurologie möchte ich mich ganz herzlich für die wunderschöne und lehrreiche Zeit bedanken. Ganz besonders möchte ich auch Arianna und Jasi für ihren unermüdlichen Einsatz bei der lumbalen Liquorentnahme danken! Danke, dass ich Teil eines so tollen Teams sein konnte!

Bei meinen Mitdoktoranden möchte ich mich für die gemeinsame Zeit bedanken. Nicole, danke für deine Freundschaft und dein Vertrauen. Johannes, deine philosophische Ader wird mir fehlen. Ute, die gemeinsame Neuro-Klassenfahrt war toll mit dir. Thomas und Franz - ich werde euch und eure Gemälde vermissen! Silvia du bist ein Unikat - ich werde dich vermissen! Vielen lieben Dank auch an das gesamte Doktorandenzimmer für die gemeinsamen Stunden, Mensagänge und Kaffeepausen!

Meinen Eltern möchte ich für ihr Vertrauen in mich, ihre durchgehende Unterstützung auf meinem beruflichen Werdegang und ihr offenes Ohr danken.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Henning danken – für deine Motivation, deine Geduld, deine Unterstützung und deine Liebe.