

Aus dem Institut für Tierpathologie
(Lehrstuhl: Allgemeine Pathologie und Neuropathologie)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Schmahl)

Transkranielle, spinale und periphere Magnetstimulation bei Maus und Hund

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Daniela Emrich
aus
Sigmaringen

München, 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Köstlin
Univ.-Prof. Dr. Nuss
Univ.-Prof. Dr. Hartmann
Univ.-Prof. Dr. Matis

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis	x
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Magnetstimulation im Allgemeinen	3
2.1.1 Historischer Überblick	3
2.1.2 Physikalische Grundlagen	4
2.1.3 Sicherheitsaspekte und Richtlinien	8
2.1.4 Reizweiterleitung im Nervengewebe	10
2.1.5 Reizauslösung durch Stimulation	11
2.1.6 Speziesspezifische Reizweiterleitung	13
2.1.7 Magnetstimulation versus Elektrostimulation	14
2.2 Anwendungsgebiete der Magnetstimulation	15
2.2.1 Magnetstimulation in der Humanmedizin	17
2.2.2 Magnetstimulation in der experimentellen Tiermedizin	20
2.3 Magnetstimulation in Wissenschaft und Zukunft	22
2.3.1 Spulenoptimierung	23
2.3.2 Pulsformoptimierung	25
2.4 Transkranielle Magnetstimulation und Pharmaka	27
2.4.1 Narkose und magnetisch motorisch evoziertes Potential	27
2.5 Periphere Magnetstimulation	28
2.5.1 Muskelaufbau und Kraftentwicklung	29
2.5.2 Innervation und motorische Einheiten	32
2.5.3 Denervation der Muskulatur nach Neurotrauma	32
2.5.4 Funktionelle Stimulation in der Rehabilitation	33

3	Eigene Untersuchungen	36
3.1	Zielsetzung	36
3.2	Versuchsgenehmigungen	37
3.3	Experimentelles Vorgehen für die Maus	37
3.3.1	Technische und methodische Vorarbeiten	37
3.3.2	Haltung der Tiere	48
3.3.3	Anästhesie und Monitoring	48
3.3.4	Magnetstimulation	49
3.3.5	Elektrophysiologische Ableitungen	49
3.3.6	Statistische Beurteilung	50
3.4	Experimentelles Vorgehen für den Hund	51
3.4.1	Technische Vorarbeiten	51
3.4.2	Haltung der Tiere	52
3.4.3	Anästhesie und Monitoring	52
3.4.4	Magnetstimulation	52
3.4.5	Kraftmessung	53
3.4.6	Statistische Beurteilung	53
3.5	Versuchsdurchführungen zur Magnetstimulation an der Maus	53
3.5.1	Festlegung der Stimulusintensität	53
3.5.2	Phänotypisierung durch SHIRPA-NP	54
3.5.3	Bestimmung der Magnetfeldausdehnung	60
3.5.4	Beurteilung von Anästhesieprotokollen	64
3.5.5	Beurteilung verschiedener Stimulationspunkte	66
3.6	Versuchsdurchführung zur Magnetstimulation am Hund	67
3.6.1	Beurteilung unterschiedlicher Impulsformen zur Kraftentwicklung	67
3.6.2	Untersuchte Tiere	68
3.6.3	Magnetstimulation	68
3.6.4	Kraftmessung	69
4	Ergebnisse	71
4.1	Transkranielle und spinale Magnetstimulation der Maus	71
4.1.1	Festlegung der Stimulusintensität	71
4.1.2	Eingangsuntersuchung via Phänotypisierung	71
4.1.3	Bestimmung der Magnetfeldausdehnung	77
4.1.4	Beurteilung der Spulenausrichtung	81
4.2	Bewertung unterschiedlicher Narkoseregimes der Maus	82
4.2.1	Beurteilung der anästhesiologischen Parameter	82

4.2.2	MMEP-Parameter	84
4.3	Stimulationspunktwahl und -orientierung	87
4.4	Kraftmessung durch periphere Magnetstimulation beim Hund	90
5	Diskussion	92
5.1	Neue Wege durch Magnetstimulation bei der Maus	92
5.1.1	SHIRPA-NP und reproduzierbare neurologische Phänotypisierung . .	92
5.1.2	Die Stimulusintensität als Garant für maximale Potentiale	95
5.1.3	Virtueller und tatsächlicher Bezug von Feldparametern und Stimula- tionsmaxima im lebenden Tier	97
5.1.4	Welche Narkose ist also zur Magnetstimulation der Maus geeignet? .	104
5.1.5	Zentrale Stimulationspunkte zur MMEP-Erzeugung bei der Maus . .	112
5.2	Periphere Magnetstimulation zur Kraftentwicklung beim Hund	117
5.2.1	Burst-Stimulation hat einen steigernden Effekt auf die Kraftentwick- lung	117
6	Zusammenfassung	122
7	Summary	124
	Danksagung	126
	Literaturverzeichnis	127

Tabellenverzeichnis

3.1	Untersuchungen innerhalb des SHIRPA-Protokolls	42
3.2	Benötigte Ausstattung zur Durchführung des SHIRPA-NP-Protokolls	46
3.3	Durchführung des SHIRPA-NP-Protokolls	54
3.4	Verwendete Narkoseprotokolle	65
4.1	Ergebnisse des SHIRPA-NP-Protokolls	75
4.2	Anästhesiologische Parameter der verwendeten Narkosen	83
4.3	Erhobene MMEP-Parameter je verwendeter Narkose	87
4.4	Erhobene MMEP-Parameter der Stimulationspunkte	90
4.5	Erhobene Kraft je Stimulationsprotokoll	91
5.1	Literaturübersicht zum Einfluss unterschiedlicher Anästhetika auf MMEPs . . .	105
5.2	Neuronale Repräsentationen je Stimulationspunkt	114

Abbildungsverzeichnis

2.1	Magnetfeld um die Windung einer stromdurchflossenen Rundspule	4
2.2	Flussrichtung der elektrischen und magnetischen Felder	5
2.3	Negativer monophasischer Impuls	6
2.4	Negativer biphasischer Impuls	6
2.5	Rund- und Achterspule mit sekundärem elektrischem Feld	7
2.6	Entstehung der Depolarisation am Axon	12
2.7	Gyriertes versus lissencephales Hirn	14
2.8	Schematische Darstellung der Definition von Latenz und Amplitude	16
2.9	Aufbau eines biphasischen Magnetstimulators	26
2.10	Querschnitt durch den Oberschenkel eines Hundes	30
2.11	Vergleich von neurogener und Inaktivitäts-Muskelatrophie	33
3.1	Organigramm zur Zielsetzung und Reihenfolge der durchgeführten Untersuchungen	38
3.2	Validierungsbefunde des SHIRPA-NP	40
3.3	Reaktionen auf das Anheben unterschiedlicher Mäuse an der Schwanzbasis	41
3.4	Beispiele für abnorme Bewegungsmuster	41
3.5	Phänotypisierungs-Aufbau	44
3.6	Rotarod	45
3.7	Heizfolie und Netzgerät	46
3.8	Laserzielsystem zur Stimulationspunktbestimmung	47
3.9	Zielvorrichtung mit eingespannter Stimulationsspule	48
3.10	Kraftaufnehmer	51
3.11	Fokale Achterspule mit erhobenem Bereich höchster Depolarisationskapazität	62
3.12	Ausgangsposition für die Spulenverschiebung	63
3.13	Schematisierte Darstellung der 0°-Position zur Rotations-Untersuchung	64
3.14	Transkranielle Stimulation nach Punktauswahl mit Linienlaser	67
3.15	Transkranielle Stimulationspunkte und spinaler Stimulationspunkt	68
3.16	Am Hund zur peripheren Magnetstimulation verwendete Achterspule	68
3.17	Schema eines Burstpulses	69

3.18	Versuchsaufbau zur Kraftmessung am Hund	70
4.1	Spinale Magnetstimulation einer Maus	78
4.2	Durchschnittliche Amplituden in den Punkten A, B und C der Spule	78
4.3	Durchschnittliche Amplituden der MMEPs an drei Spulenlokalisationen	79
4.4	Schematisiertes Potential zur Auslösung von MMEPs am Punkt A bei kranio- kaudaler Verschiebung	80
4.5	Abnahme der Amplituden mit zunehmender Bewegung in Z-Achsen-Richtung	81
4.6	Normierte Amplituden je Rotationswinkel	82
4.7	Beispiel abgeleiteter Potentiale zweier Mäuse unter KM-Anästhesie	84
4.8	Boxplots der erhobenen Latenzen zu den beiden Stimulationszeitpunkten	85
4.9	Durchschnittliche Latenzen je Narkose und Stimulationszeitpunkt	85
4.10	Boxplots der erhobenen Amplituden zu den beiden Stimulationszeitpunkten	86
4.11	Darstellung des Amplitudenabfalls mit Andauern der Narkose	86
4.12	Boxplots der Latenzen an den vier Stimulationspunkten	88
4.13	Median und paramedian erhobene Latenzen in S2 und S3	88
4.14	Boxplots der Amplituden an den vier Stimulationspunkten	89
4.15	Median und paramedian erhobene Amplituden in S2 und S3	89
4.16	Parabola und normierte Einzelwerte des Kraftanstiegs je Stimulationsprotokoll	91
5.1	Simulation maximaler und supramaximaler Stimulusintensität	95
5.2	Simulationen zu Feldstärke und Feldgradient der dezentralen Spule	99
5.3	Feldstärke parallel zur Spulenoberfläche	100
5.4	Feldstärkeberechnung zu Objekten größer als versus gleich groß wie die Spule	101
5.5	Feldstärken in 30 und 10 mm Entfernung zur dezentralisierten Spule	102
5.6	Schnittebenenkennzeichnung auf Höhe von S2-S3	113
5.7	Transversalschnitt auf Höhe von S1	113
5.8	Transversalschnitt auf Höhe von S2	115
5.9	Transversalschnitt auf Höhe von S3	115

Abkürzungsverzeichnis

ALS	A myotrophe L ateralsklerose
ATP	A denosin t riphosphat
B	Das Formelzeichen B steht für die Flächendichte des magnetischen Feldes
dB	D ezibel
DBP	D reifach- B urst- P uls
DMS	D ehnungsmessstreifen
EMND	E quine M otor N euron D isease
EP	E inzelpuls
ES	E lektrostimulation
FBP	F ünffach- B urst- P uls
FES	F unktionelle E lektrostimulation
FMS	F unktionelle M agnetstimulation
F-Welle	Physiologische motorische Spätantwort, welche am peripheren Nerven als Rückschlagwelle (antidrome Reizleitung) nach supramaximaler Reizung auftritt
GABA	G amma- a minobutyric a cid; hemmender Transmitter des Zentralnervensystems
GFAP	G lial F ibrillary A cidic P rotein
HE	H interextremität
H-Reflex	elektrisch ausgelöster Eigenreflex, zur Darstellung der Dorsalwurzel und intraspinalen synaptischen Verschaltung
Hz	H ertz; Einheit der Frequenz
ISI	I nterstimulus- I nterval
ISO	I sofluran

KE	Krafteinheiten
KE_{Incl}	Krafteinheiten, Incline
KE_{Lat}	Krafteinheiten, Latenz
KE_{max}	Krafteinheiten, maximal
kHz	Kilohertz; Einheit der Frequenz
KM	Ketamin/Medetomidin
kW	Kilowatt ; Einheit der Leistung
KX	Ketamin/Xylazin
KXA	Ketamin/Xylazin/Acepromazin
M.	Musculus
M-Welle	Physiologische motorische Antwort nach peripherer Nervenreizung
MEP	Motorisch Evoziertes Potential
MMEP	Magnetisch Motorisch Evoziertes Potential
MMF	Medetomidin/Midazolam/Fentanyl
MS	Magnetstimulation
mV	Millivolt; Einheit der elektrischen Spannung
p	Ergebnis eines statistischen Signifikanztests, mit welchem eine Hypothese überprüft wurde
PE	Pentobarbital
PMS	Periphere Magnetstimulation
rPMS	repetitive Periphere Magnetstimulation
rTMS	repetitive Transkranielle Magnetstimulation
S1	Stimulationspunkt 1, im Bereich des Telencephalons
S2	Stimulationspunkt 2, am Übergang von Di- zu Mesencephalon
S3	Stimulationspunkt 3, im Bereich des Rhombencephalons
S4	Stimulationspunkt 4, spinaler Stimulationspunkt
SBP	Sechsfach-Burst-Puls
SEV	Sevofluran

SHIRPA	SmithKline Beecham Pharmaceuticals; H arwell, MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit; I mperial College School of Medicine at St Mary's R oyal London Hospital, St Bartholomew's und die Royal London School of Medicine; P henotype A ssessment
SHIRPA-NP	SHIRPA-Neuro P athologie
SMS	Spinale M agnetstimulation
T	T esla; abgeleitete SI-Einheit der magnetische Flussdichte oder Induktion
TES	Transkranielle E lektrostimulation
TMS	Transkranielle M agnetstimulation
U	Umdrehung
USB	Universeller S erieller B us
V	V olt; SI-Einheit der elektrischen Spannung
VBP	V ierfach- B urst- P uls
VE	V orderextremität
W	W att; SI-Einheit der Leistung
ZBP	Z weifach- B urst- P uls
ZML	Z entral m otorische L eitungszeit
ZNS	Z entral n ervensystem

1 Einleitung

Seit nunmehr etwa 25 Jahren ist die transkranielle und periphere Magnetstimulation im Augenmerk der Neurologie. Sie hielt Einzug in Therapie und Diagnostik und ist inzwischen aufgrund ihrer Schmerzfreiheit, Gefahrenarmut und vergleichsweise einfachen Anwendung sowohl bei Patienten als auch bei Ärzten beliebt.

Bis heute beschäftigt sich die wissenschaftliche Forschung mit der Wirkungsweise, den limitierenden Faktoren und weiteren Anwendungsgebieten der Magnetstimulation. In den letzten Jahren wurde viel Mühe darauf verwendet, die Technik der Magnetstimulation zu verbessern. Mit Hilfe neuartiger Spulen, Frequenzen und variierbarer Stimulationsprotokolle ist das Feld der Anwendungsmöglichkeiten bis heute gewachsen und wächst weiter.

Technische Neuerungen ermöglichen inzwischen auch die Magnetstimulation an Nagern, deren kleinvolumiges Zentralnervensystem bis vor Kurzem eine unüberwindbare Hürde für die Technik darstellte. Denn je kleiner ein stimulierbares Volumen, desto höhere Energie ist zu dessen Stimulation notwendig. Da mittlerweile zahllose Mausmodelle für human- und veterinärneurologische Erkrankungen bekannt sind, die für das Verständnis der Wirkungsmechanismen der Magnetstimulation genutzt werden können, ist die Etablierung der Magnetstimulation am Kleinnager notwendig geworden.

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit der TU München unter Betreuung von Herrn PD Dr. Thomas Weyh (Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik), des Klinikums Rechts der Isar in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Anne-Kathrin Preißel (Zentrum für Präklinische Forschung) und dem Helmholtz-Zentrum in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Lore Becker (German Mouse Clinic) durchgeführt. Die einzelnen Institute sind dabei seit Jahren jeweils mit der Magnetstimulation, der Labortierkunde bzw. der Phänotypisierung von Mausmodellen betraut.

Die vorliegende Abhandlung befasst sich schwerpunktmäßig mit der Magnetstimulation an der Maus und ist damit eine der ersten Studien zur standardisierten Durchführung der Magnetstimulation in dieser Spezies. Dazu wurde die Ausdehnung der Aktionspotentiale auslösenden Magnetfelder, die Stimulierbarkeit von Rückenmark und Hirn, die Anwendbarkeit unterschiedlicher Narkoseprotokolle und die Auslösung magnetisch evozierter motorischer Potentiale in verschiedenen Arealen des Zentralnervensystems der Maus überprüft.

Zusätzlich konnten im Rahmen dieser Studie neuartige Stimulations-Protokolle zur peri-

peren Magnetstimulation am Hund überprüft werden. Kürzlich gelang es der TU München (Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik), eine hochfrequente „Burst“- Stimulation durch Magnetstimulation zu realisieren. Unter elektrischer Stimulation konnte bereits früher gezeigt werden, dass „Bursts“ die Effektivität evozierter Muskelkontraktionen im Vergleich zum Einzelimpuls steigern können. Diese Wirkung ist insbesondere im Hinblick auf rehabilitatorische Prozesse gewünscht. Die vorliegende Pilotstudie am peripheren Nervensystem des Hundes erlaubt nun erstmals den Vergleich zwischen magnetischer Burst- und Einzelpulsstimulation im Hinblick auf ihren Effekt auf die ausgelöste Muskelkraft.

2 Literaturübersicht

2.1 Magnetstimulation im Allgemeinen

2.1.1 Historischer Überblick

Bereits 1870 fanden Gustav Fritsch und Eduard Hitzig in Berlin heraus, dass sich an der menschlichen Hirnrinde durch konstanten galvanischen Strom (Gleichstrom) Nervenpotentiale auslösen lassen (Fritsch und Hitzig, 1870). Wenige Jahrzehnte danach konnte bereits eine somatotopische Organisation am motorischen Kortex nachgewiesen werden (Grünbaum und Sherrington, 1903; Vogt und Vogt, 1919), die durch Penfields systematische Reizuntersuchung schließlich zum heute bekannten motorischen und sensiblen „Homunkulus“ führten (Penfield und Boldrey, 1937).

Weitere zwanzig Jahre später gelang es Gualtierotti und Paterson mit elektrischer Stimulation durch den intakten Schädel hindurch reizabhängige Muskelkontraktionen zu provozieren (Gualtierotti und Paterson, 1954). 110 Jahre nach Fritsch und Hitzig bestätigten Merton und Morton deren These durch Transkranielle Elektrostimulation (TES) an gesunden Probanden (Merton und Morton, 1980).

Mit Hilfe technischer Fortschritte, die unter anderem durch Merton et al. (1982) vorangetrieben wurden, konnten mit Hilfe der TES abnorme zentrale motorische Erregungsüberleitungen bei Patienten mit multipler Sklerose, amyotropher Lateralsklerose und Morbus Parkinson festgestellt werden. Aufgrund der schmerzhaften Reizmethode hat sich diese Form der Stimulation jedoch nicht durchgesetzt.

Die ersten einsetzbaren Magnetstimulatoren, die damals nur Einzelreize abgaben, wurden von Bickford und Freeming gebaut. Diese Stimulatoren ermöglichten ein Evozieren sichtbarer Muskelzuckungen nach magnetischer Stimulation an peripheren Nerven (Bickford und Freeming, 1965).

Durch die Entwicklung eines Magnetstimulators für die kontaktlose Reizung peripherer Nerven wurde schließlich die Ableitung eines Reizerfolges am Muskel mit Hilfe von Elektroden möglich, da das Muskelpotential nicht mehr durch Reizartefakte verdeckt wurde (Polson et al., 1982). In einer Kooperation zwischen Barkers und Mertons Arbeitsgruppen wurde die Anwendbarkeit dieses Stimulators am Kortex getestet. So war es schließlich Merton selbst,

der sich 1985 der ersten **Transkraniellen Magnetstimulation (TMS)** unterziehen ließ. Tatsächlich war es mühelos und völlig schmerzfrei möglich, gut sichtbare Muskelzuckungen an Armen und Händen hervorzurufen (Barker et al., 1985).

Innerhalb der folgenden Jahre wurde von verschiedenen Firmen, unter anderem der Fa. Novamatrix (später Fa. Magstim), der Fa. Digitimer und der Fa. Cadwell, an der Weiterentwicklung der Stimulatoren, Pulsformen und an Spulenvarianten gearbeitet. Großes Interesse wurde dabei in die Minimierung des Spulenwiderstandes gelegt, um das übermäßige Erhitzen der Spule zu verhindern, und für die Steigerung von Fokalität und Tiefenwirkung des applizierten Magnetfeldes aufgebracht.

Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung war ein Stimulator zur repetitiven Reizabgabe, der die Applikation von Doppelreizen und Salven ermöglichte. Die Errungenschaft dieser **repetitiven Transkraniellen Magnetstimulation (rTMS)** eröffnete neue Perspektiven für Forschung und Therapie, da die Effekte auf das Nervensystem länger andauerten als bei Applikation einzelner Impulse. Durch das Protokoll der so genannten Theta-Burst-rTMS (Huang et al., 2005) wurde die Dauer des Reizeffektes weiter erhöht. Dabei werden in einer Sequenz von 5 Hertz (Hz) (Theta-Frequenz) über längere Zeit Salven mit 50 Hz appliziert. Unterschiedliche Protokolle erwiesen sich dabei im stimulierten Areal als hemmend oder fördernd.

2.1.2 Physikalische Grundlagen

Ein stromdurchflossener Leiter erzeugt in seinem direkten Umfeld ein magnetisches Feld. Dieses ist direkt proportional zur Stromstärke und steht im rechten Winkel zur stromdurchflossenen Spule (Abb. 2.1). In der Regel wird es in Form von Linien dargestellt, deren Verlauf die Richtung und deren Dichte die Stärke des Magnetfeldes angeben. Die Stärke des Magnetfeldes wird in **Tesla (T)** angegeben (Harms, 2007).

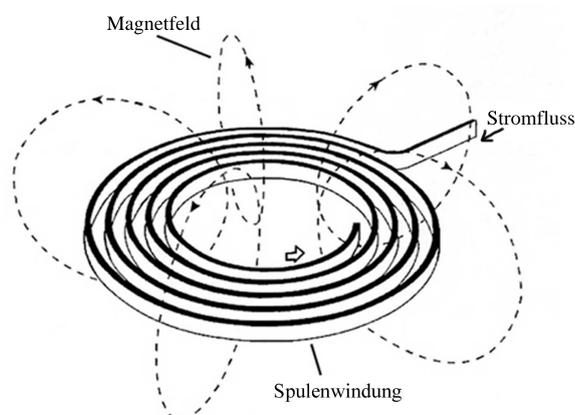


Abbildung 2.1: Magnetfeld um die Windung einer stromdurchflossenen Rundspule (Pascual-Leone et al., 2002).

Dieses zeitlich veränderliche magnetische Feld ruft immer auch ein sekundäres, zeitlich veränderliches elektrisches Feld (in V/m gemessen) hervor (Faraday, 1839). Letzteres läuft parallel zur Spulenebene, aber in entgegengesetzter Richtung zum Stromfluss innerhalb der Spule. Mit Hilfe dieses parallelen, sekundären elektrischen Feldes ist eine Reizung des Hirns durch die intakte Schädeldecke möglich (Abb. 2.2). Bei der **Magnetstimulation (MS)** erfolgt also die Reizung des Nervengewebes durch induzierte elektrische Impulse.

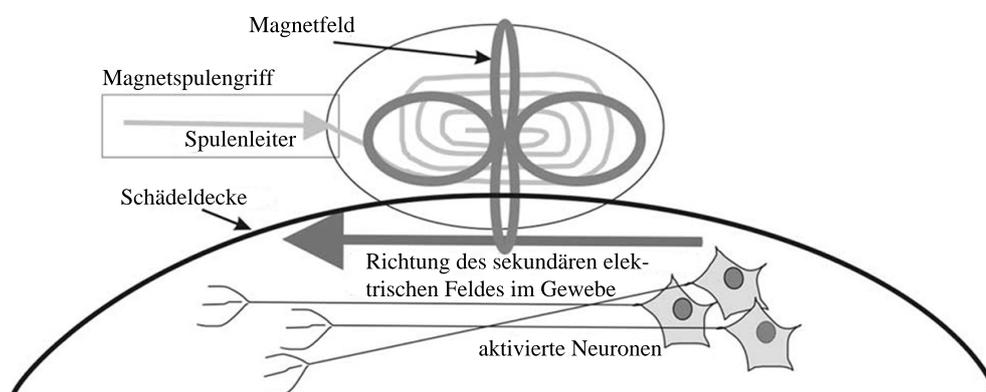


Abbildung 2.2: Flussrichtung der elektrischen und magnetischen Felder.

Da die sekundäre elektrische Feldstärke (in V/m) proportional zur Anstiegszeit des induzierten magnetischen Feldes ist, sollte ein optimaler Reiz unter $100\ \mu\text{s}$ benötigen, um eine gute Ankopplung an das Gewebe zu gewährleisten. Dazu müssen von dem Stimulationsgerät elektrische Leistungen bis ca. **4000 Kilowatt (kW)** gemeistert werden (Siebner und Ziemann, 2007).

Pulsformen

Klassischerweise unterscheidet man in der MS monophasische und biphasische sinus- oder kosinusförmige Pulsformen.

Monophasische Stimulation (Abb. 2.3 auf der nächsten Seite) weist eine deutliche Polarität auf, da ihre Spulenspannung nur wenig in die Gegenrichtung schwingt. Diese Impulse sind daher positiv oder negativ polarisiert. Eine biphasische MS hingegen wechselt ihre Polarität im Verlauf eines Impulses (Abb. 2.4 auf der nächsten Seite) von positiv nach negativ oder umgekehrt. Als Faustregel gilt hier, dass die Benennung des biphasischen Pulses anhand der initialen Stromrichtung erfolgt.

Der Vorteil der biphasischen gegenüber der monophasischen Stimulation liegt darin, dass beim biphasischen Puls bis zu 80% der Pulsenergie durch den Polaritätswechsel wieder in

den Pulscondensator zurückgespeist werden kann, womit der Energieverbrauch des Gerätes deutlich reduziert wird.

Diese biphasischen Geräte werden daher für repetitive Stimulation verwendet, da für diese Stimulationsform in kurzer Zeit hohe Leistungen vom Gerät erbracht werden müssen. Kommerzielle Geräte ermöglichen dabei meist eine Frequenz von bis zu 100 Hz (Siebner und Ziemann, 2007).

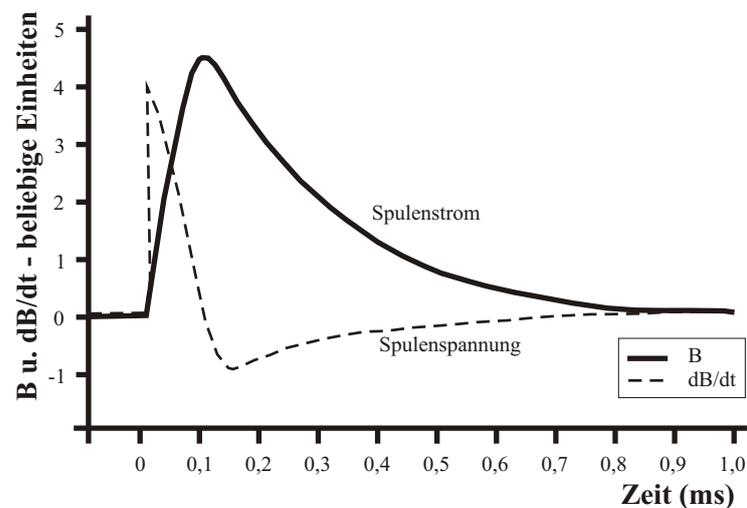


Abbildung 2.3: Negativer monophasischer Impuls in B (Pascual-Leone et al., 2002).

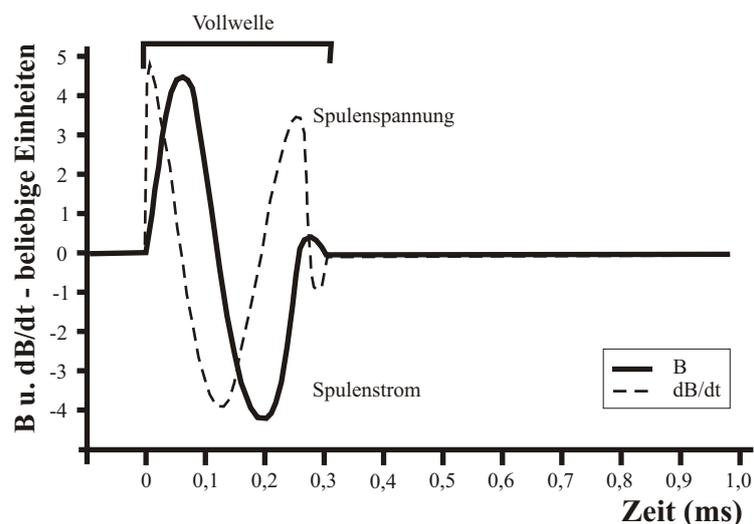


Abbildung 2.4: Negativer biphasischer Impuls in B (Pascual-Leone et al., 2002).

Im Vergleich zur Elektrostimulation (ES) ist die Reizauswahl in der MS bis dato beschränkt. Während in der ES zwischen Rechteck-Impuls, Sinuswellen-Impuls, mono-, bi- und polyphasischen Reizen variabelster Frequenz, Dauer und Interstimulus-Taktung gewählt

werden kann, verhindern aufwendige technische Voraussetzungen diese Vielfalt an möglichen Pulsen in der MS (Peterchev et al., 2008).

Mittlerweile kann jedoch in einigen Geräten sowohl zwischen monophasischem und biphasischem Impuls als auch der Polarität des Reizes gewählt werden. Die freie Puls- und Polaritätswahl ermöglicht die optimale Ankopplung am stimulierten Gewebe, ohne eine aufwendige Umpositionierung der Spule vornehmen zu müssen.

Spulenformen

Klassischerweise unterscheidet man Rundspulen von achtförmigen Spulen (Abb. 2.5).

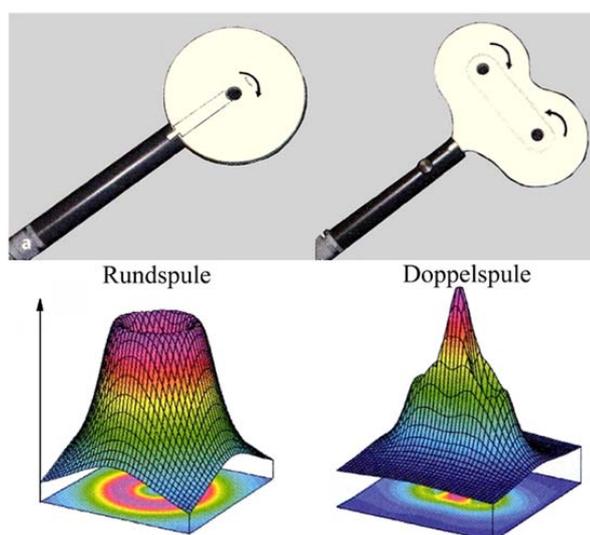


Abbildung 2.5: Rund- und Achterspule mit der jeweiligen Verteilung des sekundären elektrischen Feldes (Siebner und Ziemann, 2007).

Die Rundspule ist die erste kommerziell hergestellte Stimulationsspule. Das magnetische Feld hat hier das Maximum genau im Zentrum der Spule, während das elektrische Feld unterhalb des Zentrums gleich Null ist. Daher ist es nicht möglich, Nervengewebe unterhalb des Zentrums zu reizen.

Diese Spulenform zeichnet sich durch hohe Tiefenreichweite und geringe Erwärmung aus, hat jedoch den Nachteil der großen Ungenauigkeit des Stimulationsareals. Daher ist die Rundspule nicht für präzise topographische Stimulationen geeignet (Barker, 1991).

Die achtförmige Spule, auch Achter- oder Doppelspule genannt, ist aus zwei nebeneinander gelegten Rundspulen zusammengesetzt. Der Strom durchläuft dabei zunächst die eine und direkt im Anschluss in gegenläufiger Stromrichtung die zweite Spule. Durch diese Gegenläufigkeit addieren sich die elektrischen Felder am Berührungspunkt der Spulen. So ergibt sich an dieser Stelle ein kleines, recht klar definiertes Maximum des elektrischen Feldes.

Die Achterspule stimuliert daher wesentlich fokaler als die Rundspule (Pascual-Leone et al., 2002).

Seit Einführung der MS wird kontinuierlich an der Verbesserung der Stimulationsspulen gearbeitet. Optimalerweise soll eine Spule möglichst geringen Widerstand der Stromleiter aufweisen, eine hohe Stabilität gegenüber physikalischen Einflüssen zeigen, wie beispielsweise gegenüber Hitze, Feuchtigkeit oder Krafteinwirkungen, und möglichst punktgenau und tiefreichend stimulieren. Zusätzlich muss die einfache und sichere Handhabung durch die Anwender gewährleistet sein.

Entsprechend wird bis heute an der Optimierung der Spulenbauteile, -wicklung, -kühlung und -form gearbeitet, um sie möglichst zweckorientiert zu gestalten (siehe Kapitel 2.3.1 auf Seite 23) (Zantow, 2007; Wendicke, 2006; Peterchev et al., 2008).

Die Spule ist bei der Bestimmung der evozierbaren Magnetfeldgröße einer der Einflussnehmenden Faktoren. Je kleiner eine Spule, desto kleiner das von ihr evozierbare Magnetfeld. Neben der Spulengröße selbst hat auch die Reizintensität des applizierten Stromimpulses Einfluss auf die Größe des induzierten Magnetfeldes und damit den reizauslösenden Radius des sekundären elektrischen Feldes (Barker et al., 1991).

Das Areal innerhalb des stimulierten Gewebes unterhalb einer Spule, in dem noch eine Depolarisation erzielt wird, wird als Tiefenreichweite bezeichnet. Sie bestimmt sich aus Spulenform, Spulengröße und der gewählten Reizstärke, aber auch aus der Ansprechbarkeit des Zielgewebes. Daher ist die Tiefenreichweite schlecht vorauszusagen. Als Faustregel gilt, dass die Tiefenreichweite kommerzieller Spulen bei maximaler Reizintensität bei 1–6 cm liegt (Hess et al., 1987). Je größer die Spule und/oder die Intensität, desto größer das reizauslösende elektrische Areal und damit die Tiefenreichweite. Bei einer Spule von 12 cm Durchmesser fällt das Magnetfeld ca. 2 cm unter der Spulenoberfläche bereits auf 50% ab (Siebner und Ziemann, 2007).

2.1.3 Sicherheitsaspekte und Richtlinien

Seit etwa 20 Jahren ist die Stimulation des motorischen Kortex ein Teil der neurophysiologischen Routinediagnostik und wird von den Patienten gut toleriert (Wassermann, 1998).

Die im Hirn entwickelte Wärmeenergie bei TMS wurde auf ihre Schädlichkeit überprüft und dabei zeigte sich, dass diese nur etwa 0,01% der normalen Energieproduktion eines erwachsenen Hirnes entspricht (Barker, 1991). Damit dürfte diese Erwärmung zu keiner Schädigung des neuronalen Gewebes führen. Allerdings sollte eine elektromagnetische Strahlung von 0,4 W/kg nicht überschritten werden, da mit höheren Werten die Absorptionsrate der elektromagnetischen Felder im biologischen Gewebe und damit die elektrische Erwärmung gefährlich ansteigt (Barker et al., 1987).

Auch wenn die TMS generell als nicht schmerzhaft gilt, wurde sie doch als unangenehm beschrieben, wenn die Stimulusintensität sehr hoch gewählt wurde. Mit zunehmender Intensität werden vermehrt sensorische Fasern aktiviert, welche durch ihren höheren Schwellenwert sonst ausgespart bleiben. Auch die Stimulation von peripheren Nerven, welche zur Kontraktion von Gesichts-, Schläfen- oder Nackenmuskeln führt, wurde als unangenehm gewertet (Siebner und Ziemann, 2007).

In umfassenden Untersuchungen mit Einzel- und Doppelreizen an Hunderten von gesunden Probanden konnten nur Kopfschmerz und migräneartige Phänomene festgestellt werden (Siebner und Ziemann, 2007). Allerdings können bei Personen mit abnorm erhöhter Erregbarkeit des Kortex selbst Einzelreize einen epileptischen Anfall auslösen (Classen et al., 1995). Mit Einführung der repetitiven Stimulation musste abhängig von Anzahl, Intensität und Frequenz der verabreichten Stimuli auch ein erhöhtes Risiko von epileptischen Anfällen bei als gesund beurteilten Probanden notiert werden (Dhuna et al., 1991).

Aufgrund dieser Risiken wurden Richtlinien aufgestellt, welche die Kombinationen aus Anzahl an Impulsen, Intensität und Frequenz festlegen, die noch als sicher gelten können (Wassermann, 1998).

Unter anderem wurde festgelegt, dass die im Raum der TMS anwesenden Personen während einer repetitiven Stimulation Ohrstöpsel tragen sollten, da die Entladung einer Stimulationsspule im Gehäuse einen lauten (> 120 Dezibel (dB)) Klickton verursacht (Siebner und Ziemann, 2007). Damit befindet sich der Schalldruckpegel des Tones auf vergleichbarem Niveau mit einem Presslufthammer (100 dB) (Glaser, 2004) und liegt im Grenzbereich der zulässigen Immissionsgrenze in Wohnräumen (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, 2009).

Die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin erklärt, dass ein Schadenseintritt bereits bei einmaliger, kurzer Geräuscheinwirkung mit einem C-bewerteten Spitzenschalldruckpegel von mehr als etwa 140 dB möglich ist (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, 2009).

Auch wird bei Bestehen einer Schwangerschaft speziell von spinaler und peripherer, nicht jedoch von transkranieller Stimulation abgeraten. Damit soll die Wahrscheinlichkeit der Stimulation des Fetus minimiert werden (Wassermann, 1998). Des Weiteren gelten intrakranielle Metallpartikel und implantierte biomedizinische Geräte als Kontraindikation für die Durchführung einer MS. Patienten mit Herz- oder Hirnschrittmachern können stimuliert werden, wenn die Spule über 10 cm vom Schrittmacher entfernt ist (Siebner und Ziemann, 2007).

Auch die Langzeitverträglichkeit der MS wurde tierexperimentell an Primaten untersucht und es wurden hierbei keine histologischen Veränderungen im Hirngewebe nachgewiesen (Dwork et al., 2004). Auch wurde die Verträglichkeit der rTMS an der Ratte als unschädlich beurteilt. Im Gegenteil, es wurden sogar neuroprotektive Effekte und eine verlängerte

Lebensdauer bestimmter Neuronengruppen nachgewiesen (Post et al., 1999a).

Bisher wurde bis auf eine akut erhöhte Expression des für Astrozyten typischen Intermediärfilaments **G**lial **F**ibrillary **A**cidic **P**rotein (GFAP), welches auf eine erhöhte Aktivierung dieser Zellen hindeutet, keine gewebeschädigenden Effekte gefunden. Es scheint sogar eher so, dass die rTMS Widerstandskraft und Regenerationsfähigkeit der Nervenzellen steigern kann (Post et al., 1999a).

2.1.4 Reizweiterleitung im Nervengewebe

Eine generelle Aufgabe der Nervenzellen liegt in der Fortleitung und Modulierung elektrischer und chemischer Signale. Dies ist möglich durch das Bestehen und den Erhalt eines elektrischen Potentials im Bereich der Zellmembran (Membranpotential). Das Ruhemembranpotential wird aufrechterhalten durch eine Natrium-Kalium-Pumpe. Diese sorgt dafür, dass die Natrium-Ionen-Konzentration außerhalb der Zelle zehnmal höher liegt als innerhalb und die des Kaliums 20mal höher innerhalb als außerhalb der Membran. Typischerweise liegt das Ruhemembranpotential einer Nerven- oder Muskelzelle zwischen -90 und -70 Millivolt (mV) (Zachary, 2007).

Trifft ein Reiz am Nerven ein, erfolgt durch Öffnung von Natrium-Kanälen und Einstrom dieser Ionen eine Potentialverschiebung in Richtung von 0 mV (Depolarisation). Wird dabei eine kritische Schwelle von etwa -50 mV überschritten (Initiationsphase), erfolgt die Aktionspotentialbildung nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“. Das Öffnen weiterer Natriumkanäle und Einstrom dieser Ionen führt zu einem Membranpotential von +20 bis +30 mV (Depolarisationsphase). Die darauf folgende Repolarisationsphase, das heißt das Absenken des Membranpotentials, erfolgt durch die trägeren Kalium-Kanäle. Aufgrund des langsamen Ausstroms von Kalium-Ionen wird schließlich das Ruhepotential der Zelle wieder erreicht. Die Natrium-Kalium-Pumpe sorgt anschließend für den Rücktransport der Ionen, bis der ursprüngliche Ruhezustand wieder erreicht ist. Nach Aufbau des Aktionspotentials ist das Axon für kurze Zeit nicht mehr bzw. nur schwer erregbar (refraktär). Die absolute Refraktärzeit (< 1 ms) wird dabei von der relativen Refraktärzeit (wenige Millisekunden) unterschieden, in der ein stärkerer Reiz nötig ist und nur niedrigere Aktionspotentiale ausgelöst werden können (Silbernagl und Despopoulos, 2007).

Die Weiterleitung des Potentials erfolgt über eine Welle der Depolarisation in Richtung der Synapsen und distalen Axonanteile. Die Geschwindigkeit der Potentialfortleitung wird dabei durch die Dicke des Axons beeinflusst, da der Widerstand und die Kapazität pro Membranfläche durch den Axondurchmesser bestimmt werden. Die Leitungsgeschwindigkeit steigt insgesamt etwa mit der Quadratwurzel des Faserdurchmessers an (Heckmann und Dudel, 2007).

Die Isolierung des Axons durch Myelin produzierende Schwannzellen ermöglicht eine schnellere Reizweiterleitung im Vergleich zu unmyelinisierten Axonen. Die Schwannzellen legen sich dabei in Segmenten, auch Internodien genannt, um das Axon herum. Die dazwischen entstehenden Lücken, in denen das „nackte“ Axon verbleibt, werden als Nodien oder Ranviersche Schnürringe bezeichnet. Im Vergleich zur kontinuierlichen Depolarisationswelle am unmyelinisierten Axon verläuft die Weiterleitung am myelinisierten Axon „saltatorisch“ von Schnürring zu Schnürring. Durch die Schwannzellen, die sich um das Axon herumwickeln, wird der Membranwiderstand in diesen Bereichen erhöht und die Membrankapazität drastisch reduziert. Somit erfolgt in diesem Bereich keine Potentialänderung und ein Aktionspotential wird beinahe ohne Verlust von Schnürring zu Schnürring fortgeleitet. Die Reizleitungsgeschwindigkeit ist daher wesentlich schneller als am unmyelinisierten Axon (Heckmann und Dudel, 2007; Zachary, 2007).

Erreicht das Aktionspotential das Axonende, werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet, die zur Membrandepolarisation und Abgabe chemischer Neurotransmitter in den synaptischen Spalt führen. Je nach Funktion der Nervenzelle und Rezeptorausstattung der postsynaptischen Membran sind letztere erregend (z.B. Glutamat) oder hemmend (z.B. **Gamma-aminobutyric acid (GABA)**) für die nachgeschalteten Dendriten, neuronalen Zellkörper oder Axone. Je mehr Aktionspotentiale hintereinander die Synapse erreichen, desto mehr Transmitterstoffe werden freigesetzt (Zachary, 2007). Erregende Neurotransmitter diffundieren zur postsynaptischen Zellmembran und finden dort spezifische Rezeptoren, worauf sich Membrankanäle öffnen, die eine Depolarisation in Richtung des Schwellenwertes auslösen. Durch Ausschüttung hemmender Neurotransmitter hingegen werden postsynaptisch Ionen-Kanäle geöffnet, welche eine Hyperpolarisation der Membran verursachen und damit eine Aktionspotentialbildung erschweren (Silbernagl und Despopoulos, 2007).

Insgesamt führt ein einzelnes postsynaptisches Potential nicht zur Auslösung eines Aktionspotentials am nachgeschalteten Nerv. Dazu müssen am Zellkörper und den Dendriten des postsynaptischen Neurons mehrere Potentiale gleichzeitig eintreffen. Die Summe aus hemmenden und erregenden Potentialen entscheidet dabei, ob ein Reiz im Folgeneuron ausgelöst wird oder nicht (Heckmann und Dudel, 2007).

2.1.5 Reizauslösung durch Stimulation

Mit der elektrischen und magnetischen Stimulation soll das Ruhemembranpotential in Richtung des Schwellenwertes erhöht werden, um ein Aktionspotential in den stimulierten Nervenzellen zu induzieren.

Aus der elektrischen Stimulation weiß man, dass die Effizienz des Stimulus von der Intensität und der Dauer eines Stromimpulses abhängt (Peterchev et al., 2008). Die Stromstärke, die

bei sehr langer Stimulationsdauer gerade noch ausreicht, um ein Aktionspotential auszulösen, wird als Rheobase bezeichnet. Dagegen beschreibt die Chronaxie die minimal erforderliche Reizdauer bei Stimulation mit zweifacher Rheobase. Damit ist die Chronaxie ein Maß für die elektrische Erregbarkeit der Nervenfasern. Stark myelinisierte Axone haben eine kürzere Chronaxie und niedrigere Rheobase als schwach oder unmyelinisierte Axone (Siebner und Ziemann, 2007).

Insgesamt ist sowohl in der elektrischen als auch in der magnetischen Stimulation der räumliche Gradient des elektrischen Feldes für die Auslösung eines Aktionspotentials ausschlaggebend (Basser, 1994). Im Fall der MS erfolgt ein Ionenstrom im Nerven, wenn sowohl das sekundäre elektrische Feld wie auch der entsprechende Gradient in Richtung des Axons laufen. Dabei muss für eine erfolgreiche Reizung eine Kombination aus Feldstärke und Feldgradient überschritten werden (Pascual-Leone et al., 1999).

Auch wirkt die Ausrichtung des Neurons im elektrischen Feld auf die Effekte der Transkranielle Magnetstimulation (TMS) ein. Innerhalb eines homogenen elektrischen Feldes werden nur gebogene Axone erregt, da der elektrische Strom eine Potentialdifferenz im Verlauf des Axons induzieren muss, welche eine Stimulation bewirkt (Abb. 2.6). Ein gebogenes Axon ermöglicht, dass auch ein gleichförmiges elektrisches Feld einen Gradienten aufweist und so ein Aktionspotential ausgelöst wird.

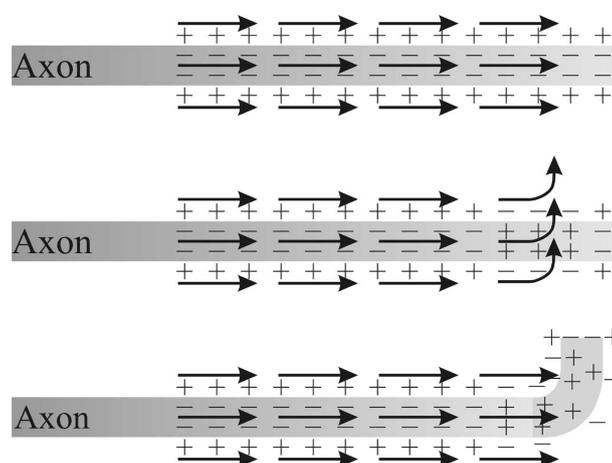


Abbildung 2.6: Entstehung der Depolarisation am geraden und gebogenen Axon durch ein elektrisches Gradientenfeld.

Die Stimulation an den gewundenen Axonen des Kortex nimmt dabei eine besondere Stellung ein. Das gebogene Axon ermöglicht, dass bereits ein gleichförmiges elektrisches Feld einen Gradienten aufweist. Dadurch ist der Ort des maximalen elektrischen Feldes einer Spule am Kortex auch der Ort der maximalen Reizung (Siebner und Ziemann, 2007).

Der Kortex setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Nervenzellpopulationen zusammen, die eine unterschiedliche räumliche Ausrichtung und Erregbarkeit aufweisen. Daher ist die

transkranielle Stimulation nicht mit der Stimulation eines geordneten, gleichförmig ausgerichteten peripheren Nerven oder des Rückenmarks zu vergleichen. Das erklärt auch, weshalb ein Drehen oder Verkippen der Spule unterschiedliche Neuronenpopulationen anregen kann. Das Verkippen der Spule verändert auch die Richtung des Stromflusses im Gewebe und so aktivieren beispielsweise latero-medial eintreffende elektrische Felder vorwiegend den pyramidalen Anteil, posterior-anterior eintreffende Felder vorwiegend extrapyramidale Anteile der Motorik (Siebner und Ziemann, 2007).

Die Richtung des Stromflusses hat dabei auch Einfluss auf die Erregungswellen. So sind bei antero-posteriorer Flussrichtung höhere Stimulusintensitäten erforderlich, um Erregungswellen auszulösen, als in der Gegenrichtung (Di Lazzaro et al., 2002).

Es wird angenommen, dass sich Pyramidenzellen und Projektionsneuronen mit ihren langen Axonen durch das induzierte elektrische Feld besser stimulieren lassen als intrakortikale Interneuronen mit einer starken dendritischen Verästelung und einem kurzen Axon (Siebner und Ziemann, 2007).

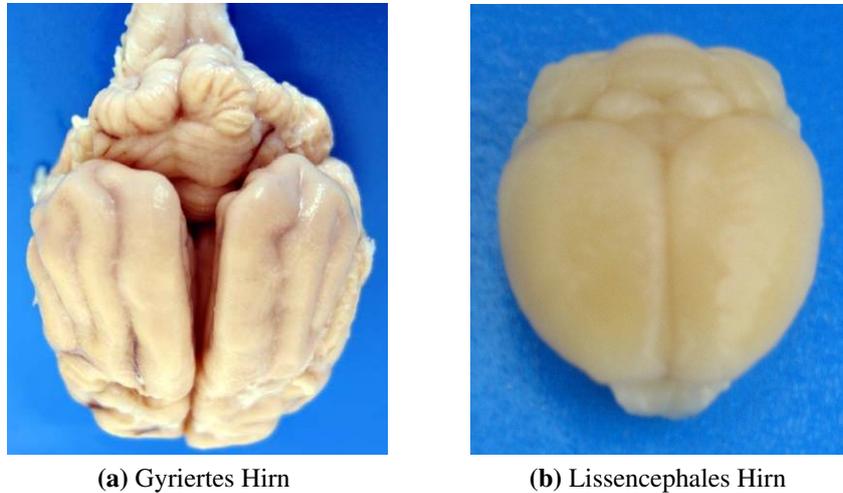
Kortikale Neuronen sind vielfältig über Synapsen mit anderen Neuronen verknüpft. Dabei kommen Verbindungen zwischen verschiedenen Kortextbereichen, aber auch mit subkortikalen Strukturen wie Basalkernen, Thalamus, Kleinhirn oder Rückenmark zustande (de Lahunta und Glass, 2009b). So führt die TMS des motorischen Kortex zu einer Erregung unterschiedlicher Bahnender und hemmender Neuronenpopulationen.

2.1.6 Speziesspezifische Reizweiterleitung

Durch das Aufbringen des Magnetfeldes im Bereich des motorischen Kortex beim Menschen kommt es dort zur Auslösung und Weiterleitung der evozierten motorischen Potentiale über den Kortikospinaltrakt bis hin zum entsprechend innervierten Muskel (Kamida et al., 1998; Reid, 2003; Fitzgerald et al., 2006). Beim Tier erfolgt die Reizweiterleitung vom Hirn über vorwiegend extrapyramidale Bahnen zum Muskel (Fujiki et al., 1990; Kamida et al., 1998; Luft et al., 2001; Nielsen et al., 2007). Bei den Labortieren verläuft sogar nur ein unwesentlicher Teil über den direkten kortikospinalen Weg (Lemon und Griffiths, 2005) und selbst eine Kortext-Ablation hat keinen Effekt auf die evozierten Potentiale (Luft et al., 2001; Nielsen et al., 2007).

Speziesspezifische und interindividuelle neuroanatomische Besonderheiten haben großen Einfluss auf die Reizauslösung und -weiterleitung bei der TMS. Bereits die individuell unterschiedliche Faltung der Großhirnrinde (Abb. 2.7a auf der nächsten Seite) hat Einfluss auf die Ausrichtung der gleichen neuronalen Elemente und damit deren Erregbarkeit. Allerdings sollte in diesem Zusammenhang erwähnt sein, dass die Labornager ein lissencephales und damit ungefaltetes Hirn haben (Chan et al., 2007), wodurch diesbezüglich weniger interindividuelle

Unterschiede bestehen sollten als beim gefalteten Hirn der Haussäugetiere (Abb. 2.7b).



(a) Gyriertes Hirn

(b) Lissencephales Hirn

Abbildung 2.7: a) Hirnpräparat eines Hundes, b) Hirnpräparat einer Labormaus.

Nielsen et al. (2007) untersuchten die Reizweiterleitung transkranial magnetisch evozierter motorischer Potentiale bei der Ratte. Mittels artifizieller Läsionen unterschiedlicher Leitungsstrukturen konnten sie die jeweilige Beteiligung der motorischen Systeme am Muskelpotential nachvollziehen. Sie fassten zusammen, dass es zu einer Summation der Potentiale an unterschiedlichen Orten kommt, und bestätigten außerdem den geringen Einfluss der direkten kortikospinalen Bahnen beim Nager. Zusätzliche Befunde dieser Gruppe ergaben, dass die Richtung des Stromflusses innerhalb der Rundspule keinen Einfluss auf die Potentiale hat und dass der Grenzwert zur Aktivierung der Muskulatur mit einer Achterspule geringgradig höher liegt als bei der Aktivierung mit einer Rundspule (Nielsen et al., 2007).

Die Identifizierung der Leitungsbahnen, die beim Nager durch TMS aktiviert werden, und das Verständnis ihrer Beteiligung an den evozierten Muskelpotentialen ist wichtig, um die mit der TMS erhobenen Befunde zur Evaluierung der motorischen Bahnen nach Rückenmarkstrauma exakt beurteilen zu können. Denn dass die funktionelle Rehabilitation des motorischen Systems auch am Nager beurteilt werden kann, gilt als bewiesen (Kaga et al., 2003; Zhang et al., 2007b).

2.1.7 Magnetstimulation versus Elektrostimulation

In der ES wird mit Hilfe von Nadelelektroden oder auf der Haut positionierten Oberflächenelektroden im Bereich sensorischer oder motorischer Nervenfasern ein Reiz appliziert. Im Vergleich zur MS ist die ES technisch wesentlich einfacher und kostengünstiger durchführbar, da Einsatz und Anschaffung der notwendigen Bauelemente in der MS um ein Vielfaches

teurer ist (Zantow, 2007). Daher hat sie sich trotz ihrer Nachteile gegenüber der MS in Klinik und Wissenschaft bislang durchgesetzt.

Ein Vorteil der MS liegt beispielsweise in der selektiven Aktivierung der motorischen Nervenfasern, da an sensorischen Fasern erst bei zunehmender Reizintensität Aktionspotentiale ausgelöst werden (Lotz et al., 1989). Außerdem ist eine Nervenreizung ohne direkten Kontakt zur Oberfläche möglich. Damit ergibt sich die Option, auch traumatisiertes Gewebe oder intraoperatives Areal kontaktlos zu stimulieren (Siebner und Ziemann, 2007).

Der größte Vorteil der MS liegt allerdings darin, dass sie Gewebe praktisch ohne Abschwächung durchdringt. Insbesondere schlecht leitende Strukturen, wie beispielsweise Knochen, schwächen weder das Magnetfeld noch verformen sie es. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, das Hirn unter der intakten Schädeldecke und damit nicht invasiv reizen zu können (Barker et al., 1987).

Bei einer transkraniellen Stimulation des Hirns verläuft die Weiterleitung der induzierten Aktionspotentiale vom kraniellen Stimulationsort hin zum Ableitort entweder direkt (D-Welle) oder transsynaptisch (I-Welle). Dies ist am aufgezeichneten Potential anhand der 1–2 ms nacheinander auftretenden Wellen erkennbar (Rothwell et al., 1999).

Die TES löst zunächst D-Wellen in den Axonen aus, während die TMS primär I-Wellen und erst bei erhöhter Reizintensität auch die früher auftretende D-Welle auslöst (Amassian et al., 1987; Day et al., 1989; Kaneko et al., 1996; Di Lazzaro et al., 1998a,b).

Für dieses Phänomen wird die unterschiedliche Ausrichtung der elektrischen Felder verantwortlich gemacht. Der bei der TES induzierte Strom läuft radiär von der Elektrode weg, während bei der TMS ein Feld parallel zur Spule induziert wird. Damit kommt es zur Aktivierung unterschiedlicher Neuronen in Folge der unterschiedlichen Ausrichtungen verschiedener Neuronenpopulationen (Siebner und Ziemann, 2007).

Da die TMS primär eine polysynaptische Reizweiterleitung induziert, ist sie anfälliger für Erregbarkeitsveränderung innerhalb der neuronalen Verschaltungen als die elektrische Stimulation. Willkürliche Bewegungen oder Pharmaka können die evozierten motorischen Potentiale daher deutlich beeinflussen (Di Lazzaro et al., 1998b; Ziemann, 2004).

2.2 Anwendungsgebiete der Magnetstimulation

Mit Hilfe der transkraniell applizierten MS kann bei allen Spezies die Integrität beider Anteile, der zerebralen wie auch der spinalen motorischen Neuronen, beurteilt werden. Zerebrale motorische Neuronen sind definiert als die Anzahl aller Neuronen, die in die Generierung und Weiterleitung eines motorischen Reizes vom Hirn bis hin zu den Neuronenkörpern innerhalb des Rückenmarks involviert sind und den Reiz an diese weitergeben. Spinale motorische Neu-

ronen sitzen im Ventralhorn des Rückenmarks, und ihre Axone ziehen über die motorischen Nervenwurzeln aus dem Spinalkanal hinaus und verlaufen dann gemeinsam mit den sensorischen Fasern innerhalb eines peripheren Nerven zur Muskulatur (de Lahunta und Glass, 2009a).

Durch Stimulation im Bereich des Rückenmarks oder der peripheren Nerven kann Einblick in die Reizleitungskapazität der entsprechend stimulierten motorischen Anteile zwischen Stimulations- und Ableitort erlangt werden.

Zur Funktionsprüfung des jeweils stimulierten anatomischen Anteils werden an den abgeleiteten **magnetisch motorisch evozierten Potentialen (MMEP)** standardmäßig die Start-Latenz und die Amplitude ausgewertet (Van Ham et al., 1994; Nollet et al., 2003a) (Abb. 2.8).

Die Start-Latenz ist als der Zeitraum zwischen Impulsabgabe und Zeitpunkt der Aufzeichnung eines evozierten Potentials definiert. Beeinflusst wird sie dabei durch die Reizleitungsgeschwindigkeit des Rückenmarks und des peripheren Nerven sowie der synaptischen Übertragungszeit und gibt damit die generellen elektrophysiologischen Eigenschaften der rekrutierten motorischen Einheiten wieder (Sylvestre et al., 1993).

Die Amplitude ist als der Spannungsunterschied zwischen den maximal und minimal aufgezeichneten Potentialspannungen definiert. Die Amplitude des MMEPs erlaubt einen Einblick in Zahl und Art der rekrutierten Motoneuronen (Reid, 2003).

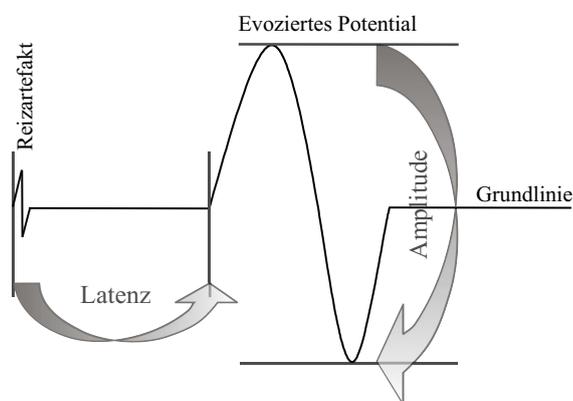


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Definition von Latenz und Amplitude.

Dabei muss beachtet werden, dass Latenz und Amplitude sowohl durch den Status der Vorspannung als auch durch die Stimulus-Intensität, -Dauer und die Richtung und Nähe des induzierten Magnetfeldes beeinflusst werden (Barker et al., 1986; Dimitrijevic et al., 1992; Nielsen, 1994; Di Lazzaro et al., 1998b; Nollet et al., 2003a).

Die aktuelle Erregbarkeit der kortikalen Neuronenverbände zum Zeitpunkt der magnetischen Stimulation hat dabei einen deutlichen Einfluss auf die Wirkung des applizierten Reizes. So kann eine willkürliche Aktivierung die Amplitude des MMEPs deutlich steigern und eine Latenzverkürzung bewirken (Henneman et al., 1965). Der Mechanismus, der dieser als

Faszilitation bezeichneten Reizweiterleitung unterliegt, ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass willkürliche Kontraktionen die Größe und Zahl der vom Hirn ausgesandten Potentiale steigern. Gemeinsam mit den eingehenden afferenten Impulsen der Muskelspindeln und den efferenten Potentialen, hervorgerufen durch die magnetische Hirnstimulation, können die spinalen Motoneuronen früher und zahlreicher als in Ruhe aktiviert und damit die Latenz verkürzt und die Amplitude vergrößert werden (Claus et al., 1988).

2.2.1 Magnetstimulation in der Humanmedizin

TMS wird mittlerweile routinemäßig am Menschen eingesetzt. Unter anderem wird die TMS zur Beurteilung von motorischen Funktionen, von Seh- und Sprachfähigkeit und für Studien zur Pathophysiologie zentraler neuronaler Erkrankungen genutzt (Mills und Murray, 1985; Rossini et al., 1987; Fehlings et al., 1989).

Neben der transkraniellen finden zusätzlich die periphere und spinale MS ihre Anwendung in der Diagnostik, Prognostik und Therapie in der Humanmedizin.

Dabei wird die Magnetstimulation **A)** zur Auslösung motorischer Potentiale und **B)** zur Modulierung der Aktivität stimulierter kortikaler Areale eingesetzt.

zu A) Die Auslösung motorischer Potentiale wird genutzt, um

- (1) spezifische Leitungszeiten zu bestimmen. Es wird die kortikomuskuläre, periphere motorische und **zentralmotorische Leitungszeit (ZML)** unterschieden.
- (2) **motorisch evozierte Potentiale (MEP)** spezieller Muskeln zu beurteilen.
- (3) eine transkutane MS peripherer Nerven durchzuführen.
- (4) ein intraoperatives Monitoring der Funktionalität von Nerven zu ermöglichen.

Leitungszeiten stellen die Dauer ab Reizabgabe dar, die ein ausgelöster Reiz benötigt, um am Ableitort aufgezeichnet werden zu können. Sie bestimmt sich aus der Art der involvierten Neuronen (schnell oder langsam leitend), der Zahl und Art (hemmend oder erregend) der zu überwindenden Synapsen und der durchlaufenen Strecke im Nervensystem (in Meter) (Hopf et al., 1996). Die Leitungszeit wird krankhaft verlängert, wenn involvierte Neuronenpopulationen untergehen oder eine übermäßige Hemmung bzw. fehlende Weiterleitung im Bereich der Synapsen vorliegt.

Je nach Ort der Stimulusabgabe wird unterschieden, ob eine transkranielle (im Bereich des motorischen Kortex), spinale (über dem Verlauf des Rückenmarks) oder periphere MS (im Verlauf des motorischen Neurons ab seinem Austritt aus dem Spinalkanal bis hin zur Endplattenregion) zur Auslösung des MEPs durchgeführt wird.

Die gezielte Überprüfung der Potentialparameter Amplitude und Latenz am selektiv stimulierten Muskel gewährt einen Einblick in die Zahl und Art der reizleitenden Neuronen und die Reizübermittlung bis hin zur Muskelkontraktion.

Diese Parameter werden in der Diagnostik und Prognostik spezieller Krankheitsbilder eingesetzt, wie beispielsweise:

Multiple Sklerose Bei diesem Krankheitsbild kommt es vor allem zu multiplen, räumlich disseminierten Myelin- und Axonverlusten in der weißen Substanz des **Zentralnervensystems** (ZNS).

Diagnostisch werden die durch TMS ausgelösten MEP bzw. ZML herangezogen.

Prognostisch bieten MEP-Werte einen Vorhersagewert des Krankheitsverlaufs (Fuhr et al., 2001; Leocani et al., 2006). Mit Hilfe der MEP können zudem kurzfristige therapeutische Effekte aufgezeigt werden (Salle et al., 1992).

Motoneuronerkrankungen Diese Art der Erkrankung kann sich sowohl im kortikalen Neuron als auch an der motorischen Nervenzelle der Ventralwurzel oder aber in beiden Neuronen manifestieren. Ein Beispiel für Letzteres ist die **Amyotrophe Lateralsklerose** (ALS).

Unterschiedlichste TMS-Messwerte haben einen mehr oder weniger diagnostischen und prognostischen Wert für die ALS.

Schlaganfall Ein Schlaganfall wird durch eine Unterversorgung von Hirnarealen bzw. der dort sitzenden Neuronen verursacht. Je nach Schweregrad und Lokalisation dieses Infarktes können unterschiedliche neurologische Störungen auftreten.

Diagnostisch und prognostisch kann mit Hilfe der TMS das Ausmaß einer Läsion bzw. Zerstörung der kortikospinalen motorischen Bahnen bestimmt werden.

Eine frühzeitige prognostische Einschätzung des Schweregrades ist zur gezielten Einleitung physiotherapeutischer Maßnahmen notwendig (Talelli et al., 2006).

Die Prognosen für einen Krankheitsverlauf, die durch TMS-Ergebnisse erhoben wurden, sind denen rein klinischer Untersuchungen überlegen (Hendricks et al., 2002). Auch für den Nachweis therapieinduzierter Verbesserungen der Erregbarkeit des motorischen Kortex stellt sich die TMS als nützlich heraus (Liepert et al., 2000).

Rückenmarkläsionen (Myelopathien) Heutzutage spielen insbesondere kompressive Erkrankungen des Rückenmarks durch Bandscheibenvorfälle eine Rolle in der Humanmedizin.

Mittlerweile haben sich MEP-Ableitungen zusätzlich zu bildgebenden Verfahren in der Diagnostik von insbesondere kompressiven Myelopathien etabliert (Teresi et al., 1987; Travlos et al., 1992). Die Höhe und Dauer der abgeleiteten Amplitude geben dabei einen Hinweis

auf die Zahl und Zusammensetzung der verbliebenen motorischen Neuronen. Es gilt als gesichert, dass selbst klinisch stumme Läsionen des Rückenmarks mittels TMS erkannt werden können (Lo et al., 2006). Insbesondere sind MEP-Ableitungen dort sinnvoll, wo atypische Symptome die klinische Beurteilung erschweren (Travlos et al., 1992).

Als sensitivster Parameter in der Diagnostik der Myelopathien hat sich die ZML herauskristallisiert. Anhand der ZML können sowohl Schäden an der Myelinhülle als auch primäre Erkrankungen der Axone erkannt werden (Lo et al., 2006).

zu B) die Modulierung der Aktivität stimulierter kortikaler Areale wird unterschieden in:

- (1) Steigerung der kortikalen Hemmung und
- (2) Steigerung kortikaler Erregbarkeit.

Eine rTMS kann die Funktion des Hirnes sowohl während der Stimulation selbst als auch über die Dauer der Stimulation hinaus beeinflussen. Die resultierenden Effekte können dabei über Stunden, zum Teil sogar über Tage nach Stimulationsende anhalten. Dabei können das Niveau der Erregbarkeit, die regionale synaptische Aktivität und die funktionelle Kopplung zwischen Hirnregionen moduliert werden (Siebner und Ziemann, 2007). Am besten erforscht sind die bahnen- und hemmenden Effekte auf Bereiche des motorischen Kortex (Awiszus, 2003; Barker et al., 1985; Bonato et al., 2006; Day et al., 1989; Di Lazzaro et al., 2004a,b; Dimitrijevic et al., 1992; Franzini et al., 2003; Fitzgerald et al., 2006).

Die erregenden oder hemmenden Folgen der rTMS sind die Grundlage für ihren therapeutischen Einsatz bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen. Im Folgenden werden beispielhaft einzelne Erkrankungen aufgelistet.

Epilepsie Als Epilepsie gelten abnorme, exzessive, synchrone Entladungen großer Neuronengruppen. Die Erkrankung kann in eine idiopathische, symptomatische oder kryptogene Form eingeteilt werden. Die Ursache der Epilepsie wie auch die antikonvulsive Medikation müssen bei der Beurteilung von TMS-Kennwerten berücksichtigt werden.

Diagnostisch werden zur Untersuchung der Epilepsie die motorische Reizschwelle, die MEP-Amplitude, kortikale Innervationsstille und die intrakortikale Hemmung und Bahnung bei TMS beurteilt (Delvaux et al., 2001; Hamer et al., 2005).

Auch wenn es unglaublich klingt, so werden Epilepsiepatienten auch therapeutisch einer rTMS unterzogen. Selbst wenn von erhöhtem Anfallsrisiko bei den Patienten ausgegangen wird, erfolgt eine Therapie mit Hilfe niedriger Reizfrequenz, um hemmende Effekte auf die kortikale Erregbarkeit zu erzielen (Tassinari et al., 2003).

Bewegungsstörungen Für viele Bewegungsstörungen ist eine Dysfunktion innerhalb der motorischen Kontrollzentren verantwortlich. So wurden einzelne Störungen des Bewegungsablaufes bzw. der -koordination, wie z.B. Morbus Parkinson, umfangreich untersucht (Priori et al., 1994; Nakashima et al., 1995). Insgesamt weisen hier Untersuchungen mit Hilfe der TMS auf eine gesteigerte Erregbarkeit des motorischen Kortex hin (Lefaucheur, 2005). Sowohl bei diesen als auch bei Erkrankungen, die mit gesteigerter Hemmung einhergehen, ist der Einsatz der rTMS diagnostisch und therapeutisch nutzbar (Alisaukiene et al., 2005).

Erkrankungen des Kleinhirns Da das Kleinhirn eine bedeutende Kontrollfunktion im motorischen Verhalten hat, bestehen zahlreiche Projektionen zwischen Kleinhirn und Großhirnkortex (de Lahunta und Glass, 2009b). Eine Veränderung im Bereich dieser Verbindungen kann mit Hilfe der TMS festgestellt werden. Insbesondere diagnostisch ermöglicht die TMS eine Beschreibung von Phänotyp und Verlauf der Kleinhirnerkrankungen. Beispielsweise trägt die Bestimmung der ZML dazu bei, ein Überschreiten des rein zerebellären Systems zu erkennen (Moshagen et al., 2003).

Depression Als sich Bickford bei einem Besuch im Labor der TMS-Gruppe als Proband für eine Stimulation zur Verfügung stellte, empfand er danach eine stimmungsaufhellende Wirkung. Dies war die Geburtsstunde der Idee einer Therapie an depressiven Patienten, welche schließlich in der Arbeitsgruppe von Hallett in den USA mit täglicher hochfrequenter rTMS bei bisher therapieresistenten Patienten erfolgreich getestet wurde (George et al., 1995).

Zudem werden Erkrankungen wie Tinnitus, Schmerz, Schizophrenie und Zwangsstörungen, die ebenfalls durch veränderte Erregbarkeit des ZNS hervorgerufen werden, mit TMS behandelt.

2.2.2 Magnetstimulation in der experimentellen Tiermedizin

Zwar hat die MS bislang begrenzten Einzug in die routinemäßig durchgeführte, klinische Anwendung in der Tiermedizin gefunden, doch basierend auf tierexperimentellen Studien konnten bereits zahlreiche neue Anwendungsgebiete für die Humanmedizin erschlossen werden.

Besonders die Möglichkeiten zur Beurteilung von Rückenmarkstraumata und Rehabilitation (Fehlings et al., 1987; Nollet et al., 2002) sowie die Untersuchung pharmakologischer Einflüsse auf magnetisch evozierte Potentiale (Ebert und Ziemann, 1999; Ghaly et al., 1999b) im Tiermodell sind auch für die Humanmedizin interessant.

Anhand der bisherigen Anwendungen der TMS am Menschen wurde deutlich, dass ein großes Potential für funktionelle Studien und therapeutische Ansätze vorliegt. Einer der wich-

tigen Vorteile der tierexperimentellen Untersuchungen ist die Möglichkeit, eine homogene Population (Tiere gleicher Spezies, Rasse/Abstammung, Größe, gleichen Alters, Geschlechts und Lebensumfelds) untersuchen zu können.

Insbesondere das fehlende Wissen über Mechanismen, welche die Erregbarkeit der Nervenzellen beeinflussen, machen tierexperimentelle Untersuchungen nötig. Neben den Versuchsbedingungen unter Einfluss von Narkotika können post mortem zudem histologische und molekularbiologische Aufarbeitungen erfolgen.

Nachteile der tierexperimentellen Untersuchungen liegen in den erheblichen Unterschieden zwischen verschiedenen Spezies. Variationen der kortikalen Strukturen, unterschiedliche Reizweiterleitungen motorischer Potentiale und Größenunterschiede spielen zum Teil eine erhebliche Rolle für die Vergleichbarkeit der erhobenen Erkenntnisse bei verschiedenen Tierarten.

Aufgrund der Größe des Hirns ist bei Katze und Hund eine Beschränkung des Reizes auf einzelne Kortexareale schwierig, während die für eine selektive Aktivierung notwendige Fokalität für das Pferd bereits durch konventionelle Spulen ausreicht (Nollet et al., 2003b).

Weissman errechnete, dass das induzierte elektrische Feld linear mit dem Radius eines sphärischen, elektrischen Leiters abnimmt (Weissman et al., 1992). Aufgrund der geringen Größe der Hirne von Labortieren kann der Magnetimpuls nur in einem kleinen Volumen eine Spannungsdifferenz erzeugen. Daher sind für Nagerversuche im Allgemeinen viel höhere Stimulationsintensitäten notwendig als bei größeren Säugetieren. Die Verteilung des elektrischen Feldes im Gewebe ist dagegen bei Mensch und Ratte vergleichbar (Keck et al., 2001).

Ein weiteres Problem stellt die Stressantwort der Tiere dar. Eine rein mechanische Immobilisierung der Tiere, die Geräusche der Spule und die Stimulation der Muskulatur können zu Reaktionen führen, welche die spezifische Wirkung der MS erheblich verfälschen können. Daher müssen die Tiere entweder zuvor an die experimentelle Situation gewöhnt werden oder während der Prozedur narkotisiert sein (Erhardt et al., 2004b). Dabei müssen mögliche Wechselwirkungen mit neuronalen Mechanismen der TMS berücksichtigt werden, da Narkotika über die Bahnung von hemmenden oder die Abschwächung erregender synaptischer Prozesse wirken (Fishback et al., 1995; Di Lazzaro et al., 2003; Ziemann, 2004).

Tierexperimentelle Untersuchungen wurden bereits bei zahlreichen Spezies durchgeführt. Dabei wurden neben der Überprüfung zellulärer Mechanismen auch Studien zum Ersatz der elektrischen Reizung in Diagnostik und Therapie durchgeführt. Sowohl TMS im Einzel- und Doppelreizmodus als auch rTMS kamen dabei zum Einsatz (Russell et al., 1994; Wang et al., 1996; Post et al., 1999a).

Die gewonnenen Erkenntnisse aus experimentellen Studien zur TMS und peripheren Magnetstimulation (PMS) an Kaninchen (Scheufler und Zentner, 2002), Schweinen (Konrad et al., 1994), Katzen (Fujiki et al., 1990), Affen (Ghaly et al., 2001) und Ratten (Chiba

et al., 1998) sowie klinische Einzelstudien, die sich mit der Stimulationspunktwahl am Pferd (Nollet et al., 2003b) und der peripheren Stimulation am Hund (Soens et al., 2008) befassen, werden die Etablierung der TMS in der Tiermedizin als auch das Wissen zu neurologischen und neuropathischen Zusammenhängen im Allgemeinen vorantreiben können.

Auch klinische Studien am Tier haben in den letzten Jahren zugenommen. Beispielsweise beschreibt Konrad et al. (1987) den Einfluss von spinalen Ischämien auf MMEP beim Hund. Einige Jahre später wurde die Anwendbarkeit der TMS zur Beurteilung von Rückenmarkläsionen an Hunden mit thorakolumbar Bandscheibenerkrankungen überprüft. Die MMEPs gaben dabei die Läsionen sensitiv wieder, selbst bei Patienten ohne klinische Symptomatik. Poma et al. (2002) konnten diese Befunde für Erkrankungen im Bereich des Halsmarks bei großen Hunden bestätigen. Kurze Zeit später folgte eine klinische Studie am Pferd, bei der sich die MMEPs auch bei dieser Spezies als nützlich zur Erkennung zervikaler Rückenmarkläsionen erwiesen (Nollet et al., 2002).

Auch wenn die Zahl der klinischen Studien zur MS am Tier damit noch eingeschränkt ist, zeigte sich bereits der diagnostische Wert für die Veterinärmedizin. Die MS könnte speziell zur Evaluierung subklinischer Läsionen und zur Funktionsprüfung zentraler motorischer Leitungsbahnen dienen, wie beispielsweise bei der **Equine Motor Neuron Disease (EMND)**.

Auch die therapeutische Anwendung zur Senkung der Anfallsfrequenz bei Epilepsien, wie sie am Menschen bereits eingesetzt wird, wäre insbesondere für die Spezies Hund interessant. Doch das liegt bislang noch in ferner Zukunft und bedarf weiterer Studien zur Sicherheit, zum Effekt verschiedener rTMS-Protokolle, zu unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen, Stimulationsdauern, Spulenorientierungen und Anästhesieverfahren.

2.3 Magnetstimulation in Wissenschaft und Zukunft

Bislang in der Praxis verwendete Magnetstimulatoren sind ausschließlich stationäre Geräte. Da jedoch speziell im Rahmen rehabilitativer Maßnahmen der ortsungebundene Einsatz wünschenswert ist, zielen die Anstrengungen der Forscher sowohl in der elektrischen als auch in der magnetischen Stimulation auf die Mobilitätssteigerung der Anwender durch Geräteverkleinerung und Gewichtsreduktion ab (Hara, 2008).

Bislang sind rehabilitative Übungen für Motorik und Sensorik mit Hilfe der MS auf einen klinischen Standort beschränkt. Eine Durchführbarkeit der Stimulationen im Wohnraum der Patienten würde die Akzeptanz regelmäßiger Trainingseinheiten verbessern, da sie eine Erleichterung für jene Patienten darstellt, für die Wege zum Krankenhaus eine große Hürde bedeuten.

Prinzipiell liegen daher auch die im Folgenden aufgeführten Zielsetzungen wie Spulenver-

besserung und Pulsformoptimierung im Rahmen dieses übergeordneten Aspekts.

Durch eine zweckoptimierte Pulsabfolge, -frequenz und -dauer erhofft sich die Wissenschaft zudem, bisherige Anwendungsgebiete der MS verbessern und neue Einsatzbereiche erschließen zu können.

2.3.1 Spulenoptimierung

Das in der Umgebung einer Magnetspule entstehende Magnetfeld kann an der Spulenoberfläche eine Feldstärke bis zu 4 T betragen (Barker et al., 1985). Mit steigender Entfernung zur Spule ist ein zunehmender Feldstärkeverlust nachweisbar. Damit geht einher, dass erregbares Gewebe, das in zu großer Distanz zur Spule liegt, mit den dortigen Feldstärken nicht erregt werden kann. Speziell für intrakranielle, nicht-kortikale Stimulationsareale und periphere Nervenstimulationen ist daher eine fokale Feldausdehnung mit ausreichender Tiefenreichweite angestrebt. Entsprechend der gewünschten Ausdehnung des Magnetfeldes entstanden in den letzten Jahren zahlreiche Spulengeometrien, die gezielt für unterschiedliche Fragestellungen entwickelt wurden (Ruohonen und Ilmoniemi, 1998).

Insbesondere die Steigerung der Fokalität der Spule, die Ermöglichung vieler Stimulationsprotokolle, die Reduzierung der Materialermüdung bei Erhitzung und die Minimierung zeitabhängiger Ermüdungsprozesse lagen dabei im Interesse der Techniker und Wissenschaftler (Siebner und Ziemann, 2007; Zantow, 2007; Wendicke, 2006).

Um insbesondere hochfrequente Stimulationsprotokolle der rTMS gewährleisten zu können, müssen die Behandlungsspulen eine hohe Leistung erbringen. Sie erhitzen dabei aufgrund ihres Materialwiderstandes zum Teil enorm, was zusätzlich zu einer Gefährdung des Patienten führen würde.

In der Praxis wurde diesem Problem meist durch externe Kühlung, zum Beispiel durch Eis, oder durch den Austausch der erhitzten Spule gegen eine Ersatzspule abgeholfen.

Eine passive Kühlung über das Anbringen von Kühlkörpern ist nicht möglich, da Wirbelströme provoziert und dadurch die Gesamtwirkung des Systems verringert würde.

Auch das Anbringen von Werkstoffen mit hohem Wärmespeichervermögen erübrigt sich, da die Handhabung beträchtlich eingeschränkt und durch die entsprechend längere Abkühlung die Praktikabilität limitiert würde (Zantow, 2007).

Auch bestehen Ansätze zur aktiven Kühlung mittels Flüssigkeit oder Luftgebläse. Doch auch diese erhöhen Gewicht und Ausmaß der Spule, was auf Kosten der Handhabung geht. Dennoch ist die aktive Kühlung bis dato eine praktizierte Methode zur Steigerung der Standzeit der Behandlungsspule (Zantow, 2007).

Die Fokalität der Spule konnte mittlerweile deutlich verbessert werden (Wendicke, 2006): Inzwischen ist es beim Menschen möglich, ein Hirnareal von unter 10 mm Durchmesser mit

Hilfe der MS zu reizen, ohne gleichzeitig umliegende Regionen zu aktivieren (Siebner und Ziemann, 2007).

Oftmals geht jedoch mit der Steigerung der Fokalität ein Verlust der Tiefenreichweite einher. Die Optimierung einer Reizspule besteht darin, dass die Geometrie der Spule bei minimalem Energiebedarf ein exaktes Areal mit der entsprechend vorgesehenen Tiefenreichweite ermöglicht.

Im Fall von Stimulationen zur Muskelkraftherzeugung bedeutet die Optimierung des induzierten Feldes, dass eine möglichst selektive Stimulation der Endplattenregion des Muskels durchführbar ist, da nachgewiesen ist, dass die Muskelkontraktionen durch die Erregung der terminalen Endäste der Nerven auslösbar sind (Machetanz et al., 1994). Die Stimulation muss allerdings zusätzlich so zielgenau erfolgen, dass antagonistische Muskeln nicht mitstimuliert werden.

Eine weitere Problematik, die durch eine Optimierung der Spulen gelöst werden kann, liegt in der Stimulation kleiner Volumina wie dem Hirn der Labornager. Magnetspulen zur Stimulation kleiner Hirne, etwa von Maus und Ratte, erfordern neue Geometrien oder einen innovativen Eisenkern. Im Vergleich zu derzeitigen Standard-Rundspulen und -Achterspulen ist eine Modifikation notwendig, die das Ungleichgewicht zwischen physikalischen Eigenschaften wie der Hitzebeständigkeit und Feldstärke, überwinden kann, um den neuronalen Schwellenwert zu überschreiten (Weissman et al., 1992).

Bis jetzt wurden bei Nagern die meisten Untersuchungen zur MS des Hirns an Ratten durchgeführt. Meist wurden dazu Rundspulen mit einem Umfang von 5 bis 5,5 cm verwendet (Fishback et al., 1995; Kamida et al., 1998; Luft et al., 2001).

Für die Maus existiert dagegen erst eine einzige Studie, die eine Ableitung von MEPs beschreibt (Zhang et al., 2007b). Zhang et al. (2007b) führten die TMS an unsedierten Tieren unter Stimulation mit einer 5 cm-Rundspule durch, um periphere und kortikale MMEPs abzuleiten. Die Studie bestätigte dabei, dass zur Auslösung der MMEPs bei der Maus stärkere Stimuli nötig sind als bei der Ratte (Zhang et al., 2007b).

Eine zweite Studie zur MS an der Maus wurde von Ahmed und Wieraszko (2008) durchgeführt. Innerhalb dieser Studie wurden jedoch keine MMEPs abgeleitet oder beurteilt. Die Gruppe untersuchte den Einfluss körperlicher Übungen in Kombination mit spinaler MS auf die Heilung nach Rückenmarkverletzung und konnte deren positiven Effekt auf die Rehabilitation nachweisen.

Neue Spulengeometrien, die zur gesteigerten Fokalität und Effektivität des elektrischen Feldes führen und damit die gezielte Aktivierung motorischer Leitungsbahnen erlauben, sollen nun zusätzliche Studien an der Maus ermöglichen.

2.3.2 Pulsformoptimierung

Wie bereits im Kapitel 2.1.2 auf Seite 4 kurz angeschnitten, liegt eine Möglichkeit für die Steigerung der Reizeffizienz in der Pulsform-Optimierung. Da die Bewerkstelligung der Reizvariabilität bei der MS weit aufwendiger und kostenintensiver ist als bei der elektrischen Stimulation, ist dies bislang nur eingeschränkt möglich.

Generell versteht man unter der Pulsform einen Strom-Zeit-Verlauf innerhalb der Magnetspule. Die Pulsform beeinflusst dabei maßgeblich die Leistungsfähigkeit einer Pulsquelle. Eine veränderte Pulsform kann für eine Energie-Rückspeisung des Gerätes sorgen und durch eine optimale Stimulusabfolge eine effektive Reizantwort bewirken. Daher ermöglichen optimierte Pulsformen einen gesenkten Energiebedarf des Stimulationsgeräts, wodurch sich die Pulsform als entscheidender Faktor für die Verbesserung des Gesamtsystems anbietet (Zantow, 2007).

Abhängig von der medizinischen Zielsetzung unterscheidet man bisher Einzelimpulse und die schnelle Aneinanderreihung solcher Einzelimpulse, auch Pulsserien oder Stimulus trains genannt. Letztere werden bei konstanter Frequenz als rTMS oder repetitive Periphere Magnetstimulation (rPMS) bezeichnet. Bei Frequenzen bis 1 Hz spricht man von niederfrequenter rTMS/rPMS, bei Frequenzen > 1 Hz von hochfrequenter rTMS/rPMS. Aber auch spezielle Pulsserien mit variierenden Pulszahlen und variierenden Interstimulus-Intervallen werden genutzt, wie beispielsweise das bereits erwähnte Theta-Burst Protokoll (Huang et al., 2005).

Selbst eine selektive Faserstimulation ist mit speziellen elektrischen Pulsformen möglich. So zeigte sich, dass kürzere Pulslängen im Rechteckimpuls (Gorman und Mortimer, 1983), quasi-trapezoidale Pulsformen (Fang und Mortimer, 1991) und biphasische Rechteckimpulse vorwiegend kleinere Nervenfasern aktivieren.

Auch die Dauer eines applizierten Impulses hat Einfluss auf die ausgelösten Potentiale. Beispielsweise können kürzere Pulslängen von Rechteckimpulsen die resultierende Muskelkraft während der Elektrostimulation erhöhen (Grill und Mortimer, 1996).

Zusätzlich spielt der Impuls eine wichtige Rolle für die Effektivität der Reizauslösung im Gewebe. Mit elektrischen, hochfrequenten, polyphasischen Impulsen konnte eine Intensitätssenkung bei gleicher Wirkung des Impulses erzielt werden (Reilly et al., 1985). Diese polyphasischen Reize, die eine Frequenz von mehreren Kilohertz aufweisen und aus einer definierten Wellenzahl bestehen, werden als „Bursts“ bezeichnet. Die Pulsdauer der Burst-Impulse bleibt dabei im Bereich weniger hundert Mikrosekunden. Reilly und Kollegen (1985) zeigten, dass eine polyphasische Impulsform einer niedrigeren Intensität zum Erzielen des Schwellenwertes bedarf als eine Stimulation mit monophasischen oder biphasischen Impulsen.

Generell geht man davon aus, dass eine hochfrequente Pulsabfolge den gleichen Effekt erzielen kann wie ein monophasischer Impuls höherer Intensität. Dies wurde zuerst am mathematischen Modell nachvollzogen, wobei Butikofer und Lawrence (1979) eine Effektsteigerung mit größtem Steigerungspotential bis hin zu einer Dreifachwelle als optimale Voraussetzung für diese von ihnen als „quantal stimulation“ bezeichnete Methode beurteilten (Butikofer und Lawrence, 1979).

Aufgrund dieser Reiz-Wirkungs-Steigerung ist die Applikation solcher „Bursts“ auch in der MS wünschenswert. Die Schwierigkeit, diese in der elektrischen Stimulation so einfach zu bewerkstellenden Impulse auch für die MS zu realisieren, soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Der Aufbau eines biphasischen Magnetstimulators ist in Abb. 2.9 zum besseren Verständnis dargestellt. Der Kondensator, der für die primäre Aussendung der Pulsenergie zuständig ist, erhält beim biphasischen Puls einen Großteil dieser Energie nach Durchlaufen der Spule zurück (siehe dazu Kapitel 2.1.2 auf Seite 4). Um nun sofort einen oder mehrere weitere Puls abgeben zu können, ist das neuerliche „Anfeuern“ des Kondensators nötig. Die exakte Zeitpunktwahl, die mikrosekundengenau erfolgen muss, ist hier der limitierende Faktor (Aussage PD Weyh, unveröffentlicht).

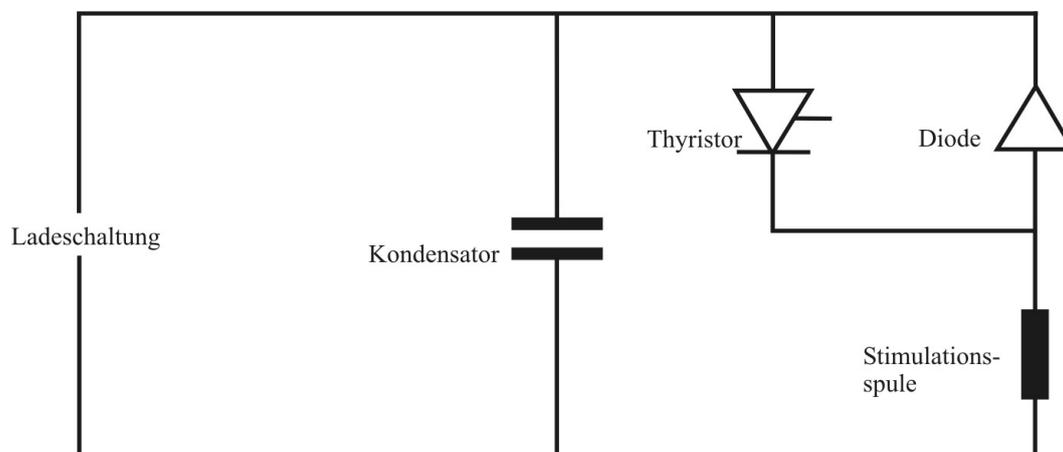


Abbildung 2.9: Aufbau eines biphasischen Magnetstimulators.

Mit Hilfe von Transistoren, die statt eines Thyristors eingebaut wurden, gelang es der Arbeitsgruppe Weyh (Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für medizinische Elektronik, 2008) erstmals, eine hochfrequente Reizabfolge mit mehreren Kilohertz abzufeuern. Damit ist die Erzeugung von „Bursts“ durch MS und damit ein Vergleich mit ähnlichen Pulsformen der elektrischen Stimulation möglich.

Entsprechend befasste sich diese Arbeitsgruppe in den letzten Jahren mit der Realisierung besonders effektiver Stromverläufe (Zantow, 2007). Dazu wurden zunächst Simulationen an einem Axonmodell durchgeführt, dem Hodgkin-Huxley-Modell, das sie modifizierten und

damit der realen Nervenleitung beim Säugetier ähneln. Die als optimal beurteilten Pulsformen wurden in den Geräteaufbauten realisiert (Zantow, 2007).

2.4 Transkranielle Magnetstimulation und Pharmaka

Die Parameter Amplitude und Latenz der MMEPs werden insbesondere zur Erkennung und Beurteilung neuronaler Läsionen herangezogen (siehe Kapitel 2.1.5 auf Seite 11). Neben Läsionen wie Motoneuronenverlust oder pathische Prozesse im Bereich der Myelinschicht der Neuronen können auch pharmakologische Einflüsse an ihnen abgelesen werden.

Jede Medikation, welche einen Einfluss auf die Neurotransmission und Ionenkanal-Funktion hat, muss in die Beurteilung der Parameter miteinbezogen werden. Die kortikal und spinal ausgelösten MMEPs werden sowohl beim Menschen als auch beim Tier transsynaptisch weitergeleitet, daher können Erregbarkeitsveränderungen durch Pharmaka auf einer oder beider dieser Ebenen zu Veränderungen der Latenz und Amplitude führen (Ziemann, 2004).

2.4.1 Narkose und magnetisch motorisch evoziertes Potential

Lebende Tiere, besonders jene, die im wissenschaftlichen Zweck genutzt werden, dürfen im Rahmen der Untersuchungen keinem Schmerz, Leid und physischem oder psychischem Stress ausgesetzt werden.

Auch wenn es sich bei der MS um ein in der Humanmedizin als schmerzfrei beschriebenes Prozedere handelt, ist die dazu notwendige Manipulation des Tieres als stressig zu bewerten. Entsprechend ist eine Anästhesie des Tieres einer Fixation und reinen Immobilisierung vorzuziehen. Allerdings spielt die Wirkung von Pharmaka für die MS eine besondere Rolle, da sie zum großen Teil durch indirekte Reizweiterleitung erfolgt. Zentral wirksame Medikamente haben dabei sowohl Einfluss auf transkraniell als auch auf spinal evozierte Potentiale (Ziemann, 2004).

Der Einfluss, den verschiedene Anästhetika auf MMEPs haben, wurde bereits in zahlreichen Studien an Menschen (Kalkman et al., 1992; Schmid et al., 1992; Taniguchi et al., 1993; Sihle-Wissel et al., 2000; Scheufler und Zentner, 2002; Di Lazzaro et al., 2003), Hunden (Glassman et al., 1993; Young und Sylvestre, 1993; Van Ham et al., 1994, 1995, 1996), Katzen (Yamada et al., 1994), Pferden (Nollet et al., 2003c), Hasen (Scheufler und Zentner, 2002), Affen (Stone et al., 1992; Ghaly et al., 1999b) und Ratten (Fishback et al., 1995; Chiba et al., 1998; Kamida et al., 1998; Luft et al., 2001) untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Formen der Anästhesie Einfluss auf die ausgelösten MMEPs verschiedenster Spezies haben, zum Teil mit gegensätzlichem Effekt.

Während bei einer Spezies hemmende Einflüsse durch ein Pharmakon überwiegen, wirkt das gleiche Medikament bei einer anderen Spezies stimulierend auf die Reizweiterleitung.

Beispielsweise ist das Narkotikum Propofol beim Menschen für die MS nicht geeignet, da es jegliche Potential-Ableitung verhindert (Kalkman et al., 1992; Schmid et al., 1992; Scheufler und Zentner, 2002), während es andererseits das Hypnotikum der Wahl zur MS an der Ratte ist, da hier die Amplituden ungewöhnlich konstant bleiben, selbst bei kontinuierlicher Gabe über eine Zeitspanne von drei Stunden per Dauerinfusion (Fishback et al., 1995). Bei Hunden und Kaninchen wiederum verhält sich die Wirkung des Propofols ähnlich wie beim Menschen (Van Ham et al., 1995; Scheufler und Zentner, 2002). Dennoch wurde nach Versuchen mit Kaninchen berichtet, dass es zu einer hohen Variabilität von Amplitude und Start-Latenz führen kann (Scheufler und Zentner, 2002). Ähnliche speziesspezifische Unterschiede der Wirkung wurden für Ketamin, Etomidate, Fentanyl, Thiopental, Midazolam und verschiedene Kombinations-Anästhesien festgestellt (Kalkman et al., 1992; Glassman et al., 1993; Van Ham et al., 1995; Chiba et al., 1998; Scheufler und Zentner, 2002; Di Lazzaro et al., 2003). Bis heute existieren jedoch keine Untersuchungen zur Anwendbarkeit von Anästhesiemethoden der Maus zur magnetischen Stimulation in dieser Spezies.

2.5 Periphere Magnetstimulation

Prinzipiell bietet auch die MS die Möglichkeit, periphere Nerven zu erregen. Dennoch wird sie in der täglichen Praxis nur selten eingesetzt, obwohl sie Vorteile gegenüber der klassischen elektrischen Stimulation bietet (siehe dazu auch Kapitel 2.1.4 auf Seite 10).

Zum einen ist die geringe Schmerzhaftigkeit zu nennen, da Schmerzrezeptoren der Haut nicht aktiviert werden (Han et al., 2006) und durch zweckoptimierte Orientierung der Spule eine intensivere Stimulation der motorischen im Vergleich zu den sensorischen Fasern erfolgt (Tuday et al., 2006). Zum anderen unterliegen Magnetfelder einer geringeren Abschwächung durch penetriertes Gewebe als elektrische Felder (Harms, 2007). Dadurch können auch tiefer liegende Nerven bzw. Muskelfasern und damit eine größere Zahl motorischer Einheiten gereizt werden. Im Vergleich zur Elektrostimulation, bei der nur die elektrodennahen Fasern erregt werden, können so größere Muskelkräfte und damit geringere Ermüdung der einzelnen Faser erreicht werden. Die daraus resultierende Kontraktion ist daher der physiologischen Muskelkraftentwicklung ähnlicher, so dass ein besserer Trainingseffekt zu erwarten ist.

Einen weiteren Vorteil der MS bietet die Reizwirkung ohne mechanischen Kontakt, was auch die Untersuchung traumatisierter Regionen oder steriler Areale ermöglicht.

Als größter Nachteil der MS wird jedoch gewertet, dass kein genau definierter Punkt erregt und eine supramaximale Stimulation nicht immer garantiert werden kann (Bischoff et al.,

1994). Dies sind zwar Grundvoraussetzungen für die Durchführung klinisch aussagekräftiger Nervenleitungsuntersuchungen, bieten aber keinen Nachteil für funktionelle periphere Stimulation.

Die MS peripherer motorischer Axone ist mittlerweile als effektive, schmerzfreie Methode zur Aktivierung assoziierter Muskeln etabliert (Machetanz et al., 1994). Damit stellt sie ein vielversprechendes Prozedere zum Zweck der Rehabilitation denervierter Muskelpartien nach Verletzungen dar (Davey et al., 1994).

Zusätzlich können mit Hilfe ausgewählter Stimulationsfrequenzen im Fall neuronaler Läsionen die Faserzusammensetzung der stimulierten Muskulatur aufrecht erhalten und denervationsbedingte histochemische Umwandlungen abgemildert werden, was für die elektrische Stimulation bereits bewiesen werden konnte (Salmons und Vrbova, 1969; Marqueste et al., 2006).

2.5.1 Muskelaufbau und Kraftentwicklung

Generell existieren in der Skelettmuskulatur drei Hauptfasertypen, die je nach biochemischer Grundfunktion, Lokalisation und Training eines Muskels in variierender Zahl repräsentiert sind (Valentine und McGavin, 2007). Die verschiedenen Fasertypen (Typ I und II-A, II-B, II-X) werden entsprechend der Geschwindigkeit ihrer Kontraktion (schnell oder langsam), ihrer Ermüdungsrate (schnell oder langsam) und der Art des Stoffwechsels (oxidativ, glykolytisch oder gemischt) unterteilt (Landon, 1992).

Der Großteil der Muskeln enthält sowohl Typ I- als auch Typ II-Fasern. Physiologischerweise ist der Querschnitt eines Muskels durch eine mosaikartige Durchmischung der unterschiedlichen Fasertypen gekennzeichnet. Der prozentuale Anteil der einzelnen Fasertypen variiert jedoch von Muskel zu Muskel. In Abb. 2.10 auf der nächsten Seite ist der prozentuale Anteil der Typ I-Fasern innerhalb der Oberschenkelmuskulatur des Hundes dargestellt (Valentine und McGavin, 2007).

Selten ist ein Muskel ausschließlich aus einem Fasertyp zusammengesetzt. Allerdings bestehen dabei große Unterschiede zwischen verschiedenen Rassen und Spezies (Valentine und McGavin, 2007).

Typ I-Fasern kommen besonders zahlreich in den Muskeln vor, deren Hauptfunktion in langsamer, lang andauernder Aktivität liegt, so zum Beispiel in Muskeln zur Aufrechterhaltung der Körperposition. Diese Muskeln sitzen vor allem tief, nahe dem Skelettsystem. Zusätzlich nimmt der Anteil der Typ I-Fasern zur tieferen Stelle eines Muskels hin zu. Muskeln, die schnell und für kurze Dauer kontrahieren, enthalten vorwiegend Typ II-Fasern (Romanul, 1964).

Auch das Vorkommen der einzelnen unten aufgezählten Muskelfasertypen unterscheidet

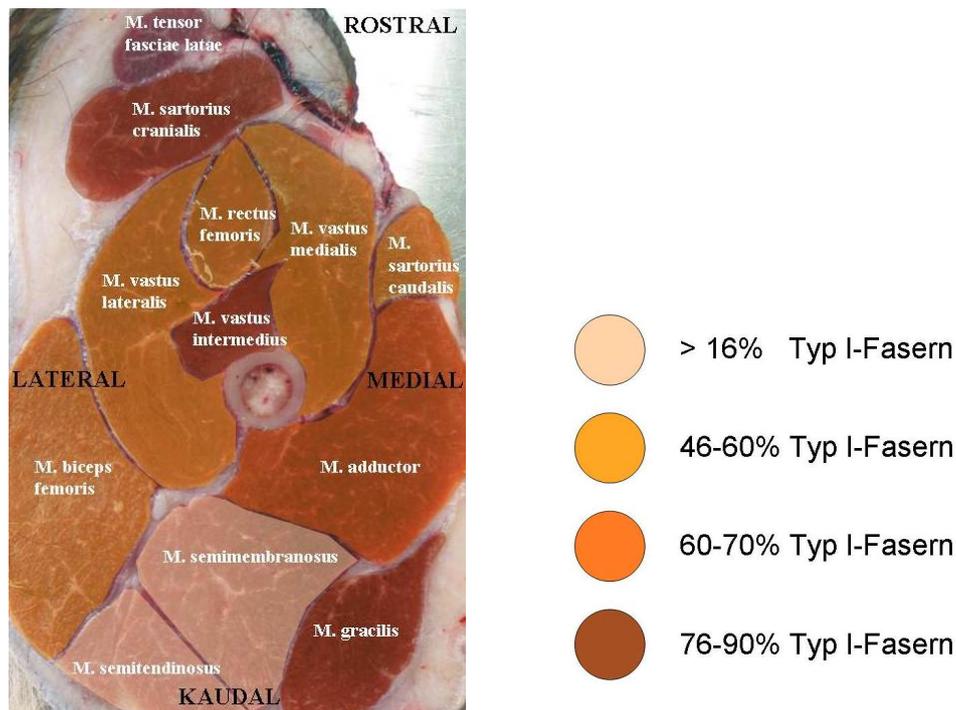


Abbildung 2.10: Querschnitt durch den Oberschenkel eines Hundes mit farblicher Darstellung des prozentualen Typ I-Faseranteils (nach Valentine und McGavin (2007)) (Gefrierschnitt - auf halber Länge des Femurs).

sich bei den verschiedenen Spezies. Der Hund beispielsweise besitzt keine Typ II-B Fasern, bei ihm besitzen alle Fasern oxidativen Stoffwechsel (Valentine und McGavin, 2007).

Fasertyp I Auch langsam zuckende Fasern, langsam oxidativ oder „tonisch“ genannt. Diese Fasern kontrahieren langsam und unter geringer Kraftentwicklung. In einer physiologischen Situation kontrahieren diese Fasern immer zuerst. Sie ermüden nur langsam und erholen sich rasch. Wegen der großen Menge an Mitochondrien und der darin enthaltenen Zytochrome und wegen des in den Fasern eingelagerten Myoglobins sind diese Muskelfasern deutlich dunkelrot gefärbt. Typ I- Fasern sind vor allem für die Statik des Körpers verantwortlich und sind daher in Muskeln des Stammes und tiefer liegenden Muskeln der Extremitäten überrepräsentiert (Landon, 1992). Da diese Fasern vor allem durch niederfrequent pulsierende motorische Neuronen gereizt werden, nutzt man für ihre Reizung mit Hilfe der ES niedrige Frequenzen zwischen 5 und 25 Hz (van Kerkhof, 2005).

Fasertyp IIA Wird auch schnell kontrahierend, oxidativ-glykolytisch oder „fast-contracting, slow-fatigueing“ genannt. Diese Fasern ermüden langsamer und erholen sich rascher als Typ IIB Fasern. Sie enthalten mehr Mitochondrien und Myoglobin als der Fasertyp IIB und sind damit weißlich-rot gefärbt (Landon, 1992). Ihre optimale Stimulationsfre-

quenz liegt zwischen 50 und 70 Hz (van Kerkhof, 2005). Kommt es durch Inaktivität zur Atrophie der Muskulatur, sind speziell die Typ IIA-Fasern betroffen.

Fasertyp IIB Wird auch schnell kontrahierend, glykolytisch oder „fast-contracting, fast-fatiguing“ genannt. In diesen Fasern herrscht ein vorwiegend glykolytischer Stoffwechsel und sie sind nur wenig oxidativ. Die Geschwindigkeit ihrer Kontraktion geht mit einem hohen Verbrauch an ATP einher. Aufgrund der geringen Zahl von Mitochondrien und der darin enthaltenen Zytochrome und wegen der geringeren Menge an Myoglobin sehen diese Muskelfasern weißlich aus. Eine optimale Stimulationsfrequenz dieses Fasertyps liegt bei 50–70 (-100) Hz (van Kerkhof, 2005).

Obwohl die Muskelzellen häufig auch Muskelfasern genannt werden, sind es tatsächlich multinukleäre Zellen beachtlicher Länge, die bis zu 10 cm oder mehr erreichen können (Landon, 1992). Der Faserdurchmesser liegt dabei bei etwa 10–100 µm (Landon, 1992). Die Kerne der Zellen sind randständig innerhalb der zylinderförmigen Faser verteilt und richten die zellulären Vorgänge entlang der Kerndomäne aus. Dadurch können Teile der Zelle unabhängig von anderen Zellbereichen reagieren.

In der Nachbarschaft der Muskelfasern sitzen zudem Satellitenzellen, auch ruhende Myoblasten genannt. Diese Zellen sind entlang der gesamten Muskelfaser verteilt und sitzen zwischen der Plasma-Membran (Sarkolemm) und der Basalmembran. Sie sind zu Teilung, Verschmelzung und Neubildung reifer Muskelfasern fähig (Valentine und McGavin, 2007).

Die einzelnen Muskelfasern sind durch eine bindegewebige Schicht, das Endomysium, voneinander getrennt. Mehrere Fasern werden als Faszikel durch das Perimysium zusammengefasst (0,1–1 mm Durchmesser), einer etwas dickeren Bindegewebsschicht. Der gesamte Muskel ist zusätzlich durch das Epimysium umgeben, eine schützende Faszie, die Muskel und Sehne miteinander verbindet. Diese bindegewebigen Schichten bilden gemeinsam einen wichtigen Teil des Kontraktionsapparates, indem sie die entwickelte Kraft speichern und an den Stützapparat übertragen (Landon, 1992).

Jede Muskelfaser ist aus einigen hundert dicht aneinander liegenden Myofibrillen zusammengesetzt, die Aktin- und Myosin-Filamente enthalten. Das Myosinmolekül besitzt einen zweiteiligen Kopf. Dieser ist über ein Halsstück (Kopf + Hals = schweres Meromyosin) mit dem Schwanzteil (leichtes Meromyosin) des Myosins verbunden. Durch die gelenkige Verbindung der einzelnen Molekülteile ist eine reversible Bindung zwischen Aktin und Myosin und ein Ineinandergleiten der Filamente möglich. Dies läuft nicht an allen Myosinköpfchen gleichzeitig ab, sondern das asynchrone Kippen der Köpfe gewährt einen kontinuierlichen Kontraktionsablauf (Silbernagl und Despopoulos, 2007).

2.5.2 Innervation und motorische Einheiten

Mehrere Muskelfasern werden durch ein einzelnes Axon eines peripheren Nervs innerviert. Gemeinsam bilden diese eine „motorische Einheit“. Alle diese Fasern kontrahieren bei einer Stimulation gemeinsam. Verschiedene Muskeln haben eine unterschiedliche Zahl an Muskelfasern, die zu einer motorischen Einheit gehören. Je feiner die Bewegungen eines Muskels ausgeführt werden müssen, desto weniger Fasern sind in einer motorischen Einheit zusammengefasst (z.B. 1 bis 4 Fasern je Axon in extraokulären Augenmuskeln). In Muskeln, die vor allem der Krafterzeugung dienen, wie z.B. der **Musculus (M.) quadriceps**, sind die motorischen Einheiten dagegen sehr groß (100 oder mehr Fasern je Axon) (de Lahunta und Glass, 2009a).

Die Endaufzweigungen der motorischen Axone bilden Synapsen mit den Muskelfasern im Bereich der neuromuskulären Endplatte. Diese übertragen eintreffende Aktionspotentiale auf den Muskel und können nur mit Hilfe der Elektronenmikroskopie dargestellt werden (Landon, 1992). Sie reihen sich ausschließlich entlang einer spezifischen Zone innerhalb des Muskels auf, die typischerweise als „Bande“ zwischen Muskelfaseransatz und -ursprung verläuft.

Trifft ein Aktionspotential an der motorischen Endplatte ein, wird dort Azetylcholin freigesetzt, das einen Endplattenstrom induziert. Dieser breitet sich entlang des Sarkolemms über die ganze Muskelfaser aus. Das Sarkolemm ist an vielen Stellen senkrecht zu den Muskelfibrillen als transversale Tubuli (T-System) eingestülpt. Ca^{2+} , das in den longitudinalen Tubuli des sarkoplasmatischen Retikulums gespeichert ist, wird beim Eintreffen des Aktionspotentials freigesetzt. Dadurch steigt die Konzentration an Ca^{2+} innerhalb der Muskelzelle um das etwa 1000fache an. Damit wird eine ganze Reihe von Reaktionen ausgelöst, die letztendlich zur Muskelkontraktion führen (Valentine und McGavin, 2007).

2.5.3 Denervation der Muskulatur nach Neurotrauma

Generell sind die motorischen Einheiten von dem sie innervierenden Nerven abhängig. Der Erhalt des normalen Muskelfaser-Durchmessers ist abhängig von trophischen Faktoren, die durch den intakten Nerv gebildet werden. Der Verlust des neuronalen Inputs verursacht eine Stilllegung mit nachfolgender neurogener Muskelatrophie, die bei kompletter Denervierung mehr als die Hälfte der Muskelmasse ausmachen kann.

Sowohl degenerative Erkrankungen, Traumata, Entzündungen, Tumoren als auch metabolische Störungen des Nervensystems können zu dessen Schädigung und damit zu einer Muskelatrophie führen (Valentine und McGavin, 2007).

Abbildung 2.11a auf der nächsten Seite zeigt das histologische Bild einer neurogenen Muskelatrophie mit typisch angulären Muskelfasern, die spitze Winkel im Querschnitt aufweisen.

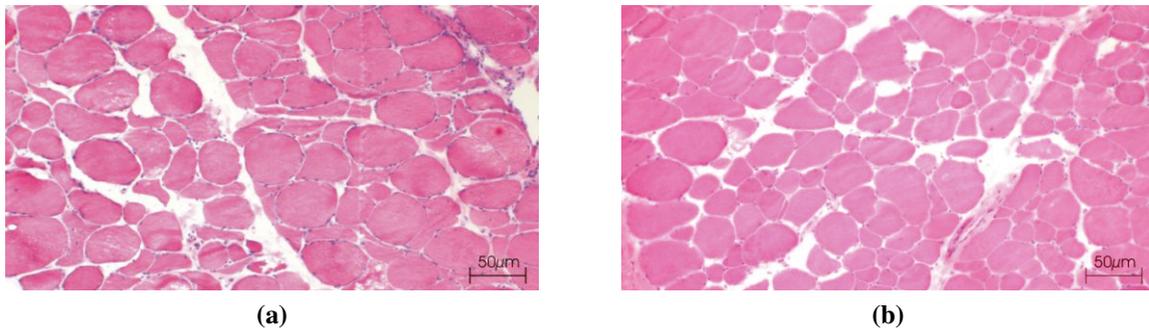


Abbildung 2.11: Vergleich: a) neurogene Muskelatrophie (Pferd; Westfälisches Warmblut; 16 Jahre) b) Inaktivitäts-Muskelatrophie (Katze, EKH, 9 Monate); (Muskelbiopsien, Cryotomschnitt, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Institut für Tierpathologie, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie, LMU München).

Im Vergleich dazu zeigt Abb. 2.11b die im Fall verminderter Muskelnutzung auftretende Muskelatrophie, bei der eine typisch runde Faseratrophie vorliegt. Diese Schonungsatrophie kann beispielsweise aufgrund von Schmerzen oder Fixationen einer Extremität hervorgerufen werden.

Nach dem Funktionsverlust einer Nervenfasern gehen alle von dieser Faser versorgten Muskelzellen unter. Klinisch ist dies anhand der Umfangsminderung des gesamten Muskels zu erkennen. Die Denervation führt dabei zu zunehmender Atrophie der Muskulatur und sinkenden Muskelfaserdurchmessern. Auch mechanische und biochemische Veränderungen der Muskelzelle resultieren aus dieser Denervierung (Boudriau et al., 1996).

Da typischerweise immer zusammengehörende Gruppen von Muskelfasern durch den gleichen Nerven versorgt werden, geht bei Verlust dieses Nerven auch eine zusammengehörige Fasergruppe unter. Diese felderförmige, anguläre Atrophie der Muskelfasern ist daher typisch für die vom Nerven verursachte Muskelatrophie (de Lahunta und Glass, 2009a).

Durch Ersatz des neurogenen Inputs, welcher durch das Auswachsen benachbarter motorischer Nervenfasern bewerkstelligt wird, kommt es zur funktionellen Wiederaufnahme der Muskeleigenschaften. Da jedoch häufig die Fasertypenentwicklung vom innervierenden Nerven abhängt und somit ein Typwechsel mit neuer Innervation verursacht werden kann, kommt es zum Verlust der normalerweise mosaikartigen Durchmischung der Fasertypen. Es bilden sich stattdessen große Flächen einheitlichen Fasertyps, so genannte „Cluster“.

2.5.4 Funktionelle Stimulation in der Rehabilitation

In Zeiten höherer Lebenserwartung, zunehmender Zahl an spinalen und peripheren Unfalltraumata und steigender Inzidenz von Schlaganfallpatienten nimmt auch die Zahl der vollständig oder teilweise gelähmten Patienten zu. Häufig muss mit dauerhaftem Verlust der

Gehfähigkeit des Erkrankten gerechnet werden. Der Mangel der Selbständigkeit ist für diese Patienten eine zusätzliche psychische Belastung. Eine Verbesserung rehabilitativer Strategien ist daher von großem Interesse.

Neben den ischämischen Infarkten in Hirn oder Rückenmark verursachen auch periphere Nervenläsionen oder Rückenmarkstraumata eine Inaktivität der betroffenen Muskeln beim Menschen (Gordon und Mao, 1994) und bei Tieren (Laurent, 2004a).

Findet eine Reinnervation nach Nervenläsion statt, pendelt sich die vorausgegangene Muskelfasereigenschaft erst nach einiger Zeit wieder ein, da die neue Nervenfasern nicht immer die gleiche Steuerfrequenz wie die ursprünglich innervierende Nervenfasern aufweist (Gordon und Stein, 1982; Foehring et al., 1986a,b; Gordon et al., 1986, 1988).

Mittels chronischer Stimulation schnell kontrahierender Muskelfasern mit niedrigfrequenter, tonischer Stimulation wurde der Effekt einer vertauschten Reinnervation nachgeahmt und die zeitabhängige Reorganisation nachgewiesen (Salmons und Vrbova, 1967, 1969; Salmons und Sreter, 1976; Ausoni et al., 1990; Mourselas und Granat, 1998).

Eines der wichtigsten Ziele des Muskeltrainings nach einem Neurotrauma liegt im Wiedererlangen der Fähigkeit, das Körpergewicht zu tragen, da dies unabkömmlich sowohl für den Stand als auch für die Bewegung ist. Die Aufrechterhaltung der Kontraktion in den dafür notwendigen Muskeln wird dabei maßgeblich von den langsam ermüdenden Typ I- Muskelfasern bewerkstelligt, die zur Rehabilitation daher besonderer Aufmerksamkeit bedürfen.

Ein gezieltes Training dieser speziellen Fasertypen kann unter Verwendung muskelspezifischer Frequenzen erreicht werden. Frequenzen, welche der physiologischen motorischen Steuerfrequenz durch das ursprüngliche spinale Motoneuron ähneln, sind dabei besonders effektiv (Hennig und Lomo, 1987).

Die Funktionelle Elektrostimulation (FES) kann künstlich eine Erregung gesunder oder teilweise innervierter Muskeln erzeugen, um nützliche Kräfte oder Bewegungen auszulösen. Die FES hat sich in der Rehabilitation und funktionellen Erhaltung der Muskulatur bereits als nützlich erwiesen. Eine Stimulation der traumatisierten Motoneuronen führt zur erhöhten Ausschüttung neurotropher Faktoren und einer schnelleren Reinnervation des Zielmuskels bei Mensch und Ratte (Gordon et al., 2007).

Ein regelmäßiger neuronaler Input über einen von außen gegebenen Stimulus wird zur Rehabilitation gelähmter Muskulatur genutzt, da die Muskelzellendifferenzierung die neuronale Erregung benötigt (Carlson et al., 1981; Gulati, 1988). Fehlt eine Innervation des Muskels, kommt es zum Faserumbau des Muskels und zur Änderung kontraktile Eigenschaften (Salmons und Vrbova, 1969). Die Aufrechterhaltung der Muskelaktivität ist daher in der Phase der Reinnervation von großem Interesse.

In Untersuchungen von Marqueste und Mitarbeitern führten sowohl Laufradnutzung als

auch chronische elektrische Stimulation zu einer Erhöhung des Muskelgewichts und geringerer Ermüdung bei Ratten mit peripherer Nervenläsion im Vergleich zu denen ohne geförderte Muskelaktivität (Marqueste et al., 2004, 2006).

Zum Zweck der Rehabilitation ist eine schmerzfreie, effektive Stimulation der ungenutzten Muskelanteile nötig. Magnetische Stimulation der motorischen Nerven bietet eine Exzitation der peripheren Nerven ohne Schmerzauslösung (Machetanz et al., 1994; Soens et al., 2008).

Ob die Funktionelle Magnetstimulation (FMS) die FES ersetzen kann, ist noch nicht vollständig geklärt, ist jedoch Ziel der aktuellen Forschung (Vortrag Prof. Straube auf der „International Conference on Transcranial Magnetic and Direct Current Stimulation 2008“, Göttingen, Deutschland).

Mehrere Autoren bestätigten bereits, dass durch die MS eine Aktivierung der Motoneuronen erfolgt, welche für die resultierenden Muskelkontraktionen verantwortlich ist, und es nicht zur direkten Stimulation der Muskelfasern selbst kommt. Durch den Einsatz neuromuskulärer Blocker konnten sie nachweisen, dass keine Depolarisation der Muskelfasern, sondern die indirekte Stimulation über die motorischen Nervenzellen erfolgt (Lotz et al., 1989; Machetanz et al., 1994; Ellaway et al., 1997). Generell ist die Reizschwelle der Muskelfaser deutlich höher als die der motorischen Nervenfasern (Crago et al., 1974), so dass deren direkte Stimulation unwahrscheinlich ist.

Der damit erbrachte Beweis, dass die mit der MS ausgelösten Muskelkontraktionen auf einer neuronal gesteuerten Kontraktion und nicht auf direkter Depolarisation der Muskelfasern basieren, ist eine wichtige Grundvoraussetzung für Rehabilitationsbemühungen. Denn nur bei neuronalem Input könnte die gesteigerte Expression neurotropher Faktoren und damit eine gesteigerte Heilung nach Nervenläsionen möglich werden (Post et al., 1999a). Der therapeutische Nutzen, den die FMS bieten kann, scheint dabei immens. Neben der Vorbeugung gegen Muskelatrophien und Erhaltung der motorischen Kontrolle könnte auch eine Kraftsteigerung nach oder unabhängig von einem Nervenstrauma möglich werden.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit verfolgte drei Hauptziele, die im Folgenden genauer erläutert werden. Erstens wurde die Effektivität einer hochfokalen Spule an der Maus überprüft, zweitens die spinale und transkranielle MS an der Maus etabliert und drittens wurde die Effektivität neuartiger magnetischer Pulse untersucht.

Die Untersuchung der Spuleneffektivität wurde am Hirn der Labormaus vorgenommen.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde überprüft, ob die Reizintensität, die mit einer neuartigen, hochfokalen Achterspule appliziert werden kann, für eine supramaximale Stimulation von Rückenmark und Hirn der Maus ausreicht. Die entsprechend als supramaximal beurteilte Reizintensität wurde für die darauf folgenden Untersuchungen beibehalten.

Jedem Teilschritt der nun durchgeführten Untersuchungen wurde die phänotypische Analyse der im Test genutzten Tiere vorangestellt. Um ausschließen zu können, dass Unterschiede der MMEPs zwischen verschiedenen Tieren und Experimenten durch neuropathische Veränderungen am untersuchten Tier verursacht werden, sind alle Tiere mit Hilfe eines Phänotypisierungs-Modells, dem SHIRPA-Protokoll, speziell auf neurologische Defizite untersucht worden.

Als nächster Teilschritt wurden die im numerischen Feldrechenprogramm erhobenen Daten zur Magnetfeldausdehnung an der Maus überprüft. Dazu wurde die Stimulation des Rückenmarks gewählt, da die dort herrschende einheitliche Orientierung der Nervenfasern zu einer gleichgerichteten Gradienteneinwirkung durch das sekundäre elektrische Feld führt. Ein wichtiger Teilpunkt dieses Untersuchungsschrittes war die Evaluierung unterschiedlicher Winkelausrichtungen der Spule in Relation zum stimulierten Areal. Diese Daten wurden erhoben, um die optimale Stimulationsrichtung in Bezug auf die Reizentwicklung festzustellen und für folgende Untersuchungen zu nutzen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden unterschiedliche Anästhesieprotokolle der Maus im Bezug auf ihre Anwendbarkeit für die transkranielle und spinale MS beurteilt. Basierend auf den Ergebnissen der Anästhesie-Untersuchungen wurde im nächsten Untersuchungsschritt die Fokalität der induzierten Felder am Hirn und Rückenmark der Maus beurteilt. Dazu wurden Hirnareale der Maus selektiv stimuliert und die entsprechenden MMEPs abgeleitet.

Im dritten Teil der vorliegenden experimentellen Studie wurde die Pulseffektivität neuartiger Magnetimpulse überprüft. Für diese Untersuchungen wurde die Spezies Hund ausgewählt, da diese aufgrund ihrer Körperproportionen und der daraus resultierenden Kraftentwicklung besser mit dem Menschen vergleichbar ist. Zusätzlich weist die Spezies Hund innerhalb einer Rasse und eines Geschlechts vergleichbare Körpergrößen und damit Muskelängen auf. Die Unterbringung der Tiere in derselben Haltung führt zudem zu einheitlichem Trainingsstatus und damit zu ähnlichen Muskelproportionen zwischen verschiedenen Tieren.

Um die Effektivität magnetischer Stimulusformen auf die Muskelkraft darzustellen, wurden fünf unterschiedliche Burst-Protokolle eingesetzt und mit magnetischen Standard-Einzelimpulsen verglichen.

Zur besseren Übersicht sind in Abb. 3.1 auf der nächsten Seite die durchgeführten Schritte in einem Organigramm aufgeführt.

3.2 Versuchsgenehmigungen

Alle im Folgenden beschriebenen tierexperimentellen Versuchsaufbauten an den untersuchten Mäusen und Hunden wurden im Rahmen genehmigter Tierversuche durchgeführt. Die entsprechenden Anträge wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.3 Experimentelles Vorgehen für die Maus

Ein erster Schritt der vorliegenden Arbeit lag in der Durchführung zahlreicher Vorarbeiten, die eine MS an der Maus erleichtern und verbessern sollten. Neben der Auswahl und Anpassung der Methode mit Hilfe publizierter Daten beinhaltete dies auch die Planung und Entwicklung der technischen Voraussetzungen.

3.3.1 Technische und methodische Vorarbeiten

Zur Phänotypisierung

Da es sich bei der MS an der Maus um ein nicht etabliertes Verfahren handelt, zu dem keine Erfahrungswerte vorliegen, wurden entsprechend neurologisch unauffällige Tiere für die Versuche ausgewählt. Zur Beurteilung des Gesundheitszustandes der Mäuse wurde vor der jeweiligen Teiluntersuchung eine Phänotypisierung der entsprechenden Tiere durchgeführt.

Dazu ist das speziell auf die Maus zugeschnittene Phänotypisierungs-Modell des SHIRPA ausgewählt worden. Das SHIRPA-Protokoll wurde als systematisches, objektives Protokoll entwickelt, das die Phänotypisierung hoher Tierzahlen ermöglicht (Rogers et al., 1997, 2001).

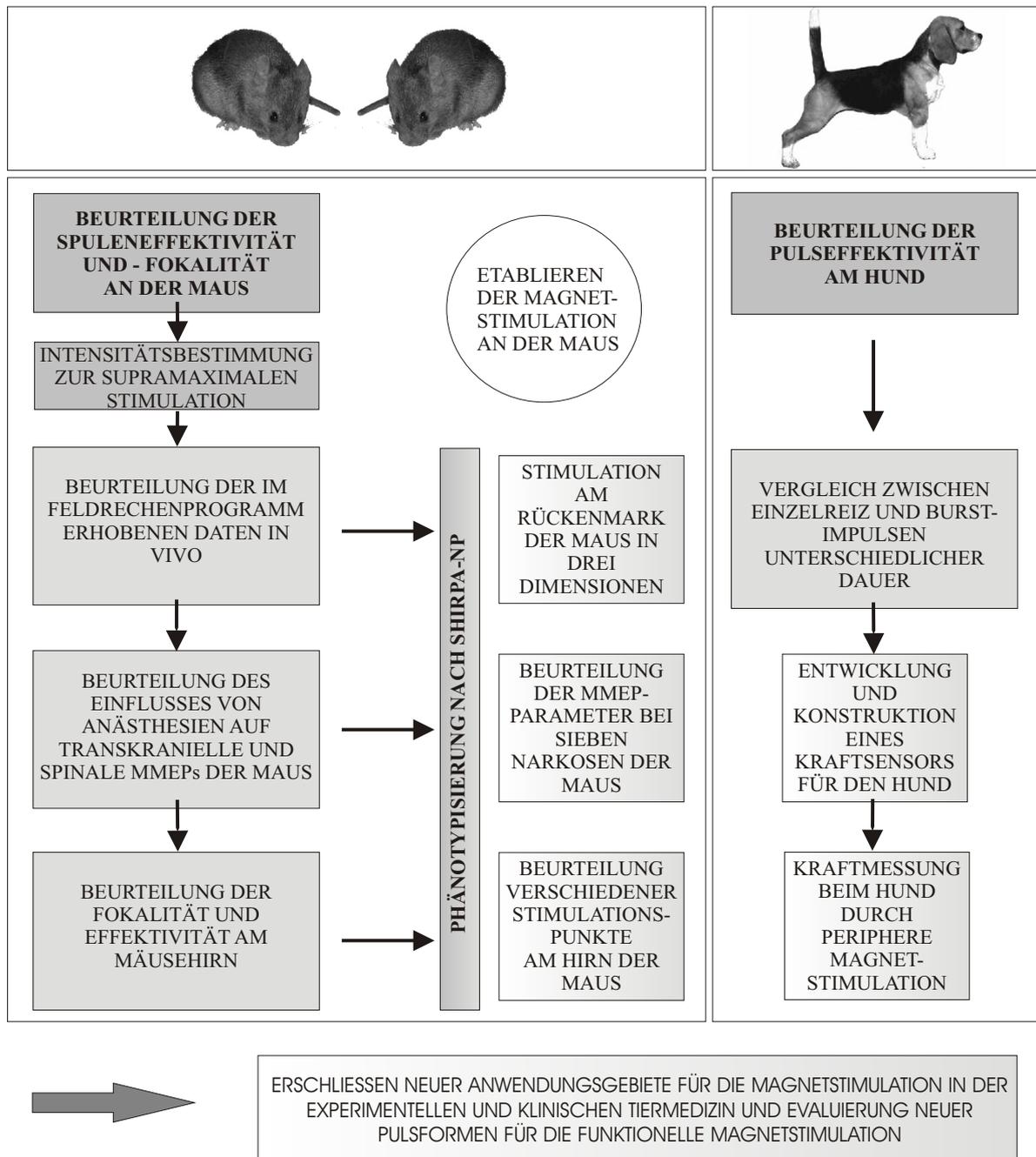


Abbildung 3.1: Organigramm zur Zielsetzung und Reihenfolge der durchgeführten Untersuchungen.

Der Name „SHIRPA“ setzt sich dabei aus den Initialen der Entwicklerinstitute SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harwell, MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit, Imperial College School of Medicine at St Mary's, Royal London Hospital, St Bartholomew's und die Royal London School of Medicine Phenotype Assessment zusammen.

SHIRPA bietet die Beurteilung physiologischer, verhaltensspezifischer und neurologischer Zustände selbst für hohe Tierzahlen in groß angelegten Mutageneseprojekten (Nolan et al., 2000).

Dieses Protokoll dient der Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustandes und spezieller Organsysteme, wie beispielsweise des Nervensystems. Es kann damit sowohl für die Ermittlung des Gesundheitszustandes eines oder mehrerer Tiere als auch zur Verlaufskontrolle in Studien mit Mehrfachuntersuchungen am selben Tier herangezogen werden.

Method Um die vom Normalen abweichende Biologie einer Mausmutante und die Identifikation feiner Varianten des Phänotyps darstellen zu können, ist eine vollständige klinische und pathologische Charakterisierung der Tiere notwendig. Obwohl es ausgeklügelte Techniken gibt, wurde die Mehrzahl der Analysen des Verhaltens und der Funktionsabläufe in der Maus zunächst mehr qualitativ als quantitativ durchgeführt. Beispielsweise wurde in Verhaltensstudien beurteilt, ob ein Tier sich putzt, frisst oder in welcher Form es auf Manipulation durch den Menschen reagiert (Chang et al., 1993).

Einzelne Forschergruppen haben zwar differenziertere Tests für lokomotorische und kognitive Fähigkeiten der Maus angewendet (Muller et al., 1994; Nasir et al., 1995; Reeves et al., 1995), haben deren Resultate jedoch isoliert betrachtet, ohne auf die Varianten anderer Phänotypen einzugehen.

SHIRPA verwendet für die Untersuchung des Phänotyps einer Maus ein dreistufiges Protokoll aus einzelnen Tests, welche die semiquantitative Erhebung von Daten zur individuellen Leistung beinhalten. Die Tests folgen einer zügig durchführbaren Reihenfolge, in der das Tier wenig belastet wird. Die ersten beiden Stufen des Protokolls sind so aufgebaut, dass ein erfahrener Untersuchender bis zu 50 Mäuse pro Tag evaluieren kann (Rogers et al., 1997). Beide Protokollanteile benötigen ausschließlich günstige, einfach zu handhabende Ausrüstungen.

Basierend auf bestehenden Angaben zur Durchführung des SHIRPA-Protokolls (Medical Research Council Harwell, 2007) wurde ein spezielles Protokoll erstellt, das insbesondere auf die Beurteilung des neuromuskulären Systems der Maus ausgerichtet ist.

Tabelle 3.1 auf Seite 42 gibt das ursprünglich von Rogers et al. (1997) entwickelte SHIRPA-Protokoll wieder, das uns als Basis zur eigenen Phänotypenanalyse diente.

Um die eigenen Untersuchungen und die bereitgestellte Ausrüstung zu validieren, wurde ein modifiziertes SHIRPA-Protokoll (SHIRPA-NP) an mehreren transgenen Mauslinien, die am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie phänotypisiert wurden, getes-

tet und mit den dort bestehenden Daten verglichen. Bei den ausgewählten Mauslinien handelt sich ausschließlich um Mausmodelle neurologischer Erkrankungen. Im Speziellen wurden die Mauslinien Glra1tg271R-783, ABE Mäuse, Beige Mouse und Cra1, sowie PrP-transgene Tiere untersucht.

Hierbei konnten Erfahrungen zur Erkennung und semiquantitativen Auswertung der Reinformen definierter neurologischer Ausfälle gesammelt werden.

Im Folgenden sind einige Beispiele der im Rahmen der Validierung erhobenen Befunde an den entsprechenden Mauslinien wiedergegeben. Zusätzlich wurden auch einzelne Tiere mit neurologischen Erkrankungen anderer Ursache untersucht. Die phänotypischen Auffälligkeiten dieser Tiere sind in den Abbildungen 3.2, 3.3 und 3.4 dargestellt.

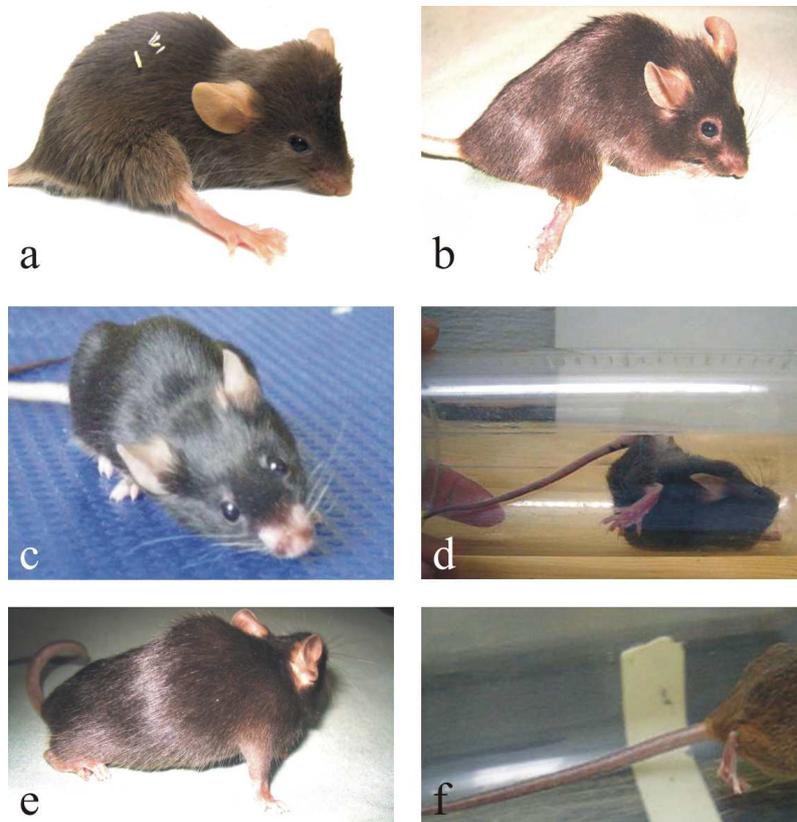


Abbildung 3.2: a) Maus mit angeborenem Hydrocephalus b) Maus mit Monoplegie der rechten Hinterextremität (Glra1tg271R-783) c) Maus mit mittelgradiger Kopfschiefhaltung nach rechts (verstärkt bei Aufregung) (C57BL/6) d) Maus mit hochgradiger Verzögerung der Aufrichtreaktion im „Contact Righting“-Test (Glra1tg271R-783) e) Maus mit Wirbelsäulenkyphose (Glra1tg271R-783) f) Maus mit Schleppen des Schwanzes (Cra1).

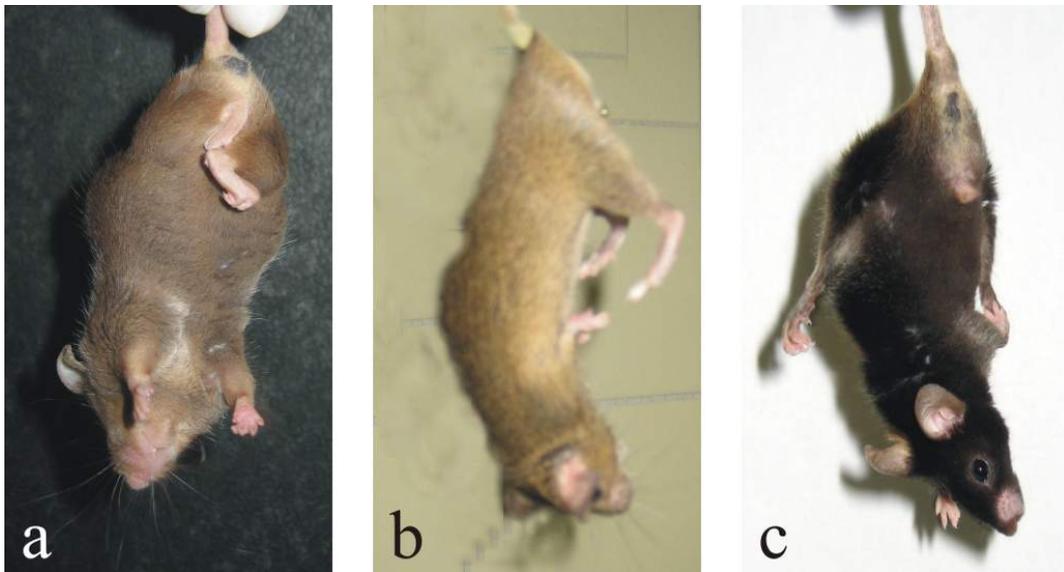


Abbildung 3.3: Reaktionen auf das Anheben unterschiedlicher Mäuse an der Schwanzbasis: a) Maus mit Verkrampfen der Hintergliedmaßen (Gla1tg271R-783) b) Myoklonus in Stresssituationen (Cra1) c) abnorme Körperrotation und Gliedmaßenhaltung bei einer Maus (Gla1tg271R-783).

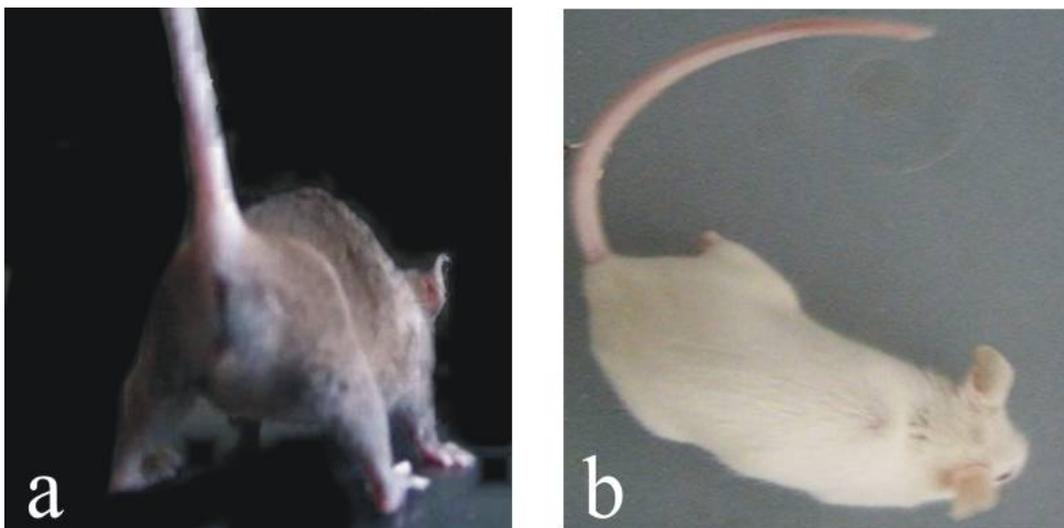


Abbildung 3.4: Beispiele für abnorme Bewegungsmuster der Maus: a) abnorme Steifigkeit des Schwanzes und plantigrades Fußes (Cra1) b) monotones Kreislaufen, erhöhte Drehfrequenz bei Stress (PrP-Linie).

Tabelle 3.1: Untersuchungen innerhalb des SHIRPA-Protokolls inklusive des jeweils beurteilten Systems (nach Rogers et al. (1997)).

Test	Testname	Funktionssystem
1	Respirationsrate	Atmungsapparat
2	Tremor	Kleinhirn, Muskulatur
3	Körperposition	Spinales Neuron, Muskulatur, Spinozerebelläre Fkt., Verhalten
4	Spontane Aktivität	Spinales Neuron, Muskulatur, Verhalten
5	Kotabsatz	Spinales Neuron, Muskulatur, Autonomes NS
6	Urinabsatz	Spinales Neuron, Muskulatur, Autonomes NS
7	Lokomotorische Aktivität	Spinales Neuron, Muskulatur, Spinozerebelläre Fkt., Verhalten
8	Transfer Erregung	Sensorik, Verhalten
9	Piloerektion	Vegetatives NS
10	Lidschluss	Autonomes NS
11	Schreckreaktion	Hirnnerv VIII, Autonomes NS
12	Gang	Spinales Neuron, Muskulatur, Spinozerebelläre Fkt.
13	Hüfthöhe	Skelettsystem, Motorik
14	Schwanzhöhe	Spinales Neuron, Muskulatur, Spinozerebelläre Fkt., Autonomes NS
15	Berührungsreaktion	Sensorik, Verhalten
16	Positionelle Passivität	Spinales Neuron, Muskulatur, Verhalten
17	Körperdrehung	Kleinhirn, Bewusstsein, Vestibuläres System
18	Gliedmaßen-Greifen	Propriozeption, Hirnnerv II, (Fein-) Motorik
19	Visuelle Positionierung	Spinales Neuron, Muskulatur, Spinozerebelläre Fkt., Sensorik
20	Griffstärke	Muskulatur
21	Körpertonus	Sensorik, Motorik
22	Ohrreflex	Hirnnerv V
23	Kornealreflex	Sensorik
24	Zehenzwicken	Sensorik, Motorik
25	Körperlänge	Wachstum
26	Tränenfluss	Hirnnerv V
27	Provoziertes Beißen	Großhirn
28	Speichelbildung	Hirnnerv VII, Hirnnerv IX

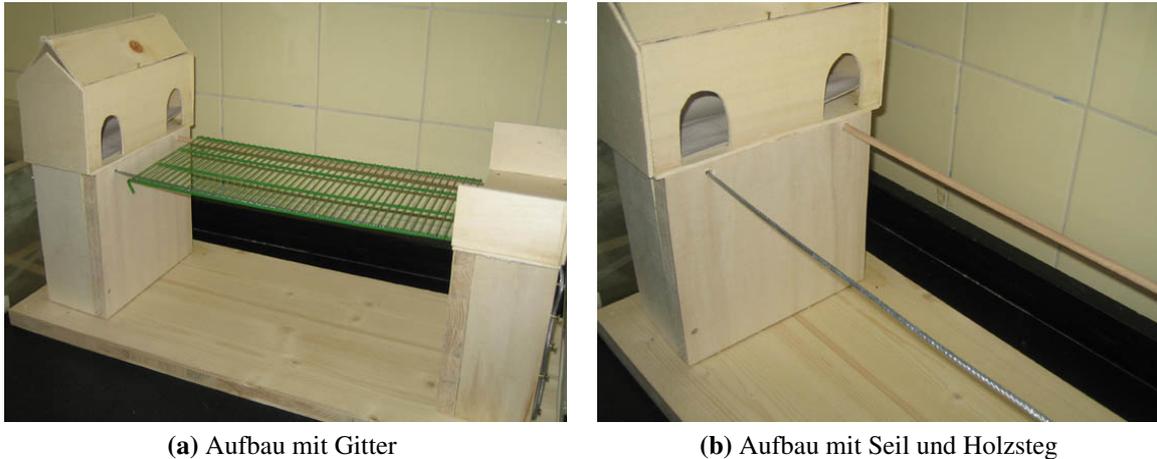
Tabelle 3.1: Untersuchungen innerhalb des SHIRPA-Protokolls... Fortsetzung.

Test	Testname	Funktionssystem
29	Herzfrequenz	Hirnnerv X, Autonomes NS
30	Abdominaler Tonus	Spinales Neuron, Muskulatur, Spinozerebelläre Fkt., Verhalten
31	Hautfarbe	Autonomes NS, Temperatur
32	Gliedmaßenstellung	Spinales Neuron, Motorik, Spinozerebelläre Funktion, Sensorik
33	Beintonus	Spinales Neuron, Muskulatur, Spinozerebelläre Fkt.
34	Drahtmanöver	Spinales Neuron, Muskulatur
35	Aufrichtreflex	Spinales Neuron, Muskulatur, Spinozerebelläre Fkt., Sensorik, Verhalten
36	Kontaktreflex	Vestibuläres System, Propriozeption
37	Negative Geotaxis	Vestibuläres System, Motorik
38	Angst	Verhalten
39	Erregbarkeit	Verhalten
40	Aggression	Verhalten
41	Vokalisierung	Verhalten
42	Verhaltensauffälligkeiten	Verhalten
43	Krämpfe	Verhalten
44	Zusätzliche Kommentare	

Generell kann die Anwendung modifizierter SHIRPA-Protokolle bei der Typisierung von Mauslinien hilfreich sein, insbesondere bei speziellen Fragestellungen. Beispielsweise wurde durch Masuya und Kollegen ein modifiziertes Protokoll erstellt, in dem zusätzliche Tests durchgeführt werden, um weitere morphologische Kriterien zur Phänotypisierung der Tiere heranzuziehen (Masuya et al., 2005).

Um auszuschließen, dass die eingesetzten Tiere eine Funktionsstörung des Nerven- und Muskelsystems aufweisen, wurde ein entsprechend angepasstes, modifiziertes SHIRPA-Protokoll, das „SHIRPA-NP“ durchgeführt. Die bestehenden Bewertungspunkte durch Rogers wurden dabei durch Tests ergänzt, die speziell Veränderungen des neuromuskulären Systems aufzeigen, während Tests mit dazu fehlender Aussagekraft nicht beibehalten wurden. Dadurch konnte die Untersuchungszeit und so der Stress für die Tiere gesenkt werden.

Bei den hinzugefügten Scores handelt es sich um die Parameter Beinspreizen, Rückenlinie, Schwanken, Plantigrades Fußes und Anziehen der Gliedmaßen.



(a) Aufbau mit Gitter

(b) Aufbau mit Seil und Holzsteg

Abbildung 3.5: Phänotypisierungsaufbau mit a) horizontalem Gitter und b) horizontalem Seil und Holzsteg (Konstruktion am Institut für Tierpathologie, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie, LMU München).

Der Parameter „Beinspreizen“ wurde ausgewählt, um Paresen, Paralysen oder auch Anomalien von Nervensystem oder Skelettsystem feststellen zu können. Die Beurteilung der Rückenlinie gibt ebenfalls einen Einblick auf die Wirbelsäulenentwicklung und damit indirekt auf die Integrität des Nervensystems.

Der Parameter „Schwanken“ ist ein zusätzlicher Test zur Beurteilung von Ataxien oder Gleichgewichtsstörungen der Tiere.

Plantigrade Fußung ist ebenfalls eine neurologische Problematik, die insbesondere bei peripheren Neuropathien beobachtet werden kann.

Das Anziehen der Gliedmaßen ist ein Merkmal, das bei zahlreichen Mausmodellen mit neurologischer Symptomatik beobachtet werden kann, und gilt als Hinweis auf einen Motoneuronenuntergang im Bereich der entsprechenden Ventralwurzeln.

Technik Notwendige Geräte zur Durchführung der Phänotypisierung wurden in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz-Zentrum München (Dr. Lore Becker, German Mouse Clinic) geplant und in eigener Arbeit oder in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Weyh (Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München) realisiert.

Als erstes wurde ein Aufbau konstruiert, der ein Seil, einen runden Holzsteg und eine Ablagefläche für ein Gitter sowie attraktive Endplattformen für die Mäuse bietet (Abb. 3.5).

Das horizontale Seil im SHIRPA-NP-Protokoll wurde an beiden Enden mit einem Holzaufbau versehen, der die Tiere zum Überwinden des Seiles animieren soll. Einer der beiden Aufbauten wurde durch ein Dach im Innenraum abgedunkelt. Zusätzlich erlauben zwei Aussparungen im Bereich der Seil- und Holzstangenfixierung ein Eintreten der Tiere. Dieser erstgenannte Aufbau simuliert einen Unterschlupf für das Tier und ist daher für die Fortbe-

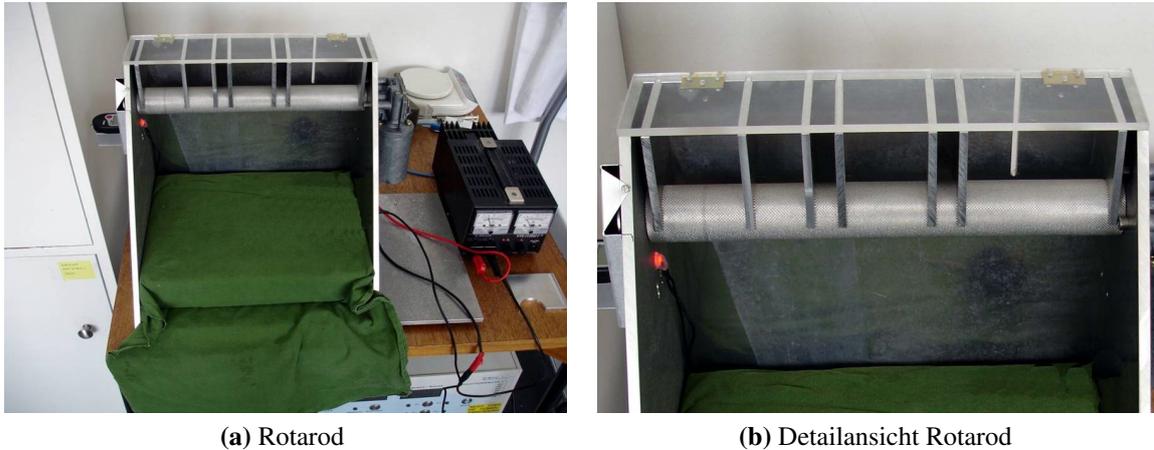


Abbildung 3.6: Rotarod mit rotierendem Zylinder und Steckvorrichtungen für variabel positionierbare Aluminiumscheiben (in Zusammenarbeit mit Florian Helling, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München).

wegung der Maus auf dem Seil attraktiv. Der zweite Aufbau besteht ausschließlich aus einer Fläche, die mit einer 5 cm hohen Umrandung versehen ist, und wurde vorrangig als mögliches Zielareal in der Gegenrichtung konzipiert.

Zusätzlich wurde ein Rotarod entwickelt (Jones und Roberts, 1968; Bogo et al., 1981). Dabei handelt es sich um einen rotierenden Zylinder, der dazu genutzt werden kann, die Koordination, Bewegungsmuster und Ausdauer der Tiere zu bewerten. Der rotierende Zylinder weist einen Querdurchmesser von 4 cm und eine desinfizierbare, griffige Oberfläche auf. Durch blickdichte Aluminiumscheiben kann er in mehrere Abschnitte unterteilt werden. Die Zahl und Breite der einzelnen Abschnitte ist durch das frei wählbare Anbringen oder Entfernen der Zwischenwände variierbar, so dass das Rotarod auf unterschiedliche Tierzahlen und Mausgrößen einstellbar ist (Abb. 3.6). Es können bis zu 5 ausgewachsene Tiere gleichzeitig auf das Rotarod aufgesetzt und untersucht werden.

Das Rotarod erlaubt eine stufenlose Erhöhung der Umdrehungszahlen zwischen 0 und 50 U/min. Die Rotationsgeschwindigkeit kann mit Hilfe eines Drehzahlmessers (RC 200, Fa. Conrad, Hirschau, Deutschland) exakt eingestellt werden.

Von oben wird das Rotarod durch eine Plexiglasscheibe abgedeckt, die mit einem Scharniergelenk versehen ist, so dass die Tiere bei hochgestellter Scheibe bequem von oben abgesetzt werden können. Während des Tests bleibt die Plexiglasscheibe über dem rotierenden Zylinder, da so das Abspringen der Mäuse in Richtung der Geräteumwandung verhindert werden kann.

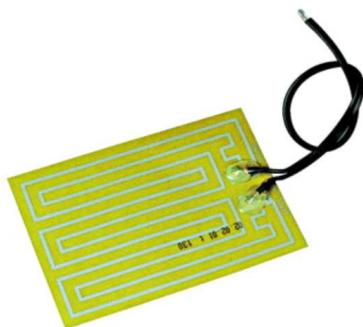
Zusätzlich wurden weitere Utensilien zur Durchführung des SHIRPA-NP bereitgestellt und vorbereitet. Diese finden sich in Tab. 3.2 auf der nächsten Seite, die eine Auflistung des benötigten Equipments enthält.

Tabelle 3.2: Benötigte Ausstattung zur Durchführung des SHIRPA-NP-Protokolls.

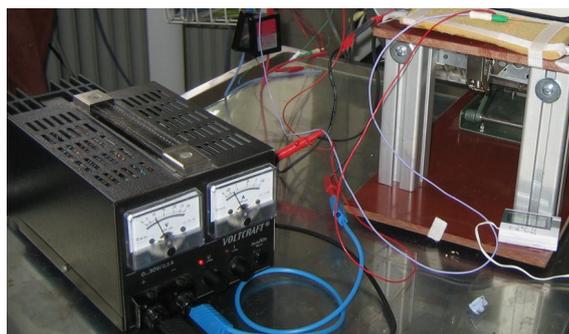
Gegenstand	Beschreibung
Plexiglas-Arena	mit einer inneren Ausmessung von 55 x 33 x 18 cm; die Bodenfläche wurde durch Linien in 15 Quadrate mit je 11 cm Kantenlänge eingeteilt
1. Plexiglas-Zylinder	mit einem Durchmesser von ca. 11 cm und einer Höhe von 15 cm
Gitter	mit Ausmaßen von 40 x 20 cm und einem Stegabstand von 12 mm
2. Plexiglas-Zylinder	mit einem inneren Durchmesser von 4 cm
Horizontaler Draht	mit 3 mm Durchmesser in 30 cm Höhe über einer Bodenpolsterung
Rotarod	ein stufenlos regulierbarer, rotierender Holm (0–50 U/min) mit einem Durchmesser von 4 cm, griffiger, desinfizierbarer Oberfläche, in einer Höhe von 25 cm über einer Bodenpolsterung
Zusätzliche Gerätschaften: Pinzette; Stoppuhr; Blech-Knacker zur Erzeugung eines Klicktons; Briefwaage; Maßband	

Zum Anästhesie-Monitoring

Für die Experimente wurde eine stufenlos steuerbare Heizfolie verwendet (Heizfolie, 135 mm x 170 mm 24 Volt (V), CA 17 Watt (W); thermo, Flächenheizungs GmbH, Rohrbach, Deutschland) (Abb. 3.7a), die ein Auskühlen der Tiere während der Anästhesiephase verhinderte. Die 12 W-Heizfolie wurde dazu auf den Objektisch aufgeklebt und mit einem regelbaren Netzteil betrieben.



(a) Heizfolie



(b) Netzgerät

Abbildung 3.7: Heizfolie und Netzgerät zur Temperaturregulation (bereitgestellt durch den Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für medizinische Elektronik, TU München).

Bei der Heizfolie handelt es sich um eine selbstklebende Folie aus Polyester mit den Ausmaßen von 110 mm x 77 mm. Laut Hersteller ist sie spleiß- und durchschlagsicher und weist höchste Sicherheits- und Leistungsqualität auf. Zur Kontrolle der Folientemperatur wurde ein

Multimeter mit Temperatursensor verwendet.

Um einen direkten Kontakt zwischen Heizfolie und Maus zu vermeiden, wurde die Heizfolie mit einer etwa 1 cm dicken Schwammschicht abgedeckt.

Abbildung 3.7b auf der vorherigen Seite zeigt die Verbindung der Heizfolie (auf dem Objektisch) mit einem regulierbaren Netzgerät (Fa. Voltcraft[®], Hirschau, Deutschland), welches ein stufenloses Erhöhen oder Senken der Temperatur erlaubt.

Zur Magnetstimulation

Für eine punktgenaue Positionierung der Magnetspule über dem gewünschten anatomischen Areal wurde eine speziell angefertigte Spulenhaltung geplant und in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Weyh konstruiert.

Es wurde dazu ein Aufbau konzipiert, der in allen drei Richtungen des Raumes verstellbar ist.

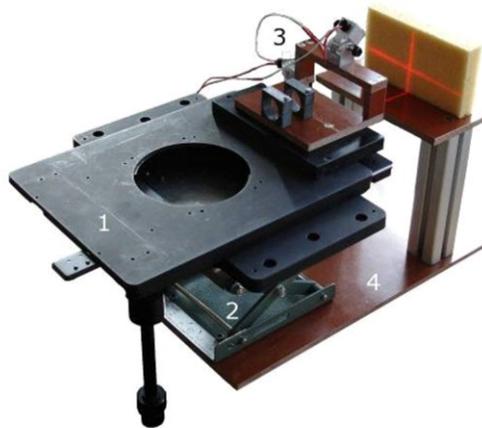


Abbildung 3.8: Laserzielsystem zur Stimulationspunktbestimmung. 1 = Mikroskopisch; 2 = Labor-Hebevorrichtung; 3 = Spulenhaltung und Linienlaserkonstruktion; 4 = Standfuß des Aufbaus (konstruiert von Florian Helling, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für medizinische Elektronik, TU München).

Die seitliche Beweglichkeit und das Verschieben in Richtung des Objektisches ist durch einen Mikroskop-Tisch (Abb. 3.8) gewährleistet, der auf eine Labor-Hebevorrichtung montiert ist, welche eine zusätzliche Höhenregulation ermöglicht.

Zur Ausrichtung der Spule dient ein optisches Laserzielsystem, das aus zwei Linienlasermodulen (Typ OLP-503 PL, Fa. Conrad, Hirschau, Deutschland) besteht, wovon das eine Modul vertikal, das andere horizontal ausgerichtet ist.

Der Schnittpunkt der beiden Linien kennzeichnet den Punkt höchster Feldstärke der Spule und stellt somit den gewünschten Stimulationspunkt dar. Abbildung 3.9 auf der nächsten Seite zeigt die in die Zielvorrichtung eingespannte Spule mit den beiden Linienlasermodulen.

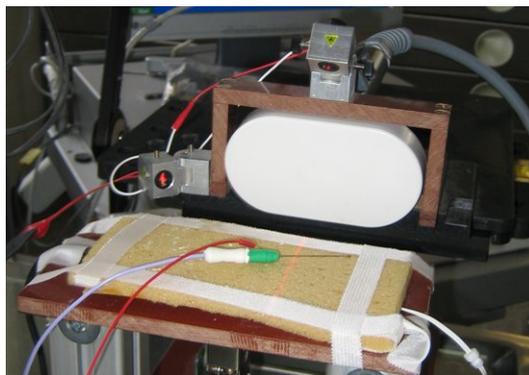


Abbildung 3.9: Zielvorrichtung mit eingespannter Stimulationsspule (konstruiert von Florian Helling, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für medizinische Elektronik, TU München).

Mit Hilfe dieses Aufbaus ist die punktgenaue Positionierung des Fokuspunktes der Spule aus einer Distanz von bis zu 10 cm möglich. Durch das stufenlose Verschieben der Spule kann die Ausrichtung des gewählten Stimulationspunktes an die individuelle Positionierung des Tieres angepasst werden.

3.3.2 Haltung der Tiere

Alle Mäuse entstammten der Haltungszucht des Institutes für Tierpathologie, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie, LMU München.

Die Tiere wurden in Makrolon Typ III Käfigen in Gruppen von bis zu vier Tieren untergebracht und erhielten freien Zugang zu Futter und Wasser. Eine Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und ein Licht-Dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden wurden beibehalten.

Tiere im Versuch wurden in Filter-Top-Käfigen untergebracht, um das Infektionsrisiko zu minimieren.

3.3.3 Anästhesie und Monitoring

Alle injizierbaren Anästhetika wurden intraperitoneal verabreicht, während die entsprechenden Antagonisten subkutan appliziert wurden (Henke und Erhardt, 2004).

Die Inhalations-Anästhesien wurden über eine Nasenmaske aufrechterhalten, nachdem die Narkose in einer speziell entwickelten Körperkammer eingeleitet wurde. Die aktuelle Konzentration des Narkosegases in der Nasenkammer wurde über eine Datex-Ohmeda Monitoring Einheit (Anandic Medical Systems AG, Schweiz) beständig wiedergegeben.

Während der Narkose wurden die Mäuse auf der stufenlos regulierbaren Heizfolie positioniert und ihre Körpertemperatur durchgängig über eine rektal applizierte Sonde überwacht (Philips 21076 A, Philips Medical Systems GmbH, Deutschland).

Jede Maus erhielt zusätzlich ein subkutanes Flüssigkeitsdepot mit körperwarmer Ringer-Laktat-Lösung und ihnen wurde Augensalbe auf die Augen aufgebracht, um ein Austrocknen der Kornea zu verhindern.

Das Zeitintervall zwischen der Injektion der Medikamente bzw. dem Verschließen der Körperkammer und dem Verlust des Aufrichtreflexes wurde notiert.

Der Verlust des Aufrichtreflexes wurde anhand des Contact Righting-Tests überprüft, beschrieben in Tab. 3.3 auf Seite 54. Zu diesem Zweck wurde das anästhesierte Tier auf den Rücken gedreht. Die Aufrichtreaktion wurde als fehlend definiert, wenn die Maus keinerlei Versuche mehr unternahm sich aufzurichten (Arras et al., 2001).

War auch nach Ablauf von 15 min post injectionem die Aufrichtreaktion erhalten, wurde eine zusätzliche Menge von 1/3 der initialen Dosierung der Injektionsanästhetika verabreicht (Henke und Erhardt, 2004), um eine vergleichbare Narkosetiefe unter den untersuchten Tieren zu gewährleisten. Der erreichte Anästhesie-Status wurde mit Hilfe des Rückzieh-Reflexes beurteilt. Nur ein deutlicher Versuch die Hintergliedmaße anzuziehen wurde als positive Reaktion definiert (Arras et al., 2001).

3.3.4 Magnetstimulation

Die Magnetstimulation wurde mit einem 2 T-Magnetstimulator (PowerMAG 30, MAG & More GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Alle Tests wurden mit Hilfe einer neuartigen Aichterspule, die in gemeinsamen Vorversuchen durch die Arbeitsgruppe Weyh konstruiert wurde und inzwischen vertrieben wird (Präzisionsspule 510518, Fa. MAG & More GmbH, München, Deutschland), vorgenommen.

Eine Einzelreizstimulation mit negativer Vollwelle, d.h. ein negativer, biphasischer, sinusoidaler Impuls wurde gewählt und in allen Teiluntersuchungen verwendet.

3.3.5 Elektrophysiologische Ableitungen

Alle elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Fischer in der Abteilung für Neurologie der Medizinischen Kleintierklinik München durchgeführt. Elektrophysiologische Ableitungen konnten an einem Elektromyographen (Nicolet S 403 and Viking Select 8.1 software; VIASYS Healthcare GmbH, Höchberg, Deutschland) durchgeführt und die MMEPs durch eine bipolare, wiederverwendbare, rostfreie Edelstahl-Nadelelektrode (0.6 mm Durchmesser, VIASYS Healthcare GmbH, Höchberg, Deutschland) abgeleitet werden. Die Ableitelektrode wurde intramuskulär im M. gastrocnemius angebracht (Luft et al., 2001).

Zusätzlich diente eine Elektrode zwischen Stimulationspunkt und peripherer Ableitelek-

trode der Erdung (Hopf et al., 1996), wodurch das Einwirken von Störpotentialen am Elektromyographen reduziert wird.

Zur Beurteilung der aufgezeichneten motorischen Potentiale wurden sowohl die Start-Latenz als auch die Potential-Amplitude herangezogen. Die Messung der Start-Latenz erfolgte anhand des Zeitintervalls zwischen Stimulusartefakt und erster Abweichung von der Grundlinie. Die Amplituden wurden als Spannungsunterschied zwischen höchster negativer und tiefster positiver Abweichung gewertet (Van Ham et al., 1994; Zhang et al., 2007b).

Zur Validierung der Potentialableitungen wurde an einer Maus eine supravitale Magnetstimulation am durchtrennten Rückenmark durchgeführt. Dazu wurde der Maus, die aus nicht mit dem Projekt in Zusammenhang stehenden Gründen euthanasiert wurde, das Rückenmark zwischen Zervikal- und Lumbalintumeszenz scharf durchtrennt. Nach Separierung der Schnittenden um 3 mm wurden rostral der Durchtrennung innerhalb von 10 min nach Exitus letalis Magnetimpulse von 75% der Stimulorkapazität appliziert. Dabei war weder bei transkranieller Stimulation noch bei Stimulation des Rückenmarks die Ableitung eines MMEPs am *M. gastrocnemius* möglich. Damit ist nachgewiesen, dass keine Weiterleitung der evozierten Potentiale über Muskeln und umgebendes Gewebe hervorgerufen wurde.

3.3.6 Statistische Beurteilung

Die statistische Bewertung erfolgte mit Hilfe der SPSS- (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) und Past-Software (Hammer et al., 2001). Amplituden und Latenzen jedes Tieres, jedes anästhetischen Protokolls, Stimulationsortes oder Zeitpunktes wurden involviert. Als biometrische Auswertverfahren und Verteilungsannahmen wurden die Mittelwerte für gepaarte Stichproben verglichen.

Mit dem Shapiro-Wilk (Sachs, 2004) wurden die kontinuierlichen Parameter auf Abweichungen von der Normalverteilung ausgewertet und, falls dieser Test nicht ablehnte, Normalverteilung angenommen.

Als optimaler Test zum Vergleich von normalverteilten Mittelwertsdifferenzen für gepaarte Stichproben wurde der T-Test ausgewählt. Die entsprechenden Daten wurden zudem einem one-way ANOVA unterzogen. Dabei wurden die Parameter aller drei durchgeführten Messungen pro Durchlauf ungemittelt integriert (Sachs, 2004).

Für die Wahrscheinlichkeit des Fehlers 1. Art wird, da in der Untersuchung keine gegen teiligen Gründe erkennbar sind, $\alpha=0,05$ (zweiseitig) gewählt. Sind mit einem Datensatz n Tests durchzuführen, so wird $\alpha_V=\alpha/n=0,05/n$ zugrunde gelegt (Bonferonisierung); z.B. für $n=2$ Tests, $\alpha_B=\alpha/2=0,05/2=0,025$. Die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art wird auf $\beta=0,02$ festgelegt. Das entspricht einer statistischen Trennschärfe ($\text{Power}=1-\beta$) von 0,08.

3.4 Experimentelles Vorgehen für den Hund

3.4.1 Technische Vorarbeiten

Ein speziell entwickelter Kraftaufnehmer wurde zur Messung der entwickelten Kontraktionen angefertigt (Abb. 3.10).

Für die Konstruktion des Kraftaufnehmers wurde ein Biegebalkenkraftsensor (Burster Präzisionstechnik GmbH & Co. KG; Typ 8511) zwischen zwei Aluminiumschienen fixiert. Dieser Aufbau wurde durch ein stufenlos verstellbares und arretierbares Gelenk mit einer weiteren Aluminiumplatte verbunden, wodurch eine frei wählbare Winkelung des Kraftaufnehmers möglich wurde.

Zur ergonomischen Gestaltung des Aufbaus wurden Kunststoffschienen an den Aluminiumschienen befestigt, die ursprünglich zur temporären Stabilisierung von Knochenbrüchen eingesetzt werden.

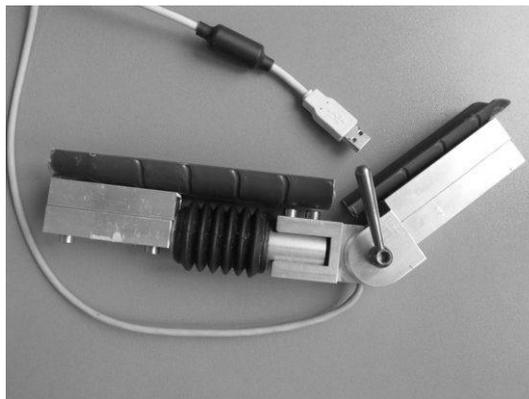


Abbildung 3.10: Speziell angefertigter Kraftaufnehmer mit integrierter USB-Schnittstelle (konstruiert von Florian Helling, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für medizinische Elektronik, TU München).

Damit das System an verschiedene Tiere, Gelenke und Größen angepasst werden kann, wurden die Kunststoffschienen und Aluminiumschienen ausschließlich verschraubt, so dass zur Änderung des Aufbaus Schienen anderer Größe montiert werden können.

Der Biegebalken basiert auf DMS-Technik, bei der mittels **Dehnungsmessstreifen** die Kraft gemessen werden kann. Dieser wird über eine USB-Schnittstelle (Typ 9205, Burster Präzisionsmesstechnik GmbH & Co. KG, Gernsbach, Deutschland) mit einem Computer verbunden. Diese Schnittstelle ermöglicht die kontinuierliche Aufzeichnung der Kraft, die auf den Sensor ausgeübt wird. Über die entsprechende Software wurden die Daten automatisch in einer Excel[®]-Tabelle abgespeichert, wodurch diese später unproblematisch weiter verarbeitet und graphisch dargestellt werden konnten.

3.4.2 Haltung der Tiere

Die Kraftmessung mit Hilfe der Magnetimpulse wurde an zehn Tieren aus dem Hundestall des Helmholtz Zentrums München durchgeführt (Abteilung für Vergleichende Medizin, Neuherberg, Leitung: Prof. J. Schmidt).

Alle Tiere waren in Gruppen von bis zu vier Hunden des gleichen Wurfs und Geschlechts untergebracht. Während des Experimentes blieben die Tiere in ihrer vertrauten Gruppenzusammensetzung.

3.4.3 Anästhesie und Monitoring

Zunächst wurde jedem Tier über eine subkutane Injektion Atropin (0.02 mg/kg; Atropinsulfat, Braun Melsungen AG, Melsungen), Acepromazin (0.02 mg/kg Vetranquil 1%, Albrecht GmbH & Co KG, Aulendorf) und Butorphanol (0.2 mg/kg; Torbugesic, Fort Dodge Veterinär GmbH, Würselen) verabreicht. Dreißig Minuten nach dieser Vorsedierung erhielten die Tiere einen Venenverweilkatheter (Vasofix Braunüle, 20G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen), über den für die Dauer des Experimentes Ringer-Laktatlösung (10 ml/kg Körpergewicht je Stunde) verabreicht wurde. Dann erfolgte die Narkoseeinleitung durch einen intravenösen Propofol-Bolus (3 mg/kg, Narcofol, CP Pharma GmbH, Burgdorf) und eine Intubation. Zusätzlich wurde in beide Augen ein Augengel aufgetragen (Vidisic, Dr. Mann Pharma und Bausch & Lomb GmbH, Berlin). Für die Dauer der gesamten Untersuchung waren die Tiere an ein geschlossenes Anästhesie-Gerät mit Isofluran (Isofluran CP, CP Pharma GmbH, Burgdorf) angeschlossen (Einleitung 2,5%, danach Reduktion nach Wirkung). Während des Experiments wurden die Vitalparameter Atmung, Temperatur, Herzfrequenz, Puls und Sauerstoffsättigung des Blutes überwacht. Eine regelmäßige Überprüfung des Lidreflexes wurde durchgeführt, um die Narkosetiefe der Tiere beurteilen zu können.

Nach Lagerung des Hundes auf der linken Körperseite ist auf eine freie Beweglichkeit der oben liegenden Gliedmaßen geachtet worden.

3.4.4 Magnetstimulation

Die MS wurde mit Hilfe einer handelsüblichen Achterspule durchgeführt (Doppelspule 510519, 19.6 cm x 9.94 cm; MAG & More GmbH, München, Deutschland), welche mit einem Prototyp zur Burststimulation verbunden war (durch den Heinz-Nixdorf Lehrstuhl für medizinische Elektronik, TU München, zur Verfügung gestellt). Es wurde eine repetitive Stimulation mit einer Frequenz von 7,5 Hz durchgeführt. Dazu wurden sechs verschiedene Stimulationsprotokolle miteinander verglichen.

3.4.5 Kraftmessung

Die USB-Schnittstelle des Kraftaufnehmers ermöglichte die kontinuierliche Aufzeichnung der Kraft, die auf den Sensor ausgeübt wurde. Über die entsprechende Software wurden die Daten automatisch in einer Excel[®]-Tabellen abgespeichert und später weiter verarbeitet und graphisch dargestellt.

3.4.6 Statistische Beurteilung

Aufgrund unabhängig variierender Einflussgrößen zwischen verschiedenen Hunden wurde eine quadratische Normierung durchgeführt, die einen statistischen Vergleich zwischen den erhobenen Daten ermöglichte.

Die statistische Analyse beinhaltete eine Wahrscheinlichkeitsberechnung auf Basis eines Shapiro-Wilk-Tests. Multiple paarweise Vergleiche wurden mittels Kruskal-Wallis und Bonferroni-korrigierten Mann-Whitney-Tests durchgeführt.

Ein Chi-Quadrat-Algorithmus wurde zur Beurteilung der Verteilung von min./max. Werten angewendet. Der Zusammenhang zwischen Muskelkraft und Latenz wurde durch den Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten berechnet. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

Zusätzlich wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt, basierend auf der Minimierung der kleinsten quadratischen Abweichung, um einen Trend innerhalb des Datensatzes feststellen zu können. Außerdem wurde eine Korrelations- und Varianzanalyse für jedes der Tiere anhand der Regressionskurve durchgeführt.

3.5 Versuchsdurchführungen zur Magnetstimulation an der Maus

3.5.1 Festlegung der Stimulusintensität

Zunächst wurden Tests zur Festlegung einer supramaximalen Stimulusintensität zur spinalen Magnetstimulation vorgenommen. Diese Form der Stimulation wird in der Literatur empfohlen, um eine möglichst stabile Potentialableitung zu gewährleisten (Rossini et al., 1999).

Ausgehend von einer Reizstärke mit 10% wurde diese in 5% -Schritten gesteigert, bis keine weitere Amplitudenvergrößerung am abgeleiteten motorischen Potential mehr hervorgerufen werden konnte. Die entsprechende Stimulationsintensität wurde dann als maximal bezeichnet. Die Erhöhung dieses Wertes um weitere 5% der Stimulorkapazität garantierte eine supramaximale Reizapplikation.

Die damit festgelegte Stimulorkapazität wurde für alle Untersuchungen an der Maus beibehalten.

3.5.2 Phänotypisierung durch SHIRPA-NP

Alle zur experimentellen Magnetstimulation eingesetzten Mäuse durchliefen das für den Versuch modifizierte SHIRPA-Protokoll (Rogers et al., 1997), so dass vor Versuchsbeginn eine Funktionsstörung des neuromuskulären Systems ausgeschlossen werden konnte.

Alle Untersuchungen wurden objektiv durchgeführt und kein Befund erwartet oder voreingenommen betrachtet (Schneider et al., 2006).

Die Durchführung des SHIRPA-NP basiert auf einem Scoring-System, dessen semiquantitative Beurteilung der Einzeltests in Tab. 3.3 aufgeführt ist. Zusätzlich wird in dieser Tabelle das Vorgehen für die einzelnen Tests beschrieben.

Tabelle 3.3: Durchführung des SHIRPA-NP-Protokolls.

Gebiet	Testname	Scoring	Durchführung
	Körpergewicht	Gewicht [g]	Wiegen der Tiere auf einer 0,01 g genauen Briefwaage
	Körperlänge	Länge [cm]	Messen von Nase bis Schwanzansatz
Hands off			
 <p>Beobachten des Tieres im Glaszylinder für die Dauer von zwei Minuten</p>	Körperstellung	0 = komplett flach 1 = auf der Seite liegend 2 = niedergestreckt 3 = sitzend od. stehend 4 = auf Hinterbeinen stehend 5 = wiederholtes Hochspringen	Der Wert, der die höchste Aktivität angibt, die das Tier im Zeitraum der Beobachtung gezeigt hat, wird notiert
	Spontane Aktivität	0 = keine 1 = ggl. Kratzen, Pflegen, langsame Bewegungen 2 = heftiges Kratzen, Pflegen, mäßige Bewegungen 3 = heftiges, schnelles Bewegen 4 = extr. heftiges, schnelles, vorschießendes Bewegen	Der Wert, der die höchste Aktivität angibt, die das Tier im Zeitraum der Beobachtung gezeigt hat, wird notiert

Tabelle 3.3: Durchführung des SHIRPA-NP-Protokolls... Fortsetzung.

Gebiet	Testname	Scoring	Durchführung
	Atemfrequenz	0 = keuchend, schnappend 1 = flach, langsam 2 = normal 3 = Hyperventilieren	Physiologischer Grundwert für die Atemfrequenz der Maus: 100–160 mal pro Minute
	Ruhtremor	0 = keiner 1 = mild 2 = deutlich	Ein gesundes Tier zeigt weder bei gezielter Bewegung noch in Ruhe einen Tremor
	Defäkation/ Urinieren	0 = nein 1 = Urinieren 2 = Kotabsatz	Kot- und Urinabsatz wird über die gesamte Dauer der Untersuchungen notiert
Überführen des Tieres in die Arena: Das Tier bleibt dazu zunächst im Glaszylinder und wird rutschend aus dem Zylinder in die Arena entlassen	Transfererregung	0 = Koma 1 = lang andauernde Starre, dann sachte Bewegung 2 = ausgedehnte Starre, dann mäßige Bewegung 3 = kurze Starre (einige Sek.), dann aktive Bewegung 4 = momentane Starre, dann eilige Bewegung 5 = extrem aufgeregt	Gesunde Tiere verharren kurz und beginnen dann eilig die Arena zu erkunden
	Bewegungsaktivität	Zahl der überquerten Felder	Die Zahl der überquerten Felder wird 30 s lang gezählt (Feld gilt als überquert, wenn die Hinterbeine eine von zwei bewerteten Linien eines Quadrates überschritten haben)

Tabelle 3.3: Durchführung des SHIRPA-NP-Protokolls... Fortsetzung.

Gebiet	Testname	Scoring	Durchführung
Beobachten des Tieres bei der freien Bewegung innerhalb der Arena für einen Zeitraum von etwa zwei Minuten	Bein-spreizen	0 = kein Spreizen 1 = spreizt die Beine kurz, einzelne Vorkommen je Bewegungseinheit 2 = wiederholtes Spreizen in schneller Folge, während einer oder mehrerer Bewegungsperioden, läuft dennoch auf gerader Linie 3 = konstantes Spreizen mit eingeschränkter Koordination (Kreislaufen) 4 = konstantes Spreizen mit erfolgreichen Bewegungsversuchen 5 = konstantes Spreizen, keine Bewegungsversuche	Es wird beobachtet, ob die Vorder- oder Hinterextremitäten abgespreizt werden. Dies gibt Hinweise auf Parese, Paralysen oder Muskelspasmen
	Schwanken	0 = kein Schwanken erkennbar 1 = schwankt im Sitzen oder in Bewegung 2 = schwankt und fällt (mind. zwei Gliedmaßen sind vom Boden abgehoben) 3 = fällt von einer Seite auf die andere, sobald sie sich fortbewegt 4 = fällt auf die Seite und kann nicht mehr aufstehen	
	Nasenposition	0 = keine Auffälligkeiten 1 = unfähig den Kopf beim Gehen anzuheben, schleift oft mit den Zähnen auf dem Boden	
	Bauchschleifen	0 = normal 1 = trägt das Körpergewicht während des Gehens auf dem Abdomen statt mit den Gliedmaßen	
	Schreckreaktion	0 = keine 1 = Beutereflex (weit od. hoch) 2 = Sprung < 1 cm 3 = Sprung > 1 cm	Während des freien Bewegens in der Arena wird ein Klickton abgegeben und die Reaktion der Maus darauf beobachtet

Tabelle 3.3: Durchführung des SHIRPA-NP-Protokolls... Fortsetzung.

Gebiet	Testname	Scoring	Durchführung
	Gang	0 = normal 1 = flüssig, aber anormal 2 = nur eingeschränkte Bewegungen	
	Rückenlinie	0 = normal 1 = kyphotisch/lordotisch	
	Hüfthöhe	0 = merklich abgeflacht 1 = kaum berührend 2 = normal (3 mm angehoben) 3 = übermäßig angehoben (über 3 mm)	
	Schwanzposition	0 = hinter sich herschleifend 1 = horizontal getragen 2 = hoch erhoben	
	Berührungsreaktion	0 = keine Reaktion 1 = mild (Reaktion erst auf starken Stups) 2 = mäßig (schnelle Antwort auf sanften Stups) 3 = stark (Flucht bei Annäherung)	Die Maus wird von oben kommend mit dem Finger im Bereich des Kopfes angetippt
	Plantigrades Füßen	0 = normales Füßen 1 = plantigrades Füßen	
Hands on			
Maus wird an der Schwanzbasis gegriffen und aus der Arena herausgehoben und kurz in einer Höhe von ca. 30 cm gehalten	Handling-Reaktion	0 = strampelt bei Halten am Schwanz 1 = strampelt bei Halten im Genick 2 = strampelt, in Rückenlage 3 = strampelt bei Halten an den Hinterbeinen 4 = kein Strampeln	
	Körperrotation	0 = keine 1 = vorhanden	Ca. 10% der Tiere versuchen sich um die eigene Achse zu drehen
	Anziehen der Gliedmaßen	0 = keines 1 = vorhanden	Es wird beobachtet, ob das Tier die Beine nach hinten abspreizt oder sie verkrampft am Körper angezogen bleiben

Tabelle 3.3: Durchführung des SHIRPA-NP-Protokolls... Fortsetzung.

Gebiet	Testname	Scoring	Durchführung
 <p>Maus wird langsam auf das Gitter herabgesenkt</p>	Visuelle Positionierung	0 = keine 1 = ab Nasenkontakt 2 = ab Barthaarkontakt 3 = vor Barthaarkontakt (über 18 mm) 4 = frühe heftige Extension (25 mm)	Beim Absenken des Tieres wird beobachtet, ob es die Wirbelsäule durchstreckt, die Vordergliedmaßen nach vorne streckt und den Blick Richtung Gitter richtet
	Griffstärke	0 = keine 1 = leichter Griff 2 = mäßiger Griff, effektiv 3 = aktiver Griff, effektiv 4 = ungewöhnlich kräftig	Die Maus wird soweit abgelassen, dass die Vordergliedmaßen greifen können. Nun wird leichter Zug nach hinten und oben ausgeübt und beurteilt, mit welcher Stärke die Maus zurückzieht
 <p>Die Maus wird vollständig auf das Gitter abgesetzt und das Gitter um die Achse gedreht, so dass die Maus mit allen Vieren daran nach unten hängt</p>	Halten am Gitter	Zeit [s]	Der Zeitraum wird festgestellt, in dem sich das Tier am Gitter halten kann. Dabei wird 45 s lang gemessen, dann ist der Test beendet
Gitter wird langsam in die Senkrechte gebracht, so dass die Maus mit Blick nach unten sitzt	Negative Geotaxis	0 = dreht um und klettert nach oben 1 = dreht um und erstarrt 2 = bewegt sich, aber scheitert am Drehen 3 = bewegt sich innerhalb von 30 s nicht 4 = fällt herunter	Ein gesundes Tier dreht sich um und verharrt oder wandert nach oben

Tabelle 3.3: Durchführung des SHIRPA-NP-Protokolls... Fortsetzung.

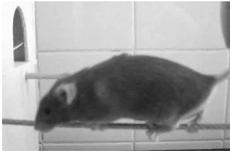
Gebiet	Testname	Scoring	Durchführung	
	Körper- spannung	0 = schlaff, kein Zurückkehren der Mulde zum Normalen 1 = leichter Widerstand 2 = extremer Widerstand, brettartig	Sanftes Eindrücken der Bauch- decke mit Daumen und Zeige- finger	
	Zehen- Kneifen	0 = nichts 1 = leichtes Zurückziehen 2 = mäßiges Rückziehen, nicht rasch 3 = rasches, schnelles Zurückziehen 4 = sehr rasches, wiederholtes Stre- cken und Beugen	Mit Hilfe der feinen Pinzet- te wird ein Zehenballen der Maus ergriffen und vorsichtig gezwickt	
Greifen der Maus im Genick	Hautfarbe	0 = bleich 1 = pink 2 = leuchtend rot	Die Hautfarbe der plantaren Fußflächen wird notiert	
	Glied- maßen- tonus	0 = kein Widerstand 1 = geringer Widerstand 2 = mäßiger Widerstand 3 = deutlicher Widerstand 4 = extremer Widerstand	Die Hintergliedmaßen werden gefasst und mehrmals gebeugt und gestreckt, um den Tonus zu beurteilen	
	Provoziertes Beißen	0 = nicht vorhanden 1 = vorhanden	Der Maus wird etwas zum Bei- ßen angeboten und ihre Ambiti- on zu beißen gewertet	
		Seil- Manöver	0 = Aktiver Griff mit den Hinterex- tremitäten 1 = Schwierigkeiten beim Greifen mit der H interextremität (HE) 2 = unfähig mit der HE zu greifen 3 = unfähig die HE anzuheben, fällt innerhalb weniger Sekunden 4 = fällt sofort hinunter	Die generelle Koordination des Tieres sowie die Fähigkeit, mit den einzelnen Gliedmaßen zu greifen, wird beobachtet
Absetzen der Maus auf einem Seil. Das Tier wird durch Fi- xation der Schwanz- basis unterstützt		Contact Righting	0 = nicht vorhanden (krankhaft) 1 = vorhanden (physiologisch) 2 = verzögert	Der Zylinder wird schwingvoll um die Achse rotiert, so dass die Maus kurzzeitig den „Boden unter den Füßen verliert“. Die Zeit bis zum Aufrichten wird gewertet
Maus soll in einen schmalen Plexiglas- zylinder krabbeln				

Tabelle 3.3: Durchführung des SHIRPA-NP-Protokolls... Fortsetzung.

Gebiet	Testname	Scoring	Durchführung
	Verzögerung des Contact Rightings	Zeit [s]	Die Zeit wird registriert, die vergeht, bis die Maus wieder auf allen Vieren sitzt oder steht. Dies sollte beim gesunden Tier prompt erfolgen
Zusätzliche Notizen	Reizbarkeit	0 = keine 1 = strampelt in Rückenzwangslage	Die generelle Aggressivität wird notiert, die das Tier im Lauf der Untersuchungen zeigt
	Vokalisation	0 = keine 1 = provoziert während des Handlings	Über die Dauer aller Untersuchungen wird notiert, wenn das Tier Laute von sich gibt
Aufsetzen des Tieres auf einen rotierenden Holm	Rotarod	Zeit [s]	Die Maus wird je drei Mal auf den mit 10 U/min rotierenden Holm aufgesetzt. Die Zeit wird jeweils gemessen und die längste Dauer, die das Tier auf dem Holm lief, wird gewertet

Zwischen den SHIRPA-NP-Durchläufen mit unterschiedlichen Tieren wurden alle Gegenstände von Kot und Urin gereinigt und desinfiziert, um eine Beeinflussung des Folgetieres durch die verbliebenen Gerüche zu verhindern.

Zur Auswertung und Beurteilung der erhobenen Daten wurden bestehende Referenzwerte für den C57BL/6-Stamm herangezogen (Rogers et al., 1999; Schneider et al., 2006).

Tiere, deren semiquantitative Beurteilung in Tests zur neuromuskulären Funktion zusammenfassend als abweichend von Normal- oder Referenzwerten gewertet wurden, sind von den weiteren Untersuchungen zur Magnetstimulation an der Maus ausgeschlossen worden.

3.5.3 Bestimmung der Magnetfeldausdehnung

Untersucht wurde die Ausdehnung des Magnetfeldes der Achterspule, die kürzlich in der Arbeitsgruppe Weyh (Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München) entwickelt wurde und inzwischen kommerziell vertrieben wird (Typ 510518, MAG & More GmbH, München, Deutschland) (Wendicke, 2006).

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen sind zur Überprüfung der Daten durchgeführt worden, die in aufwendigen numerischen Feldrechenprogrammen zu dieser Achter-

spule erhoben wurden.

Die an der Maus evozierten motorischen Potentiale wurden zur Bestimmung der Feldausdehnung im lebenden Gewebe herangezogen und damit eine entsprechend angepasste Anwendung der Spule in folgenden Untersuchungen bei dieser Spezies vorgenommen.

Die Ausdehnung des Magnetfeldes, das heißt der Raum über der Stimulationsfläche der Spule, der noch eine Reizauslösung am stimulierten Gewebe ermöglicht, soll bestimmt werden. Als Effektivitätskriterium wurde die Auslösung von MMEPs nach spinaler Stimulation an der Maus gewählt. Die Magnetspule wurde über dem Rückenmark der Maus positioniert, ein Reiz appliziert und die ausgelösten Potentiale beurteilt.

Im Folgenden wurde die Spule schrittweise in alle drei Richtungen des Raums vom Rückenmark entfernt, um so ein dreidimensionales, effektives Areal zu bestimmen. Sobald eine Distanz erreicht wurde, in der keine MMEPs mehr auslösbar waren, wurde die Spule in die ursprüngliche Lage zurückgeführt und in einer neuen Richtung vom Rückenmark abgerückt.

Zusätzlich wurde im Laufe dieser Untersuchungen eine optimale Positionierung der Spule in Bezug auf Stimulusrichtung und Winkel zum gerade verlaufenden spinalen Gewebe bei der Maus festgelegt.

Untersuchte Tiere

Zwei phänotypisch nach SHIRPA-NP als neurologisch gesund beurteilte, männliche, ein Jahr alte C57BL/6-Mäuse durchliefen die Versuche zur Auswertung der Feldcharakteristika.

Anästhesie

Die Mäuse erhielten eine Anästhesie durch Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (Dosierung siehe Tab. 3.4 auf Seite 65). Die Anästhetika wurden intraperitoneal, die entsprechenden Antagonisten subkutan appliziert, um die negativen Effekte auf das Herz-Kreislauf-System zu reduzieren (Henke und Erhardt, 2004).

Magnetstimulation

Die Tests zur Dimensionsbestimmung wurden für die Präzisionsspule 510518 (MAG & More GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Diese besteht aus zwei asymmetrisch gewickelten Kupferspulen und weist eine Stimulationsfläche von 104 mm x 56 mm auf (Abb. 3.11 auf der nächsten Seite). Jede der zwei Spulenwindungen hat einen Durchmesser von 45 mm.

Das in aufwendigen numerischen Feldrechnungen als Bereich optimaler Depolarisation und höchster Tiefenreichweite beurteilte Areal wurde als Fokuspunkt definiert (Punkt A).

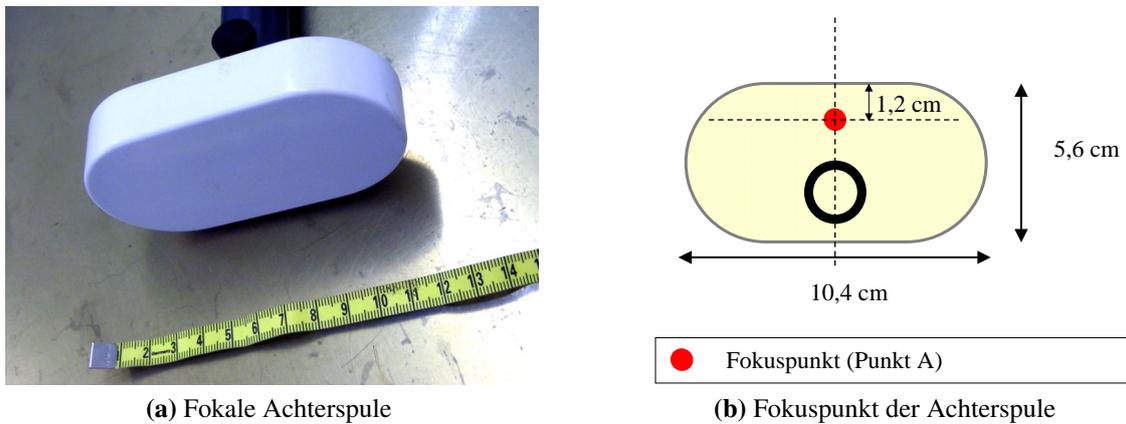


Abbildung 3.11: Fokale Achterspule mit erhobenem Bereich höchster Depolarisationskapazität.

Dieser befindet sich exakt 12 mm vom vorderen Rand der Spule entfernt, gegenüber des Haltegriffs der Spule (Wendicke, 2006) (Abb. 3.11b).

Zusätzlich zu diesem Punkt wurden mit zwei weiteren Spulenbereichen Stimulationen durchgeführt. Beide Punkte befanden sich ebenfalls in 12 mm Abstand zur Längskante der Spule. Punkt B lag genau auf der Hälfte der Kupferwindungen der Achterspule, Punkt C wurde an der Außenkante der Spule gewählt (siehe Abb. 3.12 auf der nächsten Seite).

Ausgehend von der Position 0 im Koordinatensystem wurde die Spule millimeterweise in der jeweiligen Richtung bewegt und in jeder Position wurden Einzelimpulse appliziert. Die Stimulation und Spulenbewegung wurden unterbrochen, sobald die abgeleiteten motorischen Potentiale keine auswertbare Amplitude mehr zeigten ($< 0,1$ mV).

In jeder Position der Spule wurde eine dreifache Stimulation durchgeführt und die erhobenen Einzelparameter ungemittelt in die Auswertungen einbezogen (Van Ham et al., 1994).

Felddimensionsbestimmung

Zur Beurteilung der seitlichen Ausdehnung des Feldes, der Feldwirksamkeit in der Tiefe und des Einflusses vom Rotationswinkel der Spule zum Rückenmark wurden die Mäuse in Sternallage gebracht.

Die Spule wurde mit der Stimulationsfläche parallel zur Tischplatte über der Maus fixiert. Der entsprechende Punkt der Spule (Punkt A, B oder C) wurde zu Beginn der jeweiligen Messungen über demselben Rückenmarkssegment (Th7) positioniert. Diese anatomische Region ist als Position 0 des Koordinatensystems definiert (Abb. 3.12 auf der nächsten Seite).

Während der Felddausdehnungs-Messungen blieb die Spule tangential und mit ihrer Längsseite parallel zur Rückenlinie der Maus (X-Achse) positioniert (Abb. 3.12 auf der nächsten Seite). Zur Beurteilung der unterschiedlichen Windungsbereiche der Kupferleiter wurde die

Spule mit den jeweiligen Punkten A, B und C über der Position 0 sowohl in X- als auch Y-Achsen-Richtung (im rechten Winkel zur X-Achse) bewegt.

Anschließend erfolgte die Beurteilung der Tiefenwirkung des Magnetfeldes anhand einer millimeterweisen Bewegung in der Z-Achse (Abb. 3.12).

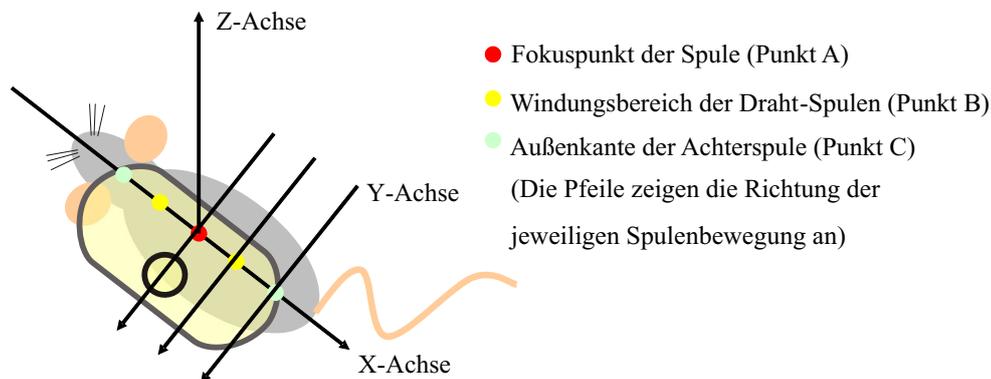


Abbildung 3.12: Schematisierte Darstellung der Ausgangsposition für Untersuchungen in latero-lateraler und kranio-kaudaler Richtung.

Seitliche Ausdehnung (Y-Achse) Zur Bewegung auf der horizontalen Ebene wurde eine Plexiglasplatte als Navigationshilfe verwendet, die mit einem Raster an Markierungslinien im 1 mm-Abstand gekennzeichnet war.

Nachdem Punkt A ausgehend von Position 0 in Y-Achsen-Richtung millimeterweise verschoben wurde, wurde die gleiche anatomische Lokalisation unter dem Zentrum jeder Spulenwindung (Punkt B) und im Folgenden entsprechend unter der jeweiligen Außenkante (Punkt C) der Spule positioniert und ebenfalls eine latero-laterale Bewegung in der Y-Achsenrichtung durchgeführt.

Tiefe des wirksamen Feldes (Z-Achse) Um die Tiefenwirksamkeit des Feldes unter der Spule zu beurteilen, wurde die Spule mit Hilfe eines millimeterweise verstellbaren Stativs in Z-Achsen-Richtung angehoben. Die Spule befand sich für die Dauer der Untersuchungen längsparallel zur Rückenlinie der Maus. Die Distanz wurde mit einer Schrittweite von jeweils einem Millimeter erhöht.

Beurteilung der Spulenausrichtungen

Ausgehend von der Startposition des Punktes A der Dimensionsuntersuchungen in X- und Y-Achsenrichtung wurde die Spule zunächst um neunzig Grad im Uhrzeigersinn gedreht. Diese Ausgangsposition ist im Versuch als 0°-Position definiert (Abb. 3.13 auf der nächsten Seite).

Um den Punkt der Stimulation während der Rotation beizubehalten, wurde die Maus um diesen Punkt herumgedreht. Dazu blieb das Rückenmarkssegment (Th7) der Maus direkt im

Zentrum einer kreisrunden Plexiglasscheibe positioniert. Diese Scheibe wies Gradkennzeichnungen auf und war um den zentralen Punkt frei drehbar.

Mit diesem Aufbau war gewährleistet, dass sich zwar der Winkel des elektrischen Feldes zum Rückenmark, nicht jedoch der generell stimulierte anatomische Punkt veränderte.

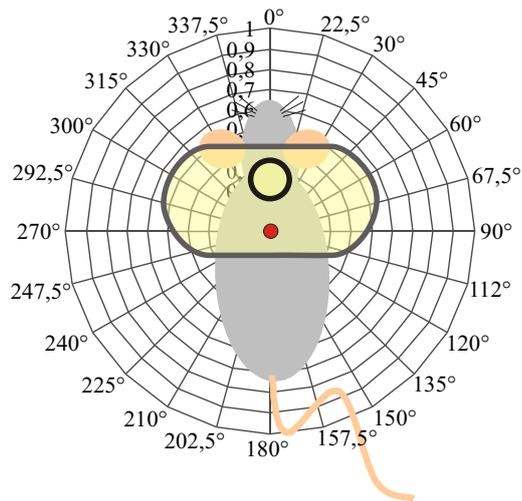


Abbildung 3.13: Schematisierte Darstellung der 0°-Position zur Rotations-Untersuchung.

3.5.4 Beurteilung von Anästhesieprotokollen

Der Einfluss von sieben verschiedenen experimentellen Anästhesie-Methoden der Maus auf die spinal ausgelösten magnetisch evozierten motorischen Potentiale wurde hier untersucht und die erhobenen Befunde mit Veröffentlichungen zum Einfluss verschiedener Anästhesien auf die transkraniell und spinal evozierten motorischen Potentiale verglichen (Van Ham et al., 1995; Ghaly et al., 2001; Borojerdi, 2002; Ziemann, 2004).

Zur Beurteilung der Anästhesien im Hinblick auf die Magnetstimulation an der Maus ist zudem das erreichte Narkosestadium der Anästhesie und ihre Nebenwirkungen berücksichtigt worden.

Untersuchte Tiere

Zehn nach SHIRPA-NP als phänotypisch gesund beurteilte, einjährige, männliche C57BL/6-Mäuse durchliefen sieben verschiedene Anästhesie-Protokolle mit einem Intervall von mindestens einer Woche.

Tiere, die während des Experiments starben, wurden durch Mäuse entsprechenden Alters und Geschlechts ersetzt. Diese durchliefen im Folgenden selbst alle ausgewählten Anästhesie-Formen.

Anästhesie-Protokolle

Die ausgewählten Protokolle beinhalten die Injektionsanästhesien:

1. **Medetomidin/Midazolam/Fentanyl (MMF)**
2. **Pentobarbital (PE)**
3. **Ketamin/Xylazin/Acepromazin (KXA)**
4. **Ketamin/Medetomidin (KM)**
5. **Ketamin/Xylazin (KX) und die Inhalationsanästhetika**
6. **Isofluran (ISO)**
7. **Sevofluran (SEV)**

Details zu den Anästhesie-Methoden und verwendeten Dosierungen sind in Tab. 3.4 aufgelistet und wurden anhand der Erfahrungswerte unserer Kollaboratoren und publizierter experimenteller Daten ausgewählt (Erhardt et al., 1984; Arras et al., 2001; Henke und Erhardt, 2004).

Tabelle 3.4: Verwendete Narkoseprotokolle mit entsprechender Dosierung der einzelnen Pharmaka inklusive möglicher Antagonisten. Dosierung in [mg/kg].

Protokoll	Medikament	Dosierung	Antagonist	Dosierung	Quelle
MMF	Medetomidin	0,5	Atipamezol	2,5	(Henke und Erhardt, 2004)
	Midazolam	5	Flumazenil	0,5	
	Fentanyl	0,05	Naloxon	1,2	
PE	Pentobarbital	50	/		(Erhardt et al., 1984)
KXA	Ketamin	100	/		(Arras et al., 2001)
	Xylazin	20	/		
	Acepromazin	3	/		
KX	Ketamin	100	/		(Arras et al., 2001)
	Xylazin	20	/		
KM	Ketamin	100	/		(Henke und Erhardt, 2004)
	Medetomidin	0,25	Atipamezol	1,25	
ISO	Isofluran	Einleitung: 5,0 Erhaltung: 2,1	/		(Henke und Erhardt, 2004)
SEV	Sevofluran	Einleitung: 6,0 Erhaltung: 4,3	/		(Henke, nicht publiziert)

Magnetstimulation

Basierend auf den zuvor erhobenen Daten zur Ausdehnung des effektiven Magnetfeldes wurden die Mäuse für die Magnetstimulation in rechte Seitenlage gebracht und das elektrische Feld im rechten Winkel zum stimulierten Gewebe orientiert.

Die Magnetspule wurde in direkten Kontakt mit der Maus und die längere Spulenseite parallel zur Wirbelsäule positioniert. Der Stromfluss innerhalb der Achterspule wurde, basierend auf den zuvor gemachten Beobachtungen zur Feldausdehnung, orthogonal zum Verlauf der langen Leitungsbahnen des Rückenmarks gerichtet und die Spulenfläche in direkten Kontakt zur Wirbelsäule gebracht. Jeder Impuls bestand aus einer negativen Vollwelle. Es wurden ausschließlich Einzelimpulse angewendet.

Es wurden je 10 (T_{10}) und 30 (T_{30}) Minuten nach Verlust der Aufrichtreaktion spinale Magnetstimulationen durchgeführt (Fishback et al., 1995). Zu beiden Zeitpunkten erfolgte eine dreimalige Magnetstimulation, um die Reproduzierbarkeit der MMEPs zu überprüfen (Van Ham et al., 1994).

3.5.5 Beurteilung verschiedener Stimulationspunkte

Untersuchte Tiere

Zehn nach SHIRPA-NP als phänotypisch gesund beurteilte, ein Jahr alte, männliche C57BL/6-Mäuse wurden transkranial und spinal magnetisch stimuliert.

Anästhesie

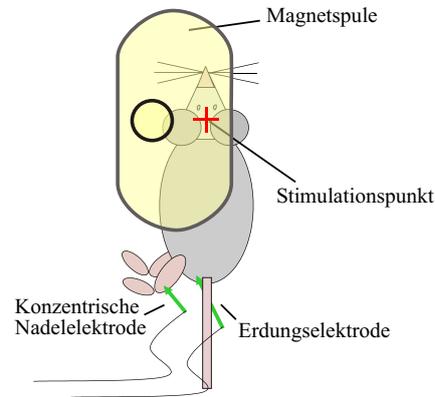
Die vorausgegangenen Untersuchungen zum Einsatz unterschiedlicher Anästhesien für die transkranielle und spinale Magnetstimulation an der Maus zeigten die gute Anwendbarkeit des Anästhesieregimes MMF für die Ableitung der MEPs in dieser Spezies.

Jedes Tier erhielt eine entsprechende Dosis der Tripel-Narkose aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl. Die Dosierung entspricht veröffentlichten Empfehlungen und ist in Tab. 3.4 auf der vorherigen Seite einzusehen.

Die Wirkung aller Anteile wurde nach Beenden der Magnetstimulationen durch subkutane Injektion des entsprechenden Antagonisten aufgehoben. Nach Verabreichung der Pharmaka Atipamezol, Flumazenil und Naloxon (Tab. 3.4 auf der vorherigen Seite) blieb das Tier bis zur selbständigen Futteraufnahme unter Beobachtung und Wärmezufuhr (Henke und Erhardt, 2004).



(a) Stimulationspunktwahl mittels Linienlaser



(b) Versuchsaufbau an der Maus

Abbildung 3.14: Transkranielle Stimulation nach Punktauswahl mit Linienlaser.

Magnetstimulation

Zur Beurteilung unterschiedlicher Stimulationspunkte zur TMS an der Maus wurde der errechnete und im Vorversuch bestätigte Fokuspunkt der Achterspule 510518 auf acht unterschiedlichen Punkten des Schädels und zusätzlich an einer Lokalisation im Verlauf der Wirbelsäule positioniert.

Alle stimulierten Areale sind anhand anatomischer Richtpunkte identifiziert worden und mit Hilfe der Zielvorrichtung erfolgte eine exakte Spulenausrichtung auf diese Punkte (Abb. 3.15 auf der nächsten Seite).

S1 befand sich median auf Höhe der lateralen Augenwinkel. S2 lag median auf halber Strecke zwischen lateralen Augenwinkeln und rostralen Ohrändern, S3 entsprechend median auf Höhe des kaudalen Ohransatzes. Die jeweils paramedian gewählten Punkte auf gleicher Höhe der Stimulationspunkte S2 und S3 lagen je zwei bis drei mm rechts und links der Medianen. S4 wurde am tiefsten Punkt der Wirbelsäule etwa auf Höhe des rostralen Schulterblattrandes des Tieres gewählt.

3.6 Versuchsdurchführung zur Magnetstimulation am Hund

3.6.1 Beurteilung unterschiedlicher Impulsformen zur Kraftentwicklung

Der nun folgende Teil der Arbeit befasst sich mit der Durchführung der Kraftmessung am Hund. Die aufgeführten Tests dienen der Beurteilung neuartiger Stimulusformen der

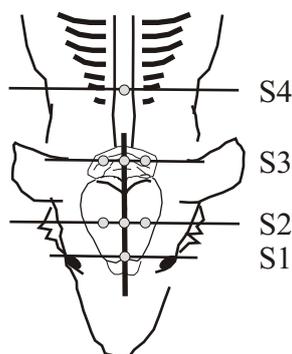


Abbildung 3.15: Transkranielle Stimulationspunkte und spinaler Stimulationspunkt.

Magnetstimulation.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Weyh (Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München) konnten neue Pulsformen realisiert werden, die erstmals magnetische Burst-Stimulation ermöglichen.

Die Untersuchungen am Hund zielen auf die Beurteilung der Effektivität dieser neuartigen Pulsformen ab. Dazu wurde ihre Wirkung auf die Kontraktion am M. quadriceps des Hundes untersucht und mit der herkömmlicher Einzelpulse verglichen.

3.6.2 Untersuchte Tiere

Alle Untersuchungen wurden an zehn neurologisch als gesund beurteilten, ausgewachsenen Beagle-Hunden beiderlei Geschlechter durchgeführt. Es handelte sich dabei um eine Hündin und neun Rüden.

3.6.3 Magnetstimulation

Zunächst erfolgte die optimale Positionierung der Achterspule (Doppelspule 510519, MAG & More GmbH, München, Deutschland) (Abb. 3.16) über dem M. quadriceps des Hundes.



Abbildung 3.16: Am Hund zur peripheren Magnetstimulation verwendete Achterspule.

Diese wurde anhand der sichtbaren Streckbewegung im Kniegelenk ausgewählt. Ein 3D-Schwenkarm-Spulenhalter ermöglichte die Beibehaltung der Spulenposition, an der die deutlichste Streckung des Beines erkennbar war. Dadurch konnte diese Position für alle Stimulationen beibehalten werden.

Burst- und Einzelimpulse wurden jeweils mit einer Frequenz von 7,5 Hz bei einer Intensität von 60% der Stimulorkapazität, entsprechend etwa 3,5 V, abgegeben. Diese Parameter sind im gesamten Experiment beibehalten worden.

Applizierte Pulswellen wurden unterschieden in Pulse mit Einzelwelle (EP) und in Zweifach- (ZBP), Dreifach- (DBP), Vierfach- (VBP), Fünffach- (FBP) und Sechsfach-Burst-Wellen (SBP).

Die Burst-Stimuli setzten sich aus zwei bis sechs aufeinander folgenden Sinuswellen zusammen, die eine Frequenz von 14 Kilohertz (kHz) aufwiesen. Eine einzelne Sinuswelle hatte eine Pulsdauer von 70 μs (Abb. 3.17).

Sobald die gemessenen **Krafteinheiten** (KE) über drei Sekunden keinen weiteren Kraftanstieg mehr aufzeigten, wurde die MS beendet.

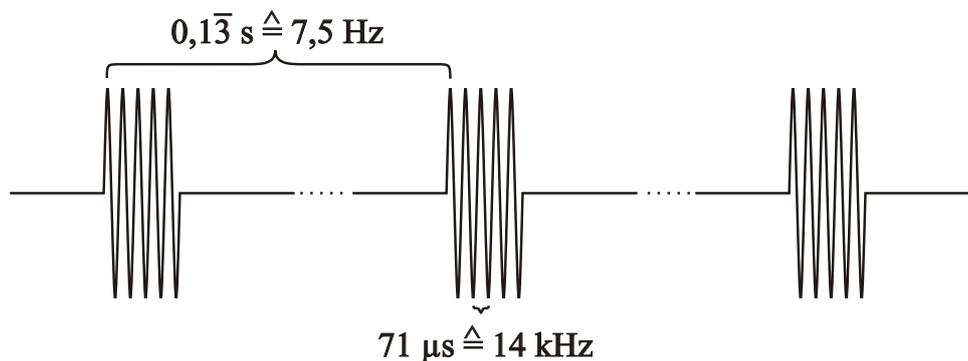


Abbildung 3.17: Schematisierte Darstellung eines Vierfach-Burst-Pulses abgegeben mit einer Frequenz von 7,5 Hz.

3.6.4 Kraftmessung

Mit Hilfe des Gelenkes mit arretierbarer Stellschraube im Sensor-Aufbau wurde das Kniegelenk in 120°-Beugung fixiert, so dass eine optimale Kraftübertragung durch den M. quadriceps gewährleistet wurde (Wiestner et al., 1992) (Abb. 3.18 auf der nächsten Seite).

Die Kontraktionen des M. quadriceps führten zu einer Spannungsveränderung innerhalb des Sensors, die proportional zur entwickelten Kraft war. Der Kraftsensor ermöglichte dabei die Messung der evozierten Kraft in KE. Diese wurden zeitgleich via USB-Schnittstelle auf den angeschlossenen Computer übertragen.

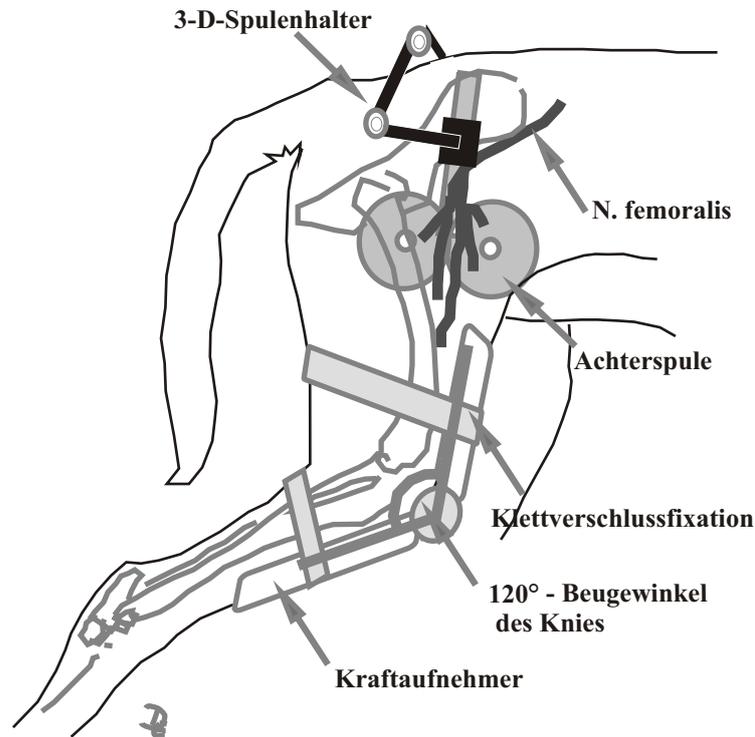


Abbildung 3.18: Versuchsaufbau zur Kraftmessung am Hund.

Die gewählte Messgenauigkeit betrug 100 Messungen pro Sekunde und alle erhobenen Daten konnten zeitgleich in Excel[®]-Tabellen aufgezeichnet und ausgewertet werden.

Beurteilte Parameter beinhalteten das maximal erreichte Drehmoment (KE_{max}), die Latenz bis zum Erreichen der höchsten Kontraktion (KE_{Lat}) und die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (KE_{Incl}).

KE_{max} wurde als das maximale Drehmoment definiert, das durch den M. quadriceps im Laufe eines Stimulus-Durchlaufs erreicht wurde. KE_{Lat} entsprach dem Zeitintervall in Sekunden, das zwischen dem initialen Magnetpuls und dem Erreichen der KE_{max} verging.

KE_{Incl} wurde errechnet aus dem Quotient von KE_{Lat} und KE_{max} in KE/s.

4 Ergebnisse

4.1 Transkranielle und spinale Magnetstimulation der Maus

4.1.1 Festlegung der Stimulusintensität

Um die Aktivierung einer maximalen Anzahl von Motoneuronen zu gewährleisten, wurde eine Erregung des Rückenmarks durchgeführt und die geeignete Stimulusintensität für kommende Untersuchungen ermittelt. Dabei wurde die Intensität zur Auslösung der maximalen MMEP-Amplitude bestimmt. Diese wurde nach der vorliegenden Untersuchung bei 70% der Stimulorkapazität erreicht. Mit dieser Stimulusintensität konnte eine durchschnittliche Amplitude von $8,91 \pm 3,34$ mV abgeleitet werden. Im Vergleich dazu waren bei 65% Stimulorkapazität nur durchschnittlich $5,33 \pm 2,27$ mV ableitbar.

Eine Steigerung um weitere 5% ergab keine weitere Amplitudenerhöhung. So lagen bei 75% Stimulorkapazität die Amplituden weiterhin bei durchschnittlich $8,66 \pm 3,1$ mV.

Daher wurde ein supramaximaler Stimulus von 75% der Stimulorkapazität ausgewählt und für alle weiteren Untersuchungen an Hirn und Rückenmark der Tiere beibehalten.

4.1.2 Eingangsuntersuchung via Phänotypisierung

Pro Tier wurde eine durchschnittliche Untersuchungszeit von 20 Minuten für den vollständigen Durchlauf des SHIRPA-NP benötigt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu den Tieren, die sich für die Magnetstimulation als geeignet erwiesen haben, sind in Tab. 4.1 auf Seite 75 wiedergegeben.

Technische Aufbauten Die Anwendung des SHIRPA-NP-Protokolls bei den neurologisch auffälligen Mauslinien Glra1tg271R-783 (unveröffentlicht), ABE-Mäuse (unveröffentlicht), LystIng3618 (Rudelius et al., 2006), Cra1 (Dupuis et al., 2009) und PrP-transgene (unveröffentlicht) ermöglichte die Sensibilisierung des Untersuchers für die unten aufgelisteten neurologischen Auffälligkeiten.

Das zur Durchführung konstruierte Rotarod (Abb. 3.6 auf Seite 45) erwies sich als einfach und zuverlässig verwendbar. Die Umdrehungszahl wurde dazu auf eine Kommastelle genau wiedergegeben. Der aufklappbare Plexiglasdeckel des Rotarods ermöglichte die gezielte Positionierung der Tiere auf dem rotierenden Zylinder. Sie konnten ohne aufwendigen Umbau oder schwierige Positionierungsversuche von oben auf den bereits langsam rotierenden Zylinder abgesetzt werden.

Der heruntergeklappte Deckel verhinderte Versuche der Tiere, über oder auf die benachbarte Gehäuseumrandung zu springen. Zwar richteten die Mäuse häufig den Blick in Richtung Randgehäuse des Rotarods, unternahmen jedoch nie einen Absprung in diese Richtung.

Die variabel positionierbaren Trennscheiben zur Unterteilung des rotierenden Zylinders ermöglichten eine Anpassung des Rotarods an die Laufgewohnheiten eines Tieres. Durch Entnahme einzelner Steckwände konnte die Lauffläche für die Tiere verbreitert werden, so dass insbesondere schwere und große Tiere einen weiteren Bewegungsspielraum hatten und damit eine mit kleineren Tieren vergleichbare Laufdauer auf dem Zylinder erreichen konnten.

Die Tiere kamen mit der Griffigkeit der Zylinderoberfläche gut zurecht, so dass sie ihre Pfoten problemlos positionieren konnten und bei ihrer Vorwärtsbewegung nicht abrutschten.

Der speziell konstruierte Aufbau mit horizontaler Seilbrücke erwies sich als hilfreich zur Überprüfung der Haltungs- und Stellreaktionen der unkonditionierten Tiere. Der abgedunkelte Holzunterschluß am Ende des Seils bot ein attraktives Ziel für die auf das Seil abgesetzten Tiere. Gesunde Tiere überwandern so die Strecke zwischen ihrer Positionierung auf dem Seil und der Einstiegs Luke ohne vorherige Gewöhnung an diese Übung, allerdings nur, solange sie an der Schwanzbasis leicht fixiert und unterstützt wurden. Fehlte diese Hilfestellung, konnte keines der Tiere die Strecke überwinden, sondern fiel meist auf die Bodenpolsterung hinunter oder verblieb hängend am Seil.

Scoring der Einzeltests Die Ergebnisse der Einzeltests sind in Tab. 4.1 auf Seite 75 wiedergegeben. Das durchschnittliche Gewicht der Mäuse, die für die Magnetstimulation ausgewählt wurden, lag bei $33,7 \pm 5,5$ g und die durchschnittliche Körperlänge bei $9,8 \pm 0,9$ cm.

Mit 12 von 20 Mäusen zeigte der größte Teil eine sitzende oder stehende Haltung während des Zeitraums im Glaszylinder, während nur zwei Tiere regelmäßig den Gefäßrand zu erreichen suchten, indem sie immer wieder vom Boden absprangen.

In der Regel (18 von 20 Mäusen) verhielten sich die Tiere während der Zeit im Glaszylinder ruhig und führten langsame Bewegungen durch, meist begannen sie auch nach kurzer Zeit mit Fellpflege und kratzten sich vereinzelt. Nur zwei der Tiere zeigten keine Aktivität außer der Begutachtung des Gefäßes. Alle Tiere waren tremorfrei und zeigten weder in Ruhe (Ruhetremor) noch in Ausübung einer gerichteten Bewegung (Intentionstremor) ein Zittern.

Fünfzehn der Tiere verfielen nach Verbringen in die Arena nur kurzzeitig in Starre und be-

gannen sich dann eilig zu orientieren und die Arenaecken zu inspizieren. Fünf Mäuse verharrten wenige Sekunden in der Position der Landung, begannen jedoch daraufhin ebenfalls eilige Untersuchungsgänge. Im Durchschnitt wurde dabei eine Bewegungsaktivität von $8,8 \pm 5,2$ überwanderten Quadraten pro halbe Minute innerhalb der Arena gezählt. Die geringste Aktivität zeigte dabei das Tier, das sich in folgenden Tests als sehr hektisch herausstellte (1 Feld), während die größte Aktivität (19 Felder) von einem insgesamt als völlig unauffällig beurteilten Tier gezeigt wurde.

Während der Beobachtung der Mäuse innerhalb der Arena wurde zusätzlich auf das Gangbild und auf Anomalien von Körperhaltung und Gliedmaßenpositionierung sowie auf Lähmungserscheinungen geachtet. Alle Tiere wiesen eine normale Rückenlinie und Nasenposition und ein physiologisches Gangbild auf und kein Tier zeigte Spreizen, Schwanken oder Bauchschleifen.

Zwei der untersuchten Tiere trugen ihre Hüfte geringgradig höher als der Rest der Tiere. Statt der im Score als normal bewerteten 3 mm Höhe trugen diese beiden Tiere die Hüfte zwischen 4–5 mm über dem Boden. Eines der beiden Tiere hielt zudem den Schwanz nicht in der Waagerechten, sondern zog ihn hinter sich her und hatte Schwierigkeiten beim Greifen des Seils mit den Hinterextremitäten. Da dieses Tier jedoch auf dem Rotarod, am Gitter und im Gangbild physiologische Score-Bewertung erreichte, wurde es zusammenfassend als „gesund“ beurteilt.

Zusätzlich zu diesem Tier zeigten weitere drei Mäuse Schwierigkeiten, das horizontale Seil gezielt mit den Hinterextremitäten zu greifen, während alle anderen in allen vier Gliedmaßen problemlos zugriffen. Da diese drei Tiere keine Hinweise auf neuromuskuläre Veränderungen aufwiesen, wurde dies als normale Lernproblematik einzelner Tiere gewertet.

Der Großteil der untersuchten Mäuse zeigte keine Schreckhaftigkeit und nur mäßige Reaktion auf Berührung. Erst bei direktem Kontakt zwischen Finger und Maus reagierten die Tiere mit schneller Flucht. Auch in den Scores zu Körperspannung, der Reaktion auf das Kneifen in die Ballen und zum Contact Righting waren alle Tiere innerhalb der Norm- und Referenzwerte. Wenig toleriert wurde dagegen das Handling der Tiere durch verschiedene Fixationsgriffe des Untersuchenden. Die Hälfte aller Tiere strampelte bereits bei Fixation an der Schwanzbasis, weitere sieben Tiere wehrten sich, als sie im Genickbereich gegriffen wurden, und drei Mäuse reagierten erst auf einen Versuch, das Hinterbein zu greifen, mit Abwehrbewegungen.

Beim Anheben der Mäuse am Schwanz zeigte eines der Tiere eine Rotation der Wirbelsäule um die eigene Achse, während alle übrigen Mäuse die Wirbelsäule gerade durchstreckten.

Dieses Tier war nach seiner Verbringung in die Arena sehr aufgeregt und hektisch, inspizierte dort die Umgebung kaum und reagierte im Test des Annäherns an das horizontale Gitter erst bei Barthaarkontakt mit Extension der Vordergliedmaßen und Durchstrecken der

Wirbelsäule. Ebenso konnte es nur geringe Griffstärke in den Vordergliedmaßen aufbringen und scheiterte beim Drehen am vertikalen Gitter.

Im Vergleich dazu drehten am vertikal ausgerichteten Gitter siebzehn aller Tiere um und stiegen das Gitter hinauf, zwei andere Tiere drehten und verhaarten dann in dieser Position.

Ein weiteres Tier zeigte erst bei Barthaarkontakt eine Positionierung auf dem horizontalen Gitter, es wich jedoch sonst in keinem Score vom Referenz- oder Normwert ab.

Bezüglich der Griffstärke konnten 15 der Tiere aktiven und effektiven Rückzug mit den Vorderbeinen erzielen, während drei Tiere nur mäßigen Griff aufbrachten. Ein weiteres Tier konnte nur schwache Griffstärke aufweisen.

Im Test zur selbständigen Wiederaufrichtreaktion im Contact Righting-Test gelang es allen Tieren ohne jegliche Verzögerung, sich prompt wieder in eine aufrechte Körperstellung zurückzubringen.

Ebenfalls auffällig war ein Tier, das immer wieder kurzzeitig seine Hintergliedmaßen anzog, wenn es am Schwanz angehoben wurde, während keines der übrigen Tiere dieses Verhalten zeigte. Dieses Tier wich jedoch in keinem anderen Score von der Norm ab.

Nach dem Drehen des Gitters um die Längsachse, so dass die Tiere von unten daran hingen und sich mit allen Vieren festhielten, gelang es allen Tieren außer einem, sich über 45 Sekunden lang daran festzuhalten. Das eine Tier, das auch nach mehreren Versuchen weiterhin nach wenigen Sekunden fiel, zeigte in keinem weiteren Test Auffälligkeiten und erwies auf dem Rotarod gute Koordination und Ausdauer (36 Sekunden).

Auf dem Rotarod blieb die Hälfte der Tiere zwischen 40 bis maximal 240 Sekunden auf dem rotierenden Zylinder (durchschnittlich $60,35 \pm 6,0$ s), während nur drei Mäuse bereits vor beziehungsweise bei 10 Sekunden fielen (10 s, 7 s, 7 s). Keines dieser Tiere wich in einem weiteren Parameter von den Norm- oder Referenzwerten ab.

Es war nicht eindeutig zu klären, ob Tiere, die in den Tests „Halten am Gitter“ oder „Rotarod“ niedrigere Bewertungen erhielten als andere, tatsächlich motorische Schwierigkeiten hatten oder sich „fallen ließen“. Obwohl die Tiere auch nach einer 20-minütigen Pause eine kürzere Verweildauer am jeweiligen Gerät aufwiesen, wurden sie als gesund beurteilt, da sie in allen weiteren Scores keine Abweichung von der Norm zeigten.

Im Bezug auf den Gliedmaßentonus, der beim Beugen und Strecken der Gliedmaßen festgestellt wurde, unterschieden sich die Tiere deutlich voneinander. Jeweils sieben Tiere wiesen geringen bis mäßigen, vier jedoch deutlichen Widerstand gegenüber der ausgeführten Bewegung auf. Weitere zwei Tiere setzten der Manipulation jedoch kaum willkürliche Bewegung entgegen.

Insgesamt konnte bei 29 von 35 Tests mit bestehendem Referenz- oder Normwert eine gute Übereinstimmung mit den Referenzwerten festgestellt werden.

Die in unserer Studie erhobenen Ergebnisse unterschieden sich in den Punkten Gewicht,

Körperlänge, Griffstärke, provoziertes Beißen, negative Geotaxis und Reizbarkeit von Daten, die Rogers et al. (2001) und Schneider et al. (2006) für die entsprechenden Tests erhoben haben.

Die Tiere unserer Untersuchungen wiesen ein höheres durchschnittliches Gewicht auf als für C57BL/6 beschrieben, zeigten geringere Griffstärke und deutlich geringere Beißaktivität und Reizbarkeit als in den herangezogenen Referenzdaten beschrieben. Auch für die Geotaxis stellte sich heraus, dass die Tiere, statt ausschließlich umzudrehen und an der Stelle zu verbleiben, nach der Drehung am Gitter hochkletterten.

Trotz dieser geringen Abweichungen wurden zwanzig Tiere für die Untersuchungen zur MS ausgewählt, da zusammenfassend keine Einschränkungen des neuromuskulären Systems ersichtlich wurde.

Tabelle 4.1: Ergebnisse des SHIRPA-NP der Tiere, die sich für die MS als geeignet erwiesen; Rw=Referenzwert; Nw=Normalwert.

Test	Mittelwert ± Standardabw.	Median	Tierzahl je Score		Rw ^{*/□} /Nw
			Tierzahl	Score	(Rogers et al., 1999) [*] (Schneider et al., 2006) [□]
Gewicht [g]	33,7 ± 5,55	33,5	Nicht anwendbar		24,5 ± 0,5 [□] 22,0 ± 0,5 [*]
Körperlänge [cm]	9,8 ± 0,85	10	Nicht anwendbar		9,1 ± 0,1 [*]
Körperstellung	3,5 ± 0,69	3	12	3	3–4 [*]
			6	4	
			2	5	
Spontane Aktivität	1,05 ± 0,51	1	2	0	1–2 [*]
			15	1	
			3	2	
Atemfrequenz	2,1 ± 0,31	2	18	2	2
			2	3	
Tremor	0	0	20	0	0 [□]
Defäkation	0–1	0	12	0	nicht bekannt
			3	1	
			5	2	
Transfer- Erregung	3,8 ± 0,52	4	5	3	3–4 [*]
			15	4	
			1	5	
Bewegungsaktivität	8,8 ± 5,18	8,5	Nicht anwendbar		14,4 ± 1,0 [*]

Tabelle 4.1: Ergebnisse der in den folgenden Tests zur Magnetstimulation ... Fortsetzung.

Test	Mittelwert ± Standardabw.	Median	Tierzahl je Score		Rw ^{*/□} /Nw (Rogers et al., 1999)* (Schneider et al., 2006)□
			Tierzahl	Score	
Spreizen	0	0	20	0	0
Schwanken	0	0	20	0	0
Nasenposition	0	0	20	0	0
Bauchschleifen	0	0	20	0	0
Schreckreaktion	0	0	20	0	0
Gang	0	0	20	0	0
Rückenlinie	0	0	20	0	0
Hüfthöhe	2,1 ± 0,31	2	18 2	2 3	2*
Schwanzposition	0,85 ± 0,37	1	1 19	0 1	1□
Berührungs- reaktion	1,95 ± 0,60	2	4 13 3	1 2 3	2*
Handling- Reaktion	0,65 ± 0,75	0,5	10 7 3	1 2 3	1□
Plantigrades Fußen	0	0	20	0	0
Körperrotation	0,05 ± 0,22	0	19 1	0 1	0-1□
Gliedmaßen- Anziehen	0,1 ± 0,31	0	19 1	0 1	0□
Visuelle Positionierung	2,9 ± 0,31	3	2 18	2 3	3*
Dauer am Gitter	43,4 ± 7,16	45	19 1	45 13	45
Griffstärke	2,65 ± 0,67	3	2 3 15	1 2 3	2*
Körperspannung	1	1	20	1	1
Zehen-Kneifen	2,85 ± 0,37	3	3	2	3*

Tabelle 4.1: Ergebnisse der in den folgenden Tests zur Magnetstimulation ... Fortsetzung.

Test	Mittelwert ± Standardabw.	Median	Tierzahl je Score		Rw ^{*/□} /Nw (Rogers et al., 1999)* (Schneider et al., 2006) [□]
			Tierzahl	Score	
			17	3	
Seil-Manöver	0,2 ± 0,41	0	16 4	0 1	nicht bekannt
Hautfarbe	0,95 ± 0,22	1	1 19	0 1	1
Gliedmaßentonus	1,65 ± 0,93	2	2 7 7 4	0 1 2 3	nicht bekannt
Provoziertes Beißen	0,6 ± 0,50	1	8 12	0 1	0 [□]
Contact Righting	1	1	20	1	1*
Verzögerung des Contact Rightings [s]	0	0	20	0	0
Negative Geotaxis	0,2 ± 0,52	0	17 2 1	0 1 2	1-2*
Reizbarkeit	0,65 ± 0,49	1	7 13	0 1	0 [□]
Vokalisation	0,55 ± 0,51	1	9 11	0 1	0-1 [□]
Rotarod	60,35 ± 6,0	35,5	Nicht anwendbar		52 ± 6,6

4.1.3 Bestimmung der Magnetfeldausdehnung

Mit allen drei untersuchten Spulenbereichen konnte in Position 0 des Rückenmarks ein Muskelpotential ausgelöst werden. Diese unterschieden sich je nach untersuchtem Punkt der Spule in ihrer Amplitudenhöhe.

Bei Stimulation mit Punkt A der Spule an Position 0 konnte eine durchschnittliche Amplitude von $2,6 \pm 0,57$ mV, im Punkt B von $1,85 \pm 0,49$ mV, im Punkt C $0,67 \pm 0,0$ mV ausge-



Abbildung 4.1: Spinale Magnetstimulation einer Maus unter Ableitung der motorischen Potentiale am linken M. gastrocnemius.

löst werden.

Abbildung 4.2 gibt die durchschnittlichen Amplituden der jeweiligen Stimulationspunkte wieder und stellt dar, wie diese mit zunehmendem Abstand zwischen Spule und Position 0 an Höhe verlieren.

Mit wachsendem Abstand zwischen dem entsprechenden Spulenpunkt und Rückenmark sanken die damit gemessenen Amplituden. Der Abstand, in dem keine Potentialauslösung mehr möglich war, unterschied sich dabei deutlich zwischen den verschiedenen Spulenpunkten.

Verschieben in latero-lateraler Richtung Es zeigte sich, dass die stärksten Potentiale mit einem Areal von etwa 9 mm um den errechneten Punkt höchster elektrischer Feldstärke (Punkt A) auslösbar waren ($2,08 \pm 0,29$ mV).

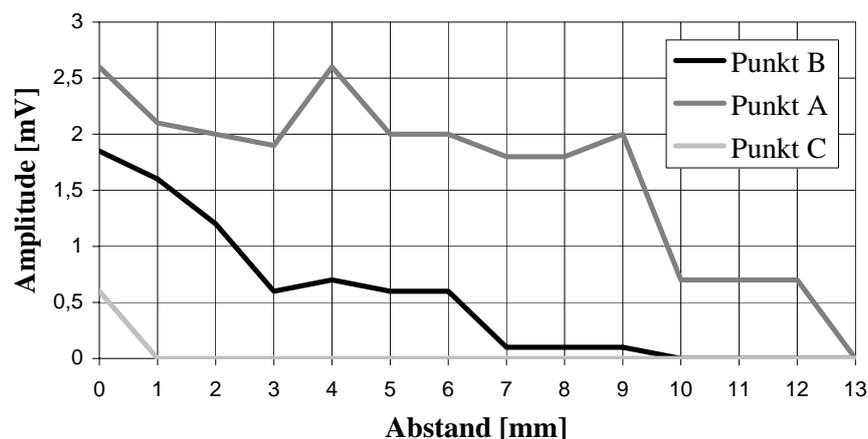


Abbildung 4.2: Durchschnittliche Amplituden in den Punkten A, B und C der Spule.

Bei einer Verschiebung des Punktes A bis zu einer Distanz von 10 mm in latero-lateraler Richtung fällt die Amplitude bereits auf etwa 24% ($0,7 \pm 0,01$ mV) des maximalen Potentials

ab und liegt bei einer Distanz von 13 mm bei einer Potentialspannung von 0 mV (Abb. 4.2 auf der vorherigen Seite).

Bei Verschieben der Punkte B und C der Spule in latero-lateraler Richtung fällt die Potentialamplitude in beiden Punkten im Vergleich zum Fokuspunkt A rascher ab.

Bei Stimulationen im Bereich des Punktes B ist bereits bei einer seitlichen Verschiebung um 3 mm ausgehend von Position 0 nur noch 32% ($0,6 \pm 0,05$ mV) der Amplitudenhöhe in Position 0 zu erzielen.

Auch hier resultiert das weitere Verschieben der Spule um vier Millimeter in latero-lateraler Richtung in einem zusätzlichen Amplitudenabfall. Im Abstand von 7 mm zur Position 0 sind nur noch 5% ($0,1 \pm 0,06$ mV) und bei einer Distanz von 8 mm zur Position 0 keinerlei Potential mehr ableitbar.

Noch weniger Spielraum zur Potentialauslösung ergibt sich am Stimulationspunkt C, bei dem bereits in Position 0 nur etwa 23% ($0,6 \pm 0,06$ mV) der Amplitudenhöhe des Punktes A in Position 0 erreicht werden konnte. Die Höhe der Potentialamplituden an den jeweiligen Spulenlokalisationen veranschaulicht Abb. 4.3.

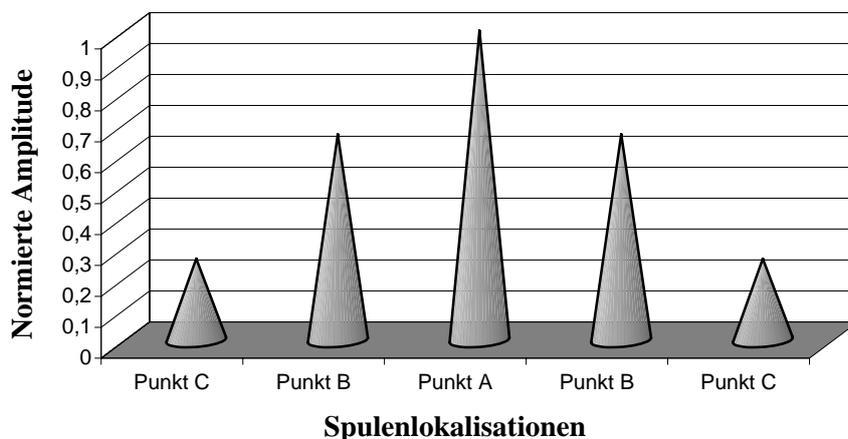


Abbildung 4.3: Durchschnittliche MMEP-Amplituden der MMEPs an drei Spulenlokalisationen (Mittelwerte; normalisiert).

Verschieben in kranio-kaudaler Richtung Bei einer Verschiebung der Spule im Punkt A ausgehend von der Position 0 in Richtung kaudal ergibt sich ein weit größerer Radius des reizauslösenden Magnetfeldes als bei Verschiebung dieses Punktes in latero-lateraler Richtung.

Insgesamt ist ausgehend von Position 0, bei der eine durchschnittliche Amplitude von $7,23 \pm 0,06$ mV ausgelöst werden konnte, bis zu einer Distanz von 23 mm ($0,7$ mV $\pm 0,30$ mV) weiterhin eine Potentialauslösung möglich.

Die gemessene Amplitudenhöhe sinkt bei weiterem Verschieben der Spule auf der X-Achse bis auf 0 mV ab.

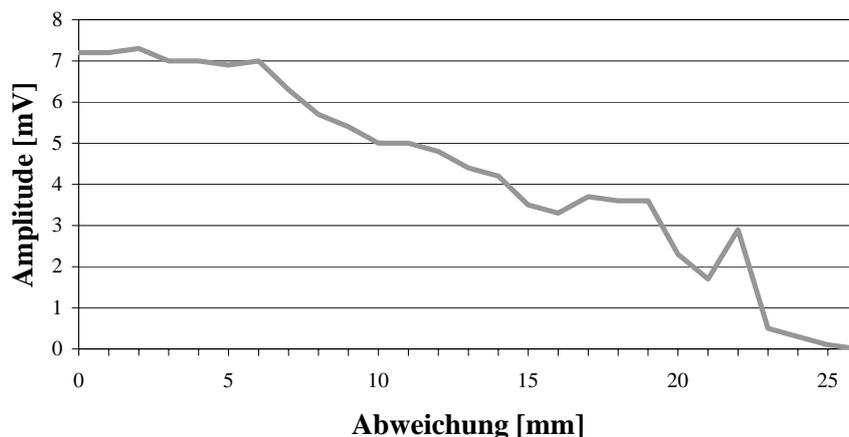


Abbildung 4.4: Schematisiertes Potential zur Auslösung von MMEPs am Punkt A bei kranio-kaudaler Verschiebung (Mittelwerte, normalisiert).

In einem Abstand von 0–2 mm von Position 0 des Koordinatensystems ist eine Amplitudenhöhe von 100% erreichbar. Ab einer Distanz von 3 mm ($7 \pm 0,05$ mV) sinkt das Potential auf 97% ab und bleibt bis zu einem Abstand von 6 mm gleichmäßig ableitbar.

Erst ab einer Distanz von 7 mm fällt das Potential weiter ab, bis in einer Distanz von 12 mm nur noch 65% der an Position 0 evozierten Amplitude auslösbar ist ($4,7 \pm 0,26$ mV).

Ab einer Distanz von 14 mm ist nur noch die Hälfte der ursprünglichen Amplitudenhöhe messbar ($3,63 \pm 1,16$ mV).

Diese Amplitudenhöhe bleibt bis zu einer Distanz von 19 mm ($3,6 \pm 0,06$ mV) konstant ableitbar. In den darauf folgenden Millimetern sinkt die Amplitude rapide bis auf 4% der ursprünglichen Höhe und ist ab einer Distanz von 26 mm des Punktes A zur Position 0 auf 0% gesunken (Abb. 4.4).

Erhöhen des Spulenabstandes zur Wirbelsäule (Z-Achse) Entsprechend der Ergebnisse bei Verschieben der Spule in latero-lateraler und kranio-kaudaler Richtung ergab auch der zunehmende Abstand der Spule zur Position 0 einen Amplitudenabfall der evozierten motorischen Potentiale (Abb. 4.5 auf der nächsten Seite).

Eine maximale Amplitude konnte bis zu einem Abstand von 2 mm des Punktes A von der Position 0 abgeleitet werden (Position 0 durchschnittlich $7,6 \pm 1,4$ mV). Ab einem Abstand von 3 mm, in dem nur noch 95% ($7,3 \pm 1,0$ mV) der Amplitudenhöhe des Punktes A erreicht werden konnten, fielen die erhobenen Werte der gemessenen Amplituden beständig ab und lagen in einer Distanz von 9 mm nur noch bei 47% ($3,6 \pm 0,34$ mV) der in Position 0 erhobenen durchschnittlichen Amplitudenwerte.

Eine weitere Verkleinerung der erhobenen Amplituden ergab sich zwischen 9 und 12 mm Abstand von der Wirbelsäule auf 10% ($0,8 \pm 0,12$ mV) der ursprünglichen Amplitude, die

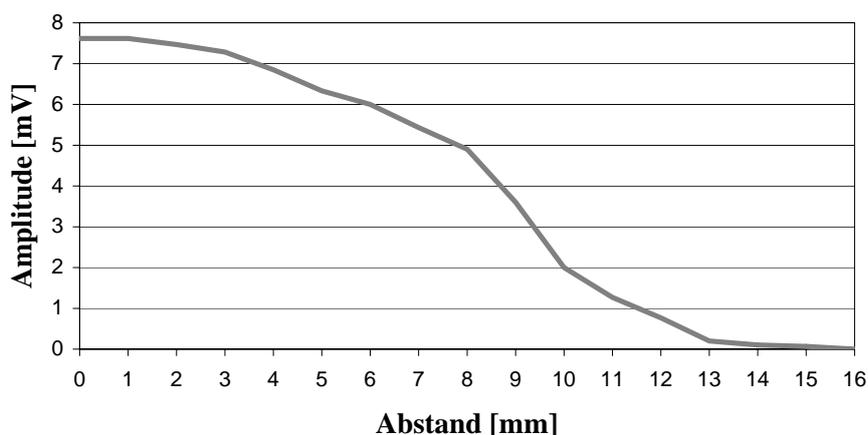


Abbildung 4.5: Abnahme der Amplituden mit zunehmender Bewegung in Z-Achsen-Richtung.

schließlich in 0% bei einem Abstand von 16 mm endete.

4.1.4 Beurteilung der Spulenausrichtung

Mit Hilfe der Rotationsuntersuchungen konnte festgestellt werden, dass nicht in jeder Winkelung von Spule zu Rückenmark eine Potentialauslösung möglich war (siehe dazu Versuchsaufbauten in Abb. 3.13 auf Seite 64).

In Rotationswinkeln von $22,5^\circ$, 45° , 60° , $67,5^\circ$, 120° , 150° und $292,5^\circ$ konnten währenddessen nur Amplituden von < 1 mV ausgelöst werden.

Die größten motorischen Potentiale im Vergleich zu allen anderen Positionierungen konnten bei einer Winkelung von 330° ($13,5 \pm 1,85$ mV) zur Ausgangsposition evoziert werden. In 0° -Position konnte beispielsweise nur eine Höhe von 73% der maximalen Amplitude erzielt werden ($9,9 \pm 0,1$ mV) und bei orthogonaler Stimulationsrichtung konnten nur 63% dieser Amplitude ($8,5 \pm 0,23$ mV) abgeleitet werden (siehe Abb. 4.6 auf der nächsten Seite). Auch unter 30° -Winkelung konnten nur 52% der Amplitude ($7,0 \pm 1,05$ mV) erzielt werden, die in 330° erreicht werden konnte.

Eine Winkelbildung zwischen Spule und Wirbelsäule von 210° , 225° und 240° ergaben jeweils eine etwa 38–46%ige Amplitudenhöhe (je $5,1 \pm 0$ mV; $6,2 \pm 0,12$ mV; $5,8 \pm 0,12$ mV). Alle weiteren Positionen ermöglichten nur deutlich geringere Potentialableitungen.

Im Vergleich zum gleichgerichteten Strom- bzw. Aktionspotentialverlauf innerhalb von Spule und Rückenmark (0° ; $9,9 \pm 0,1$ mV) konnten mit einer Stromrichtung entgegengesetzt zur motorischen Reizweiterleitung im Rückenmark (180°) nur geringere Amplituden hervorgerufen werden ($2,5 \pm 0,01$ mV).

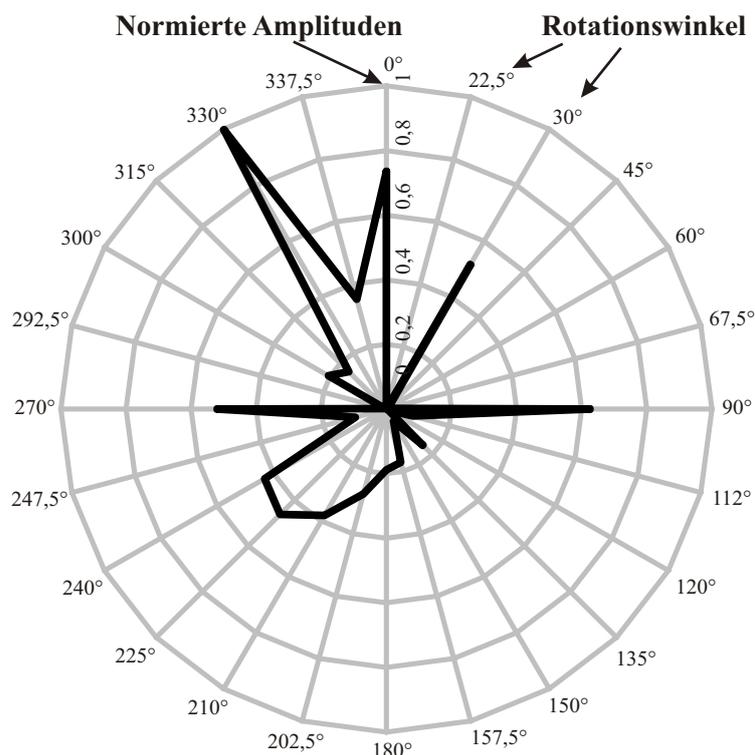


Abbildung 4.6: Normierte Amplituden je Rotationswinkel.

4.2 Bewertung unterschiedlicher Narkoseregimes der Maus

Insgesamt wurden bei jedem der verwendeten Narkoseregimes MMEPs am *M. gastrocnemius* der Mäuse abgeleitet. Die einzelnen Narkosen unterschieden sich allerdings in ihrer Eignung zur MS bei der Maus im Bezug auf ihre Sicherheit, ihren Wirkungseintritt und in ihrem Einfluss auf die abgeleiteten Potentialparameter Amplitude und Latenz.

4.2.1 Beurteilung der anästhesiologischen Parameter

In die Beurteilung der Eignung der Narkoseprotokolle für die Magnetstimulation an der Maus wurde auf (1) Narkosetiefe, (2) Dauer bis zum Verlust der Aufrichtreaktion, (3) die Notwendigkeit einer Nachdosierung und (4) Narkosesicherheit geachtet.

(1) Narkosetiefe

MMF, ISO, KM und SEV bewirkten bei allen Tieren im tiefen Narkosestadium einen negativen Rückzugreflex, während PE und KX nur bei der Hälfte (je 5/10 bzw. 3/6) der untersuchten Mäuse in einem Verlust dieses Reflexes resultierten. KXA führte bei acht der zehn getesteten Tiere zum Verlust des Rückzugreflexes (Tab. 4.2 auf der nächsten Seite).

(2+3) Verlust der Aufrichtreaktion und Notwendigkeit der Nachdosierung

Im Bezug auf die injizierbaren Anästhesien verlor ausschließlich unter KXA- und KM-Narkose jedes der Tiere die Aufrichtreaktion innerhalb von 15 Minuten nach der ersten Narkoseinjektion.

Zusätzliche Dosen mussten bei je einem der zehn getesteten Tiere unter MMF und PE verabreicht werden.

Der kürzeste durchschnittliche Zeitraum zwischen erster Verabreichung des Anästhetikums und dem Verlust der Aufrichtreaktion ist unter SEV erreicht worden (1 min 5 s).

Im Bezug auf die injizierbaren Anästhetika konnte die kürzeste Dauer zwischen erstmaliger Injektion und dem Verlust der Aufrichtreaktion unter KM (3 min 24 s), das längste Zeitintervall unter PE (10 min) festgestellt werden.

Der Zeitraum zwischen dem Einsetzen der Maus in die mit Narkosegas durchflutete Körperkammer und dem Verlust der Aufrichtreaktion war für ISO (durchschnittlich 110 s) dabei etwa halb so lang bzw. bei SEV nur etwa 1/3x so lang (durchschnittlich 65 s für SEV) wie der Zeitraum zwischen KM-Injektion und dem Verlust der Aufrichtreaktion (3 min 40 s) (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2: Anästhesiologische Parameter der verwendeten Narkosen; VAR = Verlust der Aufrichtreaktion.

Anästhesie	Ausfall des Rückzugreflexes*	Nachdosierung*	Zeit bis VAR [s] (inkl. nachdosierter Tiere)
MMF	10/10	1/10	314 ± 231
PE	5/10	1/10	672 ± 216
KXA	8/10	0/10	342 ± 233
ISO	10/10	0/10	110 ± 52
KX	3/6	0/6	–
KM	10/10	0/10	204 ± 81
SEV	10/10	0/10	65 ± 20

*Verhältnis Vorkommen/Zahl der magnetisch stimulierten Tiere

(4) Sicherheit der Narkose

Trotz intensiven Monitorings und eingeleiteter Notfallmaßnahmen starben drei von sechs untersuchten Tieren unter KX-Narkose. Unter Ketamin/Medetomidin-Anästhesie (KM) trat bei drei von zehn untersuchten Mäusen eine starke Atemdepression auf, welche nur durch Antagonisierung der Medetomidin-Komponente behoben werden konnte. Die Antagonisierung führte bei den Tieren jedoch zu kataleptischen Zuständen, die etwa 15 Minuten andauerten.

4.2.2 MMEP-Parameter

Eine Potentialableitung war unter jeder verwendeten Anästhesierung möglich. Es konnten durchschnittliche MMEP-Amplituden zwischen 10,86 und 0,45 mV abgeleitet werden. Dabei stellte sich ein hoher interindividueller als auch intraindividueller Unterschied für beides, Latenzen und Amplituden, heraus (Abb. 4.7). Alle Daten sind als Durchschnittswerte inklusive der Standardabweichungen in Tab. 4.3 auf Seite 87 dargestellt.

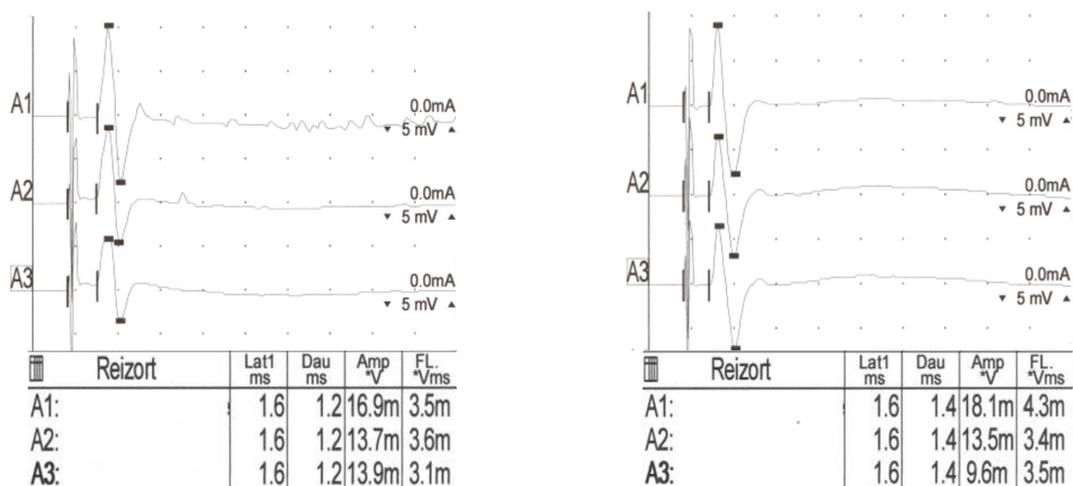


Abbildung 4.7: Beispiele abgeleiteter Muskelpotentiale am M. gastrocnemius zweier Mäuse unter KM-Anästhesie mit Darstellung der inter- und intraindividuellen Unterschiede.

Latenzen Zum Zeitpunkt T_{10} der spinalen Stimulation konnte eine maximale Latenz von $1,38 \pm 0,2$ ms (KM) von der kleinsten Latenz von $1,08 \pm 0,3$ ms (KX) unterschieden werden.

Die Latenzen zum Zeitpunkt T_{10} unterschieden sich im Gruppenvergleich nach Bonferroni-Korrektur lediglich zwischen KM und ISO ($p=0,01$) sowie unter KM und MMF signifikant ($p=0,04$).

Zum Zeitpunkt T_{30} konnte eine maximale Latenz von $1,39 \pm 0,1$ ms unter PE abgelesen werden, während mit $1,24 \pm 0,1$ ms die kürzeste Verzögerung unter MMF gesehen wurde. Die Boxplots zu den abgeleiteten Latenzen sind in Abb. 4.8 auf der nächsten Seite dargestellt.

Dieser erreichte auch im multiplen Gruppenvergleich statistische Signifikanz ($p=0,02$). Zusätzlich unterschieden sich die Latenzen unter PE signifikant von denen unter SEV-Narkose (nach Korrektur $p=0,01$).

Im Bezug auf die interindividuelle Variabilität der gemessenen Latenzen zeigten die Werte zum Zeitpunkt T_{10} unter KX eine besonders große Streuung ($1,08 \pm 0,3$ ms (27%)), während der Wertebereich unter ISO relativ eingegrenzt war ($1,23 \pm 0,1$ ms (7%)).

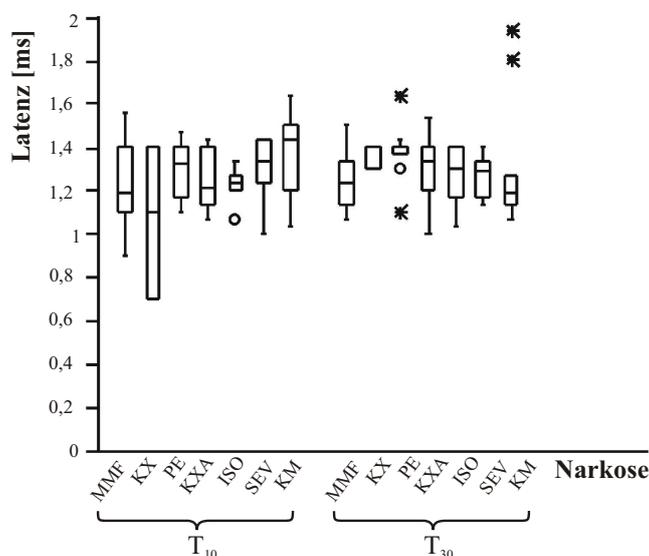


Abbildung 4.8: Boxplots der erhobenen Latenzen zu den beiden Stimulationszeitpunkten.

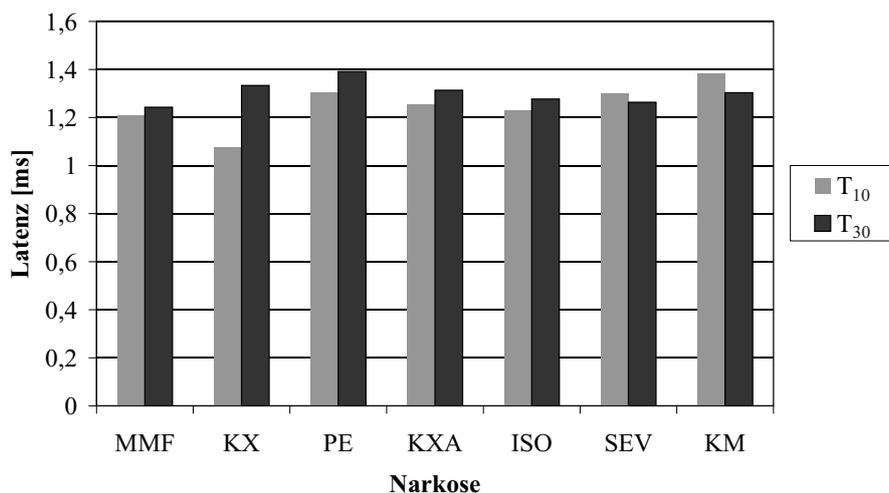


Abbildung 4.9: Durchschnittliche Latenzen je Narkose und Stimulationszeitpunkt.

Zu T₃₀ war unter KM-Anästhesie eine relativ große Standardabweichung der Latenzen feststellbar ($1,30 \pm 0,3$ ms (23%)), während zum gleichen Zeitpunkt KX stabile Latenzen aufwies ($1,33 \pm 0,1$ ms (4%)).

Innerhalb aller Narkosen, exklusive der SEV- und KM-Gruppe, konnte ein Anstieg der erhobenen Latenzzeiten im Verlauf der Anästhesie beobachtet werden (Abb. 4.9). Diese Zunahme war für PE zwischen den Zeitpunkten T₁₀ und T₃₀ signifikant.

Amplituden Bei T₁₀ zeigte sich unter KM-Narkose ebenfalls die höchste durchschnittliche Amplitude von immerhin $10,86 \pm 5,5$ mV und die niedrigste Amplitude von $6,85 \pm 5,9$ mV wiederum unter KX-Anästhesie. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den

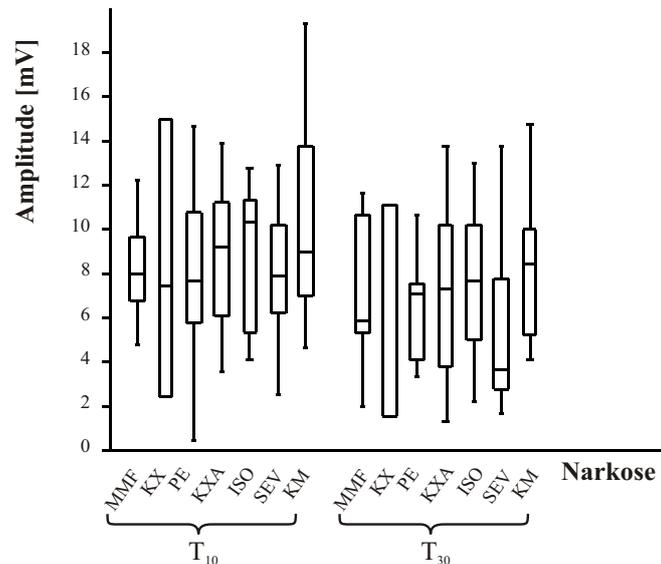


Abbildung 4.10: Boxplots der erhobenen Amplituden zu den beiden Stimulationszeitpunkten.

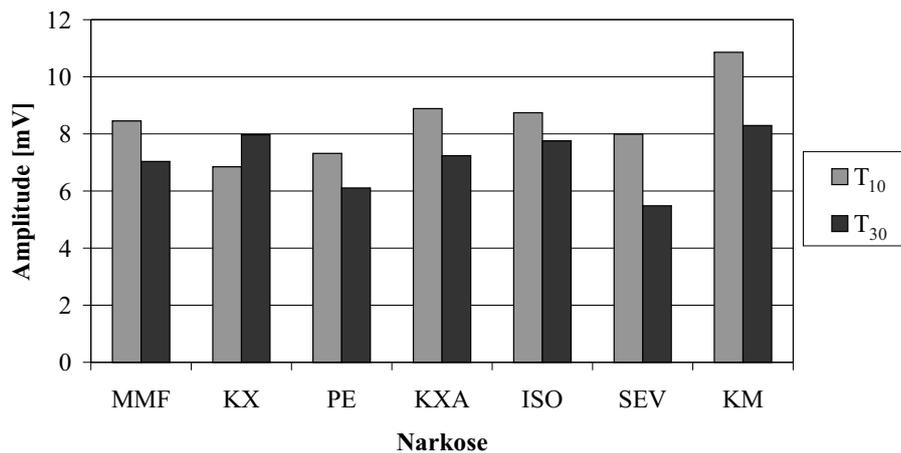


Abbildung 4.11: Darstellung des Amplitudenabfalls mit Andauern der Narkose.

einzelnen Gruppen aufgezeigt werden.

Bei T₃₀ lag die maximale Amplitude bei $8,23 \pm 3,3$ mV (KM), die kleinste Amplitude wurde bei Anästhesie mit SEV mit $5,48 \pm 4,0$ mV gemessen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Anästhesien blieb auch über die Bonferroni-Korrektur hinweg signifikant ($p=0,01$). Es konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Die Boxplots zu den abgeleiteten Amplituden sind in Abb. 4.10 dargestellt.

Zum Zeitpunkt T₁₀ verursachte insbesondere KX mit $6,85 \pm 5,9$ mV (86%) instabile Amplitudenwerte, während auch hier relativ einheitliche Amplituden unter MMF $8,46 \pm 2,6$ mV (31%) abgeleitet werden konnten.

Zum Zeitpunkt T₃₀ zeigte sich eine Anästhesie mit SEV als Ursache für instabile Amplitudenwerte von $5,48 \pm 4,0$ mV (73%) während sich die Anästhesie unter KM als besonders

Tabelle 4.3: Durchschnittliche MMEP Start-Latenzen und Amplituden zu den Zeitpunkten T₁₀ und T₃₀. Klammern zeigen signifikante Unterschiede nach Bonferroni-Korrektur an.

Anästhesie	Latenz [ms]		Amplitude [mV]	
	T ₁₀	T ₃₀	T ₁₀	T ₃₀
MMF	1,21 ± 0,20	1,24 ± 0,14	8,46 ± 2,63	7,03 ± 3,27
KX	1,08 ± 0,29	1,33 ± 0,05	6,85 ± 5,90	7,97 ± 4,98
PE	1,30 ± 0,15	1,39 ± 0,13	7,32 ± 4,76	6,11 ± 2,47
KXA	1,25 ± 0,17	1,31 ± 0,19	8,88 ± 3,51	7,24 ± 3,92
ISO	1,23 ± 0,09	1,28 ± 0,14	8,74 ± 3,50	7,76 ± 3,58
SEV	1,30 ± 0,16	1,26 ± 0,11	7,99 ± 3,52	5,48 ± 4,01
KM	1,38 ± 0,18	1,30 ± 0,31	10,86 ± 5,50	8,29 ± 3,27

stabil zur Amplitudenableitung herausstellte ($8,29 \pm 3,3$ mV (39%)).

Im Verlauf der 30-minütigen Narkose konnte bei allen Gruppen außer unter KX ein Sinken der spinal gemessenen Amplitudenwerte festgestellt werden (Abb. 4.11 auf der vorherigen Seite). Dieses war im Mann-Whitney Test zwischen T₁₀ und T₃₀ signifikant ($p < 0,05$).

4.3 Stimulationspunktwahl und -orientierung

An allen Stimulationsorten konnten motorische Potentiale ausgelöst und am M. gastrocnemius abgeleitet werden. Einzig am Stimulationspunkt S1 war nicht bei jedem Tier eine zuverlässige Potentialableitung möglich. Bei drei der zehn Tiere konnte hier keinerlei Potential aufgezeichnet werden.

Ähnlich wie bei der Evaluierung unterschiedlicher Narkosen konnte eine hohe inter- und intraindividuelle Variabilität der erhobenen Potentiale in Latenz und Amplitude festgestellt werden.

Alle durchschnittlichen Potentialparameter je Stimulationspunkt sind in Tab. 4.4 auf Seite 90 einsehbar.

Latenzen Die durchschnittliche Latenz, die durch Stimulation an den medianen Kopfpunkten abgeleitet wurde, nahm von Stimulationspunkt S2 zu S4 geringgradig ab. Die durchschnittliche Latenz bei S2 median lag bei $1,42 \pm 0,2$ ms und sank nach kaudal bis zu S4 median auf $1,37 \pm 0,1$ ms (Tab. 4.4 auf Seite 90) ab. Die Stimulation bei S1 median zeigte jedoch eine kürzere durchschnittliche Latenz als alle kaudal folgenden medianen Stimulationsorte ($1,35 \pm 0,5$ ms). Es gab allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den gemessenen Latenzen aller Lokalisationen.

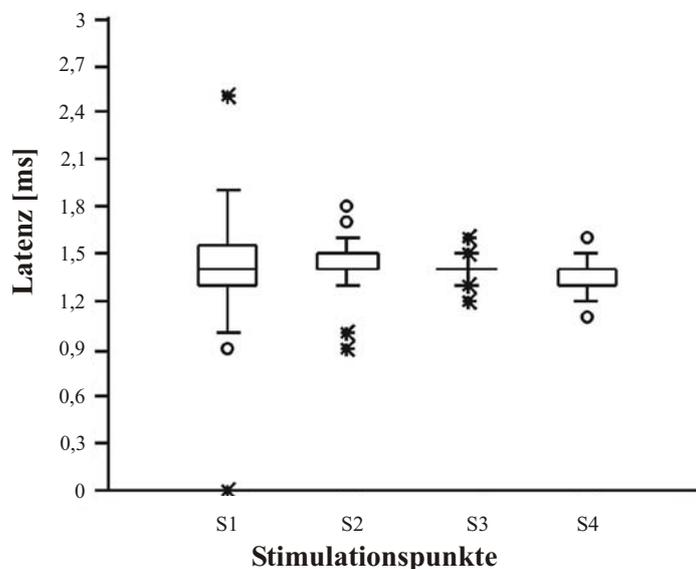


Abbildung 4.12: Boxplots der Latenzen an den vier Stimulationspunkten.

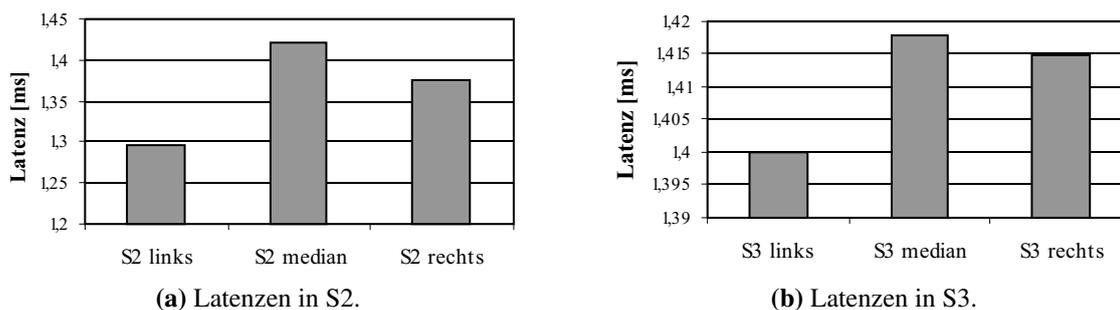


Abbildung 4.13: Median und paramedian erhobene Latenzen in S2 und S3.

Die medianen Stimulationsorte ergaben jeweils eine längere MMEP-Latenz (S2 median mit $1,42 \pm 0,2$ ms; S3 median mit $1,42 \pm 0,1$ ms) als die auf gleicher Höhe durchgeführten paramedianen Stimulationen (S2 rechts mit $1,38 \pm 0,2$ ms; S2 links mit $1,30 \pm 0,5$ ms; S3 rechts mit $1,41 \pm 0,1$ ms; S3 links mit $1,40 \pm 0,1$ ms). Es bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Beim Vergleich der rechts- und linksseitigen paramedianen Stimulation an S2 und S3 ergab sich bei beiden Lokalisationen eine längere Latenz auf der rechten Seite (S2 rechts mit $1,38 \pm 0,2$ ms; S3 rechts mit $1,41 \pm 0,1$ ms) im Vergleich zur linken Seite (S2 links mit $1,30 \pm 0,5$ ms; S3 links mit $1,40 \pm 0,4$ ms).

Amplituden Ein Vergleich der median evozierten Amplituden ergab, dass sich die größte Amplitude bei Stimulation auf Höhe von S3 ($8,39 \pm 4,3$ mV), die kleinste auf Höhe von S1 ($6,66 \pm 5,6$ mV) ableiten ließ. Die jeweils median ausgelösten Amplituden wiesen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

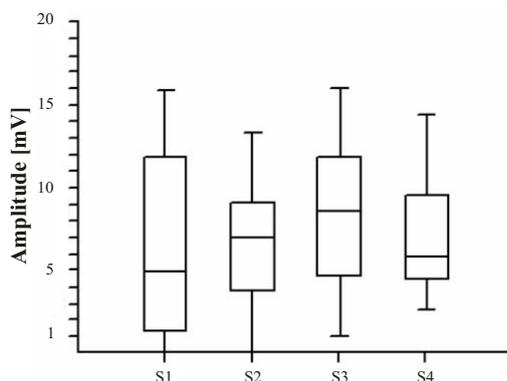


Abbildung 4.14: Boxplots der Amplituden gemessen an den vier medianen Stimulationspunkten.

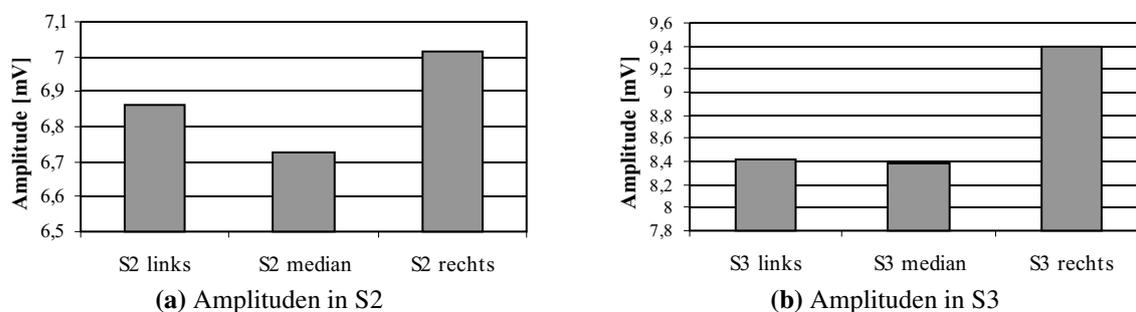


Abbildung 4.15: Median und paramedian erhobene Amplituden in S2 und S3.

Insgesamt führte die paramediane Stimulation je Lokalisation zu höheren Amplituden als die auf gleicher Höhe durchgeführten median applizierten Impulse (S2 median $6,37 \pm 4,0$ mV; S2 rechts mit $7,02 \pm 4,1$ mV; S2 links mit $6,86 \pm 2,8$ mV; S3 median $8,39 \pm 4,3$ mV; S3 rechts mit $9,4 \pm 3,3$ mV; S3 links mit $8,42 \pm 2,8$ mV). Dies war in der statistischen Auswertung jedoch ohne Signifikanz.

An allen untersuchten paramedianen Stimulationsorten wurden durchschnittlich höhere Amplituden während rechtsseitiger Hemisphärenstimulation als während linksseitiger gemessen (S2 rechts mit $7,02 \pm 4,1$ mV; S2 links mit $4,86 \pm 3,3$ mV; S3 rechts $9,4 \pm 3,3$ mV; S3 links mit $8,42 \pm 2,8$ mV). Signifikante Unterschiede bestanden dabei im Einzelgruppenvergleich zwischen den Amplituden, die auf Höhe von S3 rechts und denen von Stimulation in S2 median, S2 rechts und S2 links abgeleitet wurden (je $< 0,02$).

Generell führte die Stimulation an S3 paramedian (S3 rechts $9,40 \pm 3,3$ mV; S3 links mit $8,42 \pm 2,8$ mV) zu höheren Werten als die gleichseitigen paramedianen Lokalisationen an S2 (S2 rechts mit $7,02 \pm 4,1$ mV; S2 links mit $6,86 \pm 2,8$ mV). Dieser Unterschied war beidseitig signifikant, rechtsseitig mit $p=0,03$ und linksseitig mit $p=0,0001$.

Tabelle 4.4: Erhobene MMEP-Parameter der Stimulationspunkte.

	S1 median	S2 median	S2 rechts	S2 links	S3 median	S3 rechts	S3 links	S4 median
Latenz	1,35 ± 0,50	1,42 ± 0,20	1,38 ± 0,16	1,30 ± 0,49	1,42 ± 0,09	1,41 ± 0,11	1,40 ± 0,08	1,37 ± 0,12
Amplitude	6,66 ± 5,55	6,37 ± 3,99	7,02 ± 4,06	6,86 ± 2,81	8,39 ± 4,30	9,40 ± 3,28	8,42 ± 2,83	7,11 ± 3,60

4.4 Kraftmessung durch periphere Magnetstimulation beim Hund

Bei jedem der Hunde waren in Narkose magneteevozierte Kontraktionen des M. quadriceps auslösbar. Mit Hilfe des Kraftsensors konnten diese Kontraktionen bei allen Hunden als Drehmoment erfasst und quantifiziert werden.

Es konnten bei allen Tieren Kontraktionen des M. quadriceps durch die repetitive Magnetstimulation erzielt werden. Die periphere Magnetstimulation des N. femoralis führte zu einer visuell wahrnehmbaren Kontraktion des M. quadriceps.

Der verwendete Kraftsensor ließ sich bei allen Tieren einfach und zügig am Bein fixieren und ermöglichte bei allen Tieren und allen Protokollen eine computerassistierte Aufzeichnung. Über die USB-Schnittstelle ließen sich die Daten kontinuierlich erfassen und in eine Excel[®]-Tabelle einlesen.

Die quadratisch normierten Werte der einzelnen Beurteilungsparameter sind in Tab. 4.5 auf der nächsten Seite einzusehen und in der Grafik 4.16 auf der nächsten Seite für die durchschnittlichen Werte der einzelnen Tiere aufgetragen.

Generell war durch Einzelpulse eine schwächere Kontraktion ($0,08 \pm 0,04$ KE) auslösbar als mit jedem der durchgeführten Burst-Protokolle ($p=0,024$). Bei letzteren führte eine zunehmende Zahl an Wellen pro Burst bis hin zum VBP zu steigenden Kraftwerten ($p=0,0001$). Während bei ZBP noch Krafteinheiten von durchschnittlich $0,15 \pm 0,06$ KE ausgelöst werden konnten, steigerte sich dies bis VBP auf $0,22 \pm 0,05$ KE.

Die mit VBP erzielten Kontraktionen sind damit die stärkste erzielte Kraft innerhalb unserer Studie ($p=0,0003$).

Zusätzlich konnte der schnellste Kraftanstieg (KE_{Incl}) mit VBP ($0,25 \pm 0,084$ KE/s) und DBP ($0,17 \pm 0,08$) erzielt werden. Sie führten damit zu signifikant schnellerem Kraftanstieg als alle anderen Stimulationsprotokolle (jeweils $p=0,007$). Abbildung 4.16 auf der nächsten Seite zeigt den Anstieg der verursachten Drehmomente vom EP zum VBP inklusive einer

Tabelle 4.5: Mittelwerte und Standardabweichungen der maximalen Kraft, Latenz und des Kraftanstiegs je Stimulationsprotokoll nach quadratischer Normierung.

	EP	ZBP	DBP	VBP	FBP	SBP
KE _{max} [KE]	0,08 ± 0,04	0,15 ± 0,06	0,17 ± 0,08	0,22 ± 0,05	0,18 ± 0,04	0,20 ± 0,08
KE _{Lat} [s]	0,15 ± 0,06	0,18 ± 0,05	0,15 ± 0,06	0,16 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,05
KE _{Incl} [KE/s]	0,09 ± 0,05	0,14 ± 0,06	0,17 ± 0,08	0,25 ± 0,08	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,08

Parabola des Drehmoments.

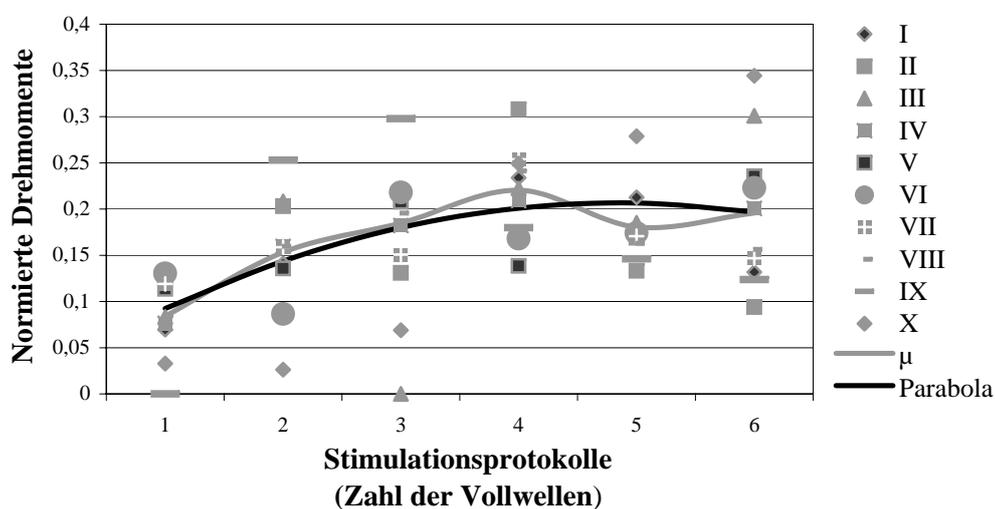


Abbildung 4.16: Parabola und normierte Einzelwerte des Kraftanstiegs je Stimulationsprotokoll.

Die Parabola zeigte dabei geringe quadratische Abweichungen ($< 3E-3$), so dass von einer hohen Zuverlässigkeit der Parabola ausgegangen werden kann. Die Mehrzahl der Einzelmessungen (8 von 10 untersuchten Tieren) zeigte eine sehr hohe Korrelation mit der errechneten Fitting-Kurve, deren Maximum ebenfalls beim VBP lag.

5 Diskussion

Im Lauf der letzten Jahre zeigten sich TMS, SMS und PMS als sinnvolle Methoden in Diagnostik, Therapie und Prognostik unterschiedlicher neurologischer und neuropsychiatrischer Erkrankungen in der Human- und Tiermedizin (Nollet et al., 2002, 2003a; Rossini und Rossi, 2007). Der Wirkungsmechanismus bereits etablierter magnetischer Stimulationsmethoden ist allerdings bis heute nicht vollständig geklärt, so dass insbesondere experimentellen Studien die Aufgabe zufällt, das Verständnis der durch die Magnetstimulation hervorgerufenen Effekte zu erweitern und damit zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten aufdecken zu können.

5.1 Neue Wege durch Magnetstimulation bei der Maus

Besonders die Maus, welche ein Modelltier zahlreicher neurologischer Erkrankungen ist (Hafezparast et al., 2002; Searle et al., 1989), kann zum Verständnis der magnetischen Wirkungsmechanismen beitragen (Zhang et al., 2007b; Robertson et al., 2002; Bergey et al., 1981; Kriz et al., 2000). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines standardisierten und reproduzierbaren Protokolls sowohl für die transkranielle als auch für die spinale Stimulation bei der Maus unter Anwendung einer dezentralisierten Achterspule.

5.1.1 SHIRPA-NP und reproduzierbare neurologische Phänotypisierung

Der neurologische Untersuchungsgang von Hund und Katze ist in der Fachliteratur ausführlich beschrieben (Laurent, 2004b) und auch die neurologische Untersuchung des Pferdes und weiterer Haus- und Nutztiere (de Lahunta, 1983; Mayhew, 2008) ist Teil der veterinärmedizinischen Routinediagnostik.

Die neurologische Untersuchung an wachen Labormäusen gestaltet sich demgegenüber als schwierig. Aufgrund der geringen Größe fallen besonders die manipulativen neurologischen Tests, wie die Überprüfung der Sehnenreflexe, in den Bereich der Unmöglichkeit. Die zum Teil geringe Kooperationsbereitschaft der Tiere im Gegensatz zu anderen Nagern wie der Ratte erschwert einige Untersuchungen, vor allem im Kopfbereich, erheblich.

Das SHIRPA-Protokoll bietet daher eine optimale Möglichkeit, in kurzer Zeit eine hohe Zahl neurologischer Tests durchzuführen und das Tier dabei möglichst wenig fixieren oder stressreich manipulieren zu müssen. Das SHIRPA-NP, das speziell zur Überprüfung der neuromuskulären Funktionen zusammengestellt wurde, erwies sich als zuverlässige Methode zur Feststellung und Beurteilung des entsprechenden neurologischen Status des Versuchstieres. Auch ermöglicht das SHIRPA-NP eine sichere Erkennung phänotypisch gesunder Tiere.

Zur Sensibilitätssteigerung des Untersuchenden und zur Erfassung der individuellen Wahrnehmungsunterschiede hat sich insbesondere die Untersuchung neurologischer Mäusemutanten als sehr hilfreich erwiesen. Für die standardisierte Durchführung und reproduzierbare Datenerhebung muss eine Lernkurve von jeweils etwa dreißig neurologisch auffälligen und gesunden Tieren veranschlagt werden.

Bezüglich publizierter Referenzwerte sind deutliche Diskrepanzen zwischen unterschiedlichen Mauslinien bekannt (Schneider et al., 2006; Rogers et al., 1999), wie sich eindrücklich an der Linie C57 und ihren Subtypen C57BL/6 und C57BL/10 zeigt (Crawley et al., 1997). Entsprechend wählten wir die Referenzen gezielt für die durch uns untersuchte Mauslinie C57BL/6 aus.

Die von Schneider et al. (2006) aufgeführten SHIRPA-Werte können dabei für die Linien C57BL/6J, C3HeB/FeJ, BALB/cByJ und 129S2/SvPas herangezogen werden. Rogers und Kollegen (1999) untersuchten des Weiteren die Linien C57BL/6, C3H, BALB/c, 129/Sv, DBA/2 und CBA/Ca.

Die erhobenen Scores unserer eigenen Tiere bewegten sich im publizierten Normalbereich und rechtfertigten so die Beurteilung als „neurologisch gesund“.

Abweichende durchschnittliche Scores zu publizierten Daten ergaben sich für die Parameter Gewicht, Körperlänge, Griffstärke, provoziertes Beißen, Reizbarkeit und negative Geotaxis. Diese lassen sich zum Teil eindeutig auf das Alter der von uns untersuchten Tiere und auf Unterschiede der genutzten Geräte zurückführen.

Während die von Schneider et al. (2006) untersuchten Mäuse 10 Wochen alt waren, sind die bei uns untersuchten Tiere im Test bereits 1 Jahr alt gewesen. Da jedoch das Wachstum der Mäuse mit 10 Wochen noch nicht abgeschlossen ist, waren das höhere Gewicht und die größeren Körpermaße bei unseren Tieren zu erwarten (Isler, 2003).

Das seltenere Vorkommen von provoziertem Beißen und die geringere Reizbarkeit könnten hingegen auf einer Art „Genselektion“ basieren. Besonders wenig aggressive und – damit korreliert – weniger explorative Tiere könnten zur geringen Ausprägung aggressiven Verhaltensweisen im Laufe vieler Generationen geführt haben (Parmigiani et al., 1999). Auch die geringere Bewegungsaktivität unserer Tiere im Vergleich zum Referenzwert könnte mit diesem wenig explorativen Verhalten zusammenhängen. Da insbesondere die selteneren Bissversuche ein für den Untersuchenden und das Tier stressarmes Handling erlaubt, war diese

„Auffälligkeit“ für die Manipulation der Tiere im Versuch willkommen.

Die geringere Griffstärke der untersuchten Tiere im Vergleich zum Referenzwert liegt wahrscheinlich im subjektiven Eindruck des Untersuchenden begründet. Da zur Beurteilung der Griffstärke kein elektronisches Gerät zu Verfügung stand, zog sich der „empfundene“ Bewertungsscore durch alle Kraftbeurteilungen und belief sich dadurch auf einen insgesamt erhöhten Scorewert im Vergleich zum Referenzwert.

Speziell für die Erhebungen von Daten zur Kraftentwicklung einer Maus bieten justierte Messgeräte vermutlich genauere Daten als der subjektive Eindruck des Menschen, da die feinen Unterschiede der Muskelkontraktionen verschiedener Mäuse selbst durch ein und denselben Untersuchenden schwer erfassbar sind.

Solche Tests allerdings, die der Kooperation und der Lernfähigkeit des Tieres unterliegen, wie das Halten am Gitter und das Rotarod, waren trotz justierter Messgeräte ebenfalls schwierig zu bewerten. Beispielsweise konnte vereinzelt ein „Mit-Rotieren“ der Tiere beobachtet werden, wie es auch Schneider und Kollegen (2006) bei ihren C57BL/6-Tieren beschrieben.

Zudem ließen sich einzelne Mäuse scheinbar willentlich vom rotierenden Rotarod oder Gitter fallen. Trotz wiederholter Testdurchführung mit einer Erholungspause von jeweils etwa 20 Minuten ließen sich diese Tiere weiterhin bereits nach kurzer Zeit fallen. Sie schienen zu begreifen, dass die Höhe des Objektes keine unüberwindbare Hürde darstellt, um dem Prozedere zu entkommen.

Eine Erklärung für das Hinaufklettern der Tiere am vertikal gehaltenen Gitter, statt nach dem Umdrehen zu verharren, könnte darin liegen, dass ihnen mehr Zeit zur Verfügung gestellt wurde als in vorausgegangen Studien. Während die Versuchsdurchläufe mit sehr hohen Tierzahlen rasch ablaufen, hatten die Tiere bei der Durchführung des SHIRPA-NP ausreichend Zeit, um nach dem Drehen und einer möglichen Orientierungszeit mit dem Aufstieg zu beginnen.

Einzelne Tiere hatten zudem Schwierigkeiten, das horizontale Seil im SHIRPA-NP gezielt mit den Hinterextremitäten zu ergreifen. Da die Tiere in keiner Weise auf das Protokoll vorkonditioniert wurden, reagierten sie möglicherweise unterschiedlich auf diese neue Anforderung, was sich anhand der sonst völlig unauffälligen Scores herauskristallisierte.

Insgesamt ist das SHIRPA-NP sensibel für Auffälligkeiten des Nervensystems und der neuromuskulären Funktionen. Parameter des allgemeinen Gesundheitszustandes sind allerdings nicht über die strikte Durchführung der Einzeltests erfassbar. Dementsprechend muss speziell die Adspektion des Tieres mit hoher Aufmerksamkeit durchgeführt werden. Geräusche wie Niesen oder Zähneknirschen und Ausfluss aus Augen oder Nase könnten bei ausschließlicher Durchführung der SHIRPA-NP-Tests übersehen werden.

Speziell für eine Anästhesie der untersuchten Tiere ist die Erhebung der allgemeinen Gesundheitsparameter sehr wichtig und diese sollten auch in entsprechende Untersuchungspro-

tokolle aufgenommen werden.

5.1.2 Die Stimulusintensität als Garant für maximale Potentiale

Die Wahl eines supramaximalen Stimulus ist für die Beurteilung des Einflusses definierter Narkoseprotokolle auf evozierte Motorpotentiale unabkömmlich. Diese Maßnahme sichert die Einstufung der Potentialparameter dahingehend ab, dass erhobene Amplitudenunterschiede auf rein pharmakologische Einflüsse zurückgeführt werden können.

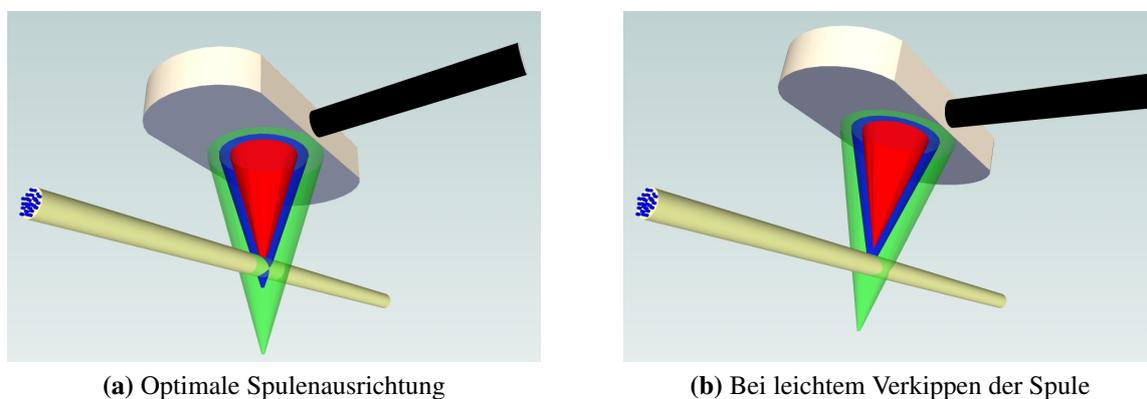


Abbildung 5.1: Simulation unterschiedlicher Feldstärken unterhalb einer Achterspule mit aufsteigender Stimulusintensität zur Aktivierung der Motoneuronen eines Nervs (blauer Zylinder). Roter Kegel = submaximale Stimulusintensität; Blauer Kegel = maximale Stimulusintensität; grüner Kegel = supramaximale Stimulusintensität.

Die Bestimmung der supramaximalen Stimulusintensität über den Wert einer maximalen Reizauslösung hinaus garantiert eine maximale Magnetfeldausdehnung, die durch schwächere Stimuli nicht einzuhalten wäre. Dieses vergrößerte Magnetfeld induziert in Folge ein ausgedehnteres elektrisches Feld, welches auch bei leichtem Verkippen der Spule weiterhin das gewünschte Zielareal und damit dessen Motoneuronen erfassen und depolarisieren kann.

Submaximale Felder würden bei Verkippen der Spule nur einen Teil der Motoneuronen treffen und so zu variablen und abgeschwächten Potentialen führen.

Abbildung 5.1 zeigt verschiedene Stimulationsintensitäten zur Aktivierung eines Nerven. Die unterschiedlich großen Kegel repräsentieren dabei die unterschiedlichen Feldausdehnungen eines submaximalen, maximalen und supramaximalen Stimulus. Dabei ist zu sehen, dass bei optimaler Positionierung der Spule der gesamte Nerv bereits mit maximalem Reiz aktiviert werden kann. Jedoch garantiert nur der supramaximale Reiz, dass auch bei Verkippen der Spule die Reizauslösung in einer maximalen Anzahl an motorischen Axonen erfolgt.

Eine kleinere Zahl von aktivierten Motoneuronen führt auch zu einer kleineren MMEP-Amplitude als bei Rekrutierung der Gesamtheit aller im Zielgebiet vorhandenen Fasern. Da

eine solche Amplitudenverkleinerung durch axonale Untergänge (Cuddon, 2002) und hemmende pharmakologische Einflüsse (Ziemann, 2004) hervorgerufen werden kann, bewahrt die supramaximale Reizstärke den Untersuchenden vor einem Abflachen der Ergebnisse durch topographische Unschärfen während der Durchführung der Stimulation am Tier. Die Zuordnung der Potentialparameter zur entsprechenden endogenen Situation ist damit erheblich verbessert.

Die durch unsere Untersuchungen als supramaximal festgelegte Stimulusintensität lag mit 75% Stimulorkapazität niedriger als die durch Zhang und Kollegen (2007a) für die Magnetstimulation der Maus verwendete Impulsstärke. Diese lösten transkranielle MMEPs in der Maus mit Hilfe einer 5 cm-Rundspule aus, arbeiteten dabei mit einer maximalen Stimulorkapazität von 100% und verwendeten – analog zu unseren Untersuchungen – ein 2 T-Gerät.

Zhang und Kollegen (2007a) positionierten den Rand der Rundspule allerdings auf dem kaudalsten Punkt des Os occipitale der Tiere, was einen Vergleich der Ergebnisse zu den unseren erschwert, denn in dieser Region ist der Querdurchmesser des stimulierten Gewebes deutlich größer als der des Rückenmarks, was eine höhere Intensität zur Aktivierung aller Motoneuronen notwendig macht (Chan et al., 2007). Da keine Daten zur Potentialentwicklung nach Intensitätssteigerung vorliegen, ist auch nicht klar ersichtlich, ob die Aktivierung der maximalen Motoneuronenzahl im Versuch gewährleistet war. Falls die Stimulusintensität, die sich aus Stimulator- und Spuleneigenschaften ergibt, nicht ausreichend war, um einen mindestens maximalen Reiz in dieser Region zu applizieren, könnte dies ein Grund für die deutlich niedrigeren Amplituden von Zhang und Kollegen (2007a) im Vergleich zu unseren spinal evozierten Potentialamplituden sein.

Es gelang uns nach spinaler Stimulation, am M. gastrocnemius der Maus MMEPs mit einer Potentialspannung von $8,66 \pm 3,1$ mV abzuleiten, die damit fast dreimal so hoch wie die Amplituden bei Zhang und Kollegen (2007a) mit $2,65 \pm 1,1$ mV waren. Auch die im Kapitel 4.3 auf Seite 87 beschriebenen transkraniellen MMEP-Amplituden unserer Untersuchungen lagen deutlich über den von Zhang beschriebenen Amplituden.

Dieses Ergebnis verdeutlicht die enorme Steigerung der Depolarisationskapazität der in unseren Untersuchungen verwendeten dezentralisierten Achterspule im Vergleich zu den bislang primär verwendeten Rundspulen zur Nagerstimulation.

Diese auch in Feldrechenprogrammen angesprochene Effektsteigerung der fokalen Achterspule könnte die Stimulation noch kleinerer Hirne, wie beispielsweise die junger Mäuse, ermöglichen. Besonders repetitive Stimulationen und deren Langzeitwirkung auf Läsionen oder auch auf Entwicklung und Verschaltung des Hirnparenchyms wären dabei von Interesse. Beispielsweise könnte der modulatorische Effekt der Magnetstimulation auf die Ausschüttung neurotropher Faktoren oder auch die Expression von Immediate-early Genen im Bereich von Läsionen des ZNS (Zhang et al., 2007a) eingesetzt werden und damit ein Ein-

blick in die Aktivierung und Verschaltung intakter neuronaler Zellen erlangt werden (Sheng und Greenberg, 1990).

Eine Forschergruppe (Yue et al., 2009) testete kürzlich den Effekt repetitiver transkranieller Magnetstimulation auf die Ausschüttung von Glutamat und GABA im Rattenhirn. Sie nutzten dazu eine Aichterspule und repetitive Stimulationen mit 0,5 Hz. Die Stimulationen resultierten in veränderten Neurotransmitter-Konzentrationen in spezifischen Hirnregionen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Frequenzen über 1 Hz sind insbesondere für länger andauernde inhibitorische oder erregende Reizapplikation interessant (Reid, 2003). Allerdings ist die von uns genutzte fokale Aichterspule bislang nur auf Stimulationsfrequenzen bis 1 Hz ausgelegt. Höhere Stimulusfrequenzen können zwar appliziert werden, jedoch nur für einen sehr kurzen Zeitraum, da sich die Spule bei hoher Frequenz stark erhitzt (Wendicke, 2006). Für höherfrequente Stimulation mit der von uns genutzten Aichterspule müsste das technische Hindernis der Überhitzung verhindert oder eine effektive Kühlmethode entwickelt werden.

Zusammenfassend konnte diese Untersuchung bestätigen, dass die gesteigerte Depolarisationskapazität der dezentralisierten Aichterspule zur Auslösung motorischer Potentiale bei der Maus einsetzbar ist, so dass die gezielte Reizapplikation zur Darstellung der motorischen Bahnen genutzt werden kann.

5.1.3 Virtueller und tatsächlicher Bezug von Feldparametern und Stimulationsmaxima im lebenden Tier

Da Rechenprogramme entstehende elektrische Felder über einer Spule unter Annahme eines fiktiven, homogenen Körpers simulieren, jedoch ein solch homogener Körper nicht mit den inhomogenen Strukturen eines lebenden Tieres übereinstimmt, ist eine Überprüfung der Feldberechnungen in vivo notwendig.

Der Körper eines Lebewesens enthält Gewebe unterschiedlicher Leitfähigkeit, die einen Einfluss auf die Ausdehnung, Ausrichtung und Tiefenreichweite der Felder haben (Davey et al., 1994; Krasteva et al., 2003). Insbesondere der Übergang zwischen den einzelnen Geweben, wie zum Beispiel zwischen Haut zu Unterhaut, kann eine Beugung der elektrischen Felder im Bereich von Gewebegrenzen (Mathis et al., 1995) bewirken und so eine Vorhersage des tatsächlich stimulierten Areals erschweren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die in aufwendigen Rechenprogrammen erhobenen Feldparameter mit den tatsächlich in vivo an der Maus abgeleiteten motorischen Potentialen verglichen. Neben der Beurteilung der Depolarisationskapazität der Felder im Fokuspunkt wurde die Auslösbarkeit motorischer Potentiale an zwei weiteren Spulenlokalisationen getestet und der jeweilige Abstand bis zum Verlust der Neuronenaktivierung für die jeweiligen

Spulenbereiche ausgewertet.

Die im Feldrechenprogramm erhobenen Daten konnten zum Teil bestätigt werden und in den Punkten Fokalität, Abstandsreichweite und Stimulationsrichtung ergänzt und so ihre Anwendung für eine in vivo durchgeführte Magnetstimulation optimiert werden.

Virtuelle Feldparameter der Spule versus in vivo Bereich der Depolarisation

Alle angeführten Kalkulationen beziehen sich auf die bei den Magnetstimulationen der Maus verwendete dezentralisierte Achterspule.

Das Volumen eines stimulierten Körpers spielt für die magnetische Feldausdehnung eine bedeutende Rolle, da sich die für die Reizentwicklung notwendigen Ringströme nur in leitendem Gewebe entwickeln können, während die umgebende Luft nicht leitend ist (Harms, 2007). Die Maus, die insgesamt nur ein kleines Volumen zur Reizauslösung bietet, stellt daher eine besondere Herausforderung für die Gestaltung spezieller Reizspulen bzw. für die Reizauslösung dar (Weissman et al., 1992).

Abbildung 5.4 auf Seite 101 zeigt ein Rechenbeispiel für die elektrische Feldentwicklung in zwei fiktiven homogenen Körpern in einer Distanz von etwa 10 mm zur Spule. Abbildung 5.4a auf Seite 101 zeigt die Berechnungen für einen Körper mit einer größeren Ausdehnung als die Stimulationsspule selbst. Es ist zu erkennen, dass sich die elektrischen Felder exakt in der Form entwickeln, wie sie physikalisch für eine Achterspule zu erwarten sind (Pascual-Leone et al., 2002; Siebner und Ziemann, 2007). Im Bereich der Spulenmitte kommt es zur Summation der elektrischen Feldstärke, während die Windungen der Einzelspulen in ihrem restlichen Verlauf etwa halb so hohe Feldstärken aufweisen. Zusätzlich ist erkennbar, dass im Bereich der Einzelspulenzentren ein Absinken der Feldstärke in Richtung 0 V/m erfolgt. Abbildung 5.4b auf Seite 101 zeigt dagegen die elektrischen Felder, die in einem Gewebe entstehen, welches ungefähr die gleichen Ausmaße wie die Spule besitzt. An den Körpergrenzen fallen die Feldstärken scharf ab, da keine Ringströme mehr entstehen können. Zusätzlich zum Fokuspunkt existieren hier zwei weitere Bereiche hoher Feldstärken über dem Spulenwindungsbereich. Übereinstimmend ist rechts und links des Fokuspunktes die abfallende Feldstärke über den Einzelspulenzentren erkennbar.

Abbildung 5.2 auf der nächsten Seite gibt ein im Feldrechenprogramm erstelltes Histogramm des elektrischen Feldes wieder, das unterhalb der im Versuch verwendeten dezentralisierten Spule induziert wird, und schließt zusätzlich den Feldgradienten ein, gebildet aus dem Betrag des elektrischen Feldes, differenziert in Y-Richtung (Wendicke, 2006).

Die Grafik zeigt, dass sich der Punkt des stärksten elektrischen Feldes (rote Spitze des Kegels) und der Bereich des maximalen Feldgradienten (tiefster Punkt der schwarzen Kurve) voneinander unterscheiden. Da beide Parameter gemeinsam für die Potentialauslösung ver-

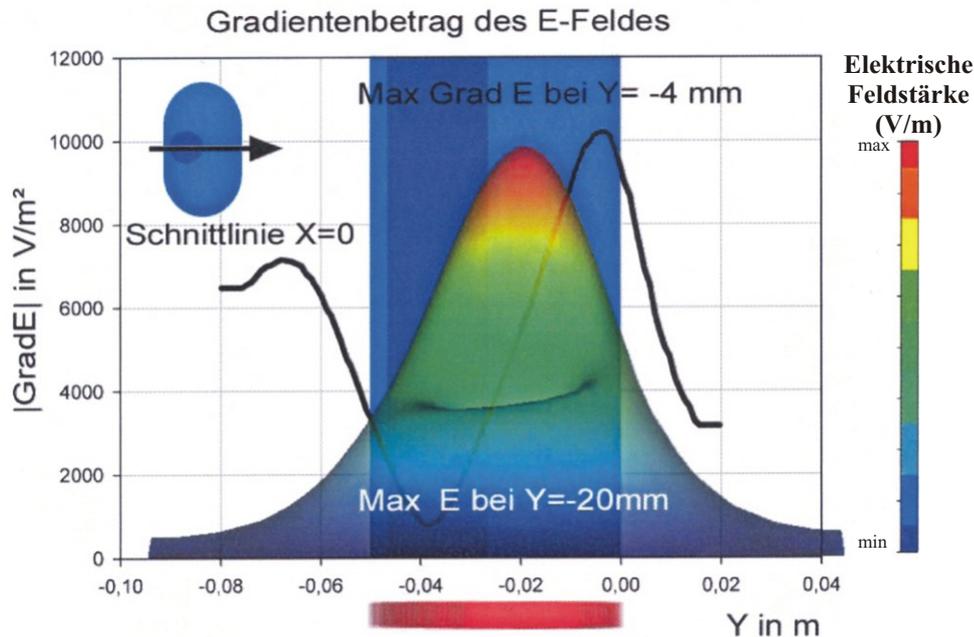


Abbildung 5.2: Simulation der elektrischen Feldstärke und des Feldgradienten der dezentralen Spule (verändert nach Wendicke, 2006).

antwortlich sind, besteht generell die Ansicht, dass die Depolarisation des erregbaren Nervengewebes an einem weiteren, nicht eingezeichneten Punkt stattfindet. Dieser Punkt der optimalen Depolarisation wird vereinfacht anhand der Multiplikation von elektrischem Feld und Gradienten bestimmt (Aussage PD Weyh, unveröffentlicht, Ruohonen et al., 1996). Im Fall der durch uns verwendeten dezentralisierten Spule liegt dieser „Fokuspunkt“ etwa 12 mm vom Rand der Spule entfernt auf der dem Spulengriff gegenüber liegenden Seite.

Abbildung 5.2 zeigt eine Simulation von Feldstärke und Feldgradient dieser dezentralen Spule. Dabei gibt die Abbildung allerdings nicht wieder, dass es sich bei der Feldausdehnung um ein dreidimensionales Areal handelt, da sie keine Darstellung der Feldstärke im Verhältnis zum Abstand der Spule enthält, sondern nur die Stärke des Feldes in einer Ebene unterhalb der Spule darstellt. Der über der Spule befindliche Kegel in Abb. 5.2 zeigt ausschließlich die in jedem Punkt der Spule ausgelöste elektrische Feldstärke an, ohne eine Eindringtiefe und damit das Areal der Reizauslösung zu definieren. Dadurch reflektiert die Grafik die in-vivo-Situation nur bedingt.

Verständlicher wird dies in Abb. 5.3 auf der nächsten Seite, welche die Stärke des elektrischen Feldes auf einer Ebene parallel zur Spulenfläche zeigt.

Aus dieser Abbildung wird neben der Darstellung der Feldstärken im Raum zusätzlich ersichtlich, dass es sich bei dem Bereich der höchsten Feldstärken um ein ovales Areal handelt. Dies lässt sich damit erklären, dass hier die Windungen der Kupferleiter in direkter Nachbar-

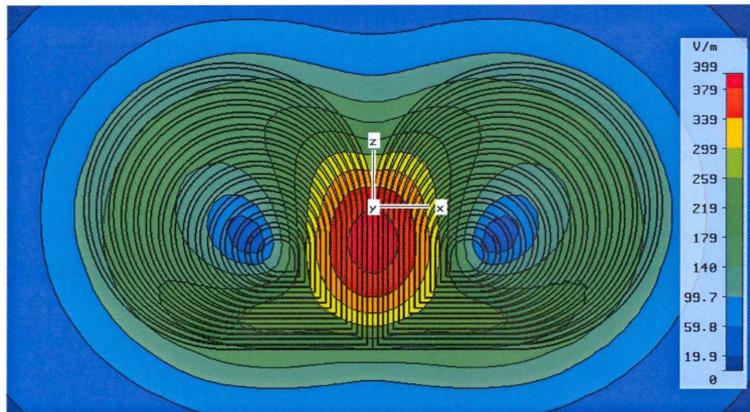


Abbildung 5.3: Simulation der elektrischen Feldstärken auf einer Ebene parallel zur dezentralen Spulenoberfläche (aus Wendicke, 2006).

schaft zueinander liegen und sich damit die durch sie induzierten elektrischen Felder addieren (siehe dazu Kapitel 2.1.2 auf Seite 4).

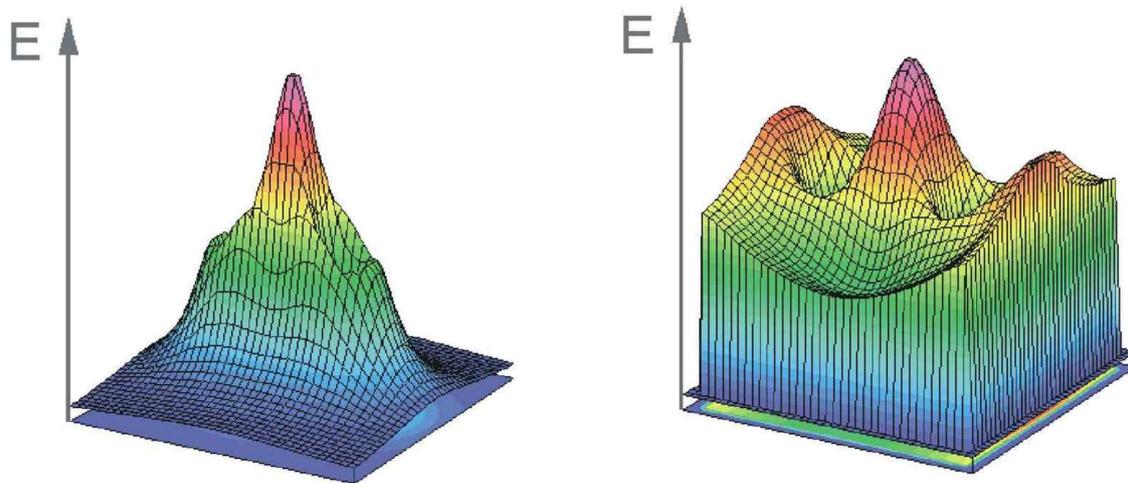
Durch diese lokal gesteigerte Feldstärke und -ausdehnung eignen sich Achterspulen ausgezeichnet für präzise topographische Stimulationen. Dagegen ist das elektrische Feld bei Rundspulen unterhalb des Spulenzentrums gleich Null, da das elektrische Feld ringförmig im Bereich der Spulenwindungen entsteht. Mit Rundspulen ist daher keine fokale Stimulation möglich und eine große Ungenauigkeit des Stimulationsareals gegeben.

Mit Hilfe der in vivo an der Maus durchgeführten Untersuchungen konnte die höchste Depolarisationskapazität im Fokuspunkt der zuvor beschriebenen dezentralen Spule bestätigt werden. Ausgehend von der errechneten Spulenlokalisierung des Fokuspunktes verloren die abgeleiteten Potentialamplituden in alle drei Richtungen des Raumes zunehmend an Höhe. Dies zeigt, dass die Feldstärke ebenfalls mit zunehmendem Abstand zum Fokuspunkt sinkt und so auch geringere Kapazität zur Depolarisation aufweist.

Zusätzlich zu Stimulationen mit dem Fokuspunkt wurden mit zwei weiteren Spulenbereichen ähnliche Erhebungen durchgeführt und auch hier konnten die bestehenden Feldrechnungen bestätigt werden. Übereinstimmend mit Erhebungen zu Objekten, die kleiner als die Spulenfläche sind, konnten wir in diesem Bereich der Spulenwindungen Potentiale mit etwa 70%iger Amplitudenhöhe der im Fokuspunkt ausgelösten Potentiale erreichen (Abb. 5.4 auf der nächsten Seite).

Auch konnte eine Depolarisationsmöglichkeit im Spulenrandbereich aufgezeigt werden, die allerdings nur bei direktem Kontakt darstellbar war und auch nur zu minimalen Potentialamplituden führte.

Wie im Feldrechenprogramm angezeigt, konnten wir die ovale Form des maximalen Feldes bestätigen. Während in Längsachse der Spule bis zu 6 mm vom Fokuspunkt entfernt maxima-



(a) Feldberechnung zu einem Körper größer als die Spule

(b) Feldberechnung zu einem Körper etwa gleicher Größe wie die Spule

Abbildung 5.4: Feldstärken der dezentralisierten Spule in einer Ebene von 10 mm Abstand zur Spulenoberfläche an einem Objekt a) größer als die Spule und b) etwa gleich groß wie die Spule (aus Wendicke, 2006).

le Amplituden auslösbar waren, konnten in rechtem Winkel dazu bis zu 9 mm weit maximale Potentiale abgeleitet werden.

Daher bietet sich die Ausrichtung der Spulenlängsachse parallel zur Wirbelsäule der Maus an, da damit das Areal der Reizauslösung im stimulierten Gewebe klein und damit definierter gehalten wird.

Zu erwähnen bleibt dabei, dass auch in dieser Spulenausrichtung eine gleichzeitige Stimulation benachbarter Strukturen gegeben ist. Bis zu einem Abstand von 26 mm vom Fokuspunkt entfernt ist eine Reizauslösung in der Längsachse der Spule möglich. Daher sind bei einer sehr dicht an der Spule liegenden Positionierung der Ableitelektroden Artefakte möglich.

Insgesamt unterscheidet sich die Stärke des elektrischen Feldes um den Fokuspunkt herum deutlich von der Stärke am Fokuspunkt selbst, so dass nur vergleichsweise niedrige Amplituden abgeleitet werden können. Für optimale Ergebnisse der Magnetstimulation an der Maus wäre eine definiertere Fokuspunktdimension wünschenswert, diese ist jedoch bislang durch fehlende technische Möglichkeiten nicht realisierbar.

Des Weiteren konnte die Ausdehnung der elektrischen Felder und damit die optimale Tiefenreichweite bis in eine Tiefe von ca. 3–4 mm entfernt von der Spule festgelegt werden. Bei größerer Distanz war eine Amplitudenabsenkung zu beobachten und ab einer Distanz von 9 mm zur Spulenoberfläche nur noch die Hälfte der Amplitudenhöhe erreichbar.

Da die Feldstärke in Feldrechenprogrammen ebenfalls mit zunehmendem Abstand zur Spule abnehmen soll, sind die sinkenden Amplitudenhöhen in Einklang mit den erhobenen Feldrechnungen zur dezentralisierten Spule (Abb. 4.5 auf Seite 81, Abb. 5.5).

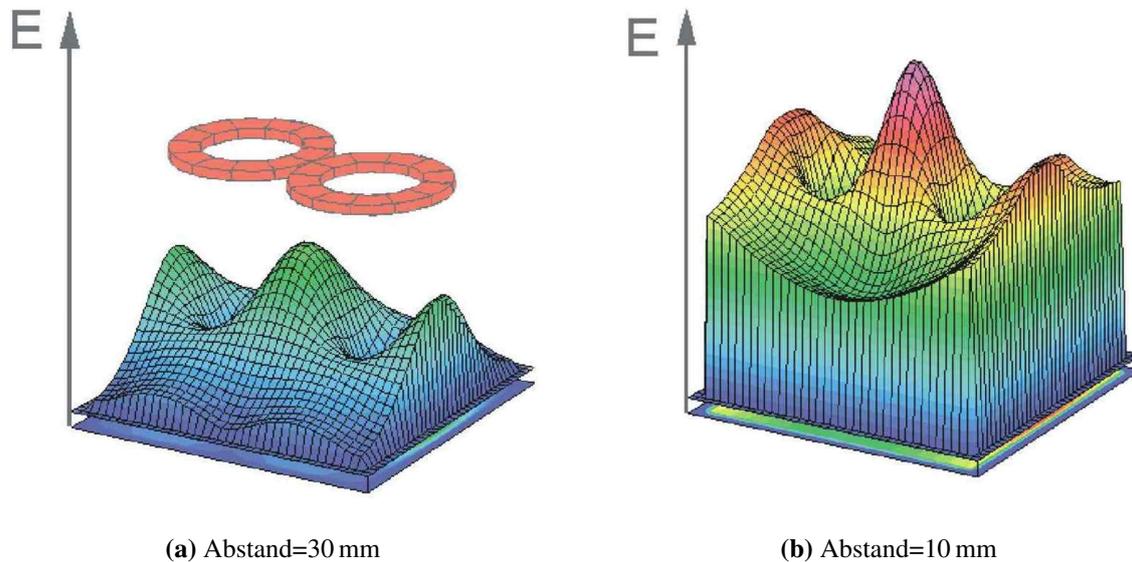


Abbildung 5.5: Feldstärken der dezentralisierten Spule auf einer Ebene parallel zur Spulenoberfläche im Abstand von a) 30 mm und b) 10 mm (Berechnungen durch Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München).

Letztere gehen allerdings davon aus, dass bei 100% Reizintensität des Stimulators bis zu einem Abstand von 10 cm von der Spule noch maximale elektrische Feldstärken entstehen, während wir bei einem Abstand von 10 cm zur Maus nur noch Potentialamplituden von etwa 25% im Vergleich zum direkten Kontakt zur Wirbelsäule erzielen konnten.

Möglicherweise resultiert dies aus der niedrigeren Stimulusintensität in unserem Versuch oder aus der fehlenden Entwicklung von Ringströmen in der zwischen Spule und Maus befindlichen Luft, da die Tiefenreichweite über einen zunehmenden Abstand zur Maus nachvollzogen wurde. Die direkte Ankopplung eines Körpers an die Spule scheint daher sinnvoller auch für die Feldentstehungen in der Tiefe.

Optimale Winkelausrichtung von Spule zu Rückenmark

Auch die Stimulationsrichtung beziehungsweise die Richtung des Stromimpulses im Verhältnis zum Verlauf der Axone sollte gezielt gewählt werden, da wir bei der Rotation der Spule bestätigen konnten, dass bei gleicher Richtung von elektrischem Feld und axonaler Reizweiterleitung höhere Amplituden ausgelöst werden können als in Gegenrichtung (Pascual-Leone et al., 1999).

Zudem konnte der Winkel von Spule zu Rückenmark als bedeutender Faktor für die Reizauslösung benannt werden. Die Rotationsversuche ergaben, dass insbesondere im spitzen Winkel oder orthogonal zum Rückenmark auftreffende elektrische Felder zu hohen MMEP-Amplituden führen. Dies stimmt mit publizierten Beobachtungen überein, wonach eine Gradientenabweichung zwischen fortleitendem Nerv und elektrischem Feld eine Depolarisation am Axon hervorrufen soll (Siebner und Ziemann, 2007).

Während sich Winkel von 22,5°, 45°, 60°, 67,5°, 120°, 150° und 292,5° zwischen Spule und Rückenmark als ungeeignet zur MS am Rückenmark der Maus erwiesen, stellte sich ein Rotationswinkel von etwa 30° als optimal zur Amplitudenauslösung bei Potentialableitung am linken M. gastrocnemius dar.

Vermutlich ist die Ableitung der Potentiale an der zur Spule gewandten Seite dafür verantwortlich, dass dabei eine seitenabhängige Amplitudenauslösung bei dieser Winkelung zum Rückenmark resultierte. Möglicherweise kam es so zur präferentiellen Aktivierung der Motoneuronen bzw. ihrer Axone auf der spulenzugewandten Seite.

Die Positionierung der Spule im 30°-Winkel zum Rückenmark ist für Untersuchungen an der lebenden Maus in Seitenlage ohne spezielle Aufbauten allerdings schwer realisierbar, da ein Verkippen der Spule in Richtung Unterlage nicht möglich ist, insbesondere wenn der direkte Kontakt zwischen Spule und Tier beibehalten werden soll. Selbst bei Positionierung der Tiere in Bauchlage wäre eine Konstruktion notwendig, welche die Spule von oben an das Tier heranführt. Ein solcher Aufbau erschwert jedoch Manipulationen und behindert zudem das Monitoring sowie die Atmung der Tiere.

Zusammenfassend entschieden wir uns für eine orthogonale Ausrichtung der elektrischen Stimuli zum Rückenmark, da in dieser Spulenausrichtung ebenfalls hohe und reproduzierbare Potentiale ausgelöst werden konnten und zusätzlich keine Richtungsabhängigkeit oder Seitenbetonung festzustellen war.

Insgesamt zeigen unsere Untersuchungen, dass die in vivo Überprüfung und Erweiterung rechnerisch erhobener Daten unabkömmlich sind für die Erfassung der tatsächlichen Reizwirkung der Magnetstimulation im lebenden Tier. Bestehende Feldrechenprogramme können die tatsächlichen Auswirkungen im erregbaren Gewebe nicht ausreichend voraussagen und die Praktikabilität resultierender Versuchsaufbauten muss zusätzlich mitbeurteilt werden.

Zum optimalen spinalen Versuchsaufbau sollte die Spule in direkten Kontakt zur Hautoberfläche des Tieres gebracht werden und die Längsachse der Spule dabei parallel zur Wirbelsäule verlaufen. Dadurch können stabile, seitenunabhängige Potentialamplituden ausgelöst und eine möglichst definierte maximale Feldausdehnung genutzt werden.

5.1.4 Welche Narkose ist also zur Magnetstimulation der Maus geeignet?

Die motorische Erregungsweiterleitung nach Stimulation wird anhand der abgeleiteten motorischen Potentiale, speziell an deren Latenz und Amplitude, beurteilt. Da diese neben krankhaften Veränderungen der Leitungsbahnen zusätzlich durch willkürliche Kontraktionen veränderbar sind, ist für die Stimulation am unkonditionierten Tier die Anästhesierung des Tieres unabkömmlich (Van Ham et al., 1994).

Allerdings wirken auch die hemmenden oder erregenden Komponenten der Pharmaka auf die erhobenen Potentialparameter ein, wie zahlreiche Studien zur Magnetstimulation unter Anästhesie zeigen konnten (Boroojerdi, 2002; Chiba et al., 1998; Di Lazzaro et al., 2003; Ghaly et al., 1990a,b; Glassman et al., 1993; Young und Sylvestre, 1993; Young et al., 1994; Van Ham et al., 1996, 1995, 1994; Taniguchi et al., 1993; Stone et al., 1992; Sihle-Wissel et al., 2000; Schmid et al., 1992; Scheufler und Zentner, 2002).

Der Einfluss durch die Pharmaka erfolgt entweder direkt über Ionenkanal-Verschiebungen oder über die Veränderung der Neurotransmitter Homeostase (Ziemann, 2004; Ebert et al., 2002). Da die Wirkung der Anästhetika an Rezeptoren des ZNS erfolgt und diese sowohl auf kortikaler Ebene als auch auf spinaler Ebene in unterschiedlicher Zahl vorkommen (Bowery und Smart, 2006), ist auch der Effekt der Pharmaka auf beiden Ebenen zu erwarten.

Gleichermaßen dokumentierte die Gruppe um Chiba (1998) einen unterdrückenden Effekt von Nembutal auf die magnetisch evozierten H-Reflexe, während die F-Welle und M-Welle unbeeinflusst blieben (Chiba et al., 1998). Beim H-Reflex handelt es sich um eine Reizweiterleitung von distal über den sensorischen Anteil des peripheren Nerven nach proximal in das Dorsalhorn des Rückenmarks. Dort erfolgt dessen Verschaltung auf das Motoneuron im Ventralhorn des Rückenmarks, welches den Reiz über die Motoneuronen des peripheren Nerven zur aufzeichnenden Elektrode überträgt (Mesrati und Vecchierini, 2004). Damit handelt es sich beim H-Reflex um ein polyneurales Potential mit synaptischer Verschaltung. Die F- und die M-Welle dagegen sind Aktionspotentiale, die ausschließlich im peripheren Anteil des motorischen Nerven verlaufen (Hopf et al., 1996). Entsprechend kann nach den Ergebnissen von Chiba und Kollegen (1998) davon ausgegangen werden, dass die übereinstimmend depressive Wirkung der Anästhetika auf die Erregbarkeit der Motoneuronen sowohl auf kortikaler als auch spinaler Ebene erfolgt.

Bislang wurden unterschiedliche Narkosemittel in zahlreichen Studien an unterschiedlichen Spezies untersucht. Tab. 5.1 auf der nächsten Seite gibt eine Reihe an Veröffentlichungen wieder, die sich unter anderem mit der Anwendung von Anästhetika beschäftigen, die im Zuge unserer Untersuchung verwendet wurden.

Entsprechend zu diesen Studien konnten wir in der vorliegenden Untersuchung den Ein-

Tabelle 5.1: Literaturübersicht zu durchgeführten Studien über die Wirkung verschiedener Anästhetika auf die MMEPs unterschiedlicher Spezies.

Pharmakon	Wirkstoff	Wirkungsweise	Mensch	Hund	Kaninchen	Ratte
Propofol	Phenolderivat	Bindet an den GABA-Rezeptorkomplex	Amplitude: ↓ Latenz: kein Einfluss (Kalkman et al., 1992)	Amplitude: ↓ Latenz: ↑ (Van Ham et al., 1995)	MMEPs selten ableitbar, insgesamt sehr variabel in Amplitude und Latenz (Scheufler und Zentner, 2002)	Amplitude: ↓ Latenz: ↑ !Dosisabhängig! (Fishback et al., 1995)
Ketamin	Phenzyklidin-derivat	Bindet an NMDA-Rezeptor, Opiat-Rezeptor und GABA-Rezeptorkomplex (=dissoziative Anästhesie)	Amplitude: ↑ Latenz: kein Einfluss (Di Lazzaro et al., 2003)	Amplitude: ↑ Latenz: kein Einfluss (Glassman et al., 1993)	Amplitude: kein Einfluss a)niedrige Dosis: kein Einfluss b)hohe Dosis: ↓ Latenz: kein Einfluss (Scheufler und Zentner, 2002)	Amplitude: kein Einfluss Latenz: kein Einfluss (Chiba et al., 1998)
Etomidate	Imidazol-Derivat	Moduliert und aktiviert β -Untereinheit des GABA-Rezeptors	Amplitude: ↓ Latenz: kein Einfluss (Kalkman et al., 1992)	Amplitude: kein Einfluss Latenz: ↑ an HE (Glassman et al., 1993)	Amplitude: kein Einfluss Latenz: kein Einfluss (Scheufler und Zentner, 2002)	Amplitude: kein Einfluss Latenz: kein Einfluss (Scheufler und Zentner, 2002)
Thiopental / Pentobarbital	Barbiturat	Bindet an GABA-Rezeptorkomplex und behindert die Freisetzung von Azetylcholin, Norepinephrin und Glutamat	Nur in 20% der Strömulationen MMEPs ableitbar (Taniguchi et al., 1993)	VE keine MMEPs ableitbar; HE nur z.T. ableitbar Bei tiefer Narkose gar nichts mehr ableitbar (Van Ham et al., 1995)	Amplitude: kein Einfluss Latenz: kein Einfluss (Scheufler und Zentner, 2002)	Amplitude: kein Einfluss Latenz: kein Einfluss (Scheufler und Zentner, 2002)
Fentanyl	Opioid	μ -Opioidrezeptor-Agonist	Amplitude: ↓ Latenz: kein Einfluss (Kalkman et al., 1992)	Amplitude extrem variabel Latenz: ↑ (Glassman et al., 1993)	Amplitude: ↓ Latenz: ↑ (Scheufler und Zentner, 2002)	Amplitude: ↓ Latenz: ↑ (Scheufler und Zentner, 2002)
Midazolam	Benzodiazepin	Bindet an GABA-Rezeptorkomplex	Amplitude: ↓ Latenz: kein Einfluss (Kalkman et al., 1992)	Keine signifikanten Effekte (Scheufler und Zentner, 2002)	Keine signifikanten Effekte (Scheufler und Zentner, 2002)	Keine signifikanten Effekte (Scheufler und Zentner, 2002)

fluss unterschiedlicher Narkosemittel der Maus auf die spinal evozierten motorischen Potentiale darstellen und zusätzlich die zeitabhängige Beeinflussung der Potentiale durch Fortbestehen des Anästhesiestatus aufzeigen. Dabei wurde sowohl die Anwendbarkeit verschiedener Injektionsanästhetika als auch der Einfluss von Inhalationsanästhesien überprüft.

Um eine Beeinflussung der Potentialparameter durch Positionsänderungen der Spule zu verhindern, wurde zusätzlich zur supramaximalen Stimulusapplikation eine speziell konstruierte Spulenhalterung verwendet. Nebenbei stellte sich die bewegliche Zielvorrichtung als eine Erleichterung bei der Durchführung der Magnetstimulation an der Maus heraus: Abgesehen von der konstanten Beibehaltung der Stimulationsrichtung und dem Verhindern eines Verkippen der Spule im Verhältnis zum stimulierten Gewebe steht eine „zusätzliche“ Hand zur Verfügung, da die Spule fest in der Spulenhalterung der Zielvorrichtung positioniert ist und keiner Fixierung durch den Untersuchenden mehr bedarf.

Eine weitere Erleichterung stellt die exakte Positionierung des Fokuspunktes aus einer Distanz von etwa 10 cm auf den entsprechenden Stimulationspunkt dar. Wie die vorausgegangenen Feldausdehnungsmessungen zeigen konnten, sollte die Spule möglichst nah am stimulierten Gewebe platziert sein, um einen maximalen Reiz auslösen zu können. Diese enge Positionierung der Spule an der Maus verhindert allerdings eine visuelle Überprüfung der Übereinstimmung von Fokuspunkt und anvisierter anatomischer Lokalisation. Die Zielvorrichtung dagegen erlaubt eine Positionierung des Linienkreuzes auf dem anatomischen Richtpunkt und so kann auch aus der Distanz eine exakte Positionierung der Spule vorgenommen und durch Heranschieben der eingespannten Spule beibehalten werden.

Neben der konstanten Aufrechterhaltung der Körpertemperatur der Maus zur Narkosestabilisierung spielt die Heizfolie auch eine Rolle für die Parameterstabilisierung der MMEP, denn Latenz und Amplitude der motorischen und sensorischen Potentiale hängen von der Temperatur des umgebenden Gewebes ab. So konnten Leandri et al. (2008) eine negative Korrelation zwischen motorischer Nervenleitgeschwindigkeit und Amplitude mit der Körpertemperatur der Ratte aufzeigen.

Alle anderen Möglichkeiten zur Aufrechterhaltung der Körperwärme einer Maus unter Anästhesie, wie warme Gelkissen, standardmäßige elektrische Heizmatten oder Latex-Handschuhe gefüllt mit körperwarmem Wasser, haben den Nachteil eines großen Volumens. Von Rotlichtlampen wird in der Regel abgeraten, da damit nur ein Erwärmen der oberflächlichen Hautschichten erreicht wird (Henke und Erhardt, 2004). Solcherlei Wärmemethoden schränken den Raum für die geplanten Untersuchungen zu sehr ein und erschweren die Versuchsdurchführungen enorm. Speziell für die Magnetstimulation und insbesondere für die Nutzung der Zielvorrichtung hat sich daher die papierdünne Klebefolie bewährt, die zusätzlich stufenlos auf die gewünschte Temperatur zur Beibehaltung der Körperwärme der Maus eingestellt werden kann.

Generell ist die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur ein wichtiger Monitoring-Aspekt bei der Anästhesie der Maus, genau wie die Überwachung der Narkosetiefe selbst. Neben dem Erkennen zu hoher Narkosestadien ist auch die Beurteilung zu niedriger Stadien von Bedeutung, denn die Tiefe der Anästhesie ist entscheidend für das Ausbleiben willkürlicher Muskelkontraktionen, die die abgeleiteten Potentialparameter unter MS verfälschen würden.

Beim Menschen beeinflusst die Mehrzahl der intravenösen Anästhetika die MMEPs durch eine deutliche Senkung der Erregbarkeit der stimulierten motorischen Leitungsbahnen. Diese Unterdrückung scheint noch deutlicher ausgeprägt bei der Anwendung von Inhalationsanästhetika (Schmid et al., 1992; Ziemann, 2004).

Dieser depressive Effekt der Inhalationsgase kann ebenfalls bei Hunden unter Halothan (Glassman et al., 1993; Van Ham et al., 1995) oder Isofluran-Anästhesie (Young und Sylvestre, 1993) festgestellt werden. In ähnlicher Weise verhält es sich mit den Inhalationsanästhesien Enfluran, Isofluran und Halothan bei der Katze, die ebenfalls zu einer Senkung der MMEPs führen (Yamada et al., 1994).

Eine Erklärung für diese gesteigerte Unterdrückung der MMEPs durch Inhalationsanästhetika liegt möglicherweise in ihrer agonistischen Beeinflussung der GABA_A Rezeptoren und der Na⁺-Kanäle in gleichem Maße, während intravenöse Anästhetika wie Propofol und Thiopental vor allem auf die GABA_A Rezeptor-Übermittlung Einfluss nehmen (Ziemann, 2004).

In unserer Studie war bei der SEV-Narkose der suppressive Effekt der Inhalationsanästhetika auf die erzielten MMEP-Amplituden zu erkennen: Unter SEV konnten im Vergleich zu ISO, MMF und KXA deutlich niedrigere Amplituden abgeleitet werden. Demgegenüber zeigte SEV keinen erkennbaren Einfluss auf die Start-Latenz der MMEPs.

SEV ist ein Isopropylether, dessen Vorteile gegenüber ISO in dem weniger stechenden Geruch und dem schnelleren Erreichen tiefer Narkosestadien liegen (Ensinger, 2005). SEV wurde bislang in keiner MS Studie am Tier getestet.

Unsere Ergebnisse stimmen somit mit denen vorausgegangener Untersuchungen am Menschen überein, bei denen ebenfalls von einem deutlich unterdrückenden Effekt einer SEV-Anästhesie auf spinal evozierte MMEPs berichtet wurde (Kammer et al., 2002).

Demgegenüber war ISO in unseren Untersuchungen mit geringerer Abschwächung der MMEP-Amplituden verbunden. Insgesamt zeigten sich bei ISO-Anästhesie im Vergleich zu den anderen Protokollen relativ hohe Amplituden der MMEPs. Dabei erfolgte unter ISO-Anästhesie eine nur geringe interindividuelle Verteilung sowohl von durchschnittlicher Amplitude als auch mittlerer Start-Latenz zu beiden Zeitpunkten der spinalen Stimulation. Daher stellt sich dieses Anästhesie-Protokoll als sehr gut nutzbar für die Messung der MMEPs an der Maus dar, auch wenn es bei anderen Spezies, wie dem Menschen (Schmid et al., 1992) und dem Hund (Young und Sylvestre, 1993), zu einer Aufhebung der MMEPs im Narkose-

stadium II und III kommt.

Diese Diskrepanz kann möglicherweise durch spezies-spezifische Reaktionen auf das Inhalationsgas, welche zu einer schwächeren Beeinflussung der Potentiale führen, hervorgerufen worden sein.

Ein Beispiel für solche spezies-spezifischen Eigenschaften sind unter anderem die Reaktionen verschiedener Tierarten auf Ketamin. Eine positive Beeinflussung der MMEPs wurden beim Hund festgestellt (Glassman et al., 1993), während Ketamin die Amplitudenhöhe der MMEPs beim Kaninchen mindert (Scheufler und Zentner, 2002). Bei Ratten wiederum ist nach einmaliger Ketamingabe kein Einfluss auf die Amplitude festzustellen (Chiba et al., 1998), während die kontinuierliche Gabe zu einer Unterdrückung der MMEPs führt (Luft et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Anästhesiekombinationen mit Ketamin untersucht und diese wiesen einen einheitlich positiven Einfluss auf die erhobenen MMEP-Parameter auf. Die abgeleiteten Amplituden insbesondere unter KXA und KM waren im Vergleich zu denen unter anderen Narkoseformen größer. Insgesamt wurden die Ergebnisse zur KX-Anästhesie dabei nur als hinweisend gewertet, da hier nur eine geringe Zahl an Tieren untersucht werden konnte.

Neben den beiden Kombinationen aus Ketamin und einem alpha2-Agonisten (KM und KX) wurde die Tripelanästhesie aus Ketamin, Xylazin und Acepromazin untersucht. Die Eignung der jeweiligen Narkosekombinationen zur Durchführung der Anästhesie zur MS an der Maus unterschied sich in verschiedenen Punkten voneinander: Ketamin in Kombination mit Xylazin alleine beeinflusst die MMEP-Parameter in ähnlicher Weise wie beim Hund, indem hohe Amplituden ableitbar sind, was zusätzlich mit Andauern der Anästhesie gesteigert wurde. Allerdings ist die Aussagekraft der für KX erhobenen Parameter durch die geringe Zahl an untersuchten Tieren mit Vorsicht zu bewerten. Aufgrund der ähnlichen Einflüsse der Kombination KM auf die MMEP-Parameter ist jedoch anzunehmen, dass der Trend für höhere Amplituden im Vergleich zu anderen Anästhesien auch für KX zutrifft.

Aufgrund der hohen Letalität der KX-Narkose empfehlen wir deren Verwendung allerdings nicht für die MS.

Das in der Kombination KM verwendete Medetomidin ist ebenfalls ein alpha2-Agonist mit etwa 20facher Potenz gegenüber Xylazin (Ebert et al., 2002). Alpha2-Rezeptoragonisten wirken analgetisch und muskelrelaxierend, doch offensichtlich schlägt in der Wirkung der Kombinationsanästhesie insbesondere die kataleptische Wirkung von Ketamin durch.

Ketamin, welches eine sogenannte „dissoziative“ Anästhesie verursacht, hat neben depressiver Wirkung auf Bewusstsein und Schmerzempfinden zusätzlich einen erregenden Einfluss, indem kataleptische Komponenten gleichzeitig mit Muskelkrämpfen auftreten (Ebert et al., 2002).

Es ist erstaunlich, dass die gemessenen Amplituden unter KM zu beiden Zeitpunkten und unter KXA zum Zeitpunkt T_{10} deutlich höher lagen als bei Ketamin-Xylazin Anästhesie, obwohl die Dosierung des Ketamins für alle drei Kombinationen konstant gehalten wurde, um einen Vergleich auch für die zusätzlich applizierten Pharmaka anstellen zu können. Möglicherweise erschwert hier die geringe Tierzahl die einwandfreie Datenbewertung.

Die in unseren Untersuchungen verwendete Tripelanästhesie aus Ketamin, Xylazin und Acepromazin zeigte ähnlichen Einfluss auf Latenz und Amplitude, jedoch in weniger deutlicher Ausprägung. KXA führte zu kurzen Start-Latenzen im Vergleich zu PE, KM und SEV, und ein depressiver Effekt auf die abgeleiteten Amplituden kam nur mit Andauern der Anästhesie zum Tragen. Unter KXA konnten, abgesehen von den anderen Ketamin-Kombinationen, im Vergleich zu den verbleibenden Anästhesien hohe Amplituden abgeleitet werden, die zwar ebenfalls mit Fortdauern der Anästhesie sanken, damit jedoch weiterhin höher als bei drei der sechs anderen verwendeten Anästhesien waren.

Der depressivere Effekt von KXA auf Latenz und Amplitude im Vergleich zu den anderen Ketamin-Kombinationen könnte auf die inhibitorische Wirkung des Phenothiazinderivats Acepromazin auf die zentralen dopaminergen und cholinergen Synapsen zurückzuführen sein (Van Ham et al., 1994). Weder Acepromazin allein noch die Kombination KXA wurden bislang für die MS genutzt. Eine Studie an Hunden untersuchte den Effekt der Kombination von Acepromazin und Methadon im Vergleich zur Kombination Xylazin mit Methadon auf die abgeleiteten MMEPs. Es konnte kein Unterschied der durchschnittlichen Start-Latenz festgestellt werden, allerdings war die Amplitude in der Kombination Acepromazin-Methadon höher (Van Ham et al., 1994).

Im Gesamtüberblick über alle drei Ketamin-Kombinationen konnten zu beiden Zeitpunkten die höchsten Amplituden unter KM aufgezeichnet werden. Einzig unter KX konnte im Verlauf der Zeit ein Anstieg der Amplituden festgestellt werden, während mit Fortdauern der KXA- und KM-Anästhesie die Amplituden sanken. Insgesamt konnten die höchsten Amplituden unter KM abgeleitet werden, keine andere Narkose ermöglichte zu irgendeinem Zeitpunkt eine höhere Amplitudenableitung.

Ein Problem dieser Anästhesiemethode stellt die enorm lange Nachschlafzeit für die Mäuse dar, die bis zu acht Stunden andauern kann (Henke und Erhardt, 2004). Dem kann zwar mit Antagonisierung des Medetomidin-Anteils mit Naloxon nach ca. 45 min entgegengewirkt werden, doch verbleibt die Gefahr eines Ketamin-Überhangs mit Auslösung tonisch-klonischer Krämpfe (Neumann, 1999).

Eine Antagonisierung aller Teilkomponenten ist dagegen bei der zusätzlich in unserer Studie integrierten Tripelanästhesie MMF möglich. MMF enthält neben dem alpha2-Agonisten Medetomidin ein Benzodiazepin (Midazolam) und ein synthetisches Opioid (Fentanyl), welches dem Betäubungsmittelgesetz unterliegt. Aufgrund der hohen Sicherheit der MMF-

Narkose und der Möglichkeit der vollständigen Antagonisierung wurde MMF erfolgreich in der klinischen und experimentellen Veterinärmedizin aufgenommen (Henke und Erhardt, 2004). Diese Anästhesie-Kombination wurde bislang noch nicht für die TMS verwendet. Allerdings wurde Medetomidin in Kombination mit Methadon zur TMS am Hund getestet. In diesem Versuchsaufbau konnten die MMEPs zwar zuverlässig ausgelöst werden, die Medetomidin-Kombination verzögerte jedoch deutlich die Weiterleitungszeit im Vergleich zu anderen Methadon-Kombinationen und unterdrückte auch die Amplituden in signifikanter Weise (Van Ham et al., 1994).

Was Midazolam und Fentanyl betrifft, so ist für den Menschen bekannt, dass beide bei einzelner Verabreichung keinen Effekt auf die MMEP-Latenz haben. Allerdings unterdrücken sie die Amplitude entweder deutlich (Midazolam) oder leicht (Fentanyl) (Kalkman et al., 1992). Dies steht im Gegensatz zu Befunden am Kaninchen, bei denen Midazolam keinen deutlichen Effekt auf die MMEP-Parameter hat, während die Gabe von Fentanyl mit Unterdrückung der Amplituden und verlängerter Weiterleitungszeit verbunden war und dabei den Effekt anderer Opioide sogar übertraf (Scheufler und Zentner, 2002).

Abgesehen von KX hatte MMF in unserer Studie, auch über das Fortdauern der Anästhesie hinweg, den geringsten depressiven Einfluss auf die MMEP-Latenz. Nach KM, ISO und KXA ermöglichte MMF im Vergleich zu den übrigen Narkosen relativ hohe Amplitudenwerte. Allerdings war ebenfalls ein Abfall der Amplituden mit Fortdauern der Anästhesie abzulesen.

Bezüglich der interindividuellen Streuung der Werte von Amplitude und Start-Latenz zeigte sich zu beiden Zeitpunkten der Anästhesie insgesamt die kleinste Streuung unter MMF. Daher ermöglicht die MMF-Narkose eine zuverlässige Datenwerterhebung und eine uneingeschränkte Vergleichbarkeit unterschiedlicher Messungen über verschiedene Zeitpunkte hinweg.

Aus Sicht der Anästhesie-Sicherheit zeigte sich MMF zudem komplikationsarm, zuverlässig im Erreichen der ausreichenden Narkosetiefe und mit zügigem Wirkungseintritt im Vergleich zu den anderen Injektionsanästhesien unserer Studie.

Unter PE dagegen verlor nur die Hälfte der untersuchten Tiere den Rückzugreflex. Auch nach PE-Anästhesie ergibt sich eine lange Nachschlafzeit für die narkotisierten Tiere. Zudem führte PE zu deutlicher Amplituden-Unterdrückung, stark verzögerter Start-Latenz und großer interindividueller Parameter-Streuung. Daher stellt es sich als wenig geeignet für die SMS oder TMS an der Maus dar.

Diese Ergebnisse sind in Einklang mit Beobachtungen zur Wirkung von PE auf MMEPs an Menschen, Ratten und Hunden (Taniguchi et al., 1993; Van Ham et al., 1995; Luft et al., 2001). Ähnlich depressive Effekte erzielen auch seine Verwandten Thiopental und Methohexiton in hoher Dosierung bei Hund (Glassman et al., 1993; Young und Sylvestre, 1993;

Van Ham et al., 1995) und Ratte (Chiba et al., 1998; Luft et al., 2001). Im Gegensatz dazu reagierten Kaninchen mit gesteigerter Amplitude bei der Magnetstimulation während einer Methohexiton-Anästhesie. Da eine niedrigere Dosierung der Barbiturate den Schwellenwert neuronaler Erregbarkeit zu senken scheint, könnte dies den gegensätzlichen Effekt erklären (Scheufler und Zentner, 2002). Auch Ziemann beschreibt eine dosisabhängige Aktivierung der GABA-Rezeptoren durch Barbiturate (Ziemann, 2004).

Wenn man bedenkt, dass eine Spanne von 30 mg/kg bis 60 mg/kg PE zur Anästhesie der Maus empfohlen werden und 50 mg/kg nötig sind, um ein Stadium III der Narkose zu erreichen, welches zum Verlust der Rückzugreaktion führt (Erhardt et al., 1984), befindet man sich damit bereits im oberen Grenzbereich. Durch den dadurch erzielten hohen GABAergen Effekt ist der deutlich depressive Effekt auf die MMEP-Parameter erklärbar. Ein Senken der Dosierung ist allerdings an der Maus nicht durchführbar, wenn gleichzeitig der Rückzugreflex ausreichend unterbunden werden soll.

Insgesamt konnte durch unsere Untersuchungen gezeigt werden, dass ein breites Feld unterschiedlicher Narkoseprotokolle die Ableitung magnetisch evozierter Potentiale am Bein der Maus ermöglicht. Wiederholte Messungen zeigten zudem, dass in allen Protokollen mit Ausnahme von KX, dessen Ergebnisse nur als hinweisend zu bewerten sind, die Dauer der Anästhesie negativ mit den MMEP-Parametern korreliert ist. So kommt es nach einer Dauer von 20 Minuten zu einer deutlich verzögerten Weiterleitungszeit und die Amplitudenhöhe wird stark reduziert.

Auch wenn einzelne Studien bei Mensch und Ratte ähnliche Beobachtungen machten, wurde diesem Phänomen bis dato keine große Bedeutung zugemessen (Fishback et al., 1995; Schmid et al., 1992). Jedoch besagen diese analogen Befunde, dass der Zeitpunkt der Stimulation von herausragender Bedeutung für die Zuverlässigkeit abgeleiteter Parameter ist. Die Vergleichbarkeit der abgeleiteten MMEPs zwischen verschiedenen Individuen ist nur gegeben, wenn der Zeitpunkt der Stimulation gleich gewählt wurde.

Eine mögliche Schwierigkeit der Parameterbewertung liegt in der interindividuellen Streuung der gemessenen Werte innerhalb der Tiere, die dieselbe Anästhesie durchlaufen.

Während unseres Versuchsaufbaus zeigte sich während MMF, ISO und KM die größte Gruppen-Homogenität und damit präsentierten sich diese Narkoseformen den anderen Protokollen als überlegen. ISO und MMF sind zudem leicht zu steuern und beinhalten bei adäquatem Monitoring nur geringes Risiko von Nebenwirkungen.

Intensives Monitoring ist allerdings bei der Induktion der Inhalationsanästhesien nötig, da hier eine hohe Gaskonzentration innerhalb der Körperkammer zur zügigen Überwindung der ersten Narkosestadien genutzt wird, so dass bei zu langem Verbleiben in der Kammer gefährlich tiefe Narkosestadien erreicht würden.

Auch die hohen Anschaffungskosten und die Komplexizität der benötigten Ausrüstung, welche zur Inhalationsanästhesie nötig ist, könnte ein limitierender Faktor für deren Praktikabilität in manchen Studien sein. Zudem könnte für manche Aufbauten die benötigte Nasenmaske ein einwandfreies Positionieren der Stimulationsspule zur TMS an der Maus limitieren.

Die Durchführung der KM-Anästhesie ist ebenfalls wenig praktikabel, wobei dies nicht speziell für die Magnetstimulation, sondern aufgrund allgemeiner Narkoseeigenschaften gilt. Die lange Nachschlafzeit oder die kataleptische Nebenwirkung aufgrund der nur anteiligen Antagonisierbarkeit der KM-Narkose machen ein intensives Monitoring der Mäuse über einen sehr langen Zeitraum notwendig und erschweren die Versuchsdurchführung.

Die MMF-Narkose bietet demgegenüber eine zuverlässige Datenwerterhebung auch über die Dauer der Anästhesie hinweg und da sie entgegen anderer Injektionsanästhesien zusätzlich eine hohe Anästhesie-Sicherheit neben zügigem Wirkungseintritt bietet, bevorzugen und empfehlen wir diese Narkoseform zur MS an der Maus.

5.1.5 Zentrale Stimulationspunkte zur MMEP-Erzeugung bei der Maus

Anhand der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass mit einer dezentralen Magnetstimulationsspule transkraniell und spinal evozierte motorische Potentiale an der Maus erzeugt und abgeleitet werden können. Dabei stand insbesondere die Identifikation derjenigen Hirnareale im Fokus, deren Stimulation zu reproduzierbaren, hohen motorischen Potentialen am *M. gastrocnemius* führen. Dazu wurde der Bereich der maximalen Depolarisation der Spule über unterschiedlichen Hirnarealen der Maus (Abb. 5.6 auf der nächsten Seite) und zusätzlich über einem spinalen Punkt positioniert und jeweils identische Magnetimpulse appliziert.

Motorische Potentiale konnten entlang der gesamten kranio-kaudalen Ausdehnung des ZNS evoziert werden: Sowohl im zerebralen Kortex, den Kerngebieten des Zwischenhirns und des Hirnstamms als auch im Bereich der Leitungsbahnen des Rückenmarks führte die Magnetstimulation zu erfolgreicher Potentialableitung.

Die Reproduzierbarkeit der Potentialauslösung war dabei nicht in allen gewählten Stimulationspunkten gleichermaßen gegeben. Die TMS am rostralen Stimulationspunkt (S1) (Abb. 5.7 auf der nächsten Seite) führte nur bei etwa einem Drittel der Tiere zur Potentialauslösung. Da auf Höhe von S1 das Hirn der Maus nach rostral konisch an Breite verliert, ist es möglich, dass das kleine Volumen an stimulierbarem Gewebe nicht ausreicht, um eine Depolarisation der dortigen Motoneuronen zu bewirken.

Als potentiell erregbare Strukturen finden sich im Frontallappen neben den Nervenzellkör-

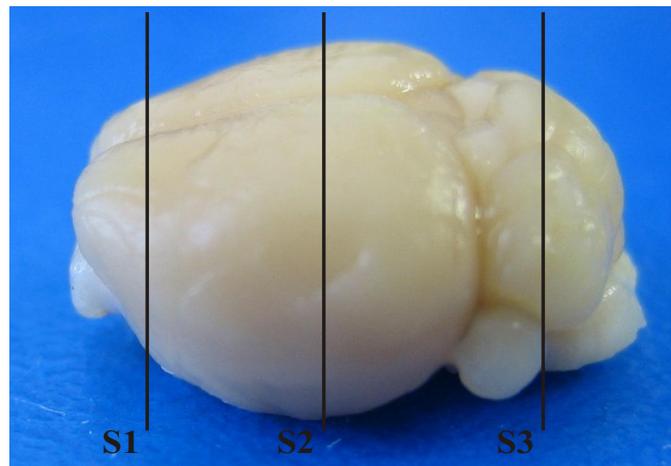
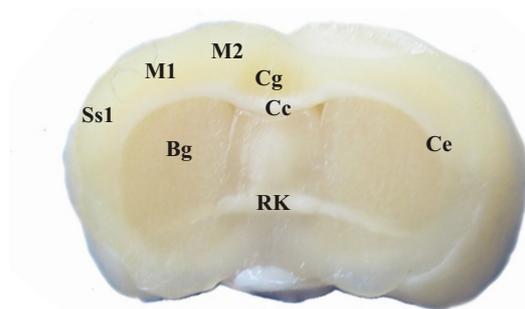


Abbildung 5.6: Formalinfixiertes Hirn einer Maus mit Kennzeichnung der transkraniellen Stimulationspunkte im Bereich des Telencephalons (S1), am Übergang von Di- zu Mesencephalon (S2) und im Bereich des Rhombencephalons (S3).



M1 = Primärer Motorkortex
M2 = Supplementärer Motorkortex
Ss1 = Primärer somatosensorischer Kortex
Bg = Basalganglien
RK = Rostrale Kommissur
Ce = Capsula externa
Cc = Corpus callosum
Cg = Cingulum
 (The Mouse Brain Library, 2007)

Abbildung 5.7: Transversalschnitt durch das Hirn der Maus auf Höhe des Telencephalons (S1) (beschriftet nach The Mouse Brain Library, 2007).

pern und Dendriten der kortikalen Motoneuronen auch deren Axone in der Weißen Substanz der Corona radiata und der Capsula interna sowie die inhibitorischen Basalkerne (Abb. 5.7) (Lemon und Griffiths, 2005; Nielsen et al., 2007; The Mouse Brain Library, 2007).

Insgesamt waren die Amplituden nach Stimulation an S1 verhältnismäßig klein gegenüber den Potentialen der weiteren kraniellen Stimulationsorte. Möglicherweise liegt die Erregbarkeitsschwelle der dort situierten Neuronen besonders hoch. Diese kann durch die Basalkerne, deren Aufgabe sowohl in hemmender als auch erregender Reizmodulation besteht, beeinflusst werden (Trepel, 2004a). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die TMS auch zu einer Aktivierung hemmender Interneuronenpopulationen führt (Siebner und Ziemann, 2007). Ein depolarisierender magnetischer Stimulus in dieser Hirnregion könnte folglich zur Unterdrückung oder Abschwächung motorischer Potentiale führen.

Eine weitere Erklärung für die kleinen Amplituden auf Höhe von S1 könnte allerdings auch in einer geringen Anzahl an Motoneuronen zu suchen sein, die hier an der Bildung

des abgeleiteten Potentials beteiligt sind (Hopf et al., 1996), denn der motorische Kortex der Maus ist weit weniger kompakt strukturiert als beim Primaten (Akintunde und Buxton, 1992; Curfs et al., 1993; Lemon und Griffiths, 2005).

Kaudal von S1 waren die MMEPs reproduzierbar ableitbar. S2 liegt am Übergang vom Di- und Mesencephalon (Abb. 5.8 auf der nächsten Seite). Auf dieser Ebene finden sich ebenfalls noch Anteile des motorischen Kortex, jedoch in geringerer Ausdehnung als in S1. Stattdessen liegen hier hauptsächlich visuelle und auditive Kortexareale. Auf Höhe S2 befinden sich zusätzlich die motorischen Leitungsbahnen der kaudalen Capsulae internaе und der daraus hervorgehenden Crura cerebri sowie extrapyramidale Kerngebiete, wie beispielsweise die hier einragenden Nuclei rubri, welche ausgelöste Potentiale über den Rubrospinaltrakt an das Ventralhorn des Rückenmarks weiterleiten. In Ergänzung der Erregungsdämpfung durch die Basalkerne übt hingegen der Thalamus einen erregenden Einfluss auf die kortikalen Motoneuronen aus.

Tabelle 5.2 veranschaulicht die anatomischen Anteile, die im entsprechenden Areal an einem ausgelösten motorischen Reiz beteiligt sein können.

Tabelle 5.2: Mögliche Zielstrukturen in ihrer anteiligen Repräsentation je Stimulationspunkt; Pyr.=pyramidale; Extrapyr.=extrapyramidale; + geringes; ++ moderates, +++ zahlreiches Vorkommen, - nicht vorhanden.

	S1	S2	S3	S4
Pyr. Dendriten	++	+	-	-
Pyr. Perikarien	+++	+	-	-
Pyr. Axone	+	+++	++	+
Basalkerne	++	+	-	-
Extrapyr. Dendriten	-	+	+++	-
Extrapyr. Perikarien	-	+	+++	-
Extrapyr. Axone	-	-	+++	+++

Man geht davon aus, dass mit magnetischen Impulsen eine primäre Aktionspotentialbildung im Bereich des Axons, selten am Neuronenkörper selbst ausgelöst wird (Siebner und Ziemann, 2007). In den kortikalen Neuronen lassen sich am ehesten Aktionspotentiale auslösen, wenn das induzierte elektrische Feld von den Dendriten zum Axon fließt und dort an der Zellmembran des Somas oder dem proximalen Axon im Bereich des initialen Axonhügels einen auswärtsgerichteten Strom induziert (Roth, 1994). Doch wie häufig diese dreidimensionalen Voraussetzungen wirklich gegeben sind, ist aufgrund der komplexen Hirnanatomie

nicht präzise vorhersagbar.

Trotz der mittlerweile breiten Anwendung der TMS sind viele Fragen der Feldankopplung an die zerebralen Motoneuronen weitgehend ungeklärt. So weiß man weder, welche Anteile des Kortex präferenziell aktiviert werden, noch welche Neuronen die niedrigste Reizschwelle besitzen (Siebner und Ziemann, 2007).

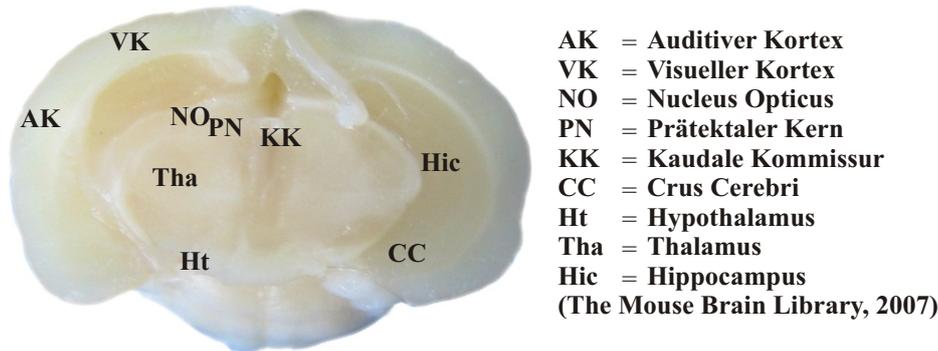


Abbildung 5.8: Transversalschnitt durch das Hirn einer Maus – Schnitt am Übergang von Di- zu Mesencephalon (beschriftet nach The Mouse Brain Library, 2007).

In der eigenen Untersuchung konnten die stärksten motorischen Potentiale nicht über der Großhirnrinde, sondern über dem Rhombencephalon (S3) ausgelöst werden.

Die Reizapplikation in diesem Bereich führte zu deutlich größeren Amplituden als in allen anderen Stimulationspunkten. Abb. 5.9 gibt einen Transversalschnitt durch das Hirn der Maus wieder, der in etwa dem stimulierten Areal entspricht.

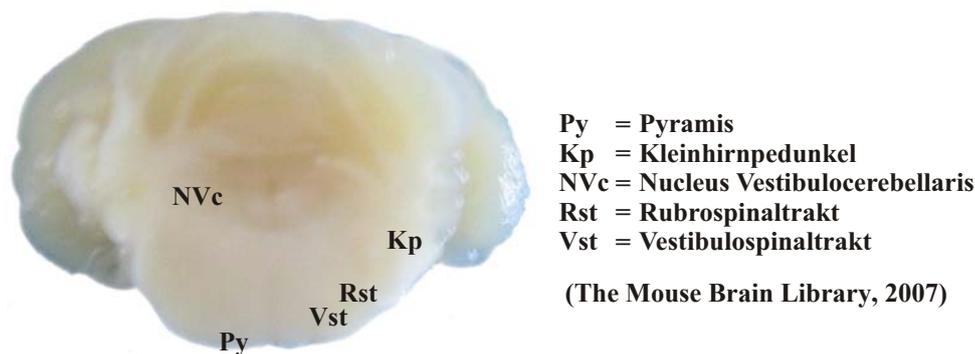


Abbildung 5.9: Transversalschnitt durch das Hirn einer Maus – Schnitt durch das Rhombencephalon (beschriftet nach The Mouse Brain Library, 2007).

In dieser Region verlaufen nahezu alle absteigenden motorischen Bahnen des pyramidalen und extrapyramidalen Systems. Zusätzlich liegt hier eine große Zahl von Kerngebieten des extrapyramidalen Systems, welche bei allen Vierbeinern, so auch der Maus, den überwiegenden Teil der motorischen Steuerzentren darstellen (Lemon und Griffiths, 2005; Alstermark und Ogawa, 2004).

So finden sich hier die Vestibulariskerne und die tegmentalen Kerne Nucleus ruber, Substantia nigra und Formatio reticularis. Die Funktion der Substantia nigra liegt in erregendem Einfluss auf die Bewegungsinitiation (Nigrostriatale-Bahnen). Auch die Formatio reticularis, die als geschlossenes Neuronennetzwerk bis ins Rückenmark reicht, wirkt erregend auf die Motoneuronen des spinalen Ventralhorns (Trepel, 2004b). Ausgehend von diesen genannten Kerngebieten ziehen Leitungsbahnen innerhalb des Rubrospinal-, des Retikulospinal- und Vestibulospinaltraktes bis zu den Ventralhörnern des Rückenmarks.

Die großen absteigenden Bahnen für die Innervation der Hintergliedmaßen finden sich daher auch im spinalen Stimulationspunkt S4 wieder. Allerdings sind die hier abgeleiteten Potentiale wesentlich kleiner als nach Stimulation unter S3. Da die Halsmuskulatur in dieser Region die Wirbelsäule in einer mehrere Millimeter dicken Schicht umgibt, entsteht ein räumlich größerer Abstand zwischen Spule und stimuliertem Nervengewebe als unter den transkraniellen Stimulationspunkten. Wie im Kapitel 4.1.3 auf Seite 77 dargestellt, verliert die elektrische Feldstärke jedoch mit zunehmendem Abstand von der Spulenoberfläche an Depolarisationskapazität, was die festgestellte Potentialabschwächung erklärt.

Abgesehen von den genannten Potentialunterschieden in der Längsachse des ZNS zeigen unsere Ergebnisse, dass bei der Maus eine zusätzliche Hemisphärenselektivität für die Induktion von motorischen Potentialen am M. gastrocnemius besteht: es entsteht eine durchweg höhere Amplitude bei der Stimulation der kontralateral zur Extremität gelegenen Hirnhemisphäre, was weitgehend unseren Vorstellungen zur Überkreuzung der absteigenden motorischen Bahnen entspricht (de Lahunta und Glass, 2009b; Oudega et al., 1994; Terashima, 1995; Gianino et al., 1999).

Dagegen kann die Seitenselektivität für die beobachteten Latenzzeiten mit Verzögerungen der Impulsweitergabe bei medianer versus paramedianer und kontralateraler versus ipsilateraler Stimulation momentan nicht erklärt werden. Diese Seitenabhängigkeit stellt jedoch einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen dar.

Für die kranio-kaudalen Unterschiede (Latenz S1 < Latenz S2) mag eine Bevorzugung kortikaler Erregung mit entsprechendem Bahnungseffekt verantwortlich sein. Auch hierzu ist unser momentanes Verständnis lückenhaft.

Insgesamt konnten die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass eine Aktivierung motorischer Bahnen in zahlreichen Lokalisationen des ZNS möglich ist. Es erwies sich die Stimulation des Hirns im Bereich des Mes- und Metencephalons als besonders geeignet für eine reproduzierbare Ableitung starker motorischer Potentiale.

Allerdings muss bei der Bewertung stets berücksichtigt werden, dass die Potentiale auf Höhe aller zwischengeschalteten Synapsen, wie am Übergang zu den Ventralhorn-Motoneuronen so auch an den motorischen Endplatten der Muskeln, durch laterale Hemmung oder Faszilitation beeinflusst werden. Dies kann einerseits durch physiologische Mecha-

nismen, andererseits auch durch pharmakologische Wirkungsmechanismen, ja selbst durch Krankheitsprozesse hervorgerufen werden, welche in die Beurteilung der Potentiale und die Wirkungsmechanismen der Magnetstimulation einbezogen werden müssen.

Die Stimulation der motorischen Kortexareale zur Ableitung motorischer Potentiale an den Extremitäten wird in der Humanmedizin beispielsweise bei perioperativen Ableitungen deszendierender Erregungswellen eingesetzt (Di Lazzaro et al., 2001, 2004a). Am Nagetier existieren bislang nur Studien mit elektrischer Stimulation zur Überprüfung der Integrität absteigender Leitungsbahnen (Fehlings et al., 1988; Zappulla et al., 1988; Dull et al., 1990; Stewart et al., 1990; Zileli und Schramm, 1991; Shiao et al., 1992). Erst wenige tierexperimentelle Studien (Nielsen et al., 2007; Nollet et al., 2002, 2003d) konnten bisher zeigen, dass auch mit Hilfe der magnetischen Stimulation der Leitungsstatus absteigender motorischer Bahnen darstellbar ist. Die hier erarbeiteten Ergebnisse mögen sicherlich eine gute Basis für weitere Anwendungen der MS an der Maus bieten.

5.2 Periphere Magnetstimulation zur Kraftentwicklung beim Hund

5.2.1 Burst-Stimulation hat einen steigernden Effekt auf die Kraftentwicklung

In diesem Untersuchungsabschnitt wurde der Frage nachgegangen, wie verschiedene Pulsformen bei peripherer Nervenstimulation die Muskelkontraktilität beim Hund beeinflussen.

Ziel war die Ermittlung eines Stimulationsprotokolls zur optimalen Kraftentwicklung, die für die Rehabilitation bei Mensch und Tier nach Neurotraumata von wesentlicher Bedeutung ist (Gordon und Mao, 1994).

Die Wiederaufnahme der Muskelfunktion über die physiologischen, nervalen Erregungsbahnen am erkrankten Muskel ist für die Aufrechterhaltung der Kontraktionsfähigkeit des Muskels wichtig. Rehabilitatorische Maßnahmen zielen daher speziell auf eine möglichst effektive neuromuskuläre Aktivierung ab.

Für diese Untersuchungen wurden speziell Laborhunde ausgewählt. Neben der Vergleichbarkeit der Muskelgröße zum Menschen spielten auch die physischen Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Tieren eine Rolle. Durch das einheitliche Haltungssystem der Beagle war eine hohe Gruppenhomogenität garantiert. Zusätzlich ist die Größe der einzelnen Oberschenkelmuskeln des Hundes ausreichend dick, um eine gleichzeitige Aktivierung der Zielmuskulatur und der antagonistischen Muskelgruppen zu verhindern. Darüber hinaus lässt sich am Hundeknie die Kraftentwicklung wesentlich leichter und reproduzierbarer erfassen als bei

kleineren Labortierspezies.

Auch die klinischen Aspekte machen die Spezies Hund im Rahmen unserer Studie interessant, da auch in der Tiermedizin zunehmend rehabilitatorische Maßnahmen nach Rückenmarkstraumata, wie Bandscheibenvorfall oder Infarkt, eingesetzt werden, um die motorischen Fähigkeiten zurückzugewinnen (Shumway, 2007; Saunders, 2007).

Mit dem Ziel, eine maximale Kraft durch periphere Magnetstimulation zu erreichen, wurden hochfrequente Burst- und Einzelimpulse appliziert und ihre Wirkung auf die Muskelkontraktionen des M. quadriceps verglichen.

Wir konnten durch den Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsprotokolle nachweisen, dass Burst-Pulsformen eine Kraftsteigerung im Vergleich zu Einzelpulsen hervorrufen, ohne dass dazu die Intensität der Einzelimpulse gesteigert werden muss.

Eine Hypothese für die gesteigerte Erregungsleistung der Bursts liegt in den durch diese hochfrequenten Impulse verursachten Oszillationen (Mourselas und Granat, 1998). Bursts verursachen eine Gewebewegung relativ zur Stimulationsquelle und durch diese Verschiebung im Gewebe werden möglicherweise zusätzliche Axone aktiviert, wodurch sich die Rekrutierung der neuromuskulären Einheiten erhöht.

Diesen steigernden Effekt konnten wir damit erstmals für magnetische Impulse darstellen, denn ähnliche Untersuchungen existieren bislang nur für die elektrische Stimulation (van Lunteren und Sankey, 2000; Binder-Macleod und Kesar, 2005; Lee et al., 1999). Bereits in den 70er Jahren stellten Burke und Kollegen bei elektrischer Stimulation einen kraftsteigernden Effekt auf stimulierte Muskeln fest, wenn einer niedrig-frequenten Stimulusabfolge zwei bis vier Pulse hoher Frequenz (Bursts) vorangestellt wurden (Burke et al., 1970, 1976). Diese kraftsteigernden Pulse bezeichneten Burke und Kollegen als „catchlike-inducing trains“.

Analoga zur Burst-Stimulation am Beginn einer konstanten Reizabfolge werden physiologischerweise durch das ZNS genutzt, um die Muskelkraft bei willkürlichen Kontraktionen zu steigern (Garland und Griffin, 1999).

In diesem Sinne wurden während willkürlicher Muskelkontraktionen bei Mensch (Desmedt und Godaux, 1977; Bawa und Calancie, 1983; Kudina und Alexeeva, 1992) und Tier (Zajac und Young, 1980; Hennig und Lomo, 1985) und insbesondere an ermüdeten Muskeln (Griffin et al., 1998) „catchlike“ Doppel- und Dreifachpulse bei Entladungen motorischer Einheiten beobachtet.

Burke und Kollegen (1970) zeigten außerdem, dass die resultierende Kraftsteigerung nach catchlike-induzierender Pulsapplikation in den langsam kontrahierenden Muskel-Einheiten deutlicher war und länger andauerte als bei schnell kontrahierenden motorischen Einheiten (Burke et al., 1970). Das macht diese Protokolle insbesondere für die Aktivierung der Typ I-faserreichen Muskeln, die für die Körperhaltung und lang andauernde Kontraktionen zuständig sind, attraktiv.

Der M. quadriceps des Hundes besteht aus einer gemischten Population langsamer und schneller motorischer Einheiten, wobei ein Überhang an ermüdungsresistenten Typ I-Fasern vorliegt (Valentine und McGavin, 2007). Dementsprechend kann hier von einem besonders intensiven Effekt der Burst-Stimulation ausgegangen werden.

Allerdings sind unsere Ergebnisse speziell für Muskeln mit ähnlicher Faserzusammensetzung relevant, da andere Zusammensetzungen der Faserqualitäten auch andere Reizapplikationen zur Kraftentwicklung benötigen könnten.

Auch die durch uns ausgewählte Frequenz der abgegebenen Einzel- und Burst-Impulse von 7,5 Hz basiert auf der gezielten Auswahl für den M. quadriceps, denn die optimale Kraftsteigerung der langsam-kontrahierenden motorischen Einheiten liegt im Frequenzbereich von 6–11 Hz (Burke et al., 1970). Die Ergebnisse von Binder-Macleod und Kollegen (1998), die im Muskel eine deutlich höhere Maximalkraft bei 8–10 Hz, nicht aber bei 11–100 Hz des auf die Bursts folgenden Stimulus-Trains feststellen konnten (Binder-Macleod et al., 1998a), unterstützen dieses experimentelle Vorgehen.

Üblicherweise werden in catchlike-induzierenden Pulsserien Interstimulus-Intervalle (ISI) von 5–10 ms verwendet (Burke et al., 1976; Binder-Macleod und Barrish, 1992; Binder-Macleod, 1995). Die Bursts unserer Protokolle weisen dagegen eine weit höhere Frequenz auf und auch die Grundfrequenz von 7,5 Hz bewirkt deutlich längere ISIs, so dass ein direkter Vergleich mit catchlike-induzierenden Pulsen erschwert ist.

Insgesamt konnten wir zeigen, dass magnetische Burst-Protokolle jeder Wellenzahl zu signifikant höherer Kraftentwicklung am M. quadriceps des Hundes führen als die Einzelpulsstimulation. Zusätzlich konnten wir einen Anstieg der Stimulus-Effektivität mit zunehmender Zahl an Vollwellen pro magnetischem Burst-Impuls nachweisen. Diese Entdeckung geht konform mit Befunden einer Studie unter van Lunteren und Sankey (2000), die *in vitro* durch elektrische Stimulationen am Rattendiaphragma einen Vierfach-Burst-Puls als signifikant stärksten Vorimpuls im Vergleich zu Zweifach- oder Dreifach-Burst zur Kraftentwicklung beurteilte.

Unser Ergebnis zeigt auch Parallelen zum mathematischen Modell von Butikofer und Lawrence (1979). Aufgrund ihrer Berechnungen schlussfolgerten diese, dass mit zunehmender Zahl an symmetrisch applizierten Impulsen eine zunehmend niedrigere Entladungskapazität pro Puls nötig sei (Butikofer und Lawrence, 1979).

Sie hielten zudem fest, dass der Großteil dieses Effektes bis hin zu drei Wellen pro Puls erreicht sein müsse. Allerdings erwarten sie einen weiteren Anstieg der Pulseffektivität bei mehr als drei Impulsen, wobei dieser Anstieg weit weniger steil verlaufen soll im Vergleich zur Effektsteigerung zwischen Einzel- bis Dreifachimpuls.

Die Kalkulationen der oben genannten Autoren korrelieren mit unseren rechnerischen Parabola-Aufstellungen. Ähnlich der mathematischen Annahmen von Butikofer war in un-

serer Rechnung der kraftsteigernde Effekt zwischen Zweifach- bis Vierfach-Burst-Puls wesentlich deutlicher als bei Stimulationen mit mehr als vier Vollwellen pro Burst.

Es scheint so, als würde bei Burst-Stimulation mit bis zu vier Vollwellen pro Puls eine Überlagerung der Stimulus-Effekte eintreten, welche die neuromuskuläre Ankopplung in den stimulierten motorischen Einheiten deutlich erleichtert.

Für die elektrische Stimulation erklärt man diesen Effekt durch die zeitliche Summation der schnell aufeinander eintreffenden Aktionspotentiale. Diese führen in ihrer Summe gemeinsam zur Depolarisation der Membran und benötigen dafür weniger Depolarisationskapazität als ein einzelner Impuls (Kantor et al., 1994).

Mourselas und Kollegen (1998), die die elektrische Burst-Stimulation im Hinblick auf die funktionelle Elektrostimulation überprüften, erklärten den Effekt der Bursts auf die Muskelkraft für zu klein und daher von keinem praktischen Nutzen für die FES. Notwendig sei eine supramaximale Stimulation und diese sei daher sinnvoller einzusetzen als die Bursts. Jedoch zeigen die Patienten bei Mourselas und Kollegen in der Regel bereits Schmerzen, bevor eine solche Intensität erreicht wird (Mourselas und Granat, 1998).

Die funktionelle magnetische Stimulation könnte diesen Nachteil von Oberflächenelektroden ausgleichen, da in der Regel keine Schmerzhaftigkeit beim Menschen ausgelöst wird. Schließlich führt die Magnetstimulation im Kontrast zur elektrischen Nervenstimulation bereits bei niedrigen Impulsstärken zur selektiven Aktivierung der motorischen Nervenfasern (Lotz et al., 1989). Zusätzlich werden physikalische Läsionen beim Patienten verhindert, da das Erhitzen der Spule über 42 °C (gesetzlich vorgeschriebener Maximalwert) durch ein automatisches Abschalten der Pulsabgabe verhindert und damit das Setzen physikalischer Läsionen vermieden wird (Wendicke, 2006).

Weitere Vorteile der FMS gegenüber der FES liegen in der geringeren Abschwächung des Magnetfeldes im durchdrungenen Gewebe. Dadurch ist eine Aktivierung selbst tief liegender motorischer Nervenfasern bereits mit niedrigerer Intensität möglich, als das bei elektrischer Stimulation mit Oberflächenelektroden der Fall ist.

FMS könnte Patienten mit Paraplegie oder Tetraplegie die Möglichkeit zurückgeben, ihre Arme oder Beine im Alltag einsetzen zu können, um eine gewisse Selbständigkeit zurückzuerlangen. Kleine alltägliche Aktivitäten, wie beispielsweise das eigenständige Halten von Essinstrumenten, könnten damit wieder von den Patienten selbst realisiert werden. Die funktionelle elektrische Stimulation hat in diesem Zusammenhang bereits große Anwendung gefunden (Liberson et al., 1961; Marsolais und Kobetic, 1988; Lyons et al., 2002).

Leider erschweren die großen Ausmaße der Magnetstimulatoren ihren Einsatz im Wohnbereich der Patienten. Bis dato werden die Stimulatoren für den Einsatz an Mensch und Tier daher ausschließlich im klinischen Betrieb eingesetzt. Eine Mobilität, die durch Geräteverkleinerung erreicht werden könnte, wäre daher von großem Interesse. Insbesondere rehabili-

tative Maßnahmen, die häufig regelmäßig und bevorzugt ambulant in den Wohnbereichen der Patienten oder Patientenbesitzer durchgeführt werden, könnten davon profitieren.

Daher wird auf dem Gebiet der Magnetstimulation an der Entwicklung kleinerer Geräte geforscht und viel Mühe in die Realisierung von ambulant einsetzbaren Stimulatoren investiert, ähnlich wie in der praktischen Anwendung von elektrischer Stimulation (de Kroon et al., 2005; Hara, 2008; Wendicke, 2006; Zantow, 2007).

Mit der Realisierung der Burst-Protokolle im Allgemeinen und mit dem hier erbrachten Beweis der optimalen Kraftauslösung mit magnetischem Vierfach-Burst im Speziellen ist wieder ein bedeutender Schritt in diese Richtung getan.

6 Zusammenfassung

Bei der Magnetstimulation handelt es sich um eine Methode zur Auslösung erregender oder hemmender Aktionspotentiale im Nervengewebe. Da damit eine im Gegensatz zur elektrischen Stimulation schmerzfreie Potentialauslösung erfolgt und zusätzlich eine Hirnstimulation durch die intakte Schädeldecke möglich ist, findet diese Methode breiten Einsatz in Klinik und Forschung.

Mit den derzeitigen Anwendungsgebieten der Magnetstimulation in der Human- und Tiermedizin ist ihre Einsetzbarkeit noch nicht ausgeschöpft und eine Vielzahl von Fragestellungen zur Wirkung der Magnetstimulation besteht bis heute. Die Mausmodelle für neurologische Erkrankungen von Mensch und Tier erlauben die Überprüfung diagnostischer, prognostischer, therapeutischer und funktioneller Fragestellungen. Daher existieren zahlreiche Forschungs- und Entwicklungsprogramme zur praktischen Anwendung der Magnetstimulation in dieser Spezies. Erst kürzlich ist durch neuartige Spulenkonstruktionen eine Stimulation an der Maus möglich geworden.

Zunächst erfolgte in der vorliegenden Studie eine Überprüfung der in Rechenprogrammen erhobenen Feldparameter für die verwendete Spule an der Maus. Diese Parameter konnten durch die Untersuchungen teilweise bestätigt und zusätzlich für Stimulationen *in vivo* ergänzt werden. Mit Hilfe speziell entwickelter technischer Aufbauten wurden die erhobenen Daten umgesetzt und studienbezogen optimiert.

In allen Experimenten ist eine Anästhesie der Tiere notwendig, um eine Beeinflussung der Parameter durch Willkürmotorik zu verhindern. Da jedoch zahlreiche Anästhetika einen depressiven Einfluss auf die motorischen Potentiale haben, wurden unterschiedliche Narkoseformen auf ihre Anwendbarkeit für die Magnetstimulation bei der Maus überprüft. Alle untersuchten Narkosen ermöglichten eine Potentialableitung, doch sie unterschieden sich in ihrer Sicherheit und in ihrem Effekt auf Latenz und Amplitude der evozierten Potentiale. Insgesamt erwies sich die Verwendung der Medetomidin-Midazolam-Fentanyl-Anästhesie als besonders geeignet zur spinalen Magnetstimulation an der Maus. Zusätzlich konnte ein Effekt der Anästhesiedauer auf die magnetisch evozierten Potentiale gezeigt werden, der für die Durchführung von Magnetstimulationsstudien bedeutsam ist.

Daraufhin wurden mehrere mediane und paramediane Hirnbereiche und ein spinaler Stimulationspunkt auf die in dem jeweiligen Areal auslösbaren motorischen Potential-Parameter

evaluiert und der Bereich der Auslösung maximaler Potentiale festgelegt. Die Potentialauslösung mit Hilfe einer hochfokalen Spule war über die gesamte Ausdehnung des Zentralnervensystems der Mäuse möglich. Als optimal zur Ableitung motorischer Potentiale wurde aufgrund der dortigen maximalen Motoneuron-Depolarisation die Hirnregion am Übergang von Mes- zu Metencephalon beurteilt.

In unseren Untersuchungen konnten wir die hohe Effektivität und Selektivität der neuartigen Spulenkonstruktion für die Magnetstimulation aufzeigen, was die standardisierte Durchführung dieser Stimulationsmethode an der Maus ermöglicht. Zusätzliche Untersuchungen am Hund dienen der Darstellung der Reizoptimierung bei peripherer Stimulation mittels innovativer magnetischer Impulse zur Kraftentwicklung.

Der Hund, dessen Proportionen und Muskelkraft der des Menschen vergleichbarer ist als die der Labornager, bietet sich zur Untersuchung des Einflusses der peripheren Magnetstimulation auf die evozierte Muskelkraft an.

Mit Hilfe eines speziell entwickelten Kraftsensors konnte am *M. quadriceps* nach peripherer Burst-Magnetstimulation ein kraftsteigernder Effekt nachgewiesen und ein Vierfach-Wellen-Burst als optimal zur Muskelkontraktion herausgearbeitet werden. Damit ist erstmals im Experiment bewiesen, dass die hochfrequenten magnetischen Burst-Impulse nicht nur rechnerisch, sondern auch *in vivo* eine Wirkungssteigerung am stimulierten Gewebe bei gleich bleibender Stimulusintensität erlauben.

Die Studie konnte zudem aufzeigen, dass die Magnetstimulation und ihre derzeitigen Anwendungsgebiete bereits mit dem momentanen Equipment methodisch und hinsichtlich der verwendeten Spezies großzügig erweiterbar sind. Eine Überprüfung der motorischen Leitfähigkeit zerebraler und spinaler Nerven sowie der Steigerung von Muskelkontraktionskraft sind so bei Kleinnagern und größeren Haustieren unter Verzicht auf schmerzhaft, invasive Eingriffe möglich.

7 Summary

Magnetic stimulation can be used to elicit excitatory and inhibitory action potentials, both in the peripheral and central nervous system. Due to the fact that magnetic stimulation, in contrast to electrical stimulation, allows for evoking action potentials without inducing pain and this even via an intact skull, this method is widely applied in clinical situations and for research purposes.

The existing areas in which magnetic stimulation is applied both in human and veterinary medicine does by far not exhaust the vast possibilities for exploiting this method of stimulation. Furthermore, a number of questions regarding how magnetic stimulation actually works remains to be elucidated.

Mouse models illustrating various neurological disorders in humans and companion animals permit the verification of numerous diagnostic, prognostic, therapeutic and functional questions. For this reason, there are a number of research projects which concentrate on applying magnetic stimulation in this kind of species. Only recently, however, following the development of a novel magnetic coil, it has become possible to magnetically stimulate mice.

As a first step in the present study, the coil's parameters, which had been acquired mathematically, were reappraised for in vivo studies. It was possible to reaffirm some of these calculated parameters; other parameters were amended for the in vivo application in the mouse. With the help of purpose-built equipment, the acquired data was put into practice and optimized if necessary.

In all experiments performed, the animals had to be anaesthetized to avoid voluntary movement which would have had an impact on the recording of motor potentials. Since numerous anaesthetics have been reported to depress motor potentials, however, different anaesthesia protocols had to be evaluated regarding their applicability in magnetic stimulation of the mouse. All anaesthesia protocols applied made it possible to record motor action potentials; they did, however, differ in their safety (regarding the survival of the mouse) and also in their extent of depressing both latency and amplitude of the motor potentials evoked. In summary, the triple-anaesthesia consisting of medetomidine, midazolam, and fentanyl seemed to be the most suitable anaesthesia for conducting magnetic stimulation of the murine spinal cord. In addition to this, it could also be shown that the duration of anaesthesia has an effect on the motor potentials recorded; this finding can be rather important when carrying out studies

requiring prolonged anaesthetics.

As a next step, several areas located in the median and paramedian area of the brain and also one located in the spinal cord were stimulated focally with the coil, and the area rendering the highest motor potential recorded in the same area as stimulated was ascertained. In general, motor potentials could be evoked all along the central nervous system of the mouse. The area located between mes- and metencephalon, however, appeared to be the most advantageous for eliciting and recording motor potentials, as a maximum of motor neurons is depolarized in this area.

Combining these results, our investigations were able to demonstrate the selectivity and efficiency of the new coil developed especially for magnetic stimulation, which allows for standardizing magnetic stimulation in the mouse.

Additional investigations conducted in the dog were designed to demonstrate the optimization of the impulse for peripheral nerve stimulation with the help of innovative burst-pulses. Since both the proportions and muscle force in the dog are more similar to that in the human than those of the laboratory rodent, canines appear to be more suitable for investigations regarding the generation of muscle force following magnetic stimulation of the peripheral nervous system. With the help of a purpose-built force transducer an enhancing effect of burst-pulses on the generation of contractile force in the quadriceps muscle could be proven; in this context, a fourfold burst-impulse seemed to be optimal for the evocation of muscle contractions. Furthermore, this is the first study able to demonstrate that magnetic burst-pulses coupled with constant stimulus intensity should not only theoretically enhance the evocation of muscle force, but actually do in *in vivo* applications.

Summarizing all our efforts, this study was able to show that magnetic stimulation can be expanded vastly with the current equipment available regarding its current field of use and the species it is applied on. Thus, it is now possible to verify motor conduction in cerebral and spinal nerves and increase muscle contraction force in laboratory rodents and companion animals, whilst doing without painful and invasive procedures.

Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Wolfgang Schmahl, für sein unermüdliches Verständnis, seine Menschlichkeit, seine konstruktive Kritik an der Doktorarbeit und für die vielen spannenden Diskussionen danken.

Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer, Dr. Kaspar Matiasek, der mit viel Geduld und unerschöpflichem Wissen Fragen beantwortet, Probleme gelöst und viele Türen geöffnet hat.

Großer Dank geht an die Arbeitsgruppe des Heinz Nixdorf-Lehrstuhls für Medizinische Elektronik um Herrn PD Thomas Weyh. Das außergewöhnliche Interesse und die Kreativität des Teams mit S. Götz, F. Helling und N. Gattinger haben mich außerordentlich beeindruckt.

Vielen Dank auch an die Kleintierklinik der LMU München, allen voran an Frau PD Andrea Fischer (Abteilung für Neurologie) und Caroline Altenhöfer, die für mich immer wieder Einschränkungen auf sich genommen haben und mich enorm unterstützt und viel Vertrauen in mich gesetzt haben.

Zudem bedanke ich mich bei dem Team für Präklinische Forschung der Technischen Universität München, insbesondere bei Frau Dr. Anne-Kathrin Preißel, für ihre große Hilfe in der Beantragung und Durchführung dieser Studie.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Becker (Helmholtz-Zentrum, München) bedanken, deren Tipps bei der Entwicklung unserer Ausrüstung und bei der Durchführung der Studie sehr geholfen haben. Auch den beiden Statistikern Herrn Scherb (Helmholtz-Zentrum, München) und Herrn Collins (Centre for Equine Studies, Animal Health Trust, Newmarket, UK) danke ich für die Unterstützung bei der Gutachtenerstellung und Datenauswertung.

Unbedingt bedanken möchte ich mich bei allen technischen Assistentinnen des Lehrstuhls und bei Frau Siebert, die mir nie eine Bitte abgeschlagen haben und immer mit Tatkraft und einem Lächeln beigestanden sind. In diesem Zusammenhang auch ein Danke an Axel Groß, der mich in der Tierbetreuung ununterbrochen unterstützte.

Nicht zu vergessen auch vielen Dank an meine Mitdotorandinnen Angie Rupp, Sophie Bader und Birgit Parzefall, die viel Geduld bewiesen und herrliche, inspirierende Diskussionen ermöglicht haben.

Abschließend danke ich meiner Familie, meinem Mann und meinen Freunden, die immer an mich glauben und mir immer schon und immer wieder viel Hilfe und Unterstützung zukommen lassen. Besonderer Dank gilt dabei Walter Bamberger.

Literaturverzeichnis

- Ahmed, Z. und Wieraszko, A.: 2008, Combined effects of acrobatic exercise and magnetic stimulation on the functional recovery after spinal cord lesions, *J Neurotrauma* **25**(10), 1257–69.
- Akintunde, A. und Buxton, D. F.: 1992, Origins and collateralization of corticospinal, corticopontine, corticorubral and corticostriatal tracts: a multiple retrograde fluorescent tracing study, *Brain Res* **586**(2), 208–18.
- Alisauskiene, M., Truffert, A., Vaiciene, N. und Magistris, M. R.: 2005, Transcranial magnetic stimulation in clinical practice, *Medicina (Kaunas)* **41**(10), 813–24.
- Alstermark, B. und Ogawa, J.: 2004, In vivo recordings of bulbospinal excitation in adult mouse forelimb motoneurons, *J Neurophysiol* **92**(3), 1958–62.
- Amassian, V. E., Stewart, M., Quirk, G. J. und Rosenthal, J. L.: 1987, Physiological basis of motor effects of a transient stimulus to cerebral cortex, *Neurosurgery* **20**(1), 74–93.
- Arras, M., Autenried, P., Rettich, A., Spaeni, D. und Rulicke, T.: 2001, Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth, *Comp Med* **51**(5), 443–56.
- Ausoni, S., Gorza, L., Schiaffino, S., Gundersen, K. und Lomo, T.: 1990, Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles, *J Neurosci* **10**(1), 153–60.
- Awiszus, F.: 2003, TMS and threshold hunting, *Suppl Clin Neurophysiol* **56**, 13–23.
- Barker, A. T.: 1991, An introduction to the basic principles of magnetic nerve stimulation, *J Clin Neurophysiol* **8**(1), 26–37.
- Barker, A. T., Freeston, I. L., Jabinous, R. und Jarratt, J. A.: 1986, Clinical evaluation of conduction time measurements in central motor pathways using magnetic stimulation of human brain, *Lancet* **1**(8493), 1325–6.

- Barker, A. T., Freeston, I. L., Jalinous, R. und Jarratt, J. A.: 1987, Magnetic stimulation of the human brain and peripheral nervous system: an introduction and the results of an initial clinical evaluation, *Neurosurgery* **20**(1), 100–9.
- Barker, A. T., Garnham, C. W. und Freeston, I. L.: 1991, Magnetic nerve stimulation: the effect of waveform on efficiency, determination of neural membrane time constants and the measurement of stimulator output, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* **43**, 227–37.
- Barker, A. T., Jalinous, R. und Freeston, I. L.: 1985, Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex, *Lancet* **1**(8437), 1106–7.
- Basser, P. J.: 1994, Focal magnetic stimulation of an axon, *IEEE Trans Biomed Eng* **41**(6), 601–6.
- Bawa, P. und Calancie, B.: 1983, Repetitive doublets in human flexor carpi radialis muscle, *J Physiol* **339**, 123–32.
- Bergey, G. K., Fitzgerald, S. C., Schrier, B. K. und Nelson, P. G.: 1981, Neuronal maturation in mammalian cell culture is dependent on spontaneous electrical activity, *Brain Res* **207**(1), 49–58.
- Bickford, R. G. und Freeming, B.: 1965, Neuronal stimulation by pulsed magnetic fields in animals and man, *Digest of the 6th International Conference of Medical Electronics in Biology and Engineering* **1**, 12.
- Binder-Macleod, S. A.: 1995, Variable-frequency stimulation patterns for the optimization of force during muscle fatigue. muscle wisdom and the catch-like property, *Adv Exp Med Biol* **384**, 227–40.
- Binder-Macleod, S. A. und Barrish, W. J.: 1992, Force response of rat soleus muscle to variable-frequency train stimulation, *J Neurophysiol* **68**(4), 1068–78.
- Binder-Macleod, S. A., Lee, S. C., Fritz, A. D. und Kucharski, L. J.: 1998a, New look at force-frequency relationship of human skeletal muscle: effects of fatigue, *J Neurophysiol* **79**(4), 1858–68.
- Binder-Macleod, S. und Kesar, T.: 2005, Catchlike property of skeletal muscle: recent findings and clinical implications, *Muscle Nerve* **31**(6), 681–93.
- Bischoff, C., Machetanz, J., Meyer, B. U. und Conrad, B.: 1994, Repetitive magnetic nerve stimulation: technical considerations and clinical use in the assessment of neuromuscular transmission, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **93**(1), 15–20.

- Bogo, V., Hill, T. A. und Young, R. W.: 1981, Comparison of accelerod and rotarod sensitivity in detecting ethanol- and acrylamide-induced performance decrement in rats: review of experimental considerations of rotating rod systems, *Neurotoxicology* **2**(4), 765–87.
- Bonato, C., Miniussi, C. und Rossini, P. M.: 2006, Transcranial magnetic stimulation and cortical evoked potentials: a TMS/EEG co-registration study, *Clin Neurophysiol* **117**(8), 1699–707.
- Boroogerdi, B.: 2002, Pharmacologic influences on TMS effects, *J Clin Neurophysiol* **19**(4), 255–71.
- Boudriaux, S., Cote, C. H., Vincent, M., Houle, P., Tremblay, R. R. und Rogers, P. A.: 1996, Remodeling of the cytoskeletal lattice in denervated skeletal muscle, *Muscle Nerve* **19**(11), 1383–90.
- Bowery, N. G. und Smart, T. G.: 2006, GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history, *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S109–19.
- Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin: 2009, Schäden und Beeinträchtigungen durch Lärm. URL http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Laerm-und-Akustik/Schaeden.html?__nnn=true&__nnn=true.
- Burke, R. E., Rudomin, P. und Zajac (3rd), F. E.: 1970, Catch property in single mammalian motor units, *Science* **168**(927), 122–4.
- Burke, R. E., Rudomin, P. und Zajac (3rd), F. E.: 1976, The effect of activation history on tension production by individual muscle units, *Brain Res* **109**(3), 515–29.
- Butikofer, R. und Lawrence, P. D.: 1979, Electrocutaneous nerve stimulation-II: stimulus waveform selection, *IEEE Trans Biomed Eng* **26**(2), 69–75.
- Carlson, B. M., Hnik, P., Tucek, S., Vejsada, R., Bader, D. M. und Faulkner, J. A.: 1981, Comparison between grafts with intact nerves and standard free grafts of the rat extensor digitorum longus muscle, *Physiol Bohemoslov* **30**(6), 505–14.
- Chan, E., Kovacevic, N., Ho, S. K., Henkelman, R. M. und Henderson, J. T.: 2007, Development of a high resolution three-dimensional surgical atlas of the murine head for strains 129S1/SvImJ and C57Bl/6J using magnetic resonance imaging and micro-computed tomography, *Neuroscience* **144**(2), 604–15.
- Chang, P. L., Lambert, D. T. und Pisa, M. A.: 1993, Behavioural abnormalities in a murine model of a human lysosomal storage disease, *Neuroreport* **4**(5), 507–10.

- Chiba, A., Nakanishi, H., Hiruma, S., Satou, T., Hashimoto, S. und Chichibu, S.: 1998, Magnetically induced motor evoked potentials and H-reflex during nembutal and ketamine anesthesia administration in rats, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **101**(1), 43–57.
- Classen, J., Witte, O. W., Schlaug, G., Seitz, R. J., Holthausen, H. und Benecke, R.: 1995, Epileptic seizures triggered directly by focal transcranial magnetic stimulation, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **94**(1), 19–25.
- Claus, D., Mills, K. R. und Murray, N. M.: 1988, Facilitation of muscle responses to magnetic brain stimulation by mechanical stimuli in man, *Exp Brain Res* **71**(2), 273–8.
- Crago, P. E., Peckham, P. H., Mortimer, J. T. und Van der Meulen, J. P.: 1974, The choice of pulse duration for chronic electrical stimulation via surface, nerve, and intramuscular electrodes, *Ann Biomed Eng* **2**(3), 252–64.
- Crawley, J. N., Belknap, J. K., Collins, A., Crabbe, J. C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R. J., Maxson, S. C., Miner, L. L., Silva, A. J., Wehner, J. M., Wynshaw-Boris, A. und Paylor, R.: 1997, Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies, *Psychopharmacology (Berl)* **132**(2), 107–24.
- Cuddon, P. A.: 2002, Electrophysiology in neuromuscular disease, *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **32**(1), 31–62.
- Curfs, M. H., Gribnau, A. A. und Dederen, P. J.: 1993, Postnatal maturation of the dendritic fields of motoneuron pools supplying flexor and extensor muscles of the distal forelimb in the rat, *Development* **117**(2), 535–41.
- Davey, K., Luo, L. und Ross, D. A.: 1994, Toward functional magnetic stimulation (fMS) theory and experiment, *IEEE Trans Biomed Eng* **41**(11), 1024–30.
- Day, B. L., Dressler, D., Maertens de Noordhout, A., Marsden, C. D., Nakashima, K., Rothwell, J. C. und Thompson, P. D.: 1989, Electric and magnetic stimulation of human motor cortex: surface EMG and single motor unit responses, *J Physiol* **412**, 449–73.
- de Kroon, J. R., Ijzerman, M. J., Chae, J., Lankhorst, G. J. und Zilvold, G.: 2005, Relation between stimulation characteristics and clinical outcome in studies using electrical stimulation to improve motor control of the upper extremity in stroke, *J Rehabil Med* **37**(2), 65–74.
- de Lahunta, A.: 1983, *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*, zweite Edition, W.B. Saunders Company.

- de Lahunta, A. und Glass, E.: 2009a, *Lower Motor Neuron: Spinal Nerve, General Somatic Efferent System*, Veterinary Neuroanatomy And Clinical Neurology, dritte Edition, Elsevier.
- de Lahunta, A. und Glass, E.: 2009b, *Veterinary Neuroanatomy And Clinical Neurology*, dritte Edition, Elsevier.
- Delvaux, V., Alagona, G., Gerard, P., De Pasqua, V., Delwaide, P. J. und Maertens de Noordhout, A.: 2001, Reduced excitability of the motor cortex in untreated patients with de novo idiopathic "grand mal" seizures, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **71**(6), 772–6.
- Desmedt, J. E. und Godaux, E.: 1977, Ballistic contractions in man: characteristic recruitment pattern of single motor units of the tibialis anterior muscle, *J Physiol* **264**(3), 673–93.
- Dhuna, A., Gates, J. und Pascual-Leone, A.: 1991, Transcranial magnetic stimulation in patients with epilepsy, *Neurology* **41**(7), 1067–71.
- Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Pilato, F., Saturno, E., Dileone, M., Mazzone, P., Insola, A., Tonali, P. A. und Rothwell, J. C.: 2004a, The physiological basis of transcranial motor cortex stimulation in conscious humans, *Clin Neurophysiol* **115**(2), 255–66.
- Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Pilato, F., Saturno, E., Insola, A., Mazzone, P., Tonali, P. A. und Rothwell, J. C.: 2002, Descending volleys evoked by transcranial magnetic stimulation of the brain in conscious humans: effects of coil shape, *Clin Neurophysiol* **113**(1), 114–9.
- Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Profice, P., Pennisi, M. A., Pilato, F., Zito, G., Dileone, M., Nicoletti, R., Pasqualetti, P. und Tonali, P. A.: 2003, Ketamine increases human motor cortex excitability to transcranial magnetic stimulation, *J Physiol* **547**(Pt 2), 485–96.
- Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Profice, P., Saturno, E., Pilato, F., Insola, A., Mazzone, P., Tonali, P. und Rothwell, J. C.: 1998a, Comparison of descending volleys evoked by transcranial magnetic and electric stimulation in conscious humans, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **109**(5), 397–401.
- Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Saturno, E., Pilato, F., Dileone, M., Sabatelli, M. und Tonali, P. A.: 2004b, Motor cortex stimulation for amyotrophic lateral sclerosis. Time for a therapeutic trial?, *Clin Neurophysiol* **115**(6), 1479–85.
- Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Saturno, E., Pilato, F., Insola, A., Mazzone, P., Profice, P., Tonali, P. und Rothwell, J. C.: 2001, The effect on corticospinal volleys of reversing the direction of current induced in the motor cortex by transcranial magnetic stimulation, *Exp Brain Res* **138**(2), 268–73.

- Di Lazzaro, V., Restuccia, D., Oliviero, A., Profice, P., Ferrara, L., Insola, A., Mazzone, P., Tonali, P. und Rothwell, J. C.: 1998b, Effects of voluntary contraction on descending volleys evoked by transcranial stimulation in conscious humans, *J Physiol* **508**(Pt 2), 625–33.
- Dimitrijevic, M. R., Kofler, M., McKay, W. B., Sherwood, A. M., Van der Linden, C. und Lissens, M. A.: 1992, Early and late lower limb motor evoked potentials elicited by transcranial magnetic motor cortex stimulation, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **85**(6), 365–73.
- Dull, S. T., Konrad, P. E. und Tacker, W. A., J.: 1990, Amplitude and latency characteristics of spinal cord motor evoked potentials in the rat, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **77**(1), 68–76.
- Dupuis, L., Fergani, A., Braunstein, K. E., Eschbach, J., Holl, N., Rene, F., Gonzalez De Aguilar, J. L., Zoerner, B., Schwalenstocker, B., Ludolph, A. C. und Loeffler, J. P.: 2009, Mice with a mutation in the dynein heavy chain 1 gene display sensory neuropathy but lack motor neuron disease, *Exp Neurol* **215**(1), 146–52.
- Dwork, A. J., Arango, V., Underwood, M., Ilievski, B., Rosoklija, G., Sackeim, H. A. und Lisanby, S. H.: 2004, Absence of histological lesions in primate models of ECT and magnetic seizure therapy, *Am J Psychiatry* **161**(3), 576–8.
- Ebert, U., Frey, H. und Schulz, R.: 2002, *Pharmakologie des zentralen Nervensystems*, Frey, H. H. und Löscher, W.: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, zweite Edition, Enke Verlag, Stuttgart.
- Ebert, U. und Ziemann, U.: 1999, Altered seizure susceptibility after high-frequency transcranial magnetic stimulation in rats, *Neurosci Lett* **273**(3), 155–8.
- Ellaway, P. H., Rawlinson, S. R., Lewis, H. S., Davey, N. J. und Maskill, D. W.: 1997, Magnetic stimulation excites skeletal muscle via motor nerve axons in the cat, *Muscle Nerve* **20**(9), 1108–14.
- Ensinger, H.: 2005, *Narkose-Inhalationsanästhetika und Injektionsanästhetika*, Aktories, K., Förstermann, U., Hoffmann B. und Starke K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, neunte Edition, Elsevier GmbH, München.
- Erhardt, A., Sillaber, I., Welt, T., Müller, M. B., Singewald, N. und Keck, M. E.: 2004b, Repetitive transcranial magnetic stimulation increases the release of dopamine in the nucleus accumbens shell of morphine-sensitized rats during abstinence, *Neuropsychopharmacology* **29**(11), 2074–80.

- Erhardt, W., Hebestedt, A., Aschenbrenner, G., Pichotka, B. und Blumel, G.: 1984, A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate), *Res Exp Med (Berl)* **184**(3), 159–69.
- Fang, Z. P. und Mortimer, J. T.: 1991, Alternate excitation of large and small axons with different stimulation waveforms: an application to muscle activation, *Med Biol Eng Comput* **29**(5), 543–7.
- Faraday, M.: 1839, In: Experimental researches in electricity, *Bernard Quaritch Ltd, London* **1**, 1–15.
- Fehlings, M. G., Tator, C. H. und Linden, R. D.: 1989, The relationships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials and spinal cord blood flow, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **74**(4), 241–59.
- Fehlings, M. G., Tator, C. H., Linden, R. D. und Piper, I. R.: 1987, Motor evoked potentials recorded from normal and spinal cord-injured rats, *Neurosurgery* **20**(1), 125–30.
- Fehlings, M. G., Tator, C. H., Linden, R. D. und Piper, I. R.: 1988, Motor and somatosensory evoked potentials recorded from the rat, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **69**(1), 65–78.
- Fishback, A. S., Shields, C. B., Linden, R. D., Zhang, Y. P. und Burke, D.: 1995, The effects of propofol on rat transcranial magnetic motor evoked potentials, *Neurosurgery* **37**(5), 969–74.
- Fitzgerald, P. B., Fountain, S. und Daskalakis, Z. J.: 2006, A comprehensive review of the effects of rTMS on motor cortical excitability and inhibition, *Clin Neurophysiol* **117**(12), 2584–96.
- Foehring, R. C., Sypert, G. W. und Munson, J. B.: 1986a, Properties of self-reinnervated motor units of medial gastrocnemius of cat. II. axotomized motoneurons and time course of recovery, *J Neurophysiol* **55**(5), 947–65.
- Foehring, R. C., Sypert, G. W. und Munson, J. B.: 1986b, Properties of self-reinnervated motor units of medial gastrocnemius of cat. I. long-term reinnervation, *J Neurophysiol* **55**(5), 931–46.
- Franzini, A., Ferroli, P., Dones, I., Marras, C. und Broggi, G.: 2003, Chronic motor cortex stimulation for movement disorders: a promising perspective, *Neurol Res* **25**(2), 123–6.

- Fritsch, G. und Hitzig, E.: 1870, Über die elektrische Erregbarkeit des Grosshirns., *Archiv Anat Physiol Wiss Med* **37**, 300–332.
- Fuhr, P., Borggreffe-Chappuis, A., Schindler, C. und Kappos, L.: 2001, Visual and motor evoked potentials in the course of multiple sclerosis, *Brain* **124**(Pt 11), 2162–8.
- Fujiki, M., Isono, M. und Hori, S.: 1990, Spinal and muscle motor evoked potentials following magnetic stimulation in cats, *Neurol Med Chir (Tokyo)* **30**(4), 234–41.
- Garland, S. J. und Griffin, L.: 1999, Motor unit double discharges: statistical anomaly or functional entity?, *Can J Appl Physiol* **24**(2), 113–30.
- George, M. S., Wassermann, E. M., Williams, W. A., Callahan, A., Ketter, T. A., Basser, P., Hallett, M. und Post, R. M.: 1995, Daily repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) improves mood in depression, *Neuroreport* **6**(14), 1853–6.
- Ghaly, R. F., Ham, J. H. und Lee, J. J.: 2001, High-dose ketamine hydrochloride maintains somatosensory and magnetic motor evoked potentials in primates, *Neurol Res* **23**(8), 881–6.
- Ghaly, R. F., Stone, J. L., Lee, J. J., Ham, J. H. und Levy, W. J.: 1999b, Monitoring spinal cord motor and somatosensory evoked potentials in anesthetized primates, *Neurol Res* **21**(4), 359–67.
- Ghaly, R. F., Stone, J. L., Levy, W. J., Kartha, R. und Aldrete, J. A.: 1990a, The effect of nitrous oxide on transcranial magnetic-induced electromyographic responses in the monkey, *J Neurosurg Anesthesiol* **2**(3), 175–81.
- Ghaly, R. F., Stone, J. L., Levy, W. J., Roccaforte, P. und Brunner, E. B.: 1990b, The effect of etomidate on motor evoked potentials induced by transcranial magnetic stimulation in the monkey, *Neurosurgery* **27**(6), 936–42.
- Gianino, S., Stein, S. A., Li, H., Lu, X., Biesiada, E., Ulas, J. und Xu, X. M.: 1999, Postnatal growth of corticospinal axons in the spinal cord of developing mice, *Brain Res Dev Brain Res* **112**(2), 189–204.
- Glaser, W.: 2004, Betriebstechnik III. URL www.pmpluss.com/html/BET5script.pdf.
- Glassman, S. D., Shields, C. B., Linden, R. D., Zhang, Y. P., Nixon, A. R. und Johnson, J. R.: 1993, Anesthetic effects on motor evoked potentials in dogs, *Spine* **18**(8), 1083–9.

- Gordon, T., Brushart, T. M., Amirjani, N. und Chan, K. M.: 2007, The potential of electrical stimulation to promote functional recovery after peripheral nerve injury—comparisons between rats and humans, *Acta Neurochir Suppl* **100**, 3–11.
- Gordon, T. und Mao, J.: 1994, Muscle atrophy and procedures for training after spinal cord injury, *Phys Ther* **74**(1), 50–60.
- Gordon, T. und Stein, R. B.: 1982, Reorganization of motor-unit properties in reinnervated muscles of the cat, *J Neurophysiol* **48**(5), 1175–90.
- Gordon, T., Stein, R. B. und Thomas, C. K.: 1986, Organization of motor units following cross-reinnervation of antagonistic muscles in the cat hind limb, *J Physiol* **374**, 443–56.
- Gordon, T., Thomas, C. K., Stein, R. B. und Erdebil, S.: 1988, Comparison of physiological and histochemical properties of motor units after cross-reinnervation of antagonistic muscles in the cat hindlimb, *J Neurophysiol* **60**(1), 365–78.
- Gorman, P. H. und Mortimer, J. T.: 1983, The effect of stimulus parameters on the recruitment characteristics of direct nerve stimulation, *IEEE Trans Biomed Eng* **30**(7), 407–14.
- Griffin, L., Garland, S. J. und Ivanova, T.: 1998, Discharge patterns in human motor units during fatiguing arm movements, *J Appl Physiol* **85**(5), 1684–92.
- Grill, W. M., J. und Mortimer, J. T.: 1996, The effect of stimulus pulse duration on selectivity of neural stimulation, *IEEE Trans Biomed Eng* **43**(2), 161–6.
- Grünbaum, A. und Sherrington, C.: 1903, Observations on the physiology of the cerebral cortex of the anthropoid apes., *Proc R Soc Lond* **72**, 152–155.
- Gualtierotti, T. und Paterson, A. S.: 1954, Electrical stimulation of the unexposed cerebral cortex, *J Physiol* **125**(2), 278–91.
- Gulati, A. K.: 1988, Long-term retention of regenerative capability after denervation of skeletal muscle, and dependency of late differentiation on innervation, *Anat Rec* **220**(4), 429–34.
- Hafezparast, M., Ahmad-Annuar, A., Wood, N. W., Tabrizi, S. J. und Fisher, E. M.: 2002, Mouse models for neurological disease, *Lancet Neurol* **1**(4), 215–24.
- Hamer, H. M., Reis, J., Mueller, H. H., Knake, S., Overhof, M., Oertel, W. H. und Rosenow, F.: 2005, Motor cortex excitability in focal epilepsies not including the primary motor area—a TMS study, *Brain* **128**(Pt 4), 811–8.

- Hammer, O., Harper, D. und Ryan, P.: 2001, Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis., *Palaeontologia Electronica* **4**(1), 9 pp.
- Han, T. R., Shin, H. I. und Kim, I. S.: 2006, Magnetic stimulation of the quadriceps femoris muscle: comparison of pain with electrical stimulation, *Am J Phys Med Rehabil* **85**(7), 593–9.
- Hara, Y.: 2008, Neurorehabilitation with new functional electrical stimulation for hemiparetic upper extremity in stroke patients, *J Nippon Med Sch* **75**(1), 4–14.
- Harms, V.: 2007, *Physik für Mediziner und Pharmazeuten*, siebzehnte Edition, Harms Verlag.
- Heckmann, M. und Dudel, J.: 2007, *Erregungsleitung und synaptische Übertragung*, Physiologie des Menschen, dreißigste Edition, Springer Lehrbuch.
- Hendricks, H. T., van Limbeek, J., Geurts, A. C. und Zwarts, M. J.: 2002, Motor recovery after stroke: a systematic review of the literature, *Arch Phys Med Rehabil* **83**(11), 1629–37.
- Henke, J. und Erhardt, W.: 2004, *Nager*, Erhardt, W., Henke, J. und Haberstroh, J.: Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen, erste Edition, Schattauer.
- Henneman, E., Somjen, G. und Carpenter, D. O.: 1965, Excitability and inhibitability of motoneurons of different sizes, *J Neurophysiol* **28**(3), 599–620.
- Hennig, R. und Lomo, T.: 1985, Firing patterns of motor units in normal rats, *Nature* **314**(6007), 164–6.
- Hennig, R. und Lomo, T.: 1987, Effects of chronic stimulation on the size and speed of long-term denervated and innervated rat fast and slow skeletal muscles, *Acta Physiol Scand* **130**(1), 115–31.
- Hess, C. W., Mills, K. R. und Murray, N. M.: 1987, Responses in small hand muscles from magnetic stimulation of the human brain, *J Physiol* **388**, 397–419.
- Hopf, H. C., Dengler, R. und Röder, R.: 1996, *Elektromyographie-Atlas*, erste Edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Huang, Y. Z., Edwards, M. J., Rounis, E., Bhatia, K. P. und Rothwell, J. C.: 2005, Theta burst stimulation of the human motor cortex, *Neuron* **45**(2), 201–6.

- Isler, D.: 2003, Ausschuss für Ernährung der Versuchstiere – Besonderheiten der Nährstoffansprüche von Mäusen im Tierversuch.
- Jones, B. J. und Roberts, D. J.: 1968, The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod, *J Pharm Pharmacol* **20**(4), 302–4.
- Kaga, A., Fujiki, M., Hori, S., Nakano, T. und Isono, M.: 2003, Motor evoked potentials following transcranial magnetic stimulation after middle cerebral artery and/or basilar artery occlusions in rats, *J Clin Neurosci* **10**(4), 470–5.
- Kalkman, C. J., Drummond, J. C., Ribberink, A. A., Patel, P. M., Sano, T. und Bickford, R. G.: 1992, Effects of propofol, etomidate, midazolam, and fentanyl on motor evoked responses to transcranial electrical or magnetic stimulation in humans, *Anesthesiology* **76**(4), 502–9.
- Kamida, T., Fujiki, M., Hori, S. und Isono, M.: 1998, Conduction pathways of motor evoked potentials following transcranial magnetic stimulation: a rodent study using a "figure-8" coil, *Muscle Nerve* **21**(6), 722–31.
- Kammer, T., Rehberg, B., Menne, D., Wartenberg, H. C., Wenningmann, I. und Urban, B. W.: 2002, Propofol and sevoflurane in subanesthetic concentrations act preferentially on the spinal cord: evidence from multimodal electrophysiological assessment, *Anesthesiology* **97**(6), 1416–25.
- Kaneko, K., Kawai, S., Fuchigami, Y., Shiraishi, G. und Ito, T.: 1996, Effect of stimulus intensity and voluntary contraction on corticospinal potentials following transcranial magnetic stimulation, *J Neurol Sci* **139**(1), 131–6.
- Kantor, G., Alon, G. und Ho, H. S.: 1994, The effects of selected stimulus waveforms on pulse and phase characteristics at sensory and motor thresholds, *Phys Ther* **74**(10), 951–62.
- Keck, M. E., Welt, T., Post, A., Muller, M. B., Toschi, N., Wigger, A., Landgraf, R., Holsboer, F. und Engelmann, M.: 2001, Neuroendocrine and behavioral effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a psychopathological animal model are suggestive of antidepressant-like effects, *Neuropsychopharmacology* **24**(4), 337–49.
- Konrad, P. E., Owen, J. H. und Bridwell, K. H.: 1994, Magnetic stimulation of the spine to produce lower extremity emg responses. significance of coil position and the presence of bone, *Spine* **19**(24), 2812–8.
- Konrad, P. E., Tacker, W. A., Levy, W. J., Reedy, D. P., Cook, J. R. und Geddes, L. A.: 1987, Motor evoked potentials in the dog: effects of global ischemia on spinal cord and peripheral nerve signals, *Neurosurgery* **20**(1), 117–24.

- Krasteva, V. T., Papazov, S. P. und Daskalov, I. K.: 2003, Peripheral nerve magnetic stimulation: influence of tissue non-homogeneity, *Biomed Eng Online* **2**, 19.
- Kriz, J., Meier, J., Julien, J. P. und Padjen, A. L.: 2000, Altered ionic conductances in axons of transgenic mouse expressing the human neurofilament heavy gene: A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, *Exp Neurol* **163**(2), 414–21.
- Kudina, L. P. und Alexeeva, N. L.: 1992, Repetitive doublets of human motoneurons: analysis of interspike intervals and recruitment pattern, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **85**(4), 243–7.
- Landon, D.: 1992, *Skeletal muscle – normal morphology, development and innervation*, Skeletal Muscle Pathology, zweite Edition, Churchill Livingstone, New York.
- Laurent, G.: 2004a, *Lesion localization and differential diagnosis*, Platt, S. R. und Olby, N. J.: BSAVA Manual Of Canine And Feline Neurology, erste Edition, British Small Animal Veterinary Association.
- Laurent, G.: 2004b, *The neurological examination*, Platt, S. R. und Olby, N. J.: BSAVA Manual Of Canine And Feline Neurology, erste Edition, British Small Animal Veterinary Association.
- Leandri, M., Leandri, S. und Lunardi, G.: 2008, Effect of temperature on sensory and motor conduction of the rat tail nerves, *Neurophysiol Clin* **38**(5), 297–304.
- Lee, S. C., Gerdomeo, M. L. und Binder-Macleod, S. A.: 1999, Effects of length on the catchlike property of human quadriceps femoris muscle, *Phys Ther* **79**(8), 738–48.
- Lefaucheur, J. P.: 2005, Motor cortex dysfunction revealed by cortical excitability studies in parkinson's disease: influence of antiparkinsonian treatment and cortical stimulation, *Clin Neurophysiol* **116**(2), 244–53.
- Lemon, R. N. und Griffiths, J.: 2005, Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization, *Muscle Nerve* **32**(3), 261–79.
- Leocani, L., Rovaris, M., Boneschi, F. M., Medaglini, S., Rossi, P., Martinelli, V., Amadio, S. und Comi, G.: 2006, Multimodal evoked potentials to assess the evolution of multiple sclerosis: a longitudinal study, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77**(9), 1030–5.
- Liberson, W. T., Holmquest, H. J., Scot, D. und Dow, M.: 1961, Functional electrotherapy: stimulation of the peroneal nerve synchronized with the swing phase of the gait of hemiplegic patients, *Arch Phys Med Rehabil* **42**, 101–5.

- Liepert, J., Bauder, H., Wolfgang, H. R., Miltner, W. H., Taub, E. und Weiller, C.: 2000, Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans, *Stroke* **31**(6), 1210–6.
- Lo, Y. L., Chan, L. L., Lim, W., Tan, S. B., Tan, C. T., Chen, J. L., Fook-Chong, S. und Ratnagopal, P.: 2006, Transcranial magnetic stimulation screening for cord compression in cervical spondylosis, *J Neurol Sci* **244**(1-2), 17–21.
- Lotz, B. P., Dunne, J. W. und Daube, J. R.: 1989, Preferential activation of muscle fibers with peripheral magnetic stimulation of the limb, *Muscle Nerve* **12**(8), 636–9.
- Luft, A. R., Kaelin-Lang, A., Hauser, T. K., Cohen, L. G., Thakor, N. V. und Hanley, D. F.: 2001, Transcranial magnetic stimulation in the rat, *Exp Brain Res* **140**(1), 112–21.
- Lyons, G. M., Sinkjaer, T., Burridge, J. H. und Wilcox, D. J.: 2002, A review of portable fes-based neural orthoses for the correction of drop foot, *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* **10**(4), 260–79.
- Machetanz, J., Bischoff, C., Pichlmeier, R., Riescher, H., Meyer, B. U., Sader, A. und Conrad, B.: 1994, Magnetically induced muscle contraction is caused by motor nerve stimulation and not by direct muscle activation, *Muscle Nerve* **17**(10), 1170–5.
- Marqueste, T., Alliez, J. R., Alluin, O., Jammes, Y. und Decherchi, P.: 2004, Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair, *J Appl Physiol* **96**(5), 1988–95.
- Marqueste, T., Decherchi, P., Desplanches, D., Favier, R., Grelot, L. und Jammes, Y.: 2006, Chronic electrostimulation after nerve repair by self-anastomosis: effects on the size, the mechanical, histochemical and biochemical muscle properties, *Acta Neuropathol* **111**(6), 589–600.
- Marsolais, E. B. und Kobetic, R.: 1988, Development of a practical electrical stimulation system for restoring gait in the paralyzed patient, *Clin Orthop Relat Res* **233**, 64–74.
- Masuya, H., Inoue, M., Wada, Y., Shimizu, A., Nagano, J., Kawai, A., Inoue, A., Kagami, T., Hirayama, T., Yamaga, A., Kaneda, H., Kobayashi, K., Minowa, O., Miura, I., Gondo, Y., Noda, T., Wakana, S. und Shiroishi, T.: 2005, Implementation of the modified-SHIRPA protocol for screening of dominant phenotypes in a large-scale enu mutagenesis program, *Mamm Genome* **16**(11), 829–37.
- Mathis, J., Seemann, U., Weyh, T., Jakob, C. und Struppler, A.: 1995, The boundary effect in magnetic stimulation. Analysis at the peripheral nerve, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **97**(5), 238–45.

- Mayhew, I.: 2008, *Large Animal Neurology*, zweite Edition, Wiley John & Sons.
- Medical Research Council Harwell: 2007, SHIRPA. URL <http://www.har.mrc.ac.uk/services/phenotyping/neurology/shirpa.html>.
- Merton, P. A., Hill, D. K., Morton, H. B. und Marsden, C. D.: 1982, Scope of a technique for electrical stimulation of human brain, spinal cord, and muscle, *Lancet* **2**(8298), 597–600.
- Merton, P. A. und Morton, H. B.: 1980, Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject, *Nature* **285**(5762), 227.
- Mesrati, F. und Vecchierini, M. F.: 2004, F-waves: neurophysiology and clinical value, *Neurophysiol Clin* **34**(5), 217–43.
- Mills, K. R. und Murray, N. M.: 1985, Corticospinal tract conduction time in multiple sclerosis, *Ann Neurol* **18**(5), 601–5.
- Moshagen, V., Moschner, C. und Wessel, K.: 2003, Wertigkeit neurophysiologischer Verfahren bei der Differentialdiagnose der Systematrophien, *Clin Neurophysiol* **34**, 55–64.
- Mourselas, N. und Granat, M. H.: 1998, Evaluation of patterned stimulation for use in surface functional electrical stimulation systems, *Med Eng Phys* **20**(5), 319–24.
- Muller, U., Cristina, N., Li, Z. W., Wolfer, D. P., Lipp, H. P., Rulicke, T., Brandner, S., Aguzzi, A. und Weissmann, C.: 1994, Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene, *Cell* **79**(5), 755–65.
- Nakashima, K., Wang, Y., Shimoda, M., Sakuma, K. und Takahashi, K.: 1995, Shortened silent period produced by magnetic cortical stimulation in patients with parkinson's disease, *J Neurol Sci* **130**(2), 209–14.
- Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kusky, J. R., Diewert, V. M., Richman, J. M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J. D., Phillips, A. G. und Hayden, M. R.: 1995, Targeted disruption of the huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes, *Cell* **81**(5), 811–23.
- Neumann, W.: 1999, Domitor und Antisedan, Sedations- und Anästhesieempfehlungen für Hund, Katze, kleine Heimtiere und Vögel. URL www.vetmed.de/vet/download/antisedan.pdf.
- Nielsen, J. B., Perez, M. A., Oudega, M., Enriquez-Denton, M. und Aimonetti, J. M.: 2007, Evaluation of transcranial magnetic stimulation for investigating transmission in descending motor tracts in the rat, *Eur J Neurosci* **25**(3), 805–14.

- Nielsen, J. F.: 1994, Standardization of facilitation of compound muscle action potentials using a modified myometer during magnetic stimulation in healthy volunteers, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **93**(1), 75–9.
- Nolan, P. M., Peters, J., Vizer, L., Strivens, M., Washbourne, R., Hough, T., Wells, C., Glenister, P., Thornton, C., Martin, J., Fisher, E., Rogers, D., Hagan, J., Reavill, C., Gray, I., Wood, J., Spurr, N., Browne, M., Rastan, S., Hunter, J. und Brown, S. D.: 2000, Implementation of a large-scale ENU mutagenesis program: towards increasing the mouse mutant resource, *Mamm Genome* **11**(7), 500–6.
- Nollet, H., Deprez, P., Van Ham, L., Verschooten, F. und Vanderstraeten, G.: 2002, The use of magnetic motor evoked potentials in horses with cervical spinal cord disease, *Equine Vet J* **34**(2), 156–63.
- Nollet, H., Van Ham, L., Deprez, P. und Vanderstraeten, G.: 2003a, Transcranial magnetic stimulation: review of the technique, basic principles and applications, *Vet J* **166**(1), 28–42.
- Nollet, H., Van Ham, L., Dewulf, J., Vanderstraeten, G. und Deprez, P.: 2003b, Standardization of transcranial magnetic stimulation in the horse, *Vet J* **166**(3), 244–50.
- Nollet, H., Van Ham, L., Gasthuys, F., Dewulf, J., Vanderstraeten, G. und Deprez, P.: 2003c, Influence of detomidine and buprenorphine on motor-evoked potentials in horses, *Vet Rec* **152**(17), 534–7.
- Nollet, H., Van Ham, L., Verschooten, F., Vanderstraeten, G. und Deprez, P.: 2003d, Use of magnetic motor-evoked potentials in horses with bilateral hind limb ataxia, *Am J Vet Res* **64**(11), 1382–6.
- Oudega, M., Varon, S. und Hagg, T.: 1994, Distribution of corticospinal motor neurons in the postnatal rat: quantitative evidence for massive collateral elimination and modest cell death, *J Comp Neurol* **347**(1), 115–26.
- Parmigiani, S., Palanza, P., Rogers, J. und Ferrari, P. F.: 1999, Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience, *Neurosci Biobehav Rev* **23**(7), 957–69.
- Pascual-Leone, A., Davey, N. J., Rothwell, J., Wassermann, E. M. und Puri, B. K.: 2002, *Handbook of Transcranial Magnetic Stimulation*, erste Edition, Arnold-Verlag.
- Pascual-Leone, A., Tarazona, F., Keenan, J., Tormos, J. M., Hamilton, R. und Catala, M. D.: 1999, Transcranial magnetic stimulation and neuroplasticity, *Neuropsychologia* **37**(2), 207–17.

- Penfield, W. und Boldrey, E.: 1937, Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation., *Brain* **60**, 389–443.
- Peterchev, A., Jalinous, R. und Lisanby, S.: 2008, A transcranial magnetic stimulator inducing near-rectangular pulses with controllable pulse width (cTMS)., *IEE Trans Biomed Eng* **55**, 257–66.
- Polson, M. J., Barker, A. T. und Freeston, I. L.: 1982, Stimulation of nerve trunks with time-varying magnetic fields, *Med Biol Eng Comput* **20**(2), 243–4.
- Poma, R., Parent, J. M., Holmberg, D. L., Partlow, G. D., Monteith, G. und Sylvestre, A. M.: 2002, Correlation between severity of clinical signs and motor evoked potentials after trans-cranial magnetic stimulation in large-breed dogs with cervical spinal cord disease, *J Am Vet Med Assoc* **221**(1), 60–4.
- Post, A., Muller, M. B., Engelmann, M. und Keck, M. E.: 1999a, Repetitive transcranial magnetic stimulation in rats: evidence for a neuroprotective effect in vitro and in vivo, *Eur J Neurosci* **11**(9), 3247–54.
- Priori, A., Berardelli, A., Inghilleri, M., Accornero, N. und Manfredi, M.: 1994, Motor cortical inhibition and the dopaminergic system. pharmacological changes in the silent period after transcranial brain stimulation in normal subjects, patients with parkinson's disease and drug-induced parkinsonism, *Brain* **117** (Pt 2), 317–23.
- Reeves, R. H., Irving, N. G., Moran, T. H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S. S., Schmidt, C., Bronson, R. T. und Davisson, M. T.: 1995, A mouse model for down syndrome exhibits learning and behaviour deficits, *Nat Genet* **11**(2), 177–84.
- Reid, V.: 2003, Transcranial magnetic stimulation, *Phys Med Rehabil Clin N Am* **14**(2), 307–25, ix.
- Reilly, J. P., Freeman, V. T. und Larkin, W. D.: 1985, Sensory effects of transient electrical stimulation—evaluation with a neuroelectric model, *IEEE Trans Biomed Eng* **32**(12), 1001–11.
- Robertson, J., Kriz, J., Nguyen, M. D. und Julien, J. P.: 2002, Pathways to motor neuron degeneration in transgenic mouse models, *Biochimie* **84**(11), 1151–60.
- Rogers, D. C., Fisher, E. M., Brown, S. D., Peters, J., Hunter, A. J. und Martin, J. E.: 1997, Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment, *Mamm Genome* **8**(10), 711–3.

- Rogers, D. C., Jones, D. N., Nelson, P. R., Jones, C. M., Quilter, C. A., Robinson, T. L. und Hagan, J. J.: 1999, Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains, *Behav Brain Res* **105**(2), 207–17.
- Rogers, D. C., Peters, J., Martin, J. E., Ball, S., Nicholson, S. J., Witherden, A. S., Hafezparast, M., Latcham, J., Robinson, T. L., Quilter, C. A. und Fisher, E. M.: 2001, SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice, *Neurosci Lett* **306**(1-2), 89–92.
- Romanul, F. C.: 1964, Enzymes in muscle.I. histochemical studies of enzymes in individual muscle fibers, *Arch Neurol* **11**, 355–8.
- Rossini, P. M., Berardelli, A. und Deuschl, G.: 1999, Applications of magnetic cortical stimulation. the international federation of clinical neurophysiology., *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* **52**, 171–185.
- Rossini, P. M., Caramia, M. D. und Zarola, F.: 1987, Mechanisms of nervous propagation along central motor pathways: noninvasive evaluation in healthy subjects and in patients with neurological disease, *Neurosurgery* **20**(1), 183–91.
- Rossini, P. M. und Rossi, S.: 2007, Transcranial magnetic stimulation: diagnostic, therapeutic, and research potential, *Neurology* **68**(7), 484–8.
- Roth, B. J.: 1994, Mechanisms for electrical stimulation of excitable tissue, *Crit Rev Biomed Eng* **22**(3-4), 253–305.
- Rothwell, J. C., Hallett, M., Berardelli, A., Eisen, A., Rossini, P. und Paulus, W.: 1999, Magnetic stimulation: motor evoked potentials. the international federation of clinical neurophysiology, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* **52**, 97–103.
- Rudelius, M., Osanger, A., Kohlmann, S., Augustin, M., Piontek, G., Heinzmann, U., Jennen, G., Russ, A., Matiasek, K., Stumm, G. und Schlegel, J.: 2006, A missense mutation in the WD40 domain of murine Lyst is linked to severe progressive Purkinje cell degeneration, *Acta Neuropathol* **112**(3), 267–76.
- Ruohonen, J. und Ilmoniemi, R. J.: 1998, Focusing and targeting of magnetic brain stimulation using multiple coils, *Med Biol Eng Comput* **36**(3), 297–301.
- Ruohonen, J., Panizza, M., Nilsson, J., Ravazzani, P., Grandori, F. und Tognola, G.: 1996, Transverse-field activation mechanism in magnetic stimulation of peripheral nerves, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **101**(2), 167–74.

- Russell, G. B., Schwentker, M. C. und Graybeal, J. M.: 1994, Preservation of neurogenic motor-evoked potentials during isoflurane electroencephalographic burst suppression in rats, *Spine* **19**(23), 2632–6.
- Sachs, L.: 2004, *Angewandte Statistik*, zwölfte Edition, Springer Verlag.
- Salle, J. Y., Hugon, J., Tabaraud, F., Boulesteix, J. M., Vallat, J. M., Dumas, M. und Poser, C. M.: 1992, Improvement in motor evoked potentials and clinical course post-steroid therapy in multiple sclerosis, *J Neurol Sci* **108**(2), 184–8.
- Salmons, S. und Sreter, F. A.: 1976, Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type, *Nature* **263**(5572), 30–4.
- Salmons, S. und Vrbova, G.: 1967, Changes in the speed of mammalian fast muscle following longterm stimulation, *J Physiol* **192**(2), 39P–40P.
- Salmons, S. und Vrbova, G.: 1969, The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles, *J Physiol* **201**(3), 535–49.
- Saunders, D. G.: 2007, Therapeutic exercise, *Clin Tech Small Anim Pract* **22**(4), 155–9.
- Scheufler, K. M. und Zentner, J.: 2002, Total intravenous anesthesia for intraoperative monitoring of the motor pathways: an integral view combining clinical and experimental data, *J Neurosurg* **96**(3), 571–9.
- Schmid, U. D., Boll, J., Liechti, S., Schmid, J. und Hess, C. W.: 1992, Influence of some anesthetic agents on muscle responses to transcranial magnetic cortex stimulation: a pilot study in humans, *Neurosurgery* **30**(1), 85–92.
- Schneider, I., Tirsch, W. S., Faus-Kessler, T., Becker, L., Kling, E., Busse, R. L., Bender, A., Feddersen, B., Tritschler, J., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Englmeier, K. H., de Angelis, M. H. und Klopstock, T.: 2006, Systematic, standardized and comprehensive neurological phenotyping of inbred mice strains in the german mouse clinic, *J Neurosci Methods* **157**(1), 82–90.
- Searle, A. G., Peters, J., Lyon, M. F., Hall, J. G., Evans, E. P., Edwards, J. H. und Buckle, V. J.: 1989, Chromosome maps of man and mouse. iv, *Ann Hum Genet* **53**(Pt 2), 89–140.
- Sheng, M. und Greenberg, M. E.: 1990, The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system, *Neuron* **4**(4), 477–85.

- Shiau, J. S., Zappulla, R. A. und Nieves, J.: 1992, The effect of graded spinal cord injury on the extrapyramidal and pyramidal motor evoked potentials of the rat, *Neurosurgery* **30**(1), 76–84.
- Shumway, R.: 2007, Rehabilitation in the first 48 hours after surgery, *Clin Tech Small Anim Pract* **22**(4), 166–70.
- Siebner, H. R. und Ziemann, U.: 2007, *Das TMS-Buch*, erste Edition, Springer Medizin Verlag.
- Sihle-Wissel, M., Scholz, M. und Cunitz, G.: 2000, Transcranial magnetic-evoked potentials under total intravenous anaesthesia and nitrous oxide, *Br J Anaesth* **85**(3), 465–7.
- Silbernagl, S. und Despopoulos, A.: 2007, *Nerv und Muskel, Arbeit*, Taschenatlas der Physiologie, siebte Edition, Thieme Verlag.
- Soens, I. V., Polis, I. E., Nijs, J. X., Struys, M. M., Bhatti, S. F. und Ham, L. M.: 2008, Magnetic stimulation of peripheral nerves in dogs: A pilot study, *Vet J* **178**, 288–290.
- Stewart, M., Quirk, G. J. und Amassian, V. E.: 1990, Corticospinal responses to electrical stimulation of motor cortex in the rat, *Brain Res* **508**(2), 341–4.
- Stone, J. L., Ghaly, R. F., Levy, W. J., Kartha, R., Krinsky, L. und Roccaforte, P.: 1992, A comparative analysis of enflurane anesthesia on primate motor and somatosensory evoked potentials, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **84**(2), 180–7.
- Sylvestre, A. M., Cockshutt, J. R., Parent, J. M., Brooke, J. D., Holmberg, D. L. und Partlow, G. D.: 1993, Magnetic motor evoked potentials for assessing spinal cord integrity in dogs with intervertebral disc disease, *Vet Surg* **22**(1), 5–10.
- Talelli, P., Greenwood, R. J. und Rothwell, J. C.: 2006, Arm function after stroke: neurophysiological correlates and recovery mechanisms assessed by transcranial magnetic stimulation, *Clin Neurophysiol* **117**(8), 1641–59.
- Taniguchi, M., Nadstawek, J., Langenbach, U., Bremer, F. und Schramm, J.: 1993, Effects of four intravenous anesthetic agents on motor evoked potentials elicited by magnetic transcranial stimulation, *Neurosurgery* **33**(3), 407–15; discussion 415.
- Tassinari, C. A., Cincotta, M., Zaccara, G. und Michelucci, R.: 2003, Transcranial magnetic stimulation and epilepsy, *Clin Neurophysiol* **114**(5), 777–98.
- Terashima, T.: 1995, Course and collaterals of corticospinal fibers arising from the sensorimotor cortex of the reeler mouse, *Dev Neurosci* **17**(1), 8–19.

- Teresi, L. M., Lufkin, R. B., Reicher, M. A., Moffit, B. J., Vinuela, F. V., Wilson, G. M., Bentson, J. R. und Hanafee, W. N.: 1987, Asymptomatic degenerative disk disease and spondylosis of the cervical spine: Mr imaging, *Radiology* **164**(1), 83–8.
- The Mouse Brain Library: 2007, Mouse Brain Atlas: C57BL/6J. URL http://www.mbl.org/atlas170/atlas170_start.html.
- Travlos, A., Pant, B. und Eisen, A.: 1992, Transcranial magnetic stimulation for detection of preclinical cervical spondylotic myelopathy, *Arch Phys Med Rehabil* **73**(5), 442–6.
- Trepel, M.: 2004a, *Großhirn (Telencephalon) und funktionelle Bahnsysteme*, Neuroanatomie – Struktur und Funktion, 3. Edition, Elsevier.
- Trepel, M.: 2004b, *Mittelhirn (Mesencephalon)*, Neuroanatomie – Struktur und Funktion, dritte Edition, Elsevier.
- Tuday, E. C., Olree, K. S. und Horch, K. W.: 2006, Differential activation of nerve fibers with magnetic stimulation in humans, *BMC Neurosci* **7**, 58.
- Valentine, B. A. und McGavin, M. D.: 2007, *Skeletal Muscle*, McGavin, M. D., Zachary, J. F.: Pathologic Basis of Veterinary Disease, vierte Edition, Mosby Elsevier.
- Van Ham, L. M., Mattheeuws, D. und Vanderstraeten, G.: 1995, Transcranial magnetic motor evoked potentials in anesthetized dogs, *Progress in Veterinary Neurology* **6**(1), 5–12.
- Van Ham, L. M., Nijs, J., Mattheeuws, D. R. und Vanderstraeten, G. G.: 1996, Sufentanil and nitrous oxide anaesthesia for the recording of transcranial magnetic motor evoked potentials in dogs, *Vet Rec* **138**(26), 642–5.
- Van Ham, L. M., Vanderstraeten, G., Mattheeuws, D. und Nijs, J.: 1994, Transcranial magnetic motor evoked potentials in sedated dogs, *Progress in Veterinary Neurology* **5**(4), 147–154.
- van Kerkhof, P.: 2005, Muskelstimulation. URL <http://www.physiosupport.org/mustim.htm>.
- van Lunteren, E. und Sankey, C. B.: 2000, Catchlike property of rat diaphragm: subsequent train frequency effects in variable-train stimulation, *J Appl Physiol* **88**(2), 586–98.
- Vogt, C. und Vogt, O.: 1919, Allgemeinere Ergebnisse unserer Hirnforschung, *J Psychol Neurol (Lpz)* **25**, 277–462.

- Wang, H., Wang, X. und Scheich, H.: 1996, LTD and LTP induced by transcranial magnetic stimulation in auditory cortex, *Neuroreport* **7**(2), 521–5.
- Wassermann, E. M.: 1998, Risk and safety of repetitive transcranial magnetic stimulation: report and suggested guidelines from the international workshop on the safety of repetitive transcranial magnetic stimulation, june 5-7, 1996, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **108**(1), 1–16.
- Weissman, J. D., Epstein, C. M. und Davey, K. R.: 1992, Magnetic brain stimulation and brain size: relevance to animal studies, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **85**(3), 215–9.
- Wendicke, K.: 2006, *Optimierung von Stimulationsspulen für die Induktive Nervenreizung*, Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Technische Universität München.
- Wiestner, T., Hogg, H. P., Heckmann, R. und Waxenberger, M. K.: 1992, Instrumentation for simultaneous recording of compound muscle action potentials and related force in the dog, *Zentralbl Veterinarmed A* **39**(5), 365–71.
- Yamada, H., Transfeldt, E. E., Tamaki, T., Torres, F. und Iaizzo, P. A.: 1994, The effects of volatile anesthetics on the relative amplitudes and latencies of spinal and muscle potentials evoked by transcranial magnetic stimulation, *Spine* **19**(13), 1512–7.
- Young, S. S., Boermans, H. J. und Sylvestre, A. M.: 1994, Magnetic motor evoked potentials during methohexital anesthesia in the dog, *Neurosurgery online* **34**(3), 490–495.
- Young, S. S. und Sylvestre, A.: 1993, A pilot study of the effects of anesthesia with isoflurane, thiopental, methohexital, propofol, or nitrous oxide on magnetic motor evoked potentials in the dog, *Progress in Veterinary Neurology* **3**(3), 91–94.
- Yue, L., Xiao-lin, H. und Tao, S.: 2009, The effects of chronic repetitive transcranial magnetic stimulation on glutamate and gamma-aminobutyric acid in rat brain, *Brain Research* **1260**, 94–99.
- Zachary, J. F.: 2007, *Nervous System*, McGavin, M. D., Zachary, J. F.: Pathologic Basis of Veterinary Disease, vierte Edition, Mosby Elsevier.
- Zajac, F. E. und Young, J. L.: 1980, Discharge properties of hindlimb motoneurons in decerebrate cats during locomotion induced by mesencephalic stimulation, *J Neurophysiol* **43**(5), 1221–35.

- Zantow, H.: 2007, *Optimierung des Strom-Zeitverlaufs für die Depolarisation von Nervenzellen*, Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Technischen Universität München.
- Zappulla, R. A., Hollis, P., Ryder, J., Moore, F. M., Adamson, J., Moustakis, W. und Malis, L. I.: 1988, Noncortical origins of the spinal motor evoked potential in rats, *Neurosurgery* **22**(5), 846–52.
- Zhang, X., Mei, Y., Liu, C. und Yu, S.: 2007a, Effect of transcranial magnetic stimulation on the expression of c-fos and brain-derived neurotrophic factor of the cerebral cortex in rats with cerebral infarct, *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **27**(4), 415–8.
- Zhang, Y. P., Shields, L. B., Zhang, Y., Pei, J., Xu, X. M., Hoskins, R., Cai, J., Qiu, M. S., Magnuson, D. S., Burke, D. A. und Shields, C. B.: 2007b, Use of magnetic stimulation to elicit motor evoked potentials, somatosensory evoked potentials, and H-reflexes in non-sedated rodents, *J Neurosci Methods* **165**(1), 9–17.
- Ziemann, U.: 2004, TMS and drugs, *Clin Neurophysiol* **115**(8), 1717–29.
- Zileli, M. und Schramm, J.: 1991, Motor versus somatosensory evoked potential changes after acute experimental spinal cord injury in rats, *Acta Neurochir (Wien)* **108**(3-4), 140–7.