

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Verhaltenskorrelate neuropsychiatrischer und
neuropsychologischer Störungen nach milder zerebraler
Ischämie im Mausmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Benjamin Winter
aus Starnberg

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Matthias Endres
2. Prof. Dr. med. Otto Witte
3. PD Dr. med. Lorenz Hirt

Datum der Promotion: 9. Juli 2007

Meinen Eltern

Christel und Rudolf Winter

Inhaltverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abstrakt	2
1 Einleitung	4
2 Zielstellung	5
3 Methodik	7
4 Ergebnisse	12
5 Diskussion	16
6 Literaturverzeichnis	24
Anhang	
Verwendete Publikationen	33
Selbständigkeitserklärung	34
Eidesstattliche Erklärung	35
Danksagung	36
Lebenslauf	37
Publikationen	38

Abkürzungsverzeichnis

5-HIAA	5-Hydroxyindol Essig
5-HT	5-Hydroxytryptamin
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
Cal	Calretinin
ChAT	Cholin-Azetyl-Transferase
DA	Dopamin
DOPAC	3,4'-Dihydroxyphenylelessigsäure
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
GABA	Gammaaminobuttersäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HVA	Homovanillinsäure
MAP-2	Mikrotubuli assoziiertes Protein 2
MCAo	Okklusion der A. cerebri media
NA	Noradrenalin
NeuN	<i>neuron-specific nuclear protein</i>
Parv	Parvalbumin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Sham	Ohne Okklusion operiert
Som	Somatostatin
SPN	<i>spiny</i> Projektionsneurone
TdT	Terminale desoxynucleotidyl-Transferase
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling</i>

Abstrakt

Für Patienten nach Schlaganfall haben emotionale und kognitive Störungen entscheidende Störungen der Emotionalität und des Verhaltens Auswirkungen auf Rehabilitation und Lebensqualität. Im Tiermodell wurden mögliche Korrelate solcher funktionellen Langzeitfolgen bislang kaum untersucht. Bis 10 Wochen nach 30 min Okklusion der A. cerebri media (MCAo) und Reperfusion in der Maus untersuchten wir selektive neuronale Schadensentwicklung im Striatum, Veränderungen der Neurotransmitter und neuropsychologische Phänomene bei spontaner lokomotorischer Aktivität, räumlichem Lernen, Angstverhalten und Depression.

Mit histologischen, immunhistochemischen und autoradiografischen Methoden wurde die striatale Läsion mit Aussparung des Kortex umfangreich untersucht. MCAo führte zu verzögertem Zellverlust von „spiny“ Projektionsneuronen, während Interneurone eine weitgehende Resistenz gegenüber der milden Ischämie aufwiesen.

6 Wochen nach Ischämie zeigten die Mäuse ein geringes residuales neurologisches Defizit, aber keine Unterschiede im Rotarod Koordinationstest, der Schwimm- oder Laufgeschwindigkeit. Dennoch wiesen MCAo Mäuse Schwierigkeiten im Strategiewechsel auf und zeigten 8–10 Wochen nach Ischämie einen ängstlichen oder hyperaktiven, aber nicht depressiven Phänotyp, in Abhängigkeit von linker vs. rechter geschädigter Hemisphäre. Verhaltensdaten konnten mit der Läsionsgröße und mit Veränderungen der Monoaminspiegel korreliert werden. Zusätzlich fanden wir extrafokalen diffusen neuronalen Schaden, der zu Störungen des neurochemischen Gleichgewichts beitragen könnte.

Abstract

Post-stroke emotional and behavioural abnormalities have an impact on outcome. So far these functional long-term sequelae have scarcely been characterized in animal models. During the 10 weeks a 30 min middle cerebral artery occlusion (MCAo) following reperfusion in the mouse, evolution of selective neuronal damage in the striatum, neurotransmitter changes and neuropsychological alterations in spontaneous locomotor activity, spatial learning, anxiety and depression were investigated.

Using histological, immunocytochemical and autoradiographic methods, we characterized the maturation of the ischemic lesion. Mild brain ischemia conferred delayed selective cell death of medium spiny projection neurons in the striatum while interneurons and glia were resistant to ischemic injury.

6 weeks after the ischemia, the mice showed distinct residual neurological deficits, but no differences in Rotarod coordination, swimming or running speeds. However, MCAo mice had difficulties in the strategy-switching tasks and showed an anxious or hyperactive, but not depressive phenotype, depending on whether the lesion was left or right hemispheric at 8–10 weeks. Behavioural data correlated with the brain lesion size and the changes in monoamine levels. Additionally extrafocal scattered neuronal damage was observed, which could account for neurochemical disturbances.

1 Einleitung

Der ischämische Schlaganfall ist die häufigste Ursache von Langzeitbehinderung im Erwachsenenalter (American Heart Association 2001). Neuropsychiatrische Folgen des Schlaganfalls umfassen eine Vielzahl von emotionalen und kognitiven Störungen und haben wesentlichen Einfluss auf Rehabilitation und das funktionelle Outcome (Robinson RG 1997). Depression ist mit 20–50% die häufigste psychiatrische Folgeerkrankung bei Schlaganfallpatienten, andere bekannte emotionale und Verhaltensstörungen sind Angststörungen, Manie, bipolare Erkrankungen, Insomnie, Apathie und pathologisches Weinen (Bhogal et al., 2004; Burvill et al., 1995a, 1995b; Leppävuori et al., 2002, 2003; Narushima et al., 2003; Robinson et al., 1984, 1997). Im Tiermodell hingegen gibt es bisher wenige Untersuchungen möglicher Korrelate dieser neuropsychiatrischen Manifestationen nach Schlaganfall, obgleich sensomotorische Defizite und Effekte auf Lernen und Gedächtnis bereits untersucht wurden (De Vries et al., 2001).

Es erscheint rational in Anbetracht der Vielzahl präklinischer Studien mit meist morphologischer oder volumetrischer Erfassung des Outcomes nach Schlaganfall, funktionelle Auswirkungen in die Evaluation miteinzubeziehen. Die Beeinträchtigung von komplexem Verhalten mag mit Schäden auf subzellulärer Ebene oder mit veränderter neuroendokriner und elektrophysiologischer Funktion einhergehen oder in diffusen morphologischen Schäden begründet sein, die durch Zellzählung oder einfacher Infarktausmessung nicht erfasst werden können (Aranowski et al., 1996).

Unser Modell transienter fokaler Ischämie in der Maus, führt 30 min Okklusion der Arteria Cerebri Media (MCAo), gefolgt von Reperfusion bei 129/SV Mäusen zur Induktion von Caspase abhängigem, verzögerten neuronalen Zelltod im dorsolateralen Striatum unter Aussparung des Kortex, während nicht-neuronale Zellen des Ischämieareals den Insult überleben (Endres et al., 1998; Katchanov et al., 2001). Pathophysiologie, Reorganisation und Outcome gleichen dem klinischen Befund bei Patienten mit kardiogener Hirnembolie und ausgeprägtem transientem hemisphäriellem Syndrom (Minematusu et al., 1992; Mohr et Barnett, 1986). Im Vergleich zu anderen Modellen mit längeren Ischämiezeiten und hoher Mortalität (50%–70% nach 7 Tagen)(Prass et al., 2003; Kondo et al., 1997; Huang et al., 2001) ist dieses Modell mit langer Überlebenszeit (~90% nach 10 Wochen) mit überschaubarem reversiblen neurologischem Defizit (meist spastische Parese der kontralateralen Vorderpfote) für die Erhebung subtiler Qualitäten, wie Kognition und Verhalten, gut geeignet.

2 Zielstellung

Verhaltensstörungen, wie auch Depression, werden bei Schlaganfallpatienten gerade mit Läsionen der Basalganglien oftmals beobachtet (Beblo et al., 1999; Starkstein et Robinson, 1989). Die Charakterisierung besonders der Langzeitstörungen von Neuropsychologie und Kognition ist im Tiermodell fokaler Ischämie bisher unzureichend.

Bisherige Untersuchungen zeigen, dass sich der maximale neuronale Schaden erst verzögert über Tagen entwickelt (Endres et al., 1998; Katchanov et al., 2001). Welche Subtypen der Neuronenpopulation über einen längeren Zeitraum davon betroffen und damit verantwortlich sind für bleibende neurologische und Verhaltensstörungen, war bisher unklar.

1.) Somit galt der erste Schritt zur weiteren Evaluation des Schlaganfallmodells der immunhistochemischen, histologischen und autoradiografischen Differenzierung geschädigter Zellen und der striatalen Kompartimente (Matrix und Striosomen) bis 6 Wochen nach Ischämie.

2.) In einer 2. Phase wurde ab der 7. Woche anhand eines etablierten Neurologischen Defizit Score (Bederson et al., 1986), der Koordinations- und Balancefähigkeit auf einer sich drehenden Walze (Rotarod) und der Schwimgeschwindigkeit der sensomotorische Phänotyp ermittelt.

In einem Wasserlabyrinth (Morris Water Maze) wurde über 7 Tage das räumliche Lernvermögen und durch Ergänzung des Standardprotokolls durch eine Lernprobe (Probe Trial) und Kontrollversuch mit sichtbarer Plattform das Vermögen zu Strategiewechsel und Umlernen erfasst (Bert et al., 2002; Harker et Whisaw, 2002).

3.) Bisherige Verhaltenstests und biochemische Untersuchungen weisen auf Hemisphärendominanz, Asymmetrie und „Händigkeit“ bei Nagetieren hin, ebenso konnten unterschiedliche Auswirkungen links- vs. rechts-hemisphärieller Läsionen nachgewiesen werden (Barnéoud et van der Loos, 1993; Robinson, 1979).

Mit dem Ziel, genauere Erkenntnisse für unser Modell zu gewinnen, wurden Tiere mit linker oder rechter MCAo sowie Sham operierte und Kontrolltiere 8–10 Wochen nach Insult auf spontane lokomotorische Aktivität sowie Angstverhalten (Elevated Plus Maze) und Depression (Forced Swim Test) untersucht.

4.) Um hierfür ursächliche neurobiochemische Schwankungen und histologische Schäden zu erfassen, wurden Proben unterschiedlicher Hirnregionen auf Monoamin- und Aminosäurespiegel untersucht und mit den Ergebnissen der Verhaltensuntersuchungen korreliert. Ein anderer Teil der Hirne wurde der histologischen und immunhistochemischen Analyse 10 Wochen nach Ischämie zugeführt.

3 Methodik

Tiere und Ischämiemodell

Die Tierexperimente sind in strenger Einhaltung der Tierschutzrichtlinien durchgeführt und im Tierschutzvorhaben G 0113/2000 Endres vom Berliner Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi) genehmigt worden. Für die Versuche wurden SVJ/129 Wildtypmäuse des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) Berlin verwendet.

In Halothan-Narkose und bei konstanter Körpertemperatur erfolgte die Ischämieinduktion im Versorgungsbereich der linken oder rechten A. cerebri media. Dazu wird ein silikonbeschichtetes Monofilament in die linke A. carotis communis eingebracht und in die A. carotis interna weiter fortgeführt, um den Abgang der A. cerebri media zu verlegen. Nach 30 min Ischämie wurde das jeweilige Filament wieder entfernt, um die Reperfusion zu ermöglichen (Endres et al., 1998).

Neurologisches Defizit

Die Einschätzung des neurologischen Defizits wurde nach den Bederson-Kriterien von einem unabhängigen Untersucher 6 Wochen nach Ischämieinduktion vorgenommen. Dabei gilt ein Score von 0 = als normal, 1 = als mildes, 2 = als mäßiges und 3 = als schweres neurologisches Defizit (Bederson et al., 1986).

Rotarod Koordination

Die Messung von Koordinations- und Balancefähigkeit erfolgte individuell auf einer sich drehenden Walze (Rotarod, TSE Systems; 3 cm Durchmesser). Nach 3 x 120 sek. Training bei 4 *rounds per minute* (rpm) wurde am nächsten Tag mit zunehmender Umdrehungszahl (4–40 rpm) die Zeit bis zum Kontaktverlust der Maus gemessen.

Video Tracking, Erfassung und Auswertung der Verhaltensdaten

Während der Explorationstests (Water Maze, Elevated Plus Maze und der spontanen lokomotorischen Aktivität) wurde software-gestützt (VideoMot 2; TSE Systems) das Kamerabild analysiert. Die Kamera befand sich dabei senkrecht über dem Versuchsaufbau. Anhand von Kontrastwerten wurden Tiere identifiziert und in zeitlicher und örtlicher Auflösung (Abtastrate bis 12,5 Hz; 640 x 480 Bildpunkte) Bewegungsmuster aufgezeichnet und ausgewertet.

Water Maze

Experimente wurden anhand bewährter Protokolle mit geringer Abwandlung durchgeführt (Bert et al., 2002; Harker et Whisaw, 2002). Der Wassertank (101 cm Durchmesser, 50 cm Höhe) wurde bis 30 cm mit 15°C milchtrüben Wasser gefüllt und räumliche Orientierungshilfen (Quadrat, Kreis, Dreieck, Kreuz), im gleichen Abstand zueinander, gut sichtbar von der Wasseroberfläche angebracht. Eine Plattform aus durchsichtigem Plexiglas® (11 x 11 cm²) befand sich nicht sichtbar 1 cm unter der Wasseroberfläche mittig in einem von vier möglichen Quadranten.

Nach einmaliger Gewöhnung starten die Tiere über 7 Tage 3x täglich in den übrigen 3 Quadranten. Zeit, Strecke, Geschwindigkeit, wie auch das Bewegungsmuster bis zum Erreichen der Plattform wird aufgezeichnet und eine Lernkurve erstellt. Für den am 8 Tag durchgeführten „Probe Trial“ wird die Plattform entfernt, dabei wird die Zeit im Zielbereich (Target Zone = ursprüngliche Stelle der Plattform), die Zeit im Zielquadranten sowie die Häufigkeit des Passierens des Zielbereiches (Target Crossings) gemessen. An Tag 9 (Relearning Task) befindet sich die Plattform im gegenüberliegenden Quadranten, und die Fähigkeit, innerhalb von drei Versuchen umzulernen wird bewertet. Hierfür ist die Plattform durch einen schmalen, über der Wasseroberfläche sichtbaren Zylinder markiert.

Die maximale Schwimmzeit jedes Versuches beträgt 90 sek., es folgen bei den Lernversuchen 30 sek. Orientierungszeit auf der Plattform. Bei Nicht-Erreichen innerhalb von 90 sek. wird das Tier zur Plattform geführt.

Spontane Lokomotorische Aktivität

In neutraler abgedunkelter Umgebung wurden Tiere über acht Stunden gefilmt und computergestützt kumulative Aktivität (Zeit, Strecke und Geschwindigkeit) bestimmt. Dabei befanden sich die Tiere einzeln in 30x20x15 cm messenden Käfigen, die für die verschiedenen Gruppen im Schachbrettmuster angeordnet sind. Ein Schwellenwert ermöglicht die ausschließliche Erfassung echter Lokomotion. Bewegungen durch Atmung oder Selbstpflege der Tiere werden nicht erfasst.

Elevated Plus Maze

Das Elevated Plus Maze ist in der Verhaltensforschung zur Bestimmung von angeborenem oder erworbenem Angstverhalten bei Nagetieren weit verbreitet und wurde wie vorbeschrieben durchgeführt (Lister, 1987; Rodgers et al., 2002). Der Aufbau für Mäuse besteht aus 4 rechtwinklig verbundenen Armen (Länge 30, Breite 5 cm) und einer zentralen Fläche von 5x5 cm und ist 50 cm vom Boden erhöht. Zwei gegenüberliegende Arme sind von 15 cm hohen Wänden umgeben (Closed Arms), die anderen zwei Arme lediglich von einer 0,25 cm erhöhten Umrandung (Open Arms). In schallarmer und abgedunkelter, neutraler Umgebung wird das Tier zentral mit Blick in Richtung eines geschlossenen Armes aufgesetzt und Lokomotion über 5 min mittels Kamera-Computer-System beobachtet und gemessen. Die kumulative Zeit und Anzahl der Aufenthalte auf den ungeschützten Armen verhält sich dabei antiproportional zum Ängstlichkeitsniveau.

Forced Swim Test

Depressions-ähnliches Verhalten, welches auch im Tiermodell auf antidepressive Behandlung anspricht, wurde im modifizierten Forced Swim Test wie vorbeschrieben untersucht (Cryan et al., 2002; Lucki, 1997; Porsolt et al., 1977). Die Tiere werden einzeln in einen zur Hälfte mit 21°C warmem Wasser gefüllten aufrechten Zylinder (15x21cm) gegeben und über 5 min das vorherrschende Verhalten von einem unabhängigen Untersucher bestimmt. Dabei wird unter definierten Kriterien zwischen Schwimmbewegung (Swimming), Aufwärtsbewegung (Climbing) und Passivität (Floating) unterschieden und die jeweilige Latenz, Gesamtzeit und Häufigkeit des angenommenen Verhaltens bestimmt.

Versuche der Situation zu entkommen (Swimming, Climbing) geben Anhalt über das Aktivitätsniveau, die Latenz bis zur Passivität bestimmen das Maß Depressions-ähnlichen Verhaltens.

Probeentnahme, Homogenisation und Neurochemische Analyse

Nach Beendigung der Verhaltensexperimente und Tötung der Mäuse wurden zügig die Gehirne entnommen und Proben von Kortex, Striatum, Septum und Hippocampus beider Hemisphären gewonnen und in flüssigem Stickstoff bei -80 °C schockgefroren. Vor der neurochemischen Quantifizierung wurden die Proben gewogen und mit

Ultraschallwellen homogenisiert. Nach Zugabe von 0,2 molarem Perchlorat und Ultrazentrifugation bei 25.000 g wurde der Überstand für die Bestimmung von Noradrenalin (NA), Dopamin (DA), 5-Hydroxytryptamin (5-HT) und deren Stoffwechselprodukte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 5-Hydroxyindol Essig (5-HIAA) mit *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) verwendet (Felice et al., 1978; Sperk, 1982; Sperk et al., 1981).

Für die Bestimmung von Glutamat, Gammaaminobuttersäure (GABA) und Taurin erfolgte anstelle von Perchlorat die Beigabe von Methanol, und nach Ultrazentrifugation zur Entfernung präzipitierter Proteine, die HPLC wie vorbeschrieben (Piepponen et Skujins 2001).

Schließlich diente der übrige Teil des Homogenisats der Cholin-Azetyl-Transferase (ChAT) Aktivitätsbestimmung nach Fonnum (1975).

Gewebeaufbereitung und Immunhistochemie

In tiefer Narkose erfolgte die in-situ Fixation (transkardiale Perfusion) und Postfixation der Hirne über 24 Stunden mit 4% Paraformaldehydlösung. Nach Anfertigung wurden 40µm coronare Gehirnschnitte mit einem der folgenden primären Antikörper inkubiert: Neuronale Nuclei (NeuN), mikrotubuli assoziiertes Protein 2 (MAP-2), Cholin-Azetyl-Transferase (ChAT), Parvalbumin (Parv), Somatostatin (Som) und Calretinin (Cal). Es folgte die Inkubation mit biotiniliertem Sekundärantikörper und 3,3'-Diaminobenzidin als Chromogen oder für Immunautoradiografie mit [³⁵S] besetztem anti-NeuN Sekundärantikörper.

Für terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) vermittelte dUTP-Biotin „nick end labeling“ (TUNEL) wurden Gehirne unfixiert in Isopentan schockgefroren, 10µm Schnittserien angefertigt und Reagenzien nach Anweisung des Herstellers angewendet. Das gleiche Verfahren zur Gehirnschnittanfertigung wurde auch für die Autoradiografie mit den Radioliganden [³H]PK1195, [³H]Flumazenil und [³H]CGP39653 angewendet (siehe unten).

Zellzählung

Auf jeweils 3 definierten und repräsentativen Hirnschnitten wurde computergestützt die Zelldichte und Gesamtzahl immunpositiver (NeuN+, ChAT+, Parv+, Som+, Cal+) Zellen im ischämischen und contralateralen Striatum untersucht.

Für die Ermittlung überlebender (ChAT+ und Cal+) Interneurone wurden zudem bei 400fach Vergrößerung von jeweils vier definierten Hirnschnitten sieben zufällige Gesichtsfelder ausgewählt.

Läsionsausmessung und Paraffinhistologie

Die Infarktmetrie erfolgte computergestützt anhand histologischer Standardfärbungen Hämatoxylin-Eosin (H&E), Kresyl-Violet (Nisslfärbung) und den anti-NeuN demarkierten Arealen. Das Gesamtinfraktvolumen wird entweder durch direkte Aufsummierung der Infarktareale oder aus der Differenz zwischen kontralateraler und nicht-infarzierter ipsilateraler Hemisphäre bestimmt. Die Differenz zwischen direktem und indirektem Infarktmetrie entspricht dem Hirnödeme im Infarktgebiet (Endres et al., 1998).

Für die Paraffin Histologie wurden Hirne nach transkardialer Perfusion mit 20% Formalin und 10% Eisessig auf Alkoholbasis in Paraffin eingebettet. Angefertigte 8µm Hirnschnitte wurden mit H&E, Nisslfärbung, und Hämatoxylin-Vanadium-Acid-Fuchsin (VAF) angefärbt (Victorov et al., 2000).

Autoradiografie

Schockgefrorene Gehirnschnitte wurden mit [³H]CGP39653, ein N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor Ligand, [³H]Flumazenil und [³H]PK1195, Liganden zentraler bzw. peripherer Benzodiazepinrezeptoren inkubiert. Die Darstellung der Verteilung radioaktiver Liganden wird nach Exposition der Schnitte auf ³H-Hyperfilm erreicht.

Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Ein statistischer Vergleich erfolgte nach *two-way repeated measures* ANOVA (Water Maze) und *one-way* ANOVA (Monoamin- und Aminosäurenspiegel, Elevated Plus Maze, Forced Swimming Test, Spontane Lokomotorische Aktivität) mit Tukey post hoc Test. Weiterhin fand Anwendung: Mann-Whitney rank-sum test (neurologisches Defizit Score, Rotarod), Student *t* test für Vergleiche zwischen linker und rechter Hirnschämie und die Pearson Korrelation (Monoaminspiegel mit Verhaltenstests, Läsionsgröße mit Verhaltenstest). $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Arbeit werden in den im Anhang der Dissertationsschrift genannten Publikationen wie folgt aufgeführt und entsprechend zitiert:

Referenz #1: Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Bruck W, Dirnagl U, Veh RW, Endres M (2003) Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol.* 13(4):452-64

Referenz #2: Winter B, Bert B, Fink H, Dirnagl U, Endres M (2004) Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. *Stroke.* 35(1):191-5.

Referenz #3: Winter B, Juckel G, Viktorov I, Katchanov J, Gietz A, Sohr R, Balkaya M, Hörtnagl H, Endres M (2005) Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice. *Biol Psychiatry* 57(10):1166-75

Selektiver neuronaler Zellschaden

Die Färbung mit H&E, VAF und Nisslfärbung der in Paraffin eingebetteten 8µm Schnitte zeigte noch 10 Wochen später die Begrenzung der ischämischen Läsion auf das ipsilaterale Striatum und den neuronalen Zellverlust mit moderater Gliose (keine Pannekrose). Kleine und mittlere striatale Neurone waren überwiegend degeneriert, wohingegen größere (den cholinergen Neuronen entsprechend) den Schaden überlebten. (Referenz #3)

30 min A. cerebri media Ischämie resultiert in einem verzögerten neuronalen Zelltod (Endres et al., 1998; Katchanov et al., 2001). So konnte zu verschiedenen Zeitpunkten (ein Tag, 3 Tage, 3 Wochen 6 Wochen und 10 Wochen) nach Insult mit H&E, VAF und Nisslfärbung, TUNEL und immunhistochemischen Methoden gegen die Antigene MAP-2, NeuN, µ-Opioid-Rezeptor, L-Enkephalin, Neurokinin B, ChAT, Parv, Cal und Som der Zeitverlauf des Schadensmodells und auch eine selektive neuronale Schädigung charakterisiert werden. Matrix und Striosomen (µ-Opioid-Rezeptor) des Neostriatums waren dabei gleichermaßen betroffen.

Der dendritische (MAP-2) Marker, anti-neuronale Nuclei (NeuN) und auch TUNEL Immunhistochemie demarkierten eine konkordante, scharfrandige Läsion durch Verlust, bzw. Auftreten von Immunpositivität. Vorhergehende Studien zeigten durch Doppelmarkierung mit TUNEL und spezifischen Zellmarkern, dass ausschließlich

neuronalen Zellen (NeuN+) vom verzögerten Zelltod betroffen sind und nicht-neuronale Zellen des Ischämieareals den Insult überleben (Endres et al., 1998; Katchanov et al., 2001). Der Zellschaden ist in erster Linie durch Verlust L-Enkephalin+ (Typ I) und Neurokinin B+ (Typ II) *spiny* Projektionsneurone (SPN) gekennzeichnet, während die großen Gruppen der Interneurone des Striatums mindestens 6 Wochen überleben. So waren 10 Wochen nach Ischämie cholinerge und somatostatinerge Interneurone nicht betroffen, Parvalbuminerge und Calretinerge wiesen erst zu diesem späten Zeitpunkt eine nur relative Resistenz gegenüber der Schädigung auf. (30–35% Reduktion). Interessanterweise zeigte der frühe Signalverlust des [³⁵S] markierten neuronalen Markers NeuN eine partielle Rückbildung nach 6 Wochen. (Referenz #1, #3)

Autoradiografisch zeigte sich als Zeichen der Microglia Aktivierung nach 3 Tagen die Zunahme von peripheren Benzodiazepinrezeptoren mit maximaler Ausprägung bei 10 Tagen bis 3 Wochen. Zentrale Benzodiazepinrezeptoren zeigten die größte Dichte in Layer VI des zerebralen Kortex und eine mittlere Dichte im Striatum, eine ähnliche Verteilung fand sich bei NMDA-Rezeptoren. Eine Reduktion dieser beiden neuronalen Rezeptorentypen konnte erst nach 10 Tagen im Ischämieareal beobachtet werden. (Referenz #1)

Diffuser neuronaler Schaden fand sich auch extrafokal in ipsi- und contralateralen Hirnregionen: Im Großhirn in Form hyperchromatischer und azidophiler Neurone (Amygdala und Hippocampus-CA3 Sektor ipsilateral, Hypothalamus beidseitig, laterales Pallidum contralateral als Teil des cholinergen Systems). Im Mittelhirn war ipsilateral die Neuronenzahl der Substantia Nigra Pars Compacta reduziert. (Referenz #3)

Zusammen betrachtet führt 30min MCAo und Reperfusion zu subtotalem verzögerten Zelltod von *spiny* Projektionsneuronen und diffuser neuronaler Zellschädigung in entfernten Hirnregionen bei überwiegendem Überleben der Interneurone.

Sensomotorischer Phänotyp

Alle Tiere mit MCAo zeigten nach 30 min Reperfusion ein Neurologisches Defizit von ≥ 2 nach Bederson, 6 Wochen nach ischämischen Insult ergab sich ein mittleres Residuum von 1.0 (typischerweise eine spastische Vorderpfotenparese), unteres und oberes Quartil = 0.5 und 1.0. Sham operierte Tiere zeigten zu keiner Zeit fokalneurologische Zeichen. ($p=0.01$, Mann Whitney rank-sum test).

Das Rotarod konnte 6 Wochen nach Insult bezüglich der Koordinationsfähigkeit kein funktionelles Defizit gegenüber Sham Tieren nachweisen, ebenso ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Schwimm- oder Laufgeschwindigkeit (Referenz #2, #3).

Lernen und Umlernen im Wasserlabyrinth (Water Maze)

Tiere aus beiden untersuchten Gruppen (MCAo und Sham) zeigten eine gute Auffassungsgabe im Erlernen der nicht sichtbaren Plattformposition anhand der räumlichen Orientierungshilfen. So zeigte die Messung der Weglängen und der Latenzen eine signifikante Lernkurve mit Werten nahe der Asymptote bereits am 5. von 7 Lerntagen, aber keine Unterschiede bezüglich des Lernvermögens zwischen MCAo und Sham.

Die Lernprobe an Tag 8 zeigte Unterschiede im Umgang mit der neuen Aufgabe. Da keine Plattform aufzufinden war, näherten sich Tiere der Gruppe Sham der erlernten Position abnehmend im Zweiten, und bedeutend weniger im letzten Drittel, während Tiere der Gruppe MCAo über 3x30 sek. den gleichen Anteil der gemessenen Verweilzeit im Zielbereich verbrachten.

Als Indikator eines generellen Lernerfolgs wurden in beiden Gruppen überproportionale Verweilzeiten in Zielquadrant und Zielzone (im Vergleich mit entsprechenden nicht präferierten Zonen) gemessen.

Die nächste Aufgabe bestand darin, eine jetzt sichtbare Plattform gegenüber der erlernten Position zu erreichen. Innerhalb von 3 Versuchen besserten sich Sham Tiere, während MCAo Tiere kein signifikantes Niveau erreichten. Dies lag in erster Linie daran, dass MCAo Tiere sowohl im 2. als auch 3. Versuch weiterhin zunächst im früheren Quadranten der Plattform suchten. Sowohl die Latenzen des 2. und 3. Versuches als auch die im früheren Quadranten gemessene Verweildauer korrelierten signifikant mit der Läsionsgröße. (Referenz #2)

Monoamin- und Aminosäurenspiegel

Bis 10 Wochen nach Ischämie kommt es ipsi- wie kontralateral zu Veränderungen striataler Monoamine und deren Metabolite. Bei Tieren mit MCAo rechts konnten höhere Konzentrationen an 5-HIAA gemessen werden. Unabhängig der Lokalisation (linke oder rechte MCAo) fanden wir erhöhte NA und erniedrigte DA und HVA Spiegel sowie einen Trend zu niedrigen ChAT Spiegeln.

Im Kortex, Septum und Hippocampus fand sich keine wesentliche Modifikation der Monoamine, Aminosäuren oder ChAT Konzentration. (Referenz #3)

Spontane Lokomotorische Aktivität

Gemessen an zurückgelegter Strecke und aktiver Zeit waren Tiere nach rechter MCAo (rMCAo) aktiver als Sham Tiere, erhöhte Aktivität nach linker MCAo (lMCAo) erreichte nicht statistische Signifikanz. Bei diesen Tieren konnte vielmehr verminderte Aktivität innerhalb der ersten 15 min im Vergleich zu rMCAo festgestellt werden („response to novelty“).

Eine hohe Signifikanz erreichte die Korrelation von NA sowie von 5-HT des rechten Striatums mit der gemessenen Aktivität. Korrelationen des linken Striatums waren nicht signifikant. (Referenz #3)

Elevated Plus Maze

Der Nachweis von Angstverhalten nach MCAo links („post-stroke anxiety“) konnte im Elevated Plus Maze erbracht werden. Exploration der offenen Arme war signifikant herabgesetzt bei Tieren mit lMCAo im Vergleich zu Sham, rMCAo wies hierbei keine signifikanten Effekte auf. Laufgeschwindigkeit und Aktivität während der Testung waren nicht unterschiedlich, der Mangel an „Open Arm“ Exploration lässt sich also nicht durch offensichtliche Defizite motorischer Fähigkeiten oder der Aktivität begründen.

Die auf den offenen Armen gemessene Zeit aller Tiere korrelierte negativ mit striatalen 5-HIAA Spiegeln. (Referenz #3)

Forced Swim Test

Die Untersuchung von Depressions-ähnlichem Verhalten nach MCAo („post-stroke depression“) erfolgte im Forced Swim Test. Weder die üblicherweise als Indikator gemessene Zeit bis zur Passivität noch die Gesamtzeit der Verhaltensweisen Schwimmen, Klettern (Climbing) oder Passivität (Floating) zeigten signifikante Unterschiede. Tiere nach lMCAo oder rMCAo gingen weniger häufig in Passivität über (dafür länger), darüber hinaus waren Tiere mit rMCAo bedeutend häufiger mit Klettern beschäftigt. Zusammen betrachtet ist zum getesteten Zeitpunkt 10 Wochen nach linker oder rechter MCAo kein Depressions-ähnliches Verhalten nachzuweisen. (Referenz #3)

5 Diskussion

Wir haben die Entstehung des zellulären Schadens im Zeitverlauf und die selektive Vulnerabilität verschiedener Subtypen von Neuronen im Striatum nach 30 min MCAo und Reperfusion in der 129/SV Maus charakterisiert. Hervorzuheben ist die Erkenntnis, dass der verzögerte Zelltod in erster Linie *spiny* Projektionsneurone (SPN) im Striatum betrifft; im Kontrast dazu wiesen die wesentlichen Subtypen von Interneuronen eine Resistenz gegenüber milder Ischämie auf. Verschiedene Studien legen nahe, dass verschiedene Neuronenpopulationen innerhalb des Striatums eine selektive Vulnerabilität gegenüber Ischämie besitzen: transiente globale Ischämie bei der Wüstenrennmaus (Chesselet et al., 1990; Tortosa et Ferrer 1993), transiente globale Ischämie bei Ratten (Larsson et al., 2001; Meade et al., 2000) und fokale Hirnischämie bei Ratten (Goto et al., 1993; Yamada et al., 1995). Andererseits schreiben einige Autoren, dass Interneurone nicht widerstandsfähiger, sondern lediglich verzögert dem ischämischen Zelltod unterliegen (Araki et al., 1994). Aus diesem Grund untersuchten wir den neuronalen Zellverlust auch zu späten Zeitpunkten nach Ischämie. 10 Wochen nach Ischämie zeigte die Läsion einen nahezu kompletten Verlust an MAP-2 Immunreaktivität sowie eine größtenteils reduzierte Anzahl NeuN+ Zellen im ischämischen Striatum. Cholinerge und Somatostatinerge überlebten unbeeinflusst in ihrer Anzahl und Zelldichte. Es besteht eine Kontroverse bezüglich der Vulnerabilität parvalbuminhaltiger Interneurone bei ischämischem Insult. Während Goto et al. (1993) bei fokaler Hirnischämie der Ratte selektives Überleben dieser Zellen zeigten, fanden Andsberg et al. (2002) eine signifikante Schädigung Parvalbumin exprimierender Interneurone (~70% Verlust nach 30min MCAo bei der Ratte). Wir fanden in unserem Modell zunächst keinen signifikanten Verlust parvalbuminerger und calretinerger Neurone bis 2 Wochen, dafür jedoch morphologische Veränderungen wie der Verlust von Zell-zu-Zell Kontakten durch das Zurückziehen der dendritischen Fortsätze. 10 Wochen nach Ischämie zeigte sich dann ein relativer Zellverlust, die Anzahl Parvalbuminerger und Calretinerger Interneurone war um 30–35% reduziert. Die Zelldichte war dabei unverändert als mögliche Folge der Gewebeschrumpfung innerhalb der Läsion.

Der Mechanismus, der zu erhöhter Widerstandsfähigkeit von Interneuronen führt, könnte auf die unterschiedlichen synaptischen Verbindungen beteiligter Neurone zurückgehen. Die vom (Motor)Kortex hervorgehenden Neuriten stellen direkte

synaptische Kontakte mit SPN her mit der exzitatorischen Aminosäure Glutamat als Neurotransmitter. Ischämische corticostriatale Fasern könnten durch Depolarisation zu nachfolgender exzessiver (zytotoxischer) Transmitterfreisetzung führen (Fonnum et al., 1981). Von der Präsynapse ausgehende Excitotoxizität könnte so zu einer selektiven Schädigung der SPN und nicht von Interneuronen führen (Calabresi et al., 1998). Andere Faktoren, die der spezifischen Vulnerabilität zu Grunde liegen, könnten durch Kalzium bindende Proteine (Nitsch et al., 1989) oder durch Ischämie bedingte ionische Mechanismen mit Veränderungen des Membranpotentials verursacht sein (Cenzonze et al., 2001).

Diese Ergebnisse erweitern unsere vorherigen Daten zu spezifischer neuronaler Vulnerabilität nach 30 min fokaler Hirnischämie. Durch Zellzählung konnten wir zeigen, dass ungefähr 10–15% aller Neurone bis zu 3 Wochen nach Ischämie im Striatum überleben. Jetzt wissen wir, dass diese Zellen Interneurone darstellen, während Projektionsneurone (SPN) absterben. SPN repräsentieren über 90% der Zellen im Striatum von Nagetieren. Sie erhalten den Großteil striataler Afferenzen und sind für nahezu den gesamten Output dieser Struktur verantwortlich (Gerfen, 1992; Graybiel, 1990; Kawaguchi et al., 1995). SPN projizieren zum lateralen Pallidum mit L-Enkephalin als Cotransmitter und Marker, SPN mit Projektion zum medialen Pallidum und der Substantia Nigra lassen sich durch Neurokinin B Antikörper markieren. Der gleichermaßen ausgeprägte neuronale Zellverlust führt zu der Annahme, dass bezüglich der selektiven Vulnerabilität zwischen Typ I und Typ II der SPN keine Unterschiede bestehen. Ebenso waren Striosomen und Matrix Kompartimente des Striatums vergleichbar anfällig gegenüber transienter Ischämie (Gerfen, 1992; Johnston et al., 1990; Pert et al., 1976).

Unter Anwendung autoradiografischer Methoden konnte eine starke Zunahme der Bindungskapazität von peripheren Benzodiazepinrezeptor-Liganden festgestellt werden. Dies entspricht am ehesten der Mikroglia Invasion, die sich am Rande der Läsion 3 Tage, und das gesamte Striatum umfassend zwischen 10 Tagen bis 6 Wochen nach Ischämie nachweisen ließ. Begleitend kennzeichnete der Verlust von NMDA- und zentralen Benzodiazepinrezeptoren ab Tag 10 die neuronale Schädigung. Bei Schlaganfallpatienten spricht eine anhaltende Bindung des peripheren Benzodiazepinrezeptor-Liganden PK1195 im Thalamus für einen aktiven Gewebeprozesses, der noch viele Monate später zu Mikroglia Aktivierung führt (Pappata et al., 2000). Auch im experimentellen Schlaganfallmodell wird eine PK1195

Zunahme thalamischer Regionen beobachtet, die über 4 Wochen andauert (Myers et al., 1991a, 1991b). Parallele immunzytochemische Untersuchungen bekräftigen die Verbindung zwischen der Zunahme von PK11195 Bindungen und der vermehrten Expression peripherer Benzodiazepinbindungsstellen durch aktivierte Mikroglia (Banati et al., 1997).

Darüber hinaus entdeckten wir extrafokal diffusen neuronalen Schaden in weiteren Hirnregionen einschließlich ipsi- und contralateralen Strukturen des limbischen Systems, Basalganglienkerne des aufsteigenden cholinergen Systems, Hypothalamus und Substantia Nigra. Die meisten dieser Regionen haben synaptische Verbindungen mit der ischämischen Läsion. Schäden innerhalb dieser Regionen könnten durch eine Kette transneuronaler und transsynaptischer Prozesse verursacht sein (Garcia et al., 1978; Nakano et al., 1990). Eine solche extrafokale Neurodegeneration kann Verhalten und Neurotransmittersynthese verändern, so deckten sich neuronale Schäden der Substantia Nigra mit niedrigen DA Spiegeln des ischämischen Striatums.

Unabhängige Studien stützen unsere Erfahrungen, die bei Mensch und Tier einen selektiven neuronalen Zelltod, gefolgt von Glia Proliferation im Striatum nach kurzen ischämischen Episoden feststellen (Fujioka et al., 2003).

Wichtige Erkenntnisse dieser Studien waren die mit dem zellulären Schaden verbundenen funktionellen Defizite. Die milde Ischämie bei Mäusen war gefolgt von einem eindrucksvollen Wiedererlangen der sensomotorischen Qualitäten wie Balance, Lauf- und Schwimgeschwindigkeit. Die bei Patienten verbreiteten Komorbiditäten des Schlaganfalls wie Störungen der Kognition, des Affekts und der Psychomotorik traten zu Tage. Voraussetzung für eine Beurteilung dieser „höheren“ Hirnfunktionen im Tierexperiment ist der Ausschluss von Störvariablen wie die eines motorisch-funktionellen Defizits. Ein letztlich nicht ganz auszuschließender Einfluss des residualen neurologischen Defizits gehört zu den Vorbehalten dieser Daten. Allerdings benützen Mäuse im Gegensatz zu Ratten ihren Schwanz und nicht ihre Vorderpfoten für Schwimmbewegungen. Im Rotarod getestete sensomotorische Leistungen, ebenso wie gemessene Lauf- und Schwimgeschwindigkeiten sollten zeigen, dass die Verhaltensexperimente nicht durch Confounder wie Paresen, Sensibiliäts- oder Visusstörungen verfälscht wurden. Diese hätten sowohl den Ausgangswert als auch den weiteren Verlauf der Akquisition (die sich auf visuelle Orientierungshilfen stützt) im Water Maze bestimmt.

Die Verhaltenstests fanden 6–10 Wochen nach 30min MCAo statt, wenn verzögerter Zelltod und sekundäre Gewebereaktion wie z.B. Inflammation abgeschlossen sind und das milde sensomotorische Defizit keiner weiteren Verbesserung mehr zugänglich ist, verglichen mit 72 Stunden nach Insult (Endres et al., 1998, Katchanov et al., 2001).

6 Wochen nach Ischämie war keine Einschränkung des einfachen Erlernens einer Position im Wasserlabyrinth nachzuweisen. Die Tiere zeigten über 7 Tage der Lernphase vergleichbare Latenzen und Weglängen und am 8. Tag mit Sham vergleichbare Retentionsparameter.

Untersuchungen an der Ratte zeigten, dass Läsionen im Nucleus Caudatus und Putamen Akquisition, Retention sowie Strategiewahl im Water Maze beeinträchtigen. (Whishaw et al., 1987) Ebenso berichten einige Autoren über Störungen der Erinnerung nach MCAo bei Ratten bei dem Einsatz von Vermeidungs- und Orientierungsaufgaben (Yamamoto et al., 1989; Markgraf et al., 1995; Okada et al., 1995a, 1995b; Whal et al., 1992). In unserem Modell waren primäres Erlernen und Retention räumlicher Information ungestört. Auch Gupta et al. fand keine Beeinträchtigung von Lernen und Gedächtnis im Vermeidungsverhalten nach transientser fokaler Ischämie bei Ratten. Andererseits kann diese Unschärfe oftmals durch Unterschiede in Lokalisation und Schwere des Schadensmodells sowie Dimensionen, Schweregrad und Versuchsprotokoll des Verhaltenstests erklärt werden.

Nichtsdestoweniger zeigten sich sowohl im *Probe Trial* als auch im *Relearning Task* diskrete Unterschiede. Obgleich MCAo Tiere innerhalb der ersten 30 Sekunden ebensoviel Zeit wie Sham Tiere im Zielbereich der vermissten Plattform verbrachten, änderten sie nicht ihre Strategie, um in der verbleibenden Minute die übrigen Quadranten des Schwimmbeckens zu explorieren. Im Gegensatz dazu zogen Sham Tiere in dieser Zeit zunehmend weitere Bahnen auch innerhalb der anderen Quadranten. Im *Relearning Task* (Umlernen auf eine neue, jetzt sichtbare Position) neigten MCAo Tiere dazu, weiterhin an der alten Stelle zu suchen. Diese Eigenschaft nahm mit dem neuronalen Zellverlust der Tiere zu. So korrelierten sowohl die Latenzen des 2. und 3. Versuches der einzelnen MCAo Tiere als auch die im ehemaligen Zielquadranten gemessene Zeit des *Relearning Tasks* mit dem NeuN demarkierten Areal. Es liegt nahe, dass Tiere mit größeren Läsionen länger zur Komplettierung des Tests benötigten, da sie an der alten, nicht mehr aktuellen Position der Plattform verharrten. Ein solcher Mangel an Flexibilität im Verhalten auf eine neue Aufgabe hin

(Strategiewechsel) ähnelt dem dysexekutivem Syndrom, beobachtet bei Patienten mit Störungen der Basalganglien (Inzelberg et al., 2001).

Nach weitgehender Charakterisierung des Schadensmodells auf histo- und zytologischer Ebene kennen wir jetzt Langzeitschäden funktioneller Art. Auch Unterschiede in der Hemisphärenlokalisierung der Ischämie ließen sich ausmachen. Rechts-hemisphärielle Ischämie führt zu einem hyperaktiven Phänotyp, links-hemisphärielle Ischämie zu vermehrter Ängstlichkeit im Vergleich mit Sham operierten Tieren. Robinson (1979) beschrieb einen transienten hyperaktiven Phänotyp bei Ratten mit rechts-hemisphäriellem Infarkt und vermutete eine Beteiligung katecholaminerger Bahnen, insbesondere noradrenerger als Ursache von *post-stroke* Hyperaktivität nach zerebraler Ischämie. Durch unsere Untersuchungen fanden wir, dass NA Spiegel nach Ischämie im Striatum erhöht waren und mit lokomotorischer Aktivität korrelierten. Interessanterweise ergab sich ein signifikanter Korrelations-Koeffizient nur für das rechte Striatum der IMCAo Tiere. Angemerkt sei hier eine große Streuweite (SEM) der neurochemische Analysen. Die NA Zunahme resultiert möglicherweise durch Einwachsen sympathischer noradrenerger Fasern des oberen Grenzstrangganglions, wie es eine Reihe von Studien zu Hirnläsionen zeigten (Crutscher, 1987; Harrel et Parsons, 1988; Jackisch et al., 1995; Kubota et al., 2002; Robinson et al., 1988). Die Dichte einsprossender Fasern und der damit verbundene Anstieg der NA Spiegel haben direkte Auswirkungen auf Verhalten und korrelierten mit dem Ausmaß der Läsion. Interessanterweise beschrieb Robinson (1979) keine Hyperaktivität bei links-hemisphäriellen Läsionen, dem entgegen stellten wir einen Trend zu höherer Aktivität bei Tieren mit IMCAo fest. Weitergehend korrelierten auch 5-HT Spiegel mit der lokomotorischen Aktivität. Vom 5-HT System wird angenommen, dass es motorische Kontrolle erleichtert (Jacobs et Fornal, 1993). Die Bedeutung der Korrelation von 5-HT (und auch NA) mit der Aktivität ist jedoch nicht geklärt. Gegenwärtig ist nicht sicher, ob der im Tiermodell beobachtete Phänotyp ein klinisches Korrelat bei Schlaganfallpatienten besitzt. Manische Symptome nach Schlaganfall sind bei ca. 1% der Patienten beschrieben (Robinson et al., 1988) und mit rechts-hemisphärieller Läsion (basotemporal oder orbitofrontal) assoziiert (Cummings et Mendez, 1984; Robinson et al., 1988, 1997; Starkstein et al., 1991). Insomnie ist eine relativ häufige und wahrscheinlich unterschätzte Beschwerde, die aber über 50% der Patienten betrifft (Leppävuori et al., 2002).

Vermehrte Ängstlichkeit bei Mäusen nach IMCAo ist ein weiterer wichtiger Befund, da diese weniger die offenen „exponierten“ Arme des Elevated Plus Maze explorierten, ein Indikator, der vielmals zur Ermittlung von Ängstlichkeit oder Furcht bei Nagern verwendet wird (Lister 1987; Nakashima et al., 2003; Rodgers et al., 2002). Erwähnenswert ist, dass dieses nicht durch Störgrößen wie verminderte Lokomotion oder Koordinationsstörungen zu erklären ist. Paradoxerweise weisen Patienten mit Angststörungen erhöhte 5-HT Spiegel auf (Nutt, 2001). Dazu passend war die gemessene „Open Arm“ Zeit negativ mit den 5-HT Spiegeln korreliert, die Bedeutung dieses Befundes bleibt allerdings noch zu erforschen. Klinische Studien berichten über eine hohe Prävalenz (zwischen 9–27%) von Angststörungen bei Schlaganfallpatienten (Aström, 1996; Burvill et al., 1995a; Castillo et al., 1995; Leppävuori et al., 2003; Robinson 1997). Interessanterweise treten generalisierte Angststörungen häufiger bei Patienten mit Major-Stroke-Syndrom des dominanten und vorderen Kreislaufs auf und sind typischerweise mit Läsionen des linken dorsolateralen Frontallappens assoziiert, wie es auch bei uns der Fall ist (Leppävuori et al., 2003; Robinson, 1997; Starkstein et Robinson 1989). Natürlich gibt es neben dem Elevated Plus Maze weitere Methoden, um Angstverhalten zu ermitteln. Neugier vs. Angst vor Neuem wird zum Beispiel im offenen Feld oder *novelty-suppressed feeding task* (Gross et al., 2000) und anderen ähnlich angeordneten Tests untersucht. Aus diesem Grund ist es von Interesse, dass IMCAo Mäuse bei der Messung der spontanen lokomotorischen Aktivität innerhalb der ersten 15 min signifikant weniger aktiv waren, („response to novelty“) und dies zu späteren Zeitpunkten oder über die gesamte Testdauer von 8 Stunden nicht der Fall war. Diese Ergebnisse sollten mit Verhaltenstests aus dieser Gruppe und der Ansprechbarkeit auf pharmakologische Intervention validiert werden, bevor eine Erprobung neuer anxiolytischer Substanzen in diesem Modell erfolgt.

Im Gegensatz dazu ergab sich zum Untersuchungszeitpunkt kein Anhalt für einen depressiven Phänotyp nach milder MCAo. *Post-stroke* Depression ist bei bis zu 40% aller Schlaganfallbetroffenen zu finden. Funktionelle und kognitive Rehabilitation sind dadurch beeinträchtigt, sozialer Rückzug und erhöhte Mortalität damit verbunden (Bhagal et al., 2004; Narushima et al., 2003; Robinson et al., 1984). Im Wesentlichen existieren zwei Theorien zu *post-stroke* Depression. Die erste vermutet eine psychologische Reaktion auf das Ereignis und die bleibende Behinderung, bei der zweiten sind es Auswirkungen der spezifischen Hirnschädigung und Veränderungen der Neurotransmitter. Die zuletzt erwähnte Theorie wird dadurch gestützt, dass

Patienten mit Schlaganfall häufiger unter Depression leiden als gleichermaßen behinderte orthopädische Patienten (Folstein et al., 1977). Ebenso stützt die unterschiedliche Häufigkeit des Auftretens von Depression zwischen links- oder rechts-hemisphäriellen Läsionen die Annahme einer organischen Genese (Sinyor et al., 1986). Robinson und andere Autoren postulierten, dass links-anteriore (frontale oder Basalganglien) Läsionen mit einer gestörten (Cortico)-striato-pallido-thalamo-corticalen Projektion zu *post-stroke* Depression prädisponieren (Beblo et al., 1999; Robinson, 1997). Andere systematische Reviews wiederum konnten diese Erkenntnis nicht bestätigen (Carson et al., 2000; Singh et al., 1998). Die striatale Läsion, die sich im Mausmodell ausbildet, entspricht der Gehirnregion, die bei Menschen von Robinson (1997) und anderen Autoren verantwortlich für die Entwicklung von *post-stroke* Depression gemacht wird. Hingegen waren bei unseren Untersuchungen weder links- noch rechts-hemisphärielle Läsionen mit verkürzter Latenz bis zur Passivität oder insgesamt vermehrter Passivität im Forced Swim Test assoziiert. Interessanterweise gingen Tiere nach IMCAo oder rMCAo weniger häufig in Passivität über. Die einzelnen Phasen dauerten dann entsprechend länger. Möglicherweise ist das Schadensmodell nicht schwer genug, um Depressions-ähnliches Verhalten bei Mäusen zu induzieren, da insbesondere das Striatum betroffen ist und der Kortex verschont bleibt. Zudem wäre es interessant, zusätzlich zu dem getesteten Zeitpunkt (10 Wochen nach MCAo) auch frühere (z.B. 2 Wochen) und spätere Zeitpunkte (4–6 Monate) zu untersuchen. Überraschenderweise zeigten Tiere mit rMCAo bedeutend häufiger *Climbing* (Aufwärtsbewegungen an der Zylinderwand). Bekanntermaßen haben Veränderungen des noradrenergen Systems (wie der locus coeruleus und das laterale tegmentale noradrenerge System) Auswirkungen auf den Forced Swim Test. *Climbing* korreliert mit der NA Ausschüttung und kann durch selektive NA Wiederaufnahmehemmer gesteigert werden (Cryan et al., 2002; Detke et al. 1995). Folglich mag der Anstieg der striatalen NA Spiegel ursächlich für die vermehrten Kletterversuche sein – in Übereinstimmung mit dem beobachteten hyperaktiven Phänotyp rechts-hemisphäriell geschädigter Tiere. Hier sei erwähnt, dass der Forced Swim Test sensitiv gegenüber antidepressiver Therapie ist, unzureichend bekannt ist aber, ob wirklich depressogene Effekte äußerer Manipulation erfasst werden. So führte zum Beispiel bilaterale Schädigung der suprachiasmatischen Kerne zu reduzierter Immobilität (Tataroglu, 2004), wohingegen nach Schädigung des Bed nucleus der Stria terminalis ein zweiter Versuch zu einer Zunahme von Immobilität führte. (Learned Despair; Schulz et Canbeyli, 2000). Ein

weiteres Depressionsmodell wie *shuttle box escape learning* (Maier et al., 1993) könnte dabei helfen, einen potenziellen depressiven Phänotyp aufzudecken. Eine weitere Einschränkung ist, dass nur männliche Mäuse für die Versuche verwendet wurden. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass es 30min Okklusion der A.cerebri Media zu selektivem neuronalen Zelltod, sekundärer Neurodegeneration, Störungen der Neurotransmitter und höherer Hirnfunktionen wie Kognition und Psychomotorik bei mäßigem sensomotorischen Defizit führt. Darüber hinaus ist dieses Modell durch die hohe Überlebensrate ideal geeignet für die Untersuchung der Langzeitfolgen und Behandlung nach zerebraler Ischämie (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, 1999).

6 Literaturverzeichnis

- American Heart Association (2001): 2001 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas, TX: Author.
- Andsberg G, Kokaia Z, Klein RL, Muzyczka N, Lindvall O, Mandel RJ (2002): Neuropathological and behavioural consequences of adeno-associated viral vector-mediated continuous intrastriatal neurotrophin delivery in a focal ischemia model in rats. *Neurobiol Dis* 9:187-204.
- Araki T, Kato H, Liu XH, Itoyama Y, Kogure K, Kato K (1994): Delayed damage of striatal interneurons after cerebral ischemia in the gerbil. *Neurosci Lett* 176:17-20.
- Aronowski J, Samways E, Strong R, Rhoades HM, Grotta JC (1996): An alternative method for the quantitation of neuronal damage after experimental middle cerebral artery occlusion in rats: analysis of behavioral deficit. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16:706–713.
- Aström M (1996): Generalized anxiety disorder in stroke patients. A 3-year longitudinal study. *Stroke* 27:270 –275.
- Banati RB, Myers R, Kreutzberg GW (1997): PK ('peripheral benzodiazepine') -binding sites in the CNS indicate early and discrete brain lesions: microautoradiographic detection of [3H]PK11195 binding to activated microglia. *J Neurocytol* 15:77-82.
- Barnéoud P, van der Loos H (1993): Direction of handedness linked to hereditary asymmetry of a sensory system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3246– 3250.
- Beblo T, Wallesch CW, Herrmann M (1999): The crucial role of frontostriatal circuits for depressive disorders in the postacute stage after stroke. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 12:236 –246.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986): Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17: 472-476
- Bert B, Fink H, Huston JP, Voits M (2002): Fischer 344 and Wistar rats differ in anxiety and habituation but not in water maze performance. *Neurobiol Learning Memory.* 78:11–22.

- Bhogal SK, Teasell R, Foley N, Speechley M (2004): Lesion location and poststroke depression. Systematic review of the methodological limitations in the literature. *Stroke* 35:794–802.
- Burvill PW, Johnson GA, Jamrozik KD, Anderson CS, Stewart-Wynne EG, Chakera TM (1995a): Anxiety disorders after stroke: Results from the Perth Community Stroke Study. *Br J Psychiatry* 166:328–332.
- Burvill PW, Johnson GA, Jamrozik KF, Anderson CS, Stewart-Wynne EG, Chakera TM (1995b): Prevalence of depression after stroke: The Perth Community Stroke Study. *Br J Psychiatry* 166:320–327.
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Sancesario G, Gubellini P, Marfia GA, Bernardi G (1998): Striatal spiny neurons and cholinergic interneurons express differential ionotropic glutamatergic responses and vulnerability: implications for ischaemia and Huntington's disease. *Ann Neurol* 43:586-597.
- Carson AJ, MacHale S, Allen K, Lawrie SM, Dennis M, House A, Sharpe M (2000): Depression after stroke and lesion location: A systematic review. *Lancet* 356:122–126.
- Castillo CS, Schultz SK, Robinson RG (1995): Clinical correlates of early-onset and late-onset post-stroke generalized anxiety. *Am J Psychiatry* 152:1174–1179.
- Centonze D, Marfia GA, Pisani A, Picconi B, Giacomini P, Barnardi G, Calabresi P (2001): Ionic mechanisms underlying differential vulnerability to ischemia in striatal neurons. *Progr Neurobiol* 63:687-696.
- Chesselet MF, Gonzales C, Lin CS, Polsky K, Jin BK (1990): Ischemic damage in the striatum of adult gerbils: relative sparing of somatostatinergic and cholinergic interneurons contrasts with loss of efferent neurons. *Exp Neurol* 110:209-218.
- Crutcher KA (1987): Sympathetic sprouting in the central nervous system: A model for studies of axonal growth in the mature mammalian brain. *Brain Res* 434:203–233.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002): Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23:238–245.
- Cummings JL, Mendez MF (1984): Secondary mania with focal cerebrovascular lesions. *Am J Psychiatry* 141:1084–1087.

- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995): Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and nonadrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 121:66–72.
- DeVries A, Nelson RJ, Traystman RJ, Hurn PD (2001): Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: Will it prove useful? *Neurosci Behav Rev* 25:325–342.
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang PL, Moskowitz MA, Liao JK (1998): Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *PNAS* 95: 8880-8885
- Felice LJ, Felice JD, Kissinger PT (1978): Determination of catecholamines in rat brain parts by reverse-phase ion-pair liquid chromatography. *J Neurochem* 31:1461–1465.
- Folstein MF, Maiberger R, McHugh PR (1977): Mood disorder as a specific complication of stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 40:1018 – 1020.
- Fonnum F (1975): A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem* 24:407–409
- Fonnum R, Storm-Mathisen J, Divac I (1981): Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriatal and corticothalamic fibres in rat brain. *Neuroscience* 6:863-873.
- Franklin KBJ, Paxinos G (1977): *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Fujioka M, Taoka T, Matsuo Y, Mishima K, Ogoshi K, Kondo Y, et al (2003): Magnetic resonance imaging shows delayed ischemic striatal neurodegeneration. *Ann Neurol* 54:732–747.
- Garcia JH, Lossinsky AS, Kauffman FC, Conger KA (1978): Neuronal ischemic injury: Light microscopy, ultrastructure and biochemistry. *Acta Neuropath (Berl)* 43:85–93.
- Gerfen CR (1992): The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15:133- 9.

- Goto S, Nagahiro S, Korematsu K, Ushio Y (1993): Striatonigral involvement following transient focal cerebral ischemia in the rats: an immunohistochemical study on a reversible ischemia model. *Acta Neuropathol (Berl)* 85:515-20.
- Graybiel AM (1990): Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13:244-54.
- Gross C, Santarelli L, Brunner D, Xiaoxi Zhuang, René Hen (2000): Altered fear circuits in 5-HT 1A receptor KO mice. *Biol Psychiatry* 45:1157–1163.
- Gupta YK, Sinha K, Chaudhary G (2002): Transient focal ischemia induces motor deficit but does not impair the cognitive function in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *J Neurol Sci.* 203:267–271.
- Harker KT, Whisaw IQ (2002): Impaired spatial performance in rats with retrosplenial lesions: importance of the spatial problem and the rat strain in identifying lesion effects in a swimming pool. *J Neurosci.* 22:1155–1165.
- Harrell LE, Parsons DS (1988): The role of cortical sympathetic ingrowth in the behavioral effects of nucleus basalis magnocellularis lesions. *Brain Res* 474:353–358.
- Huang J, Agus DB, Winfree CJ, Kiss W, Mack WJ, McTaggart RA, Choudhrie TF, Kim LJ, Mocco J, Pinsky DJ, et al (2001): Dehydroascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11720–11724.
- Inzelberg R, Plotnik M, Flash T, Schechtman E, Shahar I, Korcyn AD (2001): Mental and motor switching in Parkinson's disease. *J Mot Behav.* 33:377–385.
- Jackisch R, Neufang B, Hertting G, Jeltsch H, Kelche C, Will B, et al (1995): Sympathetic sprouting: Time course of changes of noradrenergic, cholinergic, and serotonergic markers in the denervated rat hippocampus. *J Neurochem* 65:329 –337.
- Jacobs BL, Fornal CA (1993): 5-HT and motor control: A hypothesis. *Trends Neurosci* 16:346 –352.
- Johnston JG, Gerfen CR, Haber SN, van der Kooy D (1990): Mechanisms of striatal pattern formation: conservation of mammalian compartmentalization. *Brain Res Dev Brain Res* 57:93-102.

- Katchanov J, Harms C, Gertz K, Priller J, Waeber C, Hirt L, et al., (2001): Mild ischemia induces loss of cyclin dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery prior to delayed cell death. *J Neurosci* 20: 3175–3181.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995): Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-35.
- Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Carlson E, Murakami K, Chen SF, Hoffman EK, Scott RW, Epstein CJ, Chan PH (1997): Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient cerebral ischemia. *J Neurosci.* 17:4180–4189.
- Kubota Y, Ito C, Sakurai E, Sakura E, Watanabe T, Ohtsu H (2002): Increased metamphetamine-induced locomotor activity and behavioral sensitization in histamine-deficient mice. *J Neurochem* 83:837– 845.
- Larsson E, Lindvall O, Kokaia Z (2001): Stereological assessment of vulnerability of immunocytochemically identified striatal and hippocampal neurons after global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 913:117-32.
- Leppävuori A, Pohjasvaara T, Vataja R, Kaste M, Erkinjuntti T (2003): Generalized anxiety disorders three to four months after ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 16:257–264
- Leppävuori A, Pohjasvaara T, Vataja R, Kaste M, Erkinjuntti T (2002): Insomnia in ischemic stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 14:90 –97.
- Lister RG (1987): The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92:180 –185.
- Lucki I (1997): The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 8:523–532.
- Maier SF, Grahn RE, Kalman BA, Sutton LC, Wiertelak EP, Watkins LR (1993): The role of the amygdala and dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of inescapable shock. *Behav Neurosci* 107:377–388.
- Markgraf CG, Green EJ, Hurwitz BE, Morikawa E, Dietrich WD, McCabe PM, Ginsberg MD, Schneiderman N (1995): Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 575:238–246.

- Meade CA, Figueredo-Cardenas G, Fusco F, Nowak TS Jr, Pulsinelli WA, Reiner A (2000): Transient global ischemia in rats yields striatal projection neuron and interneuron loss resembling that in Huntington's disease. *Exp Neurol* 166:307-23.
- Minematsu K, Yamagushi T, Omae T (1992): "Spectacular shrinking deficit": Rapid recovery from a major hemispheric syndrome by migration of an embolus. *Neurology* 42:157–162.
- Mohr JP, Barnett HJM (1986): Classification of ischemic strokes. In: Barnett HJM, Stein BM, Morh JP, Yatsu FM, editors. *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management, Vol. 1* New York: Curchill Livingstone 281–291.
- Myers R, Manjil LG, Frackowiak RS, Cremer JE (1991a): [³H]PK 11195 and the localisation of secondary thalamic lesions following focal ischemia in rat motor cortex. *Neurosci Lett* 133:20-24.
- Myers R, Manjil LG; Cullen BM, Price GW, Frackowiak RS, Cremer JE (1991b): Macrophage and astrocyte populations in relation to [³H]PK 11195 binding in rat cerebral cortex following a local ischemic lesion. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:314-322.
- Nakano S, Kogure K, Fujikura H (1990): Ischemia induced slowly progressive neuronal damage in the rat brain. *Neuroscience* 38:115–124.
- Nakashima MN, Ajiko K-i, Nakashima K, Takahashi M (2003): Possible role of nitric oxide in anxiety following transient cerebral ischemia in mice. *J Pharmacol Sci* 91:47–52.
- Narushima K, Kosier JT; Robinson RG (2003): A reappraisal of poststroke depression, intra- and inter-hemispheric lesion location using metaanalysis. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15:422– 430.
- Nitsch C, Scotti A, Sommacal A, Kalt G (1989): GABAergic hippocampal neurons resistant to ischemia-induced neuronal death contain the Ca²(+)-binding protein parvalbumin. *Neurosci Lett* 105:263-8.
- Nutt DJ (2001): Neurobiological mechanisms in generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 62(suppl 11):22–27.
- Okada M, Nakanishi H, Tamura A, Arae A, Mine K, Yamamoto K, Fujiwara M (1995a): Long-term spatial cognitive impairment after middle cerebral artery occlusion in

- rats: no involvement of the hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15:1012–021.
- Okada M, Tamura A, Arae A, Nakagomi T, Kirino T, Mine K, Fujiwara M (1995b): Long-term spatial cognitive impairment following middle cerebral artery occlusion in rats: a behavioral study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15:505–512.
- Pappata S, Levasseur M, Gunn RN, Myer R, Crouzel C, Syrota A, Jones T, Kreutzberg GW, Banati RB (2000): Thalamic microglial activation in ischemic stroke detected in vivo by PET and 11C-PK11195 *Neurology* 15:1052- 1054.
- Pert CB, Kuhar MJ, Snyder SH (1976): Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3729-33.
- Piepponen TP, Skujins A (2001): Rapid and sensitive step gradient assays of glutamate, glycine, taurine and γ -amino butyric acid by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection with o-phthalaldehyde- mercaptoethanol derivatization with an emphasis on microdialysis samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 757:277–283.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977): Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730 –736.
- Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov I, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A (2003): Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation: reversal by post-stroke Th1-like immunostimulation. *J Exp Med.* 198:725-736.
- Robinson RG (1979): Differential behavioral and biochemical effects of right and left hemispheric cerebral infarction in the rat. *Science* 205: 707–710.
- Robinson RG (1997): Neuropsychiatric consequences of stroke. *Annu Rev Med* 48:217–229.
- Robinson RG, Boston JD, Starkstein SE, Prive TR (1988): Comparison of mania with depression following brain injury: Causal factors. *Am J Psychiatry* 145:172–178.
- Robinson RG, Starr LB, Lipsey JR, Rao K, Price TR (1984): A two-year longitudinal study of post-stroke mood disorders: Dynamic changes in associated variables over the first six months of follow-up. *Stroke* 15:510 –517.

- Rodgers RJ, Boullier E, Chatzimichalaki P, Cooper GD, Shorten A (2002): Contrasting phenotypes of C57BL/6JOlaHsd, 129S2/SvHsd and 129/SvEv mice in two exploration-based tests of anxiety-related behaviour. *Physiol Behav* 77:301–310.
- Schulz D, Canbeyli RS (2000): Lesion of the bed nucleus of the stria terminalis enhances learned despair. *Brain Res Bull* 52:83– 87.
- Singh A, Herrmann N, Clack SE (1998): The importance of lesion location in poststroke depression: A critical review. *Can J Psychiatry* 43:921–927.
- Sinyor D, Jaques P, Kaloupek DG, Becker R, Goldenberg M, Coopersmith H (1986): Poststroke depression and lesion location: An attempted replication. *Brain* 109:537–546.
- Sperk G (1982): Simultaneous determination of serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Neurochem* 38:840–843.
- Sperk G, Berger M, Hörtnagl H, Hornykiewicz O (1981): Kainic acid-induced changes of serotonin and dopamine metabolism in the striatum and substantia nigra of the rat. *Eur J Pharmacol* 74:279 –286.
- Starkstein SE, Fedoroff JP, Berthier MD, Robinson RG (1991): Manic depressive and pure manic states after brain lesions. *Biol Psychiatry* 29:149 –158.
- Starkstein SE, Robinson RG (1989): Affective disorders and cerebral vascular disease. *Br J Psychiatry* 154:170 –182.
- Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR)(1999): Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30:2752–2758.
- Tataroglu Ö, Aksoy A, Yilmaz A, Canbeyli R (2004): Effect of lesioning the suprachiasmatic nuclei on behavioral despair in rats. *Brain Res* 1001: 118–124.
- Tortosa A, Ferrer I (1993): Parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the gerbil after transient forebrain ischemia: a qualitative and quantitative sequential study. *Neuroscience* 55:33-43.

- Victorov IV, Prass K, Dirnagl U (2000): Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. *Brain Res Brain Res Protoc* 5:135–139.
- Whal F, Allix M, Plotkine M, Boulu RG (1992): Neurological and behavioural outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 23:267–272.
- Whishaw IQ, Mittleman G, Bunsch ST, Dunnet SB (1987): Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudateputamen lesions in rats. *Behav Brain Res.* 24:125–138.
- Yamada K, Goto S, Oyama T, Yoshikawa M, Nagahiro S, Ushio Y (1995): Striatal cells containing the Ca(2)-binding protein calretinin (protein 10) in ischemia-induced neuronal injury. *Acta Neuropathol (Berl)* 89:172-7.
- Yamamoto F, Tamura A, Kirino T, Shimizu M, Sano K (1989): Effects of a new thyrotropin releasing hormone derivative on behavioral changes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*: 20:362–366.

Anhang

Verwendete Publikationen (kumulativer Impactfaktor, Stand 2005: 16,68)

Referenz #1: Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Bruck W, Dirnagl U, Veh RW, Endres M (2003): Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. Brain Pathol. 13(4):452-64 [IF: 4.04]

Referenz #2: Winter B, Bert B, Fink H, Dirnagl U, Endres M (2004): Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. Stroke. 35(1):191-5. [IF: 5.86]

Referenz #3: Winter B, Juckel G, Viktorov I, Katchanov J, Gietz A, Sohr R, Balkaya M, Hörtnagl H, Endres M (2005): Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice. Biol Psychiatry. 57(10):1166-75 [IF: 6.78]

Selbständigkeitserklärung

Medizinische Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin
An den Promotionsausschuss

Berlin, 27. Juli 2007

Sehr geehrte Damen und Herren,

der selbständige Anteil, den ich, Benjamin Winter, geb. am 06.06.81, an der Erstellung der im Anhang der Dissertationsschrift genannten Publikationen habe, setzt sich prozentual ca. wie folgt zusammen:

Referenz #1: 10%

Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse.

Beitrag im Einzelnen: Anfertigung und Standardfärbungen der histologischen Präparate.

Referenz #2: 60%

Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching.

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung aller Verhaltenstests, Bederson Score, Transkardiale Gewebefixation, immunhistochemische und Standardfärbungen, Assistenz bei der operativen Ischämieinduktion.

Referenz #3: 60%

Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice.

Beitrag im Einzelnen: Aufbau, Planung und Durchführung aller Verhaltenstests, Transkardiale Gewebefixation, Assistenz bei der operativen Ischämieinduktion und der Gewebepräparation zur neurochemischen Analyse.

Mit freundlichen Grüßen

Benjamin Winter

Prof. Dr. Matthias Endres

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Benjamin Winter, geboren am 6. Juni 1981 in Starnberg, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unerlaubte Hilfe Dritter selbständig angefertigt habe und die benutzte Literatur und Hilfsmittel vollständig angegeben sind. Die Dissertationsschrift stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar und wurde an keiner anderen Fakultät eingereicht.

Benjamin Winter

Berlin, 27. Juli 2007

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl für die Möglichkeit zur Durchführung der Promotionsarbeit im Institut für Experimentellen Neurologie.

Herrn Prof. Dr. Matthias Endres möchte ich für eine ausgezeichnete Betreuung danken. Die enge Zusammenarbeit und stetiges Interesse waren unersetzlich für den Fortschritt der Arbeit.

Herrn PD. Dr. Georg Juckel danke ich für die Bereitstellung der Mittel und Räume für die Verhaltenstests.

Frau Prof. Dr. Heide Hörtnagl (Institut für Pharmakologie, Charité) möchte ich aufrichtig für die Durchführung der neurochemischen Analyse danken.

Herrn Dr. Ilya Victorov (Brain Research Institute, Moskau) bin ich für die Durchführung der klassischen Histologie und für die Bereicherung jahrzehntelanger Erfahrung sehr dankbar.

Frau Prof. Dr. Heidrun Fink (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin) danke ich für die Einführung in die Verhaltenforschung und die Ermöglichung der Water Maze Experimente, die ich an ihrem Institut durchführen durfte.

Nicht zuletzt gilt mein Dank der Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe Endres und meinen Arbeitskollegen Dr. Juri Katchanov und Dr. Karen Gertz für Anteilnahme und Hilfe.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Publikationen

Originalarbeiten

Winter B, Juckel G, Viktorov I, Katchanov J, Gietz A, Sohr R, Balkaya M, Hörtnagl H, Endres M (2005): Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice. *Biol Psychiatry*. 57(10):1166-75

Winter B, Bert B, Fink H, Dirnagl U, Endres M (2004): Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. *Stroke*. 35(1):191-5.

Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Bruck W, Dirnagl U, Veh RW, Endres M (2003): Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol*. 13(4):452-64

Buchbeiträge

Endres M, Winter B (2004): Functional outcome following mild cerebral ischemia. *Pharmacology of Cerebral Ischemia 2004*, ed. J Krieglstein, S Klumpp (Medpharm Scientific Publishers Stuttgart), pp. 333-339

Benjamin Winter

Berlin, 27. Juli 2007