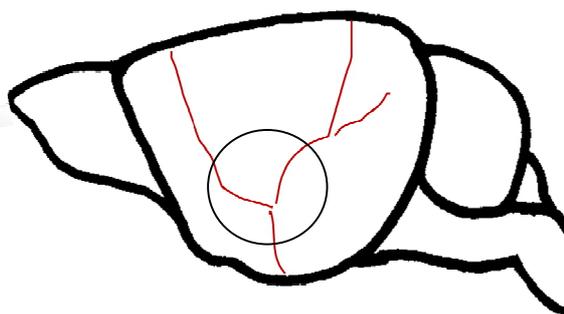
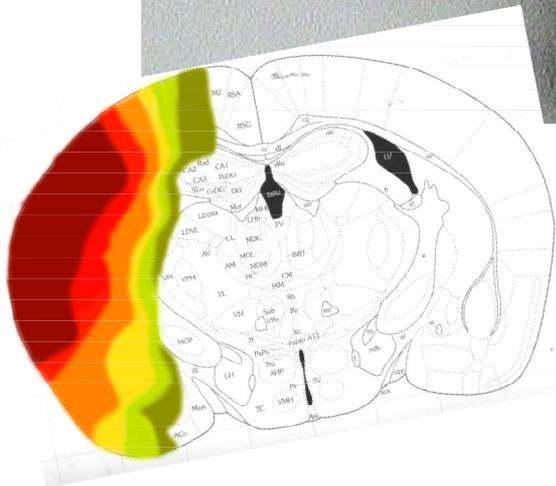
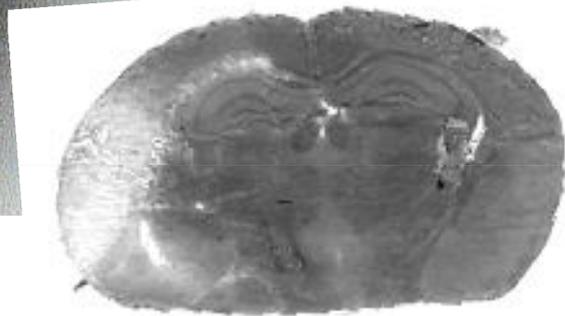


Aus dem Institut für  
Veterinär-Anatomie, Histologie und –Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Verhaltenstestung in einem Schlaganfallmodell  
der Maus



Inaugural-Dissertation  
zur Erreichung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Judith Lubjuhn



Aus dem Institut für  
Veterinär-Anatomie, Histologie und –Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Professor Dr. Martin Bergmann

**und**

Aus dem Pharmakologischen Institut der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Betreuer: Professor Dr. Markus Schwaninger

## Verhaltenstestung in einem Schlaganfallmodell

### der Maus

Inaugural-Dissertation  
zur Erreichung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von:  
Judith Lubjuhn  
Tierärztin aus Erbach

Gießen 2010



Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Dekan: Professor Dr. Dr. habil. G. Baljer**

**Gutachter: Prof. Dr. M. Bergmann  
Prof. Dr. M. Schwaninger**

**Tag der Disputation: 23.6.2010**



**-Meinen Eltern-**



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG.....</u></b>	<b>1</b>
1.1	DEFINITION.....	2
1.2	PATHOGENESE ISCHÄMISCHER SCHLAGANFALL .....	2
1.3	CEREBRALE ISCHÄMIEMODELLE AM TIER .....	7
1.3.1	Globale Ischämie Modelle .....	7
1.3.1.1	Extravaskuläre Methoden .....	7
1.3.1.1.1	Stauung .....	7
1.3.1.1.2	Dekapitation .....	8
1.3.1.1.3	Herzstillstand.....	8
1.3.1.2	Vaskuläre Methoden.....	8
1.3.1.2.1	2- Gefäß Okklusionsmodell .....	8
1.3.1.2.2	4-Gefäß Okklusionsmodell .....	9
1.3.2	GERBIL ISCHÄMIEMODELLE.....	9
1.3.3	FOKALE ISCHÄMIEMODELLE.....	10
1.3.3.1	Verschluss eines Gefäßes mittels Photochemie .....	10
1.3.3.2	Gefäßverschluss mittels Embolisation.....	10
1.3.3.3	Okklusionsmodell.....	11
1.4	EINSATZ VON TIERMODELLEN .....	12
1.4.1	NAGER ALS TIERMODELL .....	13
1.4.1	PROBLEME/ GRENZEN DES TIERMODELLS IN DER SCHLAGANFALLFORSCHUNG.....	14
1.5	DIE BEDEUTUNG VON VERHALTENSTESTS IN DER SCHLAGANFALLFORSCHUNG .....	17
1.6	VORGEHEN/ ZIEL DIESER STUDIE .....	19
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN.....</u></b>	<b>20</b>
2.1	DURCHFÜHRUNG DER DMCAO (= DISTAL MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION).....	20
2.2	VERHALTENSTESTS .....	21
2.3	DURCHFÜHRUNG DER VERHALTENSTESTS.....	22
2.3.1	CHIMNEY TEST.....	22
2.3.2	CORNER TEST.....	23
2.3.3	GANGANALYSE .....	24
2.3.4	HÄNDIGKEIT .....	25
2.3.5	HANGING WIRE.....	26
2.3.6	LATENCY TO MOVE .....	26

2.3.7	ZYLINDERTEST.....	26
2.3.8	MESSUNG KÖRPERGEWICHT.....	28
2.3.9	CORNER TEST IM LINKSSEITIGEN FADENMODELL .....	28
<b>2.4</b>	<b>PERFUSION.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>ANFERTIGEN DER HISTOLOGISCHEN SCHNITTE.....</b>	<b>29</b>
<b>2.6</b>	<b>SILBERFÄRBUNG.....</b>	<b>29</b>
<b>2.7</b>	<b>EINSCANNEN/ INFARKTMESSUNG .....</b>	<b>30</b>
<b>2.8</b>	<b>KARTIERUNG DER INFARKTHÄUFIGKEITEN.....</b>	<b>31</b>
2.8.1	KORONARSCHNITT: .....	31
2.8.2	KARTIERUNG LATERALE ANSICHT.....	32
<b>2.9</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG.....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE.....</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b>3.1</b>	<b>CHIMNEY TEST .....</b>	<b>33</b>
3.1.1	LINKSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	33
3.1.2	RECHTSSEITIG OPERIERTE TIERE.....	34
<b>3.2</b>	<b>CORNER TEST.....</b>	<b>35</b>
3.2.1	LINKSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	35
3.2.2	RECHTSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	37
<b>3.3</b>	<b>GANGANALYSE .....</b>	<b>38</b>
3.3.1	SCHRITTLÄNGE RECHTE SEITE.....	38
3.3.1.1	Linksseitig operierte Tiere .....	38
3.3.1.2	Rechtsseitig operierte Tiere .....	39
3.3.2	SCHRITTLÄNGE LINKE SEITE.....	40
3.3.2.1	Linksseitig operierte Tiere .....	40
3.3.2.2	Rechtsseitig operierte Tiere .....	41
3.3.3	SCHRITTVARIANZ RECHTE SEITE .....	42
3.3.3.1	Linksseitig operierte Tiere .....	42
3.3.3.2	Rechtsseitig operierte Tiere .....	43
3.3.4	SCHRITTVARIANZ LINKE SEITE.....	44
3.3.4.1	Linksseitig operierte Tiere .....	44
3.3.4.2	Rechtsseitig operierte Tiere .....	45
3.3.5	SCHRITTBASIS .....	46
3.3.5.1	Linksseitig operierte Tiere .....	46
3.3.5.2	Rechtsseitig operierte Tiere .....	47

<b>3.4 HÄNDIGKEIT</b> .....	<b>48</b>
3.4.1 LINKSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	48
3.4.2 RECHTSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	49
<b>3.5 HANGING WIRE</b> .....	<b>50</b>
3.5.1 LINKSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	50
3.5.2 RECHTSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	51
<b>3.6 LATENCY TO MOVE</b> .....	<b>52</b>
3.6.1 LINKSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	52
3.6.2 RECHTSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	53
<b>3.7 ZYLINDER TEST</b> .....	<b>54</b>
3.7.1 LINKSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	54
3.7.2 RECHTSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	55
<b>3.8 KÖRPERGEWICHT</b> .....	<b>56</b>
3.8.1 LINKSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	56
3.8.2 RECHTSSEITIG OPERIERTE TIERE .....	58
<b>3.9 CORNER TEST IM LINKSSEITIGEN FADENMODELL</b> .....	<b>59</b>
<b>3.10 INFARKTGRÖßE</b> .....	<b>60</b>
<b>3.11 KARTIERUNG</b> .....	<b>62</b>
3.11.1 KORONALSCHNITT 48 H NACH LINKSSEITIGER DMCAO .....	62
3.11.2 KORONALSCHNITT 23 TAGE NACH LINKSSEITIGER DMCAO .....	63
3.11.3 KORONALSCHNITT 23 TAGE NACH RECHTSSEITIGER DMCAO .....	64
3.11.4 LATERALANSICHT 48 H NACH LINKSSEITIGER DMCAO .....	65
<b><u>4 DISKUSSION</u></b> .....	<b><u>66</u></b>
<b>4.1 DISKUSSION DER METHODE</b> .....	<b>66</b>
4.1.1 VERWENDETE TIERE .....	66
4.1.2 ANÄSTHESIE .....	67
4.1.3 OPERATIONSMETHODE .....	67
4.1.4 ANALGESIE .....	68
4.1.5 DURCHFÜHRUNG DER VERHALTENSTEST .....	69
4.1.6 AUSWERTUNG .....	71
<b>4.2 ERGEBNISSE DER VERHALTENSTESTS</b> .....	<b>72</b>
4.2.1 GANGANALYSE .....	73
4.2.2 ZYLINDER TEST .....	74
4.2.3 HANGING WIRE .....	74

4.2.4	CHIMNEY TEST.....	75
4.2.5	CORNER TEST.....	76
4.2.6	HÄNDIGKEIT .....	77
4.2.7	LATENCY TO MOVE .....	78
4.2.8	KÖRPERGEWICHT .....	79
4.2.9	CORNER TEST IM LINKSSEITIGEN FADENMODELL .....	80
4.2.10	KARTIERUNGEN .....	81
<b>4.3</b>	<b>FUNKTIONELLE REGENERATION.....</b>	<b>82</b>
<b>4.4</b>	<b>HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG .....</b>	<b>86</b>
<b>4.5</b>	<b>FAZIT .....</b>	<b>88</b>
<b><u>5</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u></b>	<b><u>90</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>SUMMARY .....</u></b>	<b><u>92</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>93</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>111</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</u></b>	<b><u>113</u></b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>ANHANG .....</u></b>	<b><u>114</u></b>
<b>10.1</b>	<b>AVERTINLÖSUNG (STAMMLÖSUNG) .....</b>	<b>114</b>
<b>10.2</b>	<b>ENTWICKLERLÖSUNG.....</b>	<b>114</b>
<b>10.3</b>	<b>SILBER-IMPRÄGNIERLÖSUNG.....</b>	<b>114</b>
<b><u>11</u></b>	<b><u>ERKLÄRUNG .....</u></b>	<b><u>115</u></b>
<b><u>12</u></b>	<b><u>DANKSAGUNG.....</u></b>	<b><u>116</u></b>

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-Triphosphat
BLA	Nucleus Amygdaleus basolateralis anterior
BLV	Nucleus Amygdaleus basolateralis ventralis
CA2	Hippocampale Region
CA3	Hippocampale Region
CeC	Nucleus Amygdaleus centralis, capsuläres Divertikel
CeL	Nucleus Amygdaleus centralis, laterales Divertikel
CeM	Nucleus Amygdaleus centralis, mediales Divertikel
CPu	Putamen caudatus
DEn	Nucleus Endopiriformis dorsalis
dMCAO	distal middle cerebral artery occlusion
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Ect	ectorhinaler Cortex
LEnt	lateraler entorhinaler Cortex
LI	Lateralitätsindex
MCAO	middle cerebral artery occlusion
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
OP	Operation
Pir	Cortex Piriformis
PLCo	Nucleus Amygdaleus corticalis posterolaterlis
PRh	perirhinaler Cortex
PV	Nucleus Thalamicus Paraventricularis
SEM	Standardfehler
S1BF	somatosensorischer Cortex Barrel Field
S1FL	somatosensorischer Cortex Vordergliedmaßen

S1HL

somatosensotischer Cortex Hintergliedmaßen

S2

sekundärer somatosensorischer Cortex

# 1 Einleitung

Der Schlaganfall stellt heute eine der Hauptursachen für Tod und Behinderung im Erwachsenenalter in den Industriestaaten dar (Kjellstrom et al. 2007).

Die Forschung konzentriert sich einerseits auf eine mögliche Prävention, andererseits auf eine potentielle Neuroprotektion. Die Entwicklung neuroprotektiver Substanzen stellt ein weites und oftmals erfolgloses Forschungsfeld dar. Bislang existieren Veröffentlichungen von weit über 500 potentiell neuroprotektiven Substanzen. Diese wurden bereits klinisch getestet, zeigten aber keine Effekte beim Menschen.

Dies mag sowohl mit den verwendeten Tiermodellen in Zusammenhang stehen, als auch mit der Tatsache, dass bisher der Nachweis der Wirksamkeit einer Substanz fast ausschließlich über eine histologisch messbare Reduktion der Infarktgröße erfolgt. Der Aspekt des funktionellen „Outcome“, welcher in der Klinik den entscheidenden Faktor darstellt, wird hierbei oft vernachlässigt.

Ziel dieser Studie ist es, Verhaltenstests zu etablieren, welche eine Aussage sowohl über den Infarkt an sich (Größe, betroffene Regionen), als auch über die mögliche funktionelle Regeneration der Tiere zulassen. Solche Tests würden helfen, die funktionellen Auswirkungen von Substanzen besser einschätzen zu können. Damit wäre der Sprung von „Bench to bedside“ leichter, im Tierversuch wirksame Substanzen können somit schneller in klinische Studien eingehen.

## 1.1 **Definition**

Als Schlaganfall wird eine plötzliche oder innerhalb kurzer Zeit auftretende Erkrankung des Gehirns bezeichnet. Sie entsteht, wenn der cerebrale Blutfluss in einem solchen Maße vermindert wird, dass benötigte metabolische Substrate dem Gewebe nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen (Sharp et al. 1998).

Abhängig von den zugrunde liegenden Ursachen wird der Schlaganfall in 3 Gruppen eingeteilt:

- 1.) subarachnoidale Blutung
- 2.) intracerebrale Blutung
- 3.) ischämische Schlaganfälle

Die Gruppe der ischämischen Schlaganfälle stellt mit 80% aller Fälle den größten Teil aller Patienten dar und ist in den Fokus der Forschung gerückt (Feigin et al. 2003). Somit konzentriert sich diese Studie auf die ischämische Form, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

## 1.2 **Pathogenese ischämischer Schlaganfall**

Hauptursache für eine cerebrale Ischämie stellen Okklusionen von Hauptarterien des Gehirns dar, meist verursacht durch Embolien oder lokale Thromben. Diese entstehen meist durch arteriosklerotische Veränderungen im Gefäßsystem selbst. Weitere, aber deutlich seltenere Ursachen stellen kardiale Emboliequellen dar. Bluthochdruck ist ein weiterer prädisponierender Faktor der zu einer Ischämie führen kann.

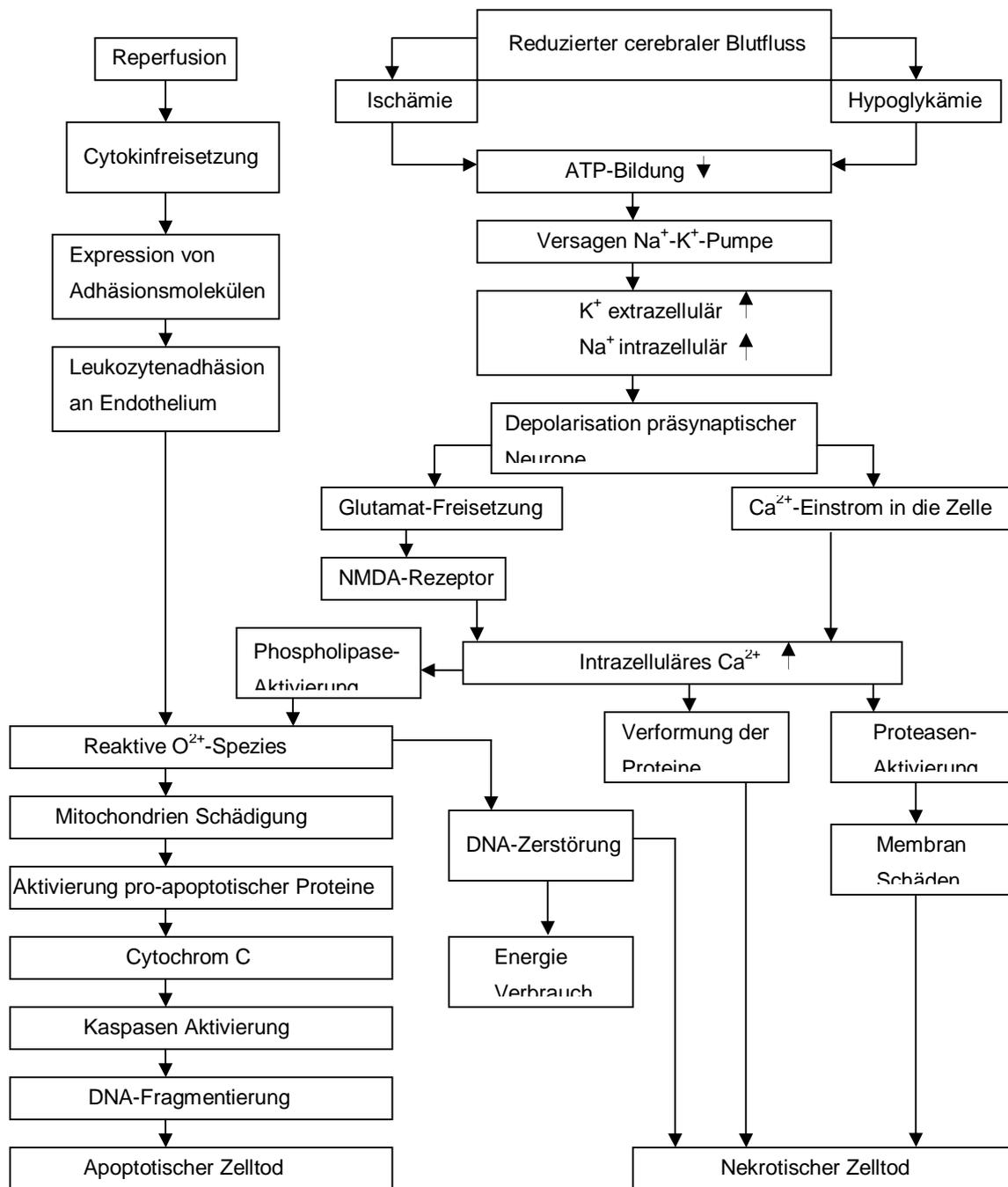


Abbildung 1: Mechanismen der cerebralen Ischämie: nach Wahlgren (Wahlgren and Ahmed 2004).

Das Gewebe des Gehirns besitzt einen hohen Bedarf an Sauerstoff und Energie.

Dieser wird fast ausschließlich über oxidative Phosphorylierung gedeckt (Sokoloff 1999).

Gleichzeitig verfügen Nervenzellen nicht über alternative Energiereserven, eine mangelnde

Versorgung hat eine sofortige Veränderung des Metabolismus zur Folge.

Die partielle oder totale Okklusion eines Hauptgefäßes des Gehirns vermindert die Zufuhr von Blut und damit die Substitution mit Sauerstoff und Substraten, welche für die oxidative Phosphorylierung benötigt werden.

Der in den betroffenen Hirnarealen entstehende Energiemangel führt zum Versagen der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe. Eine Aufrechterhaltung des energieabhängigen Ionengradienten ist nicht, oder nur eingeschränkt möglich. Das Ergebnis ist eine Störung des Membranpotentials der Neuronen und Gliazellen.

Die folgende Depolarisation der Neuronen und Gliazellen (Katsura et al. 1994) führt wiederum zu einer Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht sich (Stys et al. 1990). Gleichzeitig setzt ein Ausstrom von  $\text{K}^+$  ein, welcher die Depolarisation der ischämischen Zellen verstärkt. Die ischämische Depolarisation erhöht die präsynaptische Freisetzung von Glutamat, welches exzitatorischen Neuronen als Neurotransmitter dient. Gleichzeitig wird die energieabhängige Wiederaufnahme des Glutamats durch den Energiemangel gehemmt. Dies erhöht zusätzlich die Glutamatkonzentration im Extrazellulärraum.

Erhöhte Konzentrationen dieser Aminosäure bedingen durch eine Bindung an N-Methyl-D-Aspartat (=NMDA) Rezeptoren einen weiteren Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und zusätzlich  $\text{Na}^+$  in den Intrazellulärraum. Die Folge eines erhöhter Gehaltes an  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytoplasma stellt die Aktivierung kataboler Enzyme dar (Siesjo et al. 1999).

$\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen gelangen in stärkerem Maße in den Intrazellulärraum, als  $\text{K}^+$  ausströmt. Der intrazellulär erhöhte osmotische Druck wiederum führt zu einem passiven Wassereinstrom und somit zum intrazellulären Ödemen (Tomita 2005).

Vier bis sechs Stunden nach der cerebralen Ischämie verändert sich das entstandene Ödem. Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt erfolgenden Störung der Blut-Hirn-Schranke dringen Proteine aus dem Blut in das Gewebe ein und verändern den osmotischen Druck (Olsson et al. 1971). Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem folgt nach, es entsteht ein vasogenes Ödem,

welches zu einer Verbreitung schädigender Substanzen (z.B. freie Radikale) und somit zu einer weiteren Verschlechterung des Gewebeszustandes führen kann.

Die vom Kern der Ischämie ausgehende Depolarisationswellen greifen auf periphere, Nicht-Infarkt- Gebiete, über (Nedergaard und Astrup 1986; Back et al. 2004).

Dieser Randbezirk, auch Penumbra genannt (Astrup et al. 1981), besteht aus funktionell geschädigten, aber strukturell intakten Zellen. Diese Intaktheit ermöglicht eine grundsätzliche, wenn auch zeitliche limitierte Reversibilität der entstandenen Veränderungen (Symon et al. 1977; Hakim 1987; Ginsberg 1997; Ginsberg 2002; Back et al. 2004).

Eine Rückkehr zum Status ante ischämia erfordert eine energieabhängige Repolarisation. Diese ist aufgrund der persistierenden, aber verminderten Gewebesperfusion und der daher teilweise noch vorhandenen Substratzufuhr in diesem Gebiet grundsätzlich möglich (Hossmann 1994).

Ein, wie beispielsweise bei einer Repolarisation, erhöhter Energiebedarf im Gehirn führt über autonome Regelmechanismen zu einer Erhöhung des cerebralen Blutflusses. Diese Gegenreaktion kann aufgrund der Ischämie nicht, oder nur eingeschränkt, erfolgen (Back et al. 1994). Die ischämie bedingte Membranstabilität ermöglicht weitere, auch mehrfache Depolarisationen in diesen Regionen noch bis 6-8 Stunden nach der eigentlichen Ischämie. Steht zu diesem Zeitpunkt nicht ausreichend Energie für weitere Repolarisationen zur Verfügung, sterben die Zellen ab, der Infarkt wächst (Astrup et al. 1981; Olsen et al. 1983; Mies et al. 1993). Zwischen der Anzahl der stattfindenden Depolarisationen und der Infarktgröße kann eine direkte Korrelation nachgewiesen werden (Mies et al. 1993).

Infarktwachstum erfolgt in den Untersuchungen von Hossmann und seinen Mitarbeitern bei jedem Schlaganfall, laut Baird nimmt ein cerebraler Infarkt innerhalb der ersten 7 Tage um ca. 20% an Größe zu (Baird et al. 1997; Back et al. 2004; Hossmann 2006).

Der Prozess lässt sich in 3 Phasen unterteilen:

- 1.) akute Phase: Die akute Phase ist gekennzeichnet durch Gewebsveränderungen, welche eine direkte Folge von Energiemangel und daraus resultierenden Membranveränderungen darstellen. Gewebsveränderungen treten innerhalb weniger Minuten auf.
- 2.) subakute Phase: Die subakute Phase wird charakterisiert durch ein Wachstum des Infarktkernes in die Peri-infarkt- Zonen. Nach etwa 4-6 Stunden ist eine Kongruenz der beiden Zonen nachweisbar (Hata et al. 2000). Grundlage stellen hier Depolarisationen und Zellveränderungen auf molekularer Ebene dar.
- 3.) verspätete Phase: In der verspäteten Phase, welche Tage bis Wochen andauern kann, führen vasogene Ödeme, Entzündungen und programmierter Zelltod (= sekundäre Phänomene) zu weiteren Veränderungen der Infarktgröße (Hossmann 2006).

Parallel zur Verschiebung der Ionenkonzentrationen führt die im ischämischen Kern verminderte Gewebsperfusion zur Bildung freier  $O_2^-$  Radikale. Diese schädigen direkt die Plasmamembranen und intrazelluläre Organellen, so führen sie beispielsweise zu einer Fragmentierung der DNA (Chan 1996; Lipton und Nicotera 1998).

Freie  $O_2^-$ -Radikale führen in Verbindung mit einem erhöhten  $Ca^{2+}$ - Einstrom und einer Hypoxie zu einer Aktivierung der Expression pro-inflammatorischer Gene. Die daraus resultierende Bildung von Entzündungsmediatoren hat eine Ischämie-begleitende Entzündung des Infarktgebietes zur Folge (Sharp 1998; Dirnagl et al. 1999; Hossmann 2006).

---

## 1.3 Cerebrale Ischämie Modelle am Tier

Cerebrale Ischämie Modelle am Tier existieren bereits seit über 160 Jahren (Fluorens M., 1847 zitiert von Durukan et al. 2008).

Die humane cerebrale Ischämie weist ein hohes Maß an Variabilität in Bezug auf Lokalisation, Ursache, Schweregrad und Reversibilität der entstandenen Schäden auf.

Um die Übertragbarkeit der gewonnenen Daten auf den Menschen zu gewährleisten, werden viele verschiedene Operationsmethoden zur Ischämieinduktion in Tiermodellen entwickelt und angewendet. Bei der Vielzahl existierender Modelle muss grundsätzlich zwischen solchen für globale und solchen für fokale Ischämien unterschieden werden.

Globale Modelle werden oftmals zur Untersuchung von Herzstillstand bedingten Schäden verwendet. Fokale Modelle gelten dagegen als relevanter für akute ischämische Schlaganfälle (Mhairi Macrae 1992; Hunter et al. 1995), da die meisten humanen Ischämien fokaler Art sind.

### 1.3.1 Globale Ischämie Modelle

Globale Ischämie Modelle werden weiterhin differenziert nach extra- und intravaskulären Operationsmethoden.

#### 1.3.1.1 Extravaskuläre Methoden

##### 1.3.1.1.1 Stauung

Eine extravaskuläre Methode stellt die Stauung mittels Stauschlauch dar. Hierbei wird dem anästhesierten Tier kurzzeitig (2-3 Minuten) ein Stauschlauch um den Hals gelegt. Es entsteht ein hoher intrakranieller Druck von 600 – 700 mm Hg. Die cerebrale Durchblutung sinkt auf unter 1%. Bei diesem Modell werden sowohl die Arterien, als auch die Venen beidseitig gestaut. Gleichzeitig werden sämtliche Strukturen im Schädel einem hohen Druck ausgesetzt. Dies führt zu großen beidseitigen Läsionen, weswegen dieses Modell nur

gelegentlich genutzt wird und nicht als Standardmodell etabliert ist (Ginsberg und Busto 1989).

#### **1.3.1.1.2 Dekapitation**

Eine weitere Möglichkeit zum Herbeiführen einer globalen Ischämie stellt die Dekapitation dar, sie führt zu einer sofortigen globalen Ischämie. Damit sowohl biochemische, als auch pathophysiologische und histologische Veränderungen entstehen können, wird der Kopf des Tieres bei 37°C über einen zuvor festgelegten Zeitraum gelagert. Anschließend wird das Gehirn entnommen und wie gewünscht präpariert (Ginsberg und Busto 1989).

#### **1.3.1.1.3 Herzstillstand**

Der herbeigeführte Herzstillstand ist eine weitere Möglichkeit der Induktion einer globalen Ischämie (Mhairi Macrae 1992).

Die Herzfunktion wird chemisch gestoppt, dadurch entsteht eine Ischämie im gesamten Körper. Nach einer vorgegebenen Zeit wird das Tier reanimiert.

Derart herbeigeführte cerebrale Ischämien ähneln den Herzstillstand bedingten Schlaganfällen des Menschen.

#### **1.3.1.2 Vaskuläre Methoden**

##### **1.3.1.2.1 2- Gefäß Okklusionsmodell**

Beim 2-Gefäß-Okklusionsmodell wird mittels Kombination aus Verschluss der Arteria carotis beidseits und einer systemischer Hypotension der Blutfluss im Vorderhirn deutlich reduziert (<5% der Kontrolle im cerebralen Cortex). Hierdurch entsteht ein abrupter Wechsel zwischen Ischämie und deren Aufhebung. Dies ermöglicht einen Einblick in die Veränderungen selektiv empfindlicher Strukturen.

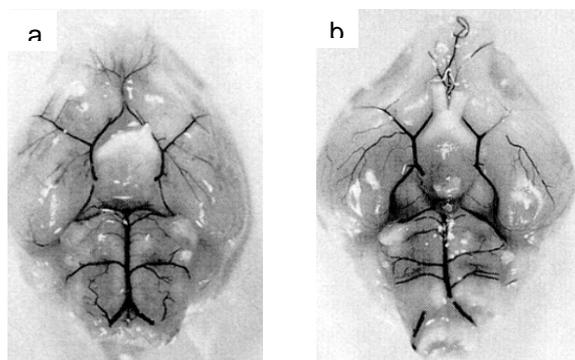
Die histologischen Veränderungen ähneln stark denen des 4-Gefäß-Okklusionsmodells.

### 1.3.1.2.2 4-Gefäß Okklusionsmodell

Im Unterschied zum 2-Gefäß-Okklusionsmodell wird beim 4-Gefäß-Okklusionsmodell zuerst eine atraumatische Spange um die jeweilige Arteria carotis interna gelegt, und anschließend die beiden Arteriae vertebrae mittels Elektrokoagulation verschlossen. Da sowohl die Größe der entstehenden Ischämie, als auch die Überlebensrate der Tiere von Labor zu Labor stark variieren, wird dieses Modell nicht sehr häufig eingesetzt (Pulsinelli und Brierley 1979; Pulsinelli und Buchan 1988; Ginsberg 1989; Hunter et al. 1995).

### 1.3.2 Gerbil Ischämie Modelle

Am mongolischen Gerbil (*Meriones unguiculatus*) durchgeführte Operationsmethoden werden von verschiedenen Autoren getrennt aufgeführt. Diese gesonderte Auflistung ist nötig, da bei diesen Tieren eine anatomische Besonderheit besteht: eine Anastomose zwischen ante- und posterioren cerebralen Gefäßringen ist nicht ausgebildet (siehe Abb. 2).



**Abbildung 2: Ventralansicht des Gehirns** von *Mus musculus* (a) und *Meriones unguiculatus* (b) mit Darstellung der Gefäßversorgung und des Gefäßringes nach Willis (Kitagawa et al. 1998)

Einige Gerbils besitzen jedoch eine Anastomose zwischen den anterioren Cerebralarterien. Diese verlaufen auf der ventralen Oberfläche des Mittelhirns und ermöglichen die Kommunikation zwischen den basalen und den carotidealen Zirkulationen (Levine und Sohn 1969; Levy und Brierley 1974; Berry et al. 1975; Molinari, G.F. 1976; Ginsberg und Busto 1989). Diese Besonderheit erklärt den Hemisphären-Infarkt im Modell der Ein-Gefäß-Ligatur

---

(Ligatur einer Arteria carotis interna) bei 20-50% aller mongolischen Gerbils (Berry et al. 1975; Ginsberg und Busto 1989; Corbett und Nurse 1998).

Die zweite am Gerbil durchgeführte Operation ist die des 2-Gefäß-Okklusionsmodells. Dazu werden sowohl die Arteria carotis der rechten als auch der linken Seite per Ligatur vorübergehend verschlossen (Kahn 1972; Berry et al. 1975; Ginsberg und Busto 1989; Corbett und Nurse 1998; Hunter et al. 1995). Die 2-Gefäß-Okklusion beim Gerbil führt zusätzlich zu Läsionen der hippocampalen CA1 Region, die denen nach einem Herzstillstand gleichen (Zola-Morgan et al. 1986).

### 1.3.3 Fokale Ischämie Modelle

#### 1.3.3.1 Verschluss eines Gefäßes mittels Photochemie

Bei dem Verschluss eines Gefäßes mittels Photochemie wird dem Tier die Färbelösung Bengal Rot intravenös injiziert. Anschließend wird die Kopfhaut inzidiert und zurückgezogen. An der Stelle des gewünschten Infarktes wird Licht mit einer Wellenlänge von 560 nm punktuell appliziert. Hierdurch wird das zirkulierende Bengal Rot aktiviert und es entsteht Singlett-Sauerstoff, welches wiederum das empfindliche Lipidmolekül peroxidiert. Diese Lipidmoleküle führen zur intravasalen Aggregation, was einen Thrombus zur Folge hat. Die Größe des ischämischen Gebietes wird dabei durch den Durchmesser des Lichtes bestimmt. Bei diesem Vorgehen entstehen im umliegenden Gewebe keine thermalen Schäden (Watson et al. 1985; Ginsberg and Busto 1989; Hunter et al. 1995).

#### 1.3.3.2 Gefäßverschluss mittels Embolisation

Das Modell des Gefäßverschlusses mittels Embolisation beruht ebenfalls auf der Bildung von Thromben im gewünschten Gefäß, um so eine Ischämie an den gewünschten Stellen induzieren zu können. Injiziert werden Blutkoagula in einem Durchmesser von <100 µm, 35

---

µm große Kohlekugeln oder Natriumsalze. Die Injektion all dieser Substanzen führt zur Bildung eines Thrombus und somit zu einem ipsilateralen Infarkt (Rosenblum und El-Sabban 1977; Kudo et al. 1982; Kaneko et al. 1985; Orset et al. 2007).

### 1.3.3.3 Okklusionsmodell

Das in der Schlaganfallforschung am meisten genutzte Modell stellt das sogenannte Okklusionsmodell der Arteria cerebri media dar. Diese Arterie stellt beim Menschen das vom Schlaganfall am häufigsten betroffene Gefäß dar, daher besitzt dieses Modell große Relevanz für die Forschung (G.F. Molinari 1976; Garcia 1984; Endres et al. 2008).

Entwickelt von Tamura 1981 für den Einsatz an Ratten, wurde das Modell von Hara 1996 für den Gebrauch an Mäusen adaptiert (Tamura et al. 1981; Hara et al. 1996).

Aufgrund der großen Relevanz existieren für dieses grundsätzliche Modell viele Variationen. Der subtemporale Zugang nach Tamura (Tamura et al. 1981) mit seinen Modifikationen (Bederson et al. 1986; Osborne et al. 1987; Shigeno et al. 1985) gilt auch heute noch als eine der Standardmethoden der experimentellen Schlaganfallinduktion. Unterschieden wird zwischen permanentem und reversiblen Vorgehen. Bei beiden Varianten wird die Arteria cerebri media verschlossen.

Das permanente Modell zeichnet sich dadurch aus, dass der Verschluss, meist mittels Elektrokoagulation, unwiderruflich ist. Beim reversiblen Modell erfolgt die Ligatur mittels chirurgischen Fäden, Clip oder Klemme, die nach einem bestimmten Zeitraum (meist zwischen 20-90 Minuten) wieder entfernt werden. Somit wird eine Reperfusion ermöglicht.

Dieses Reperusionsmodell trägt der Tatsache Rechnung, dass die einer cerebralen Ischämie zugrunde liegende Okklusion durch teilweise Rekanalisation und Kollateralenbildung vermindert wird. Die anschließende Reperfusion des Gewebes führt zu einer Abmilderung der Auswirkungen der initialen Okklusion (Saito et al. 1987).

---

## 1.4 Einsatz von Tiermodellen

Grundsätzlich ist ein „Tiermodell nur dann erfolgreich, wenn die Pathophysiologie des Modells die klinische Situation gut repräsentiert“ (Perel et al. 2007).

Ein Vorteil von Tiermodellen in der Forschung stellt die Standardisierbarkeit der Versuche dar. Diese ermöglicht es dem Untersucher, verschiedene Variablen, deren Einfluss ungewiss oder störend ist, ganz auszuschalten oder kontrolliert zuzulassen.

Ein Problem in der Erforschung der cerebralen Ischämie stellen die oftmals benötigten, frischen Gewebepreparate dar, die direkt post mortem gewonnen und speziell präpariert werden müssen (G.F. Molinari 1976). Nur an ihnen ist eine biochemische, histologische und pathologische Analyse der entstandenen Veränderungen möglich. Sie stehen aus humanem Material allerdings nicht zur Verfügung.

Weiterhin besteht das Problem, dass Patienten nicht unmittelbar (wenige Minuten) nach Eintritt der Ischämie untersucht werden können, da sie oftmals erst viel später eingeliefert werden und eine Entnahme von Gewebeproben beim humanen Schlaganfallpatienten nicht möglich ist. Somit können zeitliche Abläufe im Rahmen eines Schlaganfallgeschehens nicht am Menschen untersucht werden.

Aus diesen Gründen greift die Forschung meist auf Tiermodelle zurück. Nur diese geben dem Forscher die Möglichkeit, den Zeitpunkt der Ischämie genauestens zu terminieren.

Dies wiederum ermöglicht es, Schritt für Schritt, sowohl auf intra-, als auch auf extrazellulärem Niveau alle chemischen Veränderungen zu untersuchen, die im Gehirn nach einer Minderdurchblutung auftreten. Anhand dieser Ergebnisse kann die Entwicklung neuer pharmakologischer Substanzen erfolgen.

Möglich ist das Zurückgreifen auf das Tiermodell aufgrund der der Parallelen in biochemischen, physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen zwischen den verschiedenen Säugetierarten und dem Menschen (Shellshear 1927).

Die experimentelle Neuropathologie geht davon aus, dass induzierte Läsionen, die sowohl histologische als auch klinische Ähnlichkeiten mit den Läsionen des Menschen haben, diese auch im biochemischen und pathophysiologischen Bereich aufweisen.

Um Daten, die im Tiermodell gewonnen werden, auf den Menschen übertragen zu können, muss dieses einige Anforderungen erfüllen. Zuerst muss die produzierte Ischämie der des Menschen ähnlich sein, um eine grundsätzliche Übertragbarkeit zu gewährleisten. Desweiteren müssen die Läsionen in ihrer Größe reproduzierbar sein. Dies impliziert die Forderung nach einer möglichst einfachen Operationstechnik. Nützlich ist weiterhin eine mögliche Anwendung an anderen Spezies, um bei vielversprechenden Resultaten weitere Untersuchungen an phylogenetisch höher stehenden Organismen durchführen zu können.

#### **1.4.1 Nager als Tiermodell**

In den vorhandenen Schlaganfallmodellen wird hauptsächlich auf Nager zurückgegriffen. Diese zeigen bei einer cerebralen Ischämie Resultate, welche mit denen des Menschen vergleichbar sind. (Endres und Dirnagl 2002; Hossmann 2004). Zusätzlich weisen sie einige Vorteile gegenüber höher entwickelten Säugern wie Hunden, Katzen oder Primaten auf:

Da die Tiere durch Inzuchtverfahren innerhalb der einzelnen Stämme genetisch eine hohe Homogenität aufweisen, ist eine größtmögliche Einheitlichkeit gewährleistet.

Der Gebrauch standardisierter Tierstämme ermöglicht den Ausschluss weiterer Risikofaktoren wie Vorerkrankungen, welche sowohl das Ausmaß der Ischämie als auch deren „Outcome“ beeinflussen können (Mhairi Macrae 1992).

Die transgene Technologie ist, vor allem bei der Maus, bereits sehr weit fortgeschritten. Somit stehen dem Untersucher viele Möglichkeiten zur Erforschung von der Rolle einzelner Gene zur Verfügung (Kinouchi et al. 1991; Endres und Moskowitz 1998; Chan 2001; Wang et al. 2008).

Desweiteren entstehen in der Anschaffung deutlich geringere Kosten als dies bei höher entwickelten Säugern der Fall wäre. Weiterhin sind Körpergrößen abhängige Kosten, wie

zum Beispiel die Gewebeaufbereitungen für histologische Techniken, deutlich geringer. Die Bildung großer Versuchsgruppen ist somit erleichtert, was sich wiederum positiv auf die statistische Auswertung auswirkt (Chen et al. 1986).

Durch die geringe Körpergröße der Nager und der damit verbundenen geringeren Größe des Gehirns sind Fixationstechniken des Gewebes schnell und einfach durchführbar, was das Ausmaß postmortalen Veränderungen minimieren kann.

Ein weiterer Grund für den Einsatz von Nagern ist die Tatsache, dass die Forschung an ihnen ethisch besser akzeptiert wird, als dies an typischen Haustieren oder Primaten der Fall wäre (Ginsberg und Busto 1989).

#### 1.4.1 **Probleme/ Grenzen des Tiermodells in der Schlaganfallforschung**

Bei allen Vorteilen, die das Tiermodell zweifelsohne aufweist, gibt es Faktoren, die bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden müssen.

Trotz aller vorhandenen Ähnlichkeit ist eine „eins zu eins Übertragung“ der Ergebnisse im Tiermodell auf den Menschen nicht möglich. Die cerebrale Ischämie stellt einen derart vielschichtigen Prozess dar, dass die Entwicklung eines Modells weit über die Etablierung einer Operationstechnik zum Verschluss einer Cerebralarterie hinaus geht. Viele der humanen Patienten leiden an Krankheiten (zum Beispiel Arteriosklerose, chronische Hypertension oder Diabetes mellitus), oder weisen andere Risikofaktoren (zum Beispiel eine genetische Prädisposition, Rauchen) auf. Diesem Umstand wird im Tiermodell selten Rechnung getragen. Fakt ist, dass die meisten Tiere, die zur experimentellen Ischämieinduktion herangezogen werden, junge, gesunde Tiere sind, die an keiner chronischen Krankheit leiden. Auch wenn bereits Anstrengungen unternommen wurden, Tiermodelle mit Arteriosklerose oder chronischer Hypertonie in die Forschung einzubeziehen (Ogata et al. 1976; Payan und Conrad 1977), können diese Modelle die menschliche Situation nur in begrenztem Maße nachstellen.

Die Ergebnisse eines Schlaganfalltiermodells werden nicht allein von internen Faktoren, dem Tier, beeinflusst, sondern auch von externen, Modell-bedingten Faktoren.

Einigen Anästhetika, die für die Operation benötigt werden, wie zum Beispiel Pentobarbital, wird ein neuroprotektiver Effekt im Tiermodell zugeschrieben (Levine und Sohn 1969; Kahn 1972; Michenfelder und Milde 1975; Lightfoote et al. 1977).

Frühere Veröffentlichungen raten davon ab, Barbiturate zur Anästhesie einzusetzen, da „diese eine wesentliche Verringerung der Inzidenz von Infarkten in verschiedenen Tiermodellen zur Folge haben“ (Lightfoote et al. 1977).

Einige Operationsmethoden zur experimentellen Ischämieinduktion verursachen durch die Vorgehensweise bereits modellspezifische Schäden, die derart beim Menschen im Zusammenhang mit einem Schlaganfall nicht zu finden sind.

Als Beispiel genannt sei hier die Eröffnung des Schädeldaches mit daraus resultierender Traumatisierung und Erwärmung der Schädelknochen und des umliegenden Gewebes. Desweiteren verändert sich durch die Eröffnung des Schädels der intracraniale Blutdruck, dieses Phänomen tritt so beim Menschen nicht auf.

Ein großes Ziel der Schlaganfallforschung ist die Entdeckung und Entwicklung von Substanzen, die prophylaktisch eingesetzt werden können. In diesem Bereich werden häufig Mittel zur Blutdrucksenkung und Gerinnungshemmung eingesetzt. Da eine vollständige Reduktion der Schlaganfälle allein mittels Prophylaxe nicht möglich ist, fokussieren sich neuere Forschungen verstärkt auf neuroprotektive Möglichkeiten. Neuroprotektion wird in diesem Zusammenhang als „Eingreifen, welches nicht pharmakologischer Art sein muss, welches die Infarktgröße vermindern und den Tod peripherer, den Infarkt umgebender Zellen verringern soll“, definiert (Wahlgren und Ahmed 2004).

Frühere Studien zeigen, dass die Penumbra den Bereich mit der größten Hoffnung auf Beeinflussung des Infarktgeschehens und seiner Folgen darstellt. Aufgrund der noch vorhandenen, wenn auch reduzierten Perfusion, geht man davon aus, dass in diesem Gebiet die Neuronen nur geschädigt, nicht aber zerstört werden. Ausgehend hiervon ist die

Penumbra, ihre Größe und Entwicklung nach einem Schlaganfall, sowie die mögliche Beeinflussung durch neuroprotektive Substanzen in den Fokus der Forschung gerückt.

Zum Beweis der Wirksamkeit einer Substanz wird meist eine histologische Auswertung verwendet. Einige Zellen sind in ihrer Morphologie nur schwer voneinander zu unterscheiden, wie zum Beispiel pyramidale Zellen der CA1- von der CA3- Region im Hippocampus, die eine ähnliche Größe besitzen (Woodhams et al. 1993). Eine Unterscheidung der Zellen ist insofern wichtig, da diese Regionen eine wichtige Funktion in Informationsübertragung aus dem Gyrus dentatus und dem Hippocampus besitzen (Scharfman H.E. 2007). Die verschiedenen Zelltypen besitzen unterschiedlich lange post-ischämische Überlebenszeiten, gleichzeitig existiert eine von Zelltyp zu Zelltyp variierende Sensitivität gegenüber ischämischen Schäden (Onodera et al. 1993). Die ehemalige Existenz bereits untergangener Zellen kann nicht nachgewiesen werden (Fukuda et al. 1993). Dies erschwert die quantitative Bestimmung ischämischer Schäden der Neuronen im Nachhinein.

Ein weiterer, wichtiger, in der Histologie aber häufig vernachlässigter Aspekt ist die Verschaltung der beiden Hemisphären. Da viele Neurone, besonders in cortikalen Regionen, ihre Informationen auf die andere Hemisphäre projizieren (Beckstead 1978), kann ein ischämischer Schaden in einer Hemisphäre Einfluss auf die Funktionen der Gegenseite haben. Diese funktionelle Verschaltung wird bei vielen rein histologischen Analysen nicht gemessen.

Ein weiteres Problem in der Erforschung möglicher wirksamer Substanzen stellt der Zeitraum der Studien dar, so ist der Großteil der pharmakologischen Studien am Tiermodell lediglich auf kurzzeitige Effekte ausgerichtet. Häufig werden die Tiere bereits am 7. Tag nach der Ischämieinduktion getötet und die histologischen Veränderungen ausgewertet.

Ein bekanntes Beispiel stellt die Substanz MK- 801, ein NMDA Antagonist, dar. Ihr wurde ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen, nachdem sie 2 Stunden nach einer Okklusion der Arteria cerebri media bei Katzen und 30 Minuten nach einer solchen Okklusion bei Ratten

verabreicht wurde. Da die Tiere bereits 6 Stunden (Katzen), beziehungsweise 3 Stunden (Ratten) nach der Operation getötet wurden, können keine Aussagen über einen langfristigen neuroprotektiven Effekt getroffen werden (Graham, D. et al. 1989). In weiteren Versuchen mit MK- 801 wurde gezeigt, dass der Effekt über einige Tage anhält, ein Effekt über Wochen wurde nicht untersucht (Valtysson et al. 1994). Viele der Substanzen in pharmakologischen Schlaganfallstudien scheinen den Eintritt des Zelltodes nur zu verzögern (Valtysson et al. 1994; Corbett und Nurse 1998). Dies bedeutet, dass Zellen, die 7 Tage nach der Ischämie leben und geschützt erscheinen, 3 Wochen später dennoch sterben können.

Aufgrund von Erfahrungen vorausgehender Studien kann man davon ausgehen, dass ischämische Gewebeschäden im Gehirn erst nach 1-2 Wochen Überlebenszeit stabil bleiben. Somit ist eine definitive Wirksamkeitsstudie aus histologischer, biochemischer und pathophysiologischer Sicht erst nach diesem Zeitraum möglich.

## 1.5 **Die Bedeutung von Verhaltenstests in der Schlaganfallforschung**

Die Tatsache, dass in der humanmedizinischen Klinik das „funktionelle Outcome“ der Patienten den wichtigsten Faktor in der Beurteilung darstellt, zeigt die Notwendigkeit, eine Auswertung von Ischämien nicht allein auf histologische Ergebnisse zu begründen.

Frühere Studien zeigen, dass einige Tiere bei teilweise normaler Histologie starke Beeinträchtigungen im Verhalten sowie eine schlechte funktionelle Regeneration aufweisen. Da der Anspruch besteht, das Tiermodell so relevant wie möglich an die klinischen Gegebenheiten anzupassen, muss dieser Aspekt, der des „funktionellen Outcome“, berücksichtigt werden (Hunter et al. 1995; Corbett und Nurse 1998).

Bei der Wichtigkeit des Wiedererlangens der motorischen und cerebralen Funktionen für den Patienten und den oben aufgeführten Problemen bei einer alleinigen histologischen

Einschätzung ist es sinnvoll, im Tiermodell zusätzlich Verhaltenstests einzuführen (Smith et al. 1997). Da Verhaltenstests sehr zeitintensiv sind, werden sie meist nicht routinemäßig eingesetzt. Dennoch sind sie gerade für den klinischen Aspekt von großem Interesse. Sie ermöglichen es, die potentielle Verbesserung der klinischen und funktionellen Regeneration eines Stoffes (=Neuroprotektion) zu erkennen und zu beurteilen. Die Einschätzung des neurologischen Status der Tiere stellt den Untersucher vor einige Herausforderungen. Mäuse verfügen über ein reiches Spektrum an Ausdrucksmöglichkeiten. Die Körpersprache äußert sich teilweise sehr differenziert und subtil. Gleichzeitig findet ein Teil der Vokalisation im für den Menschen nicht wahrnehmbaren Ultraschallbereich statt. Diese Faktoren erschweren dem Untersucher die Interpretation der Auswirkungen einer Behandlung.

Durch diese Faktoren ergibt sich die Notwendigkeit zur Objektivierung des Verhaltens der Tiere, soweit dies möglich ist. Hierzu erweist es sich als praktikabler, die Tiere spezifischen Tests zu unterziehen, als sie nur in ihrer gewohnten Umgebung zu beobachten (Cowey und Bozek 1974).

Je nach überprüfter cerebraler Funktion werden Verhaltenstests unterteilt in sensorische, motorische und kognitive Tests. Für jeden dieser Bereiche existieren mehrere Testverfahren. Um alle Veränderungen zu überprüfen, ist der Aufbau einer Testbatterie nötig (Gladstone et al. 2002).

Nager weisen ein hohes Maß an spontaner funktioneller Regeneration auf (DeVries et al. 2001). Deswegen werden an einen Verhaltenstest große Anforderungen gestellt. Einerseits muss er Veränderungen direkt post operationem zuverlässig anzeigen, andererseits in der Lage sein, Aussagen über ein „Langzeit Outcome“ zu treffen. Zusätzlich ist es wichtig, anhand des Tests sicher zwischen MCAO und Schein operierten Tieren unterscheiden zu können. Die frühzeitig durchgeführten Verhaltenstests und deren Ergebnisse weisen eine hohe Aussagefähigkeit in Bezug auf die spätere Funktionsfähigkeit auf (Corbett und Nurse 1998).

Trotz aller Vorteile und Verbesserungen in der Auswertung, die sich durch Verhaltenstests ergeben, bleibt eine differenzierte Betrachtung notwendig.

Eine 1992 durchgeführte Studie zeigt, dass sich das Verhalten bereits wenige Wochen nach der Operation dem vor dem Eingriff gezeigten angleicht. Eine Apoptose der cerebralen Neuronen ist zu diesem Zeitpunkt immer noch möglich.

Die Interpretation der Ergebnisse wird zum Einen durch die Apoptose, zum Anderen durch die Frage, wie wichtig der Zusammenhang zwischen dem Zelluntergang und der Zerstörung bestimmter cerebraler Regionen ist (Corbett et al. 1992), als auch der Plastizität des Gehirnes erschwert.

## 1.6 **Vorgehen/ Ziel dieser Studie**

Ziel dieser Studie ist es, die Erforschung von Substanzen, die in der Therapie einer cerebralen Ischämie eingesetzt werden können, zu vereinfachen.

Da „die vorklinische Evaluierung therapeutischer Effekte, die einzig auf Messung der frühen Infarktgrößen beruhen, nicht länger adäquat sind“ (Gladstone et al. 2002), wird in dieser Studie die histologische Messung des Infarktes um einige Verhaltenstests erweitert.

Gewünscht ist es, Verhaltenstests zu etablieren, die eine zuverlässige Erfassung des neurologischen Defizites, auch über längere Zeiträume zulassen. Weiterhin sollen die Ergebnisse dieser Tests deutlich mit der Infarktgröße und den betroffenen Gehirnebenen korrelieren.

## 2 Material und Methoden

Die Tierversuche wurden unter dem Aktenzeichen 35-9185.81/G-88/07 genehmigt.

Verwendet wurden 81 männliche, genetisch nicht veränderte, C57bl/6 Mäuse (Mus musculus, Firma Charles River) im Alter von 10 Wochen. Die Haltung der Tiere erfolgte standardisiert im Einzelkäfig bei 20°C (+/-1°C) Raumtemperatur und einem 12 h Hell-Dunkel-Zyklus. Die Käfige waren normierte Standardkäfige mit Futterpellets und Wasser ad libitum, Späne als Einstreu, sowie, zusätzlich pro Tier, 2 Kleenextücher und 1 Toilettenpapierrolle zum „Environmental Enrichment“.

Die Tiere wurden in 4 Gruppen unterteilt:

n1 = linksseitige dMCAO = 22 Tiere

n2 = linksseitige Scheinoperation = 21 Tiere

n3 = rechtsseitige dMCAO = 22 Tiere

n4 = rechtsseitige Scheinoperation = 16 Tiere

### 2.1 Durchführung der dMCAO (= distal middle cerebral artery occlusion)

Jede Maus wurde vor der Operation gewogen. Die Anästhesie erfolgte mittels 2,5%iger Avertinlösung (siehe Anhang; 25 µl/g KG intra peritoneal). Die Lagerung erfolgte in Seitenlage. Die Maus wurde mittels Pflasterstreifen auf einer Wärmeplatte unter dem Operationsmikroskop (Typ SM33, Firma Hund Wetzlar) fixiert.

Ein, mit der Wärmeplatte verbundenes, Rektalthermostat (beides Typ FLQ 150, Firma Hund Wetzlar) wurde rektal eingeführt, um die Körperinnentemperatur bei konstanten 37 °C zu halten. Die Augen wurden mittels Bepanten® Augensalbe vor Austrocknung geschützt. Aufgrund der geringen Körpergröße, wurde auf eine weitere chirurgische Vorbereitung des OP-Feldes durch Rasur verzichtet. Das Fell wurde stattdessen mittels Kodan® Tinktur forte gereinigt.

Ein Hautschnitt wurde hinter dem Auge, etwa auf halber Höhe zwischen Auge und Ohrgrund, geführt. Anschließend wurde der Musculus temporalis mittels Elektrokoagulation (Modell ICC 50 der Firma Erbe) vom Ansatz bis zum Ursprung hin entfernt. Mit Hilfe einer elektrischen Fräse (Modell Micromat 50/E der Firma Proxxon) wurde das Schädeldach kreisförmig eröffnet, so dass das darunterliegende Gehirn frei lag. Mittels des Koagulators wurde nun die Arteria cerebri media an 3 Stellen (ihre Basis und die daraus abzweigenden 2 Äste) weitestmöglich distal koagulierte. Die Kopfhaut der Maus wurde chirurgisch mittels Einzelheften vernäht (Nahtmaterial Polyester 1,5 metric, Firma Resorba®). Anschließend wurde das Tier in seinem Käfig für etwa 2 Stunden unter einer Wärmelampe gelagert.

Das Vorgehen in den Schein operierten Gruppen erfolgte in der gleichen Art und Weise. Der Unterschied bestand im Unterlassen der Koagulation der Arteria cerebri media.

## 2.2 Verhaltenstests

Jedes Tier wurde vor und nach der Operation verschiedenen Verhaltenstests unterzogen um motorische und sensomotorische Fähigkeiten, sowie die Körperkraft und das Allgemeinbefinden zu überprüfen.

	ante	1. d	2. d	7. d	8. d	9. d	14. d	15. d	16. d	21. d	22. d	Perfusion
Corner	X	X			X				X		X	
Gang	X	X			X				X		X	
Zylinder	X	X		X			X				X	
Chimney	X		X		X		X				X	
Hanging wire	X		X			X					X	
Händigkeit	X		X			X			X			
Latency to move	X	X	X		X		X				X	

Abbildung 3: Zeittafel Verhaltenstests

## 2.3 Durchführung der Verhaltenstests

Die Tests wurden nach einem festen Zeitplan im Verhaltensraum durchgeführt. Dessen Fenster wurden mit lichtundurchlässiger Folie abgeklebt. Dadurch konnten Umwelteinflüsse wie Wetter und Licht eliminiert werden.

Die Reihenfolge der Tiere und Tests veränderte sich nicht. Die Tageszeit des Testens pro Tier blieb gleich (+/- 1 Stunde), so dass tageszeitliche Einflüsse auf das Verhalten minimiert werden konnten.

Die testende Person war bezüglich der Operationsgruppen geblindet, zusätzlich wurde die Apparatur vor jeder Maus zur Geruchsneutralisation mittels 1%iger Ethanolösung gereinigt. Der Untersucher trug einen weißen Kittel, am Testtag wurde kein Parfum aufgetragen. Über jeden Verhaltenstest wurde Protokoll geführt.

### 2.3.1 Chimney Test

Der Chimney Test diente der Überprüfung der motorischen Koordination der Tiere. Für diesen Test wurde ein durchsichtiger, horizontaler Glaszylinder mit 3 cm Durchmesser und 25 cm Länge verwendet, der bei 20 cm Länge markiert war (Heinecke 1987). Die Röhre wurde waagrecht gehalten und die Maus darin platziert, so dass sie zum Ende des Zylinders lief. Sobald sie mit der Nase das Ende erreichte (=0 cm Marke), wurde der Zylinder in vertikale Stellung gebracht, so dass die Maus mit dem Kopf nach unten stand. Gemessen wurde die Zeit, die von den Mäusen benötigt wurde, um rückwärtslaufend die 20 cm –Marke zu erreichen. Die maximal gemessene Zeit betrug 90s, danach wurde der Versuch abgebrochen.

### 2.3.2 Corner Test

Zur Testung sensomotorischer Funktionen und Defizite stand mit dem Corner Test ein etablierter Versuch zur Verfügung, der bereits vielfach angewendet wurde (Li Zhang et al. 2002; Xiaoling Li 2004; Bouet et al. 2007). Er wurde 1982 von Schallert et al. für Ratten entwickelt, und 2002 von Zhang für Versuche an Mäusen adaptiert (Schallert et al. 1982; Li Zhang et al. 2002), und diente der Entdeckung von sensomotorischen- und Haltungs-Asymmetrien. Die Apparatur (Abb. 4), angefertigt in der Werkstatt der Universität Heidelberg, stellt eine Ecke dar. Diese wurde gefertigt aus zwei Platten (30 x 20 x 1 cm), die an einer Seite mit einem Winkel von 30° aneinander gefügt wurden. Ein schmaler Schlitz zwischen den Platten ermunterte die Mäuse dazu, den Winkel zu betreten. Die Tiere wurden mit dem Kopf voran vor den Winkel gesetzt. Aufgrund ihrer Vorliebe für geschützte Stellen liefen sie in Richtung der Ecke. Ab einer bestimmten Enge wurden die Vibrissae auf beiden Seiten gereizt, was ein Aufstellen auf die Hinterhand und eine Drehung um 180° bewirkte (Abb. 5). Gezählt wurden nur solche Drehungen, die aus einer vollen Aufrichtung heraus entstanden. Pro Tier und Tag wurden 12 dieser Drehungen gezählt. Aus diesem Ergebnis wurde der Lateralitätsindex als Bewertungsgrundlage wie folgt errechnet:

$$LI = \frac{\text{(Drehung zur Infarktseite – Drehung zur Nicht-Infarktseite)}}{\text{(Summe aller Drehungen)}}$$

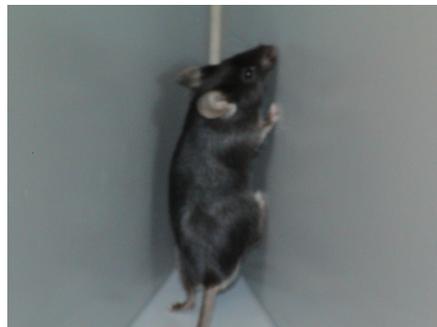
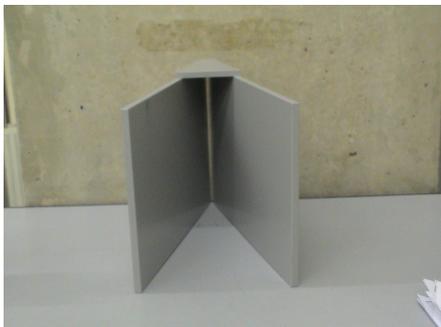


Abbildung 4: Corner Test Apparatur

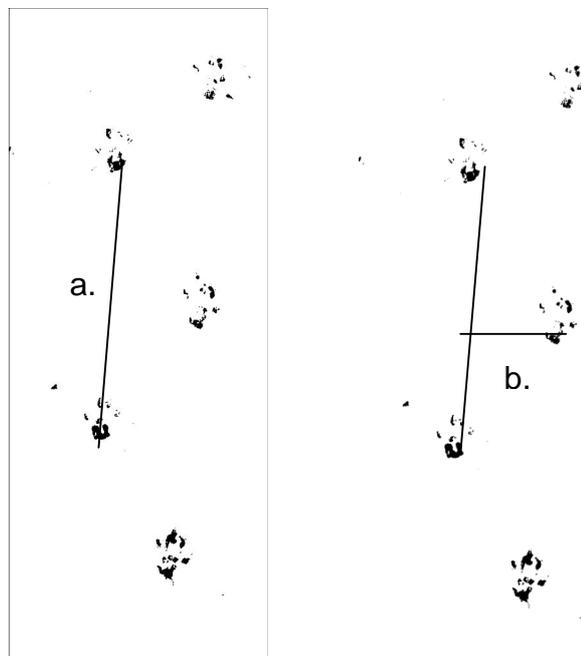
Abbildung 5: Volles Aufrichten einer Maus

### 2.3.3 Ganganalyse

Eine Analyse des Ganges diente der Kontrolle motorischer Funktionen der Tiere. Verwendet wurden hierfür nicht alle Mäuse, da parallel ein Versuch mit computergestützter Ganganalyse erfolgte. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug somit:

$$n1=7 \quad n2=8 \quad n3=8 \quad n4=8$$

Den Mäusen wurden die Vorderpfoten mit nichttoxischer Tinte (Fingermalfarbe für Kinder, Firma Engelhard, Farbe blau) bemalt. Danach wurden sie vor einen 30 cm langen und 10 cm breiten, nicht einsehbaren Tunnel (angefertigt in der Werkstatt der Universität Heidelberg) gesetzt, dessen Boden mit Papier ausgelegt war. Am Ende des Tunnels lag ein Futterpellet als Lockmittel. Beim Durchqueren des Tunnels hinterließen die Mäuse Farbabdrücke auf dem Papier. Die Auswertung fand nach Jaworski statt (Jaworski et al. 2006). Ausgewertet wurden 3-4 Schritte je Seite nach ihrer Schrittlänge, ihrer Variation der Schrittlänge und der Breite der Schrittbasis, ausgehend vom Mittelpunkt des jeweiligen Pfotenabdruckes (Abb. 6).



**Abbildung 6: Auswertung Ganganalyse:** wobei a.) die Messung der Schrittlänge links und b.) die Breite der Schrittbasis anzeigt. Das Errechnen der Schrittlängenvarianz geschah als längster Schritt einer Seite minus den kürzesten Schritt. Ausgewertet wurden je Seite 3-4 Schritte.

### 2.3.4 Händigkeit

Die Händigkeit wurde mittels Collins Protokoll in der Collins Apparatur getestet und dient der Überprüfung von Verhaltensasymmetrien (Collins 1968, 1969). Die Collins-Apparatur (Abb. 7) bestand aus einem transparenten Plastik Käfig mit einer Größe von 10,5 x 6 x 6 cm. An einer Seite befand sich mittig eine Öffnung mit 0,9 cm Durchmesser, so dass das Tier diese nur mit einer Pfote passieren konnte. Hinter dieser Öffnung war eine Ablage montiert, auf die das Futter gelegt wurde.

Vor Beginn des Versuches wurden die Mäuse 1 Woche lang an das für diesen Versuch verwendete Futter (Bioserv Dustless Pellets Size 2), durch tägliche Zugabe zum normalen Futter, gewöhnt. Die Pellets wurden so vor die Öffnung gelegt, dass sie nur mittels einer Pfote und nicht mit dem Maul oder der Zunge erreichbar waren. Die Maus wurde nach 12 Stunden Futterentzug in die Apparatur gesetzt, beobachtet wurden 20 Greifversuche. Mäuse, die den Versuch nicht innerhalb von 20 Minuten begannen, wurden eine Stunde später erneut getestet.

Zur Analyse wurde ein Händigkeitsindex erstellt. Er errechnete sich folgendermaßen:

$$\text{HI} = \frac{(\text{Greifen mit Pfote der Infarktseite} - \text{Greifen mit Pfote der Nicht-Infarktseite})}{(\text{Gesamtzahl der gewerteten Greifversuche})}$$



Abbildung 7: Collins Apparatur

### 2.3.5 Hanging Wire

Zum objektiven Beurteilen der Körperkraft wurde der Hanging Wire Test entwickelt. Hierbei wurden die Mäuse auf einem Käfigdeckel platziert und in 60 cm Höhe über den mittels Holzspänen weich gepolsterten Käfigboden gehalten. Der Käfigdeckel wurde um 180° gedreht, so dass die Tiere sich an ihm festhalten mussten, um nicht hinabzustürzen. Gemessen wurde die Zeit vom Umdrehen des Deckels bis zum Loslassen und Abstürzen der Maus, die Höchstzeit betrug hier 120s. Benötigte das Tier länger zur Durchführung wurde der Versuch abgebrochen.

### 2.3.6 Latency to move

Dieser Test diente der Überprüfung des Allgemeinbefindens, gemessen an der Bewegungsbereitschaft (Lauffreudigkeit) der Mäuse. Da dieser Versuch in einer späteren Versuchsgruppe in die Testreihe aufgenommen wurde, waren die Gruppengrößen kleiner, als bei den übrigen Verhaltenstests.

Sie betrug:            n1= 10            n2= 7            n3= 9            n4= 6

Die Tiere wurden auf eine Platte gesetzt. Auf dieser waren zwei Kreise gezeichnet. Der innere Kreis hatte einen Durchmesser von der durchschnittlichen Körperlänge einer Maus (= 7cm), der äußere Kreis entsprach im Durchmesser der zweifachen durchschnittlichen Körperlänge (= 14cm). Die Maus wurde am Schwanz gehalten und in die Mitte des inneren Kreises gesetzt. Gleichzeitig mit dem Loslassen wurde die Stoppuhr gestartet. Gemessen wurde die Zeit, die das Tier benötigte, um den äußeren Kreis mit dem gesamten Körper zu übertreten.

### 2.3.7 Zylindertest

Der Zylindertest wurde von Schallert entwickelt, um eventuelle Asymmetrien der Tiere während der Umgebungserkundung zu untersuchen (Schallert et al. 1982).

Zur Durchführung wurden die Tiere in einen durchsichtigen, 15 cm hohen und 9 cm Durchmesser messenden Zylinder (Abb. 8), hergestellt in der Glasbläserei der Universität Heidelberg, gesetzt. Beurteilt wurde die Berührung der Zylinderwand, mit den Vordergliedmaßen, nach einem vollen Aufrichten. Angewendet wurde das folgende Beurteilungsschema:



**Abbildung 8: Zylinder Test**

- 1.) Der erste Vordergliedmaßenkontakt mit der Wand während eines vollen Aufrichtens, wurde als unabhängige Wandberührung des jeweiligen Beines gezählt.
- 2.) Gleichzeitiges Berühren der Wand mit dem rechten und linken Vorderbein und für Seitwärtsbewegungen an der Wand wurden als beiderseitige Bewegung gezählt.
- 3.) Nachdem das 1. Vorderbein die Wand berührte und dann gleich das 2., ohne dass das 1. Bein die Wand losließ, wurden sowohl das 1. Bein, als unabhängige Wand-Bewegung, als auch eine beidseitige Bewegung gezählt.
- 4.) Eine Seitliche Bewegung mit beiden Beinen an der Wand entlang wurden als beidseitige Bewegung gezählt.

Insgesamt wurden 20 Bewegungen gewertet und daraus ein Index errechnet.

$$\text{ZI} = \frac{(\text{Kontakt Infarktseite} - \text{Kontakt Nicht-Infarktseite})}{(\text{Gesamtzahl der gewerteten Kontakte})}$$

### 2.3.8 Messung Körpergewicht

Zusätzlich zu den Verhaltenstests wurden die Tiere vor und an verschiedenen Tagen nach der OP gewogen (Abb. 9). Dies erlaubte Aussage über das Fressverhalten und somit über das Allgemeinbefinden der Maus.

	Tag				
Messung Körpergewicht	Vor OP	Tag 1	Tag 8	Tag 15	Tag 23

**Abbildung 9: Zeittafel Messung Körpergewicht**

### 2.3.9 Corner Test im linksseitigen Fadenmodell

Zur Kontrolle des Einflusses der Operationsmethode auf das Verhalten der Mäuse wurde mit 8 männlichen, genetisch unveränderte C57bl/6 Mäusen (Firma Charles River) eine zweiter Versuch durchgeführt. Diese Mäuse waren im gleichen Alter und wurden unter denselben Haltungsbedingungen gehalten, wie die Tiere der parallelen Versuchsreihe.

Die Operation wurde von einem Kollegen durchgeführt, der bereits einige Forschungen mit Mäusen und Ratten, die er dieser Operationsmethode unterzog, durchführte.

Dieser Eingriff stellt ein transientes Modell dar. Die Mäuse wurden mittels Isofluran anästhesiert, die linksseitige Arteria carotidea wurde über einen Hautschnitt in der linken Halsseite freipräpariert und anschließend über den Zeitraum von 60 Minuten mittels eines speziellen Fadens (Firma Docoll) ligiert. Nach Ablauf der 60 Minuten wurde die Ligatur entfernt und die Hautwunde mittels chirurgischen Einzelheften verschlossen.

Die Durchführung und Auswertung des Corner Tests erfolgte nach dem bereits beschriebenen Protokoll.

## 2.4 Perfusion

Am 23. Tag nach der Operation wurden die Mäuse nach dem abschließenden Test erneut, mittels 2,5%iger Avertinlösung (25µl/g KG intra peritoneal, siehe Anhang), narkotisiert und anschließend mittels kardialer Perfusion mit 30 ml Ringer- Laktat- Lösung getötet. Hierzu wurden sie auf dem Rücken fixiert und das Sternum eröffnet. Das rechte Atrium wurde eröffnet und 30 ml einer sterilen Ringer-Laktat-Lösung wurden mit Hilfe einer Butterfly-Kanüle in den linken Vorhof mit stetigem Druck injiziert, um eine ausreichende Perfusion zu gewährleisten. Die Mäuse wurden sofort dekapitiert, anschließend der Schädel mittels Schere eröffnet und das Gehirn ohne Beschädigung entnommen.

Das Gehirn wurde direkt nach der Entnahme für 2-3 Minuten zum Schockfrostern auf Trockeneis gelegt, danach erfolgte die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5 Anfertigen der histologischen Schnitte

Das tiefgefrorene Gehirn wurde mittels Kältemikrotom (Modell CM 3050S der Firma Leica) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in 20 µm dicke Schnitte im Abstand von 400 µm geschnitten. Je Schnittstelle wurden Triplettsere angefertigt, diese wurden auf Objektträgern (Superior der Firma Marienfeld Laboratory Glasware) in ein Gefriermedium (Tissue Freezing Medium<sup>®</sup> der Firma Jung) eingebettet.

Die entstandenen Präparate wurden anschließend luftgetrocknet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.6 Silberfärbung

Jeweils 1 Schnitt pro Ebene wurde nach folgendem Schema gefärbt:

Die Schnitte wurden für 4 Minuten auf einem Schüttler in der Imprägnierlösung (siehe Anhang) inkubiert. Danach wurden sie 6 x für je eine Minute in Wasser gewaschen. Als nächstes wurden sie auf dem Schüttler für 4 Minuten in der Entwicklerlösung (siehe Anhang)

inkubiert und danach 3 x für je eine Minute in Wasser gewaschen. Anschließend trockneten die gefärbten Schnitte über Nacht.

## 2.7 Einscannen/ Infarktmessung

Die gefärbten und getrockneten Schnitte wurden mittels HP Precision scan bei 300 dpi und 150% Größe eingescannt als Grauskala und anschließend als tif-Datei gespeichert. Die Auswertung erfolgte mittels ScionImage. Die Einstellungen im ScionImage waren folgendermaßen gewählt: Skalierung in mm, gemessene Distanz: 594 Pixel, bekannte Strecke: 50, Pixel-Blickpunkt-Verhältnis: 1000, Einheit in mm und Gradeinteilung mit 11.880 Pixel pro mm.

Zur Feststellung der Infarktgröße wurde folgende Formel verwendet (Abb.10):

$$(\text{Größe der Nicht-Infarkt-Hemisphäre}) - (\text{Größe der Infarkt-Hemisphäre}) = \text{Infarktgröße}$$

Des Weiteren wurde jeweils der gefärbte Koronalschnitt verwendet, um eine Kartierung der Infarkthäufigkeiten vorzunehmen. Diese diente der Charakterisierung der am Häufigsten von einer dMCAO betroffenen Hirnareale.



**Abbildung 10: Silber gefärbter Schnitt, Tag 23:** Nach der Perfusion wurde je ein Schnitt (20 µm) der Triplettsreihe Silber gefärbt und eingescannt. Die Größe des Infarktes wurde mit der Formel ((Größe der Nicht-Infarkt-Hemisphäre) – (Größe der Infarkt-Hemisphäre) = Infarktgröße) berechnet

## 2.8 Kartierung der Infarkthäufigkeiten

### 2.8.1 Koronarschnitt:

Um eine Häufigkeitskartierung der Infarkte an Tag 2 nach der MCAO erstellen zu können, wurden Schnitte einer anderen Versuchsreihe, bei der die Tiere an Tag 2 nach der Operation perfundiert wurden, verwendet. Bei den verwendeten 19 Tieren handelte es sich um männliche C57bl/6 Mäuse im Alter von 10 Wochen, die ebenfalls genetisch unverändert waren. Die Haltung, die Operation und die histologische Auswertung erfolgten wie bereits beschrieben. Im Gegensatz zur oben genannten Versuchsreihe bekamen die Tiere kein „Environmental Enrichment“.

Es wurde pro Gehirn der sichtbare Infarkt (= Silberdefizit) im Programm PhotoShop farblich umrahmt. Dieser farblich markierte Schnitt wurde der Größe des eingescannten Koronalschnittes aus dem „Mouse brain atlas“ (Franklin 1997) angepasst. Anschließend wurden die umrahmten Areale mit denen des Buches verglichen und im Protokoll notiert, welches Areal im jeweiligen Gehirn betroffen war.

Zum Schluss wurde die Abbildung aus dem Brain Atlas folgendermaßen eingefärbt:

Areal bei über 17 Mäusen betroffen	
Areal bei 14 -16 Mäusen betroffen	
Areal bei 11 -13 Mäusen betroffen	
Areal bei 9 -10 Mäusen betroffen	
Areal bei 6 - 8 Mäusen betroffen	
Areal bei 1 - 5 Mäusen betroffen	

Abbildung 112: Farbgebung Infarkt Kartierung

### 2.8.2 Kartierung laterale Ansicht

Die gefärbten und gescannten Schnitte der Gehirne wurden ausgedruckt und die Infarkte per Hand vermessen. Gemessen wurden bei jedem Schnitt der Abstand des Infarktes von einer gezeichneten Querlinie über den dorsalen Rand des Gehirns und die Länge des Infarktes. Anschließend wurde eine Lateralansicht eines Mäusegehirnes auf die gleiche Größe (150% der natürlichen Größe) der gescannten Gehirne gebracht und ausgedruckt. Die Messergebnisse wurden nun per Hand in das Bild eingetragen und verbunden. Das entstandene Bild wurde wiederum eingescannt.

Die Farbgebung erfolgte wie bei der Kartierung der Koronalschnitte (Abb. 11).

### 2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm SigmaStat Version 2.0.

Die Graphen wurden mittels Sigma Plot Version 8.0 erstellt. Für jede Gruppe wurde getestet, ob eine Normalverteilung der Daten vorliegt. War dies der Fall, wurden ONE WAY REPEATED MEASURES ANOVA durchgeführt.

Waren die vorhandenen Daten nicht normalverteilt, wurden FRIEDMAN REPEATED MEASURES ANOVA ON RANKS durchgeführt. Als Post-hoc Test wurde der Dunnet Test gewählt.  $P < 0.05$  galt als statistisch signifikant.

### 3 Ergebnisse

Von den 81 verwendeten Tieren verstarben 10 Tiere nach der Operation, ihre Ergebnisse wurden nicht gewertet. Ein Tier erlitt nach der Operation während der Verhaltenstests epileptiforme Anfälle und wurde von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Bei 7 Tieren kam es nach dem Eingriff zu Schädigungen des Auges der Operationsseite, ihre Ergebnisse wurden nicht in die Statistik einbezogen. 5 Tiere wiesen bereits vor der Operation keine Vibrissae auf, wahrscheinlich aufgrund von Benagen während der Gruppenhaltung vor Beginn der Versuche. Diese Tiere wurden ebenfalls von der Versuchsreihe ausgeschlossen, so dass die Gruppen folgende Größe besaßen:

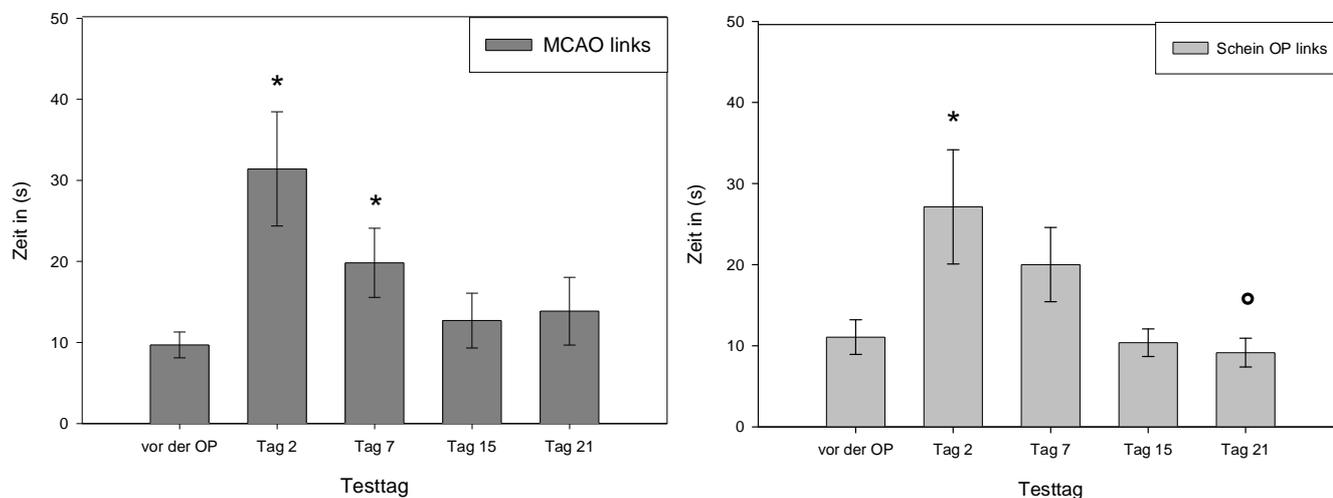
n 1 = 17 Tiere      n 2 = 16 Tiere      n 3 = 14 Tiere      n 4 = 11 Tiere

#### 3.1 Chimney Test

##### 3.1.1 Linksseitig operierte Tiere

Die Auswertung der Ergebnisse des Chimney Tests der linksseitig operierten Gruppen erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/61) = 7,794$ ,  $p < 0,001$ . Die ANOVA Ergebnisse der Scheinoperationsgruppe ergaben sich als  $F(4/57) = 4,569$ ,  $p = 0,003$ . Der Dunn's Test zeigte, dass die Mäuse beider Gruppe (Abb. 12) am ersten Testtag nach dem Eingriff im Schnitt etwa doppelt so lange zur Durchführung des Versuchs benötigten, wie vor der Operation (MCAO-Gruppe:  $p < 0,05$ , Scheinoperationsgruppe:  $p < 0,05$ ). Die benötigte Zeit sank ab Tag 2 wieder, um ab Tag 15 fast das Niveau vor der Operation zu erreichen. Während die Tiere der Scheinoperations-Gruppe die durchschnittliche Zeit vor der OP erreichten, schafften dies die Mäuse der MCAO-Gruppe nicht. Am 7. Tag nach der Operation benötigten lediglich die Tiere der linksseitige MCAO-

Gruppe signifikant länger um den Versuch zu absolvieren ( $p=0,049$ ). An Tag 21 wiesen die Schein operierten Tieren Signifikanzen in der benötigten Zeit zu Tag 7 ( $p<0,04$ ) auf.

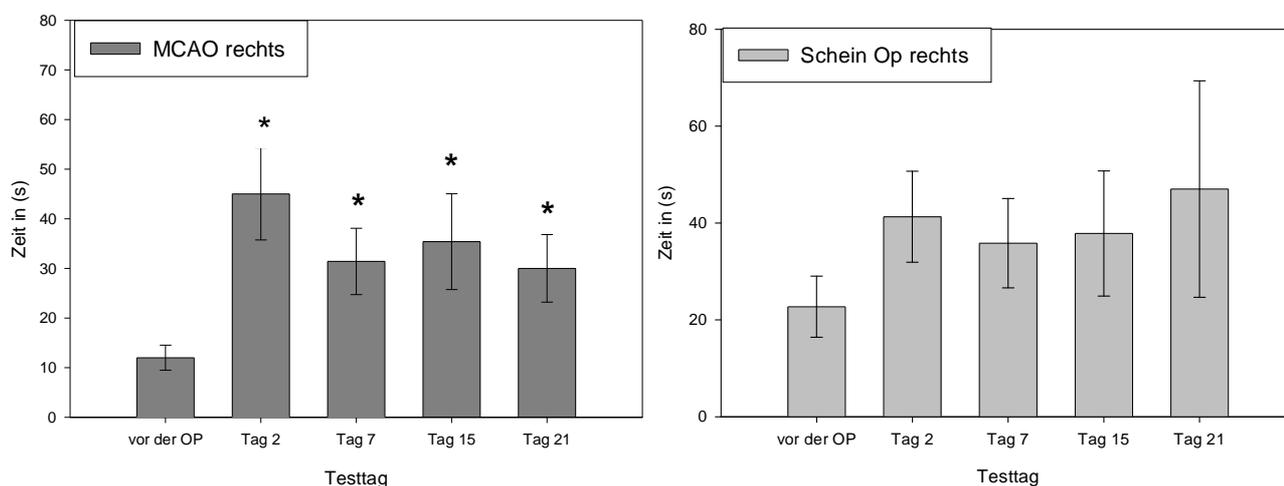


**Abbildung 12: Chimney Test linksseitig operierter Gruppen:** Die Tiere wurden in einen 25cm langen, horizontal gelagerten Glaszylinder gesetzt, der bei Erreichen der linken Seite in die Vertikale gebracht wurde. Gezählt wurde die Zeit, die die Mäuse benötigten, um rückwärtskletternd die 20-cm Marke zu erreichen. Hierbei ist  $*p<0,05$  zu Vor der OP (Dunn's Test). Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag steht für den Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.1.2 Rechtsseitig operierte Tiere

Die Auswertung der Ergebnisse des Chimney Tests der rechtsseitig operierten Gruppen erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunnet Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/38)=8,119$ ,  $p<0,001$ . Die Scheinoperations Gruppe zeigte im ANOVA folgende Ergebnisse:  $F(4/31)=1,165$ ,  $p=0,345$  (Abb. 13). Insgesamt benötigten die Tiere dieser beiden Gruppen am 2. Tag nach dem Eingriff deutlich länger zur Versuchsdurchführung, allerdings war dieser Unterschied nur bei den MCAO- Tieren statistisch signifikant ( $p<0,05$ ). Der Rückgang der benötigten Zeit fand bei den MCAO- Tieren stärker statt, erreichte allerdings nicht das Niveau vor dem Eingriff. Auch am Tag 21 nach dem Eingriff wurde die durchschnittliche Ausgangszeit von keiner der beiden Gruppen erreicht. Statistisch signifikante Unterschiede

bestanden in der MCAO-Gruppe an jedem Tag in Bezug auf die benötigte Zeit vor dem Eingriff (Tag 7 zu Vor der OP:  $p < 0,05$ , Tag 15 zu Vor der OP:  $p = 0,0078$ , Tag 21 zu Vor der OP:  $p = 0,008$ ).



**Abbildung 3: Chimney Test rechtsseitig operierter Gruppen:** Die Tiere wurden in einen 25cm langen, horizontal gelagerten Glaszylinder gesetzt, der bei Erreichen der linken Seite in die Vertikale gebracht wurde. Gezählt wurde die Zeit die die Mäuse benötigten, um rückwärtskletternd die 20-cm Marke zu erreichen. Hierbei ist \* $p < 0,05$  zu Vor der OP (Dunn's Test). Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag steht für den Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

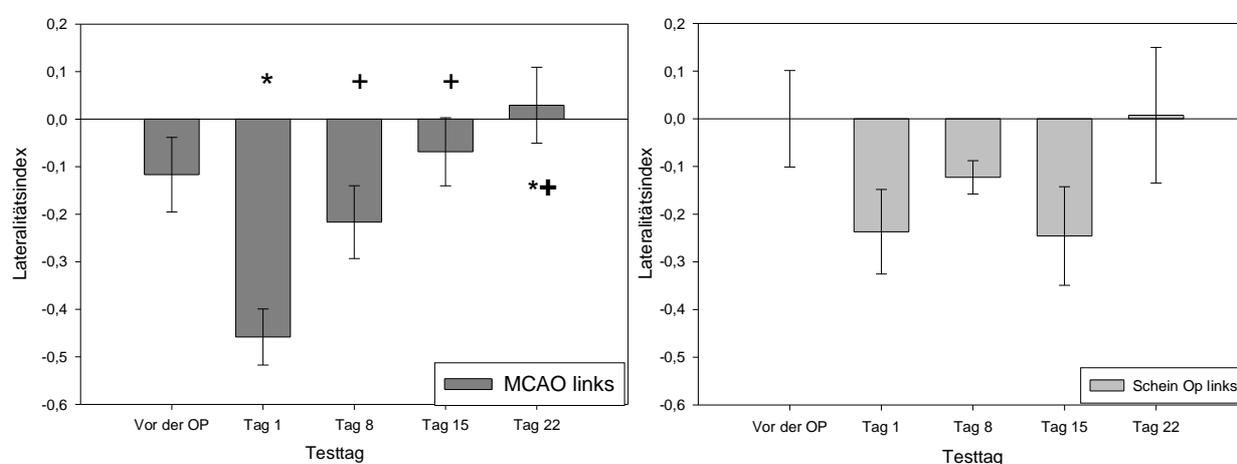
## 3.2 Corner Test

### 3.2.1 Linksseitig operierte Tiere

Die Auswertung der Daten linksseitig operierter Mäuse erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/70) = 1,015$ ,  $p < 0,001$ . Der ANOVA der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als  $F(4/66) = 1,616$ ,  $p = 0,181$  (Abb. 14).

In diesem Versuch wiesen die linksseitig operierten Gruppen eine deutliche Veränderung im Lateralitätsindex an Tag 1 nach dem Eingriff auf. Die Tiere drehten sich vermehrt zur kontralateralen Seite hin. Diese Tendenz wurde im zeitlichen Verlauf der beiden Gruppen abgeschwächt und erreichte am 15. Tag bei den MCAO-Tieren den Ausgangswert.

Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich bei den MCAO-Tieren im Vergleich von Tag 1 und vor der Operation ( $p= 0,017$ ). Weitere statistisch signifikante Unterschiede bestanden bei den Tieren der MCAO-Gruppe zwischen Tag 1 und Tag 8 ( $p= 0,017$ ), sowie zwischen Tag 1 und Tag 15 ( $p< 0,001$ ). An Tag 22 wiesen die MCAO-Tiere statistisch signifikante Unterschiede sowohl zu Vor der Operation ( $p= 0,033$ ), als auch zu Tag 1 ( $p< 0,001$ ) auf. Die Scheinoperations-Tiere ähnelten in ihren Veränderungen dem zeitlichen Verlauf der MCAO-Tiere, allerdings unterbrochen durch Tag 15 bestanden hier keinerlei statistische Signifikanzen.

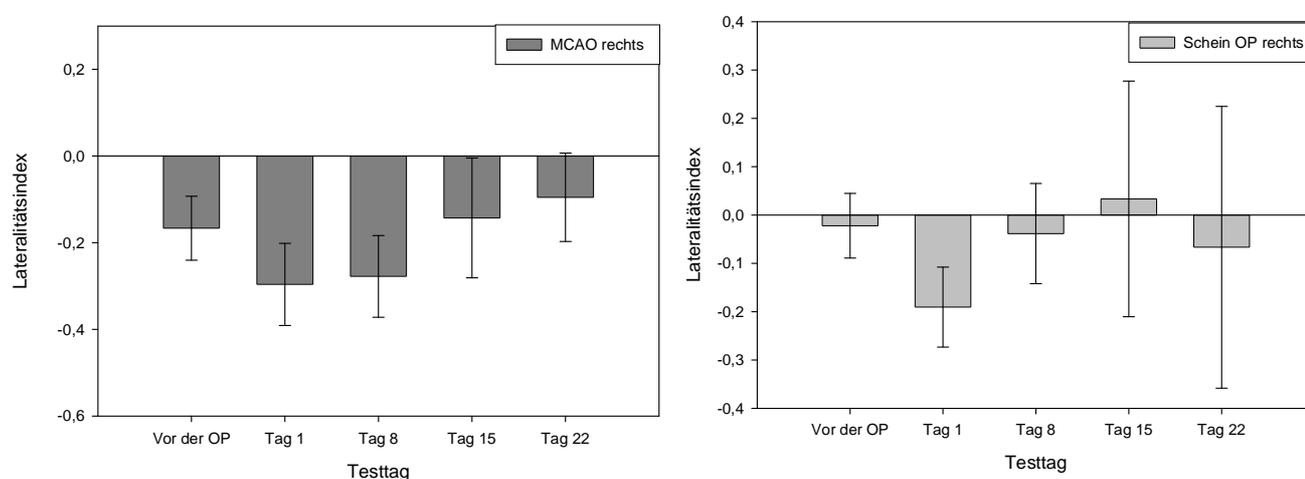


**Abbildung 4: Corner Test linksseitig operierte Gruppen:** Die Tiere wurden vor einen 30° Winkel gesetzt, in den sie hineinliefen. In der Ecke richteten sie sich auf die Hinterhand auf und drehten sich um ihre eigene Achse. Gewertet wurden Drehungen nach einem vollen Aufrichten auf die Hinterhand. Dargestellt ist der errechnete Lateralitätsindex. \* $p<0,05$  zu Vor der OP, + $p<0,05$  zu Tag 1  
Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag steht für den Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.2.2 Rechtsseitig operierte Tiere

Die Auswertung der Daten der rechtsseitigen Operationsgruppen erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/45) = 3,305$ ,  $p = 0,019$ . Der ANOVA der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als  $F(4/30) = 1,350$ ,  $p = 0,274$  (Abb. 15).

Insgesamt wiesen die rechtsseitig operierten Tiere ähnliche zeitliche Verläufe auf, wie die linksseitigen, der Effekt war allerdings nicht so stark. So waren die auftretenden Unterschiede in der Testung statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 5: Corner Test rechtsseitig operierte Gruppen:** Die Tiere wurden vor einen 30° Winkel gesetzt, in den sie hineinliefen. In der Ecke richteten sie sich auf die Hinterhand auf und drehten sich um ihre eigene Achse. Gewertet wurden Drehungen nach einem vollen Aufrichten auf die Hinterhand. Dargestellt wurde der errechnete Lateralitätsindex. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag steht für den Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

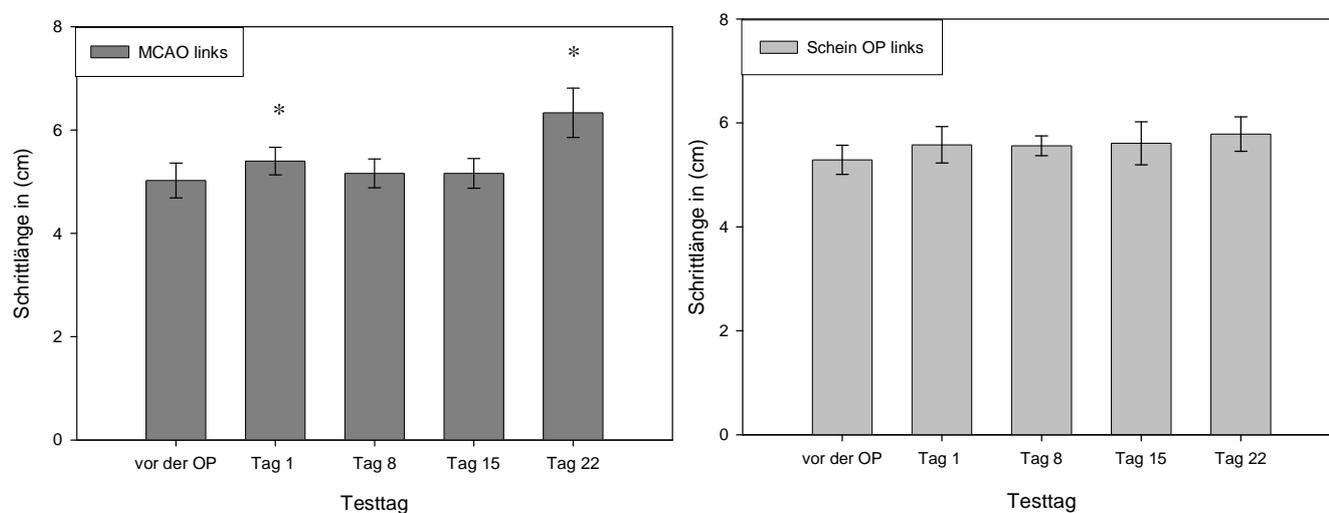
### 3.3 Ganganalyse

#### 3.3.1 Schrittlänge rechte Seite

##### 3.3.1.1 Linksseitig operierte Tiere

Die Schrittlänge der rechten Seite bei linksseitig operierten Tieren wurde mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/22) = 4,197$ ,  $p = 0,011$ . Der ANOVA der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als  $F(4/28) = 2,272$ ,  $p = 0,921$  (Abb. 16).

Beide Gruppen verlängerten die Schritte der rechten Seite am Tag 1 nach der Operation. Diese Veränderung wies in den MCAO-behandelten Tieren statistische Signifikanzen auf ( $p < 0,05$ ). Ebenfalls statistisch signifikant waren die Schrittverlängerungen der rechten Seite an Tag 22 gegenüber Vor der Operation ( $p = 0,048$ ).

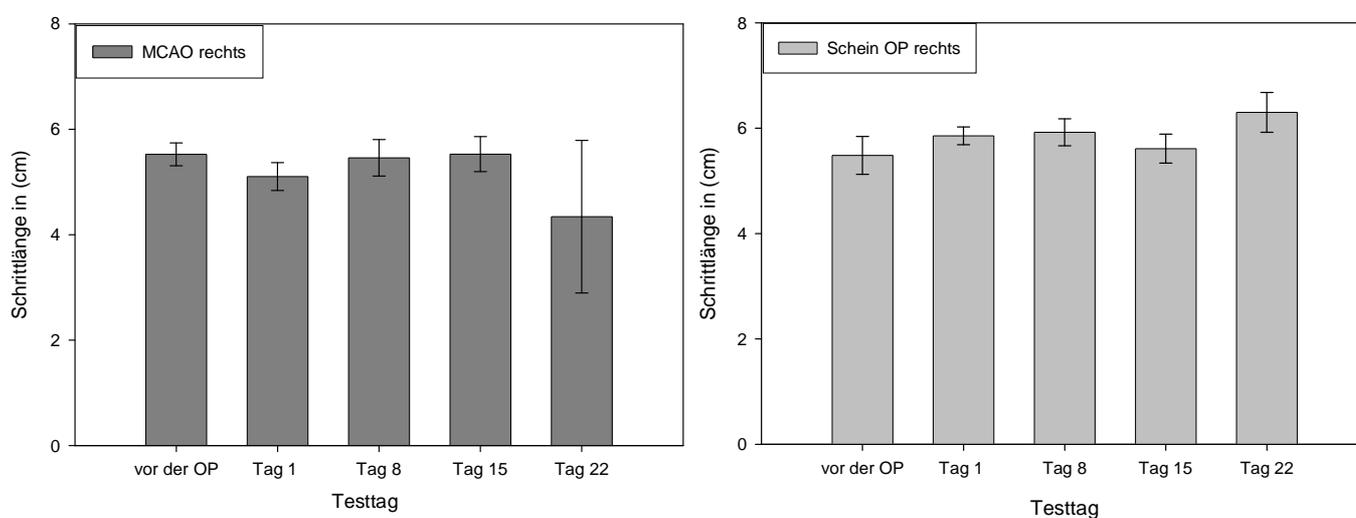


**Abbildung 16: Schrittlänge rechte Seite, linksseitig operierte Gruppen:** Den Mäusen wurden die Vorderpfoten eingefärbt, anschließend wurden sie vor einen 30x10cm großen Tunnel gesetzt. Dessen Boden war mit Papier ausgelegt. Vom jeweiligen Mittelpunkt des Abdruckes aus wurde die Schrittlänge von 3 rechten Schritten gemessen. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= Testtag nach dem Eingriff. \* $p < 0,05$  zu Vor der OP  
Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM

### 3.3.1.2 Rechtsseitig operierte Tiere

In diesen Gruppen erfolgte die Analyse ebenfalls mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Grupp ergaben sich als  $F(5/30) = 1,369$ ,  $p = 0,264$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als  $F(4/21) = 5,103$ ,  $p = 0,729$  (Abb. 17).

Es zeigte sich im Dunn's Test kein Effekt der Behandlung auf die Schrittlänge der Mäuse.



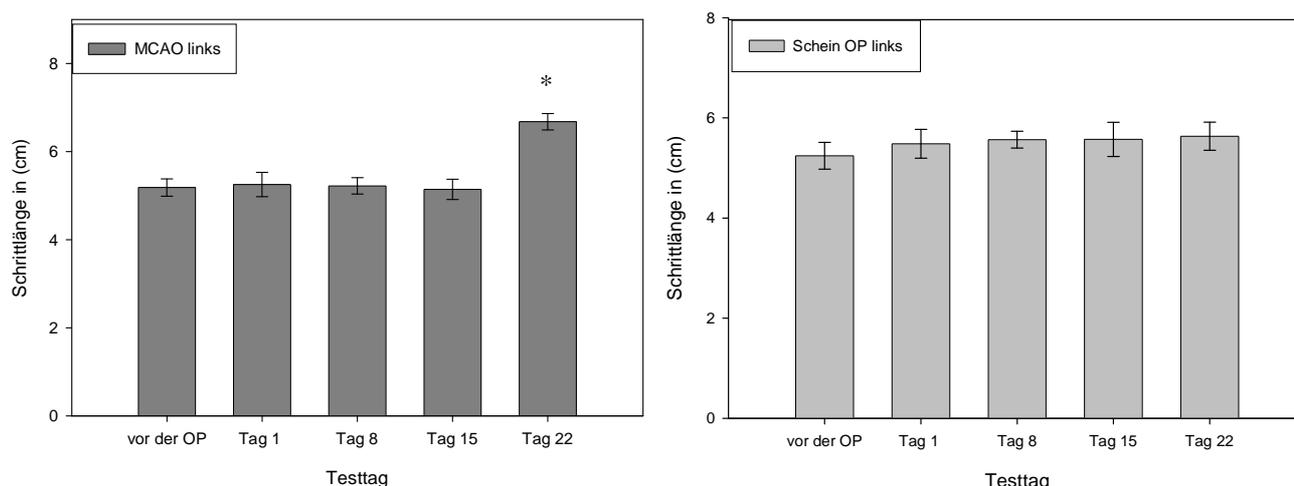
**Abbildung 17: Schrittlänge rechte Seite, rechtsseitig operierte Gruppen:** Den Mäusen wurden die Vorderpfoten eingefärbt, anschließend wurden sie vor einen 30x10cm großen Tunnel gesetzt. Dessen Boden war mit Papier ausgelegt. Vom jeweiligen Mittelpunkt des Abdruckes aus wurde die Schrittlänge von 3 rechten Schritten gemessen. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM

### 3.3.2 Schrittlänge linke Seite

#### 3.3.2.1 Linksseitig operierte Tiere

In diesen Gruppen erfolgte die Auswertung der Daten mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/22) = 6,014$ ,  $p = 0,002$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als  $F(4/28) = 0,2276$ ,  $p = 0,921$  (Abb. 18).

Die Schrittlänge der linken Seite blieb bei den Tieren beider linksseitigen Gruppen nahezu unverändert. MCAO- und Scheinoperations Mäuse wiesen beide vor der Operation eine fast gleiche Schrittlänge auf, die sich an Tag 1 nach der Operation kaum veränderte. Ein statistisch signifikanter Effekt auf die Schrittlänge konnte nur an Tag 22 bei den Tieren der MCAO-Gruppe beobachtet werden ( $p < 0,05$ ).

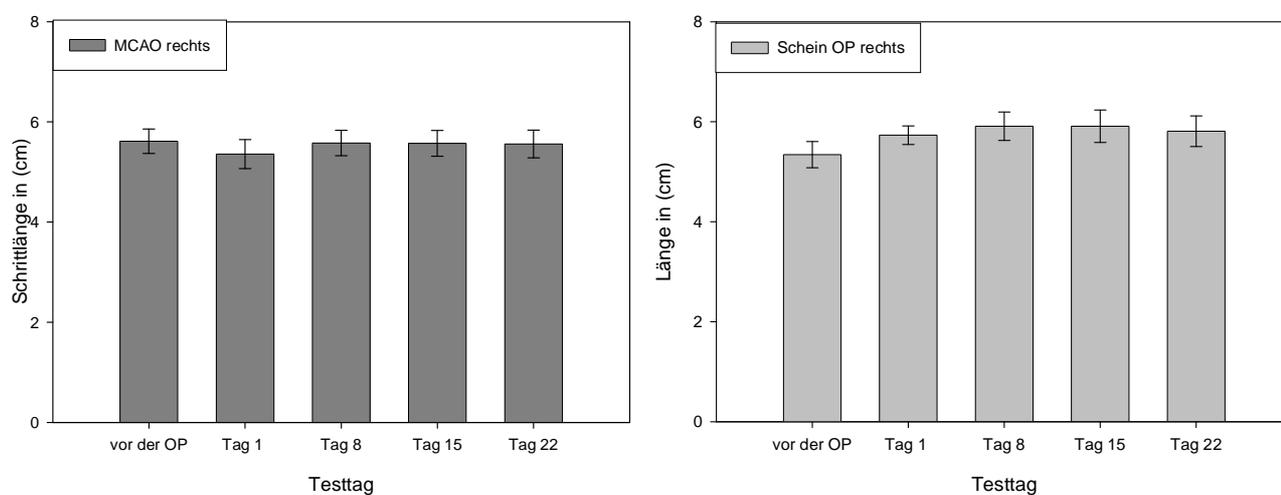


**Abbildung 6: Schrittlänge linke Seite, linksseitig operierte Gruppen:** Den Mäusen wurden die Vorderpfoten eingefärbt, anschließend wurden sie vor einen 30x10cm großen Tunnel gesetzt. Dessen Boden war mit Papier ausgelegt. Vom jeweiligen Mittelpunkt des Abdruckes aus wurde die Schrittlänge von 3 linken Schritten gemessen. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= Testtag nach dem Eingriff. \* $p < 0,05$  zu Vor der OP  
Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM

### 3.3.2.2 Rechtsseitig operierte Tiere

In diesen Gruppen erfolgte die Auswertung der Daten mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Grupp ergaben sich als  $F(4/27) = 0,4387$ ,  $p = 0,780$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe (Abb. 26) ergab sich als  $F(4/21) = 0,9875$ ,  $p = 0,436$  (Abb. 19).

Der Dunn's Test wies keine statistische Signifikanzen in der linksseitigen Schrittlänge, weder zwischen der Art der Behandlung, noch in Bezug auf den Testtag auf.



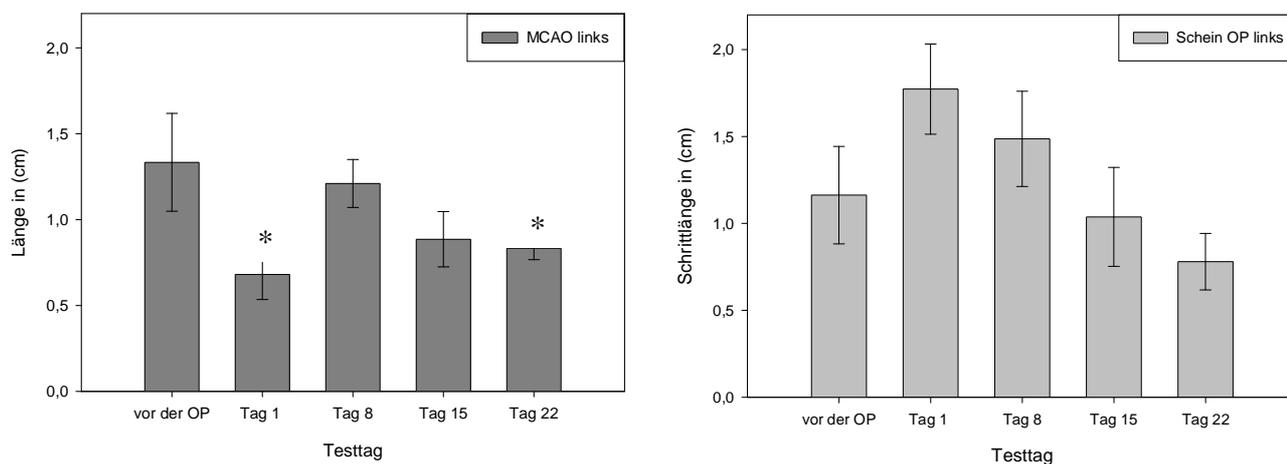
**Abbildung 19: Schrittlänge linke Seite, rechtsseitig operierte Gruppen:** Den Mäusen wurden die Vorderpfoten eingefärbt, anschließend wurden sie vor einen 30x10cm großen Tunnel gesetzt. Dessen Boden war mit Papier ausgelegt. Vom jeweiligen Mittelpunkt des Abdruckes aus wurde die Schrittlänge von 3 linken Schritten gemessen. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.3.3 Schrittvarianz rechte Seite

#### 3.3.3.1 Linksseitig operierte Tiere

In diesen Gruppen erfolgte die Auswertung der Daten mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/22) = 5,755$ ,  $p = 0,003$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe (Abb. 28) ergab sich als  $F(3/18) = 0,099$ ,  $p = 0,456$  (Abb. 20).

Der Dunn's Test zeigte statistisch signifikante Unterschiede in der Gruppe der MCAO-Behandlung zwischen dem Testtag vor der Eingriff und Tag 1 ( $p < 0,05$ ), sowie vor dem Eingriff und Tag 22 ( $p < 0,05$ ) auf.

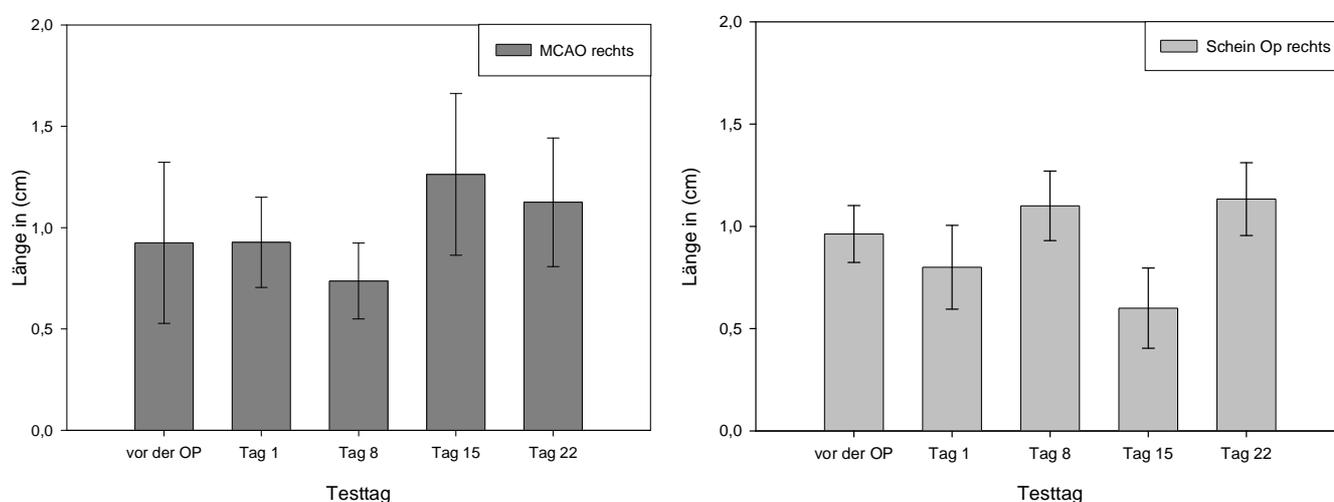


**Abbildung 20: Schrittvarianz rechte Seite, linksseitig operierte Gruppen:** Den Mäusen wurden die Vorderpfoten eingefärbt, anschließend wurden sie vor einen 30x10cm großen Tunnel gesetzt. Dessen Boden war mit Papier ausgelegt. Vom jeweiligen Mittelpunkt des Abdruckes aus wurde die Schrittlänge von 3 rechten Schritten gemessen, der längste minus dem kürzesten Schritt ergab die Varianz. \*  $p < 0,05$  zu Vor der OP, Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag = jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.3.3.2 Rechtsseitig operierte Tiere

In diesen Gruppen erfolgte die Auswertung der Daten mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunnett Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/27) = 0,3659$ ,  $p = 0,831$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe (Abb. 30) ergab sich als  $F(4/21) = 0,907$ ,  $p = 0,478$  (Abb. 21).

Der Dunn's Test ergab keinerlei signifikante Unterschiede in Bezug auf die Behandlung oder den Testtag.



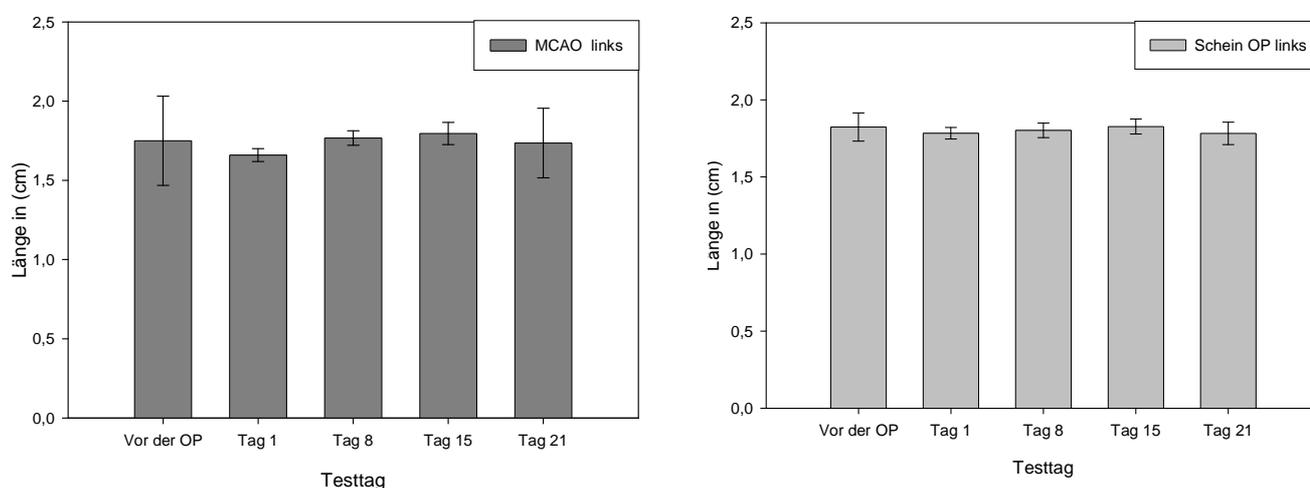
**Abbildung 7: Schrittvarianz rechte Seite, rechtsseitig operierte Gruppen:** Den Mäusen wurden die Vorderpfoten eingefärbt, anschließend wurden sie vor einen 30x10cm großen Tunnel gesetzt. Dessen Boden war mit Papier ausgelegt. Vom jeweiligen Mittelpunkt des Abdruckes aus wurde die Schrittlänge von 3 rechten Schritten gemessen, der längste minus dem kürzesten Schritt ergab die Varianz. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.3.4 Schrittvarianz linke Seite

#### 3.3.4.1 Linksseitig operierte Tiere

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/22) = 0,503$ ,  $p = 0,734$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als  $F(4/28) = 0,788$ ,  $p = 0,542$  (Abb. 22).

Die Analyse der Daten mittels Dunn's Tests ergab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Behandlung und Testtag.

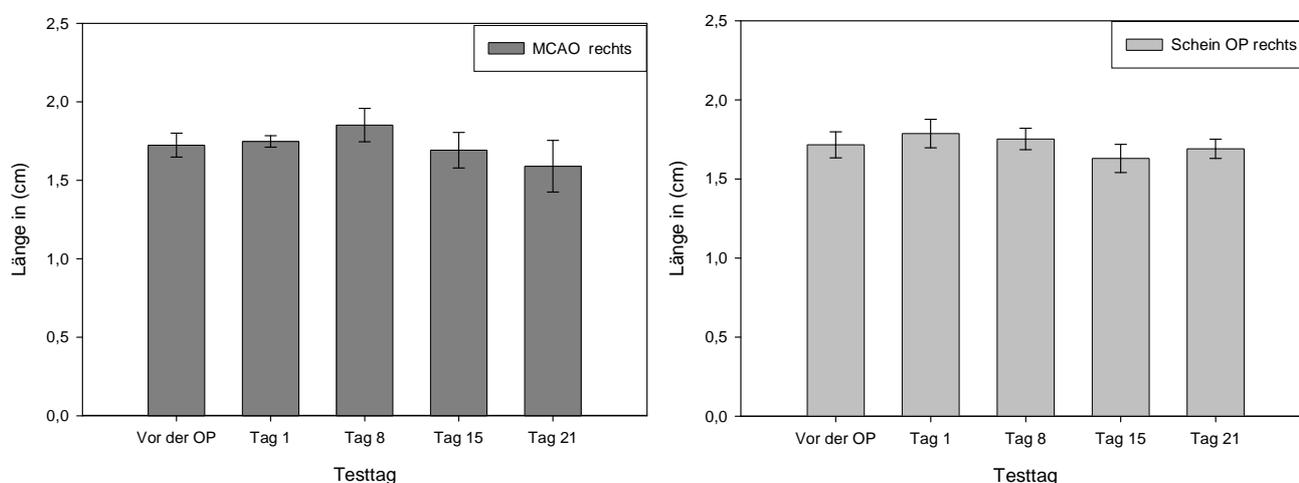


**Abbildung 22: Schrittvarianz linke Seite, linksseitig operierte Gruppen:** Den Mäusen wurden die Vorderpfoten eingefärbt, anschließend wurden sie vor einen 30x10cm großen Tunnel gesetzt. Dessen Boden war mit Papier ausgelegt. Vom jeweiligen Mittelpunkt des Abdruckes aus wurde die Schrittlänge von 3 linken Schritten gemessen, der längste minus dem kürzesten Schritt ergab die Varianz. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.3.4.2 Rechtsseitig operierte Tiere

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/27) = 0,725$ ,  $p = 0,583$ . Der ANOVA Test der Scheinoperationsgruppe ergab sich als  $F(4/21) = 0,564$ ,  $p = 0,691$  (Abb. 23).

Die Analyse der Daten mittels Dunn's Tests ergab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Behandlung und Testtag.



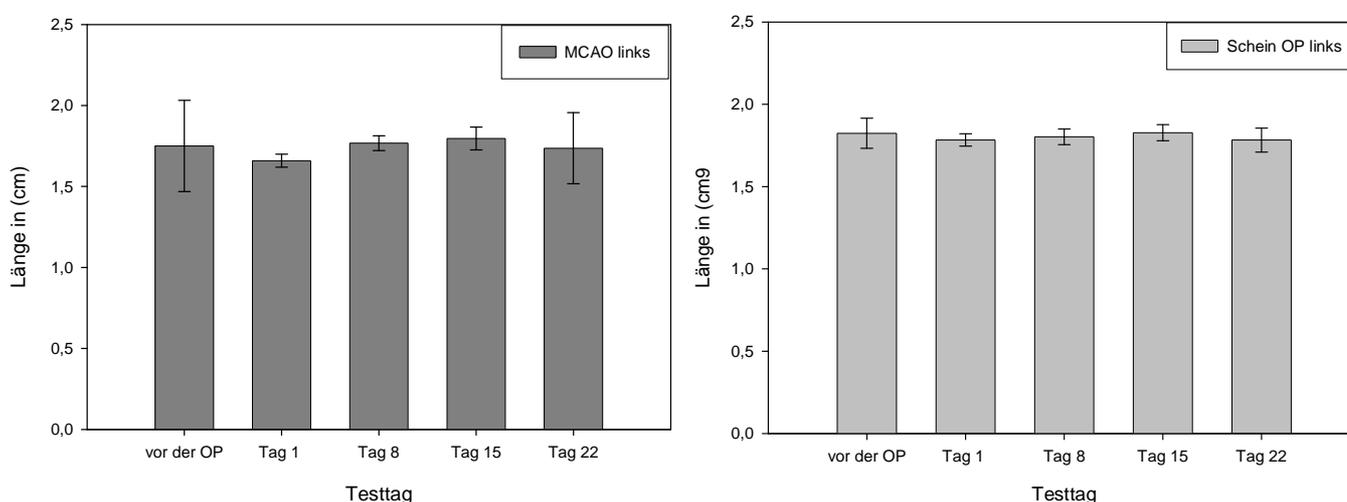
**Abbildung 8: Schrittvarianz linke Seite, rechtsseitig operierte Gruppen:** Den Mäusen wurden die Vorderpfoten eingefärbt, anschließend wurden sie vor einen 30x10cm großen Tunnel gesetzt. Dessen Boden war mit Papier ausgelegt. Vom jeweiligen Mittelpunkt des Abdruckes aus wurde die Schrittlänge von 3 linken Schritten gemessen, der längste minus dem kürzesten Schritt ergab die Varianz. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.3.5 Schrittbasis

#### 3.3.5.1 Linksseitig operierte Tiere

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/22) = 0,474$ ,  $p = 0,754$ . Der ANOVA Test der Scheinoperationsgruppe ergab sich als  $F(4/28) = 0,113$ ,  $p = 0,977$  (Abb. 24).

Die Analyse der Daten mittels Dunn's Tests ergab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Behandlung und Testtag.

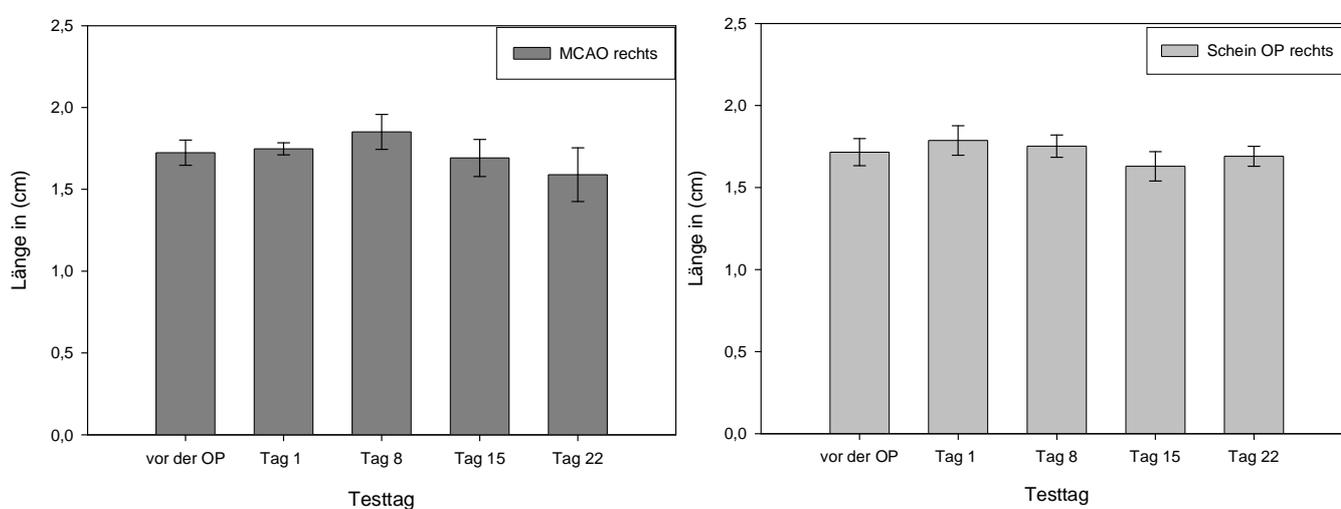


**Abbildung 24: Schrittbasis linksseitig operierte Gruppen:** Den Mäusen wurden die Vorderpfoten eingefärbt, anschließend wurden sie vor einen 30x10cm großen Tunnel gesetzt. Dessen Boden war mit Papier ausgelegt. Vom jeweiligen Mittelpunkt des Abdruckes aus wurde im rechten Winkel die Schrittlänge der Gegenseite geschnitten. Die Distanz zwischen Schrittlänge und Mittelpunkt des Abdruckes ist die Basisbreite. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.3.5.2 Rechtsseitig operierte Tiere

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/27) = 1,459$ ,  $p = 0,242$ . Der ANOVA Test der Scheinoperationsgruppe ergab sich als  $F(4/21) = 0,154$ ,  $p = 0,959$  (Abb. 25).

Die Analyse der Daten mittels Dunn's Tests ergab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Behandlung und Testtag.



**Abbildung 9: Schrittbasis rechtsseitig operierte Gruppen:** Den Mäusen wurden die Vorderpfoten eingefärbt, anschließend wurden sie vor einen 30x10cm großen Tunnel gesetzt. Dessen Boden war mit Papier ausgelegt. Vom jeweiligen Mittelpunkt des Abdruckes aus wurde im rechten Winkel die Schrittlänge der Gegenseite geschnitten. Die Distanz zwischen Schrittlänge und Mittelpunkt des Abdruckes ist die Basisbreite gewertet. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

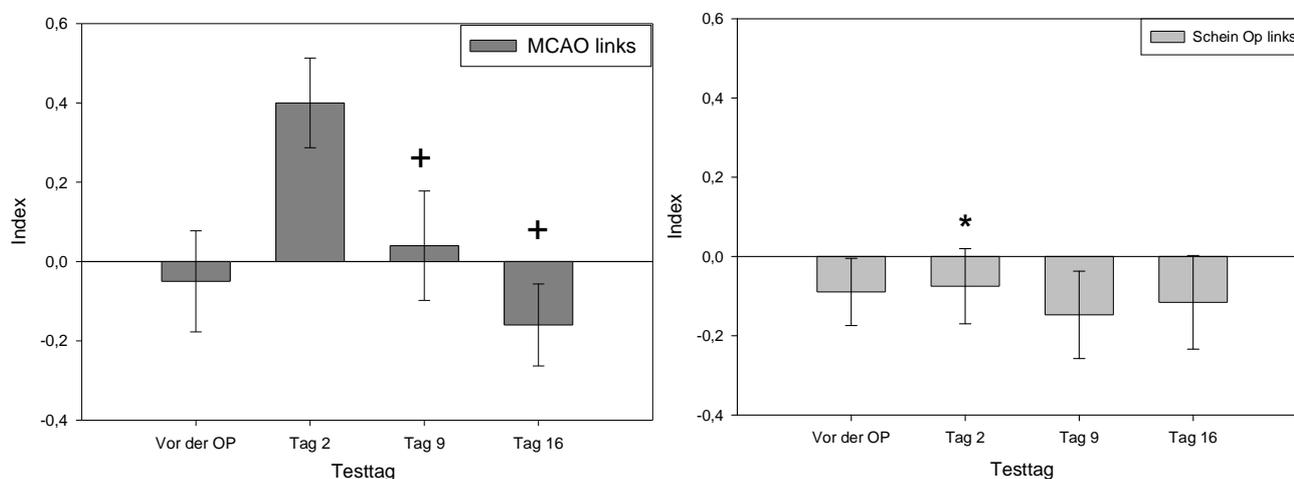
### 3.4 Händigkeit

#### 3.4.1 Linksseitig operierte Tiere

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(3/54) = 6,608$ ,  $p < 0,001$ . Der ANOVA Test der Scheinoperationsgruppe ergab sich als  $F(3/51) = 0,188$ ,  $p = 0,904$  (Abb. 26).

In der Analyse mittels Dunn's Test zeigten die Mäuse der MCAO-Gruppe an Tag 2 ein vermehrtes Greifen mit der Pfote der ipsilateralen Seite ( $p = 0,034$ ) in Bezug auf Vor der OP. Die Tiere in der Scheinoperationsgruppe hingegen veränderten ihren Händigkeitsindex kaum. Ab Tag 9 näherte sich der Index der MCAO Tiere deutlich dem Ausgangswert an, und wies statistische Signifikanzen zu Tag 2 auf ( $p = 0,025$ ). An Tag 16 war eine statistische Signifikanz zu Tag 2 zu erkennen ( $p = 0,021$ ).

Die Tiere der Scheinoperationsgruppe zeigten an keinem Tag einen Einfluss des Eingriffs auf die Händigkeit.

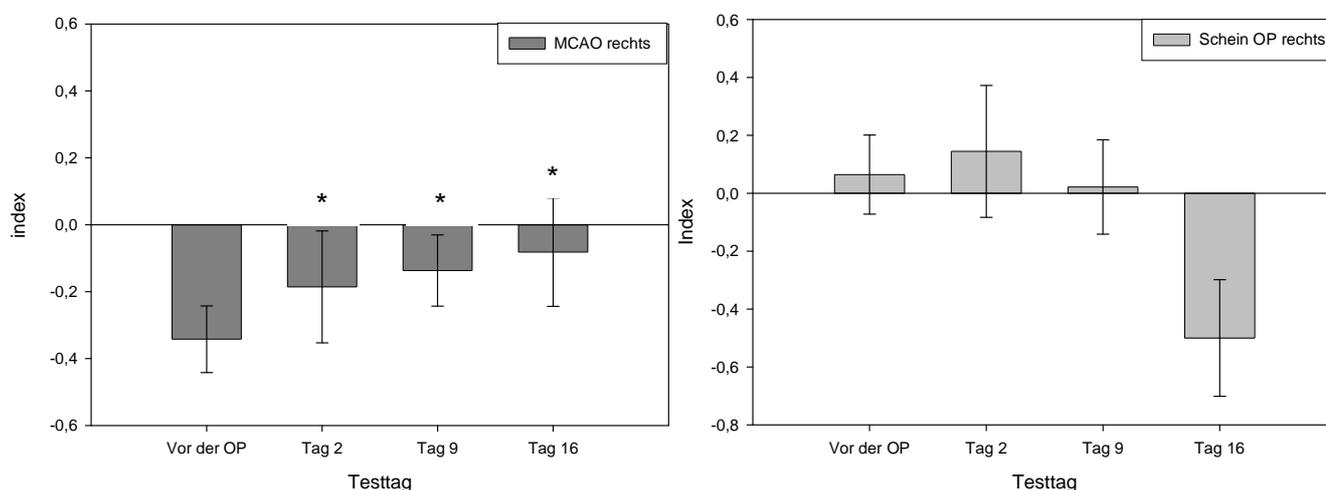


**Abbildung 26: Händigkeit linksseitig operierte Gruppen:** Nach 12 Stunden Hungern wurden die Tiere in die Collins Apparatur gesetzt. An dieser wurde Futter platziert, welches die Mäuse nur mit einer Pfote erreichen konnten. Gezählt wurden die Griffe nach Futter je Pfote, insgesamt 20 Griffe. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff, \* $p < 0,05$  zu Vor der OP, +  $p < 0,05$  zu Tag 2. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.4.2 Rechtsseitig operierte Tiere

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(3/42) = 2,905$ ,  $p = 0,046$ . Der ANOVA Test der Scheinoperationsgruppe ergab sich als  $F(3/31) = 0,152$ ,  $p = 0,925$  (Abb. 27).

In der Analyse mittels Dunn's Test zeigten die Mäuse der MCAO-Gruppe an jedem Tag ein vermehrtes Greifen nach Futter mit der Pfote der ipsilateralen Seite im Vergleich zu Vor der OP ( $p < 0,05$ ). Die Tiere der Scheinoperierten Gruppe wiesen keine statistische Signifikanzen in Bezug auf den Testtag auf.



**Abbildung 10: Händigkeit rechtsseitig operierte Gruppen:** Nach 12 Stunden Hungern wurden die Tiere in die Collins Apparatur gesetzt. An dieser wurde Futter platziert, welches die Mäuse nur mit einer Pfote erreichen konnten. Gezählt wurden die Griffe nach Futter je Pfote, insgesamt 20 Griffe. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff, \* $p < 0,05$  zu Vor der OP. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

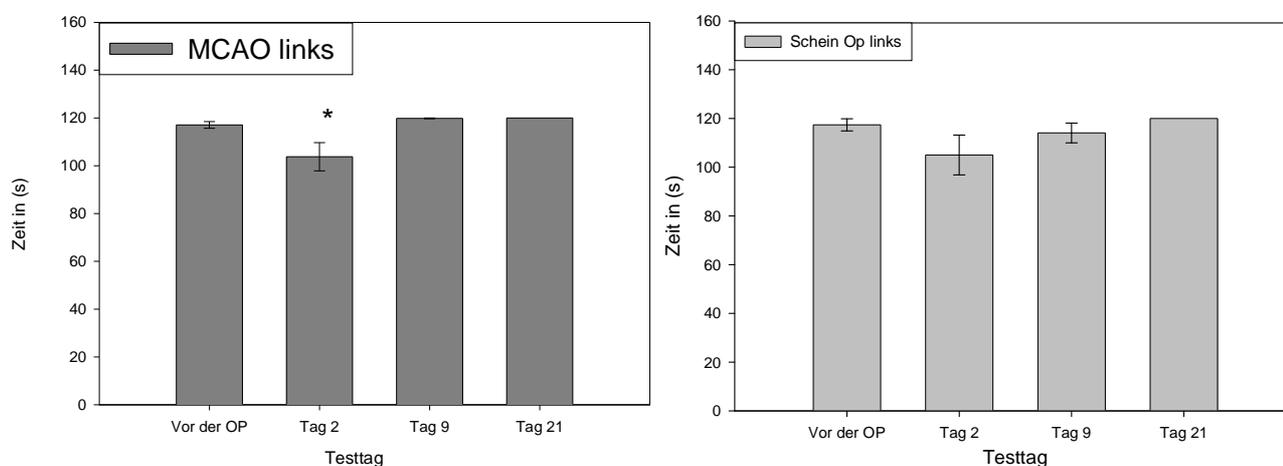
Auffällig ist eine starke Divergenz der Händigkeit am Tag Vor der Operation zwischen den beiden MCAO- Gruppen: In der linksseitig operierten Gruppe war nahezu keine Seitenpräferenz feststellbar (Index -0,05), während in der rechtsseitig operierten Gruppe bereits am Tag Vor der Operation ein Händigkeitindex von -0,35 bestand.

### 3.5 Hanging wire

#### 3.5.1 Linksseitig operierte Tiere

Im Hanging wire Test erfolgte die statistische Auswertung der Daten mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO behandelten Tiere ergaben sich als  $F(3/45) = 6,112$ ,  $p = 0,001$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als Friedmans Chi-Square = 1,050 mit Freiheitsgraden = 3;  $p = 0,015$  (Abb. 28).

In diesem Test waren beide linksseitig operierten Gruppen vor der Operation in der Lage, sich fast 120s am Käfigdach zu halten. An Tag 2 war diese Zeit bei den MCAO-operierten Mäusen verkürzt ( $p < 0,05$ ). Die MCAO-Mäuse erreichten an Tag 8 bereits wieder die Ausgangszeiten vor der Operation, während die Tiere der Scheinoperationsgruppe diese erst an Tag 21 erreichten.

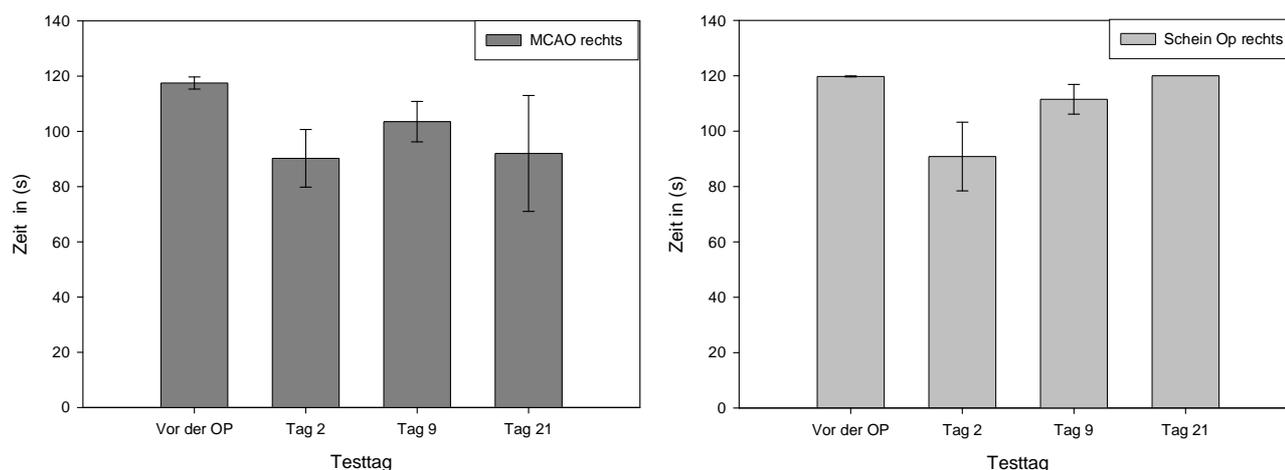


**Abbildung 11: Hanging Wire Test linksseitig operierte Gruppen:** Die Mäuse wurden auf dem Käfigdeckel platziert. Dieser wurde um  $180^\circ$  gedreht, so dass die Tiere sich festhalten mussten, um nicht abzustürzen. Gemessen wurde die Zeit vom Umdrehen des Käfigdeckels bis zum Absturz der Tiere, jedoch maximal 120s. Vor der OP = Testtag vor dem Eingriff, Tag = jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. \* $p < 0,05$  zu Vor der OP. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.5.2 Rechtsseitig operierte Tiere

Im Hanging wire Test erfolgte die statistische Auswertung der Daten mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(3/29) = 2,844$ ,  $p = 0,055$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als Friedmans Chi-Square = 9,478 mit Freiheitsgraden = 2;  $p = 0,009$  (Abb. 29).

In der Post-hoc- Auswertung mittels Dunn's Tests zeigten die Ergebnisse der MCAO-Tiere eine Abnahme der Zeit an Tag 2 im Vergleich zu Tag 1. Diese Veränderung war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,055$ ). Bei den Tieren der Scheinoperationsgruppe zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede in Bezug auf den Testtag.



**Abbildung 12: Hanging Wire rechtsseitig operierte Gruppen:** Die Mäuse wurden auf dem Käfigdeckel platziert. Dieser wurde um 180° gedreht, so dass die Tiere sich festhalten mussten, um nicht abzustürzen. Gemessen wurde die Zeit vom Umdrehen des Käfigdeckels bis zum Absturz der Tiere, jedoch maximal 120s. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

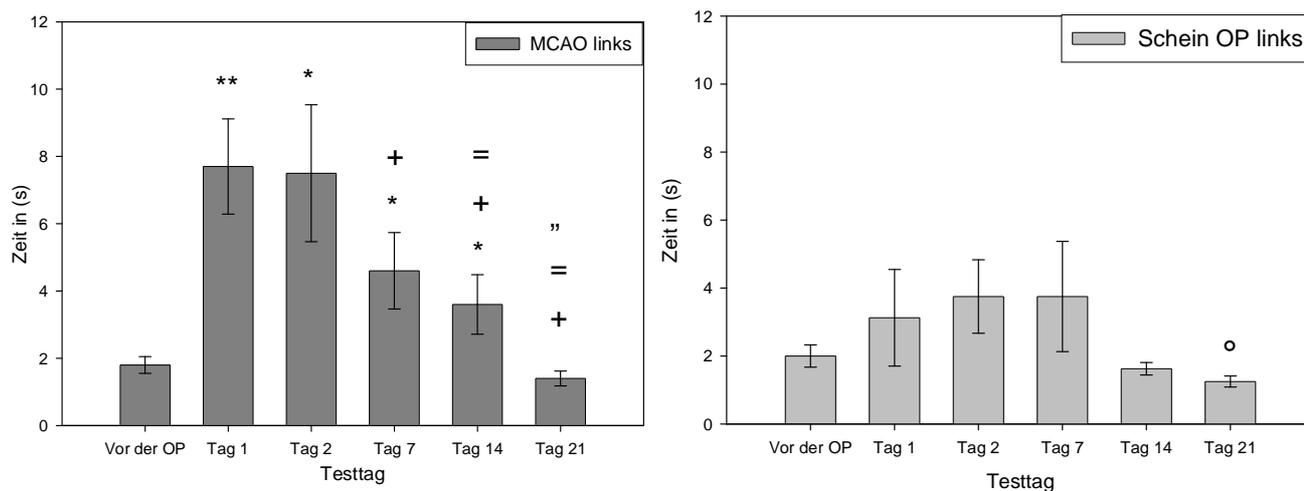
## 3.6 Latency to move

### 3.6.1 Linksseitig operierte Tiere

Im Test der Latency to move erfolgte die statistische Auswertung der Daten mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO behandelten Mäuse ergaben sich als  $F(5/45) = 6,004$ ,  $p < 0,001$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als Friedmans Chi-Square = 1,397 mit Freiheitsgraden = 5;  $p = 0,016$  (Abb.30).

Der Dunn's Test zeigte, dass sich vor der Operation die beiden Gruppen, die Zeit betreffend nicht unterschieden. An Tag 1 zeigte sich in der Gruppe der MCAO-Mäuse eine signifikante Steigerung der benötigten Zeit ( $p < 0,001$ ). Bei den Scheinoperierten Mäusen war die benötigte Zeit ebenfalls verlängert, allerdings nicht signifikant ( $p = 0,27$ ). An Tag 2 war die benötigte Zeit bei MCAO-Mäusen nicht wesentlich verändert, die der Scheinoperationsmäuse stieg dagegen etwas an. Die Tiere der MCAO-Gruppe wiesen einen signifikanten Unterschied zum Tag vor der Operation auf ( $p = 0,018$ ). An Tag 14 war die benötigte Zeit der MCAO-Tiere weiter abgesunken, während nun auch die der Scheinoperation Tiere begann, sich dem Ausgangsniveau anzunähern. An diesem Tag wiesen die MCAO-Mäuse sowohl einen signifikanten Unterschied zu Tag 1 ( $p = 0,020$ ), als auch zu vor der Operation ( $p = 0,035$ ) auf. An Tag 21 lagen beide Gruppen unterhalb ihrer Zeit vor dem Eingriff und unterschieden sich nicht voneinander.

Die MCAO Tiere wiesen an diesem Tag Signifikanzen zu Tag 1 ( $p < 0,001$ ), Tag 2 ( $p = 0,018$ ) und Tag 14 ( $p = 0,021$ ) auf, die Scheinoperationsmäuse zu Tag 7 ( $p = 0,043$ ).

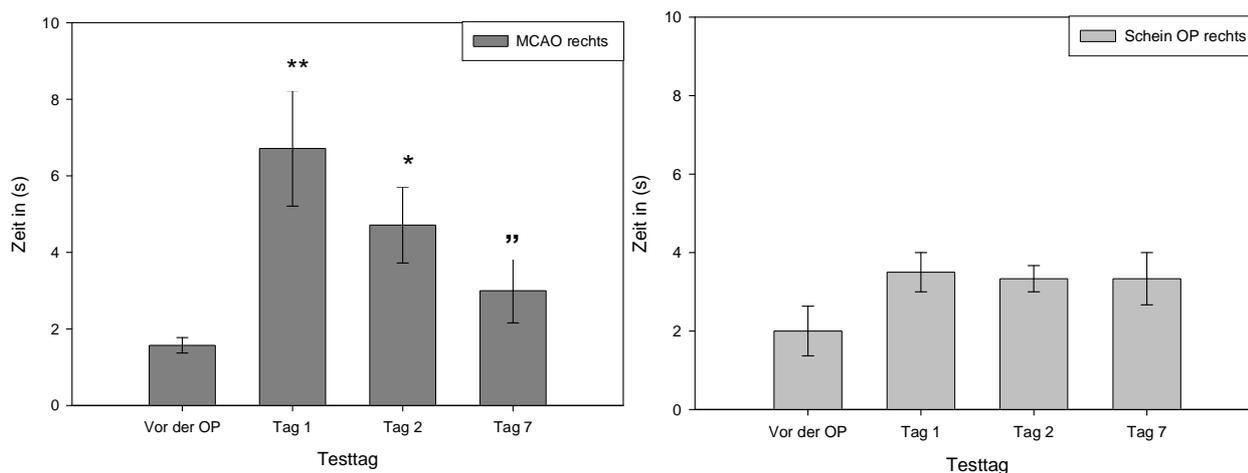


**Abbildung 30: Latency to move linksseitig operierte Gruppen:** Gemessen wurde die Zeit, die die Mäuse benötigten, um eine Distanz von der eigenen Körperlänge zu überwinden. Vor der OP= Ergebnisse vor der OP, Tag= jeweiliger Versuchstag nach dem Eingriff. \*\* $p < 0,001$  zu Vor der OP, \*  $p < 0,05$  zu Vor der OP, + $p < 0,05$  zu Tag 1, „ $p < 0,05$  zu Tag 2, ° $p < 0,05$  zu Tag 7, = $p < 0,05$  zu Tag 14. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.6.2 Rechtsseitig operierte Tiere

Im Test der Latency to move erfolgte die statistische Auswertung der Daten mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(3/18) = 1,060$ ,  $p < 0,001$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als  $F(3/15) = 2,518$ ,  $p = 0,097$  (Abb. 31).

Der Dunn's Test zeigte, dass die MCAO-Mäuse an Tag 1 signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr Zeit zur Durchführung des Versuches benötigten, als vor der Operation. An Tag 2 begannen die MCAO-Mäuse, sich ihrer Ausgangszeit anzunähern, benötigten allerdings immer noch signifikant mehr Zeit als vor der Operation ( $p = 0,006$ ). An Tag 7 sank die benötigte Zeit der MCAO-Mäuse erneut ab, statistisch signifikant waren diese Unterschiede zu Tag 2 ( $p = 0,038$ ). Die Scheinoperationsmäuse blieben erneut fast unverändert in der benötigten Zeit.



**Abbildung 13: Latency to move rechtsseitig operierte Gruppen:** Gemessen wurde die Zeit, die die Mäuse benötigten, um eine Distanz von der eigenen Körperlänge zu überwinden. Vor der OP= Ergebnisse vor der OP, Tag= jeweiliger Versuchstag nach dem Eingriff. \*\* $p < 0,001$  zu Vor der OP, \*  $p < 0,05$  zu Vor der OP, „ $p < 0,05$  zu Tag 2, Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

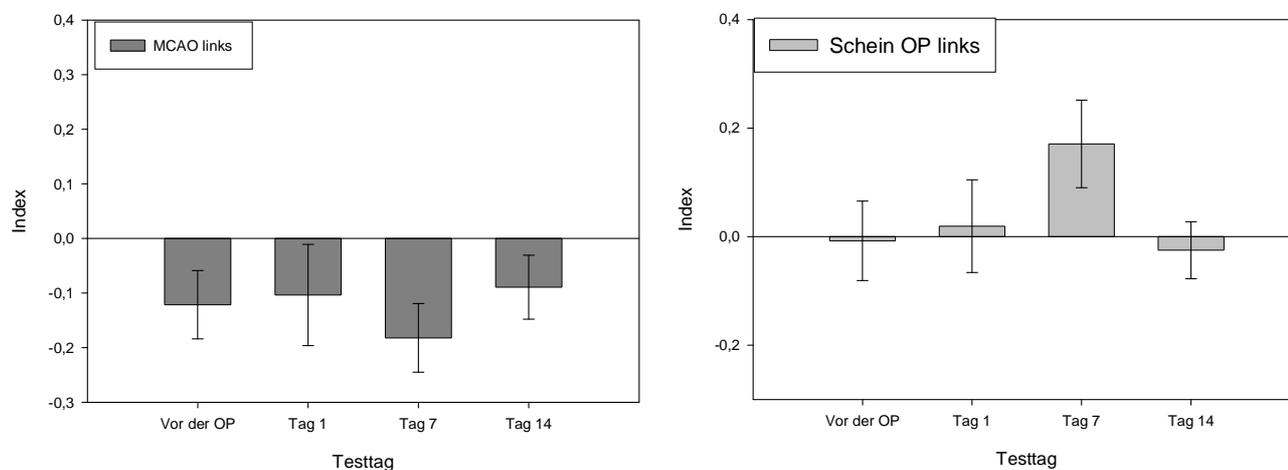
### 3.7 Zylinder Test

#### 3.7.1 Linksseitig operierte Tiere

Die statistische Auswertung der Daten des Zylinder Tests der linksseitig operierten Gruppen erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als Friedmans Chi-Square = 2,6378 mit Freiheitsgraden = 4;  $p = 0,62$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als  $F(4/48) = 1,037$ ,  $p = 0,398$  (Abb. 32).

Tiere der MCAO-Gruppe zeigten bereits vor dem Eingriff eine deutliche Tendenz, die Vorderpfote der später kontralateralen Seite stärker zur Umgebungserkundung einzusetzen.

Die Tiere der Scheinoperationsgruppe zeigten keine solche Tendenz, bei ihnen war bei Benutzung der Pfote keine Seitenpräferenz feststellbar.

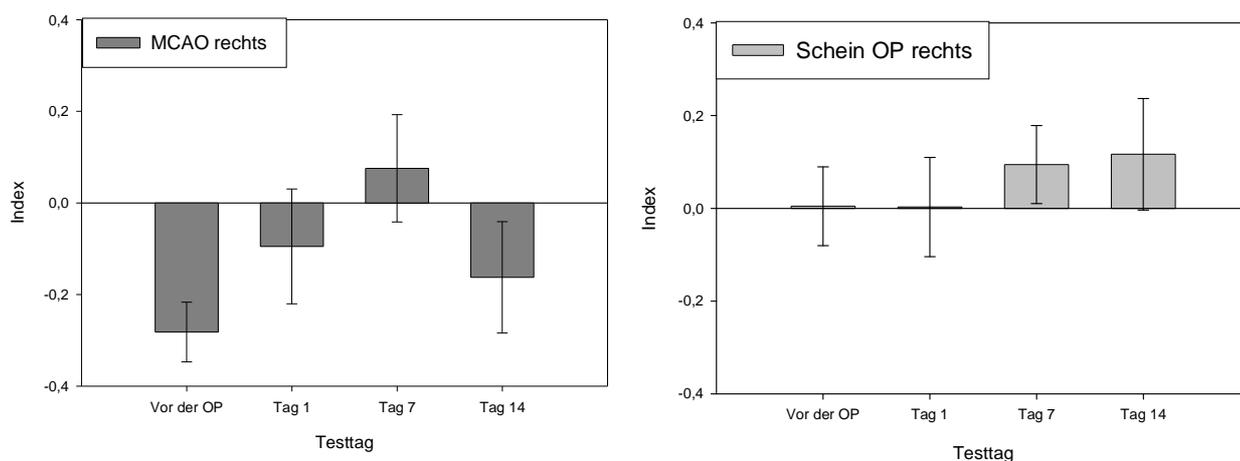


**Abbildung 14: Zylinder Test linksseitig operierte Gruppen:** Gemessen wurde der Gebrauch der Vorderpfoten zur Umgebungserkundung. Die Tiere wurden hierzu in einen Glaszylinder mit 9 cm Durchmesser und 15 cm Höhe gesetzt und die Wandkontakte mit den jeweiligen Vorderpfoten gezählt. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

### 3.7.2 Rechtsseitig operierte Tiere

Die statistische Auswertung der Daten des Zylinder Tests der rechtsseitig operierten Gruppen erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(2/20) = 0,214$ ,  $p = 0,809$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als  $F(2/16) = 1,779$ ,  $p = 0,201$  (Abb. 33).

Die Tiere der MCAO-Gruppe zeigten bereits vor der Operation eine deutliche Präferenz im Gebrauch der kontralateralen Pfote, während bei Tieren der Scheinoperationsgruppe keinerlei Präferenzen feststellbar waren. Am 1. Tag nach dem Eingriff war die Präferenz der MCAO Tiere durch vermehrten Einsatz der ipsilateralen Pfote abgemildert, aber dennoch deutlich zu erkennen. Statistische Signifikanzen traten nicht auf.



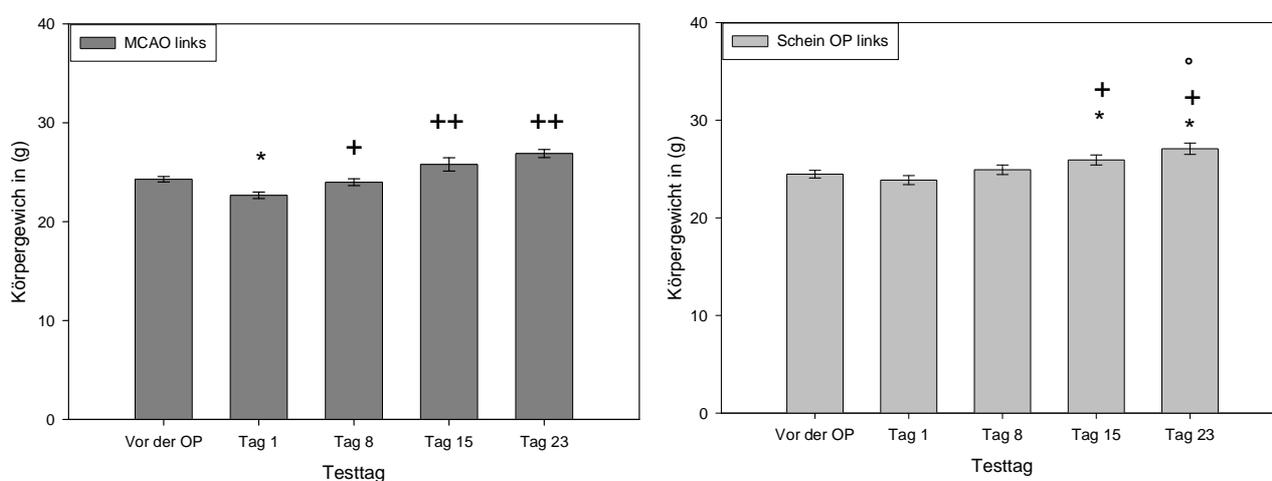
**Abbildung 15: Zylinder Test rechtsseitig operierte Gruppen:** Gemessen wurde der Gebrauch der Vorderpfoten zur Umgebungserkundung. Die Tiere wurden hierzu in einen Glaszylinder mit 9 cm Durchmesser und 15 cm Höhe gesetzt und die Wandkontakte mit den jeweiligen Vorderpfoten gezählt. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

## 3.8 Körpergewicht

### 3.8.1 Linksseitig operierte Tiere

Die statistische Auswertung der Daten der linksseitig operierten Gruppen erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als Friedmans Chi-Square = 7,257 mit Freiheitsgraden = 4;  $p < 0,001$ . Der ANOVA Test der Scheinoperations-Gruppe ergab sich als Friedmans Chi-Square = 6,840 mit Freiheitsgraden = 4;  $p < 0,001$  (Abb. 34).

An Tag 1 nach der Operation sank das Körpergewicht der MCAO-Mäuse signifikant im Vergleich zum Ausgangsgewicht ( $p= 0,0036$ ). Die Scheinoperations- Mäuse veränderten ihr Gewicht an Tag 1 kaum. An Tag 8 begann das Gewicht der MCAO-Mäuse wieder zu steigen, es erreichte nahezu den Wert von Vor der Operation. Somit entstand ein signifikanter Unterschied zu Tag 1 ( $p= 0,004$ ). In der Gruppe der Scheinoperationsmäuse übertraf das Körpergewicht an Tag 8 das Ausgangsgewicht. An Tag 15 vermehrte sich das Gewicht beider Gruppen erneut, so dass die MCAO-Tiere erneut signifikante Unterschiede zu Tag 1 aufwiesen ( $p< 0,001$ ). Die Scheinoperations- Mäuse zeigten an diesem Tag sowohl Signifikanzen zu Tag 1 ( $p= 0,035$ ), als auch zu vor der Operation ( $p= 0,014$ ). An Tag 23 hatten beide Gruppen erneut an Körpergewicht gewonnen, so dass nun signifikante Unterschiede der MCAO Tiere zu Tag 1 ( $p< 0,001$ ) bestanden. Die Tiere der Scheinoperations- Gruppe wiesen an diesem Tag ebenfalls signifikante Unterschiede zu Vor der Operation ( $p=0,012$ ), Tag 1 ( $p=0,005$ ) und Tag 8 ( $p=0,003$ ) auf.



**Abbildung 16: Körpergewicht linksseitig operierte Gruppen:** Die Tiere wurden an verschiedenen Tagen gewogen. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

\* $p<0,05$  zu Vor der OP, ++ $p<0,001$  zu Tag 1, + $p<0,05$  zu Tag 1, ° $p<0,05$  zu Tag 8.

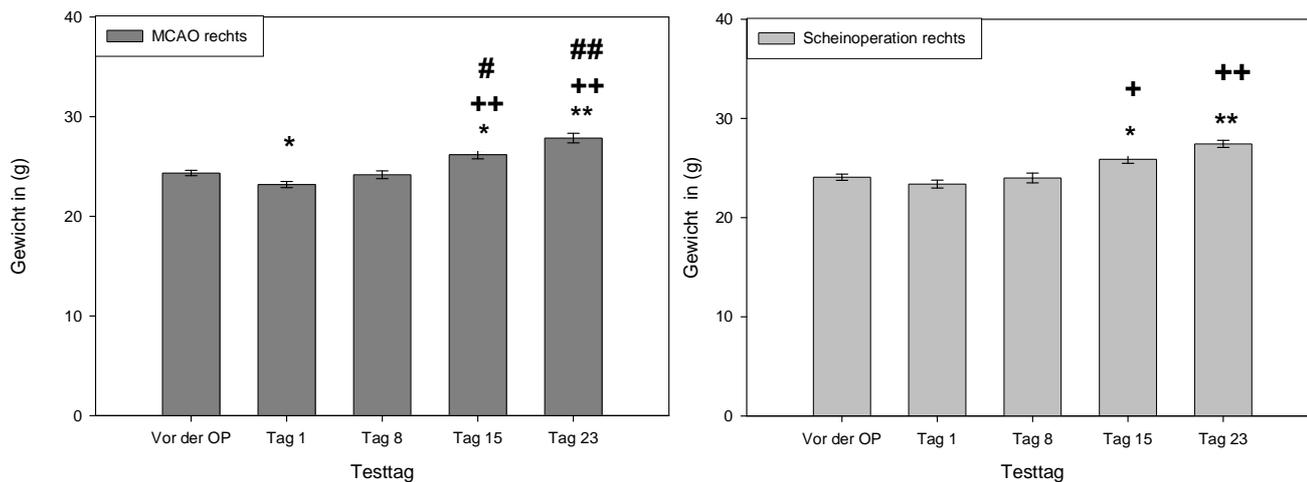
### 3.8.2 Rechtsseitig operierte Tiere

Die statistische Auswertung der Daten der rechtsseitig operierten Gruppen erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe ergaben sich als  $F(4/54) = 5,601$ ,  $p < 0,001$ . Der ANOVA Test der Scheinoperationsgruppe ergab sich als  $F(4/38) = 3,794$ ,  $p < 0,001$  (Abb. 35).

Im Dunn's Test zeigten die Tiere der MCAO-Gruppe einen statistisch signifikanten Unterschied im Körpergewicht zwischen Vor der OP und Tag 1 ( $p < 0,05$ ). An Tag 8 nach der Operation begann bei beiden Gruppen eine Gewichtszunahme, die Gruppen erreichten an diesem Tag ihr Ausgangsgewicht. Am 15. Tag wiesen sowohl die Mäuse der MCAO, als auch Scheinoperationsgruppe eine erneute Gewichtszunahme auf. Bei den MCAO Tieren entstanden statistisch signifikante Unterschiede zu Vor der Operation ( $p = 0,03$ ), Tag 1 ( $p < 0,001$ ) und Tag 8 ( $p = 0,008$ ). Die Scheinoperation-Tiere zeigten an diesem Tag signifikante Unterschiede zu Vor der Operation ( $p < 0,05$ ) und Tag 1 ( $p < 0,05$ ).

Tag 23 nach dem Eingriff zeigte ein ähnliches Bild wie Tag 15. Es kam zu einer erneuten Zunahme des Körpergewichts in beiden Gruppen. Signifikante Unterschiede waren wie an Tag 15 der MCAO-Tiere zu Vor der Operation ( $p < 0,001$ ), Tag 1 ( $p < 0,001$ ) und Tag 8 ( $p < 0,001$ ) vorhanden.

Die Scheinoperationsmäuse wiesen einen statistisch signifikanten Unterschied zu dem Gewicht vor dem Eingriff ( $p < 0,001$ ) und zu Tag 1 nach dem Eingriff ( $p < 0,001$ ) auf.

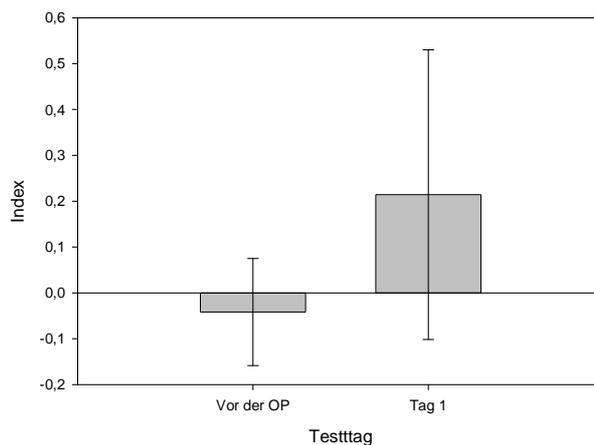


**Abbildung 35: Körpergewicht rechtsseitig operierte Gruppen:** Die Tiere wurden an verschiedenen Tagen gewogen. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag= jeweiliger Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

\*\*p<0,001 zu Vor der OP, \*p<0,05 zu Vor der OP, ++p<0,001 zu Tag 1, +p<0,05 zu Tag 1, ##p<0,001 zu Tag 8, #p<0,05 zu Tag 8.

### 3.9 Corner Test im linksseitigen Fadenmodell

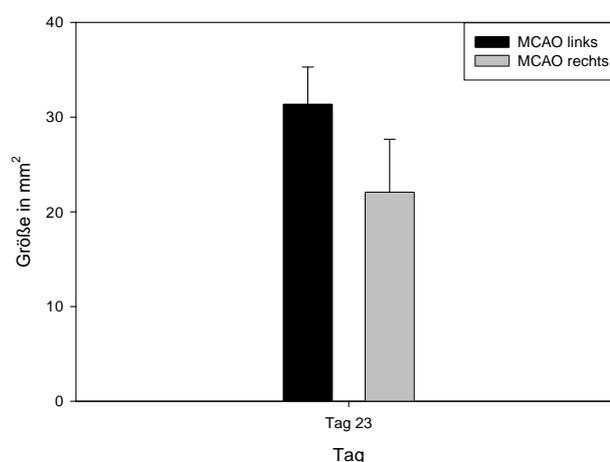
Die statistische Auswertung der Daten der mittels Fadenmodell operierten Gruppe erfolgte mittels One Way repeated measures ANOVA und darauf folgendem Dunn's Test. Die Ergebnisse des ANOVA Tests der MCAO-Gruppe (Abb. 36) in Bezug auf den Testtag ergab sich als  $F(1,2/145) = 0,5029$ ,  $p = 0,505$ . Aufgrund hoher Sterblichkeit (6 Tiere an Tag 8) wurden lediglich die Daten der Testtage Vor der OP und Tag 1 ausgewertet.



**Abbildung 17: Corner Test im linksseitigen Fadenmodell:** Die Tiere wurden vor einen 30° Winkel gesetzt, in den sie hineinliefen. In der Ecke richteten sie sich auf die Hinterhand auf und drehten sie sich um ihre eigene Achse. Gewertet wurden Drehungen nach einem vollen Aufrichten auf die Hinterhand. Dargestellt wurde der errechnete Lateralitätsindex. Vor der OP= Testtag vor dem Eingriff, Tag steht für den Testtag nach dem Eingriff. Dargestellt wurden die Ergebnisse als Mittelwert, die Fehler als SEM.

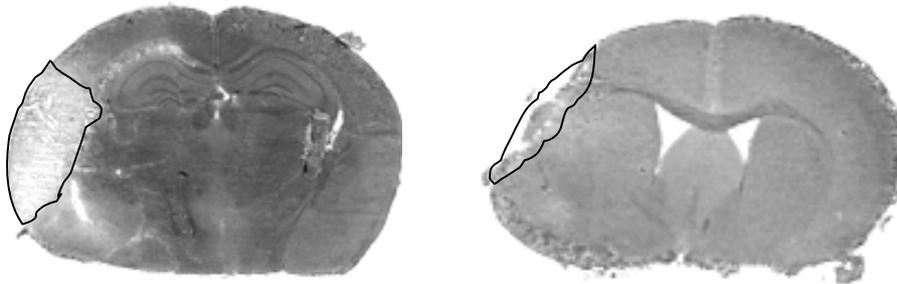
### 3.10 Infarktgröße

Die Messung der Infarkte nach linksseitiger MCAO an Tag 23 nach dem Eingriff ergab eine durchschnittliche Infarktgröße der Gehirne von 31,37 mm<sup>2</sup>. Die durchschnittliche Infarktgröße bei einem rechtsseitig induzierten Infarkt betrug an Tag 23 nach der Induktion 22,08 mm<sup>2</sup> (Abb. 37). Der gemessene Unterschied in der Infarktgröße war statistisch signifikant ( $p=0,018$ ).



**Abbildung 18: Infarktgrößen nach links- und rechtsseitiger MCAO:** Die Analyse der Infarktgröße erfolgte nach Silberfärbung anhand 20µm dicker Gewebepreparate. \* $p<0,05$  (t-Test). Dargestellt wurden die Mittelwerte mit SEM.

Der Vergleich zwischen 2 histologischen Schnitten von Tag 2 und Tag 23 (Abb. 38) zeigt einen deutlichen Wandel der ischämisch bedingten Veränderungen an. An Tag 2 ist ein deutliches Silberdefizit zu erkennen, welches eine gute Erkennbarkeit der ischämischen Region gewährleistet. An Tag 23 hingegen ist die Anfärbung nicht mehr möglich, aufgrund teilweiser Nekrose des Gewebes ist die Größe der betroffenen Hemisphäre gesunken.

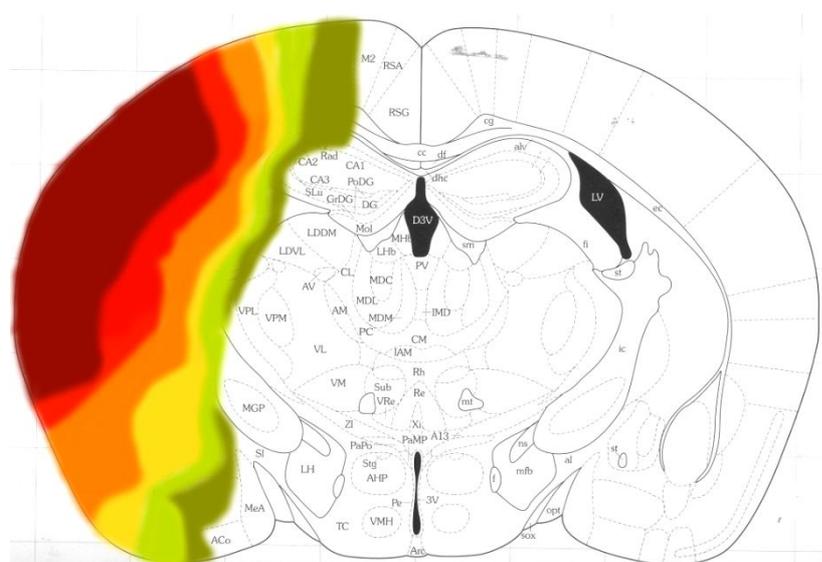


**Abbildung 198: Vergleichende Darstellung der Infarkte an Tag 2 und Tag 23:** Nach der Perfusion wurde je ein Schnitt (20  $\mu\text{m}$ ) der Triplettsreihe Silber gefärbt und eingescannt. Die gefärbten Schnitte zeigen deutliche Unterschiede in der Infarktverteilung, Gewebsschädigung und Anfärbbarkeit, abhängig vom Tag der Perfusion. Die jeweilige Infarktzone ist schwarz umrandet.

### 3.11 Kartierung

#### 3.11.1 Koronarschnitt 48 h nach linksseitiger dMCAO

Die histologische Auswertung der vom Infarkt betroffenen Areale zeigte eine Konzentration der Ischämie im cerebralen Cortex (Abb. 39). Dieser war bei allen Tieren betroffen, vor allem die Gebiete des somatosensorischen und rhinalen Cortex (S1BF, S2, Ect und PRh). Diese waren bei mindestens 17 von 19 Mäusen betroffen. In den somatosensorischen Regionen der Vorderbeine (S1FL), der dorsale Nucleus Endopiriformis (Den), sowie dem Putamen caudatus (Cpu) waren dagegen nur bei 11, beziehungsweise 16 der operierten Tiere Veränderungen nachzuweisen, die einer cerebralen Ischämie folgten. Bereiche wie der primäre Motorcortex (M1), der somatosensorische Cortex der Hinterbeine (S1HL), der Cortex piriformis (Pir) sowie der Bereich der Amygdala (BLA, BLV, CeC, CeL, CxA, LaDL und PLCo) waren bei wenigen Tieren ( $n \leq 10$ ) betroffen.



**Abbildung 20: Kartierung linksseitiger MCAO nach 48 h:** Die Analyse erfolgte anhand des Koronarschnittes. Die Regionen wurden nach folgendem Schema eingefärbt:

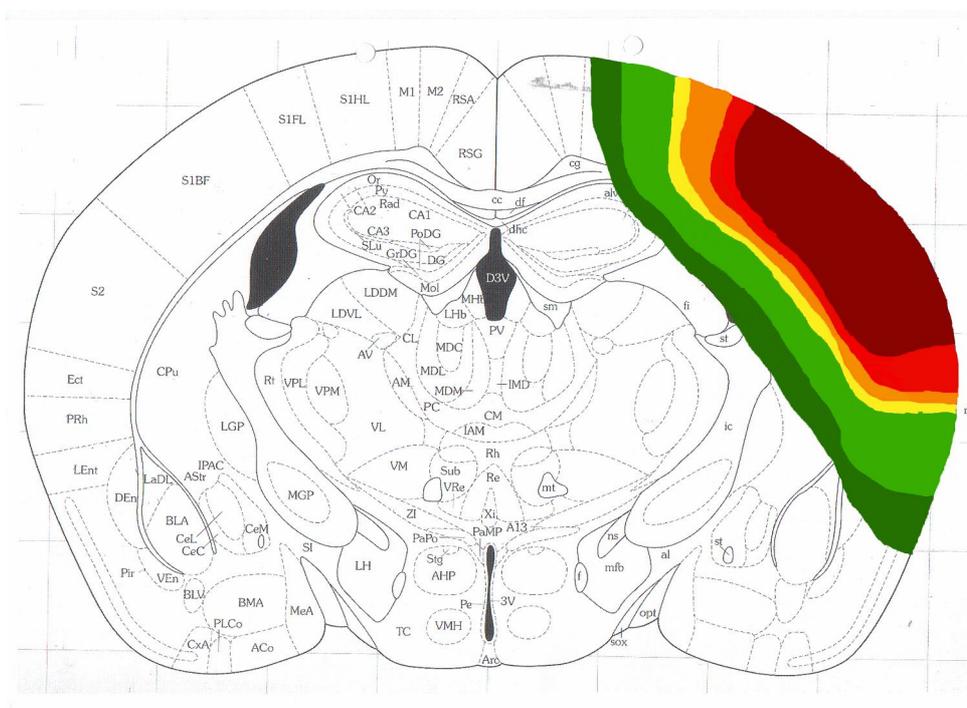
- Areal bei > 17 Mäusen betroffen
- Areal bei 14-16 Mäusen betroffen
- Areal bei 11-13 Mäusen betroffen
- Areal bei 9-10 Mäusen betroffen
- Areal bei 6-8 Mäusen betroffen
- Areal bei 1-5 Mäusen betroffen





### 3.11.3 Koronarschnitt 23 Tage nach rechtsseitiger dMCAO

Wie auch bei den linksseitigen Tieren wurde in dieser Kartierung die relative Einheitlichkeit der Infarkte deutlich (Abb. 41). Rechtsseitig operierte Tiere wiesen in der Kartierung ebenfalls eine Konzentration des Infarktes auf Regionen des somatosensorischen Cortex wie die S1SL (Vorderhand), S1BF (Barrel field) und S2 (sekundärer somatosensorischer Cortex), sowie auf den extrarhinalen Cortex (Ect) auf. Eine Ausdehnung des Infarktes auf das Striatum des Pudamen caudatus (Cpu), den Nucleus Thalamicus paraventricularis (PV), die Amygdala (Den) sowie den lateralen endorhinalen Cortex (LEnt) war zu diesem Zeitpunkt nur bei wenigen Tieren ( $n \leq 6$ ) zu erkennen.



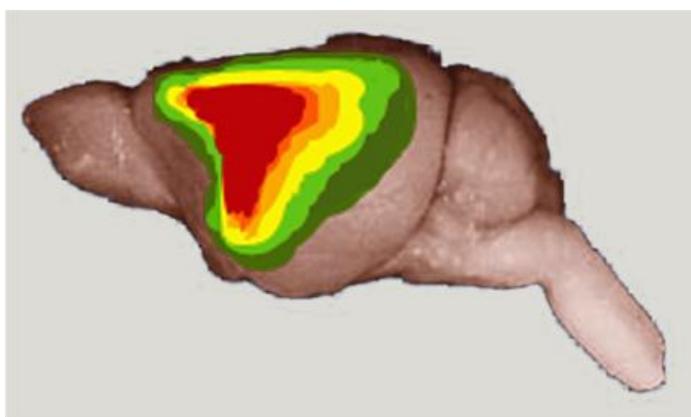
**Abbildung 22: Kartierung rechtsseitiger MCAO an Tag 23:** Die Analyse erfolgte anhand des Koronarschnittes. Die Regionen wurden nach folgendem Schema eingefärbt:

Areal bei > 17 Mäusen betroffen	
Areal bei 14-16 Mäusen betroffen	
Areal bei 11-13 Mäusen betroffen	
Areal bei 9-10 Mäusen betroffen	
Areal bei 6-8 Mäusen betroffen	
Areal bei 1-5 Mäusen betroffen	

### 3.11.4 Lateralansicht 48 h nach linksseitiger dMCAO

Die laterale Ansicht zeigte, dass sich die Läsionen einer dMCAO auf den parietalen Cortex konzentrierten (Abb. 42). Ein auch den temporalen Cortex umfassender Infarkt trat nur bei einem Teil der Tiere ( $n \leq 10$ ) auf.

Grundsätzlich stellten sich die Verteilung der Infarkte wie erwartet dar: ischämische Schäden im Hauptversorgungsgebiet der Arteria cerebialis media waren bei allen Gehirnen zu finden. Lediglich einige wenige Tiere ( $n \leq 6$ ) wiesen eine größere Verteilung der Infarktschäden auf.



**Abbildung 23: Kartierung Lateralansicht 48 h nach Eingriff:** Die Regionen wurden nach folgendem Schema eingefärbt:

Areal bei > 17 Mäusen betroffen	
Areal bei 14-16 Mäusen betroffen	
Areal bei 11-13 Mäusen betroffen	
Areal bei 9-10 Mäusen betroffen	
Areal bei 6-8 Mäusen betroffen	
Areal bei 1-5 Mäusen betroffen	

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methode

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Verhaltenstests, welche schnell und einfach durchgeführt werden können. Gleichzeitig sollten sie eine Unterscheidung zwischen MCAO- und Scheinoperation Behandlung zulassen und Voraussagen über die Histologie ermöglichen.

#### 4.1.1 Verwendete Tiere

In dieser Studie wurden männliche Mäuse des Stammes C57bl/6 eingesetzt.

Dies sollte zum Einen genetische Einflüsse auf das Verhalten minimieren, zum Anderen den neuroprotektiven Einfluss von Progesteron, Östrogen und seinen Derivaten auf den Infarkt und das Verhalten ausschließen (Alkayed et al. 1998; Zhang et al. 1998; Bramlett und Dietrich 2001; Xiaoling Li 2004).

Aufgrund des Einflusses von Gewichtsunterschieden auf Infarktgröße und Outcome (Connolly et al. 1996) wurde auf möglichst homogene Gruppen geachtet.

Das Alter der Tiere von 10 Wochen wurde unter anderem gewählt, da frühere Studien einen neurodegenerativen Effekt verschiedener Anästhetika bei Neonaten zeigten (Jevtovic-Todorovic J. et al. 2003, Loepke A.W. und Soriano S.G. 2008).

Bei deutlich älteren Tieren ist wiederum der Schädelknochen deutlich fester und dicker. Die Operation benötigt durch das verlängerte Fräsen deutlich mehr Zeit, was eine Erhöhung der Anästhesie mit allen bekannten Folgen auf den Kreislauf und damit letztlich auf die Größe der Ischämie bedeuten würde (Roth D.M. et al. 2002).

---

#### 4.1.2 **Anästhesie**

Avertin in 2,5%iger Konzentration wurde bis dato in der Arbeitsgruppe als Anästhetikum verwendet. Dementsprechend fand es Einsatz in der Gruppe, deren histologische Infarktauswertung die Grundlage zur Erstellung des Infarktatlases an Tag 2 darstellt. Unterschiedliche Narkotika haben einen unterschiedlichen Einfluss auf den Blutdruck und damit auf die cerebrale Durchblutung und somit die Größe des Infarktes (Saha et al. 2007). Weiterhin zeigen die Ergebnisse früherer Studien einen Einfluss unterschiedlicher Anästhetika auf die Respiration, und somit auch auf die cerebrale Sauerstoffversorgung (Dittmar et al. 2004). Berichte über eine respiratorische Depression infolge einer Avertin Anästhesie sind derzeit keine bekannt.

Daher wurde zum Erreichen einer Vergleichbarkeit der Infarkte auf das bereits verwendete Avertin zurückgegriffen.

#### 4.1.3 **Operationsmethode**

Die häufigste Schlaganfallform beim Menschen stellt die fokale Ischämie dar, wobei die Arteria media cerebri das meist betroffene Gefäß ist. Die Induktion einer fokalen Ischämie durch permanente oder vorübergehende Okklusion dieser Arterie stellt daher das Mittel der Wahl in der Forschung auf diesem Gebiet dar (Hunter et al. 1995).

In dieser Studie wurde die permanente Okklusion des distalen Abschnittes der Arteria media cerebri mittels Elektrokoagulation durchgeführt. Diese Operationsmethode war aufgrund ihrer guten Reproduzierbarkeit, der konstanten Größe der entstehenden Läsionen und der daraus resultierenden Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten die Methode der Wahl.

Da die verschlossenen Gefäßzweige Endarterien darstellen, ist der Blutfluss des betroffenen Bereiches im Zentrum deutlich geringer. Aufgrund von Anastomosen und Perfusion anderer Gefäße, steigt er zur Peripherie hin an. Dies ermöglicht später eine gute Unterscheidung zwischen dem Infarktkern und dessen Peripherie (Hossmann 2008).

---

Die Operationsdauer beträgt bei einem geübten Operateur nicht länger als 15- 20 Minuten. Das erforderliche Anästhetikum kann somit gering dosiert werden, sein Einfluss auf die Ischämie, das Tier, dessen Verhalten und cerebrale Funktionen wird damit weitest möglich nivelliert.

Das permanente Modell wurde gewählt, da auch in einem transienten Modell eine Reperfusion nach 2-3 Stunden keine Reduzierung des Infarktolumens bedingt, die Streuung der Infarktgröße jedoch deutlich größer ist (Aronowski et al. 1997).

In diesem Modell war sowohl die Überlebensrate der Tiere mit 87,7% an Tag 23 gut, verglichen mit 25% Überlebensrate an Tag 23 im Filamentmodell, als auch nur eine geringe Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens (Fressverhalten, gemessen am Körpergewicht) zu beobachten. Die Tiere waren somit körperlich in der Lage, Verhaltenstests zu absolvieren.

Die gute Überlebensrate ermöglichte es, Tests über einen längeren Zeitraum durchzuführen, und so die Langzeiteffekte einer dMCAO auf das Verhalten zu untersuchen.

In früheren Studien wurde bereits die distale Okklusion der Arteria cerebri media im Zusammenhang mit Verhaltenstest verwendet. Eine umfassende, die Hauptfunktionen des Cortex testende Batterie an Verhaltenstests wurde bis dato noch nicht eingesetzt. Die gewählten Tests wurden auf einzelne Aspekte der kortikalen Funktionen reduziert

Weiterhin existiert keine Veröffentlichung, in welcher zusätzlich ein Einfluss der Operationsseite auf die Ischämie und das Verhalten untersucht wurde.

#### 4.1.4 **Analgesie**

Bis dato sind keine Veröffentlichungen bekannt, die sich speziell mit den postoperativen Schmerzen nach einer Kraniotomie, sowie deren Auswirkungen auf das Verhalten der Mäuse befassen. Rocha-Filho veröffentlichte 2009 Daten, aus denen hervorgeht, dass etwa 65% der humanmedizinischen Patienten, an denen eine Kraniotomie durchgeführt wurden, unter Kopfschmerzen leiden. In dieser Studie fand jedoch keine Bezugnahme zur Art des

---

Eingriffes, des Alters, Geschlechtes, die Existenz subarachnoidaler Blutungen, sowie die Häufigkeit des Auftretens von Kopfschmerzen vor dem Eingriff statt. Es zeigte sich kein Unterschied in der Lebensqualität der Patienten mit Kopfschmerzen, unabhängig davon, ob diese kraniotomie-induziert waren, oder bereits vor dem Eingriff auftraten (Rocha-Filho et al. 2009). Aus diesen Ergebnissen resultiert, dass postoperative Schmerzen ab Tag 7 post OP keinen Einfluss auf die Lebensqualität der Tiere haben. In dieser Studie wurde das Körpergewicht als Indikator für das Allgemeinbefinden der Tiere verwendet. Diese Messung stellt zusätzlich eine einfache, jedoch aussagekräftige Methode zur Bestimmung postoperativer Schmerzen bei Nagern dar (Wheat et al. 2009). Tiere mit starken postoperativen Schmerzen zeigen eine Reduktion der Futteraufnahme (Stevenson et al. 2006, Wheat et al. 2009), was sich bei Mäusen aufgrund der hohen Stoffwechselrate zeitnah in einer Abnahme des Körpergewichtes zeigt. Bei allen 4 Gruppen war das Vorgehen intra operationem gleich, mit dem Unterschied, dass eine Koagulation der Arterie bei den Tieren der Sham-Gruppen nicht stattfand. Man kann also davon ausgehen, dass die Dolenz des Eingriffes bei allen Gruppen gleich ist. In dieser Studie verlieren die Tiere aller Gruppen (sowohl Sham-, als auch MCAO-Gruppe) post operativ an Körpergewicht. Die Sham-Tiere weisen jedoch eine deutlich schnellere Erholung des Körpergewichtes auf, als die der MCAO- Gruppe. Ausgehend von den Daten von Rocha-Filho kann man darauf schließen, dass die Unterschiede der Gewichtszunahme in den Gruppen ab Tag 8 nicht mehr auf eventuelle Schmerzen zurückgeführt werden kann (Rocha-Filho et al. 2009).

#### 4.1.5 Durchführung der Verhaltenstest

1992 veröffentlichte Daten zeigen, dass direkt oder kurz nach dem Eingriff durchgeführte Verhaltenstests zuverlässigere Langzeitprognosen stellen können als die alleinige Histologie (Corbett et al. 1992).

Jeder in einem Verhaltenstest getestete Parameter stellt sich individuell in hohem Maße variabel dar. Eine Quantifizierung und objektive Beurteilung der erhobenen Daten ist nicht immer leicht (Yonemori et al. 1998).

Um vergleichbare Resultate erzielen zu können, wurden die äußeren Testbedingungen für die einzelnen Individuen möglichst gleich gehalten. Die Tiere wurden ½ Stunde vor Beginn der Tests aus dem Tierraum in den Verhaltensraum zur Akklimatisierung verbracht. Der Verhaltensraum war vom Laborgeschehen abgelegen, um eine größtmögliche Ruhe zu erzielen. Desweiteren waren die Fenster des Raumes mittels lichtundurchlässiger Folie abgeklebt, ein Einfluss von Tageszeit, Lichtintensität und Wetter auf die Mäuse sollten dadurch eliminiert werden. Die Verhaltenstests wurden zur gleichen Tageszeit und in der gleichen Reihenfolge von einem Untersucher absolviert. Dieser trug Einmalhandschuhe und einen weißen Kittel, welcher im Verhaltensraum aufbewahrt wurde um einer Geruchsveränderung vorzubeugen.

Um reproduzierbare und statistisch auswertbare Daten zu erhalten, wurden die Tiere zusätzlich vor dem Eingriff allen Verhaltenstests unterzogen. Dies ermöglichte eine direkte, individuelle Beobachtung der Auswirkung des Eingriffs.

Zur Erzielung bestmöglicher Ergebnisse wurden die Verhaltenstests nach der Operation, im Anschluss an eine Aufwach- und Regenerationsphase, durchgeführt. Später gestartete Versuche sind laut Gionet nicht immer zuverlässig darin, Veränderungen aufzuzeigen (Gionet et al. 1991).

Aufgrund der in früheren Studien gezeigten Korrelation zwischen sensomotorischen Defiziten in den ersten 3 Wochen nach einer MCAO und der entstandenen Läsion (Grabowski et al. 1988) wurde das Protokoll der Verhaltenstests auf 4 Wochen ausgelegt. Hiervon dienten 3 Wochen der Überprüfung nach der Operation. Die Tiere wurden nicht jeden Tag getestet, um ihre Motivation zur Durchführung der Versuche nicht zu überbeanspruchen. Dies hätte eventuell eine verschlechterte Performance und daraus eine resultierende negative Beeinflussung der Ergebnisse zur Folge.

---

Die Überprüfung von Mäusen, die sowohl links-, als auch rechtsseitig einer dMCAO unterzogen wurden, sollte den Einfluss der Operationsseite aufzeigen. Um externe Faktoren zu nivellieren und Defizite aufzuzeigen (Haelewyn et al. 2007), wurden zusätzlich 2 Scheinoperation Gruppen (links- und rechtsseitig) gebildet.

Gewählt wurden teilweise bereits etablierte Tests zur Überprüfung motorischer und sensorischer Fähigkeiten, auf einen kognitiven Test wurde verzichtet. Diese wurden in der Vergangenheit bereits häufig durchgeführt (Corbett et al. 1992; Bland et al. 2000; Gibson et al. 2005; Ryan et al. 2006). Allerdings wurde zusätzlich das Allgemeinbefinden mittels Überprüfung des Fressverhaltens (Messung Körpergewicht, Seite 56), sowie des Bewegungsdranges (Latency to move, Seite 52) untersucht.

Wichtig war es in dieser Studie, Tests zu verwenden, welche keine hohen apparativen und zeitlichen Aufwendungen benötigen. Unsere Hoffnung war, dass sich diese Tests eher in den Laboralltag der Schlaganfallforschung einfügen würden, als dies bei Tests der Fall wäre, die hohe Anschaffungskosten und/oder zusätzlichen großen zeitlichen Aufwand erforderten.

#### 4.1.6 **Auswertung**

Die an den histologischen Schnitten durchgeführte Silberfärbung gestattet eine gute Unterscheidung zwischen geschädigtem und intaktem Gewebe, unterscheidet dabei aber nicht zwischen weißer und grauer Substanz. So werden auch subcortikal gelegene, vom Infarkt betroffene Gewebe in die Auswertung integriert.

Weiterhin ergibt sich eine gute Differenz in der optischen Dichte der Anfärbungen bereits 2 Stunden nach der Ischämie, so können auch kurzfristige Untersuchungen durchgeführt werden.

Da die Anfärbung von 20 µm dicken Kryotomschnitten möglich ist, werden weitere biochemische oder immunhistologische Verfahren an ein- und demselben Gehirn möglich (Vogel et al. 1999).

## 4.2 **Ergebnisse der Verhaltenstests**

Manche der eingesetzten Verhaltenstests wurden in dieser Form noch nicht bei Mäusen im Zusammenhang mit der Schlaganfallforschung eingesetzt, beispielsweise der Händigkeitstest oder die Ganganalyse mittels Tinte.

Andere Tests, wie der Corner Test, waren bereits lange Zeit etabliert und anerkannt, wurden jedoch teilweise nur bei rechtsseitig operierten Tieren, oder anderen Operationsmodellen eingesetzt.

Über eine wie in dieser Versuchsreihe angelegte Überprüfung des Verhaltens bei sowohl rechts-, als auch linksseitig operierter MCAO- und Schein operierten Mäusen war in der Literatur noch nichts bekannt.

Die Ergebnisse fielen je nach behandelter Seite deutlich unterschiedlich aus.

Insgesamt waren bei den linksseitig operierten Tieren nur der Chimney Test, der Corner Test, die Händigkeit, die Latency to move, sowie die Messung des Körpergewichtes in der Lage, zwischen MCAO- und Scheinoperation-Gruppe zu unterscheiden.

Rechtsseitig MCAO operierte Tiere konnten nur der Chimney Test und die Latency to move zuverlässig von der Scheinoperation- Gruppe differenzieren.

Einige der durchgeführten Tests erwiesen sich dagegen als nicht aussagekräftig im Bezug auf die Differenzierung zwischen MCAO- und Scheinoperation Behandlung, sowie dem Zeitpunkt der Untersuchung. Dies waren die Ganganalyse, der Zylinder Test und der Hanging wire Test.

---

#### 4.2.1 Ganganalyse

Die Ganganalyse wurde bis dato in dieser Form noch nicht in der Schlaganfallforschung eingesetzt.

Bei der Durchführung des Versuches erwies sich die fehlende Möglichkeit zur Standardisierung als Nachteil. Da es sich bei dem Versuchsaufbau um einen geschlossenen Tunnel handelte, war eine Beobachtung der Maus während des Versuches nicht möglich.

Durchgänge, die von dem Tier nicht zügig, sondern mit Pausen durchgeführt wurden, waren anhand der Abdrücke zu erkennen und wurden nicht zur Bewertung zugelassen. Leichtere Störungen des Ablaufs oder Geschwindigkeitsänderungen waren dagegen nicht immer sicher zu erkennen. Eine Änderung der Geschwindigkeit eines Tieres führte zu einer Änderung der Schrittlänge, eine Beeinflussung der Ergebnisse war nicht auszuschließen. Dieser Aspekt wurde in der Auswertung berücksichtigt, indem nur gleichmäßig erscheinende Schrittsequenzen vermessen wurden.

Die scheinoperierten Tiere beider Seiten zeigten ein von der MCAO-Gruppe wenig verändertes Gangbild, ein Indiz dafür, dass der Eingriff keinen Einfluss ausübte. Das Gangbild der MCAO Mäuse zeigte lediglich in der linksseitig operierten Gruppe Einflüsse der Operation sowohl auf die Schrittlänge beider Seiten, als auch auf die Schrittvarianz der rechten Seite.

Aufgrund der Verschaltung des Gehirns war eine Veränderung im Gang der zur Ischämie kontralateralen Seite zu erwarten. Der motorische Cortex wurde kartografiert (Franklin 1997). Ein Vergleich der erstellten Kartierungen und der kortikalen Regionen anhand des Atlas zeigte, dass nur bei wenigen Tieren der rechtsseitigen MCAO Gruppe die Gebiete, welche somatosensorisch und motorisch für die Funktion der Vordergliedmaßen zuständig sind, von der Ischämie betroffen waren. Bei Tieren der linksseitig operierten MCAO Gruppe waren diese Regionen häufiger betroffen.

Dies stellt eine mögliche Erklärung für die geringen Effekte der Operation bei den linksseitig operierten Tieren, und das Fehlen eines Effektes bei den rechtsseitig operierten Tieren dar.

---

#### 4.2.2 Zylinder Test

Der Zylinder Test wurde entwickelt, um motorische Dysfunktionen der Vorderhand in ischämischen Schlaganfallmodellen bei Ratten zu erforschen (Schallert et al. 2000; Karhunen et al. 2003). Er wurde von Li in Mausmodellen eingesetzt, und gilt als zuverlässiger Test, der auch bei Langzeitversuchen zuverlässige Daten liefert (Xiaoling Li 2004).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten keine signifikanten Abweichungen vom Verhalten vor der Operation. Die rechtsseitig operierten Gruppen wiesen lediglich Tendenzen ohne statistische Signifikanzen auf. Zu erwarten wäre eine Zunahme des Gebrauchs der ipsilateralen Seite gewesen, wie dies in vorherigen Studien beobachtet wurde (Karhunen et al. 2003; Xiaoling Li 2004). In den genannten Studien wird nur die rechtsseitige Operation durchgeführt, in dieser Gruppe zeigten sich auch in dieser Studie die meisten Effekte.

Ein geringer statistischer Effekt der Operation auf die motorischen Funktionen der Vorderhand zeigte sich bereits in einem anderen Verhaltenstest, der Analyse des Gangbildes.

Ebenfalls anders als bei früheren Studien von Li und Zhang war das Verschwinden der Effekte bereits ab Tag 7 nach dem Eingriff. Die erwähnten früheren Veröffentlichungen hingegen zeigen eine zuverlässige Unterscheidung zwischen MCAO- und Schein operierter Behandlung auch am 90. Tag nach einer induzierten cerebralen Ischämie (Li Zhang 2002; Xiaoling Li 2004). Hierbei gilt zu beachten, dass in diesen Studien anderen Infarktmodelle Anwendung fanden.

#### 4.2.3 Hanging wire

Die Ergebnisse des Hanging wire Tests ließen eine Unterscheidung zwischen den linksseitigen Gruppen an Tag 1 nach dem Eingriff zu. Die Daten stimmten somit grundsätzlich mit den Beobachtungen von Xiaoling Li 2004 überein (Xiaoling Li 2004). Die motorische Kraft der Maus traf lediglich bei linksseitig operierten Tieren eine Aussage

darüber, welcher Behandlung das Tier zu welchem Zeitpunkt unterzogen wurde. Dieser Test konnte allerdings nur an Tag 1 nach der Operation zwischen MCAO- und Scheinoperierten-Tieren unterscheiden. Eine Unterscheidung zwischen MCAO- und Scheinoperationsbehandlung war bei den rechtsseitig behandelten Gruppen zu keinem Zeitpunkt möglich.

Es konnte in dieser Studie allerdings auch die Nützlichkeit von der Messung des Körpergewichtes, der Latency to move, dem Corner Test, dem Chimney Test und der Händigkeit in Bezug auf die Behandlung (MCAO, Scheinoperation) und den Zeitpunkt gezeigt werden.

#### 4.2.4 Chimney Test

Die Ergebnisse des Chimney Tests dieser Studie stimmten grundsätzlich mit früheren Untersuchungen von Bouet überein. Allerdings wurden in jener Studie die Tiere einer rechtsseitigen Operation mittels intraluminarer Okklusion der Arteria media cerebri unterzogen, und benötigten bereits vor der Operation deutlich länger, den Versuch zu absolvieren (Bouet et al. 2007).

Eine Unterscheidung zwischen Tieren der MCAO- und Scheinoperationsgruppe ließ dieser Test nicht zu, jedoch eine Aussage bezüglich des Zeitpunktes in der linksseitigen MCAO-Gruppe.

Ein Anstieg der nach der Operation benötigten Zeit zur Durchführung des Versuchs war bei allen Mäusen, auch denen der Scheinoperationsgruppen, zu beobachten. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Wirkung des Anästhetikums (Blutdruckabfall mit daraus folgender Hypoxie) sowie des Eingriffs als solchen zurückzuführen (Roth, D.M. 2002).

Der beobachtete Effekt blieb nur bei den MCAO Tieren bestehen. Ein Hinweis darauf, dass er auf eine ischämisch induzierte Störung des motorischen Cortexes zurückzuführen ist. Eine Korrelation zwischen geschädigten Regionen/Infarktgröße und der länger benötigten Zeit war nicht vorhanden.

---

#### 4.2.5 **Corner Test**

Der Corner Test stellte einen kombinierten Test dar. Durch die Stimulationen an Genick und Vibrissae sowie das folgende Aufrichten überprüft er sowohl cortikale als auch subcortikale Funktionen, die nach einer MCAO gestört sein können (Xiaoling Li 2004). Während des Corner Tests aktiviert der Kontakt der Vibrissae mit der Wand der Apparatur afferente Nervenfasern. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der major relay nuclei im ipsilateralen Nucleus Trigemini und im kontralateralen ventrobasalen Thalamus. Sie besitzen eine starke synaptische Verknüpfung mit dem jeweiligen korrespondierenden, kontralateralen Projektionsgebieten (Belford und Killackey 1979; Dietrich et al. 1986a). Diese Projektionsgebiete werden in der Literatur als posteromedial barrel subfield (PMBSF) bezeichnet und haben ihren Sitz im somatosensorischen Cortex (Woolsey und Van der Loos 1970; Hurwitz et al. 1990).

Die Tiere dieser Versuchsreihen zeigten nach der Operation deutlich Präferenzen in der Drehung zur kontralateralen Seite. Dies war sowohl bei rechts-, als auch linksseitig operierten Tieren der Fall.

Diese Ergebnisse stehen bereits veröffentlichten Studien verschiedener Autoren entgegen. Sowohl Zhang als auch Li und Bouet führen bei den von ihnen operierten Tieren den Corner Test durch (Li Zhang 2002; Xiaoling Li 2004; Bouet et al. 2007). In allen 3 Studien wurden die Tiere einer rechtsseitigen, intraluminalen Okklusion der Arteria media cerebri unterzogen. Die Tiere drehen sich nach der Operation im Corner Test teilweise signifikant vermehrt zur ipsilateralen Seite hin. Weiterhin bestehen teilweise hohe Korrelationen mit der Infarktgröße (Li Zhang 2002).

Eine mögliche Erklärung für dieses früheren Veröffentlichungen zuwiderlaufende Verhalten könnte die gewählte Operationsmethode darstellen. Während in den Literaturstellen der Zugang zum Gefäß über eine Inzision am Hals erfolgte, wird im vorliegenden Modell der Musculus temporalis vom Ansatz zum Ursprung hin entfernt. Dabei ist nicht auszuschließen, dass es zur Schädigung und/oder Zerstörung afferenter Nervenfasern kommt. Eine Störung

---

der Wahrnehmung der Umgebung über die Vibrissae könnte somit verantwortlich sein für die kontralateralen Drehungen der Tiere.

Während Zhang und Li in ihren Veröffentlichungen den Corner Test als zuverlässigen Langzeittest mit signifikanten Unterschieden bis zu 90 Tagen nach der Operation beschrieben, konnten in dieser Studie bereits ab Tag 22 keine eindeutige Aussagen in Bezug auf die Behandlung getroffen werden (Li Zhang 2002; Xiaoling Li 2004).

#### 4.2.6 Händigkeit

Die Händigkeit von Mäusen wurde bis dato noch nicht im Zusammenhang mit einer cerebralen Ischämie untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten einen deutlichen Einfluss der dMCAO auf die Händigkeit der Mäuse. Direkt nach dem Eingriff gebrauchten die linksseitig operierten Tiere ihre ipsilaterale Pfote signifikant häufiger als vor der Operation. Aus der unilateralen Schädigung des cerebralen Cortexes resultiert infolge der kontralateralen Projektionen im Gehirn eine Beeinträchtigung der kontralateralen Körperfunktionen.

Bei humanen Patienten ist bekannt, dass ein Gebrauch der von einer cerebralen Ischämie ipsilateral betroffenen Hand bilateral den senso-motorischen Cortex aktiviert.

Dieser Effekt ist lediglich bis zum 25. Tag nach dem Schlaganfall zu beobachten. Ab Tag 35 werden bei einem Gebrauch der betroffenen Hand erneut nur die kontralateralen Regionen aktiviert. Der daraus folgende transiente Anstieg der motorischen Aktivität der intakten Hemisphäre innerhalb des ersten Monats nach einer Ischämie stellt einen wichtigen Faktor zur Erholung der motorischen Funktionen dar (Takeda et al. 2007).

Das Geschlecht der Mäuse nimmt laut Collins ebenfalls Einfluss auf die Händigkeit.

Weibliche Tiere weisen grundsätzlich eine signifikant stärkere Händigkeit auf, als männliche (Collins 1991). Da in dieser Studie männliche Tiere verwendet wurden, ist die mildere Ausprägung der Effekte wahrscheinlich zusätzlich geschlechtsbedingt.

---

Die beobachtete, graduell fortschreitende Änderung der Händigkeit in den rechtsseitig operierten Gruppen hat seine Ursache in der bereits vor der Operation herrschenden stark divergierenden Händigkeit.

Die Tiere dieser Gruppe wiesen zu Beginn eine Bevorzugung der kontralateralen Seite auf. Es ist nicht auszuschließen, dass in diesen Fällen bereits cortikale Regionen involviert sind, welche von einer dMCAO nicht, oder nur peripher betroffen sind.

In diesem Fall sind die Effekte einer dMCAO nicht klar definiert. Das Fortschreiten der apoptotischen Prozesse in den Randgebieten der Infarktzone (siehe Einleitung) kann nach Erreichen dieser oben genannten Regionen zu der „verspäteten“ und langsam progredierenden Änderung in der Händigkeit führen.

#### 4.2.7 Latency to move

Dieser Test über die Wartezeit, bis zum Loslaufen der Mäuse, diente der Überprüfung des Allgemeinbefindens und dem Grad des Erschöpfungssyndroms der Mäuse, welche durch den spontanen Bewegungsdrang charakterisiert werden.

Er ließ eine deutliche Unterscheidung zwischen Behandlung (MCAO, Scheinoperation) sowie Zeitpunkt zu. Nur bei den Mäusen der MCAO Gruppen war ein deutlicher Anstieg der zur Versuchsdurchführung benötigten Zeit festzustellen.

Die Ergebnisse stellen sich somit anders dar als jene von Li im Jahr 2004. Hier wird bei Mäusen in einem rechtsseitigen MCAO- Filamentmodell kein Unterschied zwischen MCAO- und Scheinoperationsbehandlung festgestellt (Xiaoling Li 2004).

Sichtbare Effekte sind wahrscheinlich auf die operativ induzierte cerebrale Ischämie und ein daraus resultierendes schlechteres Allgemeinbefinden zurückzuführen. Der Einfluss einer operationsinduzierten Ängstlichkeit auf die Ergebnisse ist nicht auszuschließen, wie Kilic in seiner Veröffentlichung in 2008 zeigt (Kilic et al. 2008). In der Humanmedizin wurde weiterhin als Folge einer cerebralen Ischämie bei 20-40% aller hemiparetischen Patienten von chronischen Erschöpfungs- und Müdigkeitssymptomen berichtet (Mead et al. 2007).

---

Ursächlich diskutiert werden Effekte proinflammatorischer Zytokine (TNF-alpha, IL-1 beta und IL-6) auf glutaminerge Übertragungswege, Beeinträchtigung astroglialer Metabolismen, ein verringerter Gehalt an den Neurotransmittern Noradrenalin und Serotonin, sowie eine Unterbrechung der afferenten und efferenten Erregungs- und Übertragungsleitungen (Chaudhuri und Behan 2004; Kumor und Pierzchala 2006; Broła et al. 2007). Spezifischere, cerebral bedingte Ursachen können aus einer Verstärkung der Grenzen für motorische Aktivierung, einer Reduktion der Anzahl an leitenden Bahnen der Pyramiden Zellen, einem zentralen Leitungsblock der ableitenden Fasern sowie metabolisch induzierter afferenter Hemmung der spinalen und corticalen Bahnen darstellen (Gandevia 2001).

Beeinflusst werden können diese Mechanismen weiterhin durch die Motivation der Individuen zur Versuchsdurchführung, das Aktivierungsmuster motorischer Einheiten, Intensität und Dauer der Aktivierung und weiteren Elementen des Unteren Motorischen Neuronen (UMN) Syndroms. Eine resultierende Schwächung der Muskelkraft entwickelt sich in kurzem zeitlichem Abstand zur auslösenden cerebralen Ischämie (Dobkin 2008).

#### 4.2.8 Körpergewicht

Die Tiere aller Gruppen erhielten körperlsgewichtsabhängig die gleiche Dosis Anästhetika. Während Nachschlafzeit und Erholungsphase nahmen die behandelten Tiere keinerlei Nahrung zu sich. Dies führte bei der hohen Stoffwechselrate der Mäuse schnell zu einem Verlust an Körpergewicht, ein Effekt, der in allen 4 Gruppen zu beobachten war (Siehe Seite 57 Abb.34 und Seite 59 Abb.35). Am deutlichsten war die Reduktion des Körpergewichtes jedoch bei den MCAO behandelten Tieren. Die Scheinoperationmäuse kehrten nach Abebben der Wirkung des Anästhetikums wieder zur normalen Futteraufnahme zurück.

Bei den MCAO Mäusen führte der Eingriff initial zu einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens und der Futteraufnahme. Daraus resultierte eine Abnahme des Körpergewichtes (siehe Seite 56). Dieser Effekt begann aufgrund einer Kompensation durch

Hyperphagie (Arsenijevic et al. 2006) bereits in der 2. Woche wieder zu verschwinden. Die erhobenen Daten stimmen mit den Ergebnissen früherer Studien überein (Tamura et al. 1981; Xiaoling Li 2004; Ryan et al. 2006). Bereits 1981 beobachtet Tamura ähnliche Veränderungen nach einer MCAO. Diese Gruppe verwendete allerdings Ratten anstatt Mäusen, und führte eine Okklusion des proximalen Stammes der Arteria media cerebri durch (Tamura et al. 1981).

In seiner Studie verwendet Li Mäuse, unterzieht diese allerdings einer transienten Operationsmethode. In dieser Studie wird ein deutlicher Gewichtsverlust in den ersten Tagen nach der Operation beschrieben. Eine Unterscheidung zwischen MCAO- und Scheinoperationsgruppen ist hier in den ersten Tagen nach dem Eingriff möglich (Xiaoling Li 2004).

Ryan beschreibt 2006, ebenfalls bei Ratten, dass sowohl in der MCAO, als auch in der Scheinoperation Gruppe in den ersten 72 h nach der Operation eine Reduktion des Körpergewichts zu verzeichnen ist (Ryan et al. 2006).

#### 4.2.9 **Corner Test im linksseitigen Fadenmodell**

Im Gegensatz zum Corner Test der einer linksseitigen MCAO-Behandlung unterzogenen Tiere zeigen die Mäuse des linksseitigen Fadenmodells keinen statistisch messbaren Einfluss des Eingriffs auf die Drehrichtung. In früheren Studien (Xiaoling Li 2004; Bouet et al. 2007) konnte hingegen eine statistisch signifikante Vermehrung der Drehungen zur ipsilateralen Seite beobachtet werden.

In besagten Studien wurden die Mäuse einer rechtsseitigen Operation unterzogen, die Dauer der Okklusion war mit 60 Minuten genauso lang, wie in dieser Studie.

Eine mögliche Erklärung stellt die hohe Mortalität der Mäuse bis zu Tag 8 dar. An diesem Tag waren 6 der 8 Tiere verstorben. Eine damit verbundene deutliche Reduktion des Allgemeinbefindens war an Tag 1 bereits zu erkennen. Ein Einfluss des Allgemeinbefindens auf das Drehverhalten ist somit nicht auszuschließen.

---

Derartig hohe Mortalitätsraten fanden in der Literatur keine Erwähnung, die erwähnten Veröffentlichungen verwenden das Fadenmodell auch für Langzeitstudien (Xiaoling Li 2004; Bouet et al. 2007). Eine weitere Erklärung für die vermehrte Drehung zur ipsilateralen Seite stellt die Tatsache dar, dass es sich bei diesem Eingriff um einen Verschluss der proximalen Arteria cerebralis media handelt, bei dem im Gegensatz zum distalen Modell, neben corticalen auch striatale Läsionen induziert werden. Laut Seyfried induzieren diese striatalen Läsionen ein vermehrtes Drehen zur ipsilateralen Seite (Seyfried et al. 2008).

#### 4.2.10 Kartierungen

Der Vergleich der beiden linksseitigen Kartierungen von Tag 2 und Tag 23 weist auf eine Verkleinerung des Infarktes nach 23 Tagen hin. Bei der Interpretation dieser Daten muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Kartierungen von Gehirnpräparaten verschiedener Tiere erstellt wurden. Es war in dieser Studie nicht möglich, die Infarktgrößen und deren Entwicklung/Veränderung bei einzelnen Tieren individuell zu verfolgen.

Auffällig waren die deutlichen Unterschiede sowohl in der Infarktgröße, als auch in der Verteilung der betroffenen Gebiete der beiden Operationsseiten.

Eine mögliche Erklärung hierfür liefert Fox 1993. Laut ihm ergeben sich Infarkte unterschiedlicher Größe aufgrund anatomischer Variationen der Arteria cerebralis media, welche er anhand von Rattengehirnen nachweist. Eine für ihn weitere mögliche Ursache stellt eine oft nur unvollständige Okklusion dar. Diese entsteht durch das nur schmale Operationsfenster im Schädeldach und der daraus entstehenden begrenzten Übersicht im Operationsfeld. So wird oftmals nur ein Hauptast des Gefäßes okkludiert, eine unvollständige Unterbindung der Blutversorgung ist das Resultat (Fox et al. 1993).

Die Kartierung der rechtsseitig operierten Tiere an Tag 23 zeigte eine dorsal verlagerte Konzentration des Infarktes. Eine mögliche Ursache kann die Operation darstellen. Die linksseitige Operation ist in unserer Arbeitsgruppe die Standardmethode, die rechtsseitige Operation erforderte eine Umstellung der gewohnten Operationsseiten.

---

Zusätzlich kann die Rechtshändigkeit des Operateurs Einfluss auf die Operation und die Operationsseite, und damit auch deren Ergebnis nehmen. Während der Operation wurden bei den rechtsseitigen MCAO Eingriffen keine vermehrten oder stärkeren Blutungen beobachtet, als in der linksseitigen. Sie können somit als Ursache für unterschiedliche Infarkte ausgeschlossen werden.

Die von der cerebralen Ischämie betroffenen Gebiete stellen höchstwahrscheinlich die Hauptursache für die Ergebnisse der Verhaltenstests dar.

Dies erklärt auch das deutlich unterschiedliche Abschneiden der beiden MCAO behandelten Gruppen (mit jeweils unterschiedlichen Infarkten und unterschiedlicher Infarktverteilung) in den gleichen Tests unter denselben äußeren Bedingungen.

Aussagen über die Infarktgröße oder die betroffenen Gehirnareale konnte keiner der durchgeführten Tests treffen, weiterhin wurde keine Korrelation zwischen Infarktgröße und -verteilung und den Ergebnissen der Verhaltenstests gefunden.

#### 4.3 Funktionelle Regeneration

Die durch den Eingriff ausgelösten Verhaltensänderungen waren in den durchgeführten Versuchen reversibel. Bei den meisten Tests waren die zu beobachtenden Effekte bereits in der 2. Woche nach der Operation nicht mehr nachweisbar. Spätestens in der 3. Woche waren sie vollständig verschwunden.

Auch die Scheinoperationsmäuse wiesen in den ersten Tagen nach dem Eingriff Veränderungen auf. Diese waren jedoch nur bei wenigen Tests (Chimney linksseitige Gruppe, Walking Intention rechtsseitige Gruppe) statistisch signifikant.

Effekte, die von Scheinoperationstieren gezeigt wurden, zeigten den Einfluss von Anästhesie und Nachschlafzeit auf das Verhalten auf.

Hunter verweist in einer Veröffentlichung 2000 ebenfalls auf Verhaltensänderungen von Scheinoperation Tieren. Er schreibt dies der Tatsache zu, dass ein Eingriff vorgenommen

---

wird, ungeachtet der Art des Eingriffs. Zu beobachten sei dies vor allem in den ersten 24 h nach dem Eingriff (Hunter et al. 2000).

In einer im Jahr 2000 veröffentlichten Studie zeigt auch Bland grundsätzliche Unterschiede zwischen MCAO und scheinoperationsbehandelten Gruppen auf. Er erklärt dies mit einer geringeren Menge an Cortextgewebe bei einer MCAO unterzogenen Tieren (Bland et al. 2000).

Eine weitere mögliche Erklärung bieten die Ergebnisse einer früheren Veröffentlichung. Laut diesen Daten führen einseitige cortikale Infarkte nachweislich sowohl zu einer verminderten Glukose-Versorgung, als auch zu einem verminderten cerebralen Blutfluss in beiden Hemisphären (Dietrich et al. 1986b; Dietrich et al. 1986c). Eine Normalisierung des Metabolismus der kontralateralen Hemisphäre findet erst 5-10 Tage nach einer cerebralen Ischämie statt.

Die Reversibilität der Effekte einer durchgeführten MCAO Operation lässt sich jedoch nicht allein durch einen nachlassenden Einfluss der Anästhetika erklären.

Auch Grabowski beschrieb 1993 die oftmals spontane Regeneration der Tiere nach einer experimentell durchgeführten MCAO, ein Effekt, der auch in dieser Studie beobachtet wurde (Grabowski et al. 1993). Eine signifikante Erholung der durch cerebrale Ischämie beeinträchtigten Funktionen findet laut früherer Studien allerdings nur bei Tieren mit einseitiger Läsion statt (Hurwitz et al. 1990). Bei Tieren mit beidseitiger cerebraler Ischämie sei ein solcher Effekt nicht vorhanden. Möglich ist dies, da nach einer einseitigen Schädigung des Gehirns die kontralateralen Regionen die Aufgaben des gestörten Gebietes übernehmen (Smith 1966).

Dies unterstützt McDaniel mit seinen Daten. Laut seiner Ergebnisse können Tiere nach einseitiger Zerstörung des parietalen Cortex diese Schäden teilweise kompensieren (McDaniel et al. 1995).

Ein Verhaltenstest überprüft eine oder mehrere Verhaltensweisen gleichzeitig, ist also selten ein solitärer Indikator für einen einzigen Sinn oder eine einzige Fähigkeit.

---

Fallen nun aufgrund einer cerebralen Ischämie bestimmte Fähigkeiten aus oder werden Verknüpfungen geschädigt, kann dies eine Umverlagerung der genutzten Sinne/Fähigkeiten zur Folge haben. Eine funktionelle Erholung der Tiere ist dann entweder ein Zeichen für den Gebrauch von Fähigkeiten/Sinnen, die vor der cerebralen Ischämie nicht in diesem Maße eingesetzt wurden, oder Zeichen einer Kompensation. Zusätzliche Kompensation erfolgt vermutlich durch einen vermehrten Gebrauch von Strukturen, welche außerhalb der „normalen Grenzen“ liegen und üblicherweise nicht vom sensorischen „Input“ erreicht werden (Rossini et al. 2001).

Die nach einseitiger MCAO zu beobachtenden Verhaltensänderungen führen Wakayama zu der Annahme, dass in bilateralen neurologischen Wegen kompensatorische Mechanismen vorhanden sind. Diese regulieren die neurologische Aktivität. Bei einseitiger MCAO werden sie geschädigt, eine Kompensation kann vorübergehend nicht mehr stattfinden. (Wakayama 1993). Beispielsweise spielt der ipsilaterale Cortex eine Rolle in der Bewegungskontrolle (Megirian et al. 1974). Er kann einen vollständigen oder partiellen Ausfall des kontralateralen Cortexes teilweise kompensieren. Da die hierfür nötigen zusätzlichen Verschaltungen einige Tage Zeit zur Entwicklung benötigen, kann die Kompensation nicht sofort erfolgen. Deutlich wird diese in der beginnenden Annäherung des Verhaltens an den Zustand vor der Operation.

Abhängig von der betroffenen Regionen und dem Ausmaß der Störungen infolge der Ischämie, tritt ein Erholungseffekt verschiedener Funktionen (messbar in der Rückkehr zu „Vor-der-Op-Verhalten“) unterschiedlich schnell auf. Die Beobachtung, dass eine Erholung in manchen Verhaltenstests deutlich schneller vonstatten geht, als in anderen, wurde bereits in früheren Arbeiten veröffentlicht (Hunter et al. 1995; Corbett und Nurse 1998). Diese Veröffentlichungen decken sich mit den in dieser Studie gezeigten Effekten, in denen die unterschiedlich langen Zeiträume, die zum Erreichen der vor der Operation Ergebnisse nötig waren, beobachtet wurden. Diese Effekte sind besonders deutlich im Vergleich der links- und rechtsseitigen Gruppen.

In den meisten Tests konnte ein Effekt lediglich in den ersten 7 Tagen nach dem Eingriff beobachtet werden (Chimney Test links- und rechtsseitig, Corner Test linksseitig, Händigkeit linksseitig, Zylinder Test rechtsseitig). Lediglich die Walking Intention ließ in der 2. Woche eine Differenzierung zwischen MCAO- und Scheinoperation Behandlung zu und traf eine Aussage über den Zeitpunkt der Behandlung.

Diskutiert werden verschiedene Mechanismen, die eine funktionelle Erholung des Gehirns nach einer cerebralen Ischämie ermöglichen. So zeigten Jones und Schallert in einer Veröffentlichung 1994 beispielsweise, dass als Resultat einer einseitigen Schädigung der kontralaterale Cortex an Dicke zunimmt, um ausfallende Funktionen zu kompensieren (Jones und Schallert 1994).

Hurwitz schreibt 1990 von einem erwiesenen Erholungsprozess nach einer cerebralen Ischämie. Für ihn besteht dieser Prozess aus 4 Teilen:

- 1.) Einer Anpassung oder Unterstützung des Verhaltens an die neuen Gegebenheiten.
- 2.) Die Auflösung von Effekten, die in der Ischämie peripheren Regionen liegen.
- 3.) Die Beendigung vorher existierender, nun schadhafter Verknüpfungen und
- 4.) eine strukturelle Reorganisation (Hurwitz et al. 1990).

Zusätzlich zur strukturellen Reorganisation sollen sich unterstützende Wege der Informationsübertragung etablieren, auch eine Hypersensitivität und vermehrte Bildung wichtiger Rezeptoren werden als Ursachen für eine funktionelle Erholung untersucht.

Neuere Studien unterstützen diese Ansätze und zeigen, dass auch in adulten Gehirnen eine kontinuierliche Neurogenese stattfindet. Diese ist im Fall einer cerebralen Schädigung erhöht, um eine Reparation der geschädigten Gebiete zu gewährleisten (Jiang et al. 2001; Jin et al. 2001; Arvidsson et al. 2002; Zhang et al. 2004). Zusätzlich zur erhöhten Neurogenese kommt es zu einem Wachstum der Axone und einer Einwanderung neuronaler Vorläuferzellen in die betroffene Region. Das Resultat stellen neue neuronale Netzwerke dar (Tonchev et al. 2003; Lichtenwalner und Parent 2006; Endres et al. 2008). Gemessen am

---

Rückgang der senso-motorischen Asymmetrie reduziert die Plastizität des Gehirns somit den Einfluss, den die Ischämie auf das Verhalten ausübt (Grabowski et al. 1993).

Ein weiterer, möglicher Faktor, der die schnelle Verminderung der Effekte beeinflusst, stellt das in dieser Studie durchgeführte „Environmental Enrichment“ dar. Jedem Tier wurden in seinem Käfig sowohl eine Toilettenpapierrolle als auch 2 Kleenextücher als Nestmaterial zur Verfügung gestellt. Frühere Studien zeigen einen erheblichen Einfluss von einer angereicherten Umgebung Enrichment auf die funktionelle Regeneration nach einem induzierten Schlaganfall (Johansson und Grabowski 1994; Ohlsson und Johansson 1995; Mattsson et al. 1997).

#### 4.4 **Histologische Auswertung**

Eine Korrelation konnte in dieser Untersuchung weder zwischen den einzelnen Verhaltenstest untereinander, noch zwischen der Histologie und den einzelnen Tests gefunden werden, weder für die linksseitig, noch für die rechtsseitig behandelten Gruppen.

Vorausgehende Studien weisen hier unterschiedliche Ergebnisse auf. So fand Li 2004 eine Korrelation zwischen Infarktgröße und Drehungen im Corner Test (Xiaoling Li 2004). Andere Autoren wiederum weisen auf eine mangelnde Korrelation hin.

Das Problem der nicht vorhandenen Korrelation zwischen Größe der ischämischen Läsion und der funktionellen Beeinträchtigung wird auch in der Humanmedizin beobachtet (STAIR 1999). In der Vergangenheit lieferten hierfür verschiedene Autoren unterschiedliche Hypothesen.

Laut Roof entstehen auch in dem die Ischämie umgebenden Gewebe neuronaler Zelltod und biochemische Änderungen des Gewebes. Die Verhaltensänderungen können hier begründet sein. Da dieses Gewebe nicht der eigentlichen Ischämie zugerechnet wird, ist eine Korrelation nicht gegeben (Roof et al. 2001).

Nicht zu vernachlässigen ist auch der Einfluss, welchen die cerebrale Ischämie selbst ausübt. Die Veränderungen, die in Folge auftreten, betreffen nicht nur den eigentlichen Ischämiekern. Metabolische Veränderungen werden ebenfalls in weiter entfernten kortikalen Regionen gefunden (Hurwitz et al. 1990).

Die in dieser Studie fehlende Korrelation zwischen der Infarktgröße und den betroffenen kortikalen Regionen und dem Verhalten kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum Einen, wie oben bereits diskutiert, erholen sich die cerebralen Funktionen im Versuchszeitraum von der Operation bis zur Perfusion. Zum Anderen stellt Verhalten einen sehr komplexen Mechanismus dar, der durch viele interne und externe Faktoren beeinflusst wird. Eine unterschiedlich starke Neugierde der Tiere kann bereits das Ergebnis im Zylinder Test beeinflussen, so dass sich dieser Test für unser Schlaganfallmodell als wenig aussagekräftig erwies. Die unterschiedliche Motivation und Lernfähigkeit der Tiere üben ebenfalls einen Einfluss aus. Aus diesem Grund gilt die möglichst standardisierte Umgebung mit minimalster Variation der äußeren Einflüsse als Grundvoraussetzung bei der Durchführung von Verhaltenstests.

Um der Vielzahl an möglichen statistischen Variablen gerecht zu werden, ist eine möglichst große Anzahl an Tieren je Gruppe nötig. Grundsätzlich war die Zahl der für diese Studie verwendeten Tiere mit insgesamt 81 Mäusen recht groß. Die Aufteilung in 4 Gruppen sowie der Ausschluss einiger Tiere verkleinerten diese jedoch sehr. Der Ausschluss erwies sich als nötig, da zum Beispiel das Fehlen der Vibrissae oder eine Verletzung des Auges starken Einfluss auf das Verhalten (Bsp. Corner Test) ausüben könnten.

Eine erneute Untersuchung der sich hier als aussagekräftig erwiesenen Verhaltenstests mit vergrößerten Gruppen könnte zu einer linearen Korrelation führen.

---

Weiterhin kann die Ursache für mangelnde Korrelation auch in der histologischen Auswertung der Infarkte liegen. Der Fokus liegt hierbei auf der Infarktgröße und den betroffenen kortikalen Regionen. Eine genaue Differenzierung der untergegangenen Zelltypen erfolgte nicht.

Aufgrund der Remodelling-Prozesse, die auf eine cerebrale Ischämie folgen, ist eine einmalige Analyse des Infarktes eventuell nicht aussagekräftig genug. Sinnvoll für weitere Untersuchungen wäre es, je Testtag sowohl die Größe, als auch die betroffenen Regionen des Infarktes zu überprüfen. Dies erfordert jedoch eine große Anzahl an Tieren. Alternativ wäre eine Untersuchung der Tiere mittels MRT-Scan je Testtag möglich. Die hierfür nötigen Narkosen könnten jedoch den Infarkt und das „Outcome“ der Tiere negativ beeinflussen.

Beim jetzigen Stand der Forschung kann keine exakte Aussage darüber getroffen werden, welche Region und darin enthaltenen Neuronen in der Verhaltenssteuerung welche Aufgaben übernehmen.

Somit bedeutet eine fehlende lineare Korrelation zwischen der Infarktgröße und den Ergebnissen des Verhaltenstests nicht, dass die von der cerebralen Ischämie betroffenen Strukturen keine Beteiligung am Verhalten haben.

#### 4.5 **Fazit**

In dieser Studie wurde erneut, wie bereits in früheren Studien, auch bei Tieren die vermehrte Nutzung einer der beiden Hemisphären nachgewiesen (Glick und Ross 1981; Diamond et al. 1983; Sherman und Galaburda 1984). Sowohl die bereits vor der induzierten MCAO festgestellte Händigkeit, als auch die im Zylinder Test nachgewiesene Asymmetrie zeigten, dass es nicht möglich ist, die Daten einer linksseitigen Schlaganfalloperation mit denen einer rechtsseitigen zu vergleichen. Der rechtsseitige Eingriff ergab aufgrund der Verhaltensasymmetrien keine Ergebnisse, wie sie aus einer einfachen Umwandlung linksseitiger Daten entstehen würden.

Die Interpretation der Ergebnisse muss daher für jede Seite individuell erfolgen.

Es wurden zwei einfach durchführbare, dennoch aussagekräftige Tests entdeckt.

Der Test der Walking Intention erlaubte vor allem in den ersten 3 Tagen post OP eine zuverlässige Aussage über die Behandlung (MCAO/Scheinoperation) sowie den Zeitpunkt.

Gleichzeitig war dieser Versuch der einzige, der sowohl für Mäuse der links-, als auch für rechtsseitigen MCAO Gruppen Effekte anzeigte. Die Messung des Körpergewichtes stellte ebenfalls einen zuverlässigen und leicht durchführbaren Test im Bezug auf Behandlung und Zeitpunkt dar.

Eine Aussage über die Infarktgröße oder die betroffenen Areale erlaubte keiner der Tests.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen deutlich die Versorgungsgebiete der Arteria cerebri media distalis und eine Beteiligung des Cortexes. Diese Resultate vereinfachen eine zukünftige Interpretation von Defiziten, auch solchen, die durch einen Verschluss der proximalen Arteria cerebri media distalis hervorgerufen werden.

## 5 Zusammenfassung

Die cerebrale Ischämie stellt heute die dritthäufigste Ursache für Tod und Behinderung im Erwachsenenalter dar. Die Erforschung wirksamer Substanzen gestaltet sich teilweise schwierig, da bei histologischen Studien das funktionelle Outcome vernachlässigt wird.

In dieser Studie fand mittels Verhaltenstest eine Überprüfung der motorischen und sensomotorischen Funktionen statt. Diese wurden in Bezug der betroffenen anatomisch-funktionellen Areale des Gehirns gesetzt.

Hierzu wurden 81 Mäuse je nach Behandlung in 4 Gruppen eingeteilt: linksseitige dMCAO, rechtsseitige dMCAO, linksseitige Scheinoperation und rechtsseitige Scheinoperation. Vor und nach dem Eingriff wurden die Tiere bestimmten Verhaltenstests nach einem ausgearbeiteten Protokoll unterzogen. Diese waren der Chimney Test, der Corner Test, eine Ganganalyse, die Händigkeit, das Hanging wire, die Walking Intention, der Zylinder Test, sowie, zur Überprüfung des Fressverhaltens, eine Messung des Körpergewichtes.

Nach Ablauf der Versuchsreihe wurden die Tiere perfundiert und das Gehirn entnommen. Die histologische Auswertung erfolgte nach einer Silberfärbung.

Die Verhaltenstests erwiesen sich als unterschiedlich sensitiv auf die Effekte der Operation. Keinerlei Effekte für das angewendete Modell zeigte der Zylinder Test, eingeschränkte Aussage erlaubte in der linksseitigen MCAO Gruppe der Hanging wire Test, sowie einige Aspekte der Ganganalyse (Schrittlänge rechts und links, sowie Schrittvarianz rechts).

Für die linksseitig operierten Tiere erwiesen sich der Chimney Test, der Corner Test und die Händigkeit als aussagekräftig in Bezug auf den Behandlungstag. Eine Unterscheidung zwischen MCAO- und Scheinoperation Behandlung ließen diese Tests nicht immer zu.

Sehr gute Resultate, auch in den rechtsseitig operierten Gruppen, ergaben die Latency to move und die Überprüfung des Körpergewichtes. Diese waren in der Lage, sowohl zwischen Behandlung, als auch zwischen den Testtagen zu differenzieren.

Die Infarkte stellten sich wie erwartet dar. Betroffen bei allen Tieren war das Hauptversorgungsgebiet der Arteria cerebri media. Nur einige wenige Tiere wiesen eine

deutlich vergrößerte Läsion auf. Die Infarkte wiesen jedoch signifikante Unterschiede in Bezug auf ihre Größe zwischen links- und rechtsseitiger MCAO auf.

Korrelationen bestanden nicht, weder zwischen den einzelnen Verhaltenstests, noch zwischen den Tests und der Infarktgröße oder der –verteilung.

## 6 Summary

Today cerebral ischemia is the 3<sup>rd</sup> most important cause of death or disability in adulthood. The investigation of neuroprotective substances is often difficult due to histological studies mostly neglect the functional outcome of the animals.

In this study the motor and sensorimotor functions of the mice were tested and correlated with the ischemia affected anatomical-functional areas of the brain, affected by ischemia.

Therefore 81 mice were distributed into 4 groups, depending on the underlying treatment: left dMCAO, right dMCAO, left sham surgery, right sham surgery.

Before and after the surgery the animals were tested in behavioural tests according to a fixed protocol. The tests were Chimney Test, Corner Test, Gait Analysis, Handedness, Hanging Wire, Walking Intention and cylinder Test. Additionally, the body weight was measured to monitor the effects of the treatment on general health.

On day 23 the mice were perfused, the brains were removed and frozen. After Silver Staining of cryosections the infarct size was measured.

The behavioural tests differed in their sensitivity towards cerebral ischemia.

The Cylinder Test detected no effects of the brain ischemia. The hanging wire test and the gait analysis, especially the stride length and the stride variance on the right side, were affected by left sided MCAO.

Meaningful results for animals treated by left sided dMCAO were found in the Chimney Test, Corner Test and Handedness. These tests distinguished the day of the test, but did not differ between dMCAO and Sham treated animals.

The Latency to move and measurement of the body weight showed good results in all of the 4 groups, even the mice treated on the right side. These tests were able to distinguish between the treatment as well as the day of testing.

The infarct size was limited to the cortex in the territory of the middle cerebral artery. The lesion size differed between the left and right dMCAO mice. There were no correlations found between the behavioural tests, or the behavioural tests and the infarct size.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alkayed, N.J., I. Harukuni, A.S. Kimes, E.D. London, R.J. Traystman, and P.D. Hurn. 1998. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* **29**: 159-65; discussion 166.
- Aronowski, J., R. Strong, and J.C. Grotta. 1997. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**: 1048-56.
- Arsenijevic, D., F. de Bilbao, J. Plamondon, E. Paradis, P. Vallet, D. Richard, W. Langhans, and P. Giannakopoulos. 2006. Increased infarct size and lack of hyperphagic response after focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor beta-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**: 433-45.
- Arvidsson, A., T. Collin, D. Kirik, Z. Kokaia, and O. Lindvall. 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* **8**: 963-70.
- Astrup, J., B.K. Siesjo, and L. Symon. 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* **12**: 723-5.
- Back, T., T. Hemmen, and O.G. Schuler. 2004. Lesion evolution in cerebral ischemia. *J Neurol* **251**: 388-97.
- Back, T., K. Kohno, and K.A. Hossmann. 1994. Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab* **14**: 12-9.
- Baird, A.E., A. Benfield, G. Schlaug, B. Siewert, K.O. Lovblad, R.R. Edelman, and S. Warach. 1997. Enlargement of human cerebral ischemic lesion volumes measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* **41**: 581-9.

- Beckstead, R.M. 1978. Afferent connections of the entorhinal area in the rat as demonstrated by retrograde cell-labeling with horseradish peroxidase. *Brain Res* **152**: 249-64.
- Bederson, J.B., L.H. Pitts, M. Tsuji, M.C. Nishimura, R.L. Davis, and H. Bartkowski. 1986. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* **17**: 472-6.
- Belford, G.R. and H.P. Killackey. 1979. Vibrissae representation in subcortical trigeminal centers of the neonatal rat. *J Comp Neurol* **183**: 305-21.
- Berry, K., H.M. Wisniewski, L. Svarzbein, and S. Baez. 1975. On the relationship of brain vasculature to production of neurological deficit and morphological changes following acute unilateral common carotid artery ligation in gerbils. *J Neurol Sci* **25**: 75-92.
- Bland, S.T., T. Schallert, R. Strong, J. Aronowski, J.C. Grotta, and D.M. Feeney. 2000. Early exclusive use of the affected forelimb after moderate transient focal ischemia in rats : functional and anatomic outcome. *Stroke* **31**: 1144-52.
- Bouet, V., T. Freret, J. Toutain, D. Divoux, M. Boulouard, and P. Schumann-Bard. 2007. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol* **203**: 555-67.
- Bramlett, H.M. and W.D. Dietrich. 2001. Neuropathological protection after traumatic brain injury in intact female rats versus males or ovariectomized females. *J Neurotrauma* **18**: 891-900.
- Brola, W., M. Ziomek, and J. Czernicki. 2007. Fatigue syndrome in chronic neurological disorders. *Neurol Neurochir Pol* **41**: 340-9.
- Chan, P.H. 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* **27**: 1124-9.
- Chan, P.H. 2001. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**: 2-14.

- Chaudhuri, A. and P.O. Behan. 2004. Fatigue in neurological disorders. *Lancet* **363**: 978-88.
- Chen, S.T., C.Y. Hsu, E.L. Hogan, H. Maricq, and J.D. Balentine. 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* **17**: 738-43.
- Cohen, H.P., A.G. Waltz, and R.L. Jacobson. 1975. Catecholamine content of cerebral tissue after occlusion or manipulation of middle cerebral artery in cats. *J Neurosurg* **43**: 32-6.
- Collins, R.L. 1968. On the inheritance of handedness. I. Laterality in inbred mice. *J Hered* **59**: 9-12.
- Collins, R.L. 1969. On the inheritance of handedness. II. Selection for sinistrality in mice. *J Hered* **60**: 117-9.
- Collins, R.L. 1991. Reimpressed selective breeding for lateralization of handedness in mice. *Brain Res* **564**: 194-202.
- Connolly, E.S., Jr., C.J. Winfree, D.M. Stern, R.A. Solomon, and D.J. Pinsky. 1996. Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* **38**: 523-31; discussion 532.
- Corbett, D., S.J. Evans, and S.M. Nurse. 1992. Impaired acquisition of the Morris water maze following global ischemic damage in the gerbil. *Neuroreport* **3**: 204-6.
- Corbett, D. and S. Nurse. 1998. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* **54**: 531-48.
- Cowey, A. and T. Bozek. 1974. Contralateral 'neglect' after unilateral dorsomedial prefrontal lesions in rats. *Brain Res* **72**: 53-63.

- DeVries, A.C., R.J. Nelson, R.J. Traystman, and P.D. Hurn. 2001. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci Biobehav Rev* **25**: 325-42.
- Diamond, M.C., R.E. Johnson, D. Young, and S.S. Singh. 1983. Age-related morphologic differences in the rat cerebral cortex and hippocampus: male-female; right-left. *Exp Neurol* **81**: 1-13.
- Dietrich, W.D., M.D. Ginsberg, and R. Busto. 1986a. Effect of transient cerebral ischemia on metabolic activation of a somatosensory circuit. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**: 405-13.
- Dietrich, W.D., M.D. Ginsberg, R. Busto, and B.D. Watson. 1986b. Photochemically induced cortical infarction in the rat. 1. Time course of hemodynamic consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**: 184-94.
- Dietrich, W.D. 1986c. Photochemically induced cortical infarction in the rat. 2. Acute and subacute alterations in local glucose utilization. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**: 195-202.
- Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**: 391-7.
- Dittmar, Michael S., Fehm \* Nando P., MD, Vatankhah, 2 Bijan MD,2 and Horn, Markus MD2 (2004). "Ketamine/Xylazine Anesthesia for Radiologic Imaging of Neurologically Impaired Rats: Dose Response, Respiratory Depression, and Management of Complications " *Comparative Medicine* **Vol 54, No 6**: 652-655.
- Dobkin, B.H. 2008. Fatigue versus activity-dependent fatigability in patients with central or peripheral motor impairments. *Neurorehabil Neural Repair* **22**: 105-10.
- Durukan, A., D. Strbian, and T. Tatlisumak. 2008. Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for stroke drug development. *Curr Pharm Des* **14**: 359-70.

- Endres, K., Moskowitz. 1998. Apoptose und ischämischer Infarkt. *Der Nervenarzt* **69**: 459-464.
- Endres, M. and U. Dirnagl. 2002. Ischemia and stroke. *Adv Exp Med Biol* **513**: 455-73.
- Endres, M., B. Engelhardt, J. Koistinaho, O. Lindvall, S. Meairs, J.P. Mohr, A. Planas, N. Rothwell, M. Schwaninger, M.E. Schwab, D. Vivien, T. Wieloch, and U. Dirnagl. 2008. Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis* **25**: 268-78.
- Feigin, V.L., C.M. Lawes, D.A. Bennett, and C.S. Anderson. 2003. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* **2**: 43-53.
- Fox, G., D. Gallacher, S. Shevde, J. Loftus, and G. Swayne. 1993. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. *Stroke* **24**: 2087-92; discussion 2092-3.
- Franklin, K.B.J.P.G. 1997. *The Mouse brain in Stereotaxic Coordinations*.
- Fukuda, T., S. Nakano, I. Yoshiya, and P.H. Hashimoto. 1993. Persistent degenerative state of non-pyramidal neurons in the CA1 region of the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience* **53**: 23-38.
- Gandevia, S.C. 2001. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev* **81**: 1725-89.
- Garcia, J.H. 1984. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* **15**: 5-14.
- Gibson, C.L., P.M. Bath, and S.P. Murphy. 2005. G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**: 431-9.

- Ginsberg, M.D. 1997. The new language of cerebral ischemia. *AJNR Am J Neuroradiol* **18**: 1435-45.
- Ginsberg, M.D. 2002. Hyperglycemia and stroke outcome: vindication of the ischemic penumbra. *Ann Neurol* **52**: 5-6.
- Ginsberg, M.D. and R. Busto. 1989. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* **20**: 1627-42.
- Gionet, T.X., J.D. Thomas, D.S. Warner, C.R. Goodlett, E.A. Wasserman, and J.R. West. 1991. Forebrain ischemia induces selective behavioral impairments associated with hippocampal injury in rats. *Stroke* **22**: 1040-7.
- Gladstone, D.J., S.E. Black, and A.M. Hakim. 2002. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* **33**: 2123-36.
- Glick, S.D. and D.A. Ross. 1981. Right-sided population bias and lateralization of activity in normal rats. *Brain Res* **205**: 222-5.
- Grabowski, M., P. Brundin, and B.B. Johansson. 1993. Paw-reaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats. *Stroke* **24**: 889-95.
- Grabowski, M., C. Nordborg, P. Brundin, and B.B. Johansson. 1988. Middle cerebral artery occlusion in the hypertensive and normotensive rat: a study of histopathology and behaviour. *J Hypertens* **6**: 405-11.
- Grabowski, M., C. Nordborg, and B.B. Johansson. 1991. Sensorimotor performance and rotation correlate to lesion size in right but not left hemisphere brain infarcts in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res* **547**: 249-57.
- Graham D, O.E., Park CK, Nehls DG, Teasdale G.M., McCulloch J. 1989. *Protective effects of the NMDA antagonist MK-801, on focal ischemic brain damage*. New York Raven Press Publishers.

- Haelewyn, B., T. Freret, E. Pacary, P. Schumann-Bard, M. Boulouard, M. Bernaudin, and V. Bouet. 2007. Long-term evaluation of sensorimotor and mnesic behaviour following striatal NMDA-induced unilateral excitotoxic lesion in the mouse. *Behav Brain Res* **178**: 235-43.
- Hakim, A.M. 1987. The cerebral ischemic penumbra. *Can J Neurol Sci* **14**: 557-9.
- Hara, H., P.L. Huang, N. Panahian, M.C. Fishman, and M.A. Moskowitz. 1996. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**: 605-11.
- Hata, R., K. Maeda, D. Hermann, G. Mies, and K.A. Hossmann. 2000. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**: 306-15.
- Heinecke, H. 1987. A comparison of two variants of the chimney behaviour test in mice. *Z Versuchstierkd* **29**: 145-8.
- Hossmann, K.A. 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* **36**: 557-65.
- Hossmann, K.A. 2004. Genetically modified animals in molecular stroke research. *Acta Neurochir Suppl* **89**: 37-45.
- Hossmann, K.A. 2006. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* **26**: 1057-83.
- Hossmann, K.A. 2008. Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* **55**: 257-70.
- Hunter, A.J., A.R. Green, and A.J. Cross. 1995. Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends Pharmacol Sci* **16**: 123-8.

- Hunter, A.J., J. Hatcher, D. Virley, P. Nelson, E. Irving, S.J. Hadingham, and A.A. Parsons. 2000. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* **39**: 806-16.
- Hurwitz, B.E., W.D. Dietrich, P.M. McCabe, B.D. Watson, M.D. Ginsberg, and N. Schneiderman. 1990. Sensory-motor deficit and recovery from thrombotic infarction of the vibrissal barrel-field cortex. *Brain Res* **512**: 210-20.
- Jaworski, D.M., P. Soloway, J. Caterina, and W.A. Falls. 2006. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)-deficient mice display motor deficits. *J Neurobiol* **66**: 82-94.
- Jevtovic-Todorovic, V., R.E. Hartman, Y. Izumi, N.D. Benshoff, K. Dikranian, C.F. Zorumski, J.W. Olney, D.F. Wozniak. 2003. Early exposure to common anesthetic agents cause widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* **23**: 876-82.
- Jiang, W., W. Gu, T. Brannstrom, R. Rosqvist, and P. Wester. 2001. Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* **32**: 1201-7.
- Jin, K., M. Minami, J.Q. Lan, X.O. Mao, S. Batteur, R.P. Simon, and D.A. Greenberg. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4710-5.
- Johansson, B.B. and M. Grabowski. 1994. Functional recovery after brain infarction: plasticity and neural transplantation. *Brain Pathol* **4**: 85-95.
- Jones, T.A. and T. Schallert. 1994. Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage. *J Neurosci* **14**: 2140-52.
- Kahn, K. 1972. The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* **22**: 510-5.

- Kaneko, D., N. Nakamura, and T. Ogawa. 1985. Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: development of a new experimental model. *Stroke* **16**: 76-84.
- Karhunen, H., A. Pitkanen, T. Virtanen, I. Gureviciene, R. Pussinen, A. Ylinen, J. Sivenius, J. Nissinen, and J. Jolkkonen. 2003. Long-term functional consequences of transient occlusion of the middle cerebral artery in rats: a 1-year follow-up of the development of epileptogenesis and memory impairment in relation to sensorimotor deficits. *Epilepsy Res* **54**: 1-10.
- Katsura, K., T. Kristian, and B.K. Siesjo. 1994. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* **22**: 991-6.
- Kilic, E., U. Kilic, M. Bacigaluppi, Z. Guo, N.B. Abdallah, D.P. Wolfer, R.J. Reiter, D.M. Hermann, and C.L. Bassetti. 2008. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res* **45**: 142-8.
- Kinouchi, H., C.J. Epstein, T. Mizui, E. Carlson, S.F. Chen, and P.H. Chan. 1991. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 11158-62.
- Kitagawa, K., M. Matsumoto, G. Yang, T. Mabuchi, Y. Yagita, M. Hori, T. Yanagihara. 1998. Cerebral Ischemia After Bilateral Carotid Artery Occlusion and Intraluminal Occlusion in Mice: Evaluation of the Patency of the Posterior Communication Artery. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**: 570-579.
- Kjellstrom, T., B. Norrving, and A. Shatchkute. 2007. Helsingborg Declaration 2006 on European stroke strategies. *Cerebrovasc Dis* **23**: 231-41.
- Kudo, M., A. Aoyama, S. Ichimori, and N. Fukunaga. 1982. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* **13**: 505-8.

- Kumor, K. and K. Pierzchala. 2006. The problem of fatigue in neurological disorders. *Wiad Lek* **59**: 685-91.
- Levine, S. and D. Sohn. 1969. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch Pathol* **87**: 315-7.
- Levy, D.E. and J.B. Brierley. 1974. Communications between vertebro-basilar and carotid arterial circulations in the gerbil. *Exp Neurol* **45**: 503-8.
- Li Zhang, T.S., Zheng Gang Zhang, Quan Jiang, Polly Arniego, Qingjiang Li, Mei lu, Michael Chopp. 2002. A test for long-term sensomotory dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods* **117**: 207-214.
- Lichtenwalner, R.J. and J.M. Parent. 2006. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**: 1-20.
- Lightfoote, W.E., 2nd, G.F. Molinari, and T.N. Chase. 1977. Modification of cerebral ischemic damage by anesthetics. *Stroke* **8**: 627-8.
- Lipton, S.A. and P. Nicotera. 1998. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium* **23**: 165-71.
- Loepke A.W., S.G. Sorriano. 2008. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. *Anesth Analg* **106**: 1681-707.
- Mattsson, B., J.C. Sorensen, J. Zimmer, and B.B. Johansson. 1997. Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments. *Stroke* **28**: 1225-31; discussion 1231-2.

- McDaniel, W.F., J.D. Via, J.S. Smith, D.L. Wells, J.J. Fu, J.F. Bishop, P.A. Boyd, and H.M. Ledesma. 1995. Unilateral injury of posterior parietal cortex and spatial learning in hooded rats. *Behav Brain Res* **70**: 165-79.
- Mead, G., J. Lynch, C. Greig, A. Young, S. Lewis, and M. Sharpe. 2007. Evaluation of fatigue scales in stroke patients. *Stroke* **38**: 2090-5.
- Megirian, D., O. Buresova, J. Bures, and S. Dimond. 1974. Electrophysiological correlates of discrete forelimb movements in rats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **36**: 131-9.
- Mhairi Macrae, I. 1992. New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol* **34**: 302-8.
- Michenfelder, J.D. and J.H. Milde. 1975. Influence of anesthetics on metabolic, functional and pathological responses to regional cerebral ischemia. *Stroke* **6**: 405-10.
- Mies, G., T. Iijima, and K.A. Hossmann. 1993. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* **4**: 709-11.
- Molinari, G.F., J.P.L. 1976. A Classification of Experimental Models of Brain Ischemia. *Stroke* **7**: 14-17.
- Nedergaard, M. and J. Astrup. 1986. Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [14C]2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**: 607-15.
- Ogata, J., M. Fujishima, Y. Morotomi, and T. Omae. 1976. Cerebral infarction following bilateral carotid artery ligation in normotensive and spontaneously hypertensive rats: a pathological study. *Stroke* **7**: 54-60.
- Ohlsson, A.L. and B.B. Johansson. 1995. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke* **26**: 644-9.

- Olsen, T.S., B. Larsen, M. Herning, E.B. Skriver, and N.A. Lassen. 1983. Blood flow and vascular reactivity in collaterally perfused brain tissue. Evidence of an ischemic penumbra in patients with acute stroke. *Stroke* **14**: 332-41.
- Olsson, Y., R.M. Crowell, and I. Klatzo. 1971. The blood-brain barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery. *Acta Neuropathol* **18**: 89-102.
- Onodera, H., H. Aoki, and K. Kogure. 1993. Long-term structural and biochemical events in the hippocampus following transient global ischemia. *Prog Brain Res* **96**: 271-80.
- Orset, C., R. Macrez, A.R. Young, D. Panthou, E. Angles-Cano, E. Maubert, V. Agin, and D. Vivien. 2007. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* **38**: 2771-8.
- Osborne, K.A., T. Shigeno, A.M. Balarsky, I. Ford, J. McCulloch, G.M. Teasdale, and D.I. Graham. 1987. Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **50**: 402-10.
- Payan, H.M. and J.R. Conrad. 1977. Carotid ligation in gerbils. Influence of age, sex, and gonads. *Stroke* **8**: 194-6.
- Perel, P., I. Roberts, E. Sena, P. Wheble, C. Briscoe, P. Sandercock, M. Macleod, L.E. Mignini, P. Jayaram, and K.S. Khan. 2007. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ* **334**: 197.
- Pulsinelli, W.A. and J.B. Brierley. 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* **10**: 267-72.
- Pulsinelli, W.A. and A.M. Buchan. 1988. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* **19**: 913-4.

- Rocha-Filho, P. A., J. L. Gherpelli, et al. (2009). "Post-craniotomy headache: a proposed revision of IHS diagnostic criteria." Cephalalgia.
- Roth, D.M., J.S. Swaney, N.D. Dalton, E. A. Gilpin, J. Ross. 2002. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**: 2134-2140.
- Roof, R.L., G.P. Schielke, X. Ren, and E.D. Hall. 2001. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke* **32**: 2648-57.
- Rosenblum, W.I. and F. El-Sabban. 1977. Platelet aggregation in the cerebral microcirculation: effect of aspirin and other agents. *Circ Res* **40**: 320-8.
- Rossini, P.M., F. Tecchio, V. Pizzella, D. Lupoi, E. Cassetta, and P. Pasqualetti. 2001. Interhemispheric differences of sensory hand areas after monohemispheric stroke: MEG/MRI integrative study. *Neuroimage* **14**: 474-85.
- R.S.T.A.I. 1999. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* **30**: 2752-8.
- Ryan, C.L., T.A. Doucette, D.A. Gill, K.D. Langdon, Y. Liu, M.A. Perry, and R.A. Tasker. 2006. An improved post-operative care protocol allows detection of long-term functional deficits following MCAo surgery in rats. *J Neurosci Methods* **154**: 30-7.
- Saha, Dhanonjoy C., \*Saha, Animita C, † Malik, Gautam, † Astiz, Mark E, and Rackow, Eric C‡ (2007). "Comparison of Cardiovascular Effects of Tiletamine–Zolazepam, Pentobarbital, and Ketamine–Xylazine in Male Rats." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* **Vol 46, No 2**: Pages 74–80.
- Saito, I., H. Segawa, Y. Shiokawa, M. Taniguchi, and K. Tsutsumi. 1987. Middle cerebral artery occlusion: correlation of computed tomography and angiography with clinical outcome. *Stroke* **18**: 863-8.

- Scharfman, H.E. 2007. The CA3 "Backprojection" to the Dentate Gyrus. *Prog Brain Res* **163**: 627-637.
- Schallert, T., S.M. Fleming, J.L. Leasure, J.L. Tillerson, and S.T. Bland. 2000. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* **39**: 777-87.
- Schallert, T., M. Upchurch, N. Lobaugh, S.B. Farrar, W.W. Spirduso, P. Gilliam, D. Vaughn, and R.E. Wilcox. 1982. Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacol Biochem Behav* **16**: 455-62.
- Seyfried, D.M., Y. Han, D. Yang, J. Ding, S. Savant-Bhonsale, M.S. Shukairy, and M. Chopp. 2008. Mannitol enhances delivery of marrow stromal cells to the brain after experimental intracerebral hemorrhage. *Brain Res* **1224**: 12-9.
- Sharp, S., Honkaniemi, Kogure, Massa. 1998. Neurochemistry and Molecular Biology. In *Stroke Pathophysiology, Diagnosis, and Management* (ed. B.M., Mohr, J.P. and Yatsu, F.M.), pp. 51-71. Churchill Livingstone.
- Shellshear, J.L. 1927. The Arteries of the Brain of the Orang-utan. *J Anat* **61**: 167-197.
- Sherman, G.F. and A.M. Galaburda. 1984. Neocortical asymmetry and open-field behavior in the rat. *Exp Neurol* **86**: 473-82.
- Shigeno, T., G.M. Teasdale, J. McCulloch, and D.I. Graham. 1985. Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability, and brain edema. *J Neurosurg* **63**: 272-7.

- Siesjo, B.K., E. Elmer, S. Janelidze, M. Keep, T. Kristian, Y.B. Ouyang, and H. Uchino. 1999. Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir Suppl* **73**: 7-13.
- Smith, A. 1966. Speech and other functions after left (dominant) hemispherectomy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **29**: 467-71.
- Smith, S.E., H. Hodges, P. Sowinski, C.M. Man, M.J. Leach, J.D. Sinden, J.A. Gray, and B.S. Meldrum. 1997. Long-term beneficial effects of BW619C89 on neurological deficit, cognitive deficit and brain damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuroscience* **77**: 1123-35.
- Sokoloff, L. 1999. Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochem Res* **24**: 321-9.
- STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable). 1990. Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development. *Stroke* **30**: 2752-2758.
- Stevenson, G. W., E. J. Bilsky, et al. (2006). "Targeting pain-suppressed behaviors in preclinical assays of pain and analgesia: effects of morphine on acetic acid-suppressed feeding in C57BL/6J mice." *J Pain* **7**(6): 408-16.
- Stys, P.K., B.R. Ransom, S.G. Waxman, and P.K. Davis. 1990. Role of extracellular calcium in anoxic injury of mammalian central white matter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4212-6.
- Symon, L., N.A. Lassen, J. Astrup, and N.M. Branston. 1977. Thresholds of ischaemia in brain cortex. *Adv Exp Med Biol* **94**: 775-82.

- Takeda, K., Y. Gomi, I. Imai, N. Shimoda, M. Hiwatari, and H. Kato. 2007. Shift of motor activation areas during recovery from hemiparesis after cerebral infarction: a longitudinal study with near-infrared spectroscopy. *Neurosci Res* **59**: 136-44.
- Tamura, A., D.I. Graham, J. McCulloch, and G.M. Teasdale. 1981. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **1**: 53-60.
- Tomita. 2005. Pathophysiology of brain edema. In: *Cerebrovascular Disease* (eds. Kalimo), pp. 33-46. Neuropaht. Basel, Basel.
- Tonchev, A.B., T. Yamashima, L. Zhao, H.J. Okano, and H. Okano. 2003. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci* **23**: 292-301.
- Valtysson, J., L. Hillered, P. Andine, H. Hagberg, and L. Persson. 1994. Neuropathological endpoints in experimental stroke pharmacotherapy: the importance of both early and late evaluation. *Acta Neurochir (Wien)* **129**: 58-63.
- Vogel, J., C. Mobius, and W. Kuschinsky. 1999. Early delineation of ischemic tissue in rat brain cryosections by high-contrast staining. *Stroke* **30**: 1134-41.
- Wahlgren, N.G. and N. Ahmed. 2004. Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* **17 Suppl 1**: 153-66.
- Wakayama, A., K. Kataoka, et al. 1993. Evaluation of masked neurological disorders in the chronic stage after middle cerebral artery occlusion in rats- metamphetamine-induced rotation and regional glucose metabolism in basal ganglia. *Neurol Med Chir* **33** : 801-8.

- Wang, X., J. Liu, H. Zhu, E. Tejima, K. Tsuji, Y. Murata, D.N. Atochin, P.L. Huang, C. Zhang, and E.H. Lo. 2008. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia. *Stroke* **39**: 1869-74.
- Watson, B.D., W.D. Dietrich, R. Busto, M.S. Wachtel, and M.D. Ginsberg. 1985. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* **17**: 497-504.
- Wheat, N. J. and D. M. Cooper (2009). "A simple method for assessing analgesic requirements and efficacy in rodents." *Lab Anim (NY)* **38**(7): 246-7.
- Woodhams, P.L., M.R. Celio, N. Ulfig, and M.P. Witter. 1993. Morphological and functional correlates of borders in the entorhinal cortex and hippocampus. *Hippocampus* **3 Spec No**: 303-11.
- Woolsey, T.A. and H. Van der Loos. 1970. The structural organization of layer IV in the somatosensory region  $\curvearrowright$ SI $\curvearrowleft$  of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* **17**: 205-42.
- Xiaoling Li, K.K.B., Zhiyuan Zeng, A. Courtney DeVries, Patricia D. Hurn, Luise McCullough. 2004. Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender. *Exp Neurol* **187**: 94-104.
- Yonemori, F., T. Yamaguchi, H. Yamada, and A. Tamura. 1998. Evaluation of a motor deficit after chronic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**: 1099-106.
- Zhang, R., Z. Zhang, C. Zhang, L. Zhang, A. Robin, Y. Wang, M. Lu, and M. Chopp. 2004. Stroke transiently increases subventricular zone cell division from asymmetric to symmetric and increases neuronal differentiation in the adult rat. *J Neurosci* **24**: 5810-5.

Zhang, Y.Q., J. Shi, G. Rajakumar, A.L. Day, and J.W. Simpkins. 1998. Effects of gender and estradiol treatment on focal brain ischemia. *Brain Res* **784**: 321-4.

Zola-Morgan, S., L.R. Squire, and D.G. Amaral. 1986. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* **6**: 2950-67.

## 8 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: MECHANISMEN DER CEREBRALEN ISCHÄMIE:.....	3
ABBILDUNG 2: VENTRALANSICHT DES GEHIRNS:.....	9
ABBILDUNG 3: ZEITTADEL VERHALTENSTESTS .....	21
ABBILDUNG 4: CORNER TEST APPARATUR    ABBILDUNG 5: VOLLES AUFRICHTEN EINER MAUS.....	23
ABBILDUNG 6: AUSWERTUNG GANGANALYSE:.....	24
ABBILDUNG 7: COLLINS APPARATUR.....	25
ABBILDUNG 8: ZYLINDER TEST .....	27
ABBILDUNG 9: ZEITTADEL MESSUNG KÖRPERGEWICHT .....	28
ABBILDUNG 10: SILBER GEFÄRBTER SCHNITT, TAG 23: .....	30
ABBILDUNG 11: FARBGEBUNG INFARKT KARTIERUNG .....	31
ABBILDUNG 12: CHIMNEY TEST LINKSSEITIG OPERIERTER GRUPPEN: .....	34
ABBILDUNG 13: CHIMNEY TEST RECHTSSEITIG OPERIERTER GRUPPEN: .....	35
ABBILDUNG 14: CORNER TEST LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN:.....	36
ABBILDUNG 15: CORNER TEST RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	37
ABBILDUNG 16: SCHRITTLÄNGE RECHTE SEITE, LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN:.....	38
ABBILDUNG 17: SCHRITTLÄNGE RECHTE SEITE, RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	39
ABBILDUNG 18: SCHRITTLÄNGE LINKE SEITE, LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN:.....	40
ABBILDUNG 19: SCHRITTLÄNGE LINKE SEITE, RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN:.....	41
ABBILDUNG 20: SCHRITTVARIANZ RECHTE SEITE, LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	42
ABBILDUNG 21: SCHRITTVARIANZ RECHTE SEITE, RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	43
ABBILDUNG 22: SCHRITTVARIANZ LINKE SEITE, LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN:.....	44
ABBILDUNG 23: SCHRITTVARIANZ LINKE SEITE, RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	45
ABBILDUNG 24: SCHRITTBASIS LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	46
ABBILDUNG 25: SCHRITTBASIS RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	47
ABBILDUNG 26: HÄNDIGKEIT LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	48
ABBILDUNG 27: HÄNDIGKEIT RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	49
ABBILDUNG 28: HANGING WIRE TEST LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN:.....	50
ABBILDUNG 29: HANGING WIRE RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	51
ABBILDUNG 30: LATENCY TO MOVE LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN:.....	53
ABBILDUNG 31: LATENCY TO MOVE RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	54
ABBILDUNG 32: ZYLINDER TEST LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN:.....	55
ABBILDUNG 33: ZYLINDER TEST RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	56
ABBILDUNG 34: KÖRPERGEWICHT LINKSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN:.....	57
ABBILDUNG 35: KÖRPERGEWICHT RECHTSSEITIG OPERIERTE GRUPPEN: .....	59
ABBILDUNG 36: CORNER TEST IM LINKSSEITIGEN FADENMODELL: .....	60

ABBILDUNG 37: INFARKTGRÖßEN NACH LINKS- UND RECHTSSEITIGER MCAO: .....	60
ABBILDUNG 38: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER INFARKTE AN TAG 2 UND TAG 23: ....	61
ABBILDUNG 39: KARTIERUNG LINKSSEITIGER MCAO NACH 48 H:.....	62
ABBILDUNG 40: KARTIERUNG LINKSSEITIGER MCAO AN TAG 23: .....	63
ABBILDUNG 41: KARTIERUNG RECHTSSEITIGER MCAO AN TAG 23:.....	64
ABBILDUNG 42: KARTIERUNG LATERALANSICHT 48 H NACH EINGRIFF:.....	65

## 9 Veröffentlichungen

Auszüge aus dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht

- 1.) Behavioral function in distal middle cerebral artery occlusion of the mouse. Lubjuhn, J. Bargiotas, P., Schwaninger, M. 2008. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*.(377);Suppl 1, 232, Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abstracts of the 49th Annual Meeting 11-13 March 2008, Mainz, Germany.
  
- 2.) Lubjuhn J. Gastens A., von Wilpert G., Bargiotas P., Herrmann O., Murikinati S., Rabie T., Marti H., Amende I., Hampton TG., Schwaninger M. 2009. Functional testing in a mouse stroke model induced by occlusion of the distal middle cerebral artery. *J Neurosci Methods*. Received 30.6.2009, Received in revised form 27.07.2009, Accepted 28.07.2009, Epub August 2009.

---

## 10 Anhang

Die angegebenen Lösungen zur Färbung wurden wie folgt verwendet

### 10.1 Avertinlösung (Stammlösung)

1 g Fluka (Sigma)-2,2,2-Tribromoethanol –10g Cat No# 90710, gelöst in  
0,5 ml Amyl Ethanol

### Avertinlösung (Gebrauchslösung)

Die Gebrauchslösung wurde jeden Tag frisch angemischt und mittels Sterilfilter gefiltert

0,125 ml Avertin-Stammlösung  
10 ml 0,9% NaCl- Lösung (Firma Braun)

### 10.2 Entwicklerlösung

6,6 g Natriumcitrat  
1,8 g Hydrochinon  
90 ml Aceton  
120 ml Formaldehyd  
420 ml H<sub>2</sub>O

### 10.3 Silber-Imprägnierlösung

0,8 ml LiCO<sub>3</sub>  
3,375 ml Silbernitrat  
25 % Ammonium Hydroxid  
607,50 ml H<sub>2</sub>O

## 11 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

## 12 Danksagung

Danken möchte ich natürlich all denen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Dies sind insbesondere:

Professor Dr. Martin Bergmann für die bereitwillige Annahme als Doktorandin und die intensive Korrektur der Arbeit.

Professor Dr. Markus Schwaninger aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg für die tolle Betreuung während der gesamten Zeit. Seine Anregungen, Unterstützung sowie das jederzeit offene Ohr erleichterten die Arbeit und motivierten jederzeit aufs Neue.

Die gesamte Arbeitsgruppe Schwaninger des Pharmakologischen Institutes der Universität Heidelberg für die tolle Arbeitsatmosphäre und große Hilfsbereitschaft, auf die man jederzeit zählen kann. Natürlich auch für die eine oder andere Tasse Kaffee, „wenn gerade mal gar nichts mehr ging“.

Dr. Tamer Rabi für seine Bereitschaft und Zeit, die Mäuse mittels Fadenmodell für mich zu operieren.

Meiner Familie für die Geduld und Unterstützung, aber auch denn Ansporn, die sie mir während der gesamten Zeit entgegenbrachte.

Meinen Freunden, die immer für mich da sind und ein offenes Ohr haben.

---

---