

# Motor physiology and neural network anatomy in rats following incomplete cervical spinal cord injury

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Filli, Linard Peider

**Publication date:**

2011

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006851070>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

**Motor physiology and neural network anatomy in rats  
following incomplete cervical spinal cord injury**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree

**Doctor of Science**

**ETH Zurich**

presented by

**Linard Peider Filli**

Master of Science ETH in Biology

12.03.1984

Val Müstair, GR

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin E. Schwab

Prof. Dr. Volker Dietz

Prof. Dr. Kevan Martin

Prof. Dr. Fritjof Helmchen

## Summary

Spinal cord injury and subsequent pathophysiological processes often lead to devastating and irreversible deficits in sensorimotor and autonomous functions in affected patients. Despite substantial progress in clinical care and rehabilitative training, spontaneous restoration of neurological functions after spinal injury is still limited. Extensive laboratory research over the last decades in animal models has shed new light on many of the mechanisms responsible for the restricted neuronal plasticity and functional recovery. Different growth-inhibitory components of the central nervous systems were identified and subsequently targeted by experimental treatment strategies to enhance neuronal plasticity and functional recovery in animal models of spinal cord injury. Indeed, multiple experimental strategies revealed significant improvements in neuroanatomical or sensorimotor properties of the injured animals. Nevertheless, the clinical translation of these experimental treatments emerged to be enormously challenging. The issue of translational research in the field of spinal cord repair is reviewed in chapter 1.

Chapter 2 of the thesis deals with a second important topic of translational spinal cord injury research, which is the accurate assessment of locomotor performance after different forms of neuropathologies. Behavioral analysis in animal research is frequently performed by tests which suffer from subjectivity, non-linearity and insensitivity. The subjectivity hinders the comparison of data across laboratories, and the insensitive tests impede the accurate analysis of, for instance, treatment-induced functional recovery. We constructed a behavioral testing battery including 4 different forms of locomotion, which allows a global, comprehensive and quantitative monitoring of locomotor functions in rodents. Transgenic mice and rats with different forms of spinal cord injury and ischemic stroke were investigated by kinematic analysis to validate the reliability and sensitivity of the testing system. The acquisition of multiple quantitative readouts during skilled locomotion, walking, wading and swimming allowed an accurate profiling of locomotor recovery after different types of central nervous system injury in adult rodents.

The most abundant type of spinal injury among humans is cervical incomplete spinal cord injury, resulting in sensorimotor impairments of upper and lower extremities. Nevertheless, studies investigating tetraplegic animal models and forelimb motor functions are rare. In Chapter 3 and 4 of the thesis, physiological and anatomical features of rats with a unilateral C4/C5 hemisection were investigated. This type of lesion leads to the Brown-Séquard syndrome revealing ipsilesional

weakness in motor and proprioceptive functions and contralesional loss of pain and temperature sensation.

Chapter 3 of the present work displays the physiological similarities between rats and humans with unilateral damage of the spinal cord. Similar to humans with incomplete cervical spinal cord injuries, rats with a unilateral C4/C5 hemisection recovered substantial locomotor functions of lower extremities, but only limited functional recovery of upper extremities. Potential reasons accounting for this disproportional recovery pattern were investigated in detail. Additionally, differential effects of monoaminergic agonists on fore- and hindlimb locomotor performance were demonstrated. Monoaminergic agonists, which have repeatedly shown to massively facilitate hindlimb stepping in different animal species with complete spinal cord transection, revealed minor and mostly negative effects on hindlimb locomotion, and no effects on forelimb functions in animals with a C4/C5 hemisection. Taken together, this chapter displayed remarkable differences in the functionality of fore- and hindlimb motor networks.

Anatomical plasticity following unilateral C4/C5 hemisection was examined in chapter 4. The combination of retrograde/anterograde neuroanatomical tracing with immunohistochemical stainings revealed spontaneous anatomical plasticity of different neuronal systems. Severed reticulospinal fibers originating from the nucleus reticularis gigantocellularis showed a massive fiber sprouting rostral to the spinal lesion, which persisted up to 43 days post injury. These fibers were colocalized with the presynaptic marker vGLUT2 and additionally formed close-appositions to C3-C4 propriospinal neurons. These neurons were shown to re-cross the lesion site and to innervate the ipsilesional cervical enlargement, thereby bridging supraspinal commands to the denervated spinal cord. The functional relevance of this propriospinal relay is currently investigated.

Finally, Chapter 5 of the thesis provides a general conclusion and outlook about the present doctoral thesis.

Summarized, this thesis provides detailed information about physiological and neuroanatomical aspects upon incomplete cervical spinal cord injury in adult rats. A new, comprehensive behavioral setup enabled a quantitative and sensitive profiling of locomotor functions. Basic differences between fore- and hindlimb spinal circuits and their functional dependence on descending inputs and pharmacological spinal excitation were displayed. Moreover, anatomical investigations resolved neuronal plasticity at different levels of the central nervous system. Descending reticulospinal fibers

and propriospinal neurons rostral to the lesion anatomically rearranged post injury in order to relay supraspinal information to the denervated cervical enlargement.

## Zusammenfassung

Rückenmarksverletzungen und daraus resultierende Folgeprozesse führen oft zu bleibenden Schäden der motorischen, sensorischen und autonomen Funktionen in betroffenen Patienten. Trotz grosser Fortschritte in der medizinischen Betreuung und in rehabilitativen Behandlungsstrategien, erholen sich diese Leute nur geringfügig (z.B. motorisch oder sensorische Funktionen). Umfangreiche Tierversuche während der letzten Jahrzehnte haben viele der Mechanismen entschlüsselt, die für die geringe neuronale Plastizität und funktionelle Erholung verantwortlich sind. Verschiedene dieser wachstumshemmenden Bestandteile des Zentralnervensystems wurden gefunden und in späteren Tierexperimenten anvisiert, um die neuronale Plastizität und die funktionelle Erholung nach Rückenmarksverletzungen zu erhöhen. Mehrere dieser experimentellen Strategien haben tatsächlich deutliche Verbesserungen von neuroanatomischen oder sensorischen/motorischen Eigenschaften in verletzten Tieren hervorrufen können. Nichtsdestotrotz stellte sich die klinische Umsetzung dieser tierexperimentellen Behandlungen als äusserst schwierig heraus. Die Thematik der translationellen Forschung im Feld der Rückenmarksregeneration wird in Kapitel 1 besprochen.

Im Kapitel 2 dieser Doktorarbeit wird eine weitere wichtige Thematik in der Forschung von Neuropathologien besprochen. Es geht um die präzise Messung der Fortbewegungsfähigkeit nach verschiedenen Formen von neurologischen Pathologien. Verhaltensanalysen in Tierexperimenten sind immer noch häufig subjektiv, nicht-linear und unzureichend genau. Dies erschwert den Vergleich von Daten zwischen verschiedenen Laboratorien und die Erkennung von potentiellen Behandlungserfolgen in Tiermodellen. Wir haben in unserem Labor nun eine Verhaltensbatterie konstruiert, die 4 verschiedenen Fortbewegungsarten gleichzeitig untersucht. Dies ermöglicht eine vollständige, verständliche und quantitative Untersuchung der Fortbewegung in Tiermodellen. Transgene Mäuse und Ratten mit verschiedenen Arten von Rückenmarkverletzungen und einem Hirnschlags-Modell sind kinematisch untersucht worden, um die Verlässlichkeit und Sensitivität des Testapparates zu überprüfen. Die parallele Datenerhebung in den verschiedenen Tests (Leiterlaufen, normales Laufen, Waten und Schwimmen) ermöglichte eine genaue Profilerstellung und Defizitanalyse der Fortbewegung in Tiermodellen mit verschiedenen Formen von Verletzungen im zentralen Nervensystem.

Die am häufigsten auftretende Form von menschlichen Rückenmarksverletzungen ist die inkomplette Verletzung des zervikalen Rückenmarks. Diese Art der Rückenmarksverletzung erzeugt sensorische/motorische Schäden in Armen und Beinen. Trotz der Häufigkeit ihres Auftretens werden

diese Verletzung und die daraus folgenden Defizite in Armen und Händen nur selten in Tiermodellen untersucht. Kapitel 3 und 4 dieser Arbeit untersuchten die physiologischen und anatomischen Eigenschaften in Ratten mit einseitiger Verletzung des Rückenmarks auf der zervikalen Höhe C4/C5. Diese Verletzung führt zum Brown-Séquard Syndrome, das sich durch ipsiläsionale Schäden der Motorik und der propriozeptiven Sensorik, und durch den kontralateralen Verlust von Schmerz- und Temperaturempfinden äussert.

Kapitel 3 zeigt die physiologischen Ähnlichkeiten zwischen dem Ratten-Model und dem Menschen mit einseitigen Verletzungen des Rückenmarks auf. Ähnlich dem Menschen zeigten Ratten mit entsprechender Verletzung im zervikalen Rückenmark (C4/C5) starke motorische Verbesserungen der Beinbewegungen, aber nur wenig funktionelle Erholung im betroffenen Arm. Die möglichen Gründe für diese asymmetrische Erholung wurden detailliert untersucht. Zusätzlich wurde entdeckt, dass monoaminerge Agonisten sehr verschieden auf die Vorder- und Hinterbeine wirkten. In früheren Experimenten wurde wiederholt gezeigt, dass die Applikation von monoaminergen Agonisten zu erheblichen Verbesserungen der Hinterbeinfunktionen in Tieren mit kompletter Durchtrennung des Rückenmarks führen kann. Tiere in unserem Experiment, die inkomplette Verletzungen hatten, zeigten eine geringe und meist negative Beeinflussung der Hinterbeinfunktion, und keine Effekte in den Vorderarmen. Zusammengefasst zeigt dieses Kapitel, dass es erhebliche Unterschiede in der Funktionalität zwischen Vorder- und Hinterbeinen gibt.

Kapitel 4 beschäftigte sich mit der anatomischen Plastizität, die nach der unilateralen C4/C5 Hemisektion des Rückenmarks auftritt. Die Kombination von anterograden und retrograden Farbstoff-Techniken mit immunohistochemischen Färbungen hat gezeigt, dass spontane anatomische Plastizität in verschiedenen Teilen des Zentralnervensystems auftritt. Reticulospinalfasern, die aus dem nucleus reticularis gigantocellularis im Hirnstamm entspringen, zeigten ein massives Faserspriesen oberhalb der spinalen Läsion, das bis 43 Tage nach der Verletzung bestehen blieb. Die spriessenden Fasern wurden positiv auf den synaptischen Marker vGLUT2 gefärbt. Dies deutet darauf hin, dass diese Fasern sich in die spinalen Netzwerke verschaltet haben und neuronale Verknüpfungen bilden. Weiter wurde gezeigt, dass die Fasern Verbindungen zu propriospinalen Neuronen herstellten, die oberhalb der Läsion lokalisiert sind. Diese propriospinalen Neurone wiesen Fasern auf, die die Verletzung umgehen konnten und unterhalb der Verletzung wieder endeten. Das ganze System bildete somit einen Umweg um die Läsion, das einen Informationsfluss zwischen Hirn und abgeschnittenen

Rückenmarksteilen wieder ermöglichte. Die funktionelle Bedeutung dieser anatomischen Veränderungen wird in derzeitigen Experimenten erforscht.

Kapitel 5 der Dissertation liefert eine generelle Schlussfolgerung der Doktorarbeit und diskutiert mögliche zukünftige Experimente, um verbleibende Fragen zu klären.

Zusammengefasst liefert diese Doktorarbeit detaillierte Informationen über die physiologischen und neuroanatomischen Aspekte, die nach einer teilweisen zervikalen Rückenmarksverletzung in Ratten auftreten. Ein neuer Verhaltensapparat ermöglichte eine quantitative und genaue Fortbewegungsanalyse, welche für die genaue Verhaltensforschung gebraucht werden kann. Es wurde gezeigt, dass es starke Unterschiede in der Funktionalität zwischen Vorder- und Hinterbeinen gibt. Vorder- und Hinterbeine reagieren sehr verschieden auf Unterbrechungen von Hirnimpulsen und auf spezifische neuromodulatorische Medikamente. Weiter hat die Untersuchung der Anatomie erwiesen, dass neuronale Plastizität auf verschiedenen Ebenen des Zentralnervensystems stattfindet. Reticulospinale Hirnstambahnen haben vermehrt auf propriospinale Neuronen projiziert, die Fasern um die Verletzung wachsen liessen.