

**Aus dem Institut für experimentelle Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin**

**Dissertation**

**Selektiver neuronaler Zelltod nach milder fokaler Ischämie in der Maus**

**Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin  
Berlin**

**von Andrea Gietz  
aus Berlin**

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. med. M. Endres**
- 2. Priv. - Doz. Dr. med. N. Plesnila**
- 3. Priv. - Doz. Dr. med. L. Hirt**

**Datum der Promotion: 27. März 2009**

**Widmung**

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	6
1.1. Schlaganfall .....	6
1.2. Tiermodell der fokalen zerebralen Ischämie .....	8
1.3. Aufbau des Striatum .....	9
1.4. Immunhistochemische Methode .....	18
2. Herleitung der Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit .....	21
3. Methodik .....	22
3.1. Tiere .....	22
3.2. Das Filamentenmodell: Okklusion der mittleren zerebralen Arterie .....	22
3.3. Gebietsmessung und Zellzählung .....	23
3.4. Statistik .....	25
3.5. Lichtmikroskopie und Kamera .....	25
3.6. Gewebeaufbereitung: Transkardiale Fixation des Gewebes .....	26
3.7. Schneiden und Lagerung des fixierten Gehirns .....	27
3.8. Immunhistochemische Verfahren zur Darstellung der Antigene .....	27
3.9. Detaillierte Färbungsprotokolle der entsprechenden Antikörper .....	32
4. Material .....	39
4.1 Pufferlösungen .....	39
4.2. Fixativa .....	40
4.3. Übrige Substrat-Zubereitung .....	41
4.4. Reagenzien .....	43
4.5. Geräte .....	45
4.6. Software .....	45
5. Ergebnisse .....	46
5.1. Anatomische Bestimmung des neuronalen Zellschadens .....	46
5.2. Striatale Gebietsgröße mittels NeuN- und Map2-Färbung .....	46
5.3. Striatale Zellzählung NeuN-positiver Neurone .....	48
5.4. Striatale Zellzählung NeuN-ir Neurone und Interneurone .....	50
5.5. Striatale Verteilung und Zelldichte der Interneurone .....	51
5.6. Striatale Verteilung und Zelldichte ChAT-positiver Neurone .....	53
5.7. Striatale Verteilung und Zelldichte Parvalbumin-positiver Neurone .....	55
5.8. Striatale Verteilung und Zelldichte Somatostatin-positiver Neurone .....	57

5.9. Striatale Verteilung und Zelldichte Calretinin-positiver Neurone .....	59
6. Abbildungen .....	62
7. Diskussion .....	74
7.1. Zeitliche Bestimmung des neuronalen Zellschadens .....	74
7.2. Topographie der Läsion .....	75
7.3. Atrophie des ischämischen Striatum .....	76
7.4. Verteilung der Interneurone im intakten Striatum .....	76
7.5. Selektive neuronale Vulnerabilität im Striatum .....	78
7.6. Selektive neuronale Resistenz cholinergischer Interneurone .....	79
7.7. Selektive neuronale Resistenz parvalbuminergischer Interneurone .....	81
7.8. Selektive neuronale Resistenz somatostatinerger Interneurone .....	83
7.9. Selektive neuronale Resistenz calretininergischer Interneurone .....	85
8. Mögliche Ursachen der selektiven neuronalen Resistenz der Interneurone.....	87
9. Ausblick .....	91
10. Zusammenfassung .....	92
11. Abkürzungen .....	94
12. Literatur .....	96
13. Publikationen.....	110
14. Danksagung .....	111
15. Erklärung .....	112

# **1. Einleitung**

## **1.1. Schlaganfall**

### **1.1.1. Definition des Schlaganfalls:**

Nach der WHO (World Health Organisation) ist der Schlaganfall ein Krankheitsbild, bei dem sich die klinischen Zeichen einer fokalen oder globalen Störung zerebraler Funktionen rasch bemerkbar machen, mindestens aber 24 Stunden anhalten oder zum Tode führen und offensichtlich nicht auf andere als vaskuläre Ursachen zurückgeführt werden können.

### **1.1.2. Epidemiologie des Schlaganfalls:**

Der Schlaganfall ist die häufigste neurologische Erkrankung und steht mit 11,4 % an Platz drei der Todesursachen in Deutschland nach Herzerkrankungen und Krebs (Anonymus, 1998). Von großer Bedeutung ist die hohe Invalidisierungsrate von ca. 30 %; nur ein Drittel der Betroffenen erreicht wieder volle berufliche und soziale Rehabilitation (Heiß W-D, 1996). Damit stellt der Schlaganfall die häufigste Ursache für lebenslange Behinderung im Erwachsenenalter dar und ist der häufigste Grund für Institutionalisierung (Kurtzke JF, 1982).

Die Schlaganfallhäufigkeit steigt mit zunehmendem Alter an. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes betrug der Anteil der über 65-jährigen in Deutschland im Jahr 2000 ca. 16 % der Gesamtbevölkerung, im Jahr 2030 soll aufgrund demographischer Hochrechnungen der Anteil der über 65-jährigen ca. 33 % betragen (Opitz PJ, 1995). Durch die fortgesetzte Zunahme der Lebenserwartung in Deutschland muss deshalb mit einem deutlichen Anstieg der Schlaganfallhäufigkeit in den nächsten Jahrzehnten gerechnet werden (Malmgren R, 1989). Diese Entwicklung wird nicht nur die Überlastung der bestehenden Versorgungseinrichtungen zur Folge haben, sondern auch zu einer Verknappung von Gesundheitsressourcen führen. Um diesem Szenario entgegen zu wirken, ist es von dringlicher Wichtigkeit, eine deutliche Senkung von beeinflussbaren Risikofaktoren wie Nikotinabusus, arterieller Hypertonus, kardiale Erkrankung, Diabetes mellitus, Lipidämie zu erreichen, sowie Erforschung der Schadensmechanismen beim Schlaganfall und (Weiter-) Entwicklung therapeutischer Ansätze, die eine effektivere Behandlung ermöglichen.

### **1.1.3. Inzidenz des Schlaganfalls in Europa:**

In den Jahren 1995-1997 konnte erstmalig ein Vergleich der Inzidenzraten zwischen den bevölkerungsbasierten Registern aus Erlangen (Deutschland), Dijon (Frankreich) und South London (Großbritannien) vorgenommen werden (Wolfe CDA, 2000; Bamford J, 1998). Im

europäischen Vergleich erleiden die Franzosen die wenigsten Schlaganfälle mit einer Inzidenz von 101 pro 100.000, es folgen die Briten mit 124 pro 100.000 und die Deutschen führen mit 136 pro 100.000 Einwohner. Die unterschiedliche Inzidenzrate zwischen den Zentren lassen sich monokausal nicht erklären. Als eines der zahlreichen Erklärungsmuster kann die unterschiedliche Verteilung der Risikofaktoren in der Gesamtbevölkerung aufgeführt werden.

#### **1.1.4. Inzidenz des Schlaganfalls in Deutschland:**

Vergleichbare Angaben zur Inzidenz des Schlaganfalls in Deutschland liegen derzeit aus zwei Bevölkerungsregistern, sowie zwei Kohortenstudien vor:

Das erste wurde bereits 1972/73 in den neuen Bundesländern (DDR-MONICA-Registerdaten) ein weiteres bevölkerungsbasiertes Schlaganfallregister wurde 1994 in Erlangen etabliert. Im Erlanger Schlaganfall-Register, das Inzidenz und Überlebensrate nach Schlaganfall in einer definierten Studienpopulation bestimmt, (Kolominsky - Rabas PL, 1998) wurden seit 1994 alle Hirn-Kreislauf-Erkrankungen (erstmalige Schlaganfälle einschließlich Rezidiv-Schlaganfälle, Subarachnoidalblutungen, und Transitorische ischämische Attacken), die im Stadtgebiet von Erlangen auftreten, prospektiv und standardisiert erhoben. Alle 101450 Einwohner der Stadt Erlangen wurden als Studiengruppe erfasst und bis zu 12 Monate nach dem ersten Schlaganfall nachverfolgt. Im Zeitraum von 1994-1996 stieg die Inzidenz dabei von 4 pro 100.000 in der Altersgruppe 25-34 Jahre auf 2117 / 100.000, bei den über 84-jährigen ereigneten sich 51% aller Schlaganfälle in der Altersgruppe > 75 Jahre. In Deutschland finden sich im europäischen Vergleich verhältnismäßig viele Hirnblutungen. Dieses könnte auf eine erhöhte Rate an Hypertonikern in Deutschland zurückzuführen sein, wenn man von der Tatsache ausgeht, dass die Hypertonie als Hauptverursacher für intrazerebrale Blutungen gilt.

#### **1.1.5. Klinik des Schlaganfalls:**

Klinisch zeigt sich ein akutes neurologisches Defizit in Form einer plötzlich einsetzende Symptomatik mit, je nach betroffener Hemisphäre (dominant oder nicht-dominant) und Hirnregion (Frontal-, Parietal-, Temporallappen, Cortex, Subcortex), einer variablen Kombination aus motorischen (Hemiparese bzw. Hemiplegie), sensiblen (Hemihypästhesie bzw. Hemianästhesie), okulomotorischen (konjungierte Deviation) und visuellen Symptomen (Gesichtsfelddefekte u.a.) sowie neuropsychologischen Syndromen wie Aphasie, Apraxie, Neglect und Anosognosie.

### **1.1.6. Letalität des Schlaganfalls:**

Nach international vorgegebenen Standards der sogenannten Helsingborg Declaration (Pan European Consensus Meeting on Stroke Management; 1996) wird die Letalität nach Schlaganfall zu definierten Zeitpunkten (28 Tage, 3 Monate und 12 Monate) erfasst und berichtet. Die Sterblichkeit nach einem Schlaganfall betrug 19,4 % in den ersten 28 Tagen, 28,5 % innerhalb der ersten drei und 37,3 % innerhalb der ersten 12 Monate nach dem Ereignis. Die Letalität beträgt nach 28 Tagen beim Hirninfarkt 11,5 % sowie bei intrazerebraler Blutung 41,6% und zum Zeitpunkt von drei Monaten nach dem Ereignis 20,1 % beim Hirninfarkt, sowie 50,0 % bei intrazerebralen Blutung und schließlich nach 12 Monaten beim Hirninfarkt 29,9 %, bei der intrazerebralen Blutung 58,3 %.

### **1.1.7. Inzidenz der Schlaganfalltypen:**

Aus dem Erlanger Schlaganfall-Register sind auch erstmalig für Deutschland die Inzidenzen zu einzelnen Schlaganfalltypen verfügbar. Die Inzidenz des Hirninfarktes betrug 137 pro 100.000, der intrazerebralen Blutung 24 pro 100.000 und der Subarachnoidalblutung 6 pro 100.000. Damit stellt der Hirninfarkt mit ca. 80 % die bedeutendste Gruppe unter den Schlaganfällen dar, in 20 % liegt eine zerebrale Blutung dem Schlaganfall zu Grunde.

## **1.2. Tiermodell der fokale zerebralen Ischämie:**

Eine fokale Ischämie ist Folge einer transienten oder permanenten Reduktion des zerebralen Blutflusses im Bereich eines großen Hirngefäßes, in zwei Drittel der Fälle der A. cerebri media. Die Flussreduktion wird in Regel durch Gefäßverschluss, einen Embolus oder einer lokalen Thrombose verursacht. Typisch ist im Gegensatz zur globalen Ischämie das Entstehen einer Infarkttrandzone, die sogenannte Penumbra, die metabolisch noch aktiv ist, funktionell jedoch bereits ausgefallen ist. Während im Infarktkern der absolute zerebrale Blutfluss  $< 0,1$  ml/g/min liegt, ist der Blutfluss in der Penumbra bei etwa  $0,2 - 0,4$  ml/g/min deutlich reduziert (Nehls DG et al, 1990). Nur nach milder fokaler Ischämie entsteht in besonders vulnerablen Hirnregionen (z.B. Basalganglien) ein selektiver neuronaler Schaden, der ähnlich dem Schaden nach globaler Ischämie einer selektiven "Parenchymnekrose" entspricht (Endres M and Dirnagl U, 2002). Die fokale Ischämie wird experimentell häufig, wie auch in unserem Modell, durch das sogenannte Filamentenmodell in der Maus induziert. Dabei wird die A. cerebri media operativ verschlossen, indem die linke A. carotis interna freigelegt, ein mit Silikon beschichteter, monofiler Nylonfaden eingeführt und bis zum Abgang der A. cerebri anterior am Circulus Willisii vorsichtig hochgeschoben wird. Für einen definierten Zeitraum

wird der Nylonfaden in der A. carotis interna belassen, der auf diese Art eine Okklusion der A. cerebri media und der A. coroidea anterior verursacht. Nach 30-60 Minuten wird der Faden wieder entfernt, um eine Reperfusion der ischämischen Versorgungsgebiete der A. cerebri media und A. choroidea anterior zu ermöglichen (Endres M et al. 1998). Daneben konnte die fokale Ischämie auch in Ratten (Longa ZE et al. 1989) durchgeführt werden. Weniger gebräuchlich sind die operativ durchgeführten fokalen Ischämien in höher entwickelten Lebewesen wie in Hunden (Molinari CF. 1970) oder in Primaten (Garcia JH et al. 1974).

### **1.3. Aufbau des Striatum**

#### **1.3.1. Nomenklatur des Striatum:**

Innerhalb der weißen Substanz des Großhirns befinden sich in unmittelbarer Nähe zum Diencephalon die Basalganglien, wobei dieser Begriff sehr unterschiedlich definiert wird. All diesen Hirnkernen im Großhirnlager ist gemeinsam, dass sie in ihrem Zusammenspiel eine wichtige Funktion bei der zentralnervalen Regulation und Abstimmung der Motorik innehaben. Innerhalb der klassischen Anatomie war es früher üblich, die Basalganglien in vier Einzelhirnkerne zu gliedern:

- Corpus amygdaloideum
- Nucleus caudatus
- Nucleus lentiformis (Putamen und Globus pallidum)
- Claustrum

Die meisten Autoren rechnen jedoch die Substantia nigra und den Nucleus subthalamicus dazu, hingegen werden das Claustrum und der Corpus amygdaloideum nicht mehr in das System der Basalganglien einbezogen. Gegenwärtig werden üblicherweise folgende Hirnkerne zu den Basalganglien gezählt:

- Corpus Striatum
  - Putamen
  - Nucleus caudatus
  - Globus pallidus
- Nucleus subthalamicus
- Substantia nigra

Da sich das Thema meiner Doktorarbeit überwiegend auf das Striatum bezieht, wird dieses im Einzelnen näher behandelt: Unter dem Begriff Corpus striatum wird der größte Kernkomplex des Großhirns zusammengefasst. Es kann unterteilt werden in das Neostriatum mit dem Nucleus caudatus und dem Putamen, beim Nager auch als dorsales Striatum bezeichnet, und in das

phylogenetisch ältere ventrale Striatum, dem Paleostriatum, das die ventrale Verbindung von Nucleus caudatus und dem Putamen, sowie den Nucleus accumbens und an der Basis des Corpus striatum striatale Anteile vom Tuberculum olfactorium sowie den Globus pallidus, der ontogenetisch dem Diencephalon zugerechnet wird, beinhaltet (Zhou F-M, 2002). Von manchen Autoren wird unter dem Begriff Corpus striatum auch das medial des Caudatoputamen-Komplexes liegende Pallidum mit eingeschlossen, was aber weder funktionell noch entwicklungsgeschichtlich sinnvoll ist. Das dorsale Striatum (Nucleus caudatus und Putamen) gilt dabei als Eingangsstruktur der Basalganglien, als Ausgangsstruktur hingegen der Nucleus entopeduncularis des Nagers, entsprechend dem internen Anteil des Globus pallidus (GPi) beim Primaten, sowie die Substantia nigra, pars reticulata (SNr). Dabei entspricht der externe Anteil des Globus pallidus (GPe) des Primaten dem gesamten Globus pallidus des Nagers (Smith et al 1998).

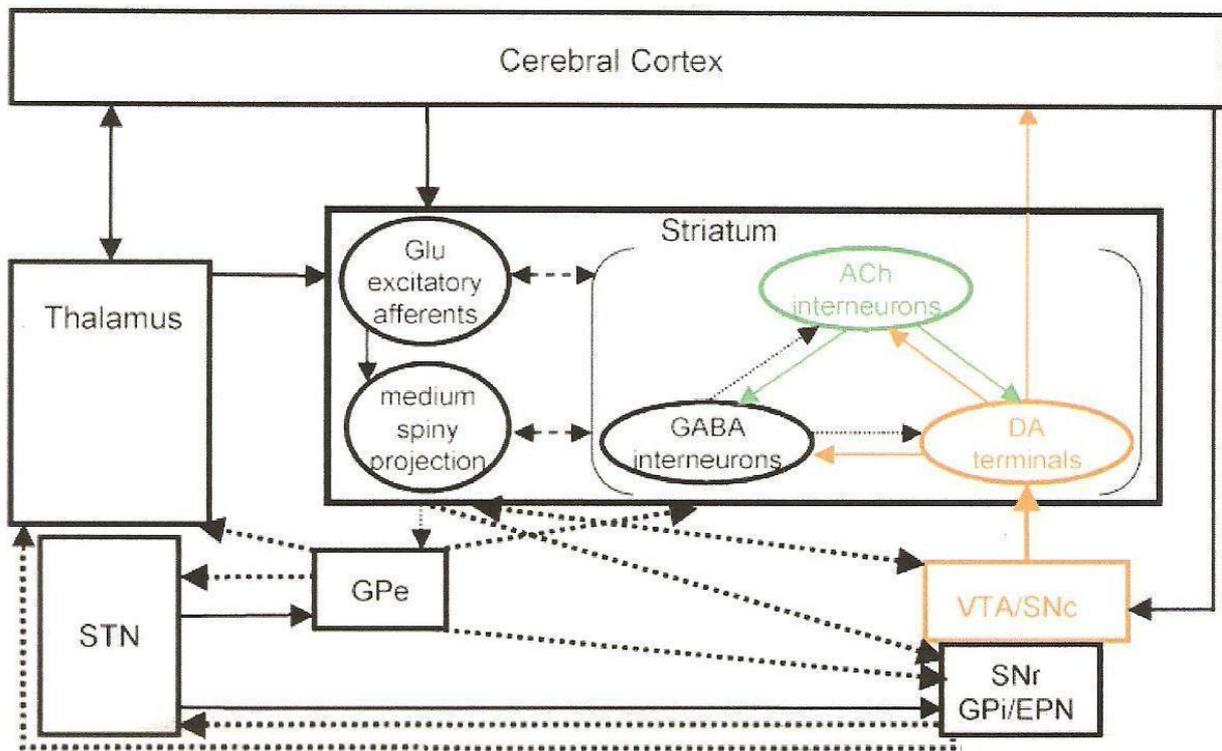
### **1.3.2. Kompartimente des Striatum:**

Wie ein Mosaik ist das Striatum aus zwei neuroanatomischen und neurochemisch definierten Kompartimenten aus den sogenannten Striosomen (Patches) und der Matrix zusammengesetzt. Aufgrund ihrer hohen Dichte an  $\mu$ -Opiat- und Enkephalin- Rezeptoren können Striosomen immunhistochemisch identifiziert werden, die Matrix hingegen an der hohen Dichte von Kalzium-bindendem Protein. Das Volumen des Striatum enthält dabei eine konstante Ratio von 15 % Patch- und 85 % Matrix-Gebiet in der Ratte, Primaten und im Menschen (Johnston JG et al 1990). Jedes kortikale Areal projiziert zu einem bestimmten Kompartiment: Kortikale Neurone der Schicht VI und aus tieferen Anteilen der Schicht V projizieren zu den Patches, hingegen kortikale Neurone der Schicht II und III, sowie aus oberflächigen Anteilen der Schicht V zu der Matrix projizieren (Gerfen CR 1989).

### **1.3.3. Funktion des dorsalen Striatum:**

Das dorsale oder auch Neostriatum, das das Caudatum und das Putamen beinhaltet, ist hauptsächlich sensomotorisch wirksam. Es empfängt über Projektionsneurone überwiegend glutamaterge sowie aspartaterge, exzitatorische Inputs von sensomotorisch kortikalen Gebieten und des intralaminaren Thalamuskerns, des weiteren Projektionen via serotonerger Fasern des dorsalen Raphekerns und dem Locus coeruleus, sowie überwiegend inhibitorisch wirksame dopaminerge Innervation von der Substantia nigra, pars compacta und im geringeren Maße auch Inputs von dem ventralen tegmentalen Areal (Haber SN, 2000; Pollack et al 2001). Innerhalb des Striatum werden diese Afferenzen über die Interneurone moduliert und zu inhibitorisch

wirksamen GABAergen Projektionsneuronen entweder über den sogenannten „direkten (exzitatorischen) Weg“ monosynaptisch zu den Ausgangsstrukturen der Basalganglien, der Substantia nigra, pars reticulata (SNr) und internales Segment des Globus pallidus (Gpi) zum Thalamus, oder über den „indirekten (inhibitorischen) Weg“ polysynaptisch via externes Segment des Globus pallidus (Gpe) und Nucleus subthalamicus, zurück zum Gpi und schließlich Thalamus weitergeleitet (Zhou F-M, 2002, Kawaguchi et al, 1995). Projektionsneurone mit dem Projektionsziel Gpi besitzen eine fördernde Funktion auf motorische Impulse, da die inhibitorisch wirksamen Projektionen des Gpi zum Nucleus anterolateralis, dem spezifischen Thalamuskern für motorische Kortexareale, durch den Transmitter GABA inhibiert werden (Hemmung der Hemmung), dagegen üben sie eine hemmende Funktion für Bewegungsimpulse bei Projektion zum Gpe aus, da von diesem inhibitorische Projektionen zum Nucleus subthalamicus ausgehen, der wiederum exzitatorisch in das internale Pallidumsegment projiziert, welches nun den Thalamus und indirekt den Kortex hemmt. Dopaminerge Neurone der Substantia nigra, pars compacta (SNc) wirken dabei modulatorisch: Aktivierte D<sub>1</sub>-Rezeptoren unterstützen die Feedbackschleife des direkten Weges, stimulierte D<sub>2</sub>-Rezeptoren wirken hingegen inhibitorisch auf den indirekten Weg. Ein Mangel an Dopamin wie bei Morbus Parkinson vermindert die direkte Hemmung des Gpi und steigert die indirekte Stimulation des Gpi. Als Folge tritt eine Hemmung der thalamo-kortikalen Projektion ein, welches sich klinisch als Akinesie zeigt. (Nakano et al 2000). Diese Modulationen der Basalganglien (Grafik 1) sind essentiell für die Planung und Ausführung der Bewegung (Zhou F-M et al, 2002).



**Grafik 1** (Zhou F-M, 2002)

Diagramm der exzitatorischen (durchgezogene Linien) und inhibitorischen Projektionen (gepunktete Linien) vom und zum Striatum. Die gestrichelten Linien repräsentieren neuronale Verbindungen zwischen exzitatorischen, kortikalen und thalamischen Afferenzen (Glu excitatory afferents) oder Kollateralen der Projektionsneurone (medium spiny projection) und striatalen GABAergen (GABA interneurons) und cholinergen Interneuronen (ACh interneurons) bzw. dopaminergen Neuronen (DA terminals): GPe, externes Segment des Globus pallidus; Gpi (EPN), internes Segment des Globus pallidus (Nucleus endopeduncularis); SNr, Substantia nigra, pars reticulata; SNc, Substantia nigra, pars compacta; STN, Nucleus subthalamus; VTA, Area tegmentalis ventralis.

#### 1.3.4. Projektionsneurone:

Die typischen Neurone des Striatum sind die so genannten Projektionsneurone, die aufgrund morphologischer Merkmale, wie ihrer in Relation zu den Interneuronen durchschnittlichen Größe, sowie ihrer dendritischen Dornen (spines), auch als „medium-spiny neurons“ bezeichnet werden und 90-95 % der totalen Population der Neurone im Striatum ausmachen. Diese Neurone wirken inhibitorisch und benutzen Gamma-Aminobuttersäure, kurz

GABA, als ihren primären Neurotransmitter, sowie in geringerer Menge Substanz P oder Enkephalin, und Neurotensin bzw. Dynorphin. Wenigstens zwei Subtypen wurden aufgrund ihrer Differenzen der axonalen Projektionen identifiziert: Ein Zelltyp projiziert hauptsächlich in die Substantia nigra und in das internale Pallidumsegment und wendet Substanz P und Dynorphin als Co-Transmitter neben GABA an, der andere Zelltyp projiziert hingegen hauptsächlich in das externale Pallidumsegment und benutzt Enkephalin als Co-Transmitter neben GABA als primären Neurotransmitter. Beide Subtypen enthalten zusätzlich Neurotensin (Graybiel AM.1990; Gerfen CR. 1992). Diese Neurone, von denen im Durchschnitt 12-20  $\mu\text{m}$  großen Somata 4 bis 5 Dendriten ausgehen, haben regelmäßige lokale Axonkollaterale, die sich meist im Bereich des eigenen Dendritenbaums verzweigen (Wilson CJ, 1990). Mikroelektrische Studien vom Striatum identifizierten wiederum Zelltypen anhand ihres neuronalen Spontanentladungsmusters: Projektionsneurone sind oft sekundenlang ruhig, feuern dann aber in kurzen Episoden. Diese Zellen werden daher auch phasisch aktive Neurone (PAN's) genannt (Wilson CJ, 1990). Die dornenhaltigen Projektionsneurone bedürfen nur schwache kortikale, thalamische bzw. dopaminerge oder serotoninerge Inputs, um zu depolarisieren. Mit einem Ruhepotential von -80 bis -90 mV gehören diese Neurone zu den am stärksten hyperpolarisierten Neuronen des Gehirns (Calabresi et al 2000).

### **1.3.5. Interneurone:**

Die Minderheit der striatalen Neurone sind die Interneurone, die je nach Autor in drei (Zhou F-M et al, 2002) oder in vier Gruppen (Kawaguchi Y et al, 1995) unterteilt werden. Nach Fu-Ming Zhou bilden folgende drei Einteilungen die Interneurone: Die GABAergen Interneurone, die zusätzlich entweder Parvalbumin, bzw. Somatostatin, Neuropeptid Y und Nitritoxid-Synthase exprimieren, und schließlich die dritte Gruppe, die großen cholinergen Interneuronen. In vier Gruppen werden die Interneurone von Yasuo Kawaguchi (Kawaguchi Y 1995) durch zytochemische, physiologische und morphologische Methoden eingeteilt: Diese sind als erste Gruppe die großen cholinergen Neurone, als zweite Gruppe definiert Y. Kawaguchi die GABAergen Interneurone, die zusätzlich Parvalbumin bilden, die dritte Klasse exprimiert neben GABA das Peptid Calretinin, sowie schließlich diejenigen, die positiv für Somatostatin, Neuropeptid Y und Nitritoxid-Synthase sind. Erst im Jahre 2000 konnte Kawaguchi Y. eindeutig den experimentellen Nachweis liefern, dass auch somatostatinerge Interneurone GABA exprimieren (Kubota and Kawaguchi, 2000).

### **1.3.6. Cholinerge Interneurone:**

Schon im Jahre 1896 wurden in einer klassischen Studie über Golgi-Färbungen cholinerge Interneurone aufgrund ihrer somatodendritischen Morphologie identifiziert (Kölliker A. 1896). Allerdings war es schwierig mit der Golgi-Methode, die weniger geeignet ist, Axone zu visualisieren, herauszufinden, ob das Neuron ein Projektionsneuron oder ein Interneuron ist. Über 80 Jahre wurde über den Status dieser gigantischen Neurone im Striatum diskutiert. Erst im Jahre 1976 konnte DiFiglia mit der Golgi-Methode (DiFiglia M et al, 1976) und Grofova mit retrograde Markierung, Golgi-Methode und intrazellulärer Markierung gegen cholinerge Acetyltransferase (Grofova I, 1976) nachweisen, dass die gigantischen Neurone cholinerge Interneurone sind. Der Schlüssel zu ihrer Identifizierung war, dass sie die Ursache von Acetylcholin (ACh) und Cholin-Acetyltransferase (ChAT, ein Enzym, das ACh-Synthese induziert) im Striatum sind, Projektionsneurone hingegen ohne jegliche cholinerge Komponente sind. Acetylcholinesterase wurde ehemals benutzt als immunhistochemischer Marker für diese Zellen, aber nach heutigem Wissen wird Acetylcholinesterase von cholinergen und von somatostatinhaltigen Interneuronen exprimiert und ist somit kein zuverlässiger Marker für cholinerge Neurone. Stattdessen ist nun Cholin-Acetyltransferase ein verlässlicher Marker, der nur cholinerge Zellen anfärbt und auch in den Färbungen dieser Arbeit angewandt wurde, um diese Neurone zu identifizieren. Von den cholinergen Neuronen existieren zwei große Subgruppen innerhalb des Telencephalons: Eine davon ist in den basalen Vorderhirnkernen lokalisiert, und projiziert über weite Strecken zum Cortex und Hippokampus. Die zweite Gruppe befindet sich im Striatum und diese cholinergen Neuronen sind Interneurone, die für eine breite, jedoch lokal auf das Striatum begrenzte überwiegend erregende Innervation sorgen (Zhou et al, 2002). Die Verzweigungen cholinergischer Interneurone und dopaminerger terminaler Fasern formen im Striatum ein ineinander verschlungenes Netzwerk, das das dichteste im Gehirn darstellt. Acetyl-Cholin (ACh) und Dopamin (DA) können aus den Synapsen dieser Zellen in den Extrazellulärraum überquellen, und so an der synaptischen Übertragung im Striatum mitwirken. Striatale Schnittpräparation demonstrierte, dass cholinerge Aktivität lokal agiert und potentiell DA-Freilassung ermöglichen kann (Zhou et al, 2001; Saka E et al, 2002), genauso wie Dopamin ACh-Freilassung beeinflussen kann (Pisani et al, 2000). 10-20 % aller Interneurone sind cholinerge Neurone, bei einer totalen Anzahl neostriataler Neurone von etwa 2,8 Millionen (Ooschot DE, 1996) beträgt die Anzahl von cholinergen Interneuronen etwa 40.000 auf einer striatalen Gehirnseite einer Ratte. Diese riesigen cholinergen Interneurone mit einem Durchmesser von 20-50 µm, haben große und extrem dicht verzweigte Axone, die an dopaminerge Verzweigungen erinnern. Zudem ist auch die Dichte von cholinergischen

Varikositäten extrem hoch: Quantitative elektronische Auszählungen mit dem Elektronen-Mikroskop hatten gezeigt, dass es ungefähr  $2 \times 10^8$  ACh -Varikositäten pro  $\text{mm}^2$  im Striatum gibt, und jedes einzelne cholinerge Interneuron hat 500.000 axonale Varikositäten (Bolam JP et al, 1984). Zusätzlich haben cholinerge Neurone weitverzweigte, dendritische Bäume, weitreichender als die der Projektionsneurone (Wilson CJ, 1990). Diese Interneurone sind fähig, synaptische Inputs über relativ weite Regionen zu integrieren. Die cholinergen Interneurone sind afferente Neurone, die überwiegend thalamische, aber auch kortikale und dopaminerge Inputs zu den Projektionsneuronen übertragen. Die meisten ihrer Synapsen enden daher auch auf den „medium-spiny neurons“, einige jedoch auch auf parvalbuminergen sowie somatostatinerger Interneurone und dopaminergen Neuronen. Im Gegensatz zu den Projektionsneuronen exprimieren cholinerge – wie auch somatostatinerge und parvalbuminerge – Interneurone den NR-1-Rezeptor, eine Untereinheit des NMDA-Rezeptors (Chen Q. et al, 1996). In-vivo-Studien haben gezeigt, dass diese Zellen in einem tonisch unregelmäßigen Muster mit einer durchschnittlichen Rate von 2-10 Herz in anästhesierten Ratten feuern und daher auch „tonisch aktive Neurone“ (TAN's) genannt werden (Wilson CJ et al, 1990. J Comp Neurol). Durch die hohe Dichte des Enzyms Acetylcholinesterase wird jedoch schnell das Acetylcholin-Signal beendet. Die cholinergen Interneurone nehmen nur eine relativ kleine Anzahl von exzitatorische Inputs auf, im Gegensatz zu den Projektionsneuronen, die die Effekte von tausenden Inputs zu integrieren vermögen (Kawaguchi et al, 1995).

### **1.3.7. Parvalbuminerge Inerneurone:**

1985 demonstrierten immunhistochemisch-anatomische Studien die Identität der „spiny“ Neurone, indem Antikörper gegen die Glutamatsäure-Decarboxylase (GAD) verwendet wurden. Im Gegensatz zu dem Erwarteten, färbte sich die Mehrheit der striatalen Neurone nicht stark positiv mit dem GAD -Antikörper. Anstelle dessen war nur eine kleine Anzahl von Neuronen, die die morphologischen Eigenschaften von Interneurone hatten, stark immunreaktiv für GAD (Bolam JP et al. 1985; Bolam JP et al. 1983). Weiter Studien zeigten, dass die weniger intensiv gegen GAD angefärbten Neurone entweder Substanz P oder Enkephalin koexprimieren und daher Projektionsneurone sind, hingegen die intensiv gegen GAD immunreaktiven Neurone keine aufspürbaren Mengen dieser Peptide enthalten und somit nicht zu den „ spiny-medium “ Neuronen zu zählen sind (Kita H et al, 1988). Gerfen wies 1985 in einem Experiment nach, dass eine Gruppe von Interneurone im Striatum positiv für Parvalbumin gefärbt wurde. Von diesem Zeitpunkt an brachten verschiedene immunhistochemische Studien zum Vorschein, dass diese Neurone ebenfalls das inhibitorisch wirkende GABA exprimieren (Kita H et al, 1990).

Parvalbuminerge Interneurone bilden im Striatum der Ratte zwischen 3 - 5 % der striatalen Zellen und sind etwas größer als „spiny“ Projektionsneurone. Sie exprimieren neben Parvalbumin auch GABA. Die Dendriten sind mit Varikositäten versehen, tragen keine Dornen, verzweigen sich 200 – 300 µm vom Zellkörper entfernt und bilden dichte Verzweigungen mit lokalen axonalen Kollateralen. Sie sind sowohl in der Matrix wie auch in den Striosomen lokalisiert und verzweigen sich über die Grenze beider Kompartimente hinaus (Kita H, 1990). Die Synapsen dieser Zellen sind symmetrisch auf dem Soma und dem Dendritenschaft angeordnet. Die parvalbuminergen Axone formen korbähnliche synaptische Verzweigungen auf den Projektionsneuronen, sowie auf den somatostatinergen Interneuronen (Kita H, 1993; Kawaguchi et al 1995). Diese Interneurone empfangen erregenden Einfluss vom zerebralen Cortex, sowie von cholinergen und dopaminergen Neuronen (Kita H, 1993; Pollack et al 2001). Unter parvalbuminergen Interneuronen sind auch „gap-junction“ bekannt, was daraufhin deutet, dass diese relativ selten Zellen ein kontinuierliches Netzwerk formen, welches exzitatorische Inputs über eine größere Distanz integriert, als es einzelne Neurone vermögen. Sie bilden auch untereinander synaptische Kontakte aus, welche inhibitorisch sind (Kita H, 1990). Die Parvalbumin-positiven Zellen stellen die hauptsächlich inhibitorisch wirksamen Interneurone im Striatum dar und sind maßgeblich an dem negativen Rückkopplungsmechanismus kortikostriataler Pathways durch Inhibition GABAerger Projektionsneurone beteiligt. Sie wirken somit modulatorisch an der Gestaltung der direkten und indirekten Feedbackschleife (Kawaguchi et al 1995, Nakano et al 2000). Zudem wurde experimentell demonstriert, dass diese Zellen schnellfeuernd sind, mit kurz andauernden Aktionspotentialen (Kawaguchi Y, 1992. J. Neurophysiol).

### **1.3.8. Somatostatinhaltige Interneurone:**

Diese explosionsartig feuern, etwas kleineren Somatostatin-, Neuropeptid Y- und die reduzierte Form von Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat-diaphorase (NADPH-d), sowie Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) - enthaltenden Interneurone haben einen Durchmesser von 12-35 µm und tragen wenige dornenartige Fortsätze. Sie sind stark immunreaktiv für Calbindin D<sub>28K</sub>, ein Kalzium-bindendes Protein, welches in 20 % der Zellen nachzuweisen ist. Im Vergleich mit cholinergen und parvalbuminerge Interneuronen haben diese Neurone weniger dendritische Verzweigungen. Wie die Projektionsneurone haben diese Interneurone lange Axone. Dieses könnte die Ursache sein, warum diese Zellen, so wie auch Projektionsneurone, eine schwache Immunreaktivität für GABA in ihren Somata präsentieren, da durch den Transport innerhalb ihrer langen Axone der Neurotransmitter GABA entsprechend verdünnt wird. Sie

bilden, wie auch cholinerge und parvalbuminerge Interneurone, den NMDA-Untereinheitsrezeptor NK-1 aus. Innerhalb der Region ihres dendritischen Feldes sind die axonalen Verzweigungen jedoch weniger dicht und über längere Distanzen innerhalb des Striatums relativ unverzweigt (Kawaguchi Y. 1993. Neurosci). Somatostatin-, Neuropeptid Y-NADPH-Diaphorase - und NOS- positive Zellen empfangen direkt kortikale, glutamaterge Inputs (Vuillet J et al.1990), sowie cholinerge und dopaminerge Innervation. Hauptsächlich innervieren diese Neurone inhibitorisch das Matrix-Kompartiment. Ihre Somata sind jedoch in beiden Kompartimenten zu finden und ihre Dendriten kreuzen oft die Grenzen der Kompartimente (Kubota Y and Kawaguchi Y. 1993. J Comp Neurol). In dieser Eigenschaft sind sie den cholinergen Interneuronen ähnlich. Zusätzlich tragen Somatostatin-positive Neurone zur Regulation des lokalen Blutflusses bei, was auf Stickstoffmonoxid (NO) zurückzuführen ist, das in den Endothelzellen der Gefäße durch Abspaltung von der Aminosäure L-Arginin mittels eines Enzyms (NO-Synthase) gebildet wird und in den vaskulären glatten Muskelzellen eine Vasodilatation als Antwort auf kortikale oder pallidale Inputs verursacht. Die zweite Funktion von NO ist die eines Transmitters, um die Freilassung von striatalen Neurotransmitter zu beeinflussen. Dieses geschieht entweder direkt durch Interaktion mit den Rezeptorkanälen, z.B. modifiziert Nitritoxid NMDA-Rezeptoren, oder indirekt über Effekte auf umgebene Neuronen (Kawaguchi Y. 1995). Zuerst wurden diese Neurone immunhistochemisch durch Diaphorase-Färbung mittels NADPH und Nitroblau-Tetrazolium (NBT) als Elektronenakzeptor visualisiert. Die Charakteristik der Diaphorase-Formazin-Färbung liegt in der Fähigkeit des NOS-Enzyms durch den Karboxy-Terminus Elektronen von NADPH zu NBT zu transferieren. Nach langer Unstimmigkeit gilt es nun als bewiesen, dass auch die somatostatinhaltigen Interneurone GABAerg sind (Kubota Y und Kawaguchi Y, 2000).

### **1.3.9. Calretininhaltige Interneurone:**

Calretinin, auch Protein 10 genannt (Yamada K et al. 1995), ist in einer Population von Neuronen mittlerer Größe von 7 – 20 µm Durchmesser in der rostral-medialen Region des Nucleus caudatus und des Putamens gefunden worden (Jacobowitz D M et al. 1991). Diese Zellen sind positiv für GABA, GAD<sub>67</sub>, sowie für Calretinin. Calretinin, ein Kalzium-bindendes Protein mit starker Homologie zu Calretinin D, wird von dieser Gruppe kleiner nicht-dornenhaltiger Neurone exprimiert. Beide Proteine enthalten vier Kalzium-bindende Domänen und haben eine Funktion als Kalzium-Puffer (Baimbridge KG et al. 1992). Gulyas (Gulyas AI et al, 1996) identifizierte zwei Arten von calretininergen Interneuronen im Hippokampus der Ratte: Dornenhaltige und dornenfreie Calretinin-immunreaktive (Cal-ir) Neurone. Dornenhaltige

Cal-ir-Neurone sind begrenzt auf den Hilus des Gyrus dentatus und dem Stratum lucidum, der Zellkörper und der dendritische Baum ist überzogen mit langen, oft sich verzweigenden Dornen (spines), deren Axone immer myelinisiert sind und deshalb nicht mit Immunfärbungen visualisiert werden können. Die dornenfreien calretininergen Zellen, die 13 % der hippocampalen GABAergen Zellen umfassen und auch im Striatum zu finden sind, zeigen eine gleichmäßige Verteilung im Hippokampus und bilden lange dendro-dendritische und axo-dendritische Verbindungscluster. Cal-ir-Neurone zeigen einen hohen Grad von Ziel-Selektivität; sie innervieren meistens, wenn nicht ausschließlich, andere GABAerge Interneurone mittels multipler Synapsen. Zwei bis fünf Dendriten gehen von den multipolaren, bipolaren oder fusiformen Perikarya aus. Die gleichmäßigen, gelegentlich perlschnurartigen Dendriten verlaufen in erster Linie radial und durchqueren verschiedene hippocampalen Schichten. Die Axonkollaterale von Cal-ir-Neurone formen oft enge Anlagerungen um Cal-negative Somata.

#### **1.4. Immunhistochemische Methoden zur Darstellung von Antigenen:**

Immunhistochemische Färbemethoden werden heute als Standardverfahren in der medizinischen Diagnostik und in der Forschung angewandt. Dabei ist die Immunhistochemie eine äußerst effiziente Kombination methodischer Verfahren, markierte Antikörper, die gegen spezielle Gewebskomponente (Antigene) oder bestimmte Substanzen gerichtet sind, auf Gewebsschnitte aufzubringen und die Orte ihrer Bindungsstellen nachzuweisen. Die Exploration ist Licht-, Fluoreszenz-, oder elektronenmikroskopisch möglich. Voraussetzung ist ein chemisches Fixationsverfahren, bei dem das nachzuweisende Antigen nicht zerstört wird und in seiner natürlichen Lage verbleibt (Sternberger LA. 1979). In der Immunhistochemie sind zwei unterschiedliche Detektionssysteme gebräuchlich: Immunofluoreszenz und enzymatische Immunhistochemie. Beide Methoden liefern präzise und spezifische Informationen und wenden die gleichen immunologischen Prinzipien von Antigen-Antikörper-Interaktion an.

##### **1.4.1. Enzymatische Immunhistochemie:**

Die immunenzymatische Methode benutzt die Eigenschaft von Enzymen, farblose chromogene Substrate in gefärbte Endprodukte umzuwandeln. Von den verschiedenen Enzymen wird die Meerrettichperoxidase, die Alkalische Phosphatase, die Glukose - Oxidase aus dem *Aspergillus niger* und die  $\beta$ -Galactosidase am häufigsten benutzt (Avrameas S. 1983). Besonders die Peroxidase aus Meerrettich wird häufig eingesetzt, weil diese mit einem Molekulargewicht von nur M 40 000 keine Überlappungen von benachbarten Bindungsstellen verursacht, zudem gut das Gewebe penetriert und dadurch eine gute Darstellung von intrazellulären Antigenen

gestattet, schließlich eine haltbare und stabile Verbindung bei niedrigen Kosten ermöglicht. Die Peroxidase verursacht die Freisetzung molekularen Sauerstoffs aus Peroxiden, die je nach Gewebeart in unterschiedlicher Konzentration vorliegen. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid im Überschuss wird die endogene Peroxidase-Aktivität eliminiert, welches zu einer Verringerung der unspezifischen Färbung des Hintergrundes führt (Tayler C. 1978). Das Enzym Peroxidase wird über ein spezifisches Chromogen wie 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) oder 3-Amino-9-Ethylkarbazol (AEC) über ein präzipitiertes, stabiles Endprodukt sichtbar gemacht. Am gebräuchlichsten ist die Verwendung von DAB. Es polymerisiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Peroxidase zu einem stabilen, bräunlichen Endprodukt.

#### **1.4.2. Direkte und indirekte immunhistochemische Nachweismethoden:**

Sowohl die enzymatische Immunhistochemie und die Immunfluoreszenzmethode beruhen auf einer Komplexbildung zwischen den gesuchten Antigenen und den dazugehörigen spezifisch bindenden Antikörpern. Um die Antigen-Antikörper-Komplexe zu visualisieren, werden die primären Antikörper direkt oder indirekt mit einem Chromogen gekoppelt. Demnach unterscheidet man die direkte und indirekte immunhistochemische Nachweismethode. In der direkten Methode ist ein Enzym direkt mit dem Antikörper konjugiert, welches dann direkt mit dem gesuchten Antigen des Gewebes reagiert. Nachteil dieser Methode ist der hohe Bedarf und dadurch die hohen Kosten der benötigten Antikörper. In der indirekten Methode wird zusätzlich ein markierter zweiter Antikörper verwendet und kann in zwei oder in drei Schritten durchgeführt werden. Verglichen mit der zwei-Schritt-Methode verstärkt die drei-Schritt-Methode das Signal intensiver, daher ist diese Methode am gebräuchlichsten. Dabei bindet der erste Antikörper an das gesuchte Antigen, zusätzlich wird ein zweiter enzymmarkierter Antikörper zugefügt, der an den ersten Antikörper bindet. Das dritte Reagenz ist mit dem gleichen Enzym wie der zweite Antikörper gekoppelt. Statt eines Enzyms wie Peroxidase-Antiperoxidase, alkalische Phosphatase-Antialkalische Phosphatase oder Avidin-Biotin-Komplex kann als Markersubstanz auch radioaktive Isotope oder Goldpartikel verwendet werden. In den hier dargelegten Färbungen ist die immunoenzymatische Methode mit dem Avidin-Biotin-Komplex verwendet worden, der daher näher erläutert wird:

#### **1.4.3. Biotin-Avidin-Methode:**

Diese Methode beruht auf die Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotins physikalisch zu binden. Der sekundäre Antikörper ist biotinyliert und bindet spezifisch an den ersten Antikörper, der wiederum an das Zielantigen gebunden ist. Es folgt die

Zugabe des löslichen, an Peroxidase gekoppelten Immunkomplex Avidin-Biotin. Durch die hohe Affinitätskonstante von Avidin zu Biotin, sowie einer Dissoziationskonstante von  $10^{-19}$  M (Antikörper hingegen haben eine Dissoziationskonstante von  $10^{-5}$  M) und der Bindungsstärke von 4 für Biotin, ist diese Nachweismethode sehr sensitiv (Kumar V. 1994).

## **2. Herleitung der Aufgabenstellung**

In verschiedenen Studien wurde kontrovers über das Überleben von Interneuronen nach Ischämie im Striatum von Nagern diskutiert: So fand Araki am 2. und 7. Tag eine merkliche Reduktion vor (Araki T. et al, 1994, Neurosci Lett), hingegen Larsson eine Proliferation von cholinergen Interneuronen nach 4 wöchigem Überleben entdeckte (Larsson E. et al, 2001, Brain Research). In Vorarbeiten der eignen Arbeitsgruppe wurden dagegen keine signifikanten Veränderung im Striatum der Maus nach milder Ischämie und einem Überleben von 3 bzw. 14 Tagen in der Anzahl der Interneuronen gesehen (Katchanov J, 2003), nach einer Überlebenszeit von 10 Wochen wurde jedoch eine deutliche Reduzierung der parvalbumin- und calretinergen Interneurone, sowie im geringeren Ausmaß auch der ChAT-positiven Neurone nachgewiesen, die Anzahl der somatostatinergen Interneurone blieb nahezu unverändert (Winter B et al, 2005). Weitere Zeitpunkte unterschiedlicher Überlebenszeit nach milder Ischämie erschienen notwendig, um den Zeitverlauf der neuronalen Degeneration nach milder Ischämie genauer zu evaluieren. Desweiteren mangelt es an experimentellen Studien in Nagern, in denen alle vier Subtypen der Interneurone im intakten Striatum sowie im Striatum nach milder Ischämie quantifiziert worden sind.

### **2.1. Ziel der Arbeit**

Ziel der Arbeit war es, die zeitliche, topisch-anatomische sowie die zytologische Disposition des neuronalen Zellunterganges im Striatum einer Maus nach einer 30 minütigen fokalen Ischämie mit nachfolgender 6 wöchiger Überlebenszeit zu untersuchen. Zusätzlich sollte das Verteilungsmuster der Anzahl und Dichte der Interneurone im intakten Striatum evaluiert werden.

Folgende Aufgabenstellungen wurden zu Beginn der Experimente formuliert:

- 1) Zeitliche und anatomische Bestimmung des neuronalen Zellschadens in dem Modell der 30 -minütigen fokalen Ischämie im Striatum der Maus
- 2) Gebietsmessung des ischämischen und kontralateralen Striatum, sowie des ischämischen Kerngebietes
- 3) Charakterisierung der selektiven Vulnerabilität striataler Neurone
- 4) Anzahl und Dichte der verschiedenen Subklassen der Interneurone im intakten sowie im ischämischen Striatum

### **3. Methodik**

#### **3.1. Tiere:**

Für die Tierexperimente, die nach strengen Richtlinien der Tierschutzbestimmungen in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Matthias Endres durchgeführt worden sind, wurden sieben männliche SV 129 Mäuse (Taconic Farms, Germantown, USA; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin) mit einem durchschnittlichem Gewicht von 18-20 g verwendet. Die Tierhaltung erfolgte nach den gültigen Tierschutzbestimmungen unter Aufsicht der Tierärztin Prof. Dr. med. Ute Lindauer in Gruppen von 4-5 Mäusen pro Käfig bei einer Temperatur von 20-21° C, freiem Zugang zu Wasser und Futter, und einem 12-stündigen Hell-Dunkelzyklus in den angegliederten Räumen unseres Laboratoriums. Registriernummer des am 01.09.2000 genehmigten Tierversuches ist: G 0113/00.

##### **3.1.1. Überlebenszeit der Tiere:**

Es wurde eine 6 wöchige Überlebenszeit der Versuchstiere ausgewählt.

##### **3.1.2. Neurologisches Defizit:**

Unmittelbar nach dem postoperativen Erwachen der Tiere nach Ischämieinduzierung, wurde zur Einschätzung des neurologischen Defizits eine Verhaltensprüfung nach Bederson-Kriterien durchgeführt. Dabei gilt ein Wert von 0 als normal, 1 als mildes, 2 als mäßiges und 3 als schweres neurologisches Defizit (Bederson et al, 1986). Alle Tiere zeigten nach milder Ischämie einen Wert von 2.

#### **3.2. Das Filamentenmodell: Okklusion der mittleren cerebralen Arterie**

Die Mäuse wurden vor der Operation mit einem N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>-Gasgemisch (70 % N<sub>2</sub>O und 30 % O<sub>2</sub>) anästhesiert. Dabei wurde die Narkose mit 1,5 % Halothan im N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>-Gemisch eingeleitet und mit 1,0 % Halothan bis zum Ende der Operation aufrechterhalten. Die Operation wurde mit Hilfe eines Präparationsmikroskops durchgeführt. Um die Körpertemperatur von 36,5 +/- 0,5 ° C der zu operierenden Tiere aufrecht zu erhalten, wurden diese während der Operation auf einer Wärmeplatte gelagert. Die linke A. carotis interna wurde freigelegt, ein mit Silikon-Resin beschichteter, monofiler Nylonfaden eingeführt und bis zum Abgang der A. cerebri anterior am Circulus arteriosus Willisii vorsichtig hochgeschoben. Für die folgenden 30 min wurde der Nylonfaden in der A. carotis interna belassen, der auf diese Art eine Okklusion der A. cerebri media und der A. choroidea anterior verursachte. Nach 30 min wurde der Faden wieder

entfernt, um eine Reperfusion der ischämischen Versorgungsgebiete der A.cerebri media und A.choroidea anterior zu ermöglichen. Vor während und nach der Operation wurde mittels Laser-Doppler-Flußmetrie der regionale zerebrale Blutfluss gemessen. Dabei zeigte sich, dass der regionale zerebrale Blutfluss während der Arterien-Okklusion auf ca. 20 % des Ausgangswertes abfiel und 5 min nach der Reperfusion wieder den Ausgangswert erreichte. Die Kontrolltiere wurden nach dem gleichen Protokoll anästhesiert, die linke A.carotis interna operativ freigelegt, kurz berührt und nach 30 min ohne weiteren Eingriff wieder verschlossen.

### **3.3. Gebietsmessung und Zellzählung**

#### **3.3.1. Computer-assistierte striatale Gebietsmessung und Zellzählung:**

Die striatale Gebietsmessung und Zellzählung wurde mit Hilfe der Computer-assistierten Analyse mit dem Programm Stereo Investigator® an den vier folgenden repräsentativen koronalen Gehirnschnitten nach dem Mausgehirn-Atlas mit stereotaxischen Koordinaten von Keith B. J. Franklin und George Paxinos (1997) durchgeführt:

Bregma 1.34 +/- 0.2 mm; Bregma 0.62 +/- 0.2 mm; Bregma -0.10 +/- 0.2 mm; Bregma -1.7 +/- 0.2 mm. Das Striatum bei der Höhe des Bregma 1.34 mm wird rostral durch die Forceps minor des bogenförmigen Corpus callosum, lateral durch die Capsula externa und dem Claustrum, caudal dem Claustrum angrenzend, durch den Nucleus dorsalis endopiriformis und dem Nucleus accumbens begrenzt. Medial wird das Striatum durch den lateralen Ventrikel und der anterioren Commissura anterior von den umgebenen Gehirnstrukturen getrennt. Das Neostriatum auf der Ebene des Bregma 0.62 mm wird rostral durch den Balken des Corpus callosum, lateral durch die Capsula externa und angrenzend der Capsula externa durch das Claustrum sowie dem Nucleus dorsalis piriformis eingegrenzt. Caudal wird der Caudatoputamen-Komplex vom ventralen Pallidum und medial von dem lateralen Ventrikel, sowie dem Nucleus accumbens und dem vorderen Anteil der Commissura anterior eingegrenzt. Auf der Ebene vom Bregma - 0.10 mm wird das ventrale Striatum rostral begrenzt durch den Corpus callosum, lateral durch die Capsula externa, caudal durch den posterioren Anteil der Commissura anterior und dem ventralen Pallidum, sowie medial durch den lateralen Ventrikel und der Capsula interna. Auf der Ebene des Bregma - 1.70 mm auf der Höhe des Hippokampus, wird der laterale Anteil zeltförmig von der Capsula externa, der mediale Anteil hingegen von dem Ausläufer des lateralen Ventrikels, lateral ebenfalls durch die Capsula externa, sowie caudal von dem Gebiet der amygdalostriatalen Transition und dem zentralem Anteil des Nucleus Amygdaloid, medial schließlich von der Capsula interna und dem lateralen Ventrikel begrenzt. Es wurde sowohl das ischämische Gebiet, wie auch das entsprechende der Kontrollseite, in die

Vermessung miteinbezogen. In der vorliegenden Arbeit ist die Zellzählung aller Neurone ausschließlich auf das Neostriatum mit dem Nucleus caudatus und dem Putamen beschränkt.

### **3.3.2. Gebietsmessung NeuN- und MAP2 - gefärbter Gehirnschnitte:**

Zur Bestimmung des ischämischen Kerngebietes wurde das mittels MAP2- oder NeuN-Färbung visualisierte ischämisch geschädigte Kernareal mit einem Cursor umfahren. Anschließend wurde die Gebietsvermessung im mm<sup>2</sup> mithilfe des Stereo Investigator® - Programms bestimmt. Als nächstes wurde das gesamte ischämische Striatum, sowie das der Kontrollseite nach den unter 3.3.1. genannten topisch-anatomischen Strukturen festgesetzt und ebenfalls mit dem Cursor umfahren und die Gebietsgröße analog dem vordem beschriebenen Verfahren berechnet. Die mit MAP2- gefärbten Schnitte dienten zur Gebietsvermessung und zum Vergleich zu den mit NeuN gefärbten Schnitten, die zur NeuN-Zellzählung herangezogen wurden, um zu prüfen, ob eine Reduktion des ischämischen Areal nach 6-wöchiger Überlebenszeit und in welcher Höhe eine Veränderung der Anzahl NeuN-positiver Neuronen stattgefunden hat. Als nächstes wurde die Fläche des ischämischen Kerngebietes in Relation zum gesamten ischämischen Striatum gesetzt und so der prozentuale Anteil des geschädigten Kerngebietes innerhalb des gesamten ischämischen Striatums errechnet. Es wurde dann die Fläche des läsierten und des unbeschädigten striatalen Areal der Kontrollseite vermessen und beide korrespondierende Werte miteinander verglichen. Als Ergebnis zeigte sich dann, ob und wenn ja in welchem Ausmaß eine Schrumpfung der ischämischen Gehirnseite stattgefunden hat.

### **3.3.3. Zellzählung der gesamten Neurone mittels NeuN-Färbung:**

Innerhalb eines umschriebenen Bereiches im Striatum NeuN-gefärbter Gehirnschnitte, wurden die NeuN-markierten Zellen gezählt und auf die Endgröße des striatalen ischämisch geschädigten Gebietes hochgerechnet. Analog zu dieser Prozedur wurde im intakten Striatum der unversehrten Hemisphäre verfahren. Schließlich wurde mit den auf diese Weise ermittelten Daten die Dichte der überlebenden Neurone bezogen auf mm<sup>2</sup> für das ischämische Areal errechnet und mit der Dichte der Neuronen der intakten striatalen Gehirnseite in Beziehung gestellt.

### **3.3.4. Zellzählung der Interneurone:**

Auch hierbei wurde zur Bestimmung des ischämischen und intakten Areals des Striatums, die topisch-anatomische Grenze der Striata mit dem Cursor umfahren, markiert und die jeweiligen Interneurone gezählt.

Als Nachweis der ischämischen Hemisphäre diente hierbei die vor dem Aufziehen auf Objektträger als links markierte Gehirnseite, da auf dieser Seite die operative Okklusion der A. cerebri media durchgeführt worden ist. Als Kontrolle dienten NeuN-/MAP2-Gehirnpräparate, bei denen sich die Läsion stets auf der linken (und kleineren) Hemisphäre präsentierte. Die Subtypen der Interneurone wurden mithilfe spezifischer Antigen-Antikörper-Färbungen und Gegenfärbung mit Ammoniumnickelsulfat visualisiert: Zur Identifizierung der morphologisch großen cholinergen Interneurone wurde der Antikörper ChAT, der gegen das Protein der Cholin-Acetyl-Transferase gerichtet ist benutzt, zur Bestimmung der Parvalbumin-positiven Interneurone wurde ein Antikörper verwendet, der eine starke Affinität zum Protein Parvalbumin ausübt, als Nachweis somatostatinerner Interneurone wurde der Antikörper Somatostatin ausgewählt, der gegen das Protein Somatostatin gerichtet ist und schließlich wurde zum Ermitteln der Calretinin-positiven Interneurone der Antikörper Calretinin in der immunhistochemischen Färbung angewandt, der gegen das Protein Calretinin gerichtet ist.

### **3.4. Statistik:**

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) präsentiert. Die Signifikanzwahrscheinlichkeit der Gegenüberstellung der striatalen Fläche sowie der Neuronen - bzw. Interneuronenzahl der ischämischen und intakten Hemisphäre wurde bei Annahme einer *Normalverteilung* der zu betrachtenden Zielvariable mit dem Student- t- Test errechnet. Dabei wurde das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt.

### **3.5. Lichtmikroskopie und Kamera :**

Zur Ausführung der konventionellen Lichtmikroskopie wurde das Leica DMRA Mikroskop angewendet. Die Aufnahmen der histochemisch sowie immunhistochemisch behandelten Gehirnschnitte erfolgten mit der digitalen Leica - Kamera DC 200. Die Gebietsmessung wurde mit einer 2,5 - fachen Vergrößerung, die Zellzählung mit einer 20 - und die photographische Darstellung der Interneurone mit einer 20 -, 40 - und 100 - fachen Vergrößerung durchgeführt.

### **3.6. Gewebeaufbereitung: Transkardiale Fixation des Gewebes**

Die Tiere wurden nach Art der histologischen Aufarbeitung in zwei Gruppen unterteilt, wobei in der ersten Gruppe 6 Tiere verwendet worden sind, in der zweiten Gruppe ein Tier:

- 1) "Free-Floating"-Histologie
- 2) Paraffin-Histologie

#### **3.6.1. "Free-Floating" - Histologie:**

Die Versuchstiere der ersten Gruppe wurden nach vorher definiertem Zeitpunkt von 6 Wochen nach milder fokaler 30-minütiger Ischämie mit einer intraperitonealen Injektion von Chloralhydrat (500mg/kg KG) tief anästhesiert. Anschließend wurden die Mäuse mit den ausgestreckten Extremitäten dorsal an einer Korkunterlage mit Nadeln befestigt. Ventral wurde das anteriore und mediale Mediastinum freigelegt und der rechte Vorhof eröffnet. Der linke Ventrikel wurde vorsichtig mit einer Kanüle versehen, über die die transkardiale Perfusion mittels einer Pumpe erfolgte (Fluss rate 5 ml/min). Zunächst wurden 5 ml gekühltes 4% iges PFA (4° C) transkardial perfundiert, bis die aus dem rechten Vorhof herausgeflossene Flüssigkeit, überwiegend von Blut gereinigt war. Nachfolgend wurde über die Pumpe ca. 50 ml 4° C gekühltes 4 % iges PFA (in Phosphatpuffer aufgelöst) in das Tier perfundiert. Anschließend wird die Maus dekapitiert. Die Kopfhaut und die Muskulatur wurden von der Kalotte abpräpariert, die Schädeldecke mit einer Hohlmeißelzange vorsichtig entfernt. Nach der Durchtrennung der kranial und basal gelegenen Gehirnnerven und Entfernung der Meningen wurde das Gehirn vorsichtig aus der Schädelkapsel heraus präpariert. Das Gehirn wurde nach schonendem Eröffnen der Kalotte und Entfernung der Meningen vorsichtig entnommen und bei 4° C für 8 Stunden in 4 % iges PFA postfixiert.

#### **3.6.2. Paraffin-Histologie:**

Das Tier der zweiten Gruppe wurde ebenfalls 6 Wochen nach milder fokaler 30 minütiger Ischämie mit einer intraperitonealen Injektion von Chloralhydrat (500mg/kg Kg) tief anästhesiert und mit ausgestreckten Extremitäten dorsal an einer Korkunterlage mit Nadeln befestigt. Ventral wurde das anteriore und mediale Mediastinum freigelegt und der rechte Vorhof eröffnet. Der linke Ventrikel wurde vorsichtig mit einer Kanüle versehen, über die die transkardiale Perfusion mit AFA-Fixativ (70 % absoluter Alkohol, 20 % Formalin-37 %, 10 % Eisessig) eingeleitet wurde. Nach der Dekapitation wurde das vorsichtig aus der Kalotte entnommene Gehirn ebenfalls von den Meningen befreit und über Nacht bei 4 C° mittels AFA-Fixativ postfixiert. Nach abgeschlossener Postfixierung wurde das Gehirnmateriale über eine aufsteigende

Alkoholreihe mit je 70 % -, 80 % - und 96 % igem Alkohol jeweils dreimal für 10 min, anschließend in absoluten Alkohol für weitere 12 Stunden bei 4 ° C belassen. Darauf folgte die Entfernung des absoluten Alkohols im Zwischenmedium Xylol für dreimal je 10 Minuten, welches nach jedem Vorgang gewechselt werde. Abschließend wurden die Präparate in geschmolzenes Paraffin für mindestens 24 Stunden in einem Wärmeschrank in Blöckchenform eingebettet und anschließend bei 4 ° C für 24 Stunden ausgehärtet.

### **3.7. Schneiden und Lagerung des fixierten Gehirns**

#### **3.7.1. Schneiden und Lagerung des fixierten Gehirns für die „Free-Floating“- Histologie:**

Das wie unter Punkt 3.6.1. behandelte in 4 % iges PFA postfixierte Gehirn, wurde am Vibratom in 40 µm dicke koronare Schnitte verarbeitet. Die Gehirnschnitte wurden anschließend für 24 Stunden in 20 % iger Glukoselösung (aufgelöst in Phosphatpuffer) bei 4 ° C aufbewahrt, und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 20 ° C gelagert. Die 20 % ige Glukoselösung diente zum Schutz der Gehirnschnitte vor Frostschäden. Nach dem Auftauen der Präparate bei Zimmertemperatur und Auswaschen der Glukoselösung stehen dieselben einer weiteren histologischen Färbung zur Verfügung

#### **3.7.2. Schneiden und Lagerung des fixierten Gehirns für die Paraffin- Histologie:**

Das wie unter Punkt 3.6.2. lange haltbare Paraffin-eingebettete Gehirn wurde am Mikrotom in 5 µm dicke Präparate aufgeschnitten und in einem Heißwasserbehälter im erwärmten Wasser auf Objektträger aufgezogen, über Nacht in einem Wärmeschrank getrocknet und anschließend nach Entfernung des Paraffins mittels Alkohol histologisch weiter aufgearbeitet.

### **3.8. Immunhistochemische Verfahren zur Darstellung der Antigene**

#### **3.8.1. Antikörper zur Darstellung der Antigene:**

Zur Visualisierung der jeweiligen Neurone, wurden innerhalb der immunhistochemischen Färbung zellspezifische Marker benutzt. Für die Darstellung der Gesamtheit aller Neurone wurden zwei unterschiedlich angreifende neuronale Marker verwendet: Zum Einen, der postsynaptische, neuronale Antikörper MAP2 (microtubule-associated protein 2), bestehend aus einem Paar Polypeptide mit hoher molekularer Masse von je 280 KDA, und einem Protein mit niedriger molekularer Masse von 70 KDA. MAP2 stimuliert die Konstruktion von Neurofilamenten und Mikrotubulen und ist beschränkt auf Neurone, wobei eine höhere Konzentration im Zytoskelett von Dendriten als in den der Perikarya anzutreffen ist

(Martinez G et al. 1997), zum Anderen, der nukleäre neuronale Marker NeuN (neuron-specific soluble nuclear antigen), welcher als panneuronaler Marker Verwendung findet, obwohl einige neuronale Populationen nicht mit NeuN angefärbt werden können, so die Purkinje-Zellen und die Mitralk- und Photorezeptorzellen des ZNS. NeuN ist im Gegensatz zu MAP2 nur in adulten Neuronen nachweisbar (Lee DR et al. 2003). Zur Identifizierung der einzelnen Subtypen der Interneurone wurden - wie im Abschnitt 3.3.4. erläutert - korrespondierende Marker ausgewählt:

- Zur Detektion der Cholin-Acetyl-Transferase der cholinergen Interneurone wurde der ChAT-Antikörper benutzt.
- Zur Erkennung des Proteins Somatostatin der somatostatinergen Interneurone wurde der Somatostatin-Antikörper angewendet.
- Gegen das Protein Parvalbumin der parvalbuminergen Interneurone wurde der Parvalbumin-Antikörper verwendet.
- und um das Protein Calretinin der calretininergen Interneurone nachzuweisen, wurde der Calretinin-Antikörper eingesetzt.

### **3.8.2. Monofärbungen mit DAB und der Freefloating-Methode:**

Die Gehirnschnitte wurden aus der bei  $-20^{\circ}$  C tiefgefrorenen 20 % igen Glukoselösung entnommen und mit einem Pinsel vorsichtig in einer mit 24 Vertiefungen (Wells) versehene Zellkulturplatte hineingelegt. Anschließend wurden die Schnitte für fünf Minuten drei mal in Phosphatpuffer gespült, um die Gehirnschnitte von der Glukoselösung zu reinigen. Pro Schnitt und Vertiefung wurde bei allen Spülungen eine Flüssigkeitsmenge von mindestens 500  $\mu$ l benötigt, während bei den Inkubationsschritten eine Flüssigkeitsmenge von 250  $\mu$ l ausreichend gewesen ist. Die endogene Peroxidase in den Gewebsschnitten wurde durch 15 minütiger Zugabe von 3 % iges  $H_2O_2$  in Phosphatpuffer irreversibel gehemmt. Wird die Behandlung mit 3 % igem Wasserstoffperoxid unterlassen, lässt die Substrat-Chromogenreaktion keine Unterscheidung zu, ob es sich bei dem nachgewiesenen Enzym um die schon vorher im Gewebe vorhandene endogene Peroxidase handelt, die ebenfalls mit dem Chromogen DAB reagiert und so zu vermehrt unspezifischen Hintergrundfärbungen führt, oder ob es die extern zugeführte Peroxidase ist, die spezifisch an der Immunreaktion teilnimmt. Nach der Einwirkung des 3 % igen  $H_2O_2$  wurden die Gehirnschnitte dreimal für je fünf Minuten in Phosphatpuffer gespült. Eine ebenfalls unspezifische Hintergrundfärbung kann durch Anlagerung von Proteinen an stark geladene Elemente der Präparate verursacht werden. Um diese unspezifische Ionenbindung zwischen Antikörper und Gewebe zu verhindern, wird eine neutrale Proteinlösung vor der Zugabe des primären Antikörpers den Gewebsschnitten zugeführt. Diese Proteine lagern sich vor

allem an die stark geladenen Kollagen- und Bindegewebelemente an und „maskieren“ sie für den Antikörper. Um zu verhindern, dass der Sekundärantikörper unspezifisch an Elemente der neutralen Proteinlösung bindet, werden Seren derselben Tierspezies, aus der der Sekundärantikörper stammt, zur Blockierung verwendet. Zur Herstellung dieser Lösung wurde ein 10 % iges normales Serum, sowie 1,2 % iges bovines Serumalbumin verwendet. Zusätzlich wurde dem Serungemisch 0,5 % iges Triton X zugefügt, um die Zellen zu penetrieren. In diese Blockierungslösung wurden für 60 Minuten bei Raumtemperatur die Gehirnschnitten inkubiert. Alle Inkubationschritte wurden, ungeachtet, ob diese bei Raumtemperatur oder bei 4 ° C im Kühlschrank stattgefunden haben, auf einem Schüttler bei 30 - 40 Schüttelbewegungen in der Minute durchgeführt, um eine optimale Durchdringung der Inkubationslösungen mit den Gehirnschnitten zu gewährleisten.

Anschließend wurde diese Lösung vorsichtig abgesaugt und ohne weiteren Waschvorgang wird der verdünnte primäre Antikörper zugesetzt. Oftmals gibt der Hersteller des jeweiligen Antikörpers Empfehlungen, in welcher Konzentration und Inkubationszeit der Antikörper positive Signale darstellt. Um aber die optimale Konzentration des Antikörpers zu ermitteln, das heißt, die geringste Menge des Antikörpers festzustellen, bei welchem die gesuchten Antigene die deutlichste Anfärbung zeigen, ist es notwendig, Verdünnungsreihen bei unterschiedlicher Inkubationszeit und -temperatur anzufertigen. Bei zu geringer Konzentration verblassen die Zielstrukturen und es kann keine eindeutige Unterscheidung zwischen spezifischen, positiven Signal und unspezifischer Bindung der Antikörper getroffen werden. Zu hohe Konzentrationen sind nicht wirtschaftlich, da die Kosten schon für geringe Mengen eines Antikörpers relativ hoch sind. Mit der jeweils ermittelten Verdünnung des primären Antikörpers in Phosphatpuffer, welche im Abschnitt des jeweiligen Antikörpers im Methodenteil aufgeführt worden ist, wurden die Gehirnschnitte entsprechend den Ergebnissen der Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit und -temperatur mit 2 % iges Normales Serum, 0,12 % iges Rinder-Albuminserum sowie 0,3 % iges Triton X inkubiert. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Schnitte wieder dreimal jeweils für fünf Minuten mit Phosphatpuffer gespült. Es folgte die Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper, der aus der gleichen Tiergattung produziert worden ist, wie das normale Serum, jedoch gegen die Spezies gerichtet ist, aus welcher der primäre Antikörper stammt. Auch beim sekundären Antikörper muss die optimale Arbeitskonzentration und Inkubationszeit und -temperatur durch Vorversuche mit einer Verdünnungsreihe ermittelt werden. Die Schnitte wurden wieder nach der Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper je dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde der ABC-Komplex, der mit einer Konzentration von 1:50 je Reagenz mit

Phosphatpuffer verdünnt werden musste und eine Vorinkubationszeit von 30 Minuten benötigte, für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf die Gewebeschnitte aufgebracht. Auch hier folgte dreimaliges Spülen mit Phosphatpuffer für jeweils fünf Minuten. Die Gehirnschnitte wurden nun 15 Minuten in einer Lösung aus destilliertem Aqua, Tris-Puffer, 0,068 % iges Imidazol als Antimykotikum, sowie 0,05 % iges DAB vorinkubiert. Anschließend wurden die histologischen Schnitte mit 150 µl 3 % iges Ammoniumnickelsulfat, welches zur Modifikation der Färbungsintensität eingesetzt wird, versetzt und die Reaktion mit 0,3 % iges Wasserstoffperoxid gestartet. Nach 3-6 Minuten wurde die Inkubationslösung abgesaugt und die Reaktion mit Phosphatpuffer gestoppt; die gebundene Peroxidase wurde schließlich sichtbar. Nach erneutem dreimaligem Auswaschen der Schnitte in Phosphatpuffer, wurden die Gehirnschnitte auf Gelatine-bezogenen Objektträger aufgezogen und maximal 30 Minuten an der Luft getrocknet. Die aufgezogenen Schnitte wurden durch die aufsteigende Alkoholreihe (jeweils zwei Minuten in 70 %-, 80 %-, 90 %- und zweimal jeweils 100% iger Alkohol) in Xylol (jeweils zweimal je 10 Minuten) überführt.

Schließlich wurden die fertig gefärbten Schnitte mit Vitroclud eingedeckt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Visualisiert wurden diese anschließend mit dem Lichtmikroskop.

### 3.8.3. Verdünnungsreihe der primären Antikörper:

ChAT-Antikörper	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2000		
Parvalbumin-Antikörper	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000
Somatostatin-Antikörper	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2000		
Calretinin-Antikörper	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000
MAP2-Antikörper	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2000		
NeuN-Antikörper	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2000		

Die optimale Konzentration des jeweiligen primären Antikörpers ist dem entsprechendem Färbeprotokoll zu entnehmen.

### 3.8.4. Inkubationszeiten der primären Antikörper:

ChAT-Antikörper	24 h	48 h	72 h	98 h	122 h
Parvalbumin-Antikörper	24 h	48 h			
Somatostatin-Antikörper	24 h	48 h			
Calretinin- Antikörper	24 h	48 h			

MAP2-Antikörper	24 h	48 h			
NeuN-Antikörper	24 h	48 h			

Die optimale Inkubationszeit des jeweiligen primären Antikörpers ist dem entsprechendem Färbeprotokoll zu entnehmen.

### 3.8.5. Inkubationstemperatur der primären Antikörper:

ChAT-Antikörper	4° C	21° C	37° C
Parvalbumin-Antikörper	4° C	21° C	37° C
Somatostatin-Antikörper	4° C	21° C	37° C
Calretinin-Antikörper	4° C	21° C	37° C
MAP2-Antikörper	4° C	21° C	37° C
NeuN-Antikörper	4° C	21° C	37° C

Die optimale Inkubationstemperatur des jeweiligen primären Antikörpers ist dem entsprechendem Färbeprotokoll zu entnehmen.

### 3.8.6. Korrespondierende sekundäre Antikörper:

Primärer Antikörper

sekundärer Antikörper

ChAT-Antikörper	Biotinyliert, gegen Kaninchen gerichtet, in einer Ziege produziert
Parvalbumin-Antikörper	Biotinyliert, gegen Maus gerichtet, im Pferd produziert
Somatostatin-Antikörper	Biotinyliert, gegen Kaninchen gerichtet, in einer Ziege produziert
Calretinin- Antikörper	Biotinyliert, gegen Kaninchen gerichtet, in einer Ziege produziert
MAP2-Antikörper	Biotinyliert, gegen Maus gerichtet, im Pferd produziert
NeuN-Antikörper	Biotinyliert, gegen Maus gerichtet, im Pferd produziert

### 3.8.7. Verdünnungsreihe der sekundären Antikörper:

Biotinyliert, gegen Kaninchen gerichtet, in Ziege produziert	1:250	1:500	1:1000
Biotinyliert, gegen Maus gerichtet, im Pferd produziert	1:250	1:500	1:1000
Biotinyliert, gegen Ziege gerichtet, im Esel produziert	1:250	1:500	1:1000

Die optimale Konzentration des jeweiligen sekundären Antikörpers ist dem entsprechendem Färbeprotokoll zu entnehmen.

### 3.8.8. Inkubationszeiten der sekundären Antikörper:

Biotinyliert, gegen Kaninchen gerichtet, in Ziege produziert	1,5 h	15 h	24 h
Biotinyliert, gegen Maus gerichtet, im Pferd produziert	1,5 h	15 h	24 h
Biotinyliert, gegen Ziege gerichtet, im Esel produziert	1,5 h	15 h	24 h

### 3.8.9. Inkubationstemperatur der sekundären Antikörper:

Bei einer Inkubationszeit von 1,5 h wurde eine Inkubationstemperatur von 21° C gewählt, hingegen bei einer Inkubationszeit von 15- oder 24 h eine Inkubationstemperatur von 4° C benötigt wird. Die optimale Inkubationszeit des sekundären Antikörpers ist dem entsprechenden Färbeprotokoll zu entnehmen.

## 3.9. Detaillierte Färbungsprotokolle der entsprechenden Antikörper

### 3.9.1. MAP2- ( bzw. NeuN-) Antikörper:

- 1) Gehirnschnitte werden aus der Glukoselösung entnommen und einzeln in eine 24-Well-Kulturplatte dreimal für je fünf Minuten mit Phosphatpuffer gespült.
- 2) Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 3 % iges Wasserstoffperoxid und PBS.
- 3) Dreimaliges Spülen für je 5 Minuten in Phosphatpuffer.
- 4) Herstellung einer Blockierungslösung mit:
  - 10 % iges Normales Pferdeserum,
  - 1,2 %iges Rinderalbumin,
  - 0,5 % iges Triton X; alle Reagenzien werden in Phosphatpuffer gelöst.
- 5) Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- 6) Absaugen der Blockierungslösung und Inkubation mit dem Primär-Antikörper MAP2 in einer Konzentration von 1:1000, 2 %iges Normales Pferdeserum, 0,12 % iges Rinderalbumin und 0,3 % iges Triton X. Alle Reagenzien werden wieder in Phosphatpuffer gelöst. Inkubation erfolgt für 24 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- 7) Abermals folgt dreimaliges Waschen der Schnitte für fünf Minuten mit Phosphatpuffer.
- 8) Herstellung einer Lösung mit dem biotinylierten, gegen Maus gerichteten Sekundär-Antikörper, der im Pferd hergestellt wurde, in einer Konzentration von 1:250, sowie 2% iges Normales Pferdeserum, 0,12 %iges Rinderalbuminserum und 0,3% Triton X,

auch hier werden alle Reagenzien in Phosphatpuffer gelöst. Die Inkubationszeit beträgt 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

- 9) Anschließendes dreimaliges Spülen der Schnitte für je fünf Minuten mit Phosphatpuffer.
- 10) Aufbringen des für 30 Minuten vorinkubierten ABC-Komplexes. Die Inkubation erfolgt für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- 11) Dreimaliges Waschen der Schnitte je fünf Minuten mit Phosphatpuffer.
- 12) Vorinkubation der Gewebeschnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit einer Lösung aus 0,05 % iges DAB und 0,068 % iges Imidazol, gelöst in Trispuffer und destilliertem Aqua.
- 13) Starten der Reaktion durch Zusatz von 150 µl 3 % iges Ammoniumnickelsulfat und 0,3 % iges Wasserstoffperoxid je Well für 3-6 Minuten.
- 14) Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Lösung und versetzen der Schnitte mit Phosphatpuffer.
- 15) Dreimaliges Spülen mit Phosphatpuffer beendet die Färbung. Die Gehirnschnitte werden in einer aufsteigender Alkoholreihe und abschließend in Xylol überführt:  
70 %-, 80 %-, 90 %-, 2 x 100 % iger Alkohol je zwei Minuten,  
2 x in Xylol je 10 Minuten
- 16) Schließlich werden die fertig gefärbten Präparate mit Vitroclud eingedeckt.

Alternativ ist ein Teil der Schnitte, die mit Antikörper gegen Map2, NeuN oder Parvalbumin gefärbt wurden, mit dem MOM-Kit behandelt worden. Der MOM-Kit eignet sich, um die starke Hintergrundfärbung zu reduzieren, die besonders bei Färbungen auftreten, bei welchen mit einem primären Antikörper gearbeitet wird, der gegen Antigene der gleichen Spezies gerichtet ist, aus welchem die Gehirnschnitte angefertigt worden sind (hier die Maus).

### **3.9.2. MOM-Kit und MAP2 -Antikörper:**

Schritte 1) – 3) wie unter Punkt 3.9.1. beschrieben.

- 4) Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit MOM-Blockierungslösung.
- 5) Dreimaliges Spülen mit PBS für je fünf Minuten.
- 6) Vorinkubation mit Diluentlösung für fünf Minuten.
- 7) Absaugen der Lösung.
- 8) Inkubation des Primär-Antikörpers MAP2 in einer Konzentration von 1:1000 für 24 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in der MOM-Diluent-Lösung.
- 9) Dreimaliges Spülen mit PBS für je fünf Minuten.

- 10) Inkubation mit dem biotinylierten MOM-Sekundär-Antikörper für 1,5 h bei
- 11) Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- 12) Dreimaliges Waschen mit PBS für je fünf Minuten.
- 13) Inkubation mit dem ABC-Komplex für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem
- 14) Schüttler.
- 15) Dreimaliges Spülen mit PBS für je fünf Minuten.
- 16) Vorinkubation mit 0,068 % iges Imidazol, 0,05 % iges DAB in Trispuffer für 15 Minuten.
- 17) Starten der Reaktion mit 150 µl 3% iges Ammoniumnickelsulfat je Well und 0,3 % iges Wasserstoffperoxid für 3-6 Minuten.
- 18) Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Lösung und Aufbringen von Phosphatpuffer
- 19) Dreimaliges Waschen mit PBS für je fünf Minuten
- 20) Aufsteigende Alkoholreihe und Überführung in Xylol
- 21) Eindeckeln mit Vitroclud

### **3.9.3. ChAT-Antikörper:**

Schritte 1) – 3) wie unter Punkt 3.9.1. beschrieben.

- 4) Herstellung einer Blockierungslösung mit:
  - 10 % iges Normales Ziegenserum,
  - 1,2 % iges Rinderalbumin,
  - 0,5 % iges Triton X, alle Reagenzien werden in Phosphatpuffer gelöst.
 Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- 5) Absaugen der Blockierungslösung und Inkubation mit dem Primär-Antikörper ChAT in einer Konzentration von 1:1000, 2 % iges Normales Ziegenserum, 0,12 % iges Rinderalbumin und 0,3 % iges Triton X. Alle Reagenzien werden in Phosphatpuffer aufgelöst. Inkubation erfolgt für 72 h bei 4 ° C auf dem Schüttler.
- 6) Abermals folgt dreimaliges Waschen der Schnitte für fünf Minuten mit Phosphatpuffer.
- 7) Herstellung einer Lösung mit dem biotinylierten, gegen Kaninchen gerichteten Sekundär-Antikörper, der in der Ziege hergestellt wurde, in einer Konzentration von 1:250, sowie 2 % iges Normales Ziegenserum, 0,12 % iges Rinderalbuminserum und 0,3 % iges Triton X, alle Reagenzien werden in Phosphatpuffer aufgelöst. Die Inkubationszeit beträgt 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- 8) Anschließendes dreimaliges Spülen der Schnitte für je fünf Minuten mit Phosphatpuffer.

- 9) Aufbringen des für 30 Minuten vorinkubierten ABC-Komplexes, Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- 10) Dreimaliges Waschen der Schnitte je fünf Minuten mit Phosphatpuffer.
- 11) Vorinkubation der Gewebeschnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit einer Lösung aus 0,05 % iges DAB und 0,068 % iges Imidazol, gelöst in Trispuffer und destilliertem Aqua.
- 12) Starten der Reaktion mit 150 µl 3% iges Ammoniumnickelsulfat pro Well und 0,3 % iges Wasserstoffperoxid für 3-6 Minuten.
- 13) Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Lösung und Aufbringen von Phosphatpuffer.
- 14) Dreimaliges Waschen mit PBS für je fünf Minuten.
- 15) Aufsteigende Alkoholreihe und Überführung in Xylol.
- 16) Eindeckeln mit Vitroclud.

#### **3.9.4. Parvalbumin-Antikörper:**

Schritte 1 – 3) wie unter 3.9.1. beschrieben.

- 4) Herstellung einer Blockierungslösung mit:
    - 10 % iges Normales Pferdeserum,
    - 1,2 % iges Rinderalbumin,
    - 0,5 % iges Triton X, alle Reagenzien werden in Phosphatpuffer gelöst.
 Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
  - 5) Absaugen der Blockierungslösung und Inkubation mit dem Primär-Antikörper Parvalbumin in einer Konzentration von 1:10000, 2 % iges Normales Pferdeserum, 0,12 % iges Rinderalbumin und 0,3 % iges Triton X. Alle Reagenzien werden in Phosphatpuffer gelöst. Die Inkubation erfolgt für 24 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
  - 6) Abermals folgt dreimaliges Waschen der Schnitte für fünf Minuten mit Phosphatpuffer.
  - 7) Herstellung einer Lösung mit dem biotinylierten, gegen Maus gerichteten Sekundär-Antikörper, der im Pferd hergestellt wurde, in einer Konzentration von 1:250, sowie 2% iges Normales Pferdeserum, 0,12 % iges Rinderalbuminserum und 0,3 % iges Triton X, alle Reagenzien werden wieder in Phosphatpuffer gelöst. Die Inkubationszeit beträgt 24 h bei 4 ° C auf dem Schüttler.
- Schritte 8 – 16) wie unter 3.9.3 beschrieben.

### **3.9.5. Somatostatin-Antikörper:**

Schritte 1 – 4) wie unter 3.9.3. beschrieben.

- 5) Absaugen der Blockierungslösung und Inkubation mit dem Primär-Antikörper Somatostatin in einer Konzentration von 1:5000, 2 % iges Normales Ziegen Serum, 0,12 % iges Rinderalbumin und 0,3 % iges Triton X. Alle Reagenzien werden in Phosphatpuffer gelöst. Inkubation erfolgt für 24 h bei 21 ° C auf dem Schüttler.
  - 6) Abermals folgt dreimaliges Waschen der Schnitte für fünf Minuten mit Phosphatpuffer.
  - 7) Herstellung einer Lösung mit dem biotinylierten, gegen Kaninchen gerichteten Sekundär- Antikörper, der in der Ziege hergestellt wurde, in einer Konzentration von 1:250, sowie 2% iges Normales Ziegen Serum, 0,12 % iges Rinderalbumin Serum und 0,3 % iges Triton X, alle Reagenzien werden in Phosphatpuffer gelöst. Inkubationszeit beträgt 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- Schritte 8 – 16) wie unter 3.9.3 beschrieben.

### **3.9.6. Calretinin-Antikörper:**

Schritte 1 – 4) wie unter 3.9.3. beschrieben.

- 3) Absaugen der Blockierungslösung und Inkubation mit dem Primär-Antikörper Calretinin in einer Konzentration von 1:10.000, 2 % iges Normales Ziegen Serum, 0,12 % iges Rinderalbumin und 0,3 % iges Triton X. Alle Reagenzien werden in Phosphatpuffer gelöst. Inkubation erfolgt für 24 h bei 21° C auf dem Schüttler.
  - 4) Abermals folgt dreimaliges Waschen der Schnitte für fünf Minuten mit Phosphatpuffer.
  - 5) Herstellung einer Lösung mit dem biotinylierten, gegen Kaninchen gerichteten Sekundär- Antikörper, der in der Ziege hergestellt wurde, in einer Konzentration von 1:250, sowie 2 % iges Normales Ziegen Serum, 0,12 % iges Rinderalbumin Serum und 0,3 % iges Triton X. Alle Reagenzien werden in Phosphatpuffer gelöst. Die Inkubationszeit beträgt 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- Schritte 8 – 16) wie unter 3.9.3 beschrieben.

### **3.9.7. Hämatoxylin-VAF (Vanadium-Acid-Fuchsin) –Färbung:**

Vorbehandlung der Paraffinschnitte:

Zunächst erfolgt die Deparaffinisierung: Drei mal 10 Minuten Überführung der Gehirnschnitte, die auf dem Objektträger vordem aufgezogen worden sind, in Xylol. Anschließend erfolgt die Rehydrierung: Je drei mal je 5 Minuten Eintauchen der Objektträger in einer absteigenden Alkoholreihe, angefangen mit 100 % -, 90 % -, 80% - und schließlich 70 % iger Alkohol.

Beginn der Hämatoxylin-VAF Färbung:

- 1) Auswaschen der präparierten Schnitte in destilliertem Wasser, je dreimal für 10 Minuten.
- 2) Fünf minütige Inkubation in Gill's Hämatoxylin.
- 3) Dreimaliges Waschen in destilliertem Wasser für je 10 Minuten..
- 4) Eintauchen der Schnitte in Acid-Alkohol für 20–30 Sekunden, bis sich eine leichte bräunliche Färbung einstellt.
- 5) Zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser für je eine Minute.
- 6) Bläuen in 1% ige Natrium-Bikarbonat-Lösung für 3-5 Minuten.
- 7) Zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser für je eine Minute.
- 8) Überführen der Gehirnschnitte in Acetat-Puffer für 10 Sekunden.
- 9) Zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser für je eine Minute.
- 10) Gegenfärbung mit VAF für eine Minute.
- 11) Zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser für je eine Minute.
- 12) Eintauchen der Präparate in 0,01% ige Borax-Lösung für 20-30 Sekunden.
- 13) Zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser für je eine Minute.
- 14) Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe, beginnend mit 70% -, 80% -, 96% - und zweimal 100% igem Alkohol für je 5 Minuten.
- 15) Klären der Schnitte in Xylol für je zweimal 10 Minuten.
- 16) Eindeckeln der Gehirnschnitte mit dem Eindeckmedium Vitro-Clud

### **3.9.8. Hämatoxylin-Eosin-Färbung:**

Vorbehandlung der Paraffinschnitte:

Wie unter 3.9.7. beschrieben. Beginn der Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

Vorgehen Schritt 1) bis 7) der Hämatoxylin-VAF-Färbung, dann folgt:

- 8) Inkubation in Eosin-Lösung für zwei Minuten

- 9) Zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser für je eine Minute  
Weiter wie unter 3.9.7. Schritt 14) bis 16) beschrieben.

### **3.9.9. Kresylviolett-Färbung (Nissel-Färbung):**

Vorbehandlung der Paraffinschnitte:

Wie unter 3.9.7. beschrieben. Beginn der Kresylviolett-Färbung:

- 1) Auswaschen der präparierten Schnitte in destilliertem Wasser, je dreimal für 10 Minuten.
- 2) Inkubation in gepufferter Kresylviolett-Lösung für 10 Minuten
- 3) Spülen in Acetatpuffer (pH-Wert 6.0) für einige Sekunden  
Weiter wie unter 3.9.7. Schritt 14) bis 16) beschrieben.

## **4. Material**

### **4.1. Pufferlösungen**

#### **4.1.1. Acetatpuffer:**

Benötige Utensilien: 200 ml Glasflasche, Rührmagnet, magnetisierte Platte, 100 ml destilliertem Wasser, 16,4 g Natriumacetat, 99% ige Essigsäure.

Zubereitung: 16,4 g Natriumacetat werden in 100 ml destilliertem Wasser angesetzt, unter Bewegung des Rührmagneten auf einer magnetisierten Platte aufgelöst, und mit 99% ige Essigsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt.

#### **4.1.2. Eisessigsäure-Natriumacetatpuffer:**

Benötige Utensilien: 100 ml Glasflasche, 130 mg Natriumacetat, 100 ml destilliertes Wasser, 1,2 ml Eisessigsäure, Rührmagnet, magnetisierte Platte.

Zubereitung: 130 mg Natriumacetat werden in 100 ml destilliertem Wasser und Hinzufügung von 1,2 ml Eisessigsäure unter Bewegung des Rührmagneten auf einer magnetisierten Platte aufgelöst und auf einen pH-Wert von 6,3 eingestellt.

#### **4.1.3. Phosphatpuffer-Stammlösung:**

Benötige Utensilien: 2 Liter Flasche, Rührmagnet, magnetisierte Platte, 2 Liter destilliertes Wasser, 200 g Natriumchlorid, 35 g Natriumdihydrogenphosphat, 5 g Natriumhydroxid, 5 g Kaliumchlorid.

Zubereitung: Alle Reagenzien werden in 2 Liter destilliertes Wasser mithilfe eines Rührmagneten auf einer magnetisierten Platte bei mittlerer Umdrehung unter Bewegung aufgelöst und mit 7,5 ml 10 N NaOH auf einen pH-Wert von 6,81 eingestellt. Aufbewahrung der Lösung bei Raumtemperatur.

#### **4.1.4. Phosphatpuffer-Arbeitslösung:**

Benötige Utensilien: 1000 ml Glasflasche, magnetisierte Platte, Rührmagnet, 900 ml destilliertes Wasser, 100 ml PBS-Stammlösung.

Zubereitung: 100 ml der PBS-Stammlösung werden mit 900 ml destilliertem Wasser aufgefüllt und unter Bewegung des Rührmagneten auf einer magnetisierten Platte aufgelöst.

#### **4.1.5. Tris-Stammlösung (1 Mol):**

Benötige Utensilien: 100 ml Glasflasche, magnetisierte Platte, Rührmagnet, 12,2 g Tris, 100 ml destilliertes Wasser.

Zubereitung: 12,2 g Tris (Hydroxymethylaminomethan) werden in 100 ml destilliertem Wasser mithilfe eines Rührmagneten auf einer nichtbeheizten magnetisierten Platte bei mittlerer Umdrehung (500 Umdrehungen / Minute) aufgelöst. Der pH-Wert wird mit 10 N HCL auf 7,6 eingestellt. Aufbewahrung der Lösung bei Raumtemperatur.

#### **4.1.6. Natrium-Bikarbonatlösung (1%):**

Benötige Utensilien: 100 ml Glasflasche, 99 ml destilliertes Wasser, 1 g Natriumbikarbonat, Rührmagnet, magnetisierte Platte.

Zubereitung: 1 g Natriumbikarbonat werden in 99 ml destilliertem Wasser unter Bewegung des Rührmagneten auf einer magnetisierten Platte aufgelöst.

### **4.2. Fixativa**

#### **4.2.1. 4 % iges PFA:**

Benötige Utensilien: 500 ml kochfeste Glasflasche, 480 ml PBS, 20 g Paraformaldehyd, Rührmagnet, Magnetisierte Heizplatte.

Zubereitung: Wegen starker Schaumbildung werden zunächst nur 300 ml PBS und 20 g Paraformaldehyd in die Glasflasche gefüllt, ein Rührmagnet hinzugefügt und die Flasche auf eine magnetisierte Heizplatte gestellt. Die Temperatur wird auf 70 °C eingestellt, bei 300 Umdrehungen/Minute wird die Lösung ca. 15 Minuten erhitzt. Langsam werden die restlichen 180 ml PBS zugeführt. Nachdem das PBS nach 15 Minuten gut mit dem Paraformaldehyd vermischt ist, wird der pH-Wert mit einem Tropfen 25 NaOH aus der Tropfpipette, sowie einigen Tropfen 25 oder 36 % HCL auf 7,3 eingestellt. Abkühlen bei Raumtemperatur, danach Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 °C.

#### **4.2. AFA-Fixativ:**

Benötige Utensilien: 100 ml Glasflasche, Rührmagnet, magnetisierte Platte, 96% ige Alkohol, 39% ige Formaldehyd, Eisessigsäure.

Zubereitung: 70 ml 96% ige Alkohol werden mit 20 ml 39% ige Formaldehyd sowie mit 10 ml Eisessigsäure vermengt und unter Bewegung des Rührmagneten auf einer magnetisierten Platte aufgelöst.

### **4.3. Übrige Substrat-Zubereitung**

#### **4.3.1. 3 % iges Ammoniumnickelsulfat:**

Benötige Utensilien: Magnetisierte Platte, Rührmagnet, 100 ml Glasflasche, 3 g Ammoniumnickelsulfat, 97 ml destilliertes Wasser.

Zubereitung: 3 g Ammoniumnickelsulfat werden in 97 ml destilliertem Wasser unter Bewegung mithilfe eines Rührmagneten auf einer nichtbeheizten magnetisierten Platte bei mittlerer Umdrehung (500 Umdrehungen / Minute) aufgelöst.

#### **4.3.2. 6,8 % iges Imidazol als Stammlösung:**

Benötige Utensilien: Schüttler, 20 ml Plastikflasche, 681 mg Imidazol, 10 ml destilliertes Wasser, 300 µl 10 N HCL.

Zubereitung: 681 mg Imidazol werden in 10 ml destilliertes Wasser unter Bewegung aufgelöst. Der pH-Wert wird mit ca. 300 µl 10 N HCL auf 7,6 eingestellt. Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

#### **4.3.3. 10 % iges Triton X als Stammlösung:**

Benötige Utensilien: 100 ml Glasflasche, magnetisierte Platte, Rührmagnet, 10 g Triton X, 90 ml PBS.

Zubereitung: Triton X und PBS mit dem Rührmagneten in eine Flasche füllen, diese auf die nicht beheizte Heizplatte stellen und auf 500 Umdrehungen / Minute für 5 Minuten einstellen. Aufbewahrung bei 4 ° C.

#### **4.3.4. 5 % iges DAB (3,3´ Diaminobenzidine):**

Benötige Utensilien: 100 ml dunkle Glasflasche, Rührmagnet, magnetisierte Platte, 5 g 3,3´ Diaminobenzidine, 95 ml destilliertes Wasser, 1 ml Natriumhypochloridlösung, 10 ml PBS.

Zubereitung: Wegen Kanzerogenität von 3,3´ Diaminobenzidine ist nur mit Schutzbrille und mit Atemschutzmaske, sowie unter einem Abzug zu arbeiten. DAB und destilliertes Wasser wird in eine lichtgeschützte Flasche gefüllt, ein Rührmagnet hinzugefügt, die Flasche auf eine nicht beheizte Heizplatte hingestellt und auf 500 Umdrehungen/Minute eingestellt. Nach ca. 10 Minuten, bis sich die Partikel vollständig aufgelöst haben, muss der Rührmagnet zur Neutralisation des DABs aus der Flasche entnommen und in ein kleines Gefäß mit PBS und Natriumhypochloridlösung hineingegeben werden. Nach Aufklaren der Lösung wird diese in einem speziell zur DAB-Entsorgung vorgesehenen Behälter eingefüllt und der Magnet kann zur

weiteren (gefahrlosen) Verwendung benutzt werden. Die DAB-Lösung wird hingegen in kleinere Gefäß-Volumina alloquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **4.3.4.1. Vorinkubationslösung mit 0,05 % iges DAB:**

Benötige Utensilien: 10 ml Plastikflasche, Schüttler, 9,3 ml destilliertes Aqua, 500  $\mu\text{l}$  Tris-Stocklösung, 100  $\mu\text{l}$  Imidazol-Stocklösung, 100  $\mu\text{l}$  DAB-Stocklösung.

Zubereitung: Die Zubereitung dieser Lösung muss direkt vor dem Arbeitsschritt erfolgen: 500  $\mu\text{l}$  Tris-Stammlösung, 100  $\mu\text{l}$  Imidazol-Stammlösung, sowie 100  $\mu\text{l}$  DAB-Stammlösung werden zu 9,3 ml destilliertem Wasser zugegeben und miteinander auf einem Schüttler vermengt. Pro Schnitt wird eine Menge von 250  $\mu\text{l}$  benötigt.

#### **4.3.5. Herstellung der MOM-Reagenzien:**

Benötige Utensilien: Schüttler, 3 x 10 ml Plastikflaschen, 10 ml Phosphatpuffer, 90  $\mu\text{l}$  Blockungs-Stocklösung, 600  $\mu\text{l}$  Diluent-Stocklösung, 2,5 ml Diluentlösung, 10  $\mu\text{l}$  Biotinylierter Sekundär-Antikörper –Stocklösung.

Zubereitung: Blockungslösung: 90  $\mu\text{l}$  der Stocklösung mit 2,5 ml Phosphatpuffer auf einem Schüttler mischen. Diluentlösung: 600  $\mu\text{l}$  der Stocklösung mit 7,5 ml Phosphatpuffer verdünnen und kurz auf einem Schüttler schütteln. Biotinylierter Sekundär-Antikörper: 10  $\mu\text{l}$  der Stocklösung mit 2,5 ml Diluentlösung mischen und ebenfalls kurz schütteln.

#### **4.3.6. Kresylviolett-Lösung:**

Benötige Utensilien: 100 ml Glasflasche, Rührmagnet, magnetisierte Platte, 100 ml Natriumacetatpuffer, 0,5 g Kresylviolett.

Zubereitung: 0,5 g Kresylviolett werden in 100 ml Natriumacetatpuffer (pH-Wert 3,8-4,0) unter Bewegung des Rührmagneten auf einer magnetisierten Platte aufgelöst.

#### **4.3.7. Borax-Lösung (0,01%):**

Benötige Utensilien: 100 ml Glasflasche, Rührmagnet, magnetisierte Platte, 99,99 ml destilliertes Wasser, 0,01 ml Borax-Lösung.

Zubereitung: 0,01 ml Borax-Lösung werden in 99,99 ml destilliertem Wasser unter Bewegung des Rührmagneten auf einer magnetisierten Platte aufgelöst.

#### **4.3.8. Ammonium-Metavanadat-Lösung (0,5%):**

Benötige Utensilien: 100 ml Glasflasche, Rührmagnet, magnetisierte Platte, 99,5 ml destilliertes Wasser, 500 mg Ammonium-Metavanadat.

Zubereitung: 500 mg Ammonium-Metavanadat werden in 99,5 ml 80-90 C° heißen destillierten Wassers auf einer magnetisierten Herdplatte mit einem Rührmagneten unter Bewegung aufgelöst.

#### **4.3.9. VAF (Vanadium-Fuchsinsäure):**

Benötige Utensilien: 100 ml Glasflasche, Rührmagneten, magnetisierte Platte, 75 ml destilliertes Wasser, 25 ml 0,5% ige Ammonium-Metavanadat-Lösung, 1 ml Eisessigsäure, 100 mg Fuchsinsäure.

Zubereitung: 100 mg der Fuchsinsäure werden in 75 ml destilliertem Wasser sowie in 25 ml der 0,5% igen Ammonium-Metavanadat-Lösung und in 1 ml Eisessigsäure unter Bewegung des Rührmagneten auf einer magnetisierten Platte aufgelöst.

#### **4.3.10. Acid-Alkohol:**

Benötige Utensilien: 100 ml Glasflasche, Rührmagnet, magnetisierte Platte, 99 ml Absoluter Alkohol, 1 % ige Hydrochlorsäure.

Zubereitung: 1% ige Hydrochlorsäure werden in 99 ml Absolutem Alkohol unter Bewegung des Rührmagneten auf einer magnetisierten Platte aufgelöst.

### **4.4. Reagenzien**

#### **4.4.1. Primäre Antikörper:**

**Anti-NeuN:** Nuklearer Neuronemarker, monoklonal, in der Maus hergestellt.

Vertrieb Firma Chemicon, Katalog-Nr.: MAB 377.

**Anti-Chat:** Marker gegen acetylcholinerge Interneurone, polyklonal, in Kaninchen hergestellt.

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Professor Dr. med. Rüdiger W. Veh, Institut für Anatomie, Universitätsklinik Charité Mitte, Berlin.

**Anti-Parvalbumin:** Marker gegen parvalbuminerge Interneurone, monoklonal, in Maus hergestellt. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Professor Dr. med. Rüdiger W. Veh, Institut für Anatomie, Universitätsklinik Charité Mitte, Berlin.

**Anti-Somatostatin:** Marker gegen somatostatinerge Interneurone, polyklonal, in Kaninchen hergestellt. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Professor Dr. med. Rüdiger W. Veh, Institut für Anatomie, Universitätsklinik Charité Mitte, Berlin.

**Anti-Calretinin:** Marker gegen calretininerge Interneurone, polyklonal, in Kaninchen hergestellt. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Professor Dr. med. Rüdiger W. Veh, Institut für Anatomie, Universitätsklinik Charité Mitte, Berlin.

**Anti-MAP2:** Neuronaler Antikörper gegen Mikrotubuli im Zytoskelett, monoklonal, in Maus hergestellt. Vertrieb Firma Chemicon, Katalog-Nr.: MAB 3418.

#### **4.4.2. Sekundäre Antikörper:**

**Biotinylierter Anti-Hase IgG:** Vertrieb Vector. Katalog-Nr.: BA-1000; Lot: LO129.

**Biotinylierter Anti-Maus IgG:** Vertrieb Vector. Katalog-Nr.: BA-2001; Lot: LO317.

#### **4.4.3. Reagenzien für Pufferlösungen:**

**Phosphatpufferstammlösung (pH-Wert 7,4):** Vertrieb durch Gibco. Katalog-Nr.: 70011-036; Lot: 3082907.

**Tris (hydroxymethylaminomethan):** Molekulargewicht 121,1. Firma Sigma, Katalog-Nummer T-1378.

#### **4.4.4. Sonstige Reagenzien:**

**Albumin-Rinderserum:** Vertrieb durch PAA-Laboratories GmbH. Katalog-Nummer: K41-401-500; Lot: G16120-249.

**Normales Pferde Serum:** Vertrieb durch Vector. Lot: J0810; Katalog-Nr.: S-2000.

**Ammoniumnickelsulfat:** Firma Fluka. Katalog 09885.

**Imidazol:** Molekulargewicht 68,1. Vertrieb durch Sigma. Katalog-Nummer I-0125.

**ABC-Peroxidase-Elite-Kit:** Vertrieb Firma Vector. Katalog-Nr.: VC-PK-6100.

**3,3' Diaminobenzidine:** Vertrieb durch Sigma. Lot: 99H1154. Katalog-Nr.: D-5637.

**Triton X-100:** Vertrieb durch Sigma. Lot: 11k0216. Katalog-Nr.: X-100.

**M.O.M. Kit-Peroxidase:** Firma Vector. Katalog-Nr.: PK-2200. Lot: MO914.

**ABC-Kit:** Vertrieb Vector. Katalog-Nr.: PK-6100.

**Natriumacetat:** Vertrieb Firma Sigma. Katalog-Nr: S 8625.

**Paraplast Plus:** Vertrieb Firma Sigma.

**Toluidin-Blau:** Vertrieb Firma Sigma. Katalog-Nr: T 3260.

**Borax (Natriumtetraborat):** Vertrieb Firma Sigma. Katalog-Nr: B 9876.

**Hämatoxylin, Gill No 2:** Vertrieb Firma Sigma. Katalog-Nr: GHS-2-16.

**Fuchsinäure:** Vertrieb Firma Sigma. Katalog-Nr: A 3908.

**Ammonium Metavanadat ( $\text{NH}^4\text{VO}^3$ ):** Vertrieb Firma Sigma. Katalog-Nr.: A 8175.

**Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat:** Vertrieb Firma Fluka. Lot: 415349/1 14501. Katalog-Nr.: 09885.

**Ethanol:** Vertrieb Firma Sigma. Katalog-Nr: E 7023.

**Formaldehyd 37% ige Lösung:** Vertrieb Firma Sigma. Katalog-Nr.: F 1635.

**Eisessigsäure:** Vertrieb Firma Sigma. Katalog-Nr.: A 0808.

**Wasserstoffperoxid 30 %:** Vertrieb durch Firma Merck. Lot: K29827697 141. Katalog-Nr.: UN 2014.

**Rotihistol:** Vertrieb Firma Roth. Karlsruhe.

**Vitro-Clud:** Vertrieb Firma R, Langenbrick GmbH, Emmendingen.

**Deckglass:** Firma Menzel-Gläser, Größe jeweils 21 X 26 mm sowie 24 X 60 mm.

**Objektträger:** Firma Menzel-Gläser. Größe 25 X 75 X 1.0 mm. Artikel-Nummer: 041300.

**Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen und mit Deckel:** Vertrieb durch Becton Dickinson. LOT: 35 3047.

**Mausgehirn-Atlas mit stereotaxischen Koordinaten:**

Vertrieb durch Academic Press. Autoren: Keith B. J. Franklin und George Paxinos. Erschienen 1997.

#### 4.5. Geräte :

**Digitale Kamera:** Firma Leica Microsystems, Heidelberg. Typ DC200.

**Mikroskop:** Firma Leica Microsystems, Heidelberg. Typ DMRA.

2,5 - , 20 - , 40 - und 100 er Objektiv. Serien-Nummer: 216693.

**Mikrom:** Firma Mikrom. Typ HM 330. Serien-Nummer: 2895.

**Vibratom:** Firma Technical Products. St.Louis,USA.

**Schüttler:** Firma Edmund Bühler. Typ TH 10. Serien-Nummer: Ks 10 DIGI.

**Heißwasserbadbehälter:** Firma Axel Johnson LabSystem. Typ HIS-2. Serien-Nummer: 838.

**Magnetisierte Heizplatte:** 100 –1250 Umdrehungen/Minute, Firma Heidolph.Typ 3001, Serien-Nummer: 099830192.

**PH-Meter:** Firma WMW,Typ PH 522, Serien-Nummer: 19020015.

#### 4.6. Software:

Computer-assistierte Analyse, Stereo Investigator®; Micro Brightfield, Inc., Williston, VT; Full License with virtual slice module; Image Library version 5.40; Copyright© 1995-2003.

## **5. Ergebnisse**

Nach der vorher definierten Überlebenszeit von 6 Wochen wurde nach einer 30 -minütigen Okklusion der Arteria cerebri media mit anschließender Reperfusion im Striatum der Maus eine deutliche zelluläre Schädigung, die überwiegend im ipsilateralen, dorsolateralen Striatum mit Aussparung des Cortex lokalisiert war, immunhistochemisch sowie histochemisch nachgewiesen. Es zeigte sich ein signifikanter neuronaler Verlust, der hauptsächlich Projektionsneurone, aber auch wie folgend näher beschrieben im unterschiedlichen Ausmaß die striatalen Interneurone betroffen hatte. Der neuronale Zellverlust wurde von einer milden Gliose ohne Pannekrose begleitet. Desweiteren wurde eine signifikante Atrophie des ischämischen Striatum nachgewiesen.

### **5.1. Anatomische Bestimmung des neuronalen Zellschadens:**

Im dorsolateralen Striatum der ischämischen Hemisphäre wurde ein profunder Verlust der dendritischen und neuronalen Immunreaktivität mittels Map2- und NeuN-Färbung immunhistochemisch nachgewiesen. In dieser scharfbegrenzten Läsion konnte in der anschließenden Zellzählung der neuronale Verlust auch quantifiziert werden. Langsame, progressive neuronale Schädigung zeigte die histochemische Hämatoxylin-Vanadium-Fuchsin-Färbung nicht nur im ipsilateralen dorsolateralen Striatum, sondern auch in der ipsilateralen Substantia nigra, pars compacta mit einer merklichen Reduktion der kleineren und mittleren Neurone bei Aussparung größerer Neurone (ChAT-positive Neurone) im Vergleich zu der kontralateralen Seite. Der Cortex zeigte sich auf der ipsilateralen Seite hingegen von der ischämischen Schädigung unversehrt.

### **5.2. Striatale Gebietsgröße mittels NeuN- und Map2-Färbung:**

Für die Visualisierung der ischämischen Schädigung wurden – wie in Abschnitt 3.8.1. näher erläutert - immunhistochemische neuronale Färbungen mit dem dendritischen Map2- sowie mit dem gegen nukleäre Antigene gerichteten NeuN- Antikörper an den Gehirnschnitten durchgeführt. Zunächst wurde das striatale Gebiet auf der ischämischen und der intakten Gehirnseite in mm<sup>2</sup> an vier repräsentativen Bregma-Ebenen bestimmt (Diagramm 5.2.1). Dabei ist auf allen vier Bregma-Ebenen deutlich eine Atrophie des ischämischen Striatums zu erkennen. Im Mittelwert zeigte das läionierte Striatum eine Fläche von 2,3 mm<sup>2</sup>, das der intakten Hemisphäre hingegen 3,2 mm<sup>2</sup>. Anschließend wurde der prozentuale Anteil des striatalen Areals der ischämischen Hemisphäre in Bezug auf das der intakte Gehirnseite, die mit

100 % festgesetzt wurde, an vier Bregma-Bereichen ermittelt. Wie in Diagramm 5.2.2 graphisch dargestellt, ergibt sich eine deutliche Verringerung der ischämischen striatalen Fläche, die im Durchschnitt einen Anteil von 72,3 % der kontralateralen striatalen Fläche eingenommen hat. Daraus folgt, dass eine signifikante Atrophie des ischämischen Striatum um 27,7 % (Diagramm 5.2.3) stattgefunden hat. Im Weiteren wurde die Gebietsgröße in mm<sup>2</sup> des ischämischen Kerngebietes innerhalb des ipsilateralen Striatum berechnet. Im Bereich von Bregma 0,1 mm präsentiert das ischämische Kerngebiet mit 3 mm<sup>2</sup> die größte Ausdehnung (Diagramm 5.2.4.). Im Durchschnitt umfasst das Infarkt Kerngebiet 67,3 % des ischämischen Striatum, in der Ebene von Bregma 0,1 mm sogar 84,5 % (Diagramm 5.2.5.).

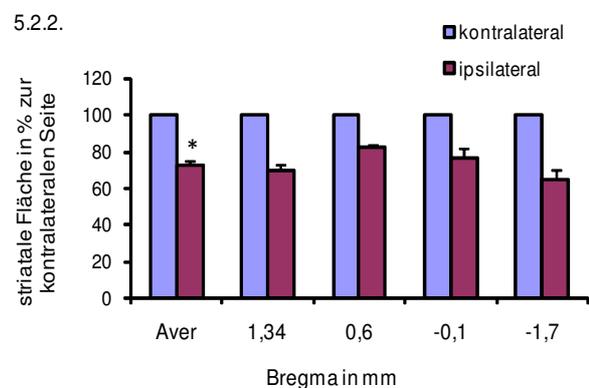
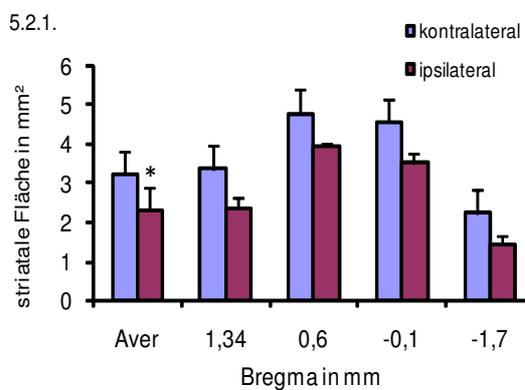


Diagramm 5.2.1. demonstriert die Gebietsgröße des nicht-läsionierten versus des läsierten Striatum in mm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ . Diagramm 5.2.2. gibt den prozentualen Größen-Vergleich des Map2/NeuN- markierten ischämischen Striatum in Relation zum Striatum der kontralateralen Hemisphäre an vier repräsentativen Bregma-Ebenen und im Mittelwert pro Gehirnschnitt wieder, wobei die Größe des Striatum der Kontrollseite mit 100 % festgelegt wurde,  $p < 0,001$ .

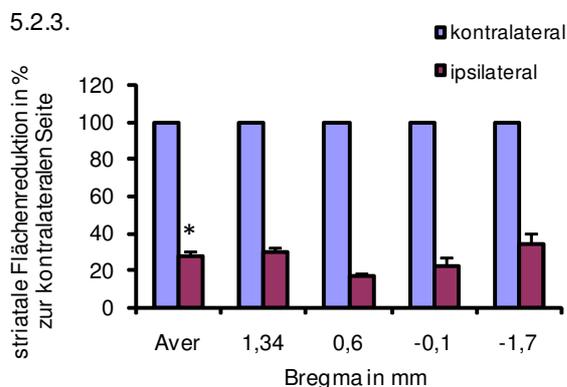


Diagramm 5.2.3. stellt pro Gehirnschnitt die Flächenreduzierung des ischämischen Striatum Map2/NeuN-markierter Präparate pro Gehirnschnitt prozentual dar, wobei das kontralaterale Striatum mit 100 % festgesetzt worden ist ( $p < 0,001$ ).

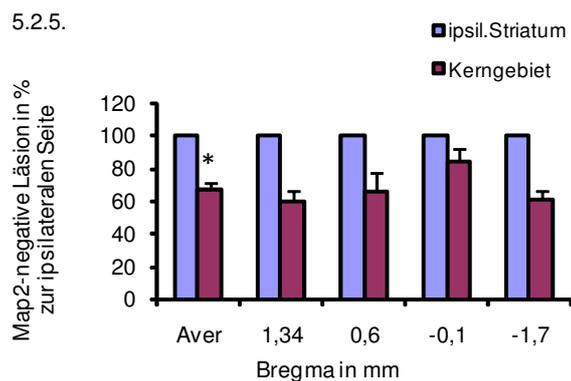
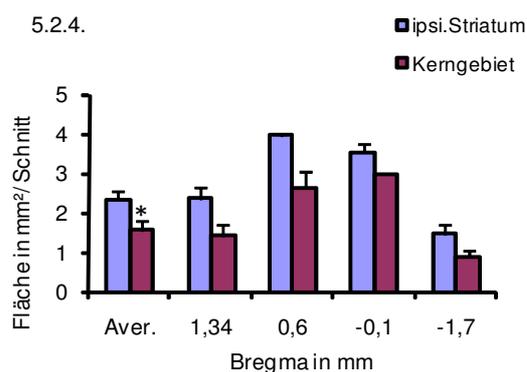


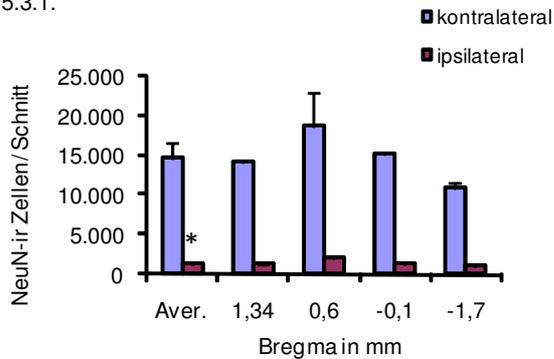
Diagramm 5.2.4. veranschaulicht die Gebietsgröße des ischämischen Kerngebietes innerhalb ischämischen Striatums pro Gehirnschnitt ( $p < 0,001$ ). Diagramm 5.2.5. verbildlicht pro Gehirnschnitt das prozentuale Verhältnis des ischämischen Kerngebietes zum ipsilateralen Striatum, dessen Gebietsgröße mit 100 % bestimmt wurde.

### 5.3. Striatale Zellzählung NeuN-positiver Neurone:

Die Gesamtzahl aller Neurone im ischämischen wie auch im intakten Striatum, wurde mit dem Antikörper NeuN visuell dargestellt. Wie in Punkt 3.3.3. aufgeführt, wurde innerhalb eines umschriebenen Bereiches an jeweils vier definierten Bregmapunkten an striatalen Gehirnschnitten, NeuN-markierte Neurone gezählt und auf die Endgröße des ischämischen und kontralateralen Striatum sowie die mittels Map2-Färbung visualisierten ischämischen Kerngebietes hochgerechnet. Diagramm 5.3.1. zeigt die Verteilung der NeuN-positiven Neurone innerhalb der vier Bregma-Ebenen im ipsi - versus kontralateralen Striatum. Im Durchschnitt pro Gehirnschnitt befanden sich im intakten Striatum pro Versuchstier 14.757 Neurone, im läsierten Striatum wurden 1386 Neurone bestimmt. Diagramm 5.3.2. stellt graphisch den Anteil überlebender Neurone im ischämischen in Relation zum kontralateralen Striatum dar. Im Mittel haben 9,3 % der NeuN-positiven Neurone die milde fokale Ischämie immunreaktiv überstanden. Diagramm 5.3.3. gibt die Zelldichte NeuN-markierter Neurone im ipsi – und kontralateralen Striatum als Mittelwert sowie innerhalb der vier ausgewählten Bregma-Positionen wieder. Die höchste Dichte im intakten Striatum wurde bei Bregma 1.34 mm mit 5300 Neuronen / mm<sup>2</sup>, die niedrigste Dichte mit 3100 Neuronen / mm<sup>2</sup> in der Ebene von Bregma – 0.1 mm nachgewiesen. Auch im ischämischen Striatum wurde auf der Höhe von Bregma 1.34 mm die höchste und bei Bregma – 0.1 mm die niedrigste Zelldichte immunhistochemisch identifiziert. Das prozentuale Verhältnis der Zelldichte im ischämischen in Relation zum intakten

Striatum, gibt das Diagramm 5.3.4. wieder: Im Durchschnitt beinhaltetete das läsierte Striatum eine relative Zelldichte von 21,3 % im Vergleich zur Gegenseite.

5.3.1.



5.3.2.

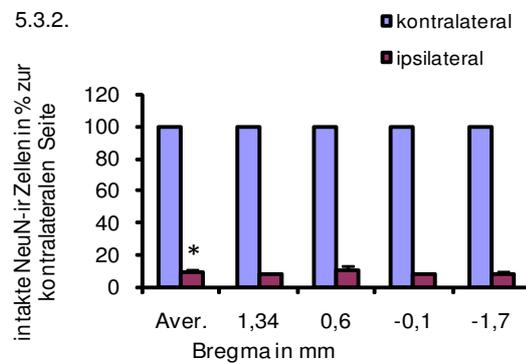
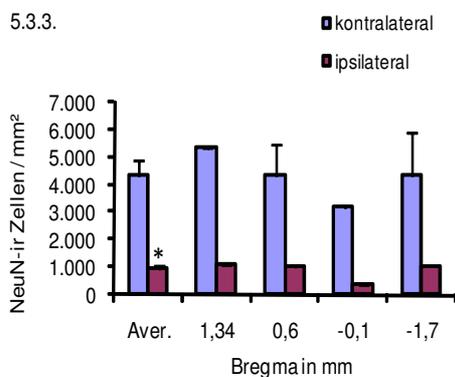


Diagramm 5.3.1. veranschaulicht die Anzahl und Verteilung der NeuN-positiven Neurone pro Gehirnschnitt im Durchschnitt sowie an vier Bregma-Punkten im ischämischen, wie auch im nicht-ischämischen Striatum ( $p = 0,0004$ ).

Diagramm 5.3.2. veranschaulicht den Anteil der überlebenden Neurone pro Gehirnschnitt im ischämischen Striatum in Prozent zum kontralateralen Striatum, das mit 100 % festgesetzt wurde.

5.3.3.



5.3.4.

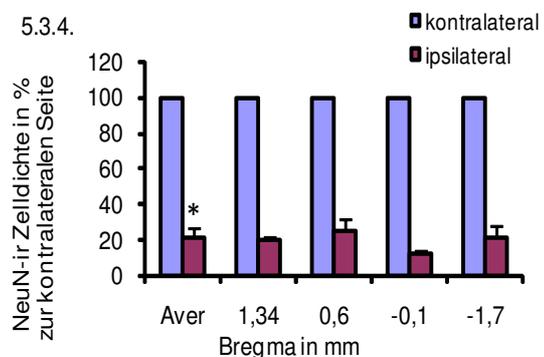


Diagramm 5.3.3. gibt die Anzahl neuronaler Zellen, die immunreaktiv für den Marker NeuN sind, bezogen auf einen mm² im ischämischen und intaktem Striatum pro Gehirnschnitt wieder ( $p = 0,0005$ ). Diagramm 5.3.4. demonstriert die relative Zelldichte positiver NeuN-Neurone pro Gehirnschnitt im ischämischen Striatum in Relation zum Striatum der Kontrollseite, das mit 100 % festgesetzt wurde.

#### 5.4. Striatale Zellzählung NeuN-ir Neurone und Interneurone:

Wie schon in der Einleitung unter dem Abschnitt 1.3.3. „Zelltypen im Striatum“ ausführlich erläutert, werden im Striatum zwei Hauptgruppen von Neuronen unterschieden: Projektionsneurone und Interneurone. Alle Neurone wurden zunächst mit dem nukleären Antikörper NeuN visualisiert, der die Antigene der Zellkerne der Projektionsneurone wie auch die der Interneurone positiv anfärbt. Um die einzelnen Subtypen der Interneurone zu identifizieren, wurde, wie in Abschnitt 3.2.4. näher beschrieben, spezielle Antikörper verwendet. Im intakten Striatum wurde als Durchschnittswert pro Gehirnschnitt eines Versuchstieres 14757 +/- 1624 Neurone gezählt, von denen 496 +/- 35 Neurone als Interneurone immunhistochemisch identifiziert worden sind. Demnach wurden in dem präparierten Gehirnmateriale im Striatum der SV 129 Mäuse im Durchschnitt 97 % Projektionsneurone und 3 % Interneurone nachgewiesen. Im ischämischen Striatum hingegen erscheint das Verhältnis zwischen Projektionsneuronen und Interneuronen gänzlich anders gewichtet: Von durchschnittlich 1386 +/- 248 Neuronen, die nach der milden fokalen Ischämie immunreaktiv waren, sind 366 +/- 19 als Interneurone charakterisiert worden (Diagramm 5.4.1.). Dieses entspricht einem Anteil der Interneurone an der Gesamtzahl der Neurone von 30 +/- 3 %. Die Interneurone zeigten demnach eine größere Resistenz gegenüber ischämischer Schädigung als Projektionsneurone. Diese haben nur zu 7 +/- 1 % die Ischämie intakt überlebt, Interneurone hingegen zu 74 %. Unter den Interneuronen demonstrierten parvalbuminerge Neurone mit einem Zelluntergang von 43 +/- 6 % den weitaus größten Verlust. ChAT-positive Neurone präsentierten mit einer 23 +/- 8 % igen Reduktion ihrer Zellanzahl das zweithöchste Defizit unter den Interneuronen. Mit 12 +/- 7 % untergegangener Zellen folgten die somatostatinerger Interneurone. Calretinin-positive Neurone verzeichneten mit einem Anteil von 106 +/- 15 % keinen Verlust ihrer Neurone durch den ischämischen Prozess (Diagramm 5.4.2 und 5.5.2.).

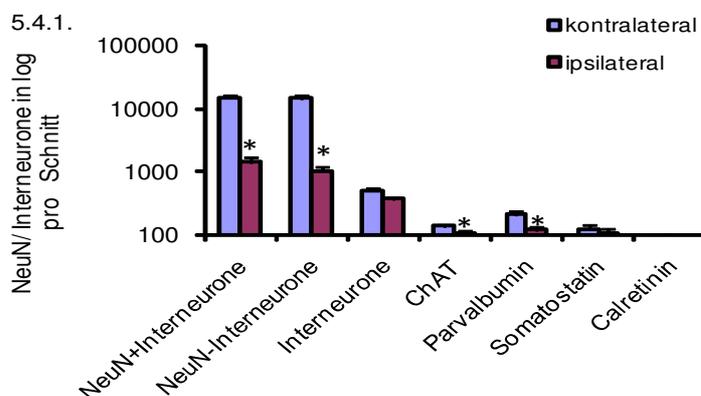


Diagramm 5.4.1. demonstriert das numerische Verhältnis und die Verteilung zwischen der Gesamtheit aller Neurone und den Subtypen der Interneurone im ischämischen wie im intakten Striatum pro Gehirnschnitt. Um trotz der großen Diskrepanz zwischen der NeuN-markierten Neuronenanzahl und die der einzelnen Subtypen der Interneurone alle Werte in einem Diagramm wiedergeben zu können, wurde die Darstellung im Logarithmus als Durchschnittswert der vier Bregma-Ebenen gewählt.

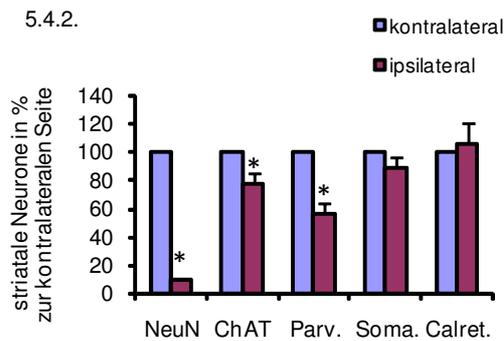


Diagramm 5.4.2. gibt den prozentualen Anteil aller NeuN-markierter Neurone und den der einzelnen Populationen der Interneurone pro Gehirnschnitt als Durchschnittswert der vier Bregma-Ebenen im ischämischen Striatum, bezogen auf das kontralaterale Striatum, das mit 100 % bestimmt wurde, wieder.

### 5.5. Absolute und relative Verteilung sowie Zelldichte der Interneurone im ischämischen Striatum:

Die höchste Resistenz gegenüber der ischämischen Schädigung innerhalb der Interneurone präsentierten calretininerge Neurone mit keinem postischämischen Verlust dieser Neurone im ipsilateralen Striatum. Somatostatinerge Neurone demonstrierten mit einem relativen Überleben von 89 % im ischämischen Striatum zum Vergleich mit der kontralateralen Seite den zweithöchsten Wert, gefolgt von ChAT-positiven Neuronen mit 77 %. Der Zellverlust somatostatinerger Neurone war mit  $p = 0,1$  nicht-signifikant, wohingegen der von cholinergen Neuronen mit  $p = 0,02$  Signifikanz erreichte. Den größten neuronalen Verlust zeigten parvalbuminerge Interneurone mit nur 57 % intakter Neurone im ischämischen zum Vergleich mit dem unversehrten Striatum. Hier wurde mit  $p = 0,0005$  ebenfalls eine Signifikanz nachgewiesen. (Diagramm 5.5.2.).

In Diagramm 5.5.1. ist die Verteilung der verschiedenen Interneurone im ipsi- versus kontralateralen Striatum dargestellt. Dabei präsentierten parvalbuminerge Neurone im ischämischen Striatum mit durchschnittlich  $119 \pm 14$  Neuronen pro Gehirnschnitt und einer Dichte von  $46 \pm 4$  Neurone /  $\text{mm}^2$ , die größte Subpopulation unter den Interneuronen. Die

zweitgrößte Gruppe bildeten somatostatinerge Neurone mit 107 +/- 21 Zellen und einer Zelldichte von 37 +/- 6 Neurone / mm<sup>2</sup>, den dritthöchsten Anteil nahmen cholinerge Neurone mit 103 +/- 12 Neuronen pro Gehirnschnitt und einer Zelldichte von 33 +/- 3 Neuronen / mm<sup>2</sup> im ischämischen Striatum ein. Die eindeutig kleinste Subpopulation im ischämischen Striatum waren mit 38 +/- 6 Neuronen und einer Dichte von 16 +/- 3 Neuronen / mm<sup>2</sup> calretininerge Interneurone (Diagramm 5.5.3.). ChAT-, Somatostatin- und Calretinin-ir Interneurone zeigen zwar eine geringe, jedoch in keinem Fall eine signifikante Erhöhung der Zelldichte von über 100 % im ischämischen Striatum im Vergleich mit der kontralateralen Seite. Bei signifikanter Schrumpfung (27,7 %) des ipsilateralen Striatum relativiert sich diese scheinbare Erhöhung der Zelldichte. Nur parvalbuminerge Interneurone demonstrieren eine relative Zelldichte von deutlich unter 100 % (83%).

### 5.5.1. Zelldichte der Interneurone im intakten Striatum:

Wie in Diagramm 5.5.3. graphisch dargestellt, waren die mit Abstand am häufigsten vorkommenden Interneurone auch im intakten Striatum der Maus pro Gehirnschnitt mit einer durchschnittlichen Zelldichte von 55 +/- 5 Neuronen / mm<sup>2</sup> diejenigen, die neben GABA auch Parvalbumin exprimierten. Somatostatinerge Interneurone bildeten wie im ischämischen auch im intakten Striatum die zweitgrößte Population innerhalb der Interneurone mit einer durchschnittlichen Dichte von 34 +/- 5 Zellen pro mm<sup>2</sup>. Es folgten ChAT-positive Interneurone mit einer Zelldichte von 32 +/- 3 Neuronen als Durchschnittswert der vier Bregma-Ebenen. Als kleinste Population wurden schließlich calretininerge Interneurone mit nur 12 +/- 3 Neuronen / mm<sup>2</sup> nachgewiesen.

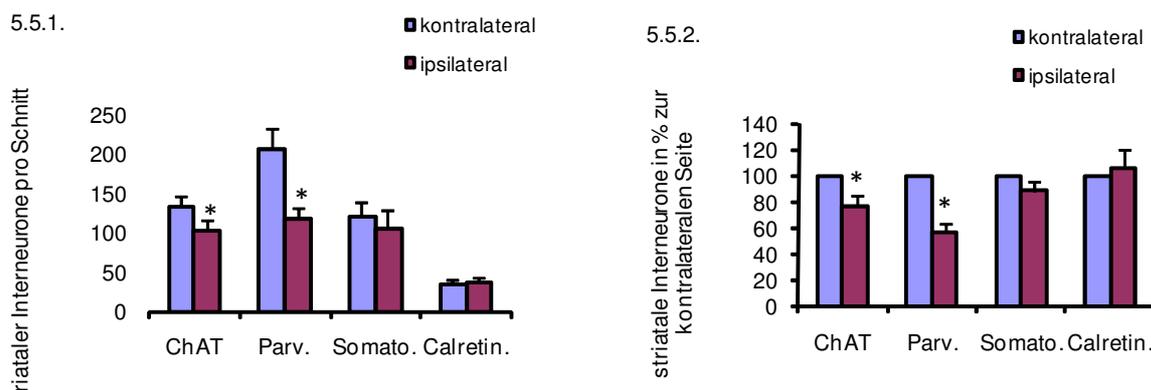


Diagramm 5.5.1. stellt die durchschnittliche Anzahl der verschiedenen Interneurone pro Gehirnschnitt als Durchschnittswert der vier Bregma-Ebenen im ischämischen und intakten Striatum dar. Diagramm 5.5.2. gibt den prozentualen Anteil der intakten Interneurone pro

Gehirnschnitt im ischämischen Striatum, bezogen auf das kontralaterale, das mit 100 % bestimmt wurde, wieder.

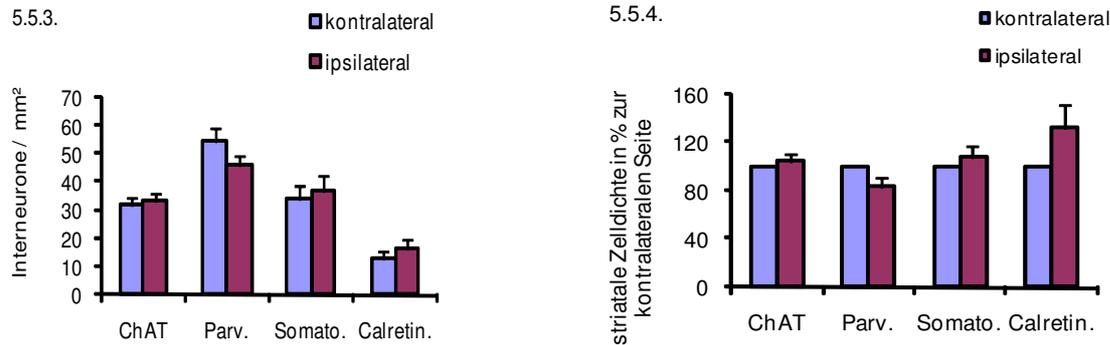


Diagramm 5.5.3. veranschaulicht die graphische Darstellung der Zelldichte der vier Interneuronen-Subtypen pro Gehirnschnitt im ischämischen und intakten Striatum, wobei auch hier als Grundlage der Durchschnittswert der vier Bregmabereiche gilt. Diagramm 5.5.4. stellt die relative Zelldichte der einzelnen Subtypen der Interneurone pro Gehirnschnitt im ischämischen Striatum in Prozent dar, wobei das Striatum der Kontrollhemisphäre mit 100 % festgelegt worden ist.

## 5.6. Absolute und relative Verteilung sowie Zelldichte Chat-ir Interneurone im ischämischen Striatum:

Die Anzahl der cholinergen Interneurone an den vier festgelegten Bregma-Ebenen im Striatum wird in Diagramm 5.6.1. graphisch dargestellt. Bei einem durchschnittlichen, mit  $p = 0,02$  signifikanten Zellverlust von 22,6 % ChAT-positiver Interneurone zeigte sich der größte Zelluntergang im Bereich von Bregma – 0.1 mm, wo mit 92 dieser Neuronen nur 64,4 % die ischämische Schädigung überlebten. Hingegen hat in der Ebene von Bregma 0.6 mm mit einem Überleben von 90,4 % bzw. 160 intakten ChAT-ir Neuronen der geringste Zellverlust stattgefunden (Diagramm 5.6.2.). Der Verlauf der Zelldichte zeigte im ischämischen, gleich dem intakten Striatum, einen Höchstwert im mittleren Striatum in der Höhe von Bregma 0.6 mm mit 45 Neuronen /mm², den niedrigsten Wert nahm der caudale Bereich in der Ebene von Bregma – 1.7 mm mit 28 Neuronen /mm² ein. (Diagramm 5.6.3.). Im ipsilateralen bezogen auf das kontralaterale Striatum konnte mit durchschnittlich 103,8 % eine nicht-signifikante ( $p = 0,69$ ) Erhöhung der Zelldichte nachgewiesen werden (Diagramm 5.6.4.), die durch die ischämisch bedingte Atrophie der striatalen Fläche verursacht wurde (Diagramm 5.2.3.).

### 5.6.1. Absolute und relative Verteilung sowie Zelldichte ChAT-ir Interneurone im intakten Striatum:

Nach den somatostatinerger Interneurone waren mit einer durchschnittlichen Dichte von 32 Neurone /mm<sup>2</sup> cholinerge Neurone am dritthäufigsten innerhalb der Interneurone im intakten Striatum der Maus anzutreffen. Die Verteilung der ChAT-Neurone mit durchschnittlich 133 +/- 14 Neurone verlief gleichförmig der Ausdehnung des dorsolateralen Striatum folgend vom Bregma 1.34 mm mit 124, über Bregma 0.6 mm mit 177 zum Bregma - 0,1 mm mit 143 Neuronen, der geringste Anteil von 72 ChAT-Neurone wurde im caudalen Bereich des Striatum in der Höhe von Bregma - 1,7 mm immunhistochemisch nachgewiesen (Diagramm 5.6.1). Die Zelldichte zeigte einen ähnlichen Verlauf wie im ischämischen Striatum: Der mit 37 Neuronen / mm<sup>2</sup> höchste Wert befand sich im mittleren Striatum in der Höhe von Bregma 0.6 mm, es folgte Bregma - 0.1 mm und - 1.7 mm mit gleicher Zelldichte von 32 ChAT-positiven Interneurone. Die mit 29 Neurone /mm<sup>2</sup> geringste Zelldichte, befand sich auf der Höhe von Bregma 1.34 mm.

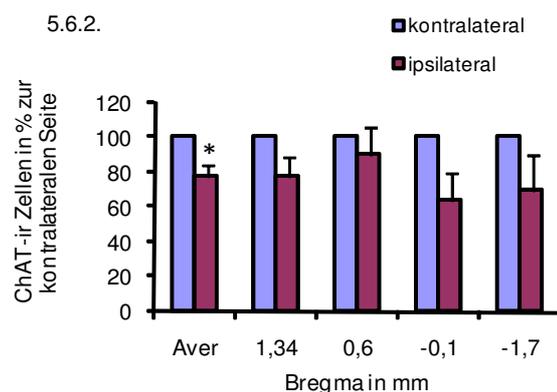
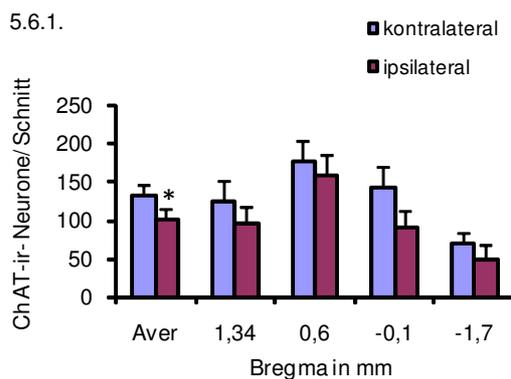


Diagramm 5.6.1. veranschaulicht die Verteilung von ChAT-Interneurone pro Gehirnschnitt im ischämischen wie im nicht-ischämischen Striatum mit  $p = 0,02$ .

Diagramm 5.6.2. stellt das Überleben der ChAT-Neurone pro Gehirnschnitt im ischämischen Striatum in Prozent zum Striatum der kontralateralen Seite, wobei die Zellanzahl hier mit 100 % festgelegt wurde, graphisch dar.

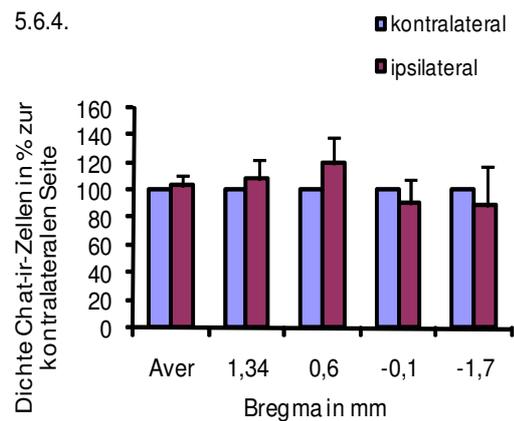
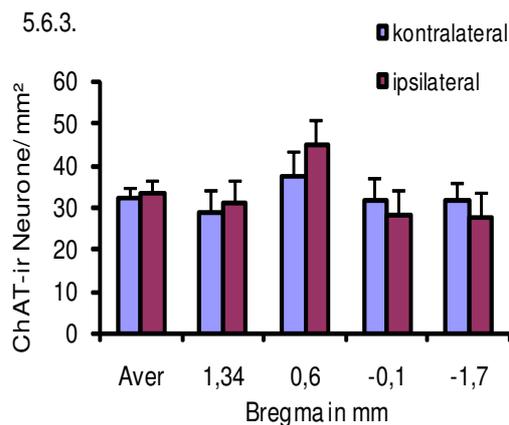


Diagramm 5.6.3. verbildlicht die Zelldichte von ChAT-Neuronen pro Gehirnschnitt im ipsi- und kontralateralen Striatum mit  $p = 0,69$ . Diagramm 5.6.4. veranschaulicht das prozentuale Verhältnis der Zelldichte cholinergischer Interneurone pro Gehirnschnitt im ischämischen Striatum, in Relation zum kontralateralen Striatum, wobei das intakte Striatum mit 100 % festgelegt worden ist.

### 5.7. Absolute und relative Verteilung, sowie Zelldichte parvalbuminergener Interneurone im ischämischen Striatum:

Die graphische Darstellung der Verteilung parvalbuminergener Interneurone pro Gehirnschnitt im ischämischen und intakten Striatum, ist in Diagramm 5.7.1. wiedergegeben. Unter den Interneuronen haben parvalbuminerge Neurone mit nur 57,1 % überlebender Zellen den größten ischämisch bedingten Zellverlust aufgezeigt, der mit  $p = 0,0005$  zugleich Signifikanz erreichte. Im caudalen Bereich des Striatum bei Bregma – 1.7 mm hatten mit einem Anteil von 91,1 % bzw. 97 Neuronen die meisten parvalbuminergen Neurone die milde Ischämie überlebt. Mit 115 Neuronen und einer Überlebensrate von 46,8 % konnte in der Höhe von Bregma 0.6 mm der höchste Zelluntergang immunhistochemisch nachgewiesen werden (Diagramm 5.7.2.). Die höchste Zelldichte parvalbuminergener Neurone wurde im ischämischen Striatum analog der höchsten Überlebensrate dieser Zellen im caudalen Bereich bei Bregma – 1.7 mm mit 61 Neuronen / mm<sup>2</sup> nachgewiesen, die niedrigste mit 35 Neurone / mm<sup>2</sup> im Bereich des höchsten postischämischen Zellunterganges bei Bregma 0.6 mm. Im Durchschnitt betrug die Zelldichte 46 Neurone / mm<sup>2</sup> (Diagramm 5.7.3.). Die Zelldichte im ischämischen Striatum bezogen auf das der intakten Gehirnseite, stellte mit einem Durchschnittswert von 83,8 % und mit  $p > 0,05$  eine nicht- signifikante Reduzierung der Zelldichte durch den ischämischen Prozess dar (Diagramm 5.7.4).

### 5.7.1. Absolute und relative Verteilung, sowie Zelldichte parvalbuminerner Interneurone im intakten Striatum:

Wie in Diagramm 5.5.3. graphisch dargestellt, waren die mit Abstand am häufigsten vorkommenden Interneurone mit einer durchschnittlichen Zelldichte von 55 / mm<sup>2</sup> im Striatum der Maus diejenigen, die neben GABA auch Parvalbumin bildeten. Im Durchschnitt befanden sich 208 +/- 25 Parvalbumin-positive Neurone im dorsolateralen intakten Striatum (Diagramm 5.7.1.). Die Verteilung dieser Interneurone korrelierte hierbei nur bedingt mit der striatalen Ausdehnung mit einem Höchstwert von 321 Neuronen bei Bregma - 0.1 mm. Es folgte der Bereich der größten striatalen Fläche in der Ebene von Bregma 0.6 mm mit 245 Parvalbumin-immunreaktiven-(Pv-ir-) Interneuronen. und das rostralen Areal bei Bregma 1.34 mm mit 179 dieser Neurone. Der niedrigste Anteil mit 107 parvalbuminerner Interneurone war im caudalen Gebiet des Striatum auf der Höhe von Bregma - 1.7 mm vorzufinden. Die durchschnittliche Zelldichte betrug 55 Neurone per mm<sup>2</sup>, der Höchstwert mit 69 Pv-Neuronen, befand sich, analog der höchsten Anzahl, auf der Höhe von Bregma - 0.1 mm im Striatum. In der caudalen Ebene, auf der Höhe des Hippokampus bei Bregma -1.7 mm, fiel der Gradient dieser Zellen nicht wie erwartet ab, sondern präsentierte mit 56 Neuronen pro mm<sup>2</sup> die zweithöchste Zelldichte von parvalbuminergen Neuronen. Ähnliche Werte wurden im rostralen Bereich des unversehrten Striatum in der Höhe von Bregma 1.34 mm mit 49 Neuronen sowie im folgenden Level bei Bregma 0.6 mm mit 50 Neurone / mm<sup>2</sup> nachgewiesen (Diagramm 5.7.3).

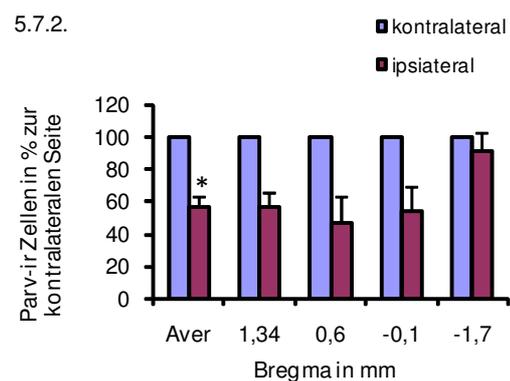
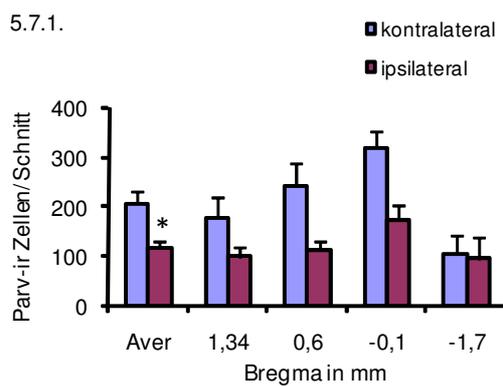


Diagramm 5.7.1. zeigt die graphische Darstellung der Verteilung parvalbuminerner Interneurone pro Gehirnschnitt, sowie des Mittelwertes aller Werte im läsierten wie im nicht-läsierten Striatum mit  $p = 0,0005$ . Diagramm 5.7.2. stellt graphisch in Prozent das Überleben parvalbuminerner Interneurone im ischämischen Striatum dar, wobei die Anzahl der Neurone im Striatum der kontralateralen Hemisphäre mit 100 % festgesetzt wurde.

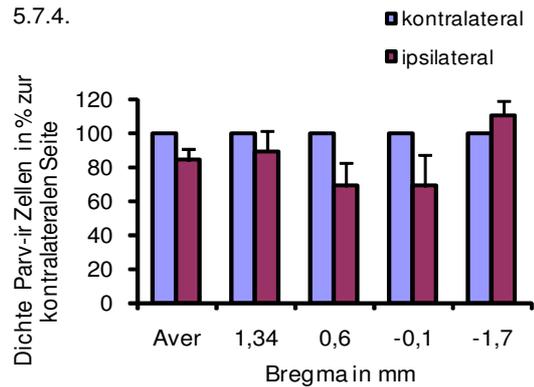
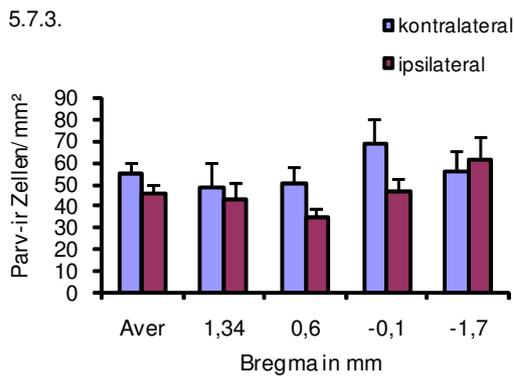


Diagramm 5.7.3. demonstriert die Anzahl parvalbuminerner Neurone bezogen auf einen mm<sup>2</sup> pro Gehirnschnitt im ipsi – versus kontralaterales Striatum mit  $p = 0,07$ .

Diagramm 5.7.4. gibt graphisch das prozentuale Verhältnis der Zelldichte parvalbuminerner Interneurone pro Gehirnschnitt im ischämischen Striatum, bezogen auf das kontralaterale Striatum wieder, wobei das nicht-ischämische Striatum mit 100 % festgelegt worden ist.

### 5.8. Absolute und relative Verteilung, sowie Zelldichte somatostatinerger Interneurone im ischämischen Striatum:

Die Anzahl somatostatinerger Interneurone wird pro Gehirnschnitt an den vier festgelegten Bregma-Ebenen im Striatum in Diagramm 5.8.1. graphisch dargestellt. Mit einem durchschnittlichen Überleben von 88,5 %, bzw. einem mit  $p = 0,15$  nicht-signifikanten Zelluntergang von 11,5 %, demonstrierten somatostatinerge Neurone die zweithöchste Überlebensrate unter den striatalen Interneuronen (Diagramm 5.8.2). Der höchste Zelluntergang zeigte sich im caudalen Areal auf der Höhe des Hippokampus bei Bregma – 1.7 mm mit 54,9 % bzw. 67 Neuronen, der niedrigste mit 199 Neuronen bei Bregma 0,6 mm mit einer 100 % igen Resistenz gegenüber der ischämischen Schädigung. Durchschnittlich wurden 34 Neurone pro mm<sup>2</sup> nachgewiesen, die höchste Zelldichte wurde auf der Höhe von Bregma 1.34 mm mit 56 Neurone und die niedrigste mit 32 Neurone pro mm<sup>2</sup> im Bereich von Bregma –0.1 mm immunhistochemisch identifiziert (Diagramm 5.8.3.). Die Zelldichte der somatostatinerger Neurone zeigte im ischämischen Striatum im Vergleich zum intakten Striatum gering höhere Werte, wobei auch diese mit  $p = 0,4$  keine Signifikanz erreichte: Im Durchschnitt betrug die relative Zelldichte 108,5 % im ischämischen in Relation zum kontralateralen Striatum (Diagramm 5.8.4), wobei die geringe Erhöhung auch hier auf die ischämisch bedingte Schrumpfung der striatalen Fläche zurückzuführen ist (Diagramm 5.2.3.).

### 5.8.1. Absolute und relative Verteilung, sowie Zelldichte somatostatinerger Interneurone im intakten Striatum:

Die zweitstärkste Population unter den Interneuronen bildeten Somatostatin-positive Neurone mit einer Dichte von 34 Neurone pro mm<sup>2</sup> und einer Anzahl von 121 +/-17 Neuronen pro Gehirnschnitt als Durchschnittswert der vier Bregmabereiche. Die Verteilung dieser Interneurone zeigte sich relativ unregelmäßig, ohne Korrelation mit der striatalen Ausdehnung: Die mit Abstand höchste Anzahl mit 198 Neuronen, befand sich im mittleren Teil des Striatum, dem Areal mit der größten striatalen Fläche, auf der Ebene von Bregma 0.6 mm. Es folgte das Gebiet im rostralen Striatum auf der Ebene von Bregma 1.34 mm mit 128 Interneuronen, dann das caudale Gebiet bei Bregma – 1.7 mm mit 122, und schließlich Bregma – 0.1 mm mit 107 somatostatinerger Interneuronen. Die Zelldichte dieser Neurone zeigte ebenfalls einen relativ unregelmäßigen Verlauf mit einem Höchstwert im caudalen Bereich des Striatum in der Höhe des Hippokampus bei Bregma – 1.7 mm mit 69 somatostatinerger Neuronen/mm<sup>2</sup>. Dann folgte das rostrale Gebiet mit 43, sowie das mit der größten striatalen Ausdehnung auf der Ebene von Bregma 0.6 mm mit 42 Neuronen. Die geringste Zelldichte lag bei Bregma – 0.1 mm mit 26 somatostatinerger Interneuronen 7 mm<sup>2</sup>.

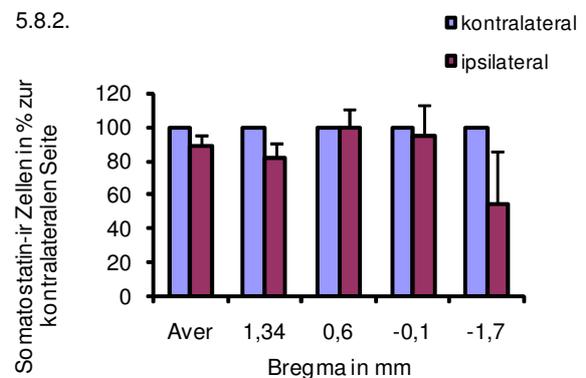
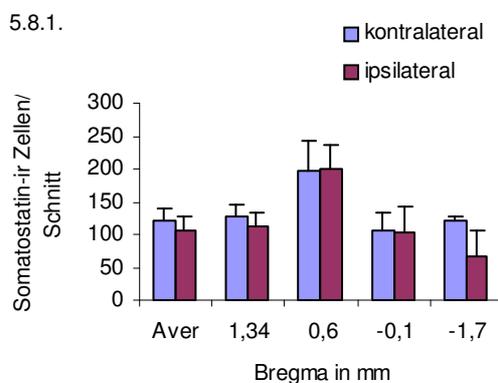


Diagramm 5.8.1. stellt die Verteilung somatostatinerger Interneurone pro Gehirnschnitt an vier repräsentativen Bregma-Ebenen im ischämischen wie im nicht-ischämischen Striatum graphisch dar (p= 0,1). Diagramm 5.8.2. zeigt das relative Überleben somatostatinerger Interneurone pro Gehirnschnitt im ischämischen Striatum in Prozent zum Striatum der Kontrollseite, dessen Neuronenanzahl mit 100 % festgelegt wurde.

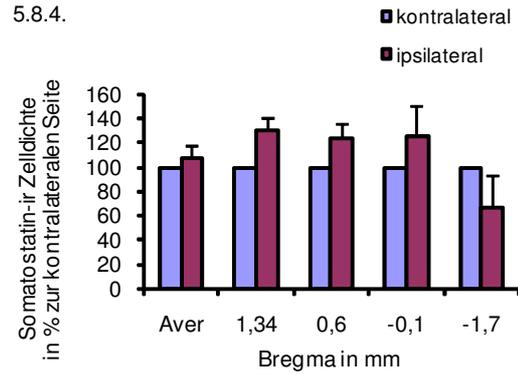
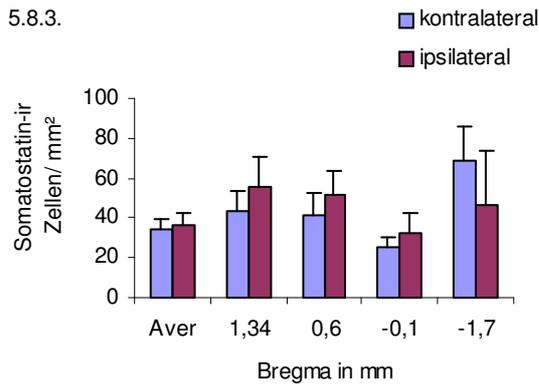


Diagramm 5.8.3. veranschaulicht die Anzahl somatostatinerner Interneurone pro mm<sup>2</sup> an vier repräsentativen Bregma-Bereichen pro Gehirnschnitt im ischämischen wie im nicht-ischämischen Striatum mit  $p = 0,4$ . Diagramm 5.8.4. demonstriert das prozentuale Verhältnis der Zelldichte somatostatinerner Interneurone pro Gehirnschnitt im ischämischen Striatum, bezogen auf das Striatum der Kontroll-Hemisphäre, wobei das intakte Striatum mit 100 % festgelegt worden ist.

## 5.9. Absolute und relative Verteilung, sowie Zelldichte Calretinin-positiver Neurone im ischämischen Striatum:

Die mit weitem Abstand geringste Zellpopulation unter den Interneuronen war im ischämischen und im intakten Striatum mit durchschnittlich 38 Neuronen pro Gehirnschnitt diejenige, die positiv auf Calretinin reagierte (Diagramm 5.6.1.).

Diagramm 5.9.1. veranschaulicht die Verteilung calretininerner Interneurone im ipsilateralen Striatum der Maus an den vier repräsentativen Bregma-Bereichen. Calretinin-positive Neurone zeigten keinen Zelluntergang und damit die höchste Resistenz gegenüber ischämische Prozesse innerhalb der striatalen Neurone, wobei diese Neurone im caudalen Bereich des Striatums auf der Höhe des Hippokampus in der Ebene von Bregma – 1.7 mm mit nur 26 intakter Calretinin-ir Interneuronen bzw. 77,4 % überlebender Neurone besonders vulnerabel auf die ischämische Schädigung reagierten. An den übrigen drei Bregma-Bereichen des ischämischen Striatum, zeigte sich sogar eine geringe Erhöhung der Zellanzahl im Vergleich zur kontralateralen Seite (Diagramm 5.9.2.).

Diese Zellpopulation demonstrierte im Mittel eine Zelldichte von 16 Zellen/mm<sup>2</sup> im geschädigten Striatum. Die Calretinin-ir Neurone präsentierten mit durchschnittlich 32,6 % die höchste relative Zelldichte innerhalb der Interneurone, wobei die Erhöhung der Zelldichte mit  $p = 0,08$  nicht-signifikant war und durch die ischämisch bedingte Schrumpfung der striatalen Fläche erklärbar ist (Diagramm 5.9.4.).

### 5.9.1. Absolute und relative Verteilung, sowie Zelldichte Calretinin-positiver Neurone im intakten Striatum:

Die niedrigste Anzahl mit durchschnittlich 35 Neuronen und einer Zelldichte von 12 Zellen pro mm<sup>2</sup> innerhalb der Interneurone im intakten Striatum pro Gehirnschnitt, spiegelte die Population der calretininergen Neuronen wieder. Der Verlauf der Verteilung folgte nicht der striatalen Ausdehnung: Der höchste Wert zeigte sich bei Bregma – 0.1 mm mit 54 dieser Interneurone, es folgte die Ebene von Bregma 1.34 mm mit 35 Neuronen. In der kleinsten striatale Fläche von Bregma – 1.7 mm wurden 34 Neurone und im Bereich der größten striatalen Fläche auf der Höhe von Bregma 0.6 mm die geringste Anzahl mit 27 Calretinin-ir Interneurone immunhistochemisch nachgewiesen (Diagramm 5.9.1.). Die höchste Zelldichte calretininerner Interneurone zeigte sich im caudalen Bereich in der Höhe von Bregma –1.7 mm, wo 19 dieser Interneurone / mm<sup>2</sup> immunhistochemisch nachgewiesen wurden. Es folgte Bregma – 0.1 mm mit 12 Neuronen, sowie 8 dieser Interneurone pro mm<sup>2</sup> bei Bregma 1.34 mm. Im Bereich der größten striatalen Ausdehnung bei Bregma 0.6 mm wurde die geringste Zelldichte mit 5 Interneurone pro mm<sup>2</sup> aufgezeigt (Diagramm 5.9.3.).

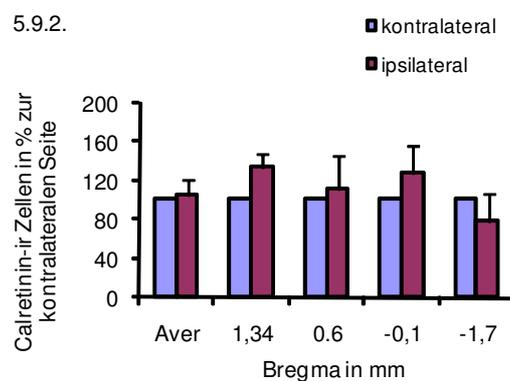
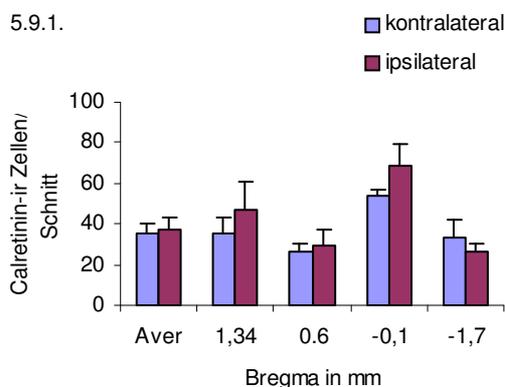


Diagramm 5.9.1. veranschaulicht die Verteilung calretininerner Neurone im ipsi - versus kontralateralen Striatum an vier repräsentativen Bregmapunkten sowie als Durchschnittswert mit  $p = 0,69$ . Diagramm 5.9.2. zeigt das Überleben calretininerner Interneurone an vier repräsentativen Bregma-Bereichen im ischämischen Striatum in Prozent zum Striatum der Kontrollseite, wobei die Neuronenanzahl mit 100 % bestimmt worden ist.

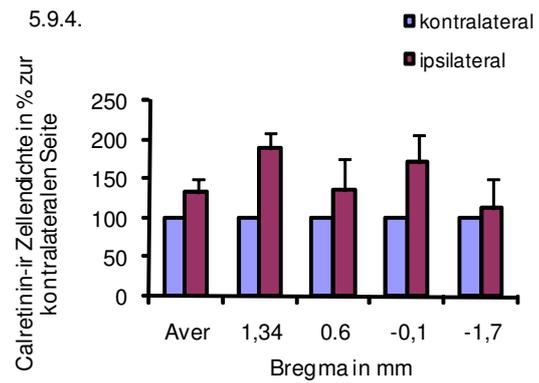
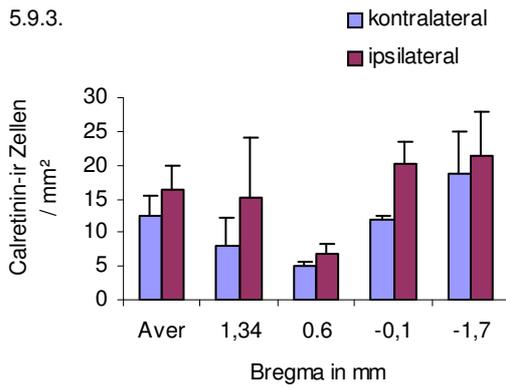


Diagramm 5.9.3. gibt in graphischer Darstellung die Anzahl calretininergere Interneurone pro Gehirnschnitt auf einen mm<sup>2</sup> im ischämischen wie im nicht-ischämischen Striatum an vier Bregmapunkten und im Durchschnitt wieder (p= 0,08). Diagramm 5.9.4. gibt graphisch das prozentuale Verhältnis der Zelldichte calretininergere Interneurone pro Gehirnschnitt im ischämischen Striatum, bezogen auf das kontralaterale Striatum wieder, wobei das nicht-ischämische Striatum mit 100 % festgelegt worden ist.

## 6. Abbildungen:

In den Abbildungen 1 – 6 sind striatale Interneurone der Maus nach einem Überleben von 6 Wochen nach milder fokaler Ischämie dargestellt. Koronare Vibratonschnitte (40µm) wurden mit Antikörper gegen Parvalbumin (Abb. 1), Cholin-Acetyl-Transferase (Abb. 2), Somatostatin (Abb. 3), sowie gegen Calretinin (Abb. 4) immunhistochemisch gefärbt. Repräsentative Abbildungen der kontralateralen Striata (Abb. A, C, E) zeigen im Vergleich zu den Abbildungen der ipsilateralen Striata (Abb. B, D, F) je nach Interneuron-Population deutlich Unterschiede hinsichtlich der Neuronenanzahl und des Dendritenreichtums.

### **Abbildung 1, koronare Vibratonschnitte (40µm):**

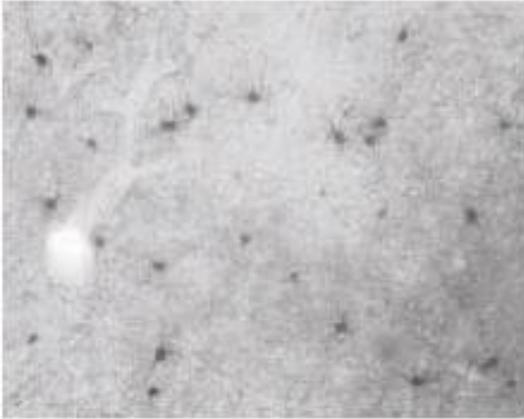
- zu A) Parvalbumin – ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 20 X vergrößert: Deutlich ist der Zell- und Dendritenreichtum im Gegensatz zu Bild B zu erkennen.
- zu B) Parvalbumin – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 20 X vergrößert: Ischämie bedingt zeigen sich deutlich weniger Zellen und Dendriten im Vergleich zu Bild A.
- zu C) Parvalbumin – ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 40 X vergrößert: Deutlich sind hier das gut dargestellte Axon sowie Dendriten zu erkennen.
- zu D) Parvalbumin – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 40 X vergrößert. Hier zeigt sich im ischämischen Striatum nur eine Somatadarstellung, ohne Axon- bzw. Dendriten.
- zu E) Parvalbumin – ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 100 X vergrößert: Deutlich sind hier das gut dargestellte Axon sowie Dendriten zu erkennen.
- zu F) Parvalbumin – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 100 X vergrößert: Im Gegensatz zu Bild E sind die hier dargestellten Neurone ohne Axon und Dendriten und mit wesentlich kleineren Soma.

# Parvalbumin-ir Interneurone

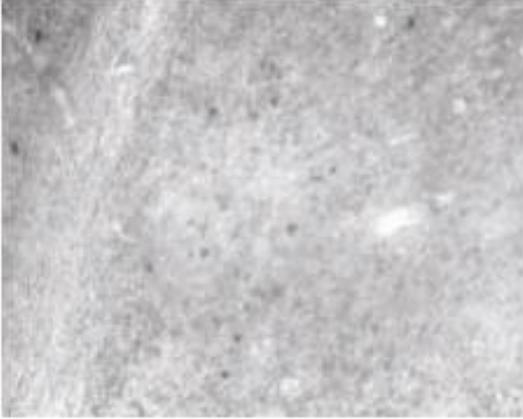
Kontralateral

Ipsilateral

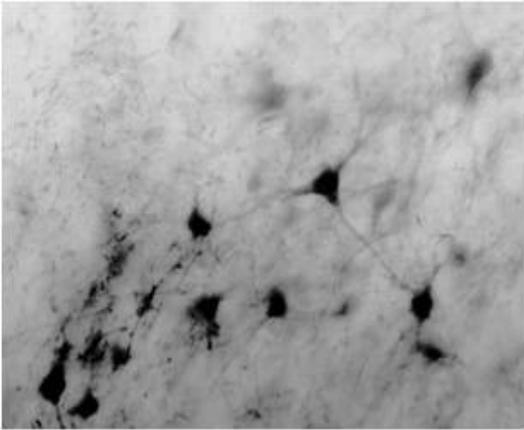
A



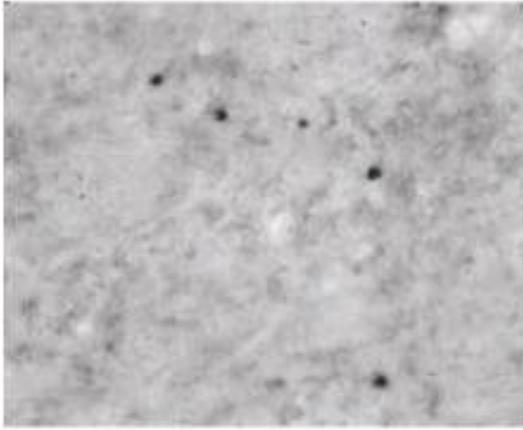
B



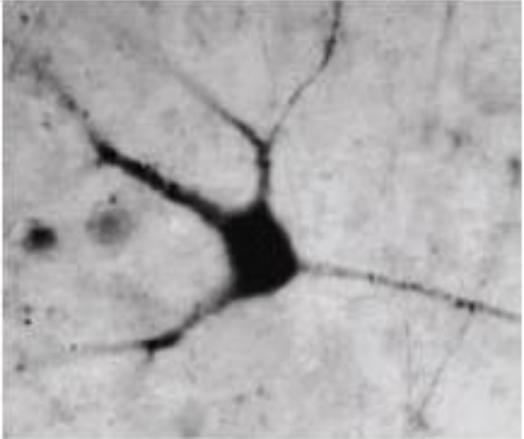
D



C



E



F

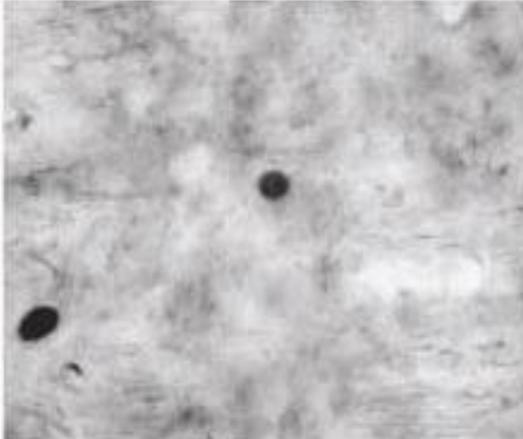


Abbildung 1, Erläuterung siehe Seite 62

**Abbildung 2, koronare Vibratomschnitte (40µm):**

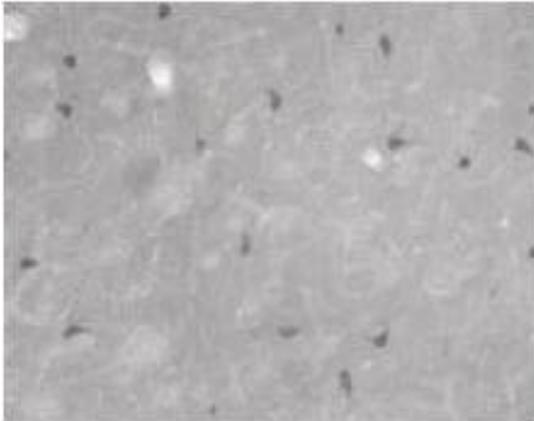
- zu A) ChAT – ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 20 X vergrößert: Auch hier sind im Vergleich zu Bild B vermehrt Axon- und Dendritenformationen und eine höhere Neuronenanzahl zu erkennen.
- zu B) ChAT – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 20 X vergrößert: Ischämie bedingt sind weniger Neurone und verminderte Axon- und Dendritendarstellung zu erkennen.
- zu C) ChAT – ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 40 X vergrößert: Deutlich sind hier Axone und dendritische Verzweigungen zu erkennen.
- zu D) ChAT – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 40 X vergrößert: Im geringeren Ausmaß als im Bild C sind hier dendritische Verbindungen zu sehen.
- zu E) ChAT – ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 100 X vergrößert: Deutlich sind hier Axone und dendritische Verzweigungen zu erkennen.
- zu F) ChAT – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 100 X vergrößert; im Vergleich zu Bild E sind hier Somata mit Axonkegel, jedoch nur angedeutet Dendriten zu erkennen.

**ChAT-ir Interneurone**

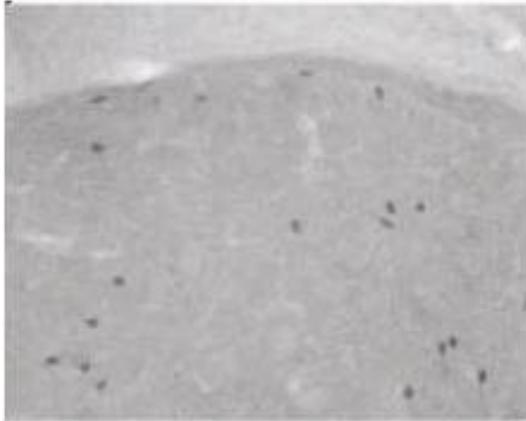
Kontralateral

Ipsilateral

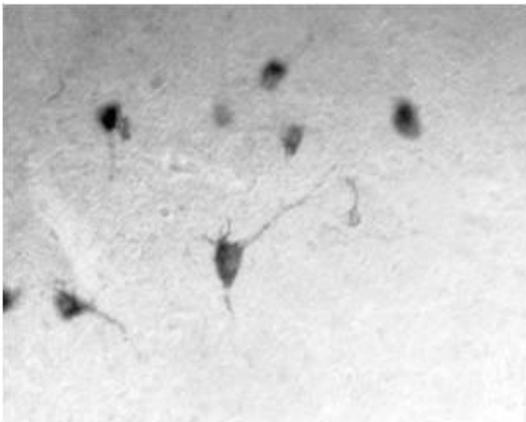
**A**



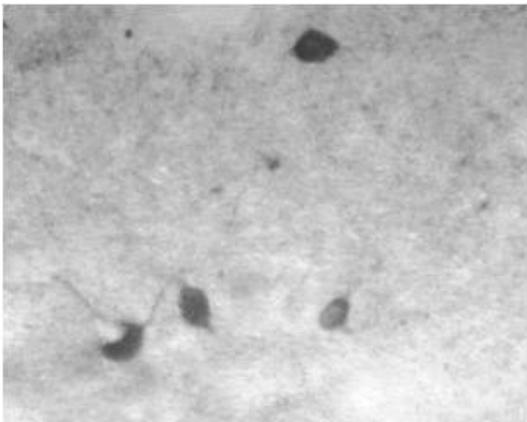
**B**



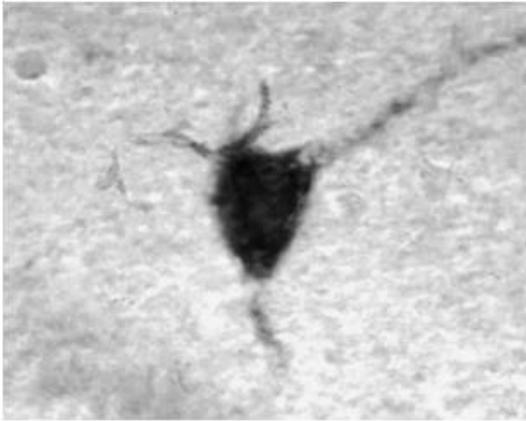
**C**



**D**



**E**



**F**

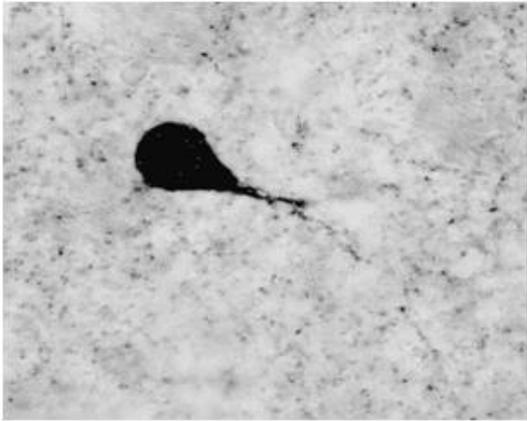


Abbildung 2, Erläuterungen siehe Seite 64

**Abbildung 3, koronare Vibratomschnitte (40µm):**

- zu A) Somatostatin-ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 20 X vergrößert: Hier ist im Vergleich zu Bild B eine vermehrte Axon- und Dendritendarstellung bei fast gleicher Zellzahl zu erkennen.
- zu B) Somatostatin – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 20 X vergrößert: Im Vergleich zu Bild A ist bei annähernd gleicher Zellzahl eine gering verminderte Axon- und Dendritendarstellung zu erkennen.
- zu C) Somatostatin – ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 40 X vergrößert:  
Hier ist im Vergleich zu Bild D eine leicht vermehrte Axon- und Dendritendarstellung bei fast gleicher Zellzahl zu erkennen.
- zu D) Somatostatin – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 40 X vergrößert: Im Vergleich zu Bild C ist bei annähernd gleicher Zellzahl eine leicht verminderte Axon- und Dendritendarstellung zu erkennen.
- zu E) Somatostatin – ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 100 X vergrößert:  
Dieses Neuron zeigt Axone und verzweigte perlschnurartige Dendriten und im Vergleich zum Bild F kaum Veränderungen der Dendriten-Aufzweigungen.
- zu F) Somatostatin – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 100 X vergrößert: Deutlich ist das Soma mit Axon zu erkennen, dendritische Verzweigungen sind im Vergleich zu Bild E nur gering vermindert dargestellt.

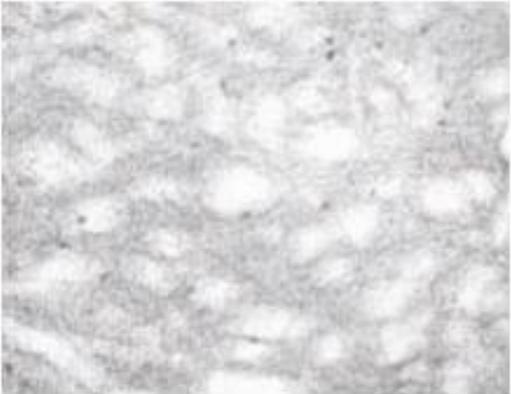
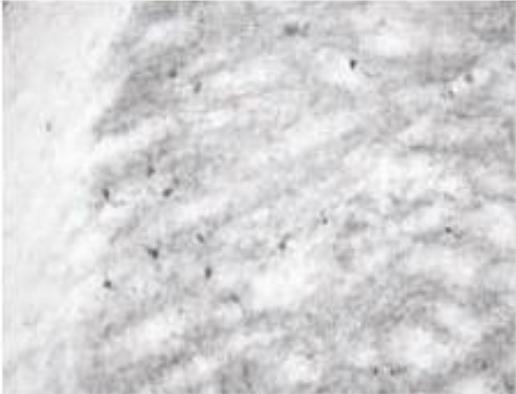
# Somatostatin-ir Interneurone

Kontralateral

Ipsilateral

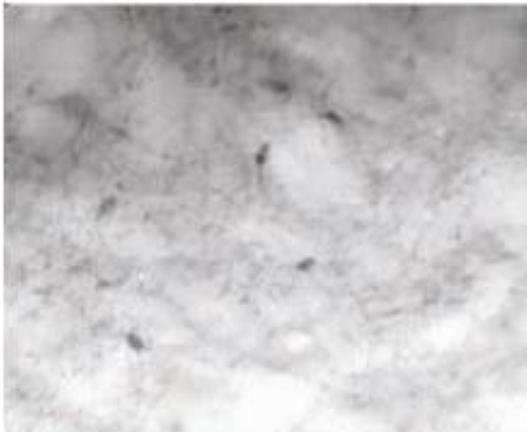
**A**

**B**



**C**

**D**



**E**

**F**

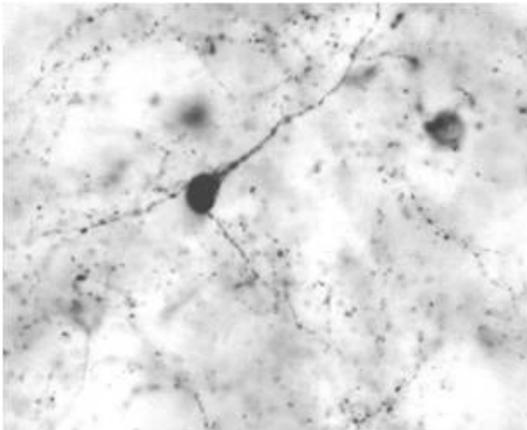
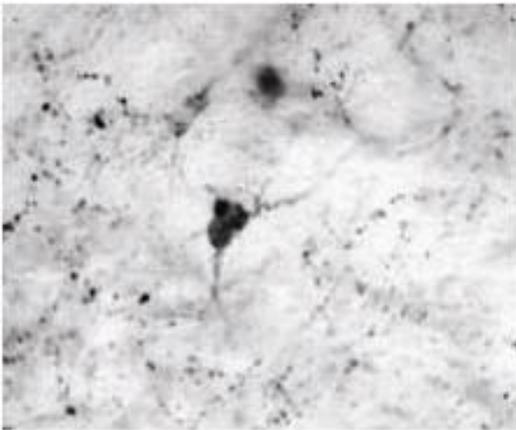


Abbildung 3, Erläuterungen siehe Seite 66

**Abbildung 4, koronare Vibratomschnitte (40µm):**

- zu A) Calretinin-ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 20 X vergrößert: Auffällig sind hier die axodendritische Zell-zu-Zell-Verbindungen.
- zu B) Calretinin – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 20 X vergrößert: Bei dieser Vergrößerung sind weder Axon, noch Dendriten, nur Soma zu erkennen.
- zu C) Calretinin – ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 40 X vergrößert: Deutlich sind die perlschnurartigen, axodendritischen Verbindungen dargestellt.
- zu D) Calretinin – ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 40 X vergrößert: Zu erkennen ist ein Soma mit Axon, jedoch ohne dendritische Verzweigungen.
- zu E) Calretinin – ir Interneurone im kontralateralen Striatum, 100 X vergrößert: Deutlich sind die cluster- und perlschnurartigen, axodendritische Verbindungen unter den Neuronen zu erkennen.
- zu F) Calretinin - ir Interneurone im ipsilateralen Striatum, 100 X vergrößert: Dargestellt ist ein Soma mit langem Axon, jedoch ohne dendritische Verzweigungen.

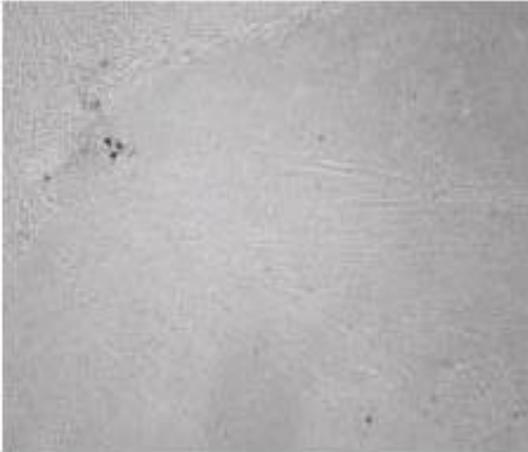
**Calretinin-ir Interneurone**

Kontralateral

Ipsilateral

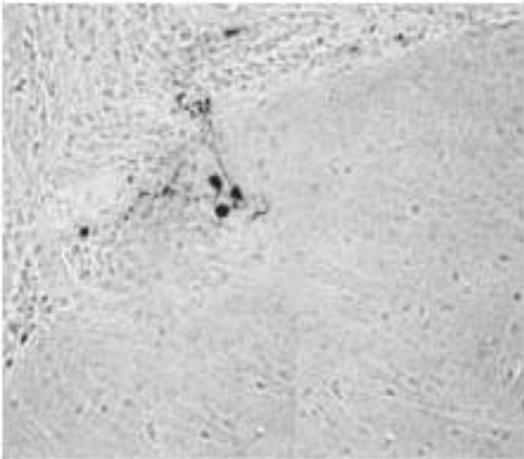
A

B



C

D



E

F

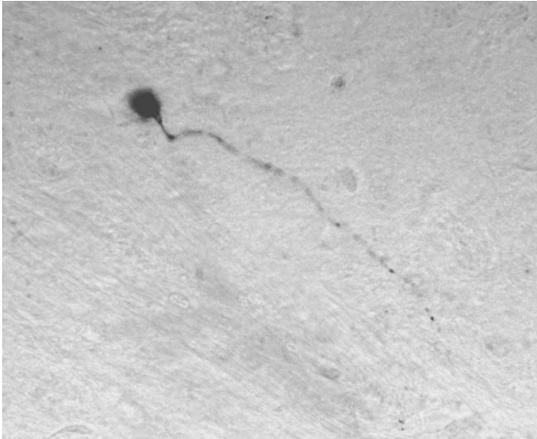
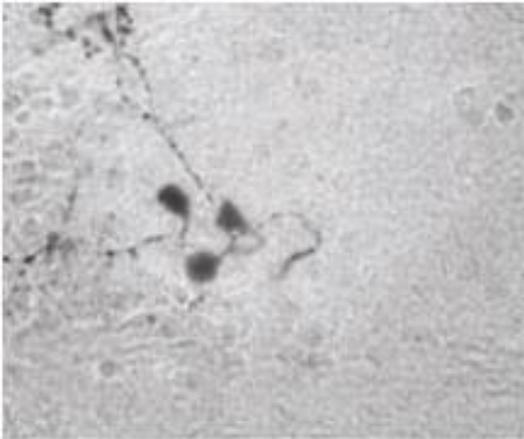


Abbildung 4, Erläuterung siehe Seite 68

### **Abbildung 5:**

Dargestellt sind im Folgenden Übersichtsaufnahmen von koronaren Vibratomschnitte ( $40\mu\text{m}$ ) der Maus nach milder fokaler Ischämie und 6 Wochen Überlebenszeit an den vier Bregma-Ebenen  $\pm 0.2$  mm. Mithilfe des nukleären, neuronalen Antikörper NeuN (Abb. A, C, E), sowie des dendritischen neuronalen Antikörpers Map2 (B, D, F) wurde jeweils auf der linken Hemisphäre durch Ausparung des Färbungsmusters das ischämische Striatum visualisiert.

zu A) NeuN-ir Neurone im Striatum, Bregma  $1.34 \pm 0.2$  mm, 2,5 X vergrößert.

zu B) MAP 2 -ir Dendriten im Striatum, Bregma  $1.34 \pm 0.2$  mm, 2,5 X vergrößert.

zu C) NeuN-ir Neurone im Striatum, Bregma  $0.14 \pm 0.2$  mm, 2,5 X vergrößert.

zu D) MAP 2 -ir Dendriten im Striatum, Bregma  $0.14 \pm 0.2$  mm, 2,5 X vergrößert.

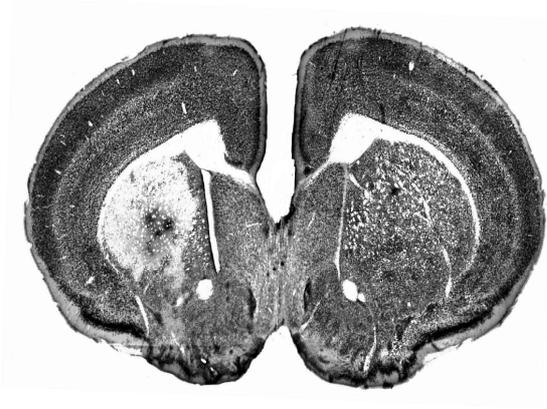
Zu E) NeuN-ir Neurone im Striatum, Normvariante Bregma  $-1.70 \pm 0.2$  mm, 2,5 X vergrößert.

Zu F) MAP2 -ir Dendriten im Striatum, Bregma  $-1.70 \pm 0.2$  mm, 2,5 X vergrößert.

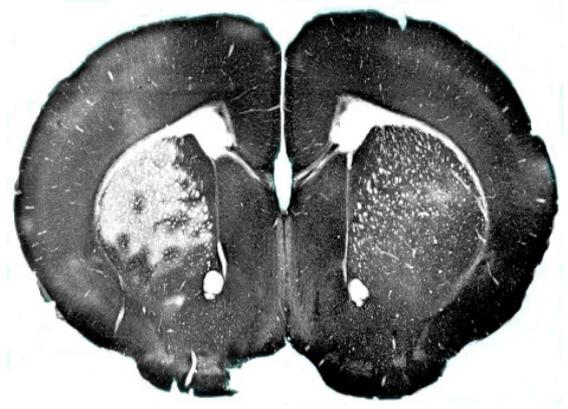
NeuN-ir Neurone

Map2-ir Neurone

A



B



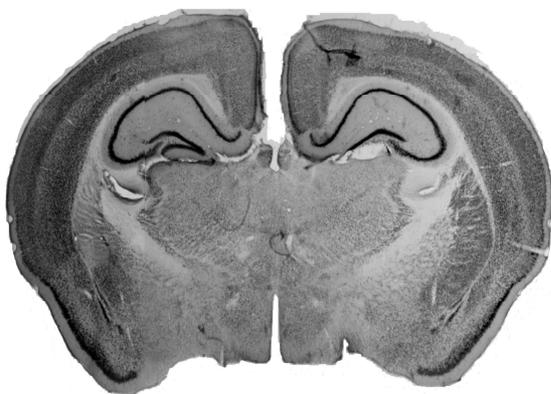
C



D



E



F

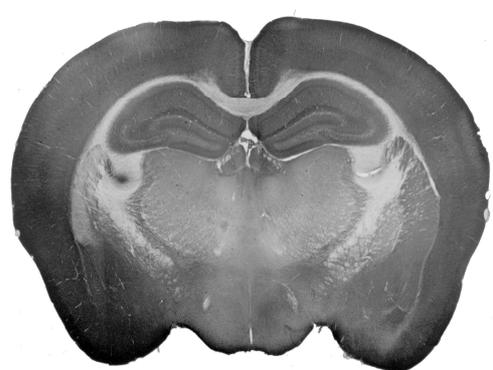


Abbildung 5, Erläuterung siehe Seite 70

### **Abbildung 6:**

Dargestellt sind Hämatoxylin-Vanadium-Fuchsinsäure-Färbungen an koronaren Mikrotomschnitten (5 µm) nach milder fokaler Ischämie mit 6 wöchiger Überlebenszeit.

Zu A) Hämatoxylin-VAF-Färbung des kontralateralen Striatum, 20 X vergrößert: Im Vergleich zu Bild B ist deutlich eine höhere Zellanzahl zu erkennen.

Zu B) Hämatoxylin-VAF-Färbung des ipsilateralen Striatum, 20 X vergrößert: Es imponiert im Vergleich zu Bild A eine mäßige Gliose und ein profunder Neuronenverlust.

Zu C) Hämatoxylin-VAF-Färbung des kontralateralen Striatum, 100 X vergrößert: Im Vergleich zu Bild D ist eine deutlich höhere Zellzahl und keine Gliose dargestellt.

zu D) Hämatoxylin-VAF-Färbung des ipsilateralen Striatum, 100 X vergrößert: Mäßige Gliose (Pfeilmarkierung) bei deutlich verminderter Zellanzahl im Vergleich zu Bild C.

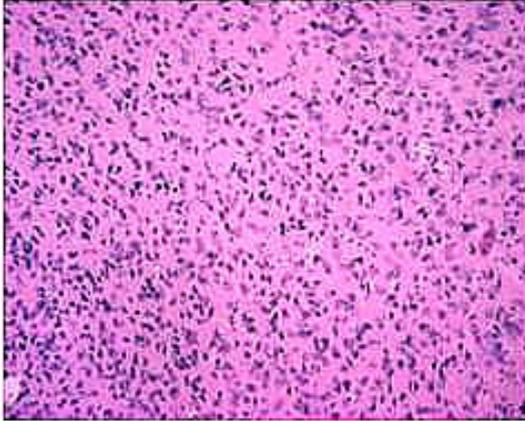
zu E) Hämatoxylin-VAF-Färbung der kontralateralen Substantia nigra, pars compacta, 40 X vergrößert: Hier ist im Vergleich zu Bild F eine mäßige höhere Zellanzahl dargestellt.

zu F) Hämatoxylin-VAF-Färbung der ipsilateralen Substantia nigra, pars compacta, 40 X vergrößert: Im Vergleich zu Bild E ist ein mäßiger Zellverlust sowie eine mäßige Gliose erkennbar.

# Hämatoxylin-VAF-Färbung

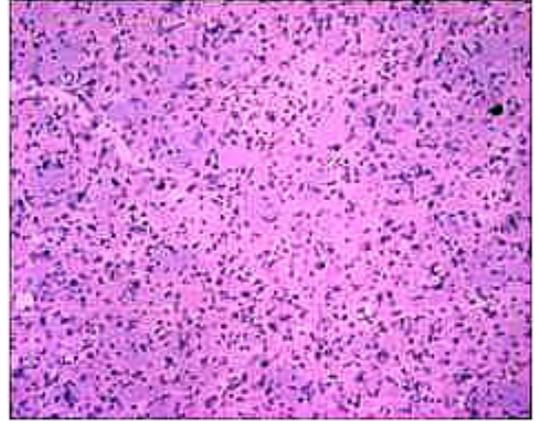
Kontralateral

A Striatum

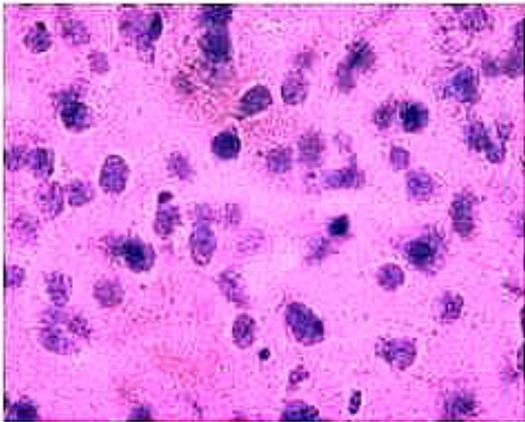


Ipsilateral

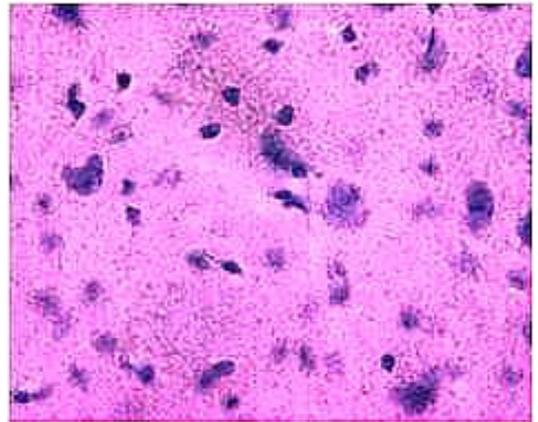
B Striatum



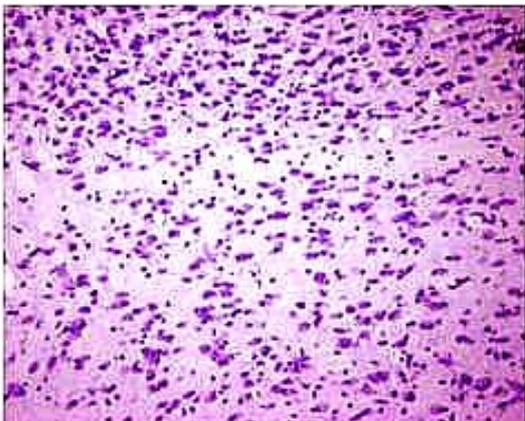
C Striatum



D Striatum



E Substantia nigra



F Substantia nigra

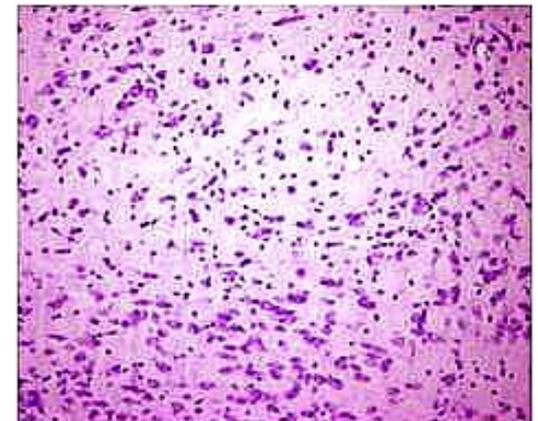


Abbildung 6, Erläuterung siehe Seite 72

## **7. Diskussion**

In unserem Ischämiemodell wurde mit histochemischen und immunhistochemischen Methoden die eingangs aufgestellte Hypothese, wonach nach transienter, milder Ischämie im Striatum ein neuronaler Zellschaden stattfindet, bestätigt. Es wurde nach einer Überlebenszeit von 6 Wochen eine scharfbegrenzte ischämische Läsion nachgewiesen, die größtenteils selektiv im dorsolateralen Striatum mit Aussparung des Kortex lokalisiert war. Zusätzlich konnte eine mäßige Reduktion der Zelldichte in der ipsilateralen Substantia nigra, pars compacta, dargestellt werden. Das ipsilaterale Striatum zeigte dabei eine signifikante Atrophie gegenüber dem Striatum der kontralateralen Hemisphäre. Histologisch zeigte das geschädigte Gebiet einen massiven Zellverlust der Projektionsneurone, der von einer moderaten Gliose begleitet war. Im Gegensatz dazu waren die vier Populationen der Interneurone größtenteils in ihrer Anzahl erhalten. Calretininerge Neurone zeigten die höchste Resistenz gegenüber ischämischer Schädigung, gefolgt von Somatostatin-positiven Neuronen, an dritter Stelle cholinerge und an letzter Stelle parvalbuminerge Neurone. Aufgrund der signifikanten Schrumpfung differierte die Zelldichte der Interneurone nur gering zwischen ischämischen und intakten Striatum. Die vorgestellten Ergebnisse bestätigten somit die in der Zielsetzung genannte weitere Hypothese, dass nach milder fokaler cerebraler Ischämie mit anschließender Reperfusion eine selektive neuronale Vulnerabilität im Striatum der Maus stattfindet.

### **7.1. Zeitliche Bestimmung des neuronalen Zellschadens:**

Es ist bekannt, dass reversible, fokale cerebrale Ischämie im Striatum Neurone nicht uniform, sondern selektiv schädigt (Andersberg G et al 2001). Die striatale neuronale Population ist, wie schon im Abschnitt 1.2.4. erwähnt, heterogen aus zwei Hauptgruppen von Neuronen zusammengesetzt: Den gegenüber ischämischer Schädigung selektiv vulnerablen Projektionsneuronen und den relativ resistenten Interneuronen. Der Zelltod striataler Neurone tritt dabei nicht sofort nach Ischämie ein, sondern schreitet mit der Zeit voran (Endres M et al 1998; Katchanov J et al 2001; Greferath U et al 2002; Araki T et al 1994). Mehrere Reperfuionszeiten sind daher nötig, um experimentell die Dynamik der neuronalen Anfälligkeit in dieser Gehirnstruktur zu erkennen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Überlebenszeitraum von 6 Wochen nach milder fokaler Ischämie im Striatum der Maus gewählt. In der Literatur gibt es keine Einstimmigkeit über den zellulären Untergang von striatalen Interneuronen nach Ischämie. So erbrachte eine Studie den experimentellen Nachweis eines signifikanten Verlustes von striatalen cholinergen Interneuronen (Greferath U et al 2002) nach Ischämie, im Kontrast dazu

wurde in einer anderen Untersuchung eine Erhöhung der cholinergen Zellzahl nach Ischämie demonstriert (Larsson E et al 2001). Weitere Studien mit kurzen Reperfuisionszeiten zwischen 24 h bis 7 Tage nach Ischämie zeigten hingegen keinen signifikanten Zellverlust striataler Interneurone auf (Chesselet M-F et al 1990; Andsberg G et al 2001; Meade CA et al 2000). In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich nach 2 -wöchiger Überlebenszeit nach unserem Schlaganfallmodell (Katchanov et al, 2003) keine signifikante Reduzierung striataler Interneurone, sodass der in dieser Arbeit vorgestellte signifikante Verlust der cholinergen und parvalbuminergen Interneurone mit einer stark verzögerten Zelldegeneration erklärbar ist. Nach der Überlebenszeit von 10 Wochen nach milder fokaler Ischämie in weiteren Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Winter B et al 2005), zeigte sich ein anhaltender, signifikanter parvalbuminerges Zellverlust. Der Zellverlust der cholinergen Interneurone erreichte nun aber keine Signifikanz mehr. Hier könnte neben der zellulären verzögerten Degeneration, ein reversibler, ischämiebedingter Rückgang der Proteinsynthese von AChT die Ursache sein. Auffällig war nach 10 -wöchigem Überleben nach milder, fokaler Ischämie auch die deutliche Reduzierung calretininerges Interneurone, die sich in der vorliegenden Arbeit nicht zeigte. Im Gegenteil, nach 6 -wöchigem Überleben zeigten calretininerges Interneurone nach milder Ischämie keinen Zellverlust. Hierbei könnte es sich entweder um eine stark verzögerte Degeneration dieser Interneurone handeln, oder Differenzen aufgrund der besonderen Methodik (Zellzählung im HPF-Areal bei geringer Neuronenzahl).

## **7.2. Topographie der Läsion:**

In unserem Schlaganfallmodell war die ischämische Schädigung überwiegend im dorsolateralen Areal des rostralen Striatum lokalisiert, der Kortex blieb dabei vollständig ausgespart. Das ischämische Kerngebiet zeigte sich dabei scharf markiert. Auch in weiteren Studien, die eine fokale, milde Ischämie in Nagern durchgeführt haben, zeigte sich das ischämische Gebiet hauptsächlich im dorsolateralen Striatum (Andsberg G et al 2001; Gonzales C et al 1992; Goto S et al 1992). Im caudalen Bereich des Striatum wurde hingegen fast das gesamte striatale Areal läsioniert. Zusätzlich zu der dorsolateralen Infarktion war ein extrafokaler neuronaler Zelltod in der Substantia nigra zu erkennen. Im Bereich der ipsilateralen Substantia nigra, pars compacta, ist eine deutliche Reduzierung der Zelldichte im Vergleich zu der Kontrollseite festgestellt worden ist, diese könnte aufgrund synaptischer Verbindungen, den nigrostriatalen Projektionen, postischämisch durch transneuronalen und transsynaptischen Prozesse verursacht worden sein (Garcia et al 1978; Nakano et al 1990; Shima et al 1999).

### **7.3. Atrophie der ischämischen Hemisphäre:**

Das striatale Gebiet wurde in der läsierten und der intakten Hemisphäre wie unter Punkt 5.2. näher beschrieben, an vier repräsentativen koronaren Gehirnschnitten vermessen. An allen vier Bregma-Ebenen umfasste das ischämische Striatum eine geringere Fläche, als im korrespondierenden Areal der intakten Gehirnseite. Im Durchschnitt nahm das ischämische Striatum durch postischämische fibrotische Umbauprozesse des geschädigten Gehirngewebes nur einen Anteil von 72 % der Fläche, verglichen mit dem intakten Striatum ein. Aufgrund der signifikanten Schrumpfung erklären sich die nicht- signifikanten Erhöhungen der Zelldichte des ipsilateralen Striatum im Vergleich zur kontralateralen Seite bei den Somatostatin -, ChAT- und Calretinin-ir Interneuronen. Die Atrophie der ischämischen Gehirnseite ist dabei zeitabhängig, wie folgende Veröffentlichungen bewiesen haben: In den ersten postischämischen Tagen zeigte sich zunächst Ödem-bedingt eine Zunahme des Infarktolumens (Renolleau S et al 1998; Chiamulera C et al 1993). Erst ab dem 7. Tag nach dem ischämischen Ereignis wurde eine Reduzierung der läsierten Gehirnseite, die über die Zeit zunahm, nachgewiesen. (Renolleau S et al, 1998; Chiamulera C et al, 1993; Andberg G et al, 2001). Ab dem 14. Tag erreichte die Atrophie der ischämischen Gehirnseite im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre in den meisten Fällen Signifikanz: So charakterisierte Chiamulera C (1993) nach 60 minütiger Okklusion der MCA im Striatum von Mäusen am 14. postischämischen Tag eine signifikante Reduzierung der läsierten Hemisphäre, die bis zum 21. Tag weiter progressiv zunahm. Renolleau S (1998) demonstrierte nach 3 monatiger Reperfusionzeit im Striatum von Ratten nach einer 60 – 90 minütigen unilateralen cerebralen Ischämie ipsilateral eine signifikante Schrumpfung der Gehirnfläche. Auch die Arbeitsgruppe von Nedergaard M et al (1987) stellte nach fokaler Ischämie in Ratten am 27. postischämischen Tag lichtmikroskopisch, ohne explizite Erfassung der Gehirnflächen, eine deutliche Reduzierung der ischämischen Hemisphäre fest. Ebenso zeigte sich in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe nach milder Ischämie und 10 wöchiger Überlebenszeit eine signifikante Gewebeschrumpfung des ipsilateralen Striatum.

### **7.4. Verteilung der Interneurone im intakten Striatum:**

Die mit Abstand am häufigsten vorkommenden Interneurone waren diejenigen, die neben GABA auch Parvalbumin exprimierten. Somatostatinerge Neurone bildeten die zweitgrößte Subpopulation innerhalb der Interneurone im intakten striatalen Areal, Chat - positive Neurone erreichten den dritthöchsten Wert in der Zelldichte, und als kleinste Population wurden schließlich calretininerge Interneurone immunhistochemisch nachgewiesen. Bemerkenswert ist dabei, dass Calretinin- ir Interneurone in drei der vier Bregma-Bereichen im

ischämischen Striatum in gering erhöhter, nicht-signifikanter Anzahl im Vergleich zur kontralateralen Seite nachzuweisen waren. Bei ebenfalls nicht-signifikanter Erhöhung der Zelldichte dieser Interneurone und Hinzuziehung der striatalen, ipsilateralen Gewebeschrumpfung, erklärt sich teilweise diese Dichte-Erhöhung dieser Zellen. Theoretisch denkbar wäre jedoch auch eine Ischämie-induzierte Neurogenese oder durch postischämische Astrozytenaktivierung erhöhte NFG-Produktion, die neben einer Steigerung der mRNA für ChAT und TrKA- Proteine (Larsson et al 2001) auch eine solche für Calretinin verursachen. Folgearbeiten wären notwendig, um eine mögliche Neurogenese immunhistochemisch zu bestätigen, z.B. mit BrdU- Färbungen nach 4 wöchigen täglichen BrdU- Injektionen. Fraglich ist natürlich, ob die Maus dabei das optimale Untersuchungsobjekt ist, da hier nur wenige Calretinin- ir Interneurone physiologisch im Striatum vorkommen. Folgearbeiten unserer Arbeitsgruppe nach einem 10 wöchigen Überleben nach milder Ischämie zeigten dagegen eine signifikante Reduzierung dieser Interneurone. Möglich ist ebenso, wie schon erwähnt, eine stark verzögerte, Ischämie-induzierte Zelldegeneration calretininerg Interneurone. In der Studie von Wu (Wu Y, Parent A, 2000), in der die Zelldichte von calretininergen, somatostatinergen und parvalbuminergen Interneuronen im Striatum der Ratte, des Primaten und des Menschen immunhistochemisch nachgewiesen worden sind, waren bei der Ratte innerhalb der Interneuronen ebenfalls parvalbuminerge Interneurone als größte Subpopulation anzutreffen. Im Gegensatz dazu, waren bei den Menschen und mehr noch bei den Primaten calretininerge Neurone weitaus häufiger im Striatum vorzufinden. Übereinstimmend mit der Studie von Wu et al im Jahr 2000, wonach die Zelldichte Calretinin-, Parvalbumin- und Somatostatin-ir Interneurone beim Menschen eine homogene Verteilung entlang der rostrocaudalen Ausdehnung des Striatum aufwies, zeigte sich im intakten Striatum der Maus nur bei ChAT-positiven Interneuronen ein solches Verteilungsmuster (Wu et al 2000). In der vorliegenden Arbeit präsentieren parvalbuminerge Interneurone die zweithöchste, somatostatinerge und Calretinin-positive Interneurone sogar die höchste Zelldichte im caudalen Bereich des Striatum. In dieser Arbeit wurde im läsierten Striatum die Zelldichte parvalbuminerg Interneurone in Relation zum kontralateralen Striatum mit ca. 84 % als die niedrigste unter den Interneuronen nachgewiesen. Alle übrigen interneuronalen Subpopulationen präsentierten in der relativen Zelldichte Werte über 100 %, bei signifikanter Gewebeschrumpfung relativiert sich jedoch diese scheinbare Erhöhung.

## **7.5. Selektive neuronale Vulnerabilität im Striatum:**

Der neuronale Verlust präsentierte sich nach unserem Ischämie-Modell im dorsolateralen Striatum nicht uniform, vielmehr unterscheidet sich die Vulnerabilität innerhalb der neuronalen Population. Dabei gehören das Striatum sowie der Hippokampus zu den Regionen, in denen Neurone höchst anfällig gegenüber ischämischen Ereignissen reagieren (Andsberg G et al 2001). Es ist hinreichend bekannt, dass im Striatum nur zwei Gruppen von Neuronen existieren, die sogenannten „medium spiny neurons“, die über 90 % aller striataler Neurone stellen, sowie Interneurone (Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A. 2003; Andsberg G et al 2001; Wilson CJ et al 1990). Zunächst zeigten sich in unserem Ischämie-Modell in der striatalen Läsion ein fast kompletter Verlust der Map2-Immunreaktivität und ein profunder Zelluntergang von 91 % der NeuN-positiven Zellen. Alle striatalen Neurone wurden mit dem nukleär-angreifenden panneuronalen Antikörper NeuN erfasst (Lee DR et al 2003). Es wurde in dieser Studie darauf verzichtet, die spiny Projektionsneurone (SPN) durch spezifische Marker wie L-Enkephalin, sowie Neurokinin B zu charakterisieren, da Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits diesbezügliche Untersuchungen durchgeführt haben und eindeutig nach milder Ischämie im Striatum der Maus einen profunden Verlust der L-Enkephalin- sowie Neurokinin B- Immunreaktivität nach 3 bzw. 14 tägiger Reperfusionzeit festgestellt worden ist. L-Enkephalin repräsentiert dabei einen Cotransmitter der Projektionsneurone mit dem Projektionsziel laterales Pallidum (Typ 1 der Projektionsneurone), und Neurokinin B einen Marker für Projektionen in das mediale Pallidum und der Substantia nigra. (Typ 2 der Projektionsneurone). Der gleichmäßige Verlust der L-Enkephalin- sowie Neurokinin B- Immunreaktivität nach milder Ischämie legt die Vermutung nahe, dass es keine Unterschiede hinsichtlich der Vulnerabilität zwischen Typ 1 und 2 der Projektionsneurone gibt (Katchanov et al, 2003). Von der Gesamtzahl der NeuN-markierten Neurone wurde im Weiteren die Gesamtsumme der Interneurone subtrahiert, und so die tatsächliche Anzahl der Projektionsneurone ermittelt. In weiteren immunhistochemischen Untersuchungen wurden Interneurone durch immunhistochemische Färbungen mit dem korrespondierenden Antikörper identifiziert und quantifiziert. Es ist durch zahlreiche Studien bestätigt, dass im Striatum besonders die spiny Projektionsneurone zum ischämischen Zelltod neigen, während striatalen Interneurone größtenteils resistent gegenüber dem ischämischen Insult sind (Andsberg G et al 2001; Larsson E et al 2001; Kokaia Z et al 1998). Übereinstimmend mit diesen Erkenntnissen, sind in unserem Ischämie-Modell durch den ischämischen Prozess die Mehrheit der Projektionsneurone (ca. 93 % der SPN) untergegangen, hingegen Interneurone überwiegend den Insult überlebt haben (ca. 74 % der Interneurone). Dabei beträgt im intakten Striatum der Anteil

der Interneurone an der Gesamtzahl der Neurone 3,4 %, im ischämischen Striatum hingegen 26 %. Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass Interneurone zwar teilweise signifikant durch die ischämische Schädigung reduziert worden sind, jedoch bei weitem nicht die gleiche Vulnerabilität der Projektionsneurone gegenüber ischämischen Ereignissen erreicht worden ist. In histochemischer Hämatoxylin-Vanadium-Fuchsin-Färbung konnte zudem im ipsilateralen Striatum eine die gesamte ischämische Läsion betreffende mäßige Gliose dargestellt werden. Bestätigt wird diese Erscheinung durch Studien unserer Arbeitsgruppe, in denen nach milder Ischämie in der Maus autoradiografisch eine Zunahme der peripheren Benzodiazepinrezeptoren vom 10. Tag bis zur 6. Woche im gesamten ipsilateralen Striatum festgestellt worden ist, und dieses als Aktivierung der Mikroglia interpretiert worden ist (Katchanov J et al 2003).

#### **7.6. Selektive Resistenz striataler ChAT-positiver Neurone:**

In unserem Ischämiemodell zeigten ChAT-positive Interneurone nach parvalbuminergen Neuronen den zweithöchsten Zellverlust von 23 %. Damit demonstrierten diese Interneurone zwar eine signifikante Reduzierung ihrer Zellanzahl, sie zeigten jedoch eine viel geringere Vulnerabilität durch den ischämischen Prozess als Projektionsneurone. Der Zelluntergang ereignete sich hierbei auf allen vier Bregma-Ebenen gleichmäßig. Das Ausmaß der Schädigung korrelierte dabei mit der Ausdehnung des ischämischen Kerngebietes: Der höchste Zellverlust wurde im Bereich des größten ischämischen Kerngebietes in Höhe von Bregma – 0.1 mm nachgewiesen. Eine Ausnahme bildete der caudale Bereich des Striatum bei Bregma – 1.7 mm: Hier zeigte sich der zweithöchste Zellverlust, obwohl das Kerngebiet auf dieser Höhe die geringste Ausdehnung umfasste. Demnach implizierten cholinerge Neurone besonders vulnerabel im caudalen Bereich des Striatum zu sein. Die durchschnittliche Zelldichte im ischämischen Striatum im Vergleich zum Striatum der intakten Hemisphäre ergab mit ca. 104 % eine nicht-signifikante Erhöhung der Dichte ( $p = 0,69$ ). Wird allerdings die Gewebeschrumpfung von 28 % mitberücksichtigt, so erklärt sich die hohe Zelldichte. Übereinstimmend im Punkt des Zellunterganges cholinergischer Interneurone nach Ischämie, zeigte sich das Ergebnis aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe nach einer Reperfusionzeit von 10 Wochen nach milder Ischämie im Striatum der Maus mit einer ca. 20 %, jedoch nicht-signifikanten- Reduktion ChAT-positiver Interneurone (Winter et al, 2005), sowie die Studie von Greferath U. 2002, in der ebenfalls ein signifikanter Zellverlust von ChAT-positiven striatalen Interneuronen, hierbei jedoch nach globaler Ischämie in Ratten, nachgewiesen worden ist. In diesem Experiment trat der Zellverlust verzögert am 8. Tag ein und war mit 96 % ein fast kompletter Zelluntergang ChAT-

positiver Neurone. Interessant ist hierbei, dass sämtliche ChAT-positiven Interneurone in dieser Studie nach Ischämie eine Re-Expression von p<sup>75</sup>-NTR zeigten. Um der Frage nachzugehen, ob cholinerge Interneurone in diesem Experiment nur ihre ChAT-Immunität, nicht aber ihre Vitalität eingebüßt hatten, wurden angrenzende, mit Thionin gefärbte Gehirnschnitte, auf die Morphologie und Größe der ChAT-Neurone überprüft. Auch hierbei zeigte sich am 8. postischämischen Tag ein fast kompletter Zelluntergang cholinergischer Interneurone. Es ist durchaus möglich, dass durch die in dieser Studie durchgeführte globale 60-minütige Karotis-Okklusion ein vielfach schwerer Insult ausgelöst worden ist, der auch einen weitaus höheren Zelluntergang von cholinergen Interneuronen im Striatum der Ratte verursachte, als es die milde, 30-minütige fokale cerebrale Ischämie im Striatum von Mäusen vermochte. Zu bemerken ist zudem, dass von 62 Ratten, an denen diese ischämisch-hypoxische Prozedur durchgeführt worden ist, nur 18 Tiere eine Läsion mittels Thionin-Färbung im Striatum, Cortex und Hippokampus aufzeigten. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass ein Teil der cholinergen Interneurone ihre ChAT-Immunreaktivität eingebüßt hatten und durch die Ischämie-Hypoxie geschrumpft sind (Garcia J.H. et al 1978; Rosenblum W.I. 1997), sodass diese kleiner als die von Greferath U. et al angenommene Zellgröße von durchschnittlich 420 +/- 37 µm waren und somit nicht in die Zellzählung eingegangen sind. Im Gegensatz dazu demonstrierte Larsson E et al 2001 eine signifikante Zunahme cholinergischer Zellen von 38 % im ischämischen Striatum von Ratten nach 30-minütiger globaler cerebraler Ischämie und einer Überlebenszeit von vier Wochen. Ein zusätzliches Experiment mit täglichen BrdU-Injektionen für einen Zeitraum von 4 Wochen vor globaler Ischämie lieferte den Nachweis, dass es sich hierbei nicht um eine Neurogenese handelt. Vielmehr wird vom Autor proklamiert, dass globale Ischämie via erhöhter Freisetzung von „nerve growth factor“ (NGF) durch aktivierte Astrozyten eine erhöhte Expression ChAT-Proteine in cholinergen Neuronen auslöst (Venero JL et al 1996; Cavicchioli L et al 1991). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen waren in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zu früheren Zeitpunkten von 3 Tagen nach milder 30-minütiger fokaler Ischämie mit 44 +/- 2 pro mm<sup>2</sup> im ipsilateralen versus 40 +/- 6 pro mm<sup>2</sup> Neuronen im kontralateralen Striatum keine Reduktion in der Anzahl der überlebenden ChAT-Neurone zu erkennen. Nach 14 tägiger Überlebenszeit wurde nach MCAO mit 42 Zellen /mm<sup>2</sup> im ipsi- versus 45 Zellen /mm<sup>2</sup> im kontralateralen Striatum, eine nicht-signifikante Reduzierung dieser Interneurone nachgewiesen (Katchanov et al 2003), wobei die Neurone hierbei mit einer differentiellen Zählmethode (Zellzählung im HPF-Areal) erfasst worden sind und nur 3 Tiere für die Auswertung zur Verfügung standen. Ebenso wurde in weiteren Studien nach Reperforationszeiten von 24 h bis 14 Tage kein signifikanter Zelluntergang cholinergischer Interneurone nach cerebraler fokaler Ischämie

entdeckt (Andsberg G et al 2001; Goto S et al 1992; Chesselet M-F et al 1990; Meade CA et al 2000). Möglich ist, dass Interneurone zu jenen Zeitpunkten zwar noch immunreaktiv waren, sich jedoch schon im Prozess der Degeneration befanden. Dann könnten diese Daten auch daraufhin deuten, dass hier eine stark verzögerte neuronale Degeneration stattgefunden hat (Greferath U et al 2002; Araki T et al 1994). Weiterhin ist zu bemerken, dass in den Studien von Meade und Goto der Zellverlust nicht explizit quantifiziert, sondern durch „Blickdiagnose“ lichtmikroskopisch festgestellt wurde.

Zusammenfassend kann aus den Daten unserer Arbeitsgruppe und den Ergebnissen dieser Studie festgestellt werden, dass bei den ChAT-immunreaktiven Interneuronen nach milder fokaler Ischämie im Striatum der Maus bis zu einer Überlebenszeit von 3 und 14 Tagen kein Zellverlust stattfindet, nach 6 bzw. 10 Wochen Reperfusionzeit jedoch ein stark verzögerter – nach 6 wöchiger Reperfusionzeit auch signifikanter – Zelluntergang stattgefunden hat. Der zunächst signifikante, dann rückläufige Zellverlust cholinergischer Interneurone könnte Ischämie bedingt, wie schon unter Punkt 7.1. erwähnt, aufgrund eines vorübergehenden Verlustes der Proteinsynthese von AChT sich ereignet haben.

#### **7.7. Selektive Resistenz striataler Parvalbumin - positiver Neurone:**

Parvalbuminerge Interneurone demonstrierten nach milder fokaler Ischämie im ipsilateralen Striatum mit einem signifikanten Zellverlust von ca. 43 % die höchste Vulnerabilität innerhalb der Interneurone. Dabei zeigte sich diese im Vergleich zu der der Projektionsneurone bei weitem weniger ausgeprägt. Trotz des hohen Zellverlustes demonstrierten diese Interneurone im caudalen Bereich des Striatum eine über 90 % ige Resistenz gegenüber ischämischer Schädigung. Parvalbumin-positive Interneurone scheinen demnach eine deutlich geringere Vulnerabilität im caudalen Bereich des Striatum als im übrigen Areal des Striatum zu haben. Ähnliche Daten belegen die Ergebnisse der Studie von Nitsch C et al (1989), jedoch im Hippokampus der Wüstenrennmaus nach kurzer, 7 minütiger globaler Ischämie: Nach einer Überlebenszeit von 28 Tagen wurde keine Abnahme der parvalbuminergen Neurone festgestellt. Gegenteiliges berichtet die Arbeitsgruppe Araki et al (1994) nach 10 minütiger globaler Ischämie im Hippokampus von Wüstenrennmäuse: Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Parvalbumin-ir Neurone. Jedoch ist die längere Okklusionszeit, 10 statt vordem 7 Minuten anzumerken, die bei der Wüstenrennmaus aufgrund vaskulärer Variation einen profunderen Zelluntergang verursachen kann. Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit befindet sich ein Großteil der experimentellen Studien mit Reperfusionzeiten von 24 h bis 7 Tagen. Folgende Autoren demonstrierten einen profunden

parvalbuminergen Zellverlust nach cerebraler Ischämie im Striatum von Rodenten: Meade CA et al 2000; Andsberg G et al 2001; Araki et al 1994; Larsson et al 2001; Gonzales et al 1991; Freund TF et al 1990. Die Unterschiede in der Anzahl überlebender parvalbuminerner Neurone sind weder abhängig von der Spezies, in der die Ischämie ausgelöst wurde, ob Maus, Wüstenrennmaus oder Ratte, noch beeinflusst durch die Art und Dauer der Ischämie, ob fokal oder global, 5 - oder 30 - minütige Ischämie. Auch die Dauer der Reperfusionzeit nimmt in den hier vorgestellten Studien erstaunlicherweise keinen divergierenden Einfluss auf den Ausgang des Zellunterganges: In drei der sechs Fälle, in denen ein signifikanter Zellverlust stattgefunden hatte, war das Untersuchungsobjekt eine Maus, bei der eine Ischämie mit einer Dauer von 5 bis 30 Minuten ausgelöst wurde, dabei handelte es sich um fokale (Andsberg G et al 2001; Gonzales et al 1991) und globale Ischämie (Araki et al 1994). In drei weiteren Fällen ereignete sich ein 30- minütiger Insult in der Ratte als fokale (Meade CA et al 2000) und globale Ischämie (Larsson et al 2001; Freund TF et al 1990). Die Überlebenszeiten variierten dabei von 24 h (Araki T et al 1994; Meade CA et al 2000) bis zu 7 Tagen (Andsberg G et al 2001; Gonzales C et al 1991). Die experimentelle Studie von Larsson E et al (2001) wies dabei drei unterschiedliche Überlebenszeiten auf: Nach 48 h zeigte sich eine 33 %ige Reduktion, nach 7 Tagen ein 38 %iger Zellverlust und nach insgesamt 4 Wochen Reperfusionzeit ging der Zellverlust parvalbuminerner Interneurone auf 24 % zurück. Diese Daten legen nahe, dass 7 Tage nach der Ischämie neben einer irreversiblen Neurodegeneration auch ein gradueller Verlust der Immunreaktivität parvalbuminerner striataler Neurone stattgefunden haben könnte, der im weiteren zeitlichen Verlauf teilweise reversibel war. Besonders in Tierexperimenten, in denen eine globale zerebrale Ischämie ausgelöst worden ist, konnte eine transiente Abnahme der Proteinsynthese während und nach der Ischämie beobachtet werden. Allerdings zeigte bis spätestens 48 h nach Ischämie die Proteinsynthese eine Normalisierung in Zellen, die nicht irreversibel geschädigt worden sind (Dienel GA et al 1980; Thilmann R et al 1986). Im Gegensatz dazu wurde aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hingegen nach milder fokaler Ischämie im Striatum der Maus mit 31 +/- 3 pro mm<sup>2</sup> im ischämischen versus 38 +/- 6 pro mm<sup>2</sup> im intakten Striatum nach drei Tagen sowie mit 38 +/- 3 pro mm<sup>2</sup> versus 44 +/- 3 pro mm<sup>2</sup> (läsioniertes versus intaktes Striatum) nach 14 Tagen ein geringer, nicht-signifikanter Zellverlust parvalbuminerner Interneurone immunhistochemisch nachgewiesen. Wie schon in den vorherigen beiden Abschnitten erläutert, wurden weniger Tiere in das Experiment einbezogen, sowie eine andere Zählmethode benutzt. Bei einem weiteren Experiment unserer Arbeitsgruppe konnte nach einer Überlebenszeit von 10 Wochen jedoch eine signifikante Reduzierung der parvalbumin-positiven Neurone gezeigt werden (Winter et al, 2005). In zwei weiteren Studien

zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Zellzahl parvalbuminerner Interneurone nach cerebraler Ischämie: Nach 30-minütiger MCAo im Striatum der Ratte und 14-tägiger Überlebenszeit wurden 321 +/- 62 parvalbuminerge Neurone im ischämischen sowie 342 +/- 52 im intakten Striatum pro Gehirnschnitt nachgewiesen (Yamada K et al 1995). Keine signifikanten Veränderungen nach Ischämie zeigte auch die Studie von Goto et al (1992) nach 30-minütiger MCAo im Striatum der Ratte mit 60-tägiger Überlebenszeit. Es wurde in dieser Studie jedoch keine explizite Zellzählung, sondern nur lichtmikroskopisch eine Schätzung der Neuronenanzahl durchgeführt.

Zusammenfassend kann aus den Daten unserer Arbeitsgruppe und Ergebnissen dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei parvalbuminergen Interneuronen nach milder fokaler Ischämie im Striatum der Maus mit einer Überlebenszeit von 3 bis 14 Tagen ein geringer, nicht-signifikanter Zellverlust stattfindet, nach 6 bzw. 10 Wochen Reperfusionzeit jedoch ein stark verzögerter signifikanter Zelluntergang stattgefunden hat.

#### **7.8. Selektive neuronale Resistenz striataler Somatostatin-positiver Neurone:**

Somatostatinerge Interneurone demonstrierten mit 12 % einen geringen, nicht-signifikanten Zelluntergang; auffallend war dagegen die hohe Anfälligkeit dieser Neurone gegenüber Ischämie im caudalen Bereich des Striatum mit einem Zellverlust von 55%. Damit imponierten diese Neurone, wie auch cholinerge und calretininerge Interneurone, mit einer höheren Vulnerabilität gegenüber ischämischer Schädigung im caudalen Areal des Striatum. Bezogen auf die Resistenz der somatostatinerger Interneurone, zeigten sich auch die Daten aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe mit einer Überlebenszeit von 10 Wochen nach milder Ischämie im Striatum der Maus; hierbei wurde ein Zellverlust von ca. 5 % nachgewiesen (Winter et al, 2005) Weiterhin übereinstimmend mit den hier erhobenen Daten war die Studie von Uemura Y et al (1990), der eine 10-15 minütige cerebrale globale Ischämie in Wüstenrennmäusen mit 4- und 21-tägiger Überlebenszeit durchführte, sowie die von Meade CA et al (2000), der eine 30-minütige cerebrale globale Ischämie in Ratten experimentell untersuchte. Auch Larsson et al (2001) wies in seinem Experiment im Striatum adulter Ratten nach 30-minütiger transientser Okklusion beider Karotiden und anschließender Reperfusionzeit von 2-, 7- und 28 Tagen keinen signifikanten Verlust somatostatinerger Neurone im Striatum nach. Im Gegensatz dazu demonstrieren zwei Tierexperimente nach cerebraler Ischämie eine moderate signifikante Reduzierung der somatostatinerger Zellen: Andsberg G et al (2001) hat nach 30-minütiger fokaler Ischämie in der C57BL - Maus einen striatalen Zellverlust von 20,1 +/- 3,3 % nachgewiesen, Chesselet M-F et al (1990) demonstrierte eine 30 %ige Reduktion der

Zelldichte nach globaler 5-minütiger Ischämie im Striatum von Wüstenrennmäusen. Die Reperfuionszeit betrug in beiden Experimenten 7 Tage. Kein Zellverlust wurde nach einer Reperfuionszeit von 3 und 14 Tagen im Striatum der Maus nach milder Ischämie in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe immunhistochemisch nachgewiesen (Katchanov et al, 2003). Es ist möglich, dass aufgrund insuffizienter Kollateralisierung des Circulus arteriosus Willisii in Wüstenrennmäusen (Levine S and Sohn D 1969) sowie der 5-minütigen bilaterale Okklusion der A.carotis communis einen größeren ischämischen Zellverlust somatostatinerger Neurone verursachte, als eine unilaterale 30-minütige Okklusion der A.cerebri media in der Maus, die über suffiziente Kollateralisierung des Circulus arteriosus Willisii verfügt. Hingegen wurde jedoch in dem Experiment von Uemura Y et al (1990) trotz doppelter globaler Ischämiedauer im Striatum von Wüstenrennmäusen kein Zellverlust somatostatinerger Neurone aufgedeckt. Ebenso besteht ein Unterschied in der Verwendung der Maus-Stämme: So wurde von Andsberg G et al (2001) ein C57 BL- Maus-Stamm verwendet, in der vorliegenden Arbeit wie auch in Vorarbeiten der eignen Arbeitsgruppe (Katchanov J et al 2003) wurden hingegen Mäuse aus dem SV 129-Stamm experimentell verwendet. Auch Unterschiede in der histologischen Aufarbeitung des Gehirnmaterials könnten zu einem divergierenden Ergebnis beitragen. So wurde in der Studie von Chesselet M-F et al (1990) nur eine 2-stündige Postfixationszeit (im hiesigen Experiment eine 8-stündige) mit 4% igem PFA angewandt. In den Studien von Andsberg G et al (2001) sowie von Chesselet M-F et al (1990) wurden nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, Antikörper gegen Somatostatin zur Detektion somatostatinerger Interneurone verwendet, sondern eine NADPH-Diaphorase-Färbung zur Visualisierung NOS-enhaltender Neurone, durchgeführt. Auch gegen diesen Einwand kann die Studie von Uemura Y et al (1990) eingebracht werden, da dieser ebenfalls eine NADPH-Diaphorase-Färbung zur Identifizierung somatostatinerger Neurone angewandt hatte und keinen signifikanten Zelluntergang entdeckte. Wie die hier aufgezeigten Unterschiede in der Durchführung der jeweiligen Tierexperimente zeigten, konnte weder durch das Modell oder der Dauer der Ischämie, noch durch die verwendete Tierspezies oder der Reperfuionszeit bzw. histologische Färbungsmethode, monokausal die divergierenden Ergebnisse hinsichtlich dem Überleben somatostatinerger Neurone im Striatum von Rodenten, erklärt werden. Eine Ausnahme bildet die kurze Postfixationszeit in der experimentellen Studie von Chesselet M-F et al (1990), die in keiner weiteren Studie aufzuzeigen war, sowie der C57 BL-Mausstamm, der von Andsberg G et al (2001) verwendet worden ist und ebenfalls nicht in anderen, hier vorgestellten Experimenten Anwendung fand.

Zusammenfassend kann aus den Daten unserer Arbeitsgruppe und Ergebnissen dieser Studie gezeigt werden, dass bei somatostatinerger Interneuronen nach milder fokaler Ischämie

im Striatum der Maus mit einer Überlebenszeit von 3 und 14 Tagen kein Zellverlust stattfindet, nach 6 bzw. 10 Wochen Reperfusionzeit jedoch ein stark verzögerter, geringer und nicht-signifikanter Zelluntergang stattgefunden hat

### **7.9. Selektive neuronale Resistenz striataler Calretinin-positiver Neurone:**

In unserer Arbeit zeigten calretininerge Interneurone keinen Zelluntergang nach dem ischämischen Prozess und demonstrierten damit die höchste Resistenz. Im Gegenteil, es wurden im ipsilateralen Striatum sogar eine geringfügig höhere Anzahl sowie eine erhöhte Zelldichte Calretinin-ir Neurone im Vergleich zur kontralateralen Seite vorgefunden. Dieses könnte, wie im letzten Abschnitt erwähnt, auf eine ischämisch induzierte Neurogenese oder Folge einer NFG stimulierten erhöhten Calretinin-Synthese via reaktiver Astrozytenaktivierung hinweisen. Wahrscheinlicher ist jedoch die Erklärung, dass eine relative Zunahme der Zelldichte durch die ischämisch bedingte Atrophie des Striatum stattgefunden hat, da die Gesamtzahl nicht-signifikant erhöht war und in Folgearbeiten unserer Arbeitsgruppe nach einer Überlebenszeit von 10 Wochen sogar eine signifikante Reduzierung dieser Interneurone nachgewiesen wurde (Winter et al, 2005). Wie somatostatinerge und Chat-ir Interneurone, zeigten sich Calretinin-ir Interneurone im caudalen Bereich des Striatum mit einem Zelluntergang von 23 % höchst anfällig gegenüber ischämischer Schädigung. Dieses Phänomen der calretininergen Vulnerabilität nach Ischämie, jedoch im Bereich des Hippokampus wurde auch durch andere Studien bestätigt (Freund TF et al 1993). Übereinstimmend mit den vorgestellten Ergebnissen, zeigte sich die Studie von Katchanov J et al 2003, in der nach 3 und 14-tägiger Überlebenszeit ebenfalls kein Zellverlust im Striatum der Maus nach unserem Ischämiemodell nachgewiesen worden ist. Aufgrund der geringen Zellanzahl wurden calretininerge Interneurone in dieser Studie nicht explizit gezählt. Auch Andsberg et al gelangte 2001 zu ähnlichen Werten im Striatum der Maus nach 30-minütiger Ischämie und einer 7-tägigen Überlebenszeit. Im Kontrast dazu präsentierte eine Studie nach 30-minütiger Okklusion der MCA und einer anschließenden Überlebenszeit von zwei Wochen im Striatum von Ratten einen signifikanten Zellverlust (Yamada K et al 1995). In dieser Veröffentlichung ist die Lokalisation der Läsion und der Zellzählung im Gehirn der Ratte nicht näher benannt worden. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit das postischämische Überleben dieser Interneurone an vier Level im Striatum von Mäusen gemessen und ein Mittelwert errechnet. Daher ist ein Vergleich der Ergebnisse aus beiden Studien unpraktikabel.

Zusammenfassend kann aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe und Ergebnissen dieser Studie festgestellt werden, dass nach einem Überleben von 3 und 14 Tagen, sowie 6 Wochen

nach milder Ischämie im Striatum der Maus keine Reduzierung Calretinin-positiver Interneurone nachgewiesen wurde. Aus Vorarbeiten mit einer Überlebenszeit von 10 Wochen wurde eine signifikante Reduzierung dieser Interneurone im Striatum der Maus nach milder Ischämie nachgewiesen, theoretisch denkbar wäre eine stark verzögerte Zelldegeneration. Aber auch die unterschiedliche Zählweise (HPF-Areal) kann zum divergierenden Ergebnis beigetragen haben (Winter et al, 2005).

## **8. Mögliche Ursache der selektiven neuronalen Resistenz der Interneurone:**

In der Literatur sind zahlreiche Erklärungsmodelle im Hinblick auf die geringere Anfälligkeit der striatalen Interneurone in Relation zu der hohen Verletzbarkeit der striatalen Projektionsneurone gegenüber ischämischer und exzitotoxischer Schädigung zu finden. Es scheint keine alleinige, monokausale Ursache vorhanden zu sein, sondern vielmehr multikausale Faktoren, die der selektiven neuronalen Resistenz striataler Interneurone gegenüber ischämischer Schädigung zu Grunde liegen (Calabresi P et al 2002). Einige Autoren gingen dabei der Frage nach, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen der Re-Expression von p<sup>75</sup>-, „neurotrophin receptor,, (NTR) auf ChAT-positiven Neuronen nach Ischämie und der relativen Resistenz dieser Neurone nach Insult existiert.

### **8.1. P<sup>75</sup>-neurotrophin receptor NTR) und mögliche relative Resistenz ChAT-positiver Neurone:**

Es ist bekannt, dass „nerve growth factor“ (NGF) via zwei Rezeptoren, den hoch affinen Tyrosin-Kinase-Rezeptor (TrKA) und den niedrig affinen p<sup>75</sup>-NTR, neuronales Überleben und Wachstum beeinflusst. Die trophischen Effekte von NGF finden durch TrKA statt, dabei kooperiert p<sup>75</sup>-NTR mit dem TrKA-Rezeptor und unterstützt die NGF-Bindung (Barrett GL et al 2000). P<sup>75</sup>-NTR ist Mitglied der Superfamilie von Todessignal-Molekülen und verursacht Apoptose während der physiologischen Zellentwicklung, in sensorischen und sympathogenen Neuronen, in Zellen des retinalen Ganglion, Oligodendrozyten und einigen Zelllinien (Barrett GL et al 2000). TrKA und p<sup>75</sup>-NTR beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Funktion. So stimuliert niedrige TrKA-Aktivität den p<sup>75</sup>-NTR und Apoptose wird induziert. Während einer Koaktivierung von p<sup>75</sup>-NTR und TrKA, verstärkt p<sup>75</sup>-NTR das TrKA-Signal, welches zur Zelldifferenzierung und Zellüberleben führt, während Apoptose inhibiert wird (Van der Zee CEEM et al 1996; Kaplan DR et al 1997). Während ihrer Entwicklung bilden cholinerge Neurone p<sup>75</sup>-NTR und TrKA-Rezeptoren aus, in ihrer adulten Form ist jedoch nur der TrKA-Rezeptor aufzuweisen (Sobreviela T et al 1994). Eine Besonderheit ist dabei, dass in Strukturen des basalen Vorderhirns in der frühen postnatalen Entwicklung nur TrKA-negative cholinerge Neurone apoptotisch untergehen, während im Neostriatum TrKA-negative und positive cholinerge Neurone sterben (Van der ZEE CEEM et al 1997). Von großer Wichtigkeit ist, dass durch cerebrale ischämische Prozesse eine Re-Expression von p<sup>75</sup>-NTR in cholinergen Interneuronen stattfindet (Kokaia Z et al 1998). Greferath griff im Jahre 2001 die oben gestellte Frage auf und untersuchte im Striatum von Ratten nach globaler Ischämie die Expression von p<sup>75</sup>-NTR auf cholinergen Neurone sowie deren post-ischämisches Überleben. Dabei wurde in

ChAT-positiven Interneuronen, die sich innerhalb der Läsion befanden, eine 100 % ige Expression von p<sup>75</sup>-NTR festgestellt, hingegen keine p<sup>75</sup>-NTR-Immunreaktivität in cholinergen Neuronen außerhalb der Läsion zu erkennen war. Am 8. Tag nach Ischämie wurde ein 96 % iger verzögerter Zelluntergang cholinergischer Neurone im ipsilateralen Striatum nachgewiesen, wobei der Autor die Möglichkeit, dass die cholinergischen Neurone nur ihre ChAT-Immunreaktivität verloren haben, aber dennoch weiter leben, nicht ausschließt. Greferath postuliert dennoch, dass Hochregulation von p<sup>75</sup>-NTR einen degenerativen Prozess und nicht das Überleben cholinergischer Neurone nach Ischämie initiiert.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte eine cerebrale Ischämie im Striatum der Ratte keinen Zelltod cholinergischer Neurone am 7. Tag nach Ischämie, obwohl eine transiente signifikante Zunahme von p<sup>75</sup>-NTR in cholinergischen Neuronen im läsierten Striatum bis zum 2. postischämischen Tag nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu wurde TrKA –Aktivität in cholinergischen Neuronen im läsierten und nicht-läsierten Striatum immunhistochemisch identifiziert, die bis zum 7. Tag Reperusionszeit andauerte. Diese Daten deuten daraufhin, dass eine Kausalität zwischen p<sup>75</sup>-NTR und relativer Resistenz cholinergischer Interneurone gegenüber cerebraler Ischämie möglich ist, nicht aber eine Initiierung von cholinergischem Zelltod durch Ischämie (Kokaia Z et al 1998). Weiterhin wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen selektiver Resistenz striataler Interneurone gegenüber ischämischen und exzitotoxischen Effekten und unterschiedlicher Expression von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten diskutiert.

## **8.2. Glutamat-Rezeptoren und mögliche selektive neuronale Resistenz striataler Interneurone:**

Übereinstimmende Aussage legen nahe, dass exzitatorische Aminosäuren, besonders solche, die am NMDA-Rezeptor binden, eine kritische Rolle in Ischämie-induzierter neuronaler Schädigung spielen (Chesselet M-F et al 1990). Dabei stellen die Aktivierung von Glutamatrezeptoren und der nachfolgende Anstieg des intrazellulären Kalziums das entscheidende pathophysiologische Ereignis in der Frühphase der zerebralen Ischämie dar (Endres M and Dirnagl U 2002). Glutamat agiert über zwei verschiedene Kategorien von Rezeptoren: Inotrope (iGLUR) und metabotrope (mGLUR) Glutamatrezeptoren. Metabotrope Glutamatrezeptoren sind gekoppelt mit sogenannten „second messenger“ Systemen und werden in drei Gruppen unterteilt: Gruppe I (mGLUR 1 und mGLUR 5) fördert die Polyphosphoinositid-Hydrolyse und intrazelluläre Kalzium-Mobilisation. Gruppe II (mGLUR 2 und mGLUR 3) und Gruppe III (mGLUR 3 sowie mGLUR 6-8) sind negativ mit der Adenylatcyclase gekoppelt (Pisani A et al 2002). Die einzelnen Subtypen der mGLUR werden unterschiedlich in striatalen

Neuronen ausgebildet. So exprimieren cholinerge Interneurone den mGLUR 1, nicht aber den mGLUR 5, hingegen Projektionsneurone besonders zahlreich den mGLUR 5 ausbilden. Aktivierung von mGLUR5 erhöht dramatisch NMDA-vermittelten Antworten in striatalen „spiny“, nicht aber in „aspiny“ Interneuronen. (Calabresi P et al 1999). Die ligandengesteuerten inotropen Glutamaterezeptoren werden ebenso in drei Untergruppen gegliedert:

- N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor
- *a*-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptor
- Kainat-Rezeptor (Gratacos E et al 2001).

Nach lokaler NMDA-Agonisten-Injektion sind in Nagern selektiv somatostatinerge sowie cholinerge Interneurone verschont, hingegen ein massiver Verlust von efferenten Projektionsneuronen erfolgt. Als Ursache der selektiven Resistenz dieser Interneurone wird die geringe Anzahl von dendritischen NMDA-Rezeptoren vermutet, da Interneurone eine morphologische Eigenschaft gemeinsam haben: Sie erscheinen „aspiny“, d.h. diese Neurone haben im Gegensatz zu den gegenüber ischämischer und NMDA-Agonisten induzierter exzitotoxischer Schädigung hoch vulnerablen Projektionsneurone keine dendritische Dornen (Gonzales C et al 1991; Graybiel AM et al 1983; Chesselet M-F et al 1990). Dendritische „spines“ sind jedoch im Striatum die Hauptstelle für synaptische Kontakte glutamaterge kortikale Inputs (Smith AD et al 1990). Desweiteren unterscheidet sich die molekulare Zusammensetzung von NMDA-AMPA- sowie Kainat-Rezeptoren auf striatale Projektionsneuronen versus Interneurone (Landwehrmeyer GB et al 1995; Chen Q et al 1996). So exprimieren cholinerge, somatostatinerge, sowie parvalbuminerge Interneurone die NMDA-Subunit NR1, sowie die iGLUR-Untereinheit  $GLUR_{5/6/7}$  der Kainat-Rezeptoren. Im Gegensatz zu den striatalen Projektionsneuronen besitzen Calretinin-, ChAT- und Somatostatin-positive Neurone keine  $GLUR_{2/3}$ -Untereinheit, parvalbuminerge striatale Interneurone bilden diese nur zu 50% aus. Nur in der Gegenwart von  $GLUR_2$ - Untereinheiten wird in AMPA-Rezeptoren  $CA^{2+}$ -Permeabilität ermöglicht. Interessant ist, dass Parvalbumin-positive Interneurone zusätzlich zu den erwähnten Rezeptor-Untereinheiten auch  $GLUR_1$  und  $GLUR_4$  ausbilden (Chen Q et al 1996). Diese Differenzen verleihen dem iGLUR spezifische Eigenschaften und verursachen entgegengesetzte Antworten gegenüber Aktivierung glutamaterger Rezeptoren während eines exzitotoxischen Insult (Calabresi P et al 2000). Hypoxie, Hypoglykämie und Ischämie verursachen Membran-Depolarisation in spiny Projektionsneurone, jedoch eine Hyperpolarisation in aspiny-Interneurone (Calabresi P et al 1995 and 1997). Diese Hyperpolarisation findet aufgrund des Öffnens spezifischer Kaliumkanäle als Antwort auf die intrazelluläre ATP-Verringerung und Kalzium-Ansammlung, statt (Pisani A et al 1999). Dieser

Mechanismus schützt cholinerge Interneurone während des Energie-Abfalls, bewahrt die ionische Homostase der Neurone und verhütet die exzitotoxischen Effekte, die durch Glutamat über Aktivierung von NMDA-Rezeptoren verursacht werden. Während eines hyperpolarisierten Ruhepotentials ist die Aktivierung NMDA-Rezeptoren durch Glutamat teilweise verhindert durch den spannungsabhängigen Block, der von Magnesium-Ionen ausgelöst wird. Im Gegensatz dazu ist während einer Membran-Depolarisation der NMDA-Rezeptor stimuliert und intrazelluläre Kalzium-Ansammlung findet statt. Aufgrund verschiedener intrinsischer Membraneigenschaften und unterschiedlicher Zusammensetzung des NMDA<sub>1</sub>- sowie NMDA<sub>2b</sub>-Rezeptors in cholinergen Interneuronen versus Projektionsneuronen, sind exzitotoxische postsynaptische Potentiale in cholinergen Interneurone zweifach länger, als in Projektionsneurone. Es ist möglich, dass dieser Mechanismus mit involviert ist in der neuronalen Resistenz cholinergischer Interneurone, sowie in der Anfälligkeit striataler Projektionsneurone gegenüber Exzitotoxizität (Calabresi P et al 1998).

#### **8.4. Kalzium-bindendes Protein und mögliche selektive neuronale Resistenz striataler Interneurone:**

Es ist in der Literatur gut dokumentiert, dass nach fokaler Ischämie via Verlust des Membranpotentials eine Kettenreaktion beginnt, die über einen pathologischen Anstieg von intrazellulären Kalzium, das wiederum via Enzyminduktion verschiedene zytoplasmatische und nukleäre Kaskaden triggert, und schließlich zu neuronalem Tod führt (Martin RL et al 1994; Calabresi P et al 2000; Nitsch C et al 1989; Johansen FF et al 1990; Freund TF et al 1990). Von einigen Autoren wird die bedingte Resistenz Parvalbumin-immunreaktiver (PV-ir) Neurone in der Eigenschaft des Kalzium-bindenden Protein Parvalbumin gesehen, pathologische intrazelluläre Kalziummengen zu puffern (Nitsch C et al 1989; Johansen FF et al 1990). Gegen diese Hypothese spricht, dass ein weiteres neuronales Kalzium-bindendes Protein, das sogenannte CaBP in Projektionsneurone enthalten ist, die im Matrix-Kompartiment des Striatum lokalisiert sind. Gerade Projektionsneurone zeigen im Striatum die höchste Vulnerabilität gegenüber ischämischer Schädigung. Zudem zeigen PV-ir Pyramidenzellen im CA-1 Sektor des Hippokampus eine sehr hohe Anfälligkeit gegenüber ischämischen Ereignissen (Freund TF et al 1990).

## **9. Ausblick:**

Es ergibt sich eine prinzipielle Schwierigkeit, die im Tierversuch gewonnenen Daten auf Menschen zu übertragen. So wurde auch in dieser Arbeit gezeigt, dass im Striatum der Maus bei weitem parvalbuminerge Neurone die übrigen Subpopulationen der Interneurone wie die der Somatostatin-, ChAT- und Calretinin-ir Neurone überwiegen, wobei verhältnismäßig nur sehr wenige calretininerge Interneurone nachgewiesen wurden. Im Gegensatz dazu wurde im Striatum des Menschen immunhistochemisch calretininerge Interneurone in weit größerer Anzahl als Parvalbumin- und Somatostatin-positive Interneurone identifiziert (Wu et al 2000). Interessant ist dabei, dass gerade calretininerge striatale Interneurone nach milder fokaler Ischämie und 6-wöchiger Überlebenszeit keine neuronale Degeneration zeigten. Nachfolgende experimentelle Studien zu verschiedenen Reperfusionzeiten erscheinen notwendig, um weitere Informationen über die Ursachen dieser Resistenz zu explorieren. Ob das geeignete Untersuchungsobjekt die Spezies Maus sein sollte, ist aufgrund des geringen physiologischen Vorkommens striataler Calretinin-positiver Interneurone jedoch fraglich.

## 10. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, den neuronalen Zelltod im Striatum der Maus nach transientser fokaler Ischämie mittels histochemischer und immunhistochemischer Detektion methodisch zu quantifizieren und zu klassifizieren. Hierbei wurden das Verteilungsmuster und die Dichte der einzelnen Subtypen der Interneurone im läsierten und intakten Striatum systematisch evaluiert. Im hier verwendeten in-vivo Tiermodell der Maus wurde durch eine 30-minütige Okklusion der linken A. cerebri media und anschließender 6-wöchiger Überlebenszeit eine striatale Ischämie induziert. Nach Dekapitation und histologischer Aufarbeitung des Gehirnmaterials wurde im ischämischen dorsolateralen Striatum ein selektiver neuronaler Zelltod nachgewiesen, wobei auf allen Ebenen des ischämischen Striatum eine signifikante Atrophie in Relation zu dem Striatum der kontralateralen Hemisphäre stattgefunden hat. Projektionsneurone zeigten erwartungsgemäß im Vergleich mit Interneuronen und Gliazellen bei weitem die geringste Resistenz gegenüber ischämischen Prozessen. Die einzelnen Populationen der Interneurone reagierten mit einer selektiven Widerstandsfähigkeit gegenüber der milden Ischämie: Die höchste Resistenz zeigten calretininerge Interneurone, gefolgt von somatostatinerger, cholinergen und schließlich parvalbuminergen Interneuronen, wobei nur ChAT- sowie Parvalbumin-positive Interneurone einen signifikanten Zellverlust demonstrierten. Desweiteren zeigten alle Populationen der Interneurone im ipsilateralen Striatum morphologische Veränderungen wie Reduktion der dendritischen Verzweigungen und Zell-zu-Zell Kontakte. Im intakten Striatum waren die mit Abstand am Häufigsten vorkommenden Interneurone diejenigen, die neben GABA auch Parvalbumin exprimierten. Trotz des hohen postischämischen Zellverlustes waren diese Neurone auch im ischämischen Striatum die größte Subpopulation unter den Interneuronen.

Somatostatinerge Neurone waren im intakten Striatum der Dichte nach am zweithäufigsten, cholinerge Neurone wurden im kontralateralen Striatum als drittgrößte Population unter den Interneuronen immunhistochemisch identifiziert. Calretininerge Neurone waren mit Abstand sowohl im ischämischen wie auch im intakten Striatum die kleinste Subpopulation unter den Interneuronen. Im Gegensatz zu der Zellanzahl erreichten die Werte der Zelldichte in Relation zu der des intakten Striatum in keinem Fall Signifikanz. Chat-, Somatostatin-, und Calretinin-positive Interneurone zeigten im ischämischen Striatum bezogen auf das intakte Striatum der Gegenseite eine Erhöhung der Zelldichte über 100 %, die sich jedoch bei Hinzuziehung der Atrophie des ischämischen Striatum wieder relativiert. Nur bei parvalbuminergen Interneuronen wurde eine ca. 20 % ige Reduktion der relativen Zelldichte nachgewiesen. Auffällig war die

relativ hohe Vulnerabilität der cholinergen, somatostatinerger und calretininerger Interneurone – trotz ihrer hohen Resistenz gegenüber ischämischer Schädigung- im caudalen Bereich des Striatum auf der Höhe des Hippokampus. Im Kontrast dazu zeigten parvalbuminerge Interneurone, die einen relativ hohen durchschnittlichen Zellverlust präsentierten, gerade im caudalen Bereich des Striatum eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber ischämischer Schädigung. Zusätzlich konnte ein mäßiger extrafokaler Zelltod innerhalb der ipsilateralen Substantia nigra histochemisch festgestellt werden.

## 11. Abkürzungen

Ach	Acetylcholin
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolol-Propionic-Acid
BDNF	brain – derived neurotrophic factor
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaBP	Calbindin D <sub>28k</sub> - Protein
Cal-ir	Calretinin-immunreaktiv
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
CoA	Koenzym A
DA	Dopamin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-terahydrochlorid
d.h.	das heißt
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid - Synthase
g	Gramm
GAD	Glutamic acid decarboxylase
GDNF	glia cell line – derived neurotrophic factor
GPe	Globus pallidus, externales Segment
GPi	Globus pallidus, internales Segment
h	Stunde/Stunden
HMG	3-Hydroxy-Methylglutaryl
HPF	High-power-field
iGLUR	ionotropischen Glutamatrezeptoren
MCA	A.cerebri media
mGLUR	metabotrophische Glutamatrezeptoren
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Milimeter
mV	Milivolt
NADPH-d	reduzierte Form der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat -Diaphorase
NBT	Nitroblau-Tertazolium

NeuN	neuron-specific nuclear protein
NGFR	nerve growth factor receptor
nm	Nanometer
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-methyl-D-Aspartat-Rezeptoren
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NPYLI	Neuropeptid Y- ähnliche Immunreaktivität
NT-3	Neurotrophin-3
NTN	Neurturin
Pv-ir	Parvalbumin-immunreaktiv
Sem	Standardfehler des Mittelwertes
SNr	Substantia nigra, pars reticularis
SPN	Spiny Projektionsneurone
SSLI	Somatostatin-ähnliche Immunreaktivität
SPLI	Substanz P-ähnliche Immunreaktivität
TrkA	Thyrosinkinase
u.a.	unter anderem
μl	Mikroliter
VAF	Vanadat-Fuchsinsäure
z.B.	zum Beispiel

## 12. Literatur:

- 1) Andsberg G, Kokaia Z, and Lindvall O. Upregulation of p75 neurotrophin receptor after stroke in mice does not contribute to differential vulnerability of striatal neurons. *Experimental Neurology* 2001; 169: 351 – 363.
- 2) Anonymus; Kapitel 16 Gesundheitswesen. Statistisches Bundesamt; Statistisches Jahrbuch 1998; 430-460.
- 3) A Prospective Community-Based Study of Stroke in Southern Italy: The Vibo Valentia Incidence of Stroke Study. *Cerebrvasc Dis* 2003; 16: 410-417.
- 4) Araki T, Kato H, Liu XH, Itoyama Y, Kogure K , Kato K. Delayed damage of striatal interneuron's after cerebral ischemia in the gerbils. *Neurosci Lett* 1994; 176: 17-20.
- 5) Araki T, Kato H, Liu X-H, Kogure K, Kato K and Itoyama Y. An immunohistochemical study of parvalbumin containing interneurons in the gerbil hippocampus after cerebral ischemia, *Metabolic Brain Disease* 1994; Vol. 9. No. 3: 225-234.
- 6) Avrameas S, Feldman G, Druet P. *Immunoenzymatic Technics*. Elsevier. Amsterdam, 1983.
- 7) Baimbridge KG, Celio MR and Rogers J H. *Trends Neurosci* 1992; 15: 303-308.
- 8) Bamford J. A prospective study of acute cerebrovascular disease in the community: the Oxford Community Stroke Project 1981-1986; 1 ; Methodology, demography, and incident cases of first-ever stroke. *J Neurol. Neursurg Psych* 1998; 51: 1373-1380.
- 9) Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 148 – 155.
- 10) Barrett GL. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 2000; 61: 205-229.

- 11) Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986; 17: 472-476.
- 12) Benett B, Check EJ, Olsenm, Hunter RL. A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J Immunol Meth* 1992; 153: 31-40.
- 13) Bernard V, Somogyi P, Boam JP. Cellular, subcellular and subsynaptic distribution of AMPA – type glutamate receptor subunits in the neostriatum of the rat. *J Neurosci* 1997; 17: 819 – 833.
- 14) Boenisch TMS. Handbook. *Immunochemical Staining Methods*. 2001; 5-11.
- 15) Bolam JP, Clarke DJ, Smith AD, Somogyi P. A type of aspiny neuron in the rat neostriatum accumulates (3 H) g-aminobutyric acid: combination of golgi – staining, autoradiography, and electron microscopy. *J Comp Neurol* 1983; 213: 121 – 134.
- 16) Bolam JP et al. Glutamate decarboxylase-immunoreactive structures in the rat neostriatum: A correlated light and electron microscopic study including a combination of Golgi-impregnation with immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 1985; 237: 1 – 20.
- 17) Bolam JP, Wainer BH, Smith AD. Characerization of cholinergic neurons in the rat striatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 1984; 12: 711-718.
- 18) Bonita R. Approaches to the problems of measuring the incidence of stroke. *Int.J Epidemiology* 1995; 24: 535-542.
- 19) Bruno V, Battaglia G, Copani A. Metabotropic glutamate receptors and neurodegeneration. *Prog Brain Res* 1998; 116: 209 – 221.
- 20) Calabresi P, Ascone CM, Centonze D et al. Opposite membrane potential changes induced by glyose deprivation in striatal spiny neurons and in large aspiny interneurons. *J Neurosci* 1997; 17: 1940-1949.

- 21) Calabresi P, Centonze D, Bernardi G. Cellular factors controlling neuronal vulnerability in the brain: A lesion from the striatum. *Neurology* 2000; Volume 55 ( 9): 1249 – 1255.
- 22) Calabresi P, Centonze D, Pisani A, and Bernardi G. Metabotropic glutamate receptors and cell – type specific vulnerability in the striatum: Implication for ischemia and Huntington` s disease. *Experimental Neurology* 1999; 158: 97 – 108.
- 23) Calabresi P, Saulle E, Centonze D, Pisani A, Marfia G A, Bernardi G. 2002. Post-ischaemic-long-term synaptic potentiation in the striatum: a putative mechanism for cell type-specific vulnerability. *Brain*; 125: 844-860.
- 24) Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernadi G. On the mechanism underlying hypoxia-induced membrane depolarisation in striatal neurons. *Brain* 1995; 118: 1027-1038.
- 25) Cavicchioli L, Flanigan JP, Dickson G, Vantini R, Dal Toso, Fusco M, Walsh FS, Leon A. Choline acetyltransferase messenger RNA expression in developing and adult rat brain: regulation by nerve growth factor. *Mol Brain res* 1991; 9: 319-325.
- 26) Chesselet M - F, Gonzales C, Lin C - S, Polsky K, and Jin B – K. Ischemic damage in the striatum of adult gerbils: Relative sparing of somatostatinergic and cholinergic interneurons contrast with loss of efferent neurons. *Experimental. Neurology* 1990; 110: 209 – 218.
- 27) Chen Q, Veenman CL, Reiner A. Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits on specific striatal neuron types and its implication for striatal vulnerability in glutamate receptor-mediated excitotoxicity. *Neuroscience* 1996; 73 (3): 715-31.
- 28) Chiamulera C, Terron A, Reggiani A and Cristofori P. Qualitative and quantitative analysis of the progressive cerebral damage after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Research* 1993; 606: 251-258.
- 29) Coons A H, Creech H H, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol* 1941; 47: 2000-2002.

- 30) Davies SW, Roberts PJ. Sprouting of cholinergic neurons following quinolinic lesions of the rat striatum. *Neuroscience* 1988; 26: 387 – 393.
- 31) DiFiglia M, Pasik P, Pasik T. A golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* 1976; 114: 245-256.
- 32) Dienel GA , Pulsinelli WA, Duffy TE. Regional protein synthesis in rat brain following acute hemispheric ischemia. *J Neurochem* 1980; 35: 1216-1226.
- 33) Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LMT, Handran SD, Rothman SM, Lin T-S, Goldberg MP, and Choi DW. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N – methyl – D – aspartate. *J Neurosci* 1995; 15: 6377 – 6388
- 34) Endres M, Fink K, Zhu J, Stagliano NE, Bondada V, Geddes JW, Azuma T, Mattson MP, Kwiatkowski DJ, and Moskowitz MA. Neuroprotective effects of gelsolin during murine stroke. *J Clin Invest* 1999; Vol. 103; 3: 347 – 354.
- 35) Endres M, Gertz K, Lindauer U, Katchanow J, Schultze J, Schröck H, Nickenig G, Kuschinsky W, Dirnagl U and Laufs U. Mechanismus of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol* 2003; 54: 582 – 590.
- 36) Endres M, Laufs U. HMG – CoA – Reduktasehemmer und Schlaganfallrisiko. *Nervenarzt*. 1998; 69: 717 – 721.
- 37) Endres M, Laufs U, Liao JK and Moskowitz MA. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends in Neurosciences* 2004; Vol 27; 5: 283 – 289.
- 38) Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA . Attenuation of delayed neuronal death after mild ischemia by inhibitors of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18(3): 238-247.
- 39) Endres M und Dirnagl U. Ätiologie und Pathogenese des ischämischen Hirninfarkt. Schlaganfall. *Interdisziplinäres Handbuch* 2002: 91-109.

- 40) Freund TF, Buzsaki G, Leon A, Baimbridge KG, and Somogyi P. Relationship of neuronal vulnerability and calcium binding protein immunoreactivity in ischemia. *Experimental Brain Research* 1990; 83: 55 – 66.
- 41) Freund TF, Magloczky ZS. Early degeneration of calretinin- containing neurons in the rat hippocampus after ischemia. *Neuroscience* 1993; 56; 581 – 596.
- 42) Garcia JH, Kamijyo Y. Cerebral infarction: evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 1974; 33: 408-421.
- 43) Garcia JH, Lossinsky AS, Kauffman FC, Conger KA. Neuronal ischemic injury: light microscopy, ultrastructure and biochemistry. *Acta Neuropath (Berl)* 1978; 43: 85-93.
- 44) Gerfen CR, Baimbridge KG, and Miller JJ. The neostriatal mosaic: Compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 1985; 82: 8780 – 8784
- 45) Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 1992; 15: 133 – 138
- 46) Gerfen CR. The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 1989; 246 (4928): 385-388.
- 47) Gertz K, Laufs U, Lindauer U, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M. Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke* 2002; 34. 551 – 557.
- 48) Ginsberg MD, Bustor R. Rodents models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989; 20: 1627-1642.
- 49) Gonzales C, Lin R C-S, and Chesselet M-F. Relative sparing of GABAergic interneurons in the striatum of gerbils with ischemia-induced lesions. *Neuroscience Letters* 1991; 135: 53 – 58.
- 50) Goto S, Nagahiro S, Korematsu K, and Ushio Y. Striatonigral involvement following transient focal cerebral ischemia in the rats: an immunohistochemical study on a reversible ischemia model. *Acta Neuropathologica* 1992; 85:515- 520.

- 51) Gratacos E, Perez – Navarro E, Tolosa E, Arenas E, and Alberch J. 2001. Neuroprotection of striatal neurons against excitotoxicity by neurotrophins and GDNF family members. *Journal of Neurochemistry*. 78; 1287 – 1296.
- 52) Graybiel AM. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 1990; 3: 244-254.
- 53) Graybiel AM. and Ragsdale CW. Biochemical anatomy of the striatum. In P.C. Emson (ED.). *Chemical Neuroanatomy*. Raven, New York. 1983; 427-504.
- 54) Greferath U, Mallard C, Roufail E, Rees SM, Barrett GL, Bartlett PF. Expression of the p75 neurotrophin receptor by striatal cholinergic neurons following global ischemia in rats is associated with neuronal degeneration. *Neuroscience Letters* 2002; 332: 57 – 60.
- 55) Grofava I. Types of striato-nigral neurones labeled by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Appl Neurophysiol* 1976; 42: 25-28.
- 56) Gruber H. Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen. Benninghoff Band drei 1985; Kapitel 17.
- 57) Gulyas AI, Hajos N, and Freund TF. Interneurons Containing Calretinin are specialized to control other Interneurons in the Rat Hippocampus. *J Neurosci* 1996; 16 (10): 3397-3411.
- 58) Haber SN, Fudge JL, McFarland NR Striatonigro-striatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* 2000; 20: 2369 – 2382
- 59) Heiß W.-D. *Deutsches Ärzteblatt* 29.03.1996; 93.831.
- 60) Ito U, Spatz M, Walker Jr. JT, Klatzo I. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. Light microscopic observations. *Acta Neuropath* 1975. 32; 209-223.
- 61) Jacobowitz D M and Winsky L. J. Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *Comp Neurol* 1991. 304; 198-218.

- 62) Johansen FF, Tonder N, Zimmer J, Baimbridge KG and Diemer NH. 1990. Short-term changes of parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*. 120; 171 – 174.
- 63) Johnston JG, Gerfen CR, Haber SN, van der Kooy D. Mechanism of striatal pattern formation: Conservation of mammalian compartmentalization. *Brain Res* 1990; 57(1):93-102.
- 64) Kaplan DR., Miller FD. Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 213 – 221.
- 65) Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf, Brück W, Hörtnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal death. *J Neurosci* 2001; 21:5045-5053.
- 66) Katchanov J., Waeber C., Gertz K., Gietz A., Winter B., Brück W., Dirnagl U., Veh RW., and Endres M. Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol* 2003; 13: 452 – 464.
- 67) Kawagucci Y. Large aspiny cells in the matrix of the rat striatum in vitro: Physiological identification, relation to the compartment and excitatory postsynaptic currents. *J Neurophysiol* 1992; 67: 1669-1682.
- 68) Kawagucci Y. Physiological, morphological and histochemical characterization of the three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 1993, 11: 4908-23
- 69) Kawaguchi Y. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 1995; 18: 527-535.
- 70) Kayser F, Bienz KA, Eckert J, Zienkernagel RM. *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme Verlag Stuttgart, New York 1998: 45-60.
- 71) KirinT, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta neuropathol* 1984; 62; 201 – 208:

72) Kirino T. Brain Res Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. 1982, 239: 57-69.

73) Kita H and Kitai ST. Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in the rat neostriatum: their morphological types and populations. Brain Res 1988; 447: 346 – 352.

74) Kita H. GABAergic circuits of the striatum. Prog Brain Res 1993; 99: 51 – 72.

75) Kita H, Kosaka T and Heizman C W. Parvalbumin – immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. Brain Res 1990; 536:1-15.

76) Kokaia Z, Andsberg G, Martinez – Serrano A, and Lindvall O. Focal cerebral ischemia in rats induces expression of p75 neurotrophin receptor in resistant striatal cholinergic neurons. Neuroscience 1998; 84: 1113 – 1125.

77) Kölliker A. Handbuch der Gewebelehre des Menschen, Band II, Kengleman, Leibzig 1896.

78) Kolominsky - Rabas PL, Sarti C, Heuschmann P, Graf C, Siemonsen S, Neundörfer B, Katalinic A, Lang E, Gassmann KG, Stockert TR. A prospective Community-Based Study of Stroke in Germany-The Erlangen Stroke Project. Stroke 1998, 29: 2501-2506.

79) Kubota Y and Kawaguchi Y. J Comp Neurol 1993, 332. 499-513.

80) Kubota Y and Kawaguchi Y . Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneuron type and target size. J Neurosci. 2000,20: 375-386.

81) Kumar V. Herausgeber: Oss VCJ and v. Regenmortel MHV. Immunochemistry. Dekker-Verlag. new york-basel-hong kong 1994: 829-847.

82) Kurtzke JF. The current neurologic burden of illness and injury in the US, Neurol 1982, 32:1207-1212

- 83) Landwehrmeyer GB, Standaert DG, Testa CM, Penney JB, Young AB. 1995. NMDA receptor subunits mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *J Neurosci.* 15; 5297 – 5307
- 84) Larsson E, Lindvall O, Kokaia Z. 2001. Stereological assessment of vulnerability of immunocytochemically identified striatal and hippocampal neurons after global cerebral ischemia in rat. *Brain Research.* 913; 117-132.
- 85) Lee DR, Helps SC, Gibbins IL, Nilsson M and Sims NR. Losses of NG2 and NeuN immunoreactivity but not astrocytic markers during early reperfusion following severe focal cerebral ischemia. *Brain Research* 2003; 989 ( 2 ): 221-230.
- 86) Lehninger AL. *Biochemie.* Verlag Chemie-Weinheim-New York 1977; 2.Auflage: 8822-8829.
- 87) Levine S and Sohn D. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch Pathol* 1969; 87: 315-317.
- 88) Longa ZE, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rat. *Stroke* 1989; 20: 84-91.
- 89) Malmgren R, Bamford J, Warlow C, Sandercock P, Slattery J. Projecting the number of patients with first-ever strokes and patients newly handicapped by stroke in England and Wales. *Br Med J* 1989, 298: 656-660.
- 90) Martinez G, Di Giacomo C, Carnazza ML, Sorrenti VR, Castana M L, Barcellona J R, Perez-Polo A, Vanella. MAP2, synaptophysin immunostaining in rat brain and behavioral modifications after cerebral postischemic reperfusion. *Dev Neurosci* 1997; 19. 457-464.
- 91) Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the sence for neuronal death? *Trends Neurosci* 1994; 17: 251–257.
- 92) Meade CA. Transient global ischemia in rats yields striatal projection neuron and interneuron loss resembling that in Huntington`disease. *Exp Neurol* 2000, 166: 307 – 323.

- 93) Miyashita K, Abe H, Nakajima T, Ishikawa A, Nishiura-Suzuki M, Naritomi H, Tanaka R and Sawada T. Glutamate release in the gerbil hippocampus after middle cerebral artery occlusion. *NeuroReport* 1994; 5: 945- 948.
- 94) Molinari CF. Selectiv segmental occlusion of intracranial arteries in the dog. *Stroke* 1970; 4: 224-231.
- 95) Ma J., Endres M., Moskowitz MA, Synergegistic decrease in infarct volume when an ICE family inhibitor and MK – 801 are combined to treat cerebral ischemia. *Br J Pharmacology* 1997; 17 ( suppl 1 ): S434.
- 96) Mudrick LA, Baimbridge KG. Long-term changes in the rat hippocampal formation following cerebral ischemia. *Brain Res* 1989; 493: 179 – 184.
- 97) Nakashima K, Todd MM, Warner DS. The relation between cerebral rate and ischemic depolarisation. *Anaesthesiology* 1995; 82. 1199-11208.
- 98) Nakano K, Kayahara T, Tsutsumi T, Ushiro H. Neural circuits and functional organisation of the striatum. *J Neurol* 2000; 247 (suppl 5):V1-15.
- 99) Nakano S, Kogure K, Fujikura H. Ischemia induced slowy progressive neuronal damage in the rat brain. *Neuroscience* 1990; 38: 115-124.
- 100) Nedergaard M. Neuronal injury in the infact border: a neuropathological study in the rat. *Acta Neuropathologica* 1987, 73. 267-274.
- 101) Nehls DG, Park CK, McCulloch J. The effects of N – methyl-D- aspartate receptor blockade with MK – 801 upon the relationship between cbF and glucose utilisation. *J Cereb. Blood Flow Metab* 1990; 8: 376.
- 102) Nitsch C, Scotti A, Sommacal A and Kalt G. GABAergic hippocampal neurons resistant to ischemia-induced neuronal death contain the Ca<sup>2+</sup>- binding protein parvalbumin. *Neuroscience Letters* 1989; 105: 263 – 268.

- 103) Olsson T, Wieloch T, and Smith M-L. Brain damage in a mouse model of global cerebral ischemia, effect of NMDA receptor blockade. *Brain Research* 2003; Volume 982, Issue 2: 260 – 269
- 104) Ooschot DE. Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical dissector methods. *J Comp Neurol* 1996;366: 580-599.
- 105) Opitz PJ. *Weltprobleme*. Bonn: Bundeszentrale für politische Bildung, 4. Auflage, 1995.
- 106) Pan European Concensus Meeting on Stroke Management. *J Int. Med* 1996; 240(4): 173-180
- 107) Pasternak G. Monoklonale Antikörpertechnik in: *Handbuch der monoklonalen Medizin*. Band I. Ganten A. (Herausgeber). Springer-Verlag. Berlin 1997:145-173.
- 108) Petito C. K, Pulsinelli W.A. Sequential development of reversible and irreversible neuronal damage following cerebral ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984; 43; 141 – 153.
- 109) Pisani A, Bonsi P, Catania MV, Giuffrida R, Morari M, Marti M, Centonze D, Bernardi G, Kingston AE, and Calabresi P. Metabotropic glutamate 2 receptors modulate synaptic inputs and calcium signals in striatal cholinergic interneurons. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22, (14): 6176 – 6185.
- 110) Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Calabresi P, Bernardi G. Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 2000;20: RC69 (1-6).
- 111) Pisani A, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G. Electrophysiological recordings and calcium measurements in striatal large aspiny interneurons in response to combined O<sub>2</sub> /glucose deprivation. *J Neurophysiol* 1999; 81: 2508-2516.
- 112) Poljak RJ et al. Three-dimensional structures of the Fab` fragment of a human immunoglobulin at 2.8-Å resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci (U.S.)* 1973, 70. 3305-10.

113) Pollack GS. Analysis of temporal patterns of communication signals. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(6): 734 - 8.

114) Pulsinelli WA., Brierley JB. The temporal profile of ischemic neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1982; 11. 491-498.

115) Pulsinelli WA., Brierley JB. The temporal profile of ischemic neuronal damage in the four-vessel occlusion rat model. *Stroke*. 1979: 492.

116) RastenYTE D. et al. Epidemiology of stroke in Kaunas, Lithuania. First result of the Kaunas Stroke Register. *Stroke* 1995; 26: 240 - 244.

117) Renolleau S, Aggoun – Zouaoui D, Ben – Ari Y, Charriaut – Marlangue C. A model of transient unilateral focal Ischemia with reperfusion in the p7 neonatal rat: Morphological changes indicative of apoptosis. *Stroke* 1998; Vol 29. (7): 1454 – 1460.

118) Rosenblum W.I., Histopathologic clues to the pathways of neuronal death following ischemia /hypoxia. *Journal of Neurotrauma* 1997; Volume 14. (5): 313- 326.

119) Saka E, Iadarola M, Fitzgerald DJ, and Graybiel AM. Local circuit neurons in the striatum regulate neural and behavioral responses to dopaminergic stimulation. *Neurobiology* 2002; Vol 99. (13): 9004 – 9009.

120) Sharp FR, Liu J and Bernabeu R. Neurogenesis following brain ischemia. *Developmental Brain Research* 2002; Volume 134, Issues 1-2: 23-30.

121) Shima K, Shirotani T, Chigasaki H. Delayed neuronal damage following focal ischemic injury in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Acta Neurochir* 1996; 67; 24-27.

122) Smith Y, Shink E, Sidibe M. Neuronal circuitry and synaptic connectivity of the basal ganglia. *Neurosurg Clin N Am* 1998; 9(2): 203-22.

- 123) Sobreviela T, Clary DO, Reichardt LF, Brandabur MM, Kordower JH, Mufson EJ. TrKA-immunoreactive profiles in the central nervous system: Colocalisation with neurons containing p<sup>75</sup> nerve growth factor receptor, choline acetyltransferase, and serotonin. *J Comp Neurol* 1994; 350:587-611.
- 124) Smith AD and Bolam JP. The neuronal network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *Trends Neurosci* 1990; 13: 259-265.
- 125) Sternberger L.A.: Immunohistochemistry. John Wiley & Sons. New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore 1979.
- 126) Strasser U, Lobner D, Behrens MM, Choi DW. Antagonists of mGLUR 1 attenuate excitotoxic neural death in cortical cultures. *Eur J Neurosci* 1998, 10 : 2848 – 2855.
- 127) Tayler Cr. Immunoperoxidase techniques. *Arch Pathol Lab Med* 1978 ;102 : 113-121.
- 128) Teramoto T, Qiu J, Plumier J – C, and Moskowitz MA. EGF amplifies the replacement of parvalbumin – expressing striatal interneurons after ischemia. *J Clin Invest* 2003; 111(8): 1125 – 1132
- 129) Thilmann R, Xie Y, Kleihues P, Kiessling M. Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol* 1986; 71: 88-93.
- 130) Uemura Y, Kowall NW, and Beal MF. Selective sparing of NADPH-diaphorase-somatostatin-neuropeptide Y neuronons in ischemic gerbil striatum. *Ann Neurol* 1990; 27: 620 – 625
- 131) Van der Zee CEEM, Hagg T. P75<sup>NGFR</sup> mediates death of cholinergic neurons during postnatal development of the neostriatum in mice. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 1997; 14. 129 – 140.
- 132) Van der Zee CEEM, Ross GM, Riopelle RJ, Hagg T. Survival of cholinergic forebrain neurons in developing p75<sup>NGFR</sup> – deficient mice. *Science* 1996; 274: 1729 – 1732.

133) Venero JL, Hefti F, Knusel B. Tropic effects of exogenous nerve growth factor on rat striatal cholinergic neurons: comparison between intraparenchymal and intraventricular administration. *Mol Pharmacol* 1996; 49: 303-310.

134) Victorov I. V, Prass K, Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. *Brain research protocols* 2000; 5; 135-139.

135) Von Bohlen O, Halbach. Dermietzel R. *Methoden der Neurohistologie*. Spektrum Akademischer Verlag 1999: 13-22.

136) Vuillet J. et al. Ultrastructural features of NPY-containing neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett* 1990; 100: 99-104.

137) Werner C, Jantzen J-P, Löffler W, *Neuroanästhesie*. Thieme-Verlag. Stuttgart. 2000; 121-142.

138) Wilson C.J . *The Synaptic Organisation of the Brain*. Oxford University Press 1990: 279-316.

139) Wilson C.J., Chang H.-T, Kitai S.T. Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J Neurosci* 1990; 10: 508-19. 1990; 269. 219-236.

140) Winter B, Juckel G, Ilya Viktorov, Katchanov J, Gietz A, Sohr R, Balkaya M, Hörtnagl H, Endres M. *Biol Psychiatry* 2005; 57; 1166-1175.

141) Wolfe C D A , Giround M, Kolominsky – Rabas PL,Dundas R, Lemesle M, Heuschmann P, Rudd A. Variations in Stroke Incidence and Survival in 3 Areas of Europe, *Stroke* 2000; 31: 2074-2079

142) Wu Y, Parent A. Striatal interneurons expressing calretinin, parvalbumin, or NADPH-diaphorase: a comparative study in the rat, monkey and human. *Brain Research* 2000; 863. 182-191.

143) Yamada K, Goto S, Oyama T, Yoshikawa M, Nagahiro S, Ushio Y. Striatal cells containing the Ca<sup>2+</sup>- binding protein calretinin ( protein 10 ) in ischemia- induced neuronal injury. *Acta Neuropathol* 1995; 89 : 172 – 177

144) Zilles K et al. *Anatomie des Blutkreislaufs. Der Schlaganfall.* Herausgeber: Hartmann A und Heiss W-D 2001; Kapitel 1: 1 – 21.

145) Zhou F – M, Liang Y, Dani JA. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat Neurosci* 2001; 4: 1224 – 1249.

146) Zhou F-M, Wilson CJ, Dani JA. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol* 2002, 53: 590 – 605.

### **13. Publikationen**

1) Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A., Winter B, Brück W, Dirnagl U, Veh RW, and Endres M. Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol* 2003; 13(4): 452 – 464.

2) Winter B, Juckel G, Viktorov I, Katchanov J, Gietz A, Sohr R, Balkaya M, Hörtnagl H, Endres M. Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice. *Biol Psychiatry* 2005; 57(10); 1166-1175.

## 14. Danksagung

Als erstes möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Matthias Endres für seine (fast) jederzeit gewährte geduldige fachliche Unterstützung bedanken, die ich von ihm erhalten habe. Für die fachliche Beratung möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. U. Dirnagl danken, für das großzügige Bereitstellen der Antikörper gegen Parvalbumin, ChAT, Somatostatin und Calretinin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. R. Veh. Und schließlich auch ein großes Danke an Frau Dr. med. D. Freyer u.a. für ihren unerwarteten Beistand während der Disputation, welches meine Nervosität etwas linderte.

Für die Einarbeitung in die Methodik der Immunhistochemie möchte ich Dr. med. Juri Katchanov danken - im Gedächtnis bleibend ist mir sein stetiges Bedanken für jede noch so kleine Gefälligkeit, die ihm erwiesen wurde.

Für das Anspornen zum Weiterschreiben dieser Arbeit in Zeiten geringer Motivation möchte ich mich besonders bei meinem Vater Dietrich Gietz und meinem Lebensgefährten Giyassetin Sayan, meiner langjährigen Freundin Mohteram Zaherdoust sowie meinen ehemaligen Kommilitoninnen und jetzigen Freundinnen Dr. med. Diana Nogai und Dr. med. Ute Kannbley bedanken.

Meiner Mutter Christa Gisela Gietz möchte ich schließlich ganz besonders dafür danken, dass sie immer da war, wann immer ich sie für die Betreuung meines Sohnes brauchte. Ohne ihre Hilfe hätte ich weder das Medizinstudium, noch die Doktorarbeit erfolgreich beenden können.

## **15. Erklärung**

“Ich, Andrea Gietz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Selektiver neuronaler Zelltod nach milder fokaler Ischämie in der Maus, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."