

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

DISSERTATION

**Evaluation des sensomotorischen Defizites nach milder
cerebraler Ischämie in der Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Matthias Kröber

aus Heidelberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Endres
2. Prof. Dr. med. M. Schwaninger
3. Prof. Dr. med. G. Kempermann

Datum der Promotion: 22.03.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Der ischämische Schlaganfall	1
1.1.1	Bedeutung und Epidemiologie	1
1.1.2	Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls	1
1.1.3	Therapie des ischämischen Schlaganfalls	4
1.2	Experimentelle Schlaganfallforschung	5
1.2.1	Mausmodell der milden fokalen Ischämie	6
1.2.2	Verhaltenstestung in der experimentellen Schlaganfallforschung	7
1.3	Zielsetzung	9
2	Methodik	11
2.1	Versuchsdesign	11
2.2	Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls	12
2.3	Verhaltenstestung	14
2.3.1	Catwalk	14
2.3.2	Rotarod	14
2.3.3	Pole Test	15
2.3.4	Pole Rotation	15
2.3.5	Chimney Test	15
2.3.6	Adhesive Removal Test	16
2.3.7	Corner Test	16
2.3.8	Corner Rotation	16
2.3.9	Cylinder Test	17
2.3.10	Bowl-Test	17
2.3.11	Paw Preference Test	18
2.4	Histologische Auswertung	18
2.5	Statistische Auswertung	18

3 Ergebnisse	21
3.1 Histologische Auswertung	21
3.2 Verhaltenstestung	21
3.2.1 Rotarod	21
3.2.2 Pole Test	22
3.2.3 Chimney Test	23
3.2.4 Catwalk	23
3.2.5 Adhesive Removal Test	26
3.2.6 Cylinder Test	27
3.2.7 Corner Test	27
3.2.8 Corner Rotation	27
3.2.9 Pole Rotation	28
3.2.10 Bowl Test	28
3.2.11 Paw Preference Test	28
3.3 Korrelationsanalyse	29
4 Diskussion	35
4.1 Interpretation der eigenen Befunde	35
4.1.1 Kurzfristige Verhaltenstestung	36
4.1.2 Langzeittestung nach MCAo	37
4.1.3 Testung des Drehverhaltens	38
4.1.4 Catwalk und Paw Preference Test	40
4.1.5 Korrelation von Läsionsgröße und funktionellem Defizit	43
4.2 Vergleich mit anderen Autoren	44
4.3 Methodenkritik	48
4.4 Schlussfolgerungen	51
5 Zusammenfassung	53
Literaturverzeichnis	55
Selbständigkeitserklärung	63
Lebenslauf	65
Publikationsverzeichnis	67
Danksagung	69

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Der ischämische Schlaganfall

1.1.1 Bedeutung und Epidemiologie

Der Schlaganfall ist in den Industrienationen die dritthäufigste Todesursache und die führende Ursache schwerer, dauerhafter Behinderung und Pflegebedürftigkeit im Erwachsenenalter (Lloyd-Jones et al., 2010). Weltweit erleiden jährlich etwa 15 Millionen Menschen erstmalig einen Schlaganfall, von denen etwa ein Drittel stirbt und ein weiteres Drittel permanent pflegebedürftig bleibt (Strong et al., 2007).

In Deutschland beträgt die altersstandardisierte Inzidenz des erstmaligen Schlaganfalls ungefähr 182 pro 100.000 Einwohner. Der Schlaganfall ist dabei in ca. 80% der Fälle ischämischer Natur (Kolominsky-Rabas et al., 2001; Lloyd-Jones et al., 2010). Das Wiederholungsrisiko nach erstmaligem Schlaganfall beträgt je nach Subgruppe bis zu 30% (Lloyd-Jones et al., 2010).

Die Inzidenz des Schlaganfalls ist stark altersabhängig. In der Altersgruppe der 55 bis 64-jährigen beträgt die Inzidenz des ischämischen Schlaganfalls 147 pro 100.000, bei den 65 bis 75-jährigen 426 pro 100.000 und bei den über 84-jährigen gar 1681 pro 100.000 (Kolominsky-Rabas et al., 1998). Aufgrund des Alterswandels in der Bevölkerung ist von einer weiter zunehmenden Inzidenz und Prävalenz des Schlaganfalls auszugehen (Kolominsky-Rabas et al., 2006; Strong et al., 2007).

Die Kosten, die durch Akutversorgung, Rehabilitation und Pflege des Schlaganfalls allein den gesetzlichen Krankenkassen entstehen, übersteigen sieben Milliarden Euro im Jahr (Kolominsky-Rabas et al., 2006). Die Folgekosten von Rehabilitation, ambulanter und stationärer Pflege übertreffen dabei die Kosten der akuten Krankenhausversorgung um ein Vielfaches.

1.1.2 Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Der Schlaganfall ist das klinische Korrelat einer akuten Unterbrechung der Blutversorgung des Gehirns, wobei der ischämische Schlaganfall durch den Verschluss einer zu-

1 Einleitung und Zielsetzung

führenden Hirnarterie bedingt ist. In dem betroffenen Versorgungsgebiet können drei metabolisch definierte Zonen unterschieden werden (Baron, 2001):

Im Kerngebiet des Infarktes kommt es durch den abrupten Stop der Sauerstoff- und Glucosezufuhr binnen Sekunden zu Energiemangel und neuronaler Dysfunktion. In Folge des massiven Energiemangels kann das Membranpotential nicht aufrechterhalten werden, Natrium- und Calcium-Ionen akkumulieren im Zytoplasma, und mit dem Verlust der Membranintegrität kommt es binnen Minuten zum nekrotischen Zelltod (Dirnagl et al., 1999).

In der Peripherie des Infarktareals hingegen kann durch Kompensationsmechanismen, z.B. durch Erhöhung der Sauerstoffextraktion, und über die Versorgung durch Kollateralgefäße eine ausreichende Restperfusion ("Oligämie") des Hirngewebes aufrechterhalten werden.

Zwischen diesen beiden Zonen befindet sich Gewebe, in welchem der Blutfluß unter die kritische Ischämiegrenze von etwa 20 ml / 100 g Gewebe pro Minute (Baron, 2001) gefallen und die geordnete neuronale Aktivität erloschen ist, die sogenannte "Penumbra" (Abbildung 1.1). Anders als in der Kernzone des Infarkts kommt es hier nicht zu massiver Zellnekrose; indessen setzt der ischämische Insult eine Kaskade von zellulären Mechanismen in Gang, welche, wenn sie nicht gestoppt wird, das Penumbrawebe dem Untergang weiht. Der Energiemangel führt in der Penumbra zu einem Verlust des Membranpotentials mit konsekutiver Freisetzung von exzitotoxischen Neurotransmittern, welches wiederum einen vermehrten Ioneninflux, speziell von Calcium-Ionen, vermittelt. Durch den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zu einer vermehrten Bildung von radikalen Sauerstoffspezies, zum anderen kommt es zur Freisetzung und Aktivierung von Proteinen, wie den Caspasen, die den programmierten Zelltod ("Apoptose") vermitteln. Gleichzeitig versucht der Körper, dieser ischämischen Kaskade durch intrinsische Schutzmechanismen entgegenzuwirken ("endogene Neuroprotektion"). Auf zellulärer Ebene wird der Energieverbrauch durch Suppression der neuronalen Aktivität und Proteinsynthese minimiert, auf Gewebeebene wird die lokale Durchblutung durch die Freisetzung von vasoaktiven Stoffen maximiert, und systemisch wird der Blutdruck gesteigert, um die Restperfusion des Peri-Infarktgewebes zu optimieren und die Gewebemöostase möglichst lange aufrechtzuerhalten (Iadecola und Anrather, 2011a). Die Penumbra ist somit Gewebe am Scheideweg: Sollte die Reperfusion ausbleiben, dehnt sich der Infarktkern immer weiter in die vormalige Penumbra aus – kommt es jedoch zu einer rechtzeitigen Wiederherstellung des Blutflusses, ist das Penumbrawebe prinzipiell überlebens- und funktionsfähig (Dirnagl et al., 1999; Moskowitz et al., 2010). Folglich ist die Penumbra das Hauptziel aller spezifischen Schlaganfalltherapien, ob in Form von

Thrombolyse oder experimenteller Therapieansätze (Donnan et al., 2009).

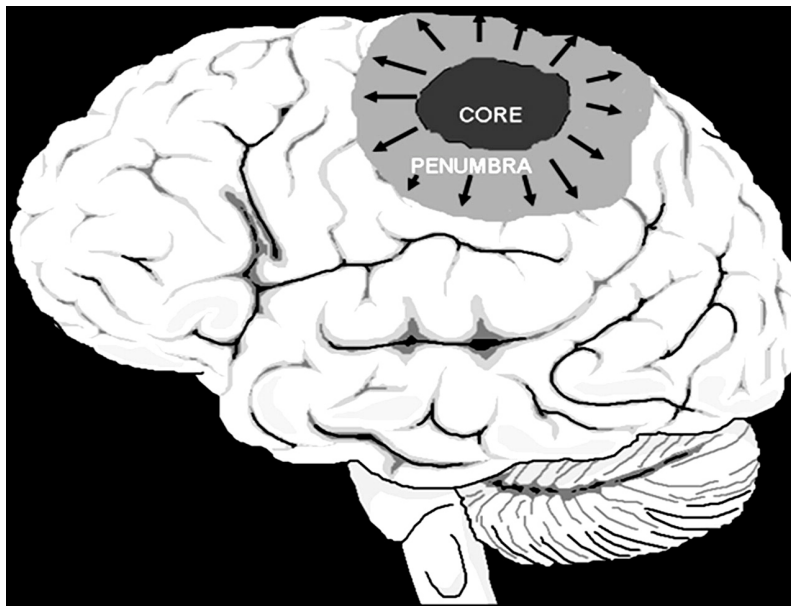


Abbildung 1.1: Die ischämische Penumbra. Die finale Schlaganfallgröße bestimmt sich aus dem Infarktkern und demjenigen Penumbra-Gewebe, das über die Zeit zugrunde geht. Modifiziert nach Bandera et al. (2006).

Neben dieser Akutantwort auf den ischämischen Insult werden zusätzliche längerfristige Reaktionsmechanismen in Gang gesetzt. So kommt es binnen kurzer Zeit zur Aktivierung und Einwanderung von Zellen des Immunsystems, welches sein Maximum innerhalb von 5-7 Tagen erreicht (Dirnagl et al., 1999). Die Auswirkungen sind zweischneidig: Durch aktivierte Makrophagen und Mikroglia kommt es einerseits zu zusätzlichem Zellverlust, andererseits ist die Entzündungsreaktion Voraussetzung für die Initiierung einer Vielzahl von Reparaturprozessen (Iadecola und Anrather, 2011b). Die langfristige Erholung der Hirnfunktion wird weiter unterstützt durch adaptive synaptische Reorganisation ("Neuroplastizität") und Neuroregeneration (Cramer et al., 2011; Moskowitz et al., 2010; Murphy und Corbett, 2009).

Es wird ersichtlich, daß die Gesamtantwort des Organismus auf den ischämischen Insult aus der komplexen dynamischen Interaktion unterschiedlicher Schutz- und Reparaturmechanismen erwächst (Abbildung 1.2, siehe auch Endres et al., 2008).

1 Einleitung und Zielsetzung

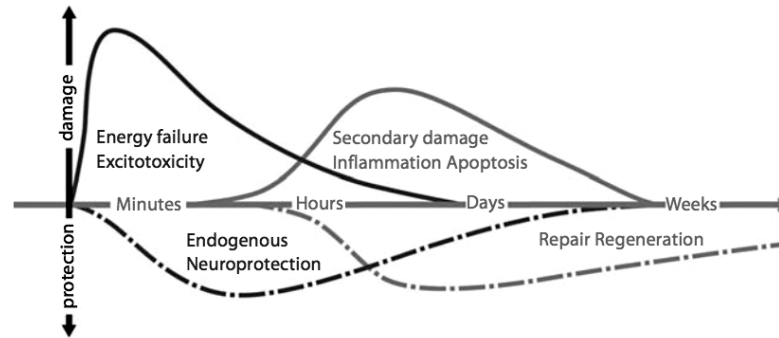


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung des zeitlichen Zusammenspiels pathophysiologischer Antwortmechanismen auf den ischämischen Insult. Modifiziert nach Endres et al. (2008).

1.1.3 Therapie des ischämischen Schlaganfalls

Die einzige kontrolliert-randomisiert getestete und zugelassene spezifische Behandlungsoption für den Schlaganfall ist die Thrombolyse mittels rekombinantem Gewebe-Plasminogenaktivator (rtPA) (Khaja und Grotta, 2007). Diese Intervention zielt auf die Wiedereröffnung des verschlossenen Blutgefäßes, stellt also einen frühen, drastischen Eingriff in die ischämisch-hypoxische Schadenskaskade dar. In geeigneten Patienten ist die Thrombolyse eine hocheffektive therapeutische Maßnahme (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Allerdings kommt primär nur ca. ein Viertel der Schlaganfallpatienten für die Thrombolysebehandlung in Frage, und lediglich 1-8,5 % aller Patienten werden tatsächlich lysiert (Millán und Dávalos, 2006). Dies ist bedingt durch das kurze therapeutische Zeitfenster von 4,5 Stunden nach Schlaganfall, die recht enggefassete Indikationsstellung und wichtige Kontraindikationen (Millán und Dávalos, 2006). Neben der Thrombolyse gewinnt in den letzten Jahren auch die mechanische Rekanalisation zunehmende Bedeutung; gleichwohl zeigt sich auch hier die überragende Bedeutung des Faktors Zeit bis zur Rekanalisation. Bei noch mangelhafter Studienlage scheint sich die Beobachtung bei Lysekandidaten zu bestätigen, daß sich alle 90 Minuten die theoretische Anzahl der notwendigen Behandlungen, um einen Patienten vor bleibender Behinderung zu bewahren (*“Number needed to treat”*), verdoppelt (Lees et al., 2010). Im Endeffekt kann wiederum nur ein sehr kleiner Prozentsatz aller Schlaganfallpatienten von der neuen Therapiemodalität profitieren. Der Großteil der Schlaganfallpatienten hingegen wird *“nur”* supportiv und präventiv behandelt. Im Sinne der evidenzbasierten Medizin ist akut vor allem die Behandlung in spezialisierten *“Stroke Units”* von erwiesenem Wert. Langfristig ist die umfassende Sekundärprävention

unter Beachtung von Blutdruckeinstellung, Lebensstilmodifikationen (körperliche Aktivität, Ernährung, Körpergewicht, Rauchen), Statintherapie und spezifischer Prophylaxe mit Thrombozytenfunktionshemmern bzw. oralen Antikoagulantien von herausragender Bedeutung (Rothwell et al., 2011).

1.2 Experimentelle Schlaganfallforschung

Da bisher nur ein sehr kleiner Prozentsatz aller Schlaganfallpatienten in den Genuß spezifischer Therapie kommt, ist die experimentelle Schlaganfallforschung gefordert, Mechanismen und Substanzen zu identifizieren, welche einem breiten Patientengut zugute kommen können oder beispielsweise das Zeitfenster für Rekanalisierungsmaßnahmen verlängern. Die Beeinflussung der ischämischen Kaskade innerhalb der Penumbra ebenso wie kurz- bis mittelfristige neuroprotektive und immunologische Prozesse sind hierbei von besonderem Interesse, doch auch die langfristige Förderung von Neuroplastizität und -regeneration gewinnt zunehmend an Aufmerksamkeit (Iadecola und Anrather, 2011a)

Mit Ausnahme der Einführung von Plasminogenaktivatoren 1996 und der Entwicklung des Penumbra-Konzeptes Mitte der 70er Jahre kann die experimentelle Schlaganfallforschung, trotz beeindruckender theoretischer Fortschritte, keine klinisch relevanten Forschungsergebnisse aufweisen. In einer vielbeachteten Studie analysierten O'Collins et al. (2006) mehr als 1000 experimentelle Therapieansätze, von denen mehr als 100 erfolglos im Menschen getestet wurden. Die Mehrzahl dieser fehlgeschlagenen Interventionsversuche konzentrierte sich auf frühe Ereignisse innerhalb der ischämischen Schädenskaskade (Iadecola und Anrather, 2011a). Der bedeutendste Fehlschlag der letzten Zeit ist das Versagen des Radikalfängers NXY-059 in der klinischen Phase III Studie (Shuaib et al., 2007; Savitz, 2007).

Das anhaltende Versagen des *“bench to bedside”* Transfers hat zu einer Reevaluation der Methoden und Endpunkte in der präklinischen Schlaganfallforschung geführt (Endres et al., 2008; Fisher et al., 2009; Moskowitz, 2010). Weshalb haben so viele, im Tiermodell erfolgversprechende, Substanzen beim Menschen keine klinische Wirksamkeit gezeigt? Unter anderem fällt eine Diskrepanz auf in der Art und Weise, wie der Nutzen einer Intervention bewertet wird. In klinischen Studien kommen funktionelle Ergebnisparameter, wie die modifizierte Rankin Skala, als primäres Evaluationsinstrument zu Anwendung. Dagegen beruhten experimentelle Studien vorwiegend auf der Evaluation der Läsionsgröße als primärem Forschungsendpunkt. Damit wird eine konstante kausale Beziehung zwischen Läsionsgröße und funktionellem Defizit vorausgesetzt. Gerade im Hinblick auf immunmodulatorische, neuroregenerative und Neuroplastizität-fördernde The-

1 Einleitung und Zielsetzung

rapieoptionen scheint diese Annahme jedoch voreilig (DeVries et al., 2001; Carmichael, 2012). Zunehmend setzt sich der Gedanke durch, daß die Verhaltenstestung, entsprechend der klinischen Evaluation des funktionellen Ergebnisses, unverzichtbarer Bestandteil der präklinischen Evaluation sein sollte (Endres et al., 2008; Fisher et al., 2009; Savitz und Schäbitz, 2008). Ein weiterer fundamentaler Unterschied zwischen experimenteller und klinischer Schlaganfallforschung zeigt sich im jeweils untersuchten Zeitfenster. Klinische Studien evaluieren primär das langfristige funktionelle Defizit nach 3 Monaten, experimentelle Studien andererseits konzentrieren sich überwiegend auf die histologische Ergebnisevaluation innerhalb von wenigen Tagen nach Infarktereignis. Auch hier findet ein Umdenken statt, und mit der zunehmenden Bedeutung der langfristigen Ergebnisevaluation wird gleichsam die Bedeutung der funktionellen Verhaltenstestung herausgehoben, da langfristige adaptive und regenerative Mechanismen eine funktionelle Verbesserung hervorrufen können, ohne daß sich die absolute Infarktgröße ändern müsste (Cramer et al., 2011).

Letztendlich muss man das frühe funktionelle Defizit bei Mensch und Maus als Ausdruck der akuten ischämischen Beeinträchtigung werten, wohingegen das langfristige Ergebnis des Schlaganfalls zur zuverlässigen Evaluation eine Mehrzahl von Modalitäten, inklusive Histologie und Verhaltenstestung, erfordert.

1.2.1 Mausmodell der milden fokalen Ischämie

Die experimentelle Modellierung des Schlaganfalls hat eine Vielzahl unterschiedlicher Schadensmodelle hervorgebracht (für eine Übersicht siehe Durukan und Tatlisumak, 2007). Grob müssen fokale von globalen Ischämie modellen unterschieden werden. Innerhalb der fokalen Ischämie modellen kann nach Induktionsmechanismus, Lokalisation und Schweregrad unterschieden werden. Wichtig ist weiter die Unterscheidung von distalen, z.B. embolisch oder mittels Ligatur induzierten Schlaganfallmodellen und proximalen Schlaganfallmodellen, welche typischerweise durch filamentöse Okklusion der Arteria Cerebri Media (*“Middle Cerebral Artery occlusion”*, kurz *“MCAo”*) erzeugt werden. Je nach Dauer des Verschlusses lassen sich verschiedene Schweregrade der fokalen Ischämie hervorrufen, die Spanne reicht von 10-minütigen Verschlusszeiten als Tiermodell von transienten ischämischen Attacken bis hin zur permanenten Okklusion der Arteria Cerebri Media (MCA) (Carmichael, 2005; Pedrono et al., 2010).

Das von uns gewählte Modell des 30-minütigen MCA-Verschlusses entspricht einem milden Schadensmodell; es werden überwiegend neuronale Zellen geschädigt und die Läsion beschränkt sich vorwiegend auf das Striatum (Katchanov et al., 2003). Durch die frühe Reperfusion können auch Reperfusionsschäden simuliert werden, wie sie beim Men-

schen durch spontane Rekanalisation (Kassem-Moussa und Graffagnino, 2002) und nach erfolgreicher Lysetherapie auftreten. Auch in anderer Hinsicht erinnert das 30-minütige MCAo Modell an den kardio-embolischen Schlaganfall im Menschen: Das ischämische Volumen ist klein und durch distale Kollateralen kann eine teilweise Restperfusion aufrechterhalten werden. Funktionell zeigen die Mäuse ein kurzzeitiges Halbseitensyndrom, welches von einer schnellen funktionellen Erholung gefolgt ist (Winter et al., 2005). Zudem ist die postoperative Letalität sehr gering.

Insgesamt erscheint das Mausmodell des 30-minütigen MCA-Verschlusses also gut geeignet, um den menschlichen Schlaganfall zu simulieren (Carmichael, 2005).

1.2.2 Verhaltenstestung in der experimentellen Schlaganfallforschung

Trotz der phylogenetischen Nähe zur Ratte unterscheidet sich die Maus von ihrem größeren Verwandten in vieler Hinsicht grundsätzlich. Sie ist kleiner und leichter, weniger intelligent und ängstlicher. Dies erschwert die Durchführung von Verhaltenstests, wie sie bei der Ratte üblich sind, oft erheblich. Infolgedessen ist die Verhaltenstestung in der Maus, speziell nach Schlaganfall, bisher wenig etabliert und standardisiert. Weiter muss beachtet werden, daß Ergebnisse aus der Ratte nur mit großer Zurückhaltung auf die Maus übertragen werden können; die beiden Spezies unterscheiden sich auch in ihrer Reaktion auf den MCA-Verschluss (Carmichael, 2005).

In der Praxis unterscheiden sich die angewandten Testmethoden von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe, es gibt nur wenige systematische Studien zur Verhaltenstestung bei Mäusen nach Schlaganfall (Bouët et al., 2007; Ferrara et al., 2009; Freret et al., 2009; Gerlai, 2000; Lubjuhn et al., 2009). Diese Situation wird weiter kompliziert durch die Verwendung unterschiedlicher Schlaganfallmodelle, unterschiedlicher Verhaltenstestungsansätze (z.B. sensomotorische Beeinträchtigung vs. kognitive Beeinträchtigung), unterschiedlicher Mäusestämme und unterschiedlicher Zeitfenster.

Insgesamt ist unser Wissen zur Verhaltenstestung in der Maus nach Schlaganfall lückenhaft. Als schwieriges und wichtiges Problem stellt sich die zuverlässige Evaluation des langfristigen funktionellen Ergebnisses und die Detektion von kleinen Behandlungseffekten heraus (Li et al., 2004). Dies trifft in besonderem Maße auf weniger schwerwiegende Schadensmodelle zu.

Weiter ist der Zusammenhang von Läsionslokalisierung und funktionellem Defizit in der Maus weitgehend unerforscht, auch weil in vielen proximalen MCAo-Modellen die gesamte Hemisphäre geschädigt wird. Für die meisten Verhaltenstests ist nicht gesichert, welche Strukturen im Speziellen zum beobachteten Defizit beitragen.

Schlußendlich ist unklar, welche der in der präklinischen Verhaltenstestung genutzten

1 Einleitung und Zielsetzung

Testparadigmen überhaupt eine Vorhersagekraft in Hinblick auf die Erholung der Motorfunktion beim Menschen haben (Schallert, 2006). Dieses Problem ist auch der bisher mangelhaften Übertragung von experimentellen Forschungsergebnissen in die klinische Praxis geschuldet und von experimenteller Seite her allein nicht behebbar.

Beispielhaft für die Schwierigkeiten der experimentellen Verhaltensforschung ist die Verwendung des (modifizierten) Bederson Scores als "funktioneller *Outcome*-Parameter". Der Bederson Score misst Verhaltensänderungen nach Schlaganfall auf einer 5-Punkte Skala und wurde entwickelt als ein Evaluationsinstrument für den MCAo-Erfolg nach 24h (Bederson et al., 1986). Für die Einschätzung des funktionellen "*Outcomes*", selbst im Zeitraum von wenigen Tagen, ist er weder gedacht noch geeignet (Savitz und Schäbitz, 2008; Li et al., 2004). Dennoch war und ist der Bederson Score, wohl auch aufgrund seiner Einfachheit, ein beliebter Test, um funktionelles "*Outcome*" zu testen (z.B. im Falle von NXY-059: Kuroda et al., 1999).

Wie oben aufgeführt ist jedoch die Durchführung geeigneter Verhaltenstests, die in der Lage sind, den Funktionsstatus der Tiere sensitiv, diskriminativ und zuverlässig zu erfassen, von zentraler Bedeutung für die Übertragung präklinischer Versuchsergebnisse in die klinische Anwendung, besonders in Hinblick auf die Evaluation von langfristigen Schadens- und Kompensationsmechanismen des angegriffenen Gehirns wie Neuroinflammation, -regeneration und -plastizität. Der sensomotorische Evaluation kommt dabei ein besonderer Stellenwert zu, da letztlich beim Menschen die motorische Beeinträchtigung von überragender klinischer Relevanz ist; sie ist es, die am häufigsten zu permanenter Behinderung und Pflegebedürftigkeit von Schlaganfallpatienten führt. Demzufolge ist die Entwicklung und Anwendung von verhaltensexperimentellen Äquivalenten der klinisch häufigen Beeinträchtigungen von Gang und Feinmotorik konzeptuell besonders relevant.

Bei der Planung und Durchführung von Verhaltensexperimenten sind die speziellen Eigenheiten unserer Versuchstiere zu bedenken. So gibt es signifikante Unterschiede in Physiologie und Verhalten verschiedener Mäusestämme. 129/Sv Mäuse sind zwar körperlich robust, dafür aber auch ausgesprochen träge, was die Durchführung von Verhaltenstests, die auf der intrinsischen lokomotorischen Aktivität und Explorationslust der Versuchstiere basieren, erschwert bis unmöglich macht. C57Bl/6N Mäuse, wie sie von uns verwendet wurden, sind agiler, indessen aber auch empfindlicher gegenüber ischämischer Schädigung (Maeda et al., 1999). Um eine möglichst geringe Varianz der Versuchsergebnisse zu gewährleisten, setzen wir gewöhnlich männliche Tiere ein. Weibliche Tiere unterliegen Zyklusschwankungen, die ihr Verhalten unkontrollierbar modifizieren; zu-

dem ist bekannt, daß Östrogene eine zusätzliche neuroprotektive Wirkung haben (Hurn und Macrae, 2000). Um Versuchsstress zu minimieren und die Aktivität der Tiere zu fördern, sollten, angepasst an ihre natürliche Nachtaktivität, alle Verhaltenstests zur späten Nachmittagszeit oder Abends durchgeführt werden und der Versuchsraum so weit wie möglich abgedunkelt werden. Alternativ ist auch die Testung unter Rotlichtbedingungen möglich. Die Durchführung einer ganzen Batterie von Tests liefert möglicherweise andere Ergebnisse als die Durchführung nur weniger, ausgewählter Tests (McIlwain et al., 2001); dem haben wir durch die relativ langen Testintervalle Rechnung getragen.

1.3 Zielsetzung

Ziel unserer Arbeit war die umfassende Charakterisierung des sensomotorischen Defizits im Langzeitverlauf nach 30-minütigem MCA-Verschluss in der Maus. Durch die schnell rückläufige sensomotorische Beeinträchtigung der Tiere in unserem Modell mit nur geringgradigen langfristigen Defiziten sind wir besonders gefordert gewesen, die Ergebnisqualität und Versuchsmethodik der Verhaltenstestung in der experimentellen Schlaganfallforschung zu optimieren und neue Ansätze zu finden.

Für die Versuchsanlage ist folglich die zeitliche Sensitivität und Diskriminationskraft der verschiedenen sensomotorischen Testungen von größter Bedeutung. Eine zentraler Aspekt unserer Arbeit liegt aber auch in der Identifikation jener Verhaltenstests, welche aufgrund einer einfachen Durchführbarkeit bei gleichzeitiger Sensitivität, Objektivität und Reliabilität der Ergebnisse überhaupt geeignet sind, eine breite Anwendung zu finden.

Zu diesem Zweck wählten wir eine Batterie von sensomotorischen Tests, wie sie bisher in der Schlaganfallforschung mit unterschiedlicher Beliebtheit Anwendung fanden, um ihre Nützlichkeit und Anwendbarkeit in festgelegten Zeitintervallen nach MCAo zu testen. Ferner untersuchten wir einige neue oder bisher im proximalen MCAo-Modell der Maus nicht angewandte Verhaltenstests, wie den *“Catwalk”*, *“Paw Preference Test”*, *“Bowl Test”* und *“Pole Rotation”* auf ihren Nutzen und entwickelten eine verbesserte Variante des *“Corner Tests”*.

Zudem erlaubte uns die finale histologische Beurteilung, den Zusammenhang zwischen histologischer Läsionsgröße und funktionellen Defiziten weiter zu untersuchen. Der Vergleich unserer Ergebnisse im striatalen Schadensmodell mit denen von kortikalen Schadensmodellen der distalen MCAo ermöglichte ferner, Aussagen über den Einfluß der Läsionslokalisation auf spezifische Verhaltensparadigmen zu treffen.

Letztlich sollte unsere Arbeit dazu beitragen, daß begründete Aussagen darüber getroffen werden können, welches für ein zu untersuchendes Defizit der richtige Verhaltenstest

1 Einleitung und Zielsetzung

zu dem jeweiligen Zeitpunkt ist. Damit erst wird die Entscheidung darüber, welche Verhaltenstests nach Schlaganfall durchgeführt werden, auf eine experimentell validierte Basis gestellt.

2 Methodik

2.1 Versuchsdesign

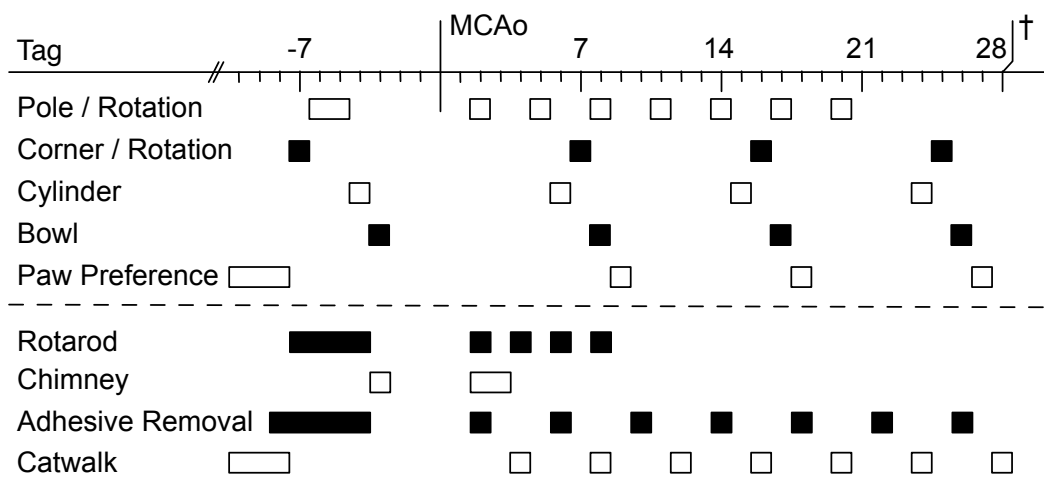


Abbildung 2.1: Experimenteller Plan der Testdurchführung in beiden Tierkohorten (Tests für Kohorte 1 oberhalb, für Kohorte 2 unterhalb der gestrichelten Linie). In beiden Kohorten gab es je eine MCAO- und eine scheinoperierte Gruppe von jeweils 10-12 Tieren. † Euthanasie an Tag 28 nach Beendigung der Versuche.

Die Versuche wurden an 8 Wochen alten männlichen Mäusen des C57Bl/6N Stammes durchgeführt. Die Mäuse wurden in standardisierten, angereicherten Käfigen in Gruppengrößen von 3-7 Tieren mit einem regulären hell-dunkel Zyklus (Dunkelphase von 7.00 bis 19.00 Uhr) gehalten. Mit Ausnahme der jeweiligen Vorabende der "Paw Preference" Testungen hatten die Tiere ad libitum Zugang zu Futter; freier Zugang zu Wasser war zu allen Zeiten gewährleistet. Aufgrund der nachtaktiven Natur der Mäuse wurden die Versuche am späten Nachmittag, abends und in der Nacht durchgeführt. Die geplanten Verhaltensexperimente wurden auf zwei Kohorten aufgeteilt, um die Anzahl der durchgeführten Tests pro Tier zu beschränken und ausreichende Zeitabstände für die Erholung der Tiere sicherzustellen. Die erste Kohorte von Tieren wurde mit "Pole Test/Rotation",

2 Methodik

“Corner Test/Rotation”, “Paw Preference Test”, “Bowl Rotation” und “Cylinder Test” konfrontiert, während die zweite Kohorte in “Rotarod”, “Catwalk”, “Chimney Test” und “Adhesive Removal Test” untersucht wurde. Für die Kohortenaufteilung und genaue zeitliche Verteilung der Versuche, siehe auch Abbildung 2.1. In beiden Kohorten gab es eine MCAo- und eine scheinoperierte Gruppe von jeweils 10-12 Tieren. Ein MCAo-Tier aus der ersten Kohorte wurde nachträglich ausgeschlossen, da histologisch kein Schlaganfall nachweisbar war. Postoperativ trat keine Mortalität auf. Alle Versuche und Prozeduren wurden von der zuständigen Tierversuchsbehörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, G0217/10, Genehmigung vom 25.11.2010) genehmigt.

2.2 Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls

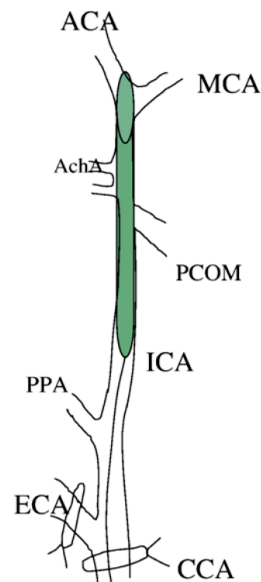


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der MCAo-Prozedur. CCA, A. carotis communis; ECA, A. carotis externa; ICA, A. carotis interna; MCA, A. cerebri media; ACA, A. cerebri anterior; PPA, A. pterygopalatina; PCOM, A. communicans posterior; AchA, A. choroidea anterior. Modifiziert nach Durukan und Tatlisumak (2007).

Im Schadensmodell der “Middle Cerebral Artery Occlusion” werden Mäuse mittels Filamentverschluss einer linksseitigen transienten zerebralen Ischämie im Stromgebiet der A. cerebri media für 30 Minuten mit nachfolgender Reperfusion ausgesetzt (30-min. MCAo). Die Mäuse werden dazu mit einer Inhalationsnarkose anästhesiert. Das Gasgemisch wird über eine Maske zugeführt. Die Tiere atmen spontan. Die Narkose wird mit 1,5 bis 2%

2.2 Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls

Isofluran in 70% N_2O und 30% O_2 mittels eines Vaporisators induziert und bei 1% Isofluran über die Operationszeit durchgeführt. Die Mäuse liegen während der OP auf einer Wärmeplatte, so dass über ein Thermometer die rektal gemessene Körpertemperatur mittels eines Rückkopplungssystems bei $37^\circ C \pm 0,5^\circ C$ konstant gehalten werden kann. Zu Beginn der OP wird durch einen medianen Hautschnitt der Halsbereich der Maus eröffnet, dann werden die großen paarigen Speicheldrüsen voneinander getrennt und zur Seite präpariert, bis man freie Sicht auf die Trachea gewinnt. Durch die Entfernung von Binde- und Fettgewebe erfolgt die Darstellung der Arteriae carotis communis, externa und interna sowie der Carotisbifurkation. Zuerst wird vorsichtig der mit der Arteria carotis communis kranial verlaufende Nervus vagus stumpf vom Gefäß getrennt, um die Arterie danach relativ weit proximal mit einer Gefäßligatur zu verschließen. Ebenso wird die A. carotis externa verschlossen. Die A. carotis interna ist anfangs nur locker mit einer Ligatur zu versehen. Der Blutfluß aus dem Circulus arteriosus cerebri (Willis) wird nämlich erst nur vorübergehend mittels eines distal der lockeren Gefäßligatur zu platzierenden Gefäßclips unterbrochen. Anschließend schneidet man vorsichtig die A. carotis communis proximal der Carotisbifurkation, aber distal der verschließenden Gefäßligatur ein, um über diese Öffnung das Filament in die Arterie einzuführen. Das Filament wird dabei nur bis zu dem festsitzenden Clip in die A. carotis interna vorgeschoben. Danach wird der Gefäßclip wieder gelöst und praktisch gleichzeitig das vorplatzierte Filament weiter in die A. carotis interna vorgeführt. Dabei muss unter Sichtkontrolle darauf geachtet werden, dass das Filament nicht fälschlicherweise in der A. pterygopalatina, die weiter distal ebenfalls noch aus der A. carotis interna entspringt, zu liegen kommt, sondern weiter in der Interna verbleibt. Das Filament sollte weitgehend im Gefäß verschwinden, bis man nach sanftem Anstoßen das Vorschieben abbricht und die noch lockere Gefäßligatur um die A. carotis interna zuzieht. Die Spitze des Filamentes befindet sich nun bei regelrechter Operation im A1-Segment der A. cerebri anterior und verlegt damit das M1-Segment der A. cerebri media und die Aa. choroideae anteriores (Abbildung 2.2). Es entsteht deshalb eine Ischämie im Mediastromgebiet, jedoch nicht im Anteriorstromgebiet, da die A. cerebri anterior über die A. Communicans anterior perfundiert wird. Je nach angestrebter Ischämiezeit, in unserem Fall 30 Minuten, kann das Filament wieder entfernt werden. Dazu wird die Ligatur über der A. carotis interna vorsichtig geöffnet, das Filament entfernt und dieselbe Ligatur wieder schnell zugezogen, um den Blutverlust aus dem Circulus arteriosus Willisii bei der Reperfusion möglichst klein zu halten. Die Versuchstiere befinden sich während der gesamten operativen Manipulation in tiefer Inhalationsnarkose. Der postoperative Wundschmerz (Hautschnitt am Hals) wird durch das schon intraoperativ

erfolgte Einbringen eines Lokalanästhetika-Gels minimiert. ¹

2.3 Verhaltenstestung

2.3.1 Catwalk

Der „*Catwalk*“ ist ein neuartiges System zur Erfassung von Gangparametern bei Maus und Ratte. Die Maus überquert dabei einen 1,3 m langen Korridor, welcher von zwei seitlichen Plastikwänden und einer Glasplatte unten gebildet wird. In der Glasplatte wird grünes Licht intern reflektiert, wenn jedoch die Maus mit ihren Pfoten die Glasplatte berührt, wird an dieser Stelle das Licht gestreut. Dieses Streulicht wird von unten mit einer empfindlichen Kamera aufgenommen. Aus dem so registrierten Gangmuster wird computer- und softwaregestützt (Catwalk XT 8.1, Noldus Information Technology, Niederlande) eine Reihe von Parametern gewonnen, welche das Gangbild der Maus beschreiben. In der praktischen Versuchsdurchführung wird der Heimkäfig der Maus an ein Ende des Glaskorridors gesetzt und die Maus am anderen Ende platziert. Nun kann sich die Maus zwanglos in ihren Heimkäfig zurückbegeben. Für jedes Tier wurden mindestens drei erfolgreiche Durchgänge gefordert; erfolgreich war ein Durchgang, wenn es zu keinem offensichtlichen Anhalten kam, die maximale Geschwindigkeitsvariation nicht mehr als 60% und die maximale Geschwindigkeit nicht mehr als 400 mm/s betrug. Unerfolgreiche Versuche wurden wiederholt. Präoperativ wurden die Tiere über vier Tage an den Versuchsaufbau gewöhnt, postoperativ wurden die Tiere alle vier Tage getestet. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte der erfolgreichen Durchläufe verwendet.

2.3.2 Rotarod

Dies ist ein Standardverfahren zur Erfassung von motorischer Koordination und Geschicklichkeit (Jones und Roberts, 1968): Die Mäuse werden auf einen rotierenden Stab (Durchmesser 3,2 cm) in einer Höhe von 15 cm gesetzt, der innerhalb von 300 Sekunden von 4 auf 40 rpm beschleunigt. Gemessen wird, wie lange sich die Maus durch Mitlaufen auf dem Stab halten kann. Da die Leistung auf dem Rotarod nicht unerheblich durch den motorischen Lernprozess beeinflusst wird, war ein ausgiebiges präoperatives Training (an vier Tagen mit jeweils vier Versuchen) notwendig. Am letzten Tag des Trainings wurde die Ausgangsleistung der Tiere ermittelt. Postoperativ wurden die Tiere alle zwei Tage bis

¹Die Beschreibung der MCAo-Prozedur wurde übernommen aus Tierversuchsanträgen von Dr. med. Karen Gertz, Charité Berlin, und entspricht dem Standardvorgehen in unserem Labor (Dirnagl und Group, 2012). Für eine ausführliche Beschreibung siehe auch Engel et al. (2011).

Versuchstag 8 getestet. Für die statistische Analyse wurde der Mittelwert aus drei Versuchen gebildet. Ein Tier in der Kontrollgruppe zeigte keine ausreichende Motivation, den Test korrekt durchzuführen und wurde von der weiteren Testung ausgeschlossen.

2.3.3 Pole Test

Der *“Pole Test”* wurde, mit geringfügigen Veränderungen, verwendet, wie von Matsuura et al. (1997) beschrieben: Ein vertikaler Eisenstab wird mit einem rauhen Klebeband abgeklebt, so daß eine Oberfläche entsteht, an der sich das Versuchstier leicht festhalten kann. Das Tier wird mit dem Kopf nach oben an das obere Ende des Stabes gesetzt. Folgende Parameter werden gemessen: die Zeit, die das Tier benötigt, um sich mit dem Kopf nach unten zu drehen (*“t turn”*), und die Zeit, die das Tier benötigt, um auf den Boden zu gelangen (*“t down”*). Präoperativ werden die Tiere über vier Tage viermal täglich trainiert und am letzten Trainingstag ein Ausgangswert erhoben. Sollte das Tier nicht in der Lage sein, den Kopf zu wenden, so wird die gesamte Zeit, die benötigt wurde, um den Boden zu erreichen ebenfalls als *“t turn”* gewertet. Postoperativ wurden die Tiere ab Tag 2 alle drei Tage bis Tag 20 getestet. Für die statistische Analyse wurde der Mittelwert aus vier Versuchen gebildet. Zwei Tiere der Kontrollgruppe waren nicht in der Lage, den Test korrekt auszuführen, und wurden von der Analyse ausgeschlossen.

2.3.4 Pole Rotation

Dieser Test stellt eine von uns entwickelte Neuinterpretation des *“Pole Tests”* dar: Während der Durchführung des *“Pole Tests”* ermittelten wir zusätzlich die Rotation, welche die Maus beim Abstieg um den Eisenstab ausführt mittels einer Videokamera. Für die statistische Analyse wurde der Mittelwert aus vier Durchgängen gebildet.

2.3.5 Chimney Test

Dieser Test untersucht die motorische Koordination des Versuchstieres (Heinecke, 1987): Die Maus wird mit dem Kopf voran in eine horizontal ausgerichtete Glasröhre (30 mm Durchmesser, 25 cm Länge) gesetzt. Sobald die Maus am Ende der Röhre angelangt ist, wird die Röhre aufgerichtet, die Maus zeigt also mit dem Kopf nach unten. Es wird die Zeit gemessen, die das Tier benötigt, um sich 20 cm weit zurück zu bewegen. Dieser Versuch wurde einmalig präoperativ und an Tag zwei und drei nach Operation durchgeführt.

2.3.6 Adhesive Removal Test

Der *“Adhesive Removal Test”* prüft die sensomotorische Leistung des Tieres (Bouet et al., 2009): Nachdem ein kleines Pflaster auf die Vorderpfoten geklebt wurde, wird gemessen, wie lange die Maus benötigt, um das Pflaster mit ihrer Schnauze oder durch Schütteln der Pfote zu kontaktieren, und wie lange sie benötigt, um das Pflaster zu entfernen. Dabei wurde abwechselnd die linke oder die rechte Vorderpfote abgeklebt. Die Tiere wurden präoperativ über 5 Tage dreimal täglich in dieser Aufgabe trainiert. Postoperativ wurden die Tiere ab Tag zwei alle vier Tage getestet. Von drei Versuchen wurden die zwei besten gemittelt und statistisch ausgewertet.

2.3.7 Corner Test

Dies ist ein Test zur Operationalisierung des sensomotorischen und posturalen Defizits. Wir benutzten dabei einen modifizierten Aufbau nach Hao et al. (2008): Zwei Kartons mit den Ausmaßen $30 \times 20 \times 1 \text{ cm}^3$ werden in einem 30° Winkel zueinander an ihren Kanten befestigt. Zwei dieser Aufbauten ergeben ein rautenförmiges Versuchsareal. Das einzelne Tier wird zu Beginn des Versuches in der Mitte der Testarena platziert und kann das Areal frei erkunden. Eine kleine Öffnung zwischen den Kartons stimuliert die Maus zum Eintritt in die beiden Eckstrukturen. Beim Erkunden der Ecköffnung berühren die Schnurrhaare, oder Vibrissen, beidseits zeitgleich die begrenzenden Kartonwände. Dies führt, idealerweise, zu einer vertikalen Aufrichtbewegung der Tiere mit einer subsequenten Drehung nach rechts oder links. Dieser Vorgang beschreibt eine erfolgreiche Drehung im *“Corner Test”*-Paradigma. Für jede Maus wurden in einem Testdurchlauf zehn dieser Drehungen beobachtet und ausgewertet. Dabei wurde der Lateralitätsindex wie folgt berechnet: $LI = \frac{\text{Drehung links} - \text{Drehung rechts}}{\text{Drehung links} + \text{Drehung rechts}}$. Präoperativ wurde für jede Maus der Ausgangswert bestimmt. Die Testung erfolgte postoperativ ab Tag sieben alle neun Tage.

2.3.8 Corner Rotation

Bei diesem von uns entwickelten Testverfahren wurde der gleiche Aufbau wie im *“Corner Test”* benutzt. Allerdings wurde in diesem Test über einen festen, 5-minütigen Zeitraum und bei freier Lokomotion im Testareal das spontane Drehverhalten der Tiere analysiert. Jede Drehung um 180° gegen den (links) oder im (rechts) Uhrzeigersinn wurde gezählt, unabhängig von eventuell begleitendem Aufrichtverhalten. Unvollständige Drehungen gingen nicht in die Messung mit ein, d.h. eine 180° Drehung konnte durch mehrere kleinere Drehbewegungen in beliebiger Richtung unterbrochen werden, die nicht gewertet

wurden (vergleiche auch Abbildung 2.3). Als Nulllinie wählten wir die Linie in Projektion auf die beiden spitzen Eckwinkel des Versuchsaufbaus. Aus den Daten wurde der Lateralitätsindex wie folgt berechnet: $LI = \frac{\text{Drehung links} - \text{Drehung rechts}}{\text{Drehung links} + \text{Drehung rechts}}$. Die Messung erfolgte gleichzeitig mit dem Corner Test.

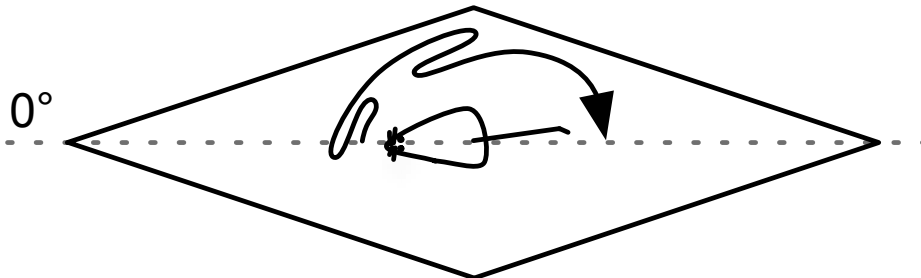


Abbildung 2.3: Versuchsaufbau im Corner Rotation Test - dargestellt ist eine einzelne, komplette 180° Drehung nach rechts, unterbrochen von mehreren Teildrehungen, die nicht gewertet wurden. Gestrichelt gezeichnet die virtuelle 0° Linie.

2.3.9 Cylinder Test

Dieser Test, in der Literatur auch teilweise als *“Paw Preference Cylinder Test”* bezeichnet, quantifiziert den spontanen Gebrauch der Vorderpfoten (Li et al., 2004): die Mäuse wurden in einen Plexiglas-Zylinder (30 cm hoch, 20 cm Durchmesser) gesetzt und 5 Minuten lang in frontaler Aufsicht gefilmt. Ein Spiegel hinter dem Zylinder stellte sicher, dass auch Bewegungen in Rückansicht ausgewertet werden konnten. Pro Maus und Testung wurden 20 vertikale Explorationsbewegungen aufgezeichnet, wobei eine Explorationsbewegung aus einer Aufrichtbewegung mit abstützendem Kontakt von Vorderpfote(n) und Zylinderglas besteht. Dieser Kontakt konnte auf drei verschiedene Arten erfolgen: a) die Maus berührte das Glas mit der ipsilateralen (linken) Vorderpfote, b) sie berührte es mit der kontralateralen (rechten) Vorderpfote oder c) beide Vorderpfoten berührten das Glas zeitgleich. Präoperativ wurde eine Ausgangsmessung erhoben, postoperativ wurden die Tiere, beginnend an Tag 6, alle 9 Tage getestet. Der Lateralitätsindex wurde wie folgt gebildet: $LI = \frac{\text{Kontakte (links - rechts)}}{\text{Kontakte (links + rechts + beide)}}$.

2.3.10 Bowl-Test

Dieser in der Schlaganfallforschung neue Test untersucht ebenfalls das Rotations- oder Drehverhalten der Tiere. Dabei werden die Tiere einzeln in eine 25 cm durchmessende Schüssel gesetzt und mittels Videokamera 30 Minuten lang bei der freien Fortbewegung

2 Methodik

aufgezeichnet. Die Auswertung des Rotationsverhaltens erfolgte mittels FG3xPATH Software, Version 7.0 (HaSoTec, Rostock). Die Tiere wurden präoperativ sowie an den Tagen 8, 27 und 26 getestet. Aus den gewonnenen Werten für das Rotationsverhalten (in 360° Drehungen im Gegenuhrzeiger- (links) beziehungsweise Uhrzeigersinn (rechts)), wurde ein Lateralitätsindex wie folgt gebildet: $LI = \frac{\text{Drehung links} - \text{Drehung rechts}}{\text{Drehung links} + \text{Drehung rechts}}$.

2.3.11 Paw Preference Test

Dieser Versuch stellte ursprünglich den Goldstandard für die Untersuchung von Händigkeit in der Maus dar (*“Collins’ Handedness Test”*, Collins, 1968). In unserem Kontext gingen wir allerdings davon aus, daß eine mögliche post-operative Veränderung der bevorzugten Greifhand primär als Ausdruck eines motorischen Defizits zu werten sei. Das Versuchstier befindet sich in einer Plexiglaszelle von $11,4 \times 6,4 \times 3,8 \text{ cm}^3$ Größe. In der frontalen Wand ist eine kleine Öffnung, durch die die Maus mit den Vorderpfoten nach Futter (zermahlene Standard-Pellets) greifen kann. Die Tiere bekamen in der Vornacht des Versuchs und am Versuchstag kein Futter, um ausreichende Motivation zu gewährleisten. Unmittelbar nach Beendigung des Versuches wurde der ad libitum Zugang zu Futter wiederhergestellt. Präoperativ und an den Tagen 9, 18 und 27 wurden pro Tier 50 Greifversuche aufgezeichnet und ausgewertet. Der Lateralitätsindex wurde wie folgt gebildet: $LI = \frac{\text{Nutzung linke Pfote} - \text{Nutzung rechte Pfote}}{\text{Nutzung linke Pfote} + \text{Nutzung rechte Pfote}}$. Ein Tier der MCAo-Gruppe zeigte sich nicht in der Lage, den Test korrekt durchzuführen und wurde von der Analyse ausgeschlossen.

2.4 Histologische Auswertung

Nach Beendigung der Verhaltensversuche an Tag 28 wurden die Tiere in tiefer Isofluran-Narkose dekapitiert, die Gehirne entnommen und schockgefroren. Die Läsionsgröße wurde mittels $20\mu\text{m}$ dicker, Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbter Kryomikrotom-Schnitte ermittelt. Die Läsionsgröße wurde aus der Summe der in den Einzelschnitten demarkierten infarzierten Areale ermittelt.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem SPSS 20 (IBM Corp., USA) Software-Paket. Die postoperativ gewonnenen Daten wurden einer Varianzanalyse mit wiederholten Messungen (*“repeated measures ANOVA”*, kurz *RM ANOVA*) unterworfen. Wenn nicht anders

spezifiziert, diente hierbei als Zwischensubjektfaktor die Gruppenzugehörigkeit (*“Gruppe”*: MCAo vs. scheinoperiert), Innersubjektfaktor (*“Zeit”*) waren die wiederholten postoperativen Messungen. Korrekturen für Sphäritätsverletzungen wurden, wenn angemessen, nach Greenhouse-Geisser vorgenommen. Zur Auswertung von Gruppenunterschieden zu einzelnen Zeitpunkten wurde eine explorative Analyse mittels unabhängiger t-Tests durchgeführt. Dabei erfolgte keine Korrektur für multiple Vergleiche. Als signifikant wurde ein zweiseitiges p von maximal 0,05 angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Auswertung

Das mittlere histologische Läsionsvolumen an Tag 28 Tage MCAo betrug $8,3 \text{ mm}^3$ bei einer Standardabweichung von $3,1 \text{ mm}^3$.

3.2 Verhaltenstestung

3.2.1 Rotarod

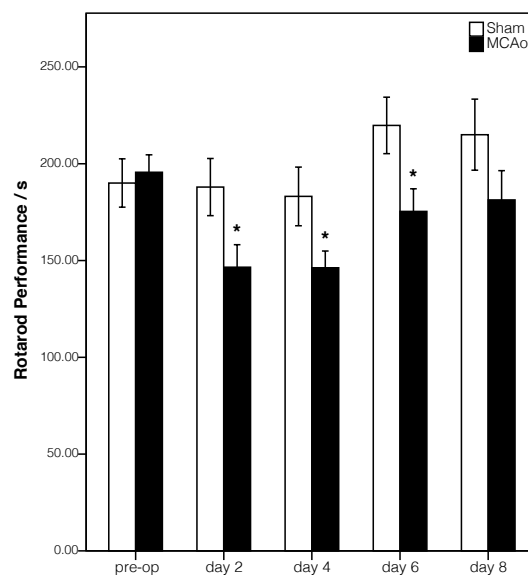


Abbildung 3.1: Rotarod Ergebnisse von MCAo- und scheinoperierten (“*Sham*”) Mäusen. Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=9-12 pro Gruppe). *p < 0.05 vs. “*Sham*” (unabhängiger t-Test).

Präoperativ fanden wir keinen Unterschied in den beiden Versuchsgruppen. Postoperativ zeigten MCAo-operierte Tiere ein deutliches Defizit über acht Tage (RM ANOVA: Effekt der Gruppe: $F=6,3$ $p=0,021$; Effekt der Zeit: $F=7,5$ $p=0,001$; Gruppe x Zeit

3 Ergebnisse

Interaktion: nicht signifikant). In der Einzelzeitpunktanalyse ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bis Tag 6 nachweisen (Abbildung 3.1).

3.2.2 Pole Test

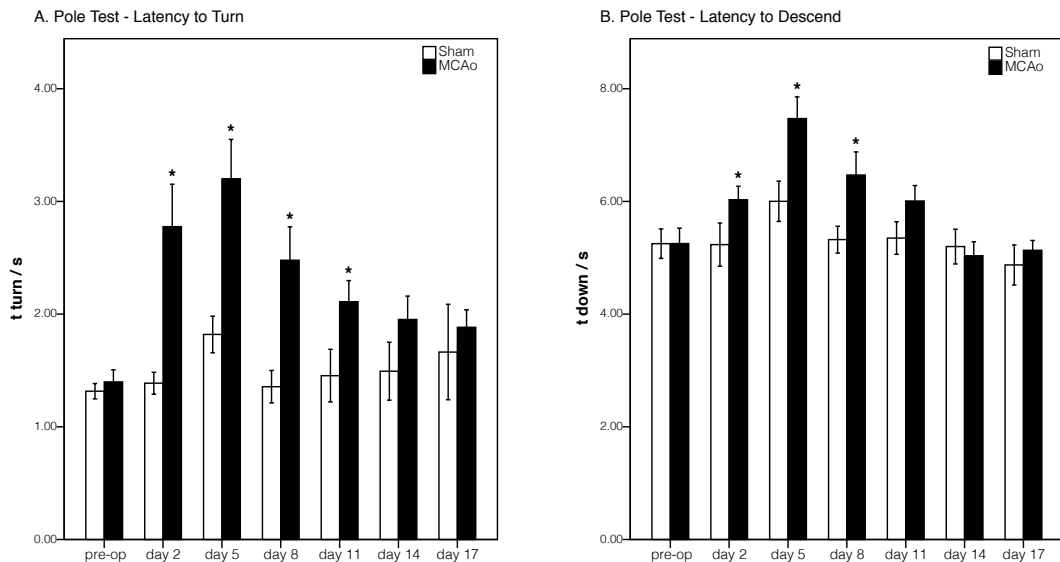


Abbildung 3.2: Pole Test Ergebnisse von MCAo- und scheinoperierten (“Sham”) Mäusen. Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=8-11 pro Gruppe). * $p < 0.05$ (unabhängiger t-Test) vs. “Sham”. A. Latenz der Kopfwendung (“t turn”). B. Latenz des Herabkletterns (“t down”).

Präoperativ zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen, sowohl in der “t turn” als auch in der “t down” Aufgabe. Die Analyse der postoperativen Messungen bis Tag 20 mittels ANOVA mit wiederholten Messungen zeigte in der “t turn” Aufgabe einen signifikanten Einfluß von *Gruppe* ($F=8,4$; $p=0,01$), *Zeit* ($F=3,7$; $p=0,012$) sowie eine signifikante *Zeit x Gruppe* Interaktion ($F=3,0$; $p=0,029$). Die Analyse der “t down” Werte ergab einen signifikanten Einfluß von *Zeit* ($F=18,1$; $p < 0,001$) und eine signifikante *Zeit x Gruppe* Interaktion ($F=3,4$; $p=0,012$), aber keinen unabhängigen Effekt der *Gruppe* ($F=3,8$; $p=0,069$). Bei Beschränkung der Analyse auf die ersten 11 Tage zeigte sich auch hier ein signifikanter Einfluß der *Gruppe* ($F=7,5$; $p=0,014$). In der Einzelzeitpunktanalyse kann in der “t turn” Aufgabe ein signifikantes Defizit von MCAo-operierten Tieren bis Tag 11 nachgewiesen werden. Hingegen verliert sich der Unterschied zwischen den Gruppen in der “t down” Aufgabe bereits nach Tag 8 (Abbildung 3.2.)

3.2.3 Chimney Test

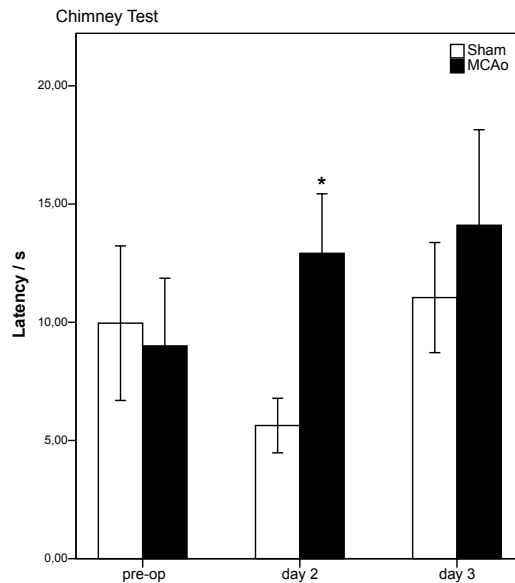


Abbildung 3.3: Chimney Test Ergebnisse von MCAo- und scheinoperierten (“Sham”) Mäusen. Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=10-12 pro Gruppe). *p < 0.05 vs. “Sham” (unabhängiger t-Test).

Gruppenunterschiede zeigten sich im Chimney Test lediglich an Tag zwei der Testung (p=0,031), an Tag drei war dieses Defizit bereits nicht mehr nachweisbar.

3.2.4 Catwalk

Um eine MCAo-bedingte Asymmetrie des Gangmusters bei MCAo-operierten Tieren nachzuweisen, führten wir eine ANOVA mit den beiden Innersubjektfaktoren Pfote (linke vs. rechte Pfote) und Zeit (Messungen von Tag 4 bis 28) und dem Zwischensubjektfaktor Gruppe (MCAo vs. scheinoperiert) durch. Es zeigte sich eine signifikante Pfote x Gruppe Interaktion für die Parameter Pfotenabdruckbreite (“Print Width”) der Vorderpfoten und Dauer des Bodenkontaktes der Hinterpfoten (“Stand”) im Gangzyklus als Ausdruck einer einseitigen Einschränkung nach MCAo (Tabelle 3.1, rechte Spalte).

Die ANOVA mit wiederholten Messungen identifizierte eine Reihe von weiteren Parametern, welche signifikant durch den MCAo-Eingriff beeinflusst wurden, jedoch keine Seitenasymmetrie aufwiesen (siehe Tabelle 3.1). Dies waren: die Durchschnittsgeschwindigkeit (“Average Speed”), das Maximum des rechten Hinterpfoten-Bodenkontaktes (“RH MaxContactAt”), die Dauer der Standphase (“Stand”), die Geschwindigkeit der Pfotenbe-

3 Ergebnisse

wegung (*SwingSpeed*), die Schrittlänge (*StrideLength*), der Anteil der Standphase am Gangzyklus (*DutyCycle*), die Gangbreite der Vorderpfoten (*Base of Support Front*), die Anzahl der Gangmuster (*StepSequence Patterns*), der Anteil der alternierenden Gangmuster AA und AB (*StepSequence AA/AB*), die zeitliche Beziehung in der Nutzung der linken Vorder- und Hinterpfote (*Phase Dispersion LF->LH*) und der prozentuale Anteil, mit welchem nur eine Pfote (*Support Single*) bzw. beide Pfoten eines Gürtelpaares (*Support Girdle*) das Körpergewicht im Gangzyklus tragen. Wir korrelierten diese Parameter auch mit der Durchschnittsgeschwindigkeit der Tiere (Tabelle 3.2). Bei mehr als 100 Parametern korrelierten 66 mit der Durchschnittsgeschwindigkeit, von welchen wiederum 14 durch die Gruppenzugehörigkeit beeinflusst wurden. Unabhängig von der Durchschnittsgeschwindigkeit waren die Parameter *Base of Support Front*, *StepSequence AA/AB*, *PhaseDispersion*, *Support Girdle* und *Print Width*.

3.2 Verhaltenstestung

Tabelle 3.1: Catwalk Parameter – ANOVA Ergebnisse

Parameter (Einheit)	Gruppe		Zeit		Gruppe x Zeit		Pfoote		Pfoote x Gruppe		Kommentar
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	
Average Speed	5,005	0,037*	1,854	0,094	0,988	0,437	N/A	N/A	3,373	0,081	MCAo-operierte bewegen sich langsamer über den Catwalk.
RH MaxContactAt (s)	5,937	0,024*	0,618	0,715	1,202	0,310	0,128	0,724	3,373	0,081	Die Bremsphase von MCAo-operierten Tieren ist verlängert, d.h. der Zeitpunkt des maximalen Pfootenkontakts ist verzögert.
RF Stand (s)	6,81	0,017*	4,90	0,000*	0,63	0,706	0,05	0,830	0,72	0,406	MCAo-operierte Tiere zeigen eine verlängerte Standarddauer in den Vorderpfoten.
LF Stand (s)	5,12	0,035*	6,12	0,000*	0,71	0,588					
RH Stand (s)	2,02	0,170	3,83	0,002*	0,57	0,750	11,25	0,003*	4,37	0,050*	Wir finden eine gruppenabhängige (d.h. MCAo-bedingte) Asymmetrie in der Standarddauer der rechten im Vergleich zur linken Hinterpfote, sowie eine gruppenübergreifende (technisch bedingte) Detektionssymmetrie links vs. rechts.
LH Stand (s)	0,05	0,823	5,60	0,000*	0,92	0,482					
RF SwingSpeed (mm/s)	4,78	0,041*	1,16	0,330	1,03	0,413	0,60	0,449	2,51	0,129	Die rechte Vorderpfote von MCAo-operierten Tieren schwingt während des Ganges langsamer als die von scheinoperierten Tieren.
LF SwingSpeed (mm/s)	3,35	0,082	1,26	0,282	1,14	0,345					
RH SwingSpeed (mm/s)	10,42	0,004*	1,97	0,075	1,71	0,124	29,12	0,000*	1,00	0,330	Die Hinterpfoten von MCAo-operierten Tieren schwingen während des Ganges langsamer als die von scheinoperierten Tieren. Es zeigt sich eine gruppen-unabhängige Detektionssymmetrie zwischen der linken und rechten Hinterpfote.
LH SwingSpeed (mm/s)	11,046	0,003*	3,512	0,003*	1,366	0,234					
RF StrideLength (mm)	8,77	0,008*	5,08	0,000*	1,08	0,381	2,05	0,168	0,13	0,718	MCAo-operierte Tiere machen kürzere Schritte mit allen vier Pfoten.
LF StrideLength (mm)	8,84	0,008*	5,09	0,000*	1,85	0,096					
RH StrideLength (mm)	8,55	0,008*	5,83	0,000*	1,92	0,083	1,61	0,219	0,28	0,602	
LH StrideLength (mm)	7,74	0,011*	5,07	0,000*	1,53	0,174					
RF DutyCycle (%)	9,08	0,007*	12,92	0,000*	0,39	0,886	0,47	0,501	1,39	0,252	Die prozentuale Dauer der Standphase im Gangzyklus von MCAo-operierten Tieren ist verlängert.
LF DutyCycle (%)	14,35	0,001*	17,67	0,000*	1,45	0,201					
RF PrintWidth (mm)	1,24	0,279	5,62	0,000*	0,44	0,850	2,44	0,134	5,76	0,026*	Im Vergleich von linkem vs. rechtem Vorderpfotenabdruck finden wir eine gruppenabhängige (MCAo-bedingte) Asymmetrie in der Abdruckbreite.
LF PrintWidth (mm)	2,61	0,122	4,79	0,000*	1,04	0,404					
Base of Support Front	17,83	0,000*	2,86	0,012*	2,14	0,054	N/A	N/A	N/A	N/A	Der Abstand der Vorderpfotenabdrücke (die Trittbreite) ist in MCAo-operierten Tieren verbreitert.
StepSequence Patterns	6,78	0,017*	0,95	0,342	0,032	0,860					Die Anzahl der Gangmuster ist verringert in MCAo-operierten Tieren.
StepSequence AA	6,99	0,016*	2,95	0,010*	2,01	0,070	N/A	N/A	N/A	N/A	Inbesondere der Anteil des alternierenden Gangmusters "AB" ist vergrößert, während das Gangmuster "AA" weniger häufig gezeigt wird.
StepSequence AB	8,37	0,009*	3,87	0,001*	2,50	0,026*					
PhaseDispersion RF->RH	3,00	0,099	3,17	0,025*	1,37	0,256	N/A	N/A	N/A	N/A	"Phase Dispersion" beschreibt die zeitliche Beziehung zweier Pfoten innerhalb des Schrittzklus, d.h. in welchem Zeitintervall die beiden Pfoten den Boden berühren (ausgedrückt in Prozent der Schrittzklusdauer). MCAo-operierte Tiere zeigen ein anderes Verhältnis in der Relation der ipsilateralen Vorder- und Hinterpfoten zueinander.
PhaseDispersion LF->LH	5,95	0,024*	7,07	0,000*	3,04	0,008*					
Support Single (%)	5,78	0,026*	19,59	0,000*	1,04	0,388	N/A	N/A	N/A	N/A	MCAo-operierte Tiere belasten seltener nur ein Bein während des Gangzyklus und tragen ihr Gewicht auch seltener mit den Gürtelpaaren (rechte und linke Vorder- bzw. Hinterpfote).
Support Girdle (%)	5,09	0,035*	0,86	0,526	1,85	0,096					

Tabelle 3.1: Ergebnisse zweier separater Varianzanalysen mit F-Statistik (F) und Signifikanzniveau (Sig.), Gruppe, Zeit und Gruppe x Zeit sind Faktoren einer Varianzanalyse mit dem Innersubjektfaktor Zeit (Messungen Tag 4 - 28) und dem Zwischensubjektfaktor Gruppe (MCAo vs. scheinoperiert). Pfoote und Pfoote x Gruppe sind Einflußgrößen in einer Varianzanalyse mit den Innersubjektfaktoren Pfoote (links vs. rechts) und Zeit und dem Zwischensubjektfaktor Gruppe (MCAo vs. scheinoperiert), n = 10-12 pro Gruppe. *p < 0,05.

Tabelle 3.2: Catwalk Parameter - Korrelationsanalyse

Parameter	Durchschnittsgeschwindigkeit	
	r	Sig.
RH MaxContactAt	0,16	0,047*
RF Stand	-0,79	0,000**
LF Stand	-0,78	0,000**
RH Stand	-0,78	0,000**
LH Stand	-0,73	0,000**
RF SwingSpeed	0,81	0,000**
LF SwingSpeed	0,82	0,000**
RH SwingSpeed	0,75	0,000**
LH SwingSpeed	0,69	0,000**
RF StrideLength	0,55	0,000**
LF StrideLength	0,55	0,000**
RH StrideLength	0,56	0,000**
LH StrideLength	0,53	0,000**
RF DutyCycle	-0,42	0,000**
LF DutyCycle	-0,56	0,000**
RF PrintWidth	0,018	0,82
LF PrintWidth	0,015	0,85
BOS FrontPaws	-0,06	0,44
StepSequence Patterns	-0,34	0,000**
StepSequence AA	0,16	0,05*
StepSequence AB	-0,12	0,13
PhaseDispersion RF->RH	-0,10	0,23
PhaseDispersion LF->LH	-0,13	0,10
Support Single	0,32	0,000*
Support Girdle	-0,13	0,12

Legende: r, Pearson Korrelationskoeffizient; Sig., Signifikanz. *p<0,05 **p<0,001; n=154.

Für eine Erläuterung der Parameter, siehe Tabelle 3.1 und Text.

3.2.5 Adhesive Removal Test

Präoperativ zeigte sich kein Gruppenunterschied. Die Latenz, mit der die kontralaterale rechte Vorderpfote berührt wurde, war in MCAo-operierten Tieren signifikant verlängert (*RMANOVA*: Effekt der Gruppe: $F=20,0$ $p<0,001$; Effekt der Zeit: $F=2,0$ $p=0,73$; Gruppe x Zeit Interaktion: $F=6,0$ $p<0,001$). In der Einzelzeitpunktanalyse zeigte sich hier eine Einschränkung bis Tag 18 in MCAo-operierten Tieren (mit Ausnahme von

Tag 14, vergleiche Abbildung 3.4). Die Latenz, mit der das Pflaster auf der ipsilateralen linken Vorderpfote berührt wurde, war hingegen über den gesamten Testzeitraum unbeeinträchtigt. Die Latenz, mit der das Pflaster von der kontralateralen Vorderpfote entfernt wird (*“time to remove”*) war über alle postoperativen Messungen signifikant beeinflusst von *Gruppe* ($F = 15,0$; $p = 0,001$), *Zeit* ($F = 4,3$; $p = 0,01$) und *Gruppe x Zeit* Interaktion ($F = 6,5$; $p = 0,001$). Die Einzelzeitpunktanalyse zeigte ein signifikantes Defizit von MCAo-operierten Tieren bis Tag vierzehn (mit Ausnahme von Tag 10, vergleiche Abbildung 3.4). Zudem war die Latenz, mit der das Pflaster von der linken Pfote entfernt wird, an Tag 2 in der MCAo-Gruppe signifikant verlängert ($p = 0,044$). Für diesen Parameter zeigte die *RM ANOVA* über die ersten drei post-operativen Zeitpunkte einen signifikanten Einfluß der *Gruppe* ($F = 6,1$; $p = 0,022$) ohne relevante Beeinflussung durch *Zeit* oder *Gruppe x Zeit* Interaktion.

3.2.6 Cylinder Test

Trotz präoperativer Vergleichbarkeit der beiden Gruppen konnte im postoperativen Verlauf zu keinem der drei Zeitpunkte ein relevantes Defizit festgestellt werden (Abbildung 3.5).

3.2.7 Corner Test

Die präoperativen Messungen beider Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Postoperativ zeigte sich ein über den ganzen Testzeitraum anhaltendes Defizit in der MCAo-Gruppe, in dem Sinne, daß sich diese Tiere präferentiell nach links drehten, ausgedrückt durch einen positiven Lateralitätsindex (*RM ANOVA*: Effekt der Gruppe: $F = 19,4$ $p < 0,001$; kein signifikanter Effekt von *Zeit* oder *Zeit x Gruppe* Interaktion). Der Gruppenunterschied war auch in der individuellen Zeitpunktanalyse durchweg signifikant (Abbildung 3.6).

3.2.8 Corner Rotation

Die durchschnittliche Anzahl pro Tier aufgezeichneten 180° Rotationen betrug 25 mit einer Standardabweichung von 5. Dabei gab es an keinem Meßzeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der aufgezeichneten Rotationen zwischen den beiden Gruppen (nicht dargestellt). Präoperativ zeigte sich kein relevanter Gruppenunterschied in der Drehpräferenz. Post-operativ zeigte die *RM ANOVA* einen signifikanten *Gruppen-effekt* ($F = 11,4$; $p = 0,003$) ohne zusätzlichen Einfluß von *Zeit* oder *Zeit x Gruppe* Interaktion. Ebenso zeigte sich in der Einzelzeitpunktanalyse zu allen postoperativen Zeitpunkten

3 Ergebnisse

ein signifikantes Defizit von MCAo-operierten Tieren (siehe Abbildung 3.6). Die Resultate im Corner Rotation Paradigma korrelierten stark mit denen des klassischen Corner Test ($n=21$): Tag 7: $r=0,72$ $p<0,001$; Tag 16: $r=0,52$ $p=0,016$; Tag 25: $r=0,70$ $p=0,001$. Die prä-operativen Werte verpassten nur knapp das Signifikanzniveau ($r=0,43$ $p=0,053$).

3.2.9 Pole Rotation

Im Pole Rotation Test zeigte sich eine transiente Änderung der Rotationspräferenz im Sinne einer verstärkten Rotation gegen den Uhrzeigersinn bzw. nach links. In der Einzelzeitpunktanalyse erreichte dieser Effekt nur an Tag 5 statistische Signifikanz. Die *RM ANOVA* über die ersten drei post-operativen Zeitpunkte ergab einen signifikanten Einfluß von *Gruppe* ($F=6,4$; $p=0,021$) sowie *Zeit* ($F=5,2$; $p=0,017$) mit schwacher *Gruppe x Zeit* Interaktion ($F=3,5$; $p=0,055$). Scheinoperierte Tiere zeigten keine signifikante Änderung der Rotationspräferenz (Abbildung 3.7).

3.2.10 Bowl Test

Die präoperativ erhobenen Werte der beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Postoperativ zeigten MCAo-operierte Tiere eine persistierende Änderung der Rotationspräferenz zugunsten der Rotation im Gegenuhrzeigersinn (links). ANOVA mit wiederholten Messungen über die Änderung der Rotationspräferenz postoperativ ergab einen signifikanten *Gruppeneffekt* ($F=17,0$; $p=0,001$) ohne Einfluß von *Zeit* oder *Zeit x Gruppe* Interaktion. In der Einzelzeitpunktanalyse war die Änderung der Rotationspräferenz im Vergleich zu den präoperativen Werten zu allen Zeitpunkten signifikant (Abbildung 3.8).

3.2.11 Paw Preference Test

Die präoperative Händigkeit der Tiere unterschied sich nicht signifikant. Postoperativ bildete sich eine deutliche Änderung der Pfotennutzung zugunsten der linken, unbehinderten, Pfote aus. Diese Änderung erreichte statistische Signifikanz an den Tagen 18 und 27. *RM ANOVA* über die postoperativen Messungen zeigte einen signifikanten *Gruppeneffekt* ($F=6,0$; $p=0,024$) ohne Einfluß von *Zeit* oder *Zeit x Gruppe* Interaktion. Scheinoperierte Tiere zeigten keine signifikante Veränderung der Händigkeit (Abbildung 3.9).

3.3 Korrelationsanalyse

Wir fanden in der bivariaten Korrelationsanalyse eine (ohne Korrektur für multiple Vergleiche) signifikante Korrelation zwischen der histologischen Läsionsgröße und der Zeit im “*Adhesive Removal Test*”, mit der das Pflaster von der linken Pfote an Tag 10 entfernt wurde (Korrelationskoeffizient $r=-0,82$; $p=0,001$). Weitere Korrelationen zwischen histologischer Läsionsgröße und funktionellem Defizit bestanden nicht.

3 Ergebnisse

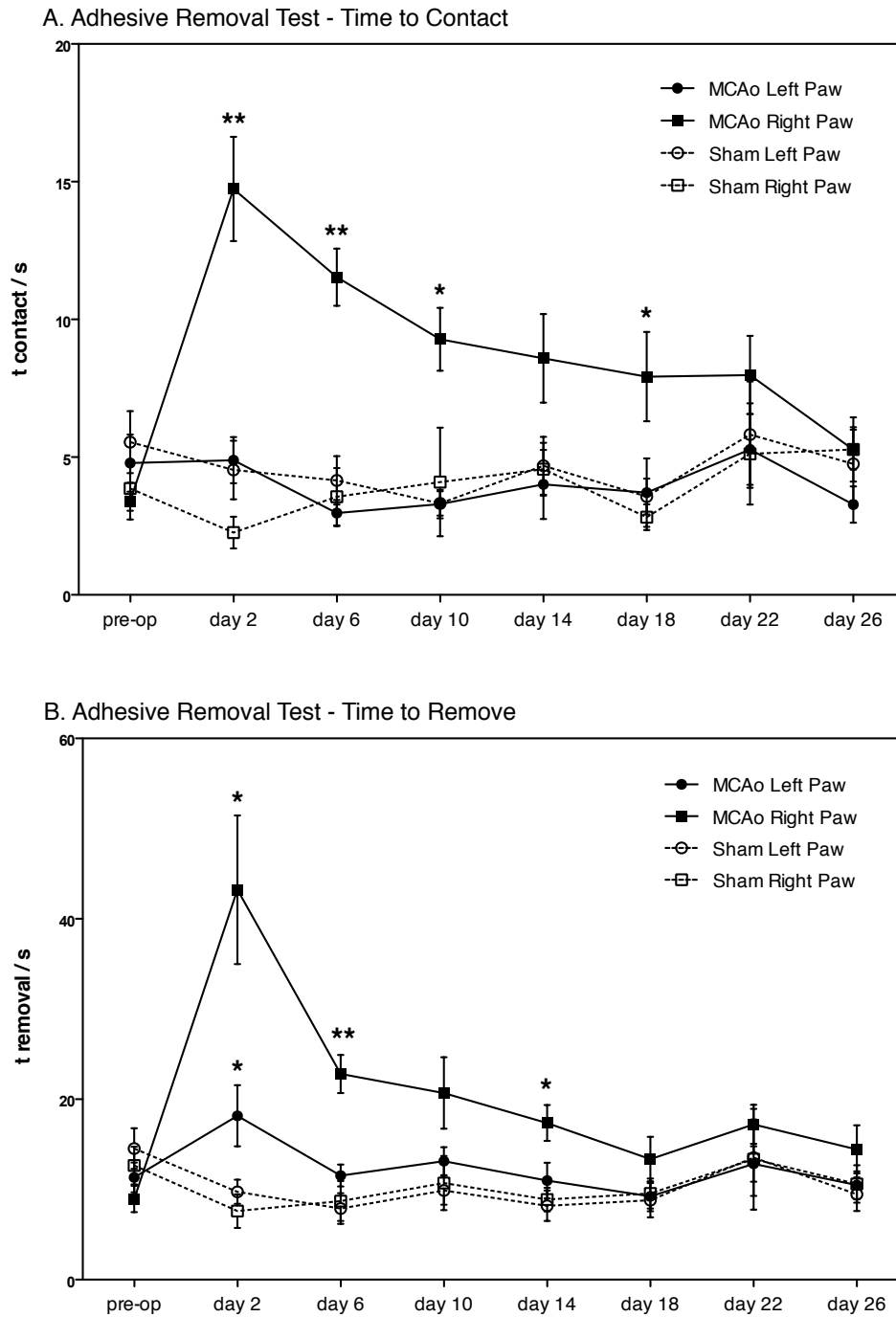


Abbildung 3.4: Adhesive Removal Test Ergebnisse von MCAo- und scheinoperierten (“Sham”) Mäusen. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=10-12 pro Gruppe). **p < 0,001 *p < 0,05 im Vergleich zur gleichen Pfote von scheinoperierten Tieren, unabhängiger t-Test). A. Latenz mit der das Klebeband berührt wurde (“time to contact”). B. Latenz mit der das Klebeband entfernt wurde (“time to remove”).

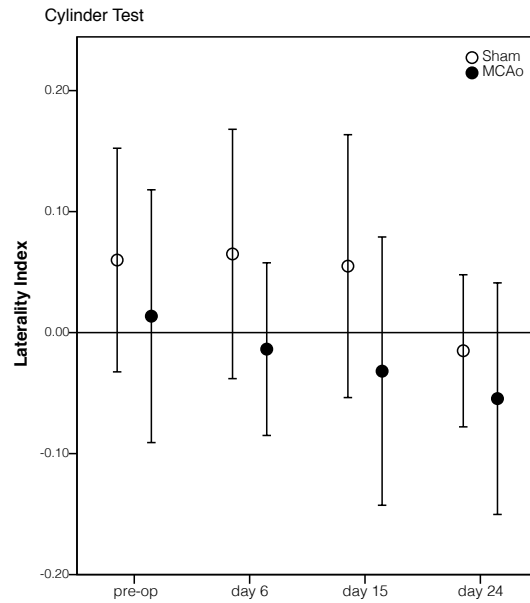


Abbildung 3.5: Cylinder Test Ergebnisse von MCAo- und scheinoperierten (“Sham”) Mäusen. Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=10-11 pro Gruppe).

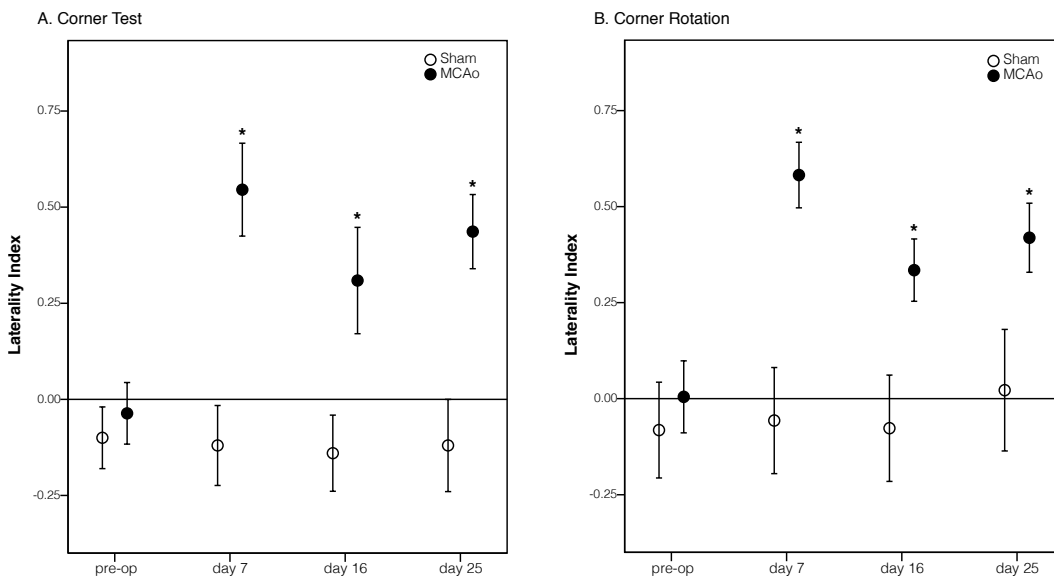


Abbildung 3.6: Corner Test und Rotation Ergebnisse von MCAo- und scheinoperierten (“Sham”) Mäusen. Ein positiver Lateralitätsindex zeigt eine bevorzugte Drehung nach ipsilateral (links) an. Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=10-11 pro Gruppe). *p < 0,05 vs. “Sham” (unabhängiger t-Test). A. Corner Test Ergebnisse. B. Corner Rotation Ergebnisse.

3 Ergebnisse

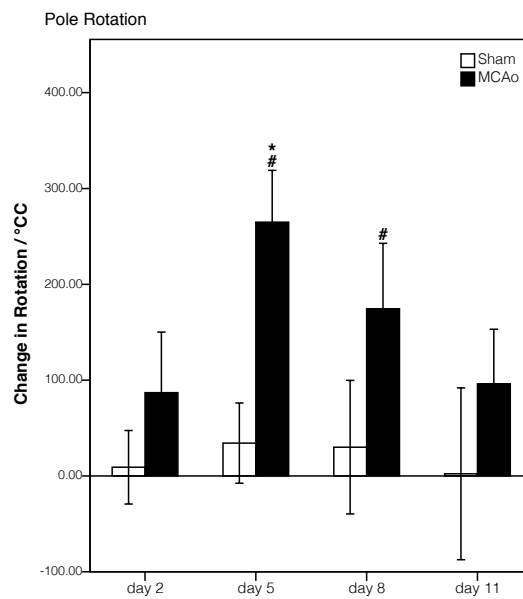


Abbildung 3.7: Pole Rotation Ergebnisse von MCAo- und scheinoperierten (“*Sham*”) Mäusen. Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=8-11 pro Gruppe). *p<0,05 vs. “*Sham*” (unabhängiger t-Test), #p<0,05 vs. keine Änderung der Rotationspräferenz (t-Test bei einer Stichprobe).

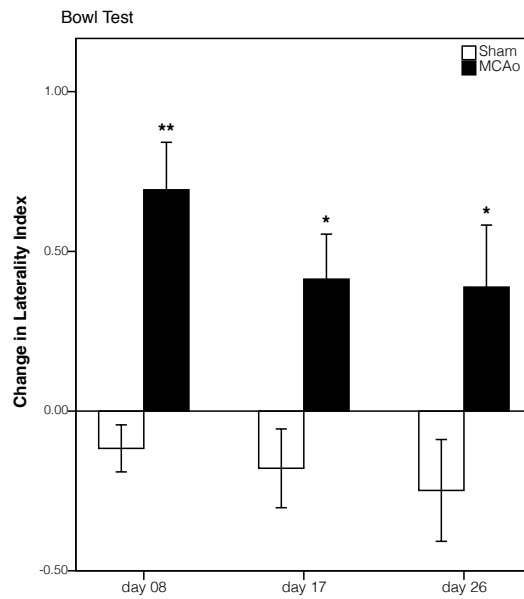


Abbildung 3.8: Bowl Test Ergebnisse von MCAo- und scheinoperierten (“*Sham*”) Mäusen. Dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n=10-11 pro Gruppe). **p < 0,001, *p < 0,05 vs. “*Sham*” (unabhängiger t-Test).

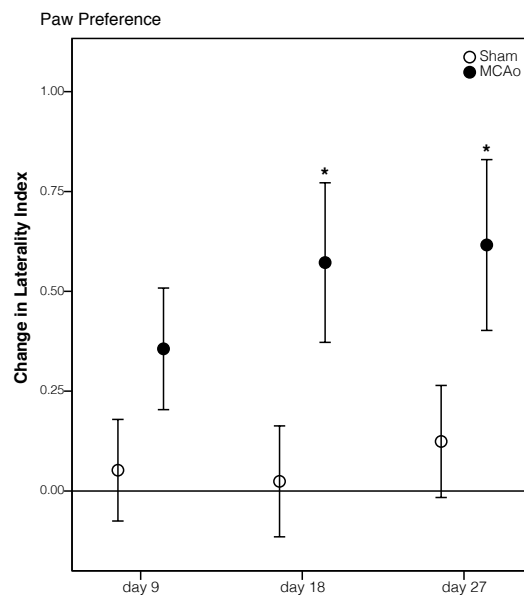


Abbildung 3.9: Paw Preference Ergebnisse von MCAo- und scheinoperierten (“*Sham*”) Mäusen. Dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n=10 pro Gruppe). *p < 0,05 vs. “*Sham*” (unabhängiger t-Test).

4 Diskussion

4.1 Interpretation der eigenen Befunde

Es besteht keine einheitliche Herangehensweise an das Problem der funktionellen Schlaganfall-Evaluation im Mausmodell. Zwar sind mittlerweile eine ganze Reihe von Testverfahren beschrieben, die Auswahl der angewandten Tests basiert aber offenbar häufig primär auf persönlicher Erfahrung und Verfügbarkeit. Es erscheint unerlässlich, die genutzten Methoden der Verhaltenstestung zur Detektion von funktionellen Defiziten zu standardisieren und optimieren, wenn die Routineevaluation funktioneller Defizite nach Schlaganfall tatsächlich erfolgreich etabliert werden soll. Nur durch die vollständige Charakterisierung von Testverfahren kann zum Beispiel die Vergleichbarkeit der Ergebnisse im Rahmen von präklinischen multizentrischen Phase-III-Studien, wie sie jüngst von Dirnagl und Fisher (2012) gefordert wurden, gewährleistet werden.

Unsere Studie diene der umfassenden Charakterisierung des sensomotorischen Defizites im Schlaganfallmodell des 30-minütigen MCA-Verschlusses bei der Maus. Dieses Modell führt aufgrund der nur milden Ischämie zu einer geringen postoperativen Mortalität und ist deshalb geeignet, um Tiere längerfristig zu verfolgen, z.B. hinsichtlich der Effekte neuroregenerativer Therapien (siehe zum Beispiel Gertz et al., 2012). Gleichzeitig bedingt die milde Ausprägung des ischämischen Schadens eine rasche funktionelle Erholung nach MCAo, so daß im mittel- bis langfristigen Verlauf nur noch subtile Defizite zu beobachten sind. Wir waren deshalb im Besonderen gefordert gewesen, möglichst sensitive Tests für die Verhaltenstestung nach Schlaganfall zu etablieren.

Neben der Evaluation bekannter Testverfahren auch in unserem Schadensmodell führten wir zudem einige neue bzw. abgewandelte Testmethoden ein. Mit *“Catwalk”* und *“Paw Preference Test”* charakterisierten wir zwei Testverfahren, welche besonders geeignet scheinen, klinisch hochrelevante Defizite, wie Gang und Feinmotorik, experimentell zu überprüfen. *“Corner Rotation Test”*, *“Bowl Test”* und *“Pole Rotation Test”* ermöglichten die differenzierte Beurteilung postural bedingter Drehasymmetrien und zeigten, mit gewissen Einschränkungen, gute Anwendbarkeit auch in der Langzeitevaluation von Defiziten.

In der folgenden Diskussion unserer Ergebnisse werden wir zunächst zwischen kurzfristig anwendbaren und langfristig sensitiven Testverfahren unterscheiden und uns in der Folge den oben erwähnten neuen Testverfahren zuwenden. Zu den kurzfristig, also für 1-2 Wochen nach Insult, effektiven Verhaltenstests zählen wir *“Rotarod”*, *“Pole Test”* und *“Chimney Test”*. Zu den etablierten langfristig, also über mindestens 3 Wochen, effektiven Testmethoden zählen wir *“Corner Test”*, *“Cylinder Test”* und *“Adhesive Removal Test”*.

4.1.1 Kurzfristige Verhaltenstestung

Der *“Rotarod”* zeigte in unserer Studie eine gute Sensitivität in der Detektion von sensorischen Defiziten im Intervall von bis zu einer Woche nach Schlaganfall. Trotz des ausführlichen Trainings vor der Operation beobachteten wir einen deutlichen Lerneffekt in beiden Versuchsgruppen. Obwohl dies unserer Erfahrung nach ungünstige Auswirkungen auf die Sensitivität der Ergebnisse hat (vergleiche z.B. Sensitivität und Qualität der *“Rotarod”* – Ergebnisse bei Bouët et al., 2007), bleibt fraglich, ob weiteres Training die Ergebnisse relevant verbessern würde.

Auch im *“Pole Test”* konnten wir an einzelnen Zeitpunkten statistisch signifikante Gruppenunterschiede im kurz- bis mittelfristigen Intervall nach MCAo nachweisen, in der *“Latency to Descend”* Aufgabe bis Tag 8, in der *“Latency to Turn”* Aufgabe bis Tag 11. In der kombinierten Analyse der wiederholten Messungen konnte über einen deutlich längeren Zeitraum ein signifikanter Gruppenunterschied nachgewiesen werden; in der *“Latency to Turn”* Aufgabe über alle post-operativen Messungen, d.h. bis einschließlich Tag 20, in der *“Latency to Descend”* Aufgabe über die ersten 11 Tage. Dennoch ist offenbar, daß sich die Leistungen der MCAo-operierten Tiere im postoperativen Verlauf gegenüber den scheinoperierten Tieren überproportional verbesserten und der Pole Test somit für die Detektion von längerfristigen Gruppenunterschieden nicht geeignet ist.

Der *“Chimney Test”* konnte lediglich am zweiten postoperativen Tag einen signifikanten Gruppenunterschied nachweisen und ist somit den beiden zuvor aufgeführten Tests im Vergleich deutlich unterlegen.

Es verbleiben für die praktische Routineanwendung kurzzeitig nach Schlaganfall zwei Testverfahren: *“Rotarod”* und *“Pole Test”*. Der *“Rotarod”* ist ein *“klassischer”* Test nach Schlaganfall in Ratte und Maus, während der *“Pole Test”* ursprünglich aus der Parkinson-Forschung stammt. Beide Tests verlangen vom Versuchstier ein hohes Maß an motorischer Koordination und Stärke. Im Vergleich war der *“Pole Test”* über den längeren Zeitraum hinweg in der Lage, ein motorisches Defizit bei MCAo-operierten Tieren nachzuweisen. Methodisch wie praktisch ist der *“Pole Test”* gegenüber dem *“Rotarod”* ebenfalls im Vorteil: Zwei unabhängige Parameter werden innerhalb eines Testdurchlauf erhoben,

die Versuchsdurchführung ist einfacher, schneller und weniger stressvoll für die Versuchstiere. In der Summe ermöglichte der *“Pole Test”* die besseren Resultate. Wir betrachten ihn daher als geeigneten Test primär für die Verhaltenstestung im Kurzzeitintervall nach Insult (vergleiche auch Tabelle 4.1).

4.1.2 Langzeittestung nach MCAo

Unter den Langzeittests erwies sich der *“Corner Test”* als sensitiver Test für die Langzeitevaluation von sensomotorischen Defiziten nach 30-minütigem MCAo-Verschluss. Zu allen postoperativen Zeitpunkten, also bis mindestens Tag 26, zeigte sich ein signifikanter Gruppenunterschied. Somit evaluiert der *“Corner Test”* offenbar ein auch in unserem milden Schadensmodell persistierendes Defizit.

Der *“Cylinder Test”* hingegen konnte keinen Unterschied zwischen MCAo-operierten und scheinoperierten Tieren aufzeigen. Wir hatten erwartet, daß der *“Cylinder Test”* eine schlechtere Langzeitsensitivität aufweisen würde als z.B. der *“Corner Test”*, dennoch überraschte uns das negative Ergebnis. Möglicherweise ist die mangelhafte Sensitivität in unserem MCAo-Modell bedingt durch die fehlende kortikale Beteiligung. Folglich scheint der *“Cylinder Test”*, auch aufgrund der vorhandenen Alternativen, für den 30-minütigen MCAo-Verschluss nicht als primäres Evaluationsinstrument geeignet.

Der *“Adhesive Removal Test”* ermöglicht die Evaluation sowohl eines sensorischen Defizites durch die *“Time to Contact”* Aufgabe als auch eines motorischen Defizites durch die *“Time to Remove”* Aufgabe. In der *“Time to Contact”* Aufgabe konnten wir bis Tag 18 einen signifikanten Gruppenunterschied nachweisen. In der *“Time to Remove”* Aufgabe zeigte sich ein individueller Gruppenunterschied nur bis Tag 14, in der Varianzanalyse mit wiederholten Messungen konnten wir jedoch über die gesamte post-operative Testphase (d.h. bis Tag 26) einen signifikanten Einfluß der Gruppenzugehörigkeit feststellen. Erklärt werden kann diese Diskrepanz durch ein geringgradiges, aber persistierendes Defizit in der MCAo-Gruppe. Dies unterstreicht die Bedeutung sowohl der Durchführung von wiederholten Messungen als auch der Anwendung des korrekten statistischen Tests, um die Aussagekraft der durchgeführten Verhaltenstests zu maximieren.

Im Vergleich von *“Corner Test”* mit dem *“Adhesive Removal Test”* zeigte der *“Corner Test”* in unserem MCAo-Modell die tendenziell bessere Langzeitsensitivität und ist einfacher durchzuführen. Andererseits ermöglicht der *“Adhesive Removal Test”*, ähnlich wie der *“Pole Test”*, die Evaluation von zwei Parametern mit unterschiedlicher funktioneller Genese. Die spezifische Evaluation des sensorischen Defizites durch den *“Adhesive Removal Test”* ist einzigartig in unserer Testbatterie. Beide Tests sind somit valide Verfahren der Langzeitevaluation im proximalen MCAo-Verschlussmodell der Maus. Je nach Interes-

senschwerpunkt mag der *“Adhesive Removal Test”* (sensorisches Defizit) oder der *“Corner Test”* (bestmögliche Langzeitsensitivität, geringer Aufwand) gewählt werden, oder es werden beide Verfahren ergänzend angewandt (vergleiche auch Tabelle 4.1).

4.1.3 Testung des Drehverhaltens

Auch wenn der Nutzen des *“Corner Tests”* unbestritten ist, schien uns die Methodik der Versuchsdurchführung und -auswertung stets unzureichend. Da lediglich zehn Ereignisse pro Messung erfasst werden ist der Einfluß auf die Ergebnisse durch zufällige Streuung groß. Die Validität der *“Corner Test”* Ergebnisse hängt weiter entscheidend von der objektiven Bewertung des Untersuchers ab: Die ideale *“Corner Test”* Ecksequenz wird von den Tieren nur selten durchgeführt, stattdessen werden einzelne Bewegungsbestandteile oftmals nur undeutlich ausgeführt. Insgesamt ist bei nur zehn registrierten Manövern die Gefahr einer subjektiven Ergebnisverzerrung hoch (siehe auch weiter unten beim Vergleich der *“Corner Test”* und *“Corner Rotation”* Ergebnisse). Zudem wird die korrekte Durchführung des *“Corner Tests”* durch die schnelle Habituation der Versuchstiere an die Versuchsumgebung erschwert, weshalb die Erfassung einer größeren Anzahl von korrekt durchgeführten Drehungen oder die Erhöhung der Testfrequenz schwierig ist – auch aus diesem Grund wurden die Tiere in unserer Studie nur alle neun Tage getestet.

Um die aufgeführten Einschränkungen des *“Corner Test”* zu überwinden, entwickelten wir das Paradigma des *“Corner Rotation”* Tests, in dem unter Beibehaltung des *“Corner Test”*-Versuchsaufbaus nicht mehr ein strenges *“Die Ecke betreten – Aufrichten – Drehen”* – Verhalten gefordert wird, sondern jegliche Dreh- oder Rotationsbewegung während freier Lokomotion ausgewertet wird. Um Einfachheit, Objektivität und somit Vergleichbarkeit zu maximieren, entschieden wir uns, nur vollständige 180° Drehungen zu zählen, kleinere Drehbewegungen wurden ignoriert (für eine genauere Beschreibung siehe Teil Methodik). Mittels dieses neuen Testparadigmas genügten fünf Minuten Beobachtungszeit, während der es nur eingeschränkt zu Habituation kam, um eine durchschnittliche Anzahl von 25 Drehungen pro Tier zu registrieren. Ebenso wie der originale *“Corner Test”* waren die Ergebnisse des *“Corner Rotation Tests”* zu allen post-operativen Zeitpunkten signifikant, zudem konnten wir eine enge Korrelation in den Ergebnissen der beiden Testverfahren nachweisen. Dies spricht für die objektive Durchführung unseres *“Corner Tests”*; allerdings fällt auch auf, daß der Lateralitätsindex in der Kontrollgruppe im *“Corner Test”* durchweg kleiner ist als im *“Corner Rotation Test”* – der Schluß liegt nahe, daß der Untersucher im *“Corner Test”* für die Kontrollgruppe dazu neigte, im Zweifel eher Drehungen nach rechts als nach links zu werten.

Unsere Ergebnisse zeigten eine deutliche Asymmetrie der spontanen Drehbewegung.

Aus der guten Korrelation der *“Corner Test”* und *“Corner Rotation”* Ergebnisse schließen wir, daß die klassische mechanistische Interpretation der *“Corner Test”*-Defizites im Sinne einer kombinierten posturalen, sensorischen und motorischen Asymmetrie (Schallert et al., 1983; Hua, 2002) zumindest nicht für unser striatales Schadensmodell zutrifft. Eher scheint die spontane Drehpräferenz im *“Corner Rotation Test”* und im *“Bowl Test”*, ebenso wie die Drehung im *“Corner Test”*, Ausdruck eines nigro-striatalen Ungleichgewichts zu sein, hervorgerufen durch die einseitige Läsion im Gebiet des Striatums mit sekundärer neuronaler Degeneration in der Substantia Nigra (Winter et al., 2005; Kronenberg et al., 2012). Demgemäß ähneln die Voraussetzungen des *“Corner Rotation Test”* denen des sogenannten *“Circling”* Verhaltens in verschiedenen Parkinson-Mausmodellen, in denen eine unilaterale striatale Läsion durch 6-Hydroxydopamin (6-OH-DA) oder durch elektrische Ablation hervorgerufen wird (Arbuthnott und Ungerstedt, 1975; Lane et al., 2005). Klassischerweise wird hierbei erst durch die pharmakologische Stimulation das Drehverhalten erzeugt, während wir in unserem Schlaganfallmodell bereits im unstimulierten Zustand eine ausgeprägte Drehpräferenz fanden. Diese Ähnlichkeit unseres Ischämie-Modells mit gewissen Parkinson-Modellen erklärt vielleicht auch die Effizienz des *“Pole Tests”* in unserem Schadensmodell, ist er doch insbesondere für die Evaluation von Defiziten im Parkinsonmodell entwickelt worden und dort besonders sensitiv.

In Kritik am *“Corner Test”* merkte Hua (2002) weiterhin an, daß durch die Vielzahl der beteiligten Verhaltenskomponenten (postural, sensorisch, motorisch) der *“Corner Test”* für die Detektion der isolierten Erholung einer dieser Verhaltenskomponenten möglicherweise nicht ausreichend sensitiv ist. Eine reduzierte Sensitivität bezüglich des Behandlungseffektes von Östrogen berichteten auch Li et al. (2004). Diese kritische Anmerkung ist vielleicht von besonderer Bedeutung für die Anwendung in Schadensmodellen, welche weitreichende kortikale Defekte erzeugen. So berichteten Barth et al. (1990), daß mehrere kortikale Areale zu einer Asymmetrie in einem dem *“Corner Test”* äquivalenten Test der Ratte führen können, und daß sich das Defizit je nach untersuchtem Läsionsort unterschiedlich schnell zurückbildete. Wir argumentieren, daß dem Verhalten im *“Corner Rotation Test”*, unter Verzicht auf die sensorische und motorische Komponente des *“Corner Tests”*, primär eine ausgeprägte „posturale“ Asymmetrie (mit der Konsequenz der verstärkten ipsilateralen Drehung) zugrunde liegt. Insgesamt ist aber unklar, welcher Verhaltenstest relevanter ist: Derjenige, welcher eine spezifische Verhaltenskomponente untersucht, oder derjenige, welcher das insgesamt resultierende Verhalten charakterisiert. Der erstere wird bei positivem Ergebnis eine vielleicht klinisch irrelevante Verbesserung festgestellt haben, während der letztere bei negativem Ergebnis möglicherweise ein prinzipiell positives Interventionsergebnis bereits präklinisch übersieht.

Der *“Bowl Test”* ist ein in der Schlaganfallforschung neuer Test, dessen Aufbau (für die Ratte) von unilateralen Läsionsmodellen des nigro-striatalen Systems übernommen wurde (Arbuthnott und Ungerstedt, 1975). Auch der *“Bowl Test”* untersucht also das posturale Defizit nach Schlaganfall – anders als im *“Corner Rotation Test”* werden die Tiere in einer Schüssel mit 25 cm Durchmesser über 30 Minuten beobachtet und ihr Drehverhalten Software-gestützt ausgewertet. Unsere Ergebnisse zeigen, daß auch der *“Bowl Test”* in der Lage ist, langfristige, d.h. über vier Wochen hinweg bestehende, Defizite zu detektieren. Darüber hinaus ist der *“Bowl Test”* einfach durchzuführen und stressfrei für die Tiere. Die gleichzeitige Messung mehrerer Tiere ist möglich.

Der *“Pole Rotation Test”* basiert auf dem Versuchsaufbau des *“Pole Tests”*, untersucht allerdings ein ganz anderes Phänomen: Während die Tiere den Stab herabsteigen, führen sie oftmals eine Drehung um die Achse des Stabs aus. Wir untersuchten erstmalig, ob sich dieses Drehverhalten nach Schlaganfall verändert. Wir fanden in der Tat eine deutliche Veränderung der Drehpräferenz zugunsten der Drehung gegen den Uhrzeigersinn, also nach ipsilateral, für einige Tage nach MCAo. Diese Veränderung war allerdings nicht längerfristiger Natur, bereits an Tag 8 ließ sich kein Unterschied mehr finden, auch wenn MCAo-operierte Tiere im Vergleich mit ihren präoperativen Werten noch eine deutlich veränderte Drehpräferenz zeigten.

Von den aufgezählten Verhaltenstests mit vorwiegend rotationaler Testkomponente ist der *“Corner Rotation Test”* ein vielversprechender neuer Test, da er einfach und schnell durchzuführen ist und objektive und sensitive Ergebnisse liefert. Durch die unkomplizierte Aufzeichnung und Auswertung des *“Corner Rotation Tests”* ist auch die Durchführung großer simultaner Messungen vorstellbar. Der *“Bowl Test”*, unter dem Caveat der notwendigen technischen Voraussetzungen, ist ein Test mit ähnlichen Stärken, erfordert aber keine manuelle Auswertung.

4.1.4 Catwalk und Paw Preference Test

Der *“Catwalk”* ist ein System zur automatischen Ganganalyse. Während die Mäuse über eine Glasplattform laufen, werden ihre Pfotenabdrücke von unten mit einer Kamera aufgezeichnet und eine Vielzahl von Gangparametern Software-gestützt erhoben. Die Anwendung des *“Catwalk”* wurde mittlerweile von zwei Gruppen im Modell des distalen MCA-Verschlusses, wie auch im Modell des proximalen MCA-Verschlusses beschrieben (Hetze et al., 2012; Lubjuhn et al., 2009). Beide Gruppen berichten allerdings nur die Ergebnisse einer einmaligen Messung auf dem *“Catwalk”*. Unsere Ergebnisse stellen also die erste umfassende Charakterisierung der Möglichkeiten des *“Catwalk”*-Systems nach MCA-Verschluß in der Maus dar. Der natürliche vierfüßige Gang ist ein fein abgestimm-

tes Zusammenspiel einer Vielzahl von Muskeln, und die Identifikation einzelner Gangparameter, die singular und unabhängig von anderen Parametern durch die ischämische Läsion beeinträchtigt werden, ist schwierig. Dennoch konnten wir Parameter identifizieren, welche eine in MCAo-operierten Tieren im Vergleich mit scheinoperierten Tieren signifikante Asymmetrie belegen. Dies waren die Abdruckbreite der rechten vs. linken Vorderpfote (*PrintWidth*) und die Standdauer der rechten vs. linken Hinterpfote (*Stand*). Darüber hinaus fanden wir eine Reihe von Parametern, die ein persistierendes Defizit von MCAo-operierten Tieren über den gesamten postoperativen Verlauf von 28 Tagen zeigten. Allerdings unterschied sich die Durchschnittsgeschwindigkeit der Tiere in den beiden Gruppen signifikant, und die Mehrzahl der statistisch signifikanten Parameter korrelierte eng mit der Durchschnittsgeschwindigkeit. Daher ist bei der Interpretation einzelner Parameter Vorsicht angezeigt. Der Geschwindigkeitsunterschied ist wahrscheinlich Ischämie-bedingt, hingegen lässt sich der über alle vier Pfoten konstante Unterschied in Pfortengeschwindigkeit (*SwingSpeed*), Schrittlänge (*StrideLength*) und Standdauer (*Stand* und *DutyCycle*) leicht als Ausdruck des unterschiedlichen Lauftempos interpretieren, also ohne ein motorisches Defizit anzunehmen. Andererseits korrelierte die Mehrzahl aller Parameter eng mit der Laufgeschwindigkeit. Und nur ein kleiner Teil dieser Parameter wiederum zeigte einen statistisch signifikanten Gruppenunterschied auf. Der von der Laufgeschwindigkeit unabhängige und intuitiv einleuchtendste unter den von uns identifizierte Parametern ist die verbreiterte Stand- bzw. Schrittbasis der Vorderpfoten (*Base of Support Front*). Betont werden muss, daß wir die oben aufgeführten Defizite über den gesamten post-operativen Zeitraum von 28 Tagen nachweisen konnten. Der Catwalk scheint also geeignet, motorische Defizite sowohl kurz- als auch langfristig zu detektieren. Allerdings ist bei der einmaligen Anwendung Vorsicht geboten. In unserer Studie erbrachte die Analyse der Daten von einzelnen Zeitpunkten unschlüssige Ergebnisse, nur in der Analyse mit wiederholten Messungen ergab sich ein einheitliches Bild. Erst im Zusammenspiel mit weiteren Studien wird es möglich werden, verlässliche Parameter und Zeitpunkte zu identifizieren, an denen auch eine gezielte einmalige Untersuchung denkbar ist.

Die Anwendung des *Catwalk* wurde mittlerweile von zwei Gruppen im Modell des distalen MCA-Verschlusses, wie auch im Modell des proximalen MCA-Verschlusses beschrieben (Hetze et al., 2012; Lubjuhn et al., 2009). Beide Gruppen berichteten allerdings nur die Ergebnisse einer einmaligen Messung auf dem *Catwalk*. Unsere Ergebnisse stellen damit die erste umfassende Charakterisierung der Möglichkeiten des *Catwalk*-Systems im Langzeitverlauf nach MCA-Verschluss in der Maus dar. Lubjuhn et al. (2009) fanden im distalen MCAo-Modell an Tag eins nach Operation eine nichtsignifikante Be-

schleunigung von operierten Tieren, mit konsekutiver Verkürzung der Standphase und Bremsdauer. Wie unten weiter aufgeführt unterscheidet sich das Defizit in distalen und proximalen Verschlussmodellen grundlegend. Hetze et al. (2012) untersuchten das Gangbild mittels *“Catwalk”* im 60-minütigen MCAo-Modell. Allerdings wurde keine kontrollierte Studie durchgeführt, sondern Daten von fünf Experimenten gesammelt und die präoperativen Werte der Tiere mit denen an Tag 10 nach Operation verglichen. Es gibt also keine Kontrollgruppe. So fanden sie einen Unterschied in der Pfotenabdruckfläche (*“PrintArea”*) und Geschwindigkeit – MCAo-operierte Tieren waren langsamer bzw. die *“Run Duration”* verlängert –, des weiteren und möglicherweise durch diesen Geschwindigkeitsunterschied bedingt fanden sie eine langsamere Geschwindigkeit der rechten Hinterpfote (*“RH SwingSpeed”*), eine kürzere Schrittlänge (*“StrideLength”*), eine verlängerte Standdauer der Vorderpfoten (*“Stand”*) und Veränderungen im *“Duty Cycle”*. Diese Ergebnisse bestätigen unsere Beobachtungen. Auch fanden sie Unterschiede in der *“Phase Dispersion”*, allerdings nicht in den von uns beobachteten Mustern AA und AB. Überraschenderweise verschmälerte sich die Schrittbasis sowohl der Vorder- als auch der Hinterpfoten postoperativ.

Die *“Catwalk”*-Anwendung ist in der Ratte nach distaler (Wang et al., 2008) und proximaler 60-minütiger MCAo (Encarnacion et al., 2011) beschrieben. Wang et al. untersuchten zwei Zeitpunkte, Tag 10 und Woche fünf. Sie fanden u.a. eine reduzierte rechte Vorderpfotenabdruckfläche und eine Veränderung von Pfotenkoordination (*“Phase Dispersion”*) und Gangmuster (*“StepSequence”*). Encarnacion et al. testeten SD-Ratten alle zwei Wochen bis Woche 12 nach MCAo. Sie fanden transiente Defizite u.a. in der Schrittlänge (*“StrideLength”*), Standphase (*“DutyCycle”*) und langfristige Unterschiede in Pfotenkoordination (*“Phase Dispersion”*) und Geschwindigkeit der rechten Vorderpfotenbewegung (*“RF SwingSpeed”*). Auch fanden sie einen Unterschied in der Gangbreite der Vorder- und Hinterpfoten, es ist nicht berichtet, ob sie sich in MCAo-Tieren verbreiterte oder verschmälerte. Ein signifikanter Unterschied in der Durchschnittsgeschwindigkeit wurde nicht gefunden. Es wurde keine Analyse hinsichtlich einer MCAo-bedingten Seitenasymmetrie berichtet.

So ergibt sich ein heterogenes Bild der *“Catwalk”*-Ergebnisse im Ischämiemodell. Auch wenn einige Übereinstimmungen gefunden wurden, z.B. in der Reduktion des Pfotenabdrucks, der Einschränkung der Schwunggeschwindigkeit der kontralateralen Pfoten, und der Veränderung der Pfotenkoordination, gibt es im Detail doch viele unklare bzw. widersprüchliche Ergebnisse. Es ist aber auch zu berücksichtigen, daß sich jede der aufgeführten Studien sich von den anderen in Tierspezies, Ischämiemodell, Versuchsdesign und statistischer Auswertung unterschied.

Insgesamt ist der “*Catwalk*” in der Versuchsdurchführung und Auswertung ein aufwendiger Test. Seine Stärke ist die Darstellung des natürlichen Gangmusters der Maus (die Übertragung auf menschliche Defizite ist leicht vorstellbar), und die Objektivität der Ergebnisse. Wir konnten zeigen, daß der “*Catwalk*” prinzipiell in der Lage ist, Gangdefizite sowohl kurzfristig als auch langfristig nach experimentellem Schlaganfall zu detektieren. Weitere Forschungsergebnisse werden erlauben, die verlässliche und valide Ergebnisparameter des “*Catwalk*”, auch im zeitlichen Kontext, mit größerer Sicherheit zu benennen.

Goldstandard zur Bestimmung der Händigkeit von Mäusen ist der sogenannte “*Collins’ Handedness Test*” (Collins, 1968). Die Nutzung des “*Collins’ Handedness Test*” nach Schlaganfall wurde erstmalig von Lubjuhn et al. (2009) beschrieben, allerdings in einem distalen Verschlussmodell. Dort konnte der Test kein langfristiges Defizit nachweisen. Hingegen konnten wir erstmals seine Nützlichkeit für die Langzeitevaluation nach proximalem MCA-Verschluss zeigen. Wir stellten ein interessanterweise über den zeitlichen Verlauf zunehmendes Defizit der Schlaganfall-operierten Tiere im Gebrauch der rechten Pfote fest, mit signifikanten Unterschieden auch noch nach 27 Tagen. Diese Ergebnisse legen nahe, daß dieser sogenannte “*Handedness Test*” in unserem Versuchsmodell eben nicht die Händigkeit der Tiere misst, sondern vielmehr als ein Test der Feinmotorik und Geschicklichkeit der Vorderpfoten aufgefasst werden kann. Um Missverständnissen hinsichtlich des untersuchten Defizites vorzubeugen änderten wir daher seinen Namen in “*Paw Preference Test*” um. Die Versuchsdurchführung ist prinzipiell einfach: Präoperativ sind einige Sitzungen zur Habituation an den Testapparat notwendig und die Tiere dürfen am Vortag nicht gefüttert werden, um eine ausreichende Motivation aufzubauen. Die Versuchsauswertung allerdings ist zeitaufwendig. Insgesamt stellt der “*Paw Preference Test*” eine sinnvolle Ergänzung unseres Repertoires an Verhaltenstests nach fokaler Ischämie dar, weil er isoliert die Motorfunktion der Vorderpfoten überprüft. In der Ratte sind hierfür zwar mehrere Tests beschrieben (siehe auch Allred et al., 2008), in der Maus existiert jedoch kein vergleichbar einfacher Test der Vorderpfotenmotorik.

4.1.5 Korrelation von Läsionsgröße und funktionellem Defizit

In der Korrelation von funktionellem Defizit mit histologischer Läsionsgröße konnte, mit einer Ausnahme, kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Signifikant war lediglich der Zusammenhang von histologischem Läsionsvolumen und der Latenz im “*Adhesive Removal Test*” mit der das Pflaster von der linken Pfote an Tag 10 entfernt wurde. Da wir weder einen Zusammenhang dieser Größen *a priori* erwarten würden, noch eine Korrektur für multiple Vergleiche erfolgte, gehen wir nicht von einem kausalen

Tabelle 4.1: Übersicht angewandter Testverfahren

Test	vorwiegende Art des Defizites	Komplexität	Empfehlung
Rotarod	motorisch	mäßig	+++
Pole Test	motorisch	einfach	+++
Chimney Test	motorisch	einfach	-
Adhesive Removal Test	sensibel / motorisch	hoch	+++
Corner Test	sensomotorisch (?), postural	mäßig	+++
Corner Rotation	postural	einfach	++
Cylinder Test	motorisch	mäßig	-
Bowl Test	postural	mäßig	+
Pole Rotation	postural	mäßig	-
Paw Preference	motorisch	hoch	++
Catwalk	motorisch	hoch	++

Legende: +++ empfohlen und etabliert; ++ empfohlen, jedoch nicht etabliert; + neu, nicht etabliert, vermutlich bessere Alternativen, - nicht empfohlen.

Zusammenhang aus.

4.2 Vergleich mit anderen Autoren

Nur wenige Studien beschäftigten sich mit einer systematischen Untersuchung der Verhaltenstestung nach cerebraler Ischämie in der Maus, und noch weniger versuchten, das langfristige Defizit zu charakterisieren (siehe Tabelle 1). Bei genauerer Betrachtung werden in vielen dieser Studien methodische Probleme offenbar.

Gerlai et al. führten bereits im Jahr 2000 eine Studie an C57Bl/6N Mäusen in einem modifizierten, 45 minütigen proximalen MCA-Verschluss-Modell durch. Das MCAo-Modell wurde in Kombination mit einem Carotis-Verschluss genutzt und führte zu einem vorwiegend kortikal lokalisierten Schaden. Die sensomotorische Evaluation war beschränkt auf "Rotarod", "Hanging Wire" und "Horizontal Surface Approach Test". Diese Tests wurden nur einmalig in Woche drei nach der Operation durchgeführt und auf die Erhebung eines Baseline-Status wurde komplett verzichtet. Zudem fehlen Informationen über das Studiendesign, insbesondere geht aus der Beschreibung nicht hervor, ob die Tiere als Kohorte untersucht wurden oder ob sie sequentiell operiert und getestet wurden. Überraschenderweise konnte der "Rotarod" noch an Tag 21 einen signifikanten Gruppenunterschied nachweisen. Diese Ergebnisse sind mit denen in unserer Studie allerdings kaum vergleichbar, da kein präoperatives Training stattfand und lediglich eine einma-

Tabelle 4.2: Übersicht von Studien zur Verhaltenstestung in der Maus nach experimenteller Ischämie

Autoren	Jahr	Ischämiemodell	Stamm	Kurzzeittests (Zeitpunkt)	Langzeittests (Zeitpunkt)	Andere motorische Tests (Zeitpunkt)	Follow-Up	Anmerkung
Balkaya, Kröber	2012	30-min. MCAo	C57Bl/6N	Rotarod (8d), Pole Test (20d), Chimney Test (3d)	Corner Test (25d), ART (26d), Cylinder Test (24d)	Catwalk (28d), Paw Preference (27d), Bowl Test (26d) etc.	Histologie	
Gerlai et al.	2000	45-min. MCAo + Carotis-Verschluss	C57Bl/6N	Rotarod (?)	-	Wire Hang (?), Horizontal surface approach test (?)	MRI	Einmalige Testung in Woche 3, keine Baseline
Bouet et al.	2007	60-min. MCAo	Swiss	Rotarod (10d), Pole Test (8d), Chimney Test (3d)	Corner Test (24d), ART (26d)	Staircase (26d)	Histologie	Unregelmäßige Testabstände
Li et al.	2004	90-min. MCAo	C57Bl/6N	-	Corner Test (42d), Cylinder Test (15d)	Wire Hang, Negative Geotaxis	Histologie	Extensive Corner-Test Nutzung
Freret et al.	2009	distale MCAo	Swiss	Rotarod (5d), Pole Test (5d), Chimney Test (5d)	Corner Test (5d), ART (21d), Cylinder Test (5d)	Staircase (21d)	MRI (d22) + Histologie	Signifikantes Defizit nur im ART
Lubjuhn et al.	2009	distale MCAo	C57Bl/6	-	Corner Test (22d)	Catwalk (1d), Paw Preference (16d), Digigait (22d)	Histologie	Catwalk-Testung nur an Tag 1

Legende: ART, Adhesive Removal Test; MCAo, Verschluss der A. cerebri media; MRI, Magnetresonanztomographie.

Anmerkung: Aus Platzgründen beschränkt sich die Auflistung der Verhaltensversuche auf sensomotorische Testverfahren.

4 Diskussion

lige Testung durchgeführt wurde. Die Leistung der Tiere war in beiden Gruppen sehr schlecht; ob das beobachtete Defizit von MCAo-operierten Tieren tatsächlich auf ein motorisches Defizit zurückzuführen ist und nicht auf Motivations- oder Lernunterschiede, bleibt fraglich. Im Gegenschluss könnten diese Ergebnisse aber auch darauf hinweisen, daß im "Rotarod" längerfristige Lerndefizite gemessen werden können. Bei wiederholten Messungen würde die steile Lernkurve beider Gruppen diesen Effekt dann verschleiern. Dieses Konzept birgt jedoch vielfältige Unwägbarkeiten und scheint als Routinemaßnahme nicht empfehlenswert. Unserer Erfahrung nach ist die Durchführung des "Hanging Wire Tests" in C57-Mäusen nicht sinnvoll, da die Tiere keine ausreichende Motivation zeigen, sich am Draht festzuhalten. Der "Horizontal Surface Approach Test" scheint immerhin eine interessante, einfache Alternative zur Testung von posturalen Asymmetrien. Insgesamt ist die Relevanz dieser Studie für die weitere experimentelle Schlaganfallforschung in der Maus eher begrenzt.

Die Untersuchung von Li et al. (2004) widmete sich primär den Einfluß von Geschlecht und Östrogenen auf das funktionelle Outcome nach 90-minütiger MCAo in C57Bl/6N Mäusen. Innerhalb diese Studie nahmen sie eine extensive Langzeitcharakterisierung des "Corner Tests" vor. In diesem Modell einer schwerwiegenden ischämischen Schädigung konnte der "Corner Test" über bis zu 42 Tage einen signifikanten Gruppenunterschied nachweisen. Weiter wurde die Nutzung des Cylinder Tests bis Tag 15 beschrieben: Im zeitlichen Verlauf konnte hier, im Unterschied zum "Corner Test", eine deutliche Verbesserung in der Versuchsgruppe beobachtet werden. Überraschend an der Studie von Li et al. ist die anfangs sehr häufige Durchführung (alle zwei Tage) des "Corner Tests". Des weiteren wurden in der Studie von Li et al. der "Hanging Wire Test" und der "Negative Geotaxis Test" erprobt, sie konnten jedoch keinen Gruppenunterschied aufzeigen. Auch bei dieser Studie geht aus dem Studienprotokoll nicht hervor, ob die Tiere als Kohorte oder als Einzeltiere untersucht wurden.

Bouët et al. untersuchten 2007 eine Kohorte von Swiss Mäusen, n = 10 pro Gruppe, im 60-minütigen MCA-Verschluß Modell. Über bis zu 26 Tage wurde eine Reihe von Verhaltenstests durchgeführt. In ihrem Aufbau ähnelte sie unserer Studie, und eine vergleichende Betrachtung ist lohnenswert, auch wenn im Voraus betont werden muss, daß sie sich von der unsrigen in zwei wichtigen Aspekten unterscheidet: Zum einen in der verwendeten Mäuseart (Swiss vs. C57Bl/6N), und zum anderen darin, daß die verschiedenen Tests in variablen Zeitintervallen angewandt wurden (vor allem in der ersten Woche nach Insult und nach längerer Pause in Woche 3-4 nach Insult). Unter den kurzfristigen Tests konnte der "Pole Test" bis Tag 8 ein relevantes Defizit aufzeigen, die Testung wurde nach Tag 8 eingestellt. Dies stimmt recht gut mit den Ergebnissen unserer Studie überein, es bleibt

allerdings unklar, wie lange der *“Pole Test”* in diesem schwerwiegenderen (60 vs. 30 Minuten Verschluss) Ischämiemodell noch ein Defizit aufgedeckt hätte. Der *“Rotarod”* konnte nur an Tag drei ein signifikantes Defizit nachweisen, anzumerken ist erneut, daß die Leistungswerte selbst der scheinoperierten Tiere mit im Mittel 95 Sekunden überraschend schlecht waren. Möglicherweise war dies durch mangelhaftes präoperatives Training der Tiere bedingt. Der *“Chimney Test”* zeigte ähnlich schlechte Ergebnisse wie in unserer Studie. Der *“Corner Test”* konnte in der Studie von Bouët et al. nur bis Tag 8 ein signifikantes Defizit zeigen, dies ist vielleicht auf die unregelmäßigen Testabstände – die nächste Testung erfolgte erst an Tag 24 – zurückzuführen. Als weiteren Test wurde der aus der Ratte adaptierte *“Staircase Test”* durchgeführt. Dieser Test war in der Lage, über drei Wochen ein relevantes Defizit festzustellen. Der *“Staircase Test”* untersucht die Geschicklichkeit der Maus, speziell im Umgang mit den Vorderpfoten. Neben der reinen Motorfunktion sind aber auch taktile und olfaktorische Reizverarbeitung und die Raumwahrnehmung für die Leistung im *“Staircase Test”* von Bedeutung. Bouët et al. selbst räumten ein, daß der *“Staircase Test”* ein in der Durchführung komplexer Test ist (Bouët et al., 2007). Der Hauptfokus der Studie lag auf dem *“Adhesive Removal Test”*, dieser wurde deutlich häufiger als die oben genannten Testverfahren durchgeführt, und die kombinierte Analyse konnte signifikante Ergebnisse bis Tag 26 aufzeigen. Es ist anzumerken, daß die häufige Durchführung dem *“Adhesive Removal Test”* zu einer höheren statistischen Signifikanz verhalf und daher der direkte Vergleich mit weniger bevorzugt behandelten Tests unangemessen wäre.

Die beiden im Folgenden diskutierten Verhaltensstudien untersuchten das motorische Defizit im distalen MCA-Verschluss-Modell. In diesem Modell wird ein vorwiegend kortikaler Defekt erzeugt, weswegen sich die Ergebnisse teilweise auffallend von denen proximaler MCA-Verschluss-Studien unterscheiden. Dies erlaubt aber auch Rückschlüsse auf die das Defizit bedingenden anatomischen Strukturen.

Freret et al. untersuchten 2009 eine Batterie von Verhaltenstests im distalen MCA-Verschluss-Modell in zwei Kohorten von Swiss Mäusen über einen Zeitraum von drei Wochen. Sie führten *“Pole Test”*, *“Rotarod”*, *“Chimney Test”*, *“Corner Test”*, *“Cylinder Test”*, *“Staircase Test”* und *“Adhesive Removal Test”* durch. Überraschenderweise konnten, mit Ausnahme des *“Adhesive Removal Tests”*, sämtliche durchgeführten sensomotorische Verhaltenstests kein Defizit aufweisen, obwohl die Testung fast unmittelbar nach dem Insult erfolgte. Hingegen konnte der *“Adhesive Removal Test”* über drei Wochen in sowohl in der *“Time to Contact”* als auch in der *“Time to Remove”* Aufgabe ein signifikantes Defizit nachweisen. Kortikale Strukturen scheinen also an den in proximalen Schadensmodellen beobachteten motorischen Defiziten nicht wesentlich beteiligt.

Ebenfalls in 2009 untersuchten Lubjuhn et al. das funktionelle Defizit im distalen MCA-Verschluss-Modell der Maus mit Schwerpunkt auf der Ganganalyse mittels “*Catwalk*” und “*Digigait*”, beides Systeme zur automatisierten Ganganalyse. Dennoch sind für den “*Catwalk*” nur Ergebnisse von Tag 1 nach Operation veröffentlicht. Somit konnten Lubjuhn et al. zwar einige signifikant unterschiedliche Parameter (z.B. “*Stance Duration*” und “*Brake Duration*”) identifizieren, die Aussagekraft und Verwertbarkeit dieser statistischen Auswertung ist aufgrund der einmaligen Messung allerdings gering. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit der “*Corner Test*” und erstmals der “*Paw Preference Test*” angewandt. Beide Tests, in unserer Studie auch im Langzeitverlauf sensitiv, konnten im distalen Verschluss-Modell nur vorübergehend ein Defizit nachweisen, der “*Corner Test*” zeigte einen relevanten Gruppenunterschied allein an Tag 1 post-OP (interessanterweise drehten die Tiere nach distaler MCAo hier bevorzugt nach rechts), und die Händigkeit der Tiere im “*Paw Preference Test*” normalisierte sich bis Tag 8 post-OP. Aus der Versuchsbeschreibung ist nicht ersichtlich, ob die Tiere als Kohorte oder einzeln und sequentiell operiert und getestet wurden, letzteres scheint wahrscheinlicher.

Zusammenfassend existiert zwar eine Handvoll Studien zum Thema Verhaltenstestung in der Maus nach fokaler Ischämie, allerdings zeigt die genauere Betrachtung oft Unzulänglichkeiten, und selbst die hochwertigen Studien der Gruppe um Freret und Bouët zeigen die Anwendung von willkürlichen Testintervallen und eine, zumindest im Falle des “*Rotarod*”, unzureichende präoperative Vorbereitung der Versuchstiere. Zum Zeitpunkt unserer Studie etablierte und unabhängig validierte Testverfahren waren “*Rotarod*” (wenn auch mit großen Unterschieden in der Sorgfalt der Versuchsdurchführung), “*Cylinder Test*” und “*Corner Test*”. Für eine ausführliche Diskussion unserer “*Catwalk*” – Ergebnisse sowohl mit anderen Mäusestudien als auch mit Studien in der Ratte sei oben auf die Diskussion der “*Catwalk*” – Ergebnisse verwiesen.

4.3 Methodenkritik

Die größte Einschränkung unserer Studienergebnisse ist bedingt durch das Fehlen einer Therapiegruppe. Wir können keine Aussage dazu treffen, welche Verhaltenstests ein relevantes Therapieergebnis nachweisen könnten. Der Vergleich von Therapiegruppe und unbehandelten Tieren verlangt in der Regel die zuverlässige Detektion von geringsten Unterschieden. Daher ist die primäre Etablierung von Verhaltenstests, die überhaupt in der Lage sind, ein längerfristigeres Defizit zu erfassen, ein notwendiger Schritt in Richtung auf erfolgreiche Verhaltenstestung in Interventionsstudien. Unklar bleibt auch, welche der untersuchten Tests auch ein klinisch relevantes Defizit untersuchen. Noch allgemei-

ner jedoch ist fraglich, ob ein negatives Ergebnis bezüglich eines Therapieeffektes in der funktionellen Testung ein Problem des Testes ist, oder ob das negative Ergebnis nicht eher gegen den funktionellen Nutzen der geprüften Therapie spricht (– ein Problem der Validität). Diese Unsicherheit ist nicht bedingt durch Fehler in der experimentellen Forschung an sich, sondern vielmehr die Konsequenz der bisher stets erfolglosen klinischen Erprobung experimentell entwickelter Interventionen.

Unsere Studie beschränkte sich also auf die Anwendung von Verhaltenstests in einem milden MCAo-Modell der Maus im Vergleich mit scheinoperierten Tieren. Da eine Selektion erfolgen musste, wählten wir diejenigen Verfahren mit der vermutlich größten klinischer Relevanz aus, das sind Tests für die Messung sensomotorischer Defizite. Unberücksichtigt blieb die Evaluation von kognitiven und psychischen Defiziten nach Schlaganfall. Wie oben ersichtlich, wurde die Mehrzahl der in der Literatur beschriebenen und unserer Einschätzung nach relevanten sensomotorischen Tests evaluiert. Der *“Staircase Test”* wurde aufgrund seiner Komplexität, die ihn für die breite Anwendung ungeeignet macht, nicht getestet.

Hinsichtlich des von uns verwendeten Modells des 30-minütigen proximalen MCA-Verschlusses sind unsere Ergebnisse zwar nicht direkt übertragbar auf andere Schadensmodelle. Da es aber in unserem Modell vorrangig zu einer Schädigung der Basalganglien kommt, während längere Verschlusszeiten darüber hinaus eine unterschiedlich ausgeprägte kortikale Beteiligung verursachen, scheint uns die vorsichtige Übertragung grundsätzlicher Ergebnisse hinsichtlich der Langzeitsensitivität der beschriebenen Tests zulässig, auch wenn von einer veränderten zeitlichen Dynamik der sensomotorischen Erholung auszugehen ist. Anders verhält es sich mit der Verhaltenstestung in distalen MCAo-Modellen, in welchen es zu keiner Beteiligung der Basalganglien kommt und sich die Testergebnisse deutlich von den unsrigen unterscheiden (siehe oben).

Der Mäusestamm C57Bl/6N ist einer der meistgenutzten Mäusestämmen in der Schlaganfallforschung. Die Übertragbarkeit und Anwendbarkeit von Ergebnissen für andere Mäusestämmen kann jedoch nicht sicher gewährleistet werden. In unseren Vortests zeigten sich zum Beispiel SV129 Mäuse nicht in der Lage, einige in C57Bl/6N Mäusen beschriebenen Verhaltenstests durchzuführen, Ferrara et al. berichteten von ähnlichen Problemen (Ferrara et al., 2009). Die Durchführung einer ganzen Batterie von Verhaltenstests beeinflusst die Leistung in den individuellen Tests und führt so zu anderen Ergebnissen als die Durchführung nur weniger, ausgewählter Tests (McIlwain et al., 2001). Dieser Kritik haben wir durch die relativ langen Testintervalle Rechnung getragen, so daß unsere Ergebnisse auch als Basis für die Selektion und Anwendung einzelner Verhaltenstests geeignet sein sollten.

4 Diskussion

Im “*Rotarod*” Test zeigte sich, daß sich die Tiere trotz extensiven Trainings in beiden Gruppen postoperativ langfristig verbesserten. Dies wäre durch eine weiter ausgebaute präoperative Trainingsphase möglicherweise vermeidbar. Allerdings ist das Training, wie von uns beschrieben, bereits sehr ausführlich, wie auch die ermittelten Rotarod-Latenzen zeigen (speziell im Vergleich mit denen anderer Gruppen). Es ist daher nicht anzunehmen, daß weiter intensiviertes Training die mittelfristige Sensitivität des “*Rotarod-Tests*” relevant verbessern würde.

Der “*Paw Preference Test*” lieferte gute Ergebnisse, allerdings war die statistische Analyse durch den recht hohen Anteil von primär “linkshändigen” Tieren erschwert. Zudem schienen sich die Tiere im Verlauf der Testung zunehmend auf den Gebrauch nur einer Pfote zu spezialisieren. Dies führte möglicherweise zu einem unabhängigen, statistisch relevanten Effekt, dem durch vermehrte präoperative Trainingssitzungen abgeholfen werden müsste. Auch im “*Bowl-Test*” drehten sich die Tiere präoperativ bevorzugt eher nach links, was die statistische Auswertung erneut erschwerte (es handelte sich um die gleiche Kohorte von Tieren, die auch im “*Paw Preference Test*” getestet wurden). Die Ermittlung des Messergebnisses erfolgt mithilfe von automatisierter Software, wodurch die jeweilige Anpassung der Parameter zwischen Arbeitsgruppen mit unterschiedlicher Ausstattung an Software, Kamera und Testräumlichkeiten nicht replikabel ist. Nichtsdestotrotz sind unsere Ergebnisse, mit den vorgegeben Standardparametern erstellt, objektiv und replizieren ein subjektiv erfassbares Verhalten. Es ist dennoch auf die Weiterentwicklung von Software zur Rotationsanalyse zu hoffen. Insgesamt scheint es angeraten, bei kritischen Tests, welche auf einer Lateralitätspräferenz (ob nun in Form von Händigkeit oder Rotationspräferenz) der Tiere basieren, die Versuchsgruppen präoperativ gleichmäßig aufzuteilen, dies verlangt allerdings auch eine verlängerte präoperative Habituations- und Sozialisationsphase in der neue Käfighierarchien gefestigt werden, bevor die Verhaltenstestung erfolgen kann.

Der “*Catwalk*” ist ein noch weitgehend unerprobtes Testverfahren in der experimentellen Schlaganfallforschung. Wir konnten in der statistischen Analyse einen signifikanten Effekt einer Reihe von Parametern nachweisen, doch nur eine kleine Anzahl dieser Parametern korrelierte statistisch nicht eng mit der Geschwindigkeit des Tieres, welche sich ebenfalls signifikant zwischen den beiden Gruppen unterschied. Andererseits korrelierte auch die Mehrzahl der nicht signifikanten Parameter mit der Durchschnittsgeschwindigkeit. Zudem konnten wir eine echte links vs. rechts Asymmetrie in MCAo-operierten Tieren für einige Parameter nachweisen. Die separate Analyse von Einzelzeitpunkten im “*Catwalk*” System scheint uns problematisch, da die natürliche Varianz bei 20+ Parametern zwangsläufig zu Signifikanzen führt. Erst die Varianzanalyse wiederhol-

ter Messungen ermöglichte es uns, übergreifende Trends und tatsächliche Unterschiede von zufälligen Variationen abzugrenzen. Allgemein sind die technischen Voraussetzungen des *“Catwalk”*-System für die Untersuchung von (möglicherweise im Rahmen der MCAo zusätzlich geschwächten) Mäusen nur grenzwertig ausreichend. Die Schwierigkeiten resultieren aus dem wesentlich geringeren Gewicht der Mäuse im Vergleich zur Ratte, für welche der *“Catwalk”* primär entwickelt wurde. Die Sensitivität und Ausgewogenheit der Fußabdruck-Erfassung – z.B. wurden die Abdrücke auf der rechten Seite der Maus konstant schlechter detektiert – bei der Maus ist deutlich verbesserungsbedürftig. Zwar können Mäuse den *“Catwalk”* bidirektional überqueren, durch die Ausrichtung des Heimkäfigs an einem Ende der Glasplattform ist die Anzahl der Durchläufe, bei der die rechte Seite schlechter erfasst wird, deutlich größer als die derjenigen, bei denen die linke schlechter detektiert wird. Die Lösung, die Position des Heimkäfigs zu variieren, ist aus praktischen Gründen nicht anwendbar, zudem erschwert es den Mäusen die Habituation an die Testumgebung. In unserer Analyse wurde die unterschiedliche Detektion von Abdrücken der linken vs. rechten Pfote durch den Vergleich von MCAo- mit scheinoperierten Tieren ausgeglichen.

4.4 Schlussfolgerungen

Unsere Studie bietet die Möglichkeit, die sensomotorische Verhaltenstestung in der Maus nach proximaler MCAo zu standardisieren. Kernergebnisse sind die Evaluation von Kurzzeit- und Langzeittests und die Beschreibung einiger neuer, nützlicher Testverfahren (Tabelle 4.1).

Für die Kurzzeittestung, also bis zu zwei Wochen nach Schlaganfall, ist auf Basis unserer Ergebnisse die Anwendung des *“Pole Tests”* empfehlenswert, gegebenenfalls stellt innerhalb der ersten Woche auch die Testung mittels *“Rotarod”* eine Alternative dar. Für die Langzeitevaluation von Defiziten über die ersten Wochen hinaus sind *“Corner Test”* und *“Adhesive Removal Test”* etablierte und geeignete Verfahren. Der *“Corner Test”* ist langfristig sehr sensitiv und einfach durchzuführen, der *“Adhesive Removal Test”* hat eine etwas schlechtere Langzeitsensitivität, ermöglicht aber die gezielte Evaluation eines sensorischen Defizites. Ergänzt werden können diese Testverfahren durch den *“Paw Preference Test”*, welcher die gezielte Evaluation der Feinmotorik der Maus erlaubt, und durch den von uns erstmals beschriebenen *“Corner Rotation Test”*. Dieser bessert einige Schwächen des *“Corner Tests”* aus, indem u.a. die Versuchsauswertung objektiviert wird. Weiter konnten wir erstmals zeigen, daß der *“Catwalk”* die sensitive Evaluation sowohl von kurzfristigen wie langfristigen Defiziten ermöglicht. In entsprechend ausgestatteten

4 Diskussion

Laboren kann er zur ergänzenden Beurteilung einer Gangbehinderung nach Ischämie angewandt werden. Der *“Catwalk”* ist allerdings aufwendig in der Versuchsdurchführung und technisch noch unausgereift – mit der Verbesserung der Detektionstechnik ist jedoch ein weiterer Zugewinn an Objektivität und Ergebnisqualität zu erwarten. Der *“Bowl Test”* ist ebenfalls ein neues und nützliches Testverfahren für die Schlaganfallforschung. Es ist jedoch fraglich, ob seine Anwendung zusätzlich zum *“Corner Rotation Test”* sinnvoll ist, da beide Testverfahren posturale Defizite quantifizieren. Nicht empfehlenswert erscheint uns, im Rahmen unserer Fragestellung, die Anwendung von *“Chimney Test”*, *“Cylinder Test”* und *“Pole Rotation Test”*.

Insgesamt hoffen wir, mit unserer Arbeit dazu beigetragen zu haben, die Verhaltenstestung in der Maus nach Schlaganfall auf eine experimentell validierte Basis zu stellen. Für die sinnvolle und möglichst klinikrelevante Verhaltenstestung nach Ischämie ist es notwendig, angemessene Verhaltenstests entsprechend dem zu untersuchendem Defizit und jeweiligen Zeitpunkt auszuwählen. Aus unseren Ergebnissen haben Empfehlungen für die Routinetestung nach 30-minütigem MCAo-Verschluss abgeleitet, die in Abbildung 4.1 zusammengefasst sind.

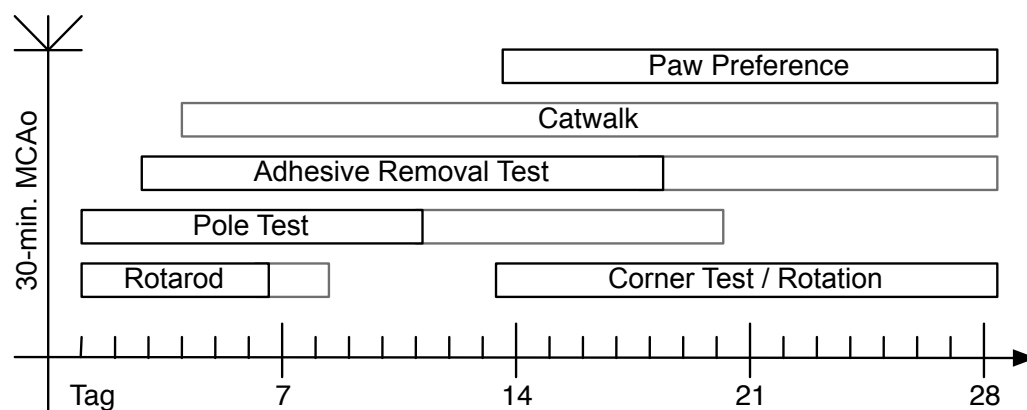


Abbildung 4.1: Übersicht empfohlener Testverfahren im zeitlichen Verlauf nach 30-minütiger MCAo. Schwarze Balken zeigen signifikante Gruppenunterschiede in der Einzelzeitpunktanalyse an, graue Kästen signalisieren längerfristige signifikante Unterschiede in der ANOVA mit wiederholten Messungen in unserer Studie.

5 Zusammenfassung

Der Schlaganfall ist in Hinblick auf Inzidenz, Mortalität und Verlust von qualitätsadjustierten Lebensjahren die bedeutendste Erkrankung der Neurologie. Trotz intensiver Forschung und großer theoretischer Fortschritte ist es bisher nicht gelungen, über die Thrombolyse hinausgehende, Schlaganfall-spezifische Therapieoptionen zu entwickeln.

Dieses anhaltende Versagen des *“bench to bedside”* Transfers hat zu einer Reevaluation der Methoden und Endpunkte in der präklinischen Schlaganfallforschung geführt. Gefordert wird eine bessere Übertragbarkeit präklinischer Forschungsergebnisse in die klinische Anwendung. Insbesondere die funktionelle Verhaltenstestung von kurz- und langfristigen sensomotorischen Defiziten soll dabei helfen, in Analogie zu klinischen Skalen wie der NIH Stroke Scale oder der modifizierten Rankin Skala, die Validität experimenteller Ergebnisse sicherzustellen. Dabei setzt sich der Gedanke durch, daß funktionelles Defizit und histologische Läsionsgröße nicht direkt korrelieren müssen. Gerade für das Studium von längerfristigen adaptiven und regenerativen Reparaturmechanismen des Gehirns ist die funktionelle Verhaltenstestung als kliniknaher Endpunkt von besonderer Bedeutung.

Die Verhaltenstestung nach experimentellem Schlaganfall in der Maus ist jedoch bisher wenig etabliert und standardisiert. Die angewandten Testmethoden unterscheiden sich von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe und nur wenige Studien beschäftigten sich systematisch mit der Verhaltenstestung nach cerebraler Ischämie. Zweck unserer Arbeit war es daher, unser Wissen über die Verhaltenstestung in der Maus nach Schlaganfall zu erweitern und zu konsolidieren. Die folgenden Ziele waren dabei vorrangig: 1. Charakterisierung des sensomotorischen Defizites und seiner Erholung im Langzeitverlauf nach 30-minütigem MCA-Verschluss, 2. Etablierung neuer bzw. verbesserter Testverfahren mit besserer Langzeitsensitivität oder klinischer Relevanz, 3. Standardisierung und Optimierung der Testmethoden. In der Summe sollte uns unsere Arbeit ermöglichen, begründete Aussagen darüber zu treffen, welches der richtige Verhaltenstest für den jeweiligen Zeitpunkt und das zu untersuchende Defizit ist, um damit die Entscheidung darüber, welche Verhaltenstests nach Schlaganfall durchgeführt werden, auf eine experimentell validierte Basis zu stellen.

5 Zusammenfassung

Wir führten daher eine umfassende Charakterisierung des sensomotorischen Defizites im Langzeitverlauf nach 30-minütigem proximalen MCAo-Verschluss (MCAo) bei der Maus durch. Es ist dies das Modell eines milden ischämischen Schadens und für die Evaluation von langfristigen Reperaturmechanismen gut geeignet. Aufgrund des nur sehr geringfügigen längerfristigen funktionellen Defizites werden für die Verhaltenstestung jedoch besonders sensitive Testverfahren benötigt. Zwei Kohorten von C57Bl/6N Mäusen wurden in zwei Batterien von Verhaltenstests in definierten Zeitabständen über bis zu 28 Tage untersucht.

Im Kurzzeitintervall von 1-2 Wochen erwiesen sich *“Pole Test”* und, mit einigen Einschränkungen, der *“Rotarod”* als gut geeignete Tests von motorischer Stärke und Koordination. Die bereits etablierten Langzeittests *“Corner Test”* und *“Adhesive Removal Test”* zeigten auch im 30-minütigen MCAo-Modell eine gute Sensitivität über bis zu vier Wochen. Da der *“Corner Test”* unter einigen methodischen Problemen wie der subjektiven Versuchsauswertung und der geringen Anzahl von Testversuchen pro Tier leidet, entwickelten wir das *“Corner Rotation”* – Paradigma. Dieser Test bewährte sich als ein einfacher, objektiver und langfristig sensibler Test speziell der posturalen Asymmetrie. Ferner führten wir mit dem *“Bowl Test”* ein alternatives automatisiertes Testverfahren für die langfristige Evaluation von posturalen Asymmetrien nach Schlaganfall ein. Mit dem *“Paw Preference Test”* und dem *“Catwalk”* - System konnten wir des weiteren zwei Testverfahren für die Evaluation von klinisch besonders relevanten Defiziten, nämlich Feinmotorik- respektive Gangstörung, etablieren. Insbesondere die Analyse des Gangbildes nach MCAo mithilfe des *“Catwalk”*-Systems stellt die erste umfassende Beschreibung dieses Testverfahrens im Langzeitverlauf nach MCAo in der Maus dar und zeigt sowohl die Schwierigkeiten wie auch das Potential dieses neuartigen Systems.

In Zusammenschau unserer Ergebnisse empfehlen wir im 30-minütigen MCAo-Modell für die Routineanwendung den *“Pole Test”* als primären Test für kurzfristige motorische Defizite, ergänzt durch *“Corner”* oder *“Corner Rotation”* Test im Langzeitverlauf. Für die Evaluation sensorischer Defizite im Langzeitverlauf ist der *“Adhesive Removal Test”* geeignet. Weiter vervollständigt werden kann die sensomotorische Testbatterie durch *“Paw Preference Test”* *“Catwalk”* für die Evaluation von Feinmotorik und Gang.

Literaturverzeichnis

- Allred, R. P., Adkins, D. L., Woodlee, M. T., Husbands, L. C., Maldonado, M. a., Kane, J. R., Schallert, T. und Jones, T. a.: The vermicelli handling test: a simple quantitative measure of dexterous forepaw function in rats. In: *Journal of neuroscience methods*, Band 170(2): S. 229–44, 2008.
- Arbuthnott, G. und Ungerstedt, U.: Turning behavior induced by electrical stimulation of the nigro-neostriatal system of the rat. In: *Experimental neurology*, Band 47(1): S. 162–172, 1975.
- Bandera, E., Botteri, M., Minelli, C., Sutton, A., Abrams, K. R. und Latronico, N.: Cerebral blood flow threshold of ischemic penumbra and infarct core in acute ischemic stroke: a systematic review. In: *Stroke; a journal of cerebral circulation*, Band 37(5): S. 1334–9, 2006.
- Baron, J.: Perfusion Thresholds in Human Cerebral Ischemia: Historical Perspective and Therapeutic Implications. In: *Cerebrovascular Diseases*, Band 11(Suppl. 1): S. 2–8, 2001.
- Barth, T. M., Jones, T. a. und Schallert, T.: Functional subdivisions of the rat somatic sensorimotor cortex. In: *Behavioural Brain Research*, Band 39(1): S. 73–95, 1990.
- Bederson, J. B., Pitts, L. H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L. und Bartkowski, H.: Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. In: *Stroke*, Band 17(3): S. 472–476, 1986.
- Bouet, V., Boulouard, M., Toutain, J., Divoux, D., Bernaudin, M., Schumann-Bard, P. und Freret, T.: The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. In: *Nature protocols*, Band 4(10): S. 1560–4, 2009.
- Bouët, V., Freret, T., Toutain, J., Divoux, D., Boulouard, M. und Schumann-Bard, P.: Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. In: *Experimental neurology*, Band 203(2): S. 555–67, 2007.

- Carmichael, S. T.: Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. In: *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, Band 2(3): S. 396–409, 2005.
- Carmichael, S. T.: Brain excitability in stroke: the yin and yang of stroke progression. In: *Archives of neurology*, Band 69(2): S. 161–7, 2012.
- Collins, R. L.: On the inheritance of handedness. I. Laterality in inbred mice. In: *The Journal of heredity*, Band 59(1): S. 9–12, 1968.
- Cramer, S. C., Sur, M., Dobkin, B. H., O'Brien, C., Sanger, T. D., Trojanowski, J. Q., Rumsey, J. M., Hicks, R., Cameron, J., Chen, D., Chen, W. G., Cohen, L. G., Decharms, C., Duffy, C. J., Eden, G. F., Fetz, E. E., Filart, R., Freund, M., Grant, S. J., Haber, S., Kalivas, P. W., Kolb, B., Kramer, A. F., Lynch, M., Mayberg, H. S., McQuillen, P. S., Nitkin, R., Pascual-Leone, A., Reuter-Lorenz, P., Schiff, N., Sharma, A., Shekim, L., Stryker, M., Sullivan, E. V. und Vinogradov, S.: Harnessing neuroplasticity for clinical applications. In: *Brain*, Band 134(Pt 6): S. 1591–609, 2011.
- DeVries, A., Nelson, R. J., Traystman, R. J. und Hurn, P. D.: Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Band 25(4): S. 325–342, 2001.
- Dirnagl, U. und Fisher, M.: International, multicenter randomized preclinical trials in translational stroke research: It's time to act. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Band 32(6): S. 933–5, 2012.
- Dirnagl, U. und Group, M. o. t. M.-S.: Standard operating procedures (SOP) in experimental stroke research: SOP for middle cerebral artery occlusion in the mouse. In: *Nature Precedings*, 2012.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. und Moskowitz, M. A.: Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. In: *Trends in Neurosciences*, Band 22(9): S. 391–397, 1999.
- Donnan, G. a., Baron, J.-C., Ma, H. und Davis, S. M.: Penumbra selection of patients for trials of acute stroke therapy. In: *Lancet neurology*, Band 8(3): S. 261–9, 2009.
- Durukan, A. und Tatlisumak, T.: Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, Band 87(1): S. 179–97, 2007.

- Encarnacion, A., Horie, N., Keren-Gill, H., Bliss, T. M., Steinberg, G. K. und Shamloo, M.: Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. In: *Journal of neuroscience methods*, Band 196(2): S. 247–57, 2011.
- Endres, M., Engelhardt, B., Koistinaho, J., Lindvall, O., Mears, S., Mohr, J. P., Planas, A., Rothwell, N., Schwaninger, M., Schwab, M. E., Vivien, D., Wieloch, T. und Dirnagl, U.: Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. In: *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*, Band 25(3): S. 268–78, 2008.
- Engel, O., Kolodziej, S., Dirnagl, U. und Prinz, V.: Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. In: *Journal of visualized experiments : JoVE*, (47): S. 2–5, 2011.
- Ferrara, A., El Bejaoui, S., Seyen, S., Tirelli, E. und Plumier, J.-C.: The usefulness of operant conditioning procedures to assess long-lasting deficits following transient focal ischemia in mice. In: *Behavioural brain research*, Band 205(2): S. 525–34, 2009.
- Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D. W., Hurn, P. D., Kent, T. A., Savitz, S. I. und Lo, E. H.: Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. In: *Stroke; a journal of cerebral circulation*, Band 40(6): S. 2244–50, 2009.
- Freret, T., Bouet, V., Leconte, C., Roussel, S., Chazalviel, L., Divoux, D., Schumann-Bard, P. und Boulouard, M.: Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test. In: *Behavioral neuroscience*, Band 123(1): S. 224–30, 2009.
- Gerlai, R.: Transient focal cerebral ischemia induces sensorimotor deficits in mice. In: *Behavioural Brain Research*, Band 108(1): S. 63–71, 2000.
- Gertz, K., Kronenberg, G., Kälin, R. E., Baldinger, T., Werner, C., Balkaya, M., Eom, G. D., Hellmann-Regen, J., Kröber, J., Miller, K. R., Lindauer, U., Laufs, U., Dirnagl, U., Heppner, F. L. und Endres, M.: Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. In: *Brain : a journal of neurology*, Band 135(Pt 6): S. 1964–80, 2012.
- Hao, J., Mdzinarishvili, A., Abbruscato, T. J., Klein, J., Geldenhuys, W. J., Van der Schyf, C. J. und Bickel, U.: Neuroprotection in mice by NGP1-01 after transient focal brain ischemia. In: *Brain research*, Band 1196: S. 113–20, 2008.
- Heinecke, H.: A comparison of two variants of the chimney behaviour test in mice. In: *Zeitschrift für Versuchstierkunde*, Band 29(3-4): S. 145–8, 1987.

- Hetze, S., Römer, C., Teufelhart, C., Meisel, A. und Engel, O.: Gait analysis as a method for assessing neurological outcome in a mouse model of stroke. In: *Journal of neuroscience methods*, Band 206(1): S. 7–14, 2012.
- Hua, Y.: Behavioral Tests After Intracerebral Hemorrhage in the Rat. In: *Stroke*, Band 33(10): S. 2478–2484, 2002.
- Hurn, P. D. und Macrae, I. M.: Estrogen as a neuroprotectant in stroke. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Band 20(4): S. 631–52, 2000.
- Iadecola, C. und Anrather, J.: Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. In: *Nature neuroscience*, Band 14(11): S. 1363–8, 2011a.
- Iadecola, C. und Anrather, J.: The immunology of stroke: from mechanisms to translation. In: *Nature medicine*, Band 17(7): S. 796–808, 2011b.
- Jones, B. J. und Roberts, D. J.: A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. In: *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie*, Band 259(2): S. 211–211, 1968.
- Kassem-Moussa, H. und Graffagnino, C.: Nonocclusion and Spontaneous Recanalization Rates in Acute Ischemic Stroke. In: *Archives of neurology*, Band 59(12): S. 1870–1873, 2002.
- Katchanov, J., Waeber, C., Gertz, K., Gietz, A., Winter, B., Brück, W., Dirnagl, U., Veh, R. W. und Endres, M.: Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, Band 13(4): S. 452–64, 2003.
- Khaja, A. M. und Grotta, J. C.: Established treatments for acute ischaemic stroke. In: *Lancet*, Band 369(9558): S. 319–30, 2007.
- Kolominsky-Rabas, P. L., Sarti, C., Heuschmann, P. U., Graf, C., Siemonsen, S., Neundoerfer, B., Katalinic, A., Lang, E., Gassmann, K.-G. und von Stockert, T. R.: A Prospective Community-Based Study of Stroke in Germany The Erlangen Stroke Project (ESPro) : Incidence and Case Fatality at 1, 3, and 12 Months. In: *Stroke*, Band 29(12): S. 2501–2506, 1998.
- Kolominsky-Rabas, P. L., Weber, M., Gefeller, O., Neundoerfer, B. und Heuschmann, P. U.: Epidemiology of Ischemic Stroke Subtypes According to TOAST Criteria: Incidence, Recurrence, and Long-Term Survival in Ischemic Stroke Subtypes: A Population-Based Study. In: *Stroke*, Band 32(12): S. 2735–2740, 2001.

- Kolominsky-Rabas, P. L., Heuschmann, P. U., Marschall, D., Emmert, M., Baltzer, N., Neundörfer, B., Schöffski, O. und Krobot, K. J.: Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. In: *Stroke; a journal of cerebral circulation*, Band 37(5): S. 1179–83, 2006.
- Kronenberg, G., Balkaya, M., Prinz, V., Gertz, K., Ji, S., Kirste, I., Heuser, I., Kampmann, B., Hellmann-Regen, J., Gass, P., Sohr, R., Hellweg, R., Waeber, C., Juckel, G., Hörtnagl, H., Stumm, R. und Endres, M.: Exofocal Dopaminergic Degeneration as Antidepressant Target in Mouse Model of Poststroke Depression. In: *Biological psychiatry*, 2012.
- Kuroda, S., Tsuchidate, R., Smith, M. L., Maples, K. R. und Siesjö, B. K.: Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Band 19(7): S. 778–87, 1999.
- Lane, E. L., Cheetham, S. C. und Jenner, P.: Repeated administration of the monoamine reuptake inhibitor BTS 74 398 induces ipsilateral circling in the 6-hydroxydopamine lesioned rat without sensitizing motor behaviours. In: *The European journal of neuroscience*, Band 21(1): S. 179–86, 2005.
- Lees, K. R., Bluhmki, E., von Kummer, R., Brott, T. G., Toni, D., Grotta, J. C., Albers, G. W., Kaste, M., Marler, J. R., Hamilton, S. a., Tilley, B. C., Davis, S. M., Donnan, G. a., Hacke, W., Allen, K., Mau, J., Meier, D., del Zoppo, G., De Silva, D. a., Butcher, K. S., Parsons, M. W., Barber, P. a., Levi, C., Bladin, C. und Byrnes, G.: Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. In: *Lancet*, Band 375(9727): S. 1695–703, 2010.
- Li, X., Blizzard, K. K., Zeng, Z., DeVries, A. C., Hurn, P. D. und McCullough, L. D.: Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender. In: *Experimental neurology*, Band 187(1): S. 94–104, 2004.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T. B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P. M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M. M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G.,

- Roger, V. L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N. D. und Wylie-Rosett, J.: Heart disease and stroke statistics–2010 update: a report from the American Heart Association. In: *Circulation*, Band 121(7): S. e46–e215, 2010.
- Lubjuhn, J., Gastens, A., von Wilpert, G., Bargiotas, P., Herrmann, O., Murikinati, S., Rabie, T., Marti, H. H., Marti, H., Amende, I., Hampton, T. G. und Schwaninger, M.: Functional testing in a mouse stroke model induced by occlusion of the distal middle cerebral artery. In: *Journal of neuroscience methods*, Band 184(1): S. 95–103, 2009.
- Maeda, K., Hata, R. und Hossmann, K. a.: Regional metabolic disturbances and cerebrovascular anatomy after permanent middle cerebral artery occlusion in C57black/6 and SV129 mice. In: *Neurobiology of disease*, Band 6(2): S. 101–8, 1999.
- Matsuura, K., Kabuto, H., Makino, H. und Ogawa, N.: Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. In: *Journal of neuroscience methods*, Band 73(1): S. 45–48, 1997.
- McIlwain, K. L., Merriweather, M. Y., Yuva-Paylor, L. a. und Paylor, R.: The use of behavioral test batteries: Effects of training history. In: *Physiology & Behavior*, Band 73(5): S. 705–717, 2001.
- Millán, M. und Dávalos, A.: The Need for New Therapies for Acute Ischaemic Stroke. In: *Cerebrovascular Diseases*, Band 22(1): S. 3–9, 2006.
- Moskowitz, M. a.: Brain protection: maybe yes, maybe no. In: *Stroke; a journal of cerebral circulation*, Band 41(10 Suppl): S. S85–6, 2010.
- Moskowitz, M. a., Lo, E. H. und Iadecola, C.: The science of stroke: mechanisms in search of treatments. In: *Neuron*, Band 67(2): S. 181–98, 2010.
- Murphy, T. H. und Corbett, D.: Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. In: *Nature reviews. Neuroscience*, Band 10(12): S. 861–72, 2009.
- O’Collins, V. E., Macleod, M. R., Donnan, G. A., Horky, L. L., van der Worp, B. H. und Howells, D. W.: 1,026 experimental treatments in acute stroke. In: *Annals of neurology*, Band 59(3): S. 467–77, 2006.
- Pedrono, E., Durukan, A., Strbian, D., Marinkovic, I., Shekhar, S., Pitkonen, M., Abo-Ramadan, U. und Tatlisumak, T.: An optimized mouse model for transient ischemic attack. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology*, Band 69(2): S. 188–95, 2010.

- Rothwell, P. M., Algra, A. und Amarenco, P.: Medical treatment in acute and long-term secondary prevention after transient ischaemic attack and ischaemic stroke. In: *Lancet*, Band 377(9778): S. 1681–92, 2011.
- Savitz, S. I.: A critical appraisal of the NXY-059 neuroprotection studies for acute stroke: a need for more rigorous testing of neuroprotective agents in animal models of stroke. In: *Experimental neurology*, Band 205(1): S. 20–5, 2007.
- Savitz, S. I. und Schäbitz, W.-R.: A Critique of SAINT II: wishful thinking, dashed hopes, and the future of neuroprotection for acute stroke. In: *Stroke; a journal of cerebral circulation*, Band 39(4): S. 1389–91, 2008.
- Schallert, T.: Behavioral tests for preclinical intervention assessment. In: *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, Band 3(4): S. 497–504, 2006.
- Schallert, T., Upchurch, M., Wilcox, R. E. und Vaughn, D. M.: Posture-independent sensorimotor analysis of inter-hemispheric receptor asymmetries in neostriatum. In: *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Band 18(5): S. 753–759, 1983.
- Shuaib, A., Lees, K. R., Lyden, P., Grotta, J., Davalos, A., Davis, S. M., Diener, H.-C., Ashwood, T., Wasiewski, W. W. und Emeribe, U.: NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. In: *The New England journal of medicine*, Band 357(6): S. 562–71, 2007.
- Strong, K., Mathers, C. und Bonita, R.: Preventing stroke: saving lives around the world. In: *Lancet neurology*, Band 6(2): S. 182–7, 2007.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, N.: Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. In: *The New England journal of medicine*, Band 333(24): S. 1581–7, 1995.
- Wang, Y., Bontempi, B., Hong, S. M., Mehta, K., Weinstein, P. R., Abrams, G. M. und Liu, J.: A comprehensive analysis of gait impairment after experimental stroke and the therapeutic effect of environmental enrichment in rats. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Band 28(12): S. 1936–50, 2008.
- Winter, B., Juckel, G., Viktorov, I., Katchanov, J., Gietz, A., Sohr, R., Balkaya, M., Hörtnagl, H. und Endres, M.: Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice. In: *Biological psychiatry*, Band 57(10): S. 1166–75, 2005.

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Jan Matthias Kröber, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Evaluation des sensomotorischen Defizites nach milder cerebraler 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.“

Berlin, den 15.01.2013

Jan Matthias Kröber

Lebenslauf

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

Publikationsverzeichnis

Balkaya, M.*, Kröber, J.*, Gertz, K., Peruzzaro, S., Endres, M.: Characterization of long-term functional outcome in a murine model of mild brain ischemia. In: *Journal of Neuroscience Methods*, 2013 Jan 03 [Epub ahead of print].

Gertz, K.*, Kronenberg, G.*, Kälin, R. E., Baldinger, T., Werner, C., Balkaya, M., Eom, G. D., Hellmann-Regen, J., Kröber, J., Miller, K. R., Lindauer, U., Laufs, U., Dirnagl, U., Heppner, F. L., Endres, M.: Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. In: *Brain : a journal of neurology*, Band 135(Pt 6): S. 1964-80, 2012.

Balkaya, M.*, Prinz, V.*, Custodis, F., Gertz, K., Kronenberg, G., Kroeber, J., Fink, K., Plehm, R., Gass, P., Laufs, U., Endres, M.: Stress worsens endothelial function and ischemic stroke via glucocorticoids. In: *Stroke; a journal of cerebral circulation*, Band 42(11): S. 3258-64, 2011.

Balkaya, M., Kröber, J.M., Rex, A., Endres, M.: Assessing post-stroke behaviour in mouse models of focal ischemia. *Eingereicht*.
In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2012 Dec 12 [Epub ahead of print].

*Beide Autoren haben gleichermaßen zu der Arbeit beigetragen.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Matthias Endres – zunächst für die Möglichkeit der Promotion, vor allem aber für die trotz aller zeitlichen Einschränkungen umsichtige Betreuung und Förderung im Laufe ihrer Entstehung.

Besonders danken muß ich Mustafa Balkaya, mittlerweile in Harvard, Boston, ohne den diese Arbeit nicht denkbar wäre.

Großen Dank schulde ich auch Karen Gertz, insbesondere für die geduldige und fürsorgliche Einführung in den Dschungel der Wissenschaft.

Weiter möchte ich Martin Ebinger, Golo Kronenberg, Anna Hetzer und Sarah Peruzzaro für die fortwährende Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, für ihr Vertrauen und ihre stete Unterstützung.