

**Hirnaktivität und Verhalten von Ratten nach
ischämischen Hirnläsionen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sonja Reinecke

aus Hildesheim

2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. O. W. Witte

Korreferent: Prof. Dr. J. P. Huston

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2001

Danksagung

Herrn Professor Dr. O. W. Witte, Oberarzt der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Überlassung des Themas, die stets hilfreichen Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima in seinem Labor.

Herrn Professor Dr. J. P. Huston, Institut für Physiologische Psychologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Betreuung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. H.-J. Freund, Direktor der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Herrn Privatdozent Dr. H. Dinse, Institut für Neuroinformatik an der Ruhr-Universität in Bochum, sowie Herrn Dr. H. Reinke danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Herrn Professor T. Schallert, Department of Psychology an der University of Texas at Austin, sowie Frau D. Kozlowski und Frau J. L. Leasure danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen bin ich zu Dank verpflichtet für ihre Diskussionsbereitschaft, die experimentellen Anregungen und praktischen Hilfestellungen. Vor allem bedanke ich mich bei Herrn Dr. C. Bruehl, Herrn Dr. G. Hagemann, Herrn Dr. K. Holthoff, Herrn Dr. M. Lutzenburg, Frau Dipl.-Biol. H. Niermann und Herrn Dr. K. Schiene. Mein besonderer Dank gilt Frau S. Hamm und Frau D. Steinhoff.

Meinem Lebensgefährten Dr. Karsten Eulenberg und meiner Familie danke ich für die hilfreiche und liebevolle Unterstützung.

Für Karsten

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	11
2.1 Versuchstiere	11
2.2 Anästhesie und Kontrolle der Körpertemperatur	11
2.3 Infarktinduktion durch Okklusion der mittleren Cerebralarterie (MCAO)	12
2.4 Induktion der photothrombotischen Läsion	15
2.5 Elektrophysiologische Ableitungen von Gehirnschnittpräparaten <i>in vitro</i>	16
2.6 Taktile Stimulation und Ableitung rezeptiver Felder der Hinterpfoten <i>in vivo</i>	19
2.7 Verhaltenstests	22
2.7.1 Bilateraler Stimulationstest	22
2.7.2 Fehlritte beim Laufen auf einem Gitter	24
2.7.3 Streckenschwimmen im Aquarium	26
2.7.4 Aufrichten im Glaszylinder	27
2.8 Histologische Verifikation der Läsionen	31
3. Ergebnisse	33
3.1 Feldpotentiale nach extrazellulärer Reizung im Neokortex nach MCAO <i>in vitro</i>	33
3.2 Veränderungen der rezeptiven Felder der Hinterpfote <i>in vivo</i>	36
3.3 Verhaltenstests	46
3.3.1 Bestimmung der Läsionsposition und -größe	46
3.3.2 Bilateraler Stimulationstest	48
3.3.3 Fehlritte beim Laufen auf einem Gitter	50
3.3.4 Streckenschwimmen im Aquarium	52
3.3.5 Aufrichten im Glaszylinder	54
4. Diskussion	66
4.1 Die Infarktmodelle	66
4.2 Elektrophysiologische Diaschisis <i>in vitro</i>	68
4.3 Elektrophysiologische Diaschisis <i>in vivo</i>	69
4.4 Asymmetrien in der Pfortennutzung	73
5. Zusammenfassung	84
6. Literatur	85
Anhang	91

Abkürzungen

aCSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
CCA	Arteria carotis communis
ECA	externe Arteria carotis communis
FL	sensomotorisches Areal der Vorderpfote
Fr1	Frontaler Kortex, Areal 1
Fr2	Frontaler Kortex, Areal 2
Fr3	Frontaler Kortex, Areal 3
GABA	γ -Aminobuttersäure
HL	sensomotorisches Areal der Hinterpfote
ICA	interne Arteria carotis communis
LFP	evoziertes lokales Feldpotential
MCA	mittlere Cerebralarterie
MCAO	mittlere zerebral Arterien Okklusion
Oc2	sekundärer occipitaler Kortex
Par1	primärer parietaler Kortex
PBS	phosphatgepufferte Normalsalzlösung
PSTH	Poststimulushistogramm
RSA	retrosplenialer agranularer Kortex
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Vita brevis, ars longa

Hippokrates

Das Gehirn ist das zentrale Steuerungsorgan des Körpers, dessen komplexe Anatomie und Physiologie uns immer noch Rätsel aufgibt. Alle lebenswichtigen Prozesse werden vom Gehirn kontrolliert und gesteuert. Dies wird von uns aber erst bewußt wahrgenommen, wenn Krankheiten das zentrale Nervensystem (ZNS) betreffen. Pathologische Veränderung führen zu ernsthaften Krankheitsbildern, die oft lebensbedrohend sind oder zu einschneidenden Veränderungen im Leben der Betroffenen führen. Neben der Steuerung der Körperfunktionen ist das ZNS das Organ, welches die Psyche und das Verhalten ausmacht. Daher ist die Erforschung der normalen biologischen Funktionen des Gehirns und deren pathologischen Veränderungen von entscheidender Bedeutung. Die Aufklärung der ablaufenden Mechanismen ist der erste Schritt in der Therapie der pathophysiologischen Veränderungen des ZNS. Dementsprechend beschäftigen sich viele Arbeiten mit pathologischen Prozessen und den Möglichkeiten ihrer Behandlung.

Als Todesursache steht der Schlaganfall in den Industrieländern nach Herzinfarkt und Krebserkrankungen an dritter Stelle (PFEFFERKORN & HABERL, 1996). Um die Therapien für Schlaganfallpatienten verbessern zu können, brauchen wir mehr Wissen über die pathophysiologischen Folgen eines Infarktes im Gehirngewebe und deren zeitlichen Verlauf. Die ablaufenden Prozesse sind vielfältig und komplex miteinander verknüpft. Neben therapeutischen Ansätzen, die vor allem auf die Reduktion des infarzierten Gebiets abzielen, ist es für zukünftige Behandlungsmethoden wichtig, die funktionelle Beeinträchtigung des umgebenden und weiter entfernten Hirngewebes eingehend zu untersuchen. Von besonderem Interesse sind die Prozesse, die eine funktionelle Erholung beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Folgen eines Schlaganfalls an Hand von zwei etablierten Ischämie-Modellen an Ratten (*Rattus norvegicus familiaris*, Linné) untersucht. Zum einen wurde die mittlere Zerebralarterie verschlossen (MCAO-Modell). Dies ähnelt dem Mediainfarkt beim Patienten. Beim zweiten Modell

handelt es sich um eine photothrombotische Läsion, die eine kleine lokale ischämische Schädigung in allen Kortexschichten induziert.

Dabei ist bekannt, daß fokale zerebrale Ischämien nicht nur die direkte Umgebung durch die Verminderung des Blutflusses schädigen. Es können auch entfernte Hirnareale und die kontralaterale Hemisphäre von den Folgen des Infarktes funktionell betroffen sein. Für diese vom Kern der Ischämie entfernten Effekte prägte VON MONAKOW (1895, 1914) den Begriff der Diaschisis. Beispielsweise wird von einem verringerten Blutfluß berichtet, der sich nach 7 bis 14 Tagen im zum Infarkt homotopen Areal nachweisen läßt (LAGREZE et al. 1987, DOBKIN et al. 1989). Aber die funktionelle Bedeutung dieser Veränderungen ist noch nicht ganz verstanden. Vielleicht bilden sie die Voraussetzungen für eine funktionelle Erholung oder sind die Ursache einer neuronalen Übererregbarkeit, die im extremen Fall zu epileptischen Anfällen führen kann. Diese Epilepsien entwickeln sich bei 14 - 18 % der Schlaganfallpatienten (KOTILA & WALTIMO 1992, SO et al. 1996).

BUCHKREMER-RATZMANN et al. (1996) konnten zeigen, daß in der Umgebung einer photothrombotischen Läsion die GABAerge Hemmung reduziert ist. Die daraus resultierende Übererregbarkeit konnte auch im Kortex der kontralateralen Hemisphäre nachgewiesen werden. Durchgeführt wurden diese Studien an koronalen Hirnschnittpräparaten. Dazu wurde der Kortex in der Schicht VI elektrisch stimuliert und die Reizantwort in Schicht II/III abgeleitet. Mit dem angewendeten Doppelpuls-Paradigma konnte eine deutliche Reduktion der intrakortikalen Hemmung nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, ob diese Übererregbarkeit für ischämische Insulte allgemeine Gültigkeit besitzt. Deshalb sollten diese Daten in der ersten Experimentalserie dieser Doktorarbeit an einem weiteren pathologischen Ischämiemodell untersucht werden. Dazu wurden Ableitung am Hirnschnittpräparat von Tieren, bei denen ein großer medialer Infarkt (MCAO) erzeugt wurde, angewendet. Da der Mediainfarkt bei Patienten oft auftritt, ist das Verständnis der Diaschisiseffekte von besonderer Bedeutung.

Als Folge eines Infarktes können Störungen in der Körperwahrnehmung und der Positionsbestimmung im Raum auftreten. Bei Patienten mit einer Läsion im temporo-parieto-okzipitalen Bereich des Kortex ist z. B. das Gerstmann-Syndrom beschrieben. Dabei werden Fingeragnosien, Rechts-Links-Desorientierung,

Agraphien und Akalkulie diagnostiziert. Taktile Sensibilitätsstörungen, wie sie bei Fingeragnosien vorkommen, können im Tiermodell mit Hilfe von somatosensorischen Karten des Kortex untersucht werden, d.h. die rezeptiven Felder des Körpers werden in ihrer kortikalen Repräsentation mit Mikroelektroden abgeleitet. Die Methode wurden von MERZENICH et al. (1978) an Primaten etabliert. Mit dieser Technik konnten NUDO et al. (1996a) ebenfalls an Primaten zeigen, daß sich durch gezieltes Training der Nutzung einer Hand ihre motorische Repräsentation im Kortex verändert. Außerdem konnten die Auswirkungen eines ischämischen Infarktes und die anschließende Rehabilitation untersucht werden (NUDO et al. 1996b, 1997). Dabei zeigten die Tiere eine Erholung durch gezieltes Training der vom Infarkt betroffenen Hand. Eine Funktionsübernahme durch verbleibendes gesundes Gewebe im Motorkortex konnte nachgewiesen werden. Bei genauer Analyse der Greifbewegung der Primaten zeigte sich auch ein sensorisches Defizit, obwohl die Läsion nur den motorischen Kortex betraf und nicht den sensorischen Kortex (NUDO et al. 2000). Auch im sensomotorischen Kortex der Ratte konnten plastische Veränderungen in den rezeptiven Feldern der Vorderpfote nachgewiesen werden (COQ & XERRI 1998). Dabei führten die Lernmöglichkeiten und Erfahrungen, die diese Tiere bei einer Haltung in einer anregenden Umgebung (*enriched-environment*) hatten, zu einer Verkleinerung der rezeptiven Felder im Vergleich zu Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden. All diese Untersuchungen weisen plastische Veränderungen nach und zeigen, daß auch die Läsionsumgebung von der Läsion beeinflußt wird. Um die möglichen Veränderungen von rezeptiven Felder in den dazugehörenden kortikalen Repräsentationen verstehen zu können, soll im folgenden der Aufbau der Reizleitungskaskade und des Gehirns erläutert werden.

Im Gehirn werden drei funktionelle Haupttypen von Neuronen differenziert. Unterschieden werden Motoneuronen, sensorische Neuronen und Interneuronen. Motoneuronen innervieren Muskelzellen, übertragen dabei die Informationen aus dem ZNS und setzen sie in Muskelbewegungen um. Sensorische Neuronen sind an der afferenten Übertragung von Signalen aus der Körperperipherie (Exteroception) oder aus dem Körperinneren (Enteroception, Proprio- und Viszeroception) beteiligt. Bei den Interneuronen wird zwischen Relais- oder Projektionsinterneuronen und lokalen Interneuronen unterschieden. Ein

Relaisneuron hat ein langes Axon, das Informationen zu einem entfernten Zielneuron übermittelt. Im Unterschied dazu hat ein lokales Interneuron ein kurzes Axon, das Informationen innerhalb einer bestimmten Gehirnregion übermittelt.

Die Rezeptorneuronen der Körperperipherie sind über sensorische Fasern mit dem Rückenmark, dem Hirnstamm, dem Thalamus und dem Kortex verbunden. Dieser Verlauf mit seinen Verschaltungen ist in Abbildung 1.1 am Beispiel einer Hinterpfote der Ratte dargestellt. Eine Berührung der Fußsohle wird von der Ratte wahrgenommen, wenn eine Population von Mechanorezeptoren Aktionspotentiale durch die afferenten Fasern des Fußes schickt. Dadurch werden bestimmte Zellpopulationen in den Hinterstrangkernen des Thalamus und in dem mit ihnen verbundenem Kortexareal der Hinterpfote (HL) aktiviert. Die afferenten sensorischen Nervenbahnen sind seriell/hierarchisch organisiert. Die Rezeptoren projizieren zu Neuronen erster Ordnung, diese wiederum zu Neuronen zweiter und dritter Ordnung. Dabei sind die sensorischen Bahnen aus der Peripherie zum ZNS anatomisch so organisiert, daß die räumlichen Relationen zwischen den Rezeptoren in der Peripherie auch im Kortex bewahrt werden. Nervenfasern von primären Sinneszellen, die benachbarte rezeptive Felder eines Fußsohlenbereiches abdecken, bilden Verbindungen mit nebeneinanderliegenden Neuronen zweiter Ordnung. Dieses Prinzip der Somatotopie setzt sich bis in die höheren Verarbeitungsebenen des ZNS fort. Ein rezeptives Feld wird definiert als der Teilbereich einer Fläche mit Rezeptoren der Haut, der bei Reizung dasselbe Neuron erregt. Dies ist das wichtigste Charakteristikum eines primären sensorischen Neurons. Die Größe des Feldes hat entscheidende Bedeutung für die räumliche Auflösung eines sensorischen Systems. Eine hohe Auflösung wird durch Neuronen mit kleinen rezeptiven Feldern erreicht. JOHNSON (1974) und GARDNER & PALMER (1989a, b) konnten zeigen, daß gerade sichtbare Eindrücke in die Hautoberfläche, die in einem Bereich von 250 bis 500 µm liegen, dem mittleren Dynamikbereich entspricht, in dem die kutanen Mechanorezeptoren ansprechen. Stärkere Stimulationen erregen nicht-kutane Rezeptorzellen im Inneren des Fußes. Diese haben einen höheren Schwellenwert für taktile Stimulationen, wie sie beispielsweise bei Bewegungen des ganzen Fußes auftreten.

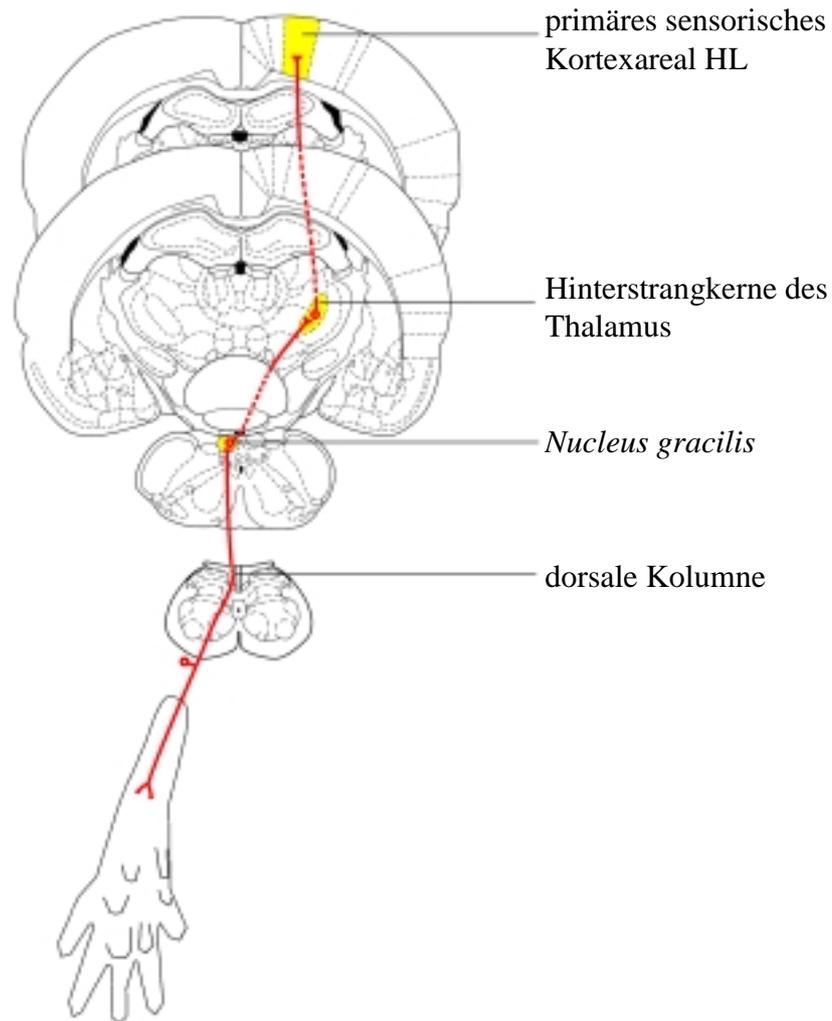


Abbildung 1.1: Organisation der sensorischen Reizleitung. Drei Neuronen (rot) verbinden den peripheren Receptorbereich (die Fußsohle) mit dem Kortex. Das erste Neuron (das primäre sensorische Neuron) ist ein Receptor, der durch Berührungen stimuliert wird. Das neuronale Signal wird durch die weiße Substanz des Rückenmarks (dorsale Kolumne) bis in den Hirnstamm (*Nucleus gracilis*) weitergeleitet. Das zweite Neuron überträgt die Information zum Hinterstrangkern des Thalamus, der die wichtigste sensorische Schaltstation des Gehirns ist. Vom Thalamus ausgehend übermittelt das dritte Neuron in dieser Reizleitungskaskade die sensorische Information zum primären sensorischen Kortex, wo sie mit Neuronen der Schicht IV verschaltet sind.

Zur optimalen Erkennung eines Reizes dient die laterale Hemmung, indem sie den Reizkontrast verstärkt. Die laterale Hemmung ist am besten im visuellen Kortex untersucht. Sie beruht darauf, daß die rezeptiven Felder der sensorischen Projektionsneuronen sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Komponenten enthalten. Die sensorischen Relaisneuronen empfangen konvergente erregende Eingänge von vielen primären sensorischen Neuronen. Dabei erregen die präsynaptischen Neuronen aus dem Zentrum des rezeptiven Feldes das

Relaisneuron viel effektiver als Neuronen von der Peripherie des rezeptiven Feldes. Hierdurch entsteht ein Erregungsgradient innerhalb des rezeptiven Feldes.

Um diesen Gradienten zu verstärken, bilden die Rezeptorneuronen auch Verknüpfungen mit inhibitorischen Interneuronen aus. Die Rezeptorneuronen, die das Zentrum eines rezeptiven Feldes innervieren, sind aufgrund der stärkeren erregenden Verknüpfung gegenüber hemmenden Einflüssen weniger empfindlich als die Neuronen in der Peripherie des rezeptiven Feldes. Aufgrund des exzitatorischen Gradienten und des inhibitorischen Feldes ist es unwahrscheinlich, daß das Relaisneuron durch Stimuli aktiviert wird, die in der Peripherie des rezeptiven Feldes eintreffen. Durch diesen Mechanismus wird die Größe des rezeptiven Feldes fokussiert und die Schärfe des sensorischen Systems erhöht. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 1.2 vereinfacht schematisiert.

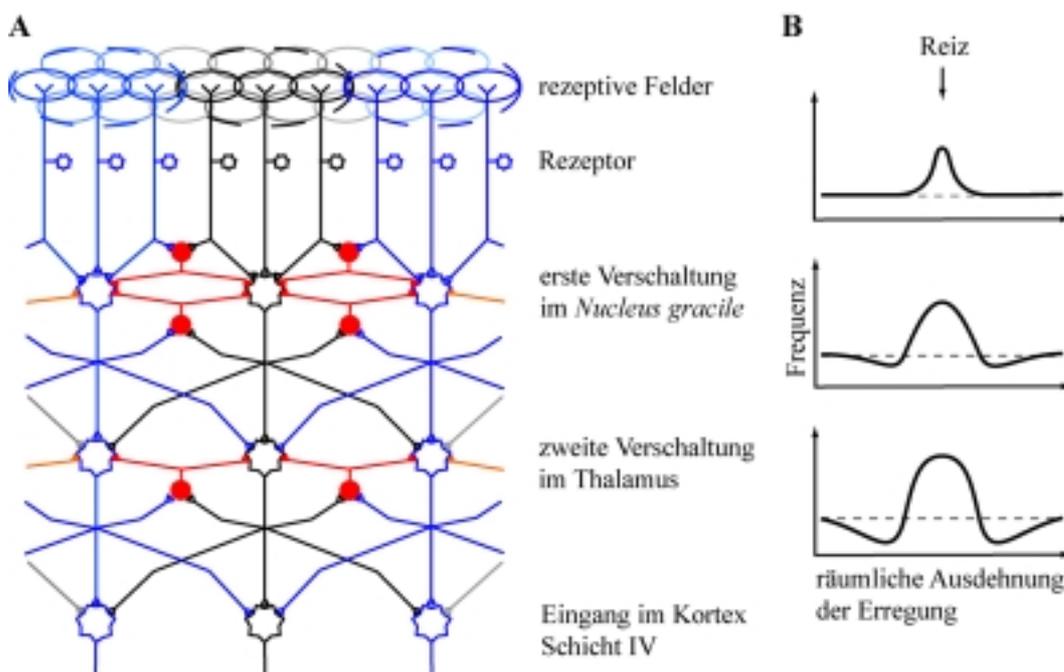


Abbildung 1.2: Kontrastverstärkung durch laterale Hemmung. **A** zeigt ein Schema der exzitatorischen synaptischen Verbindungen von Rezeptoren zu den Projektionsneuronen der folgenden Reizleitungskaskade. Die rezeptiven Felder der Rezeptoren sind als kleine Kreise um die Rezeptorendigungen in der Haut dargestellt. Das rezeptive Feld der nachgeschalteten Neuronen ist die Summe aller Rezeptorfelder und ist als großer gestrichelter Kreis angedeutet. Kommt es durch hemmende Interneuronen (rot) zu einer lateralen Inhibition, bleibt ein Erregungsgebiet auch an den folgenden Schaltstationen begrenzt. **B** zeigt eine Auftragung der Erregungsverteilung in einer Neuronenpopulation in der Region des Reizes. Auf der Y-Achse ist die Entladungsfrequenz dargestellt, die X-Achse zeigt die räumliche Verteilung der Zellpopulation. An jeder Seite des exzitatorischen Gebietes sinkt die Entladungsrate durch die Feedback-Inhibition unter das Ruhenniveau (grau Linie). Die Erregungsbegrenzung bewirkt eine Kontrasterhöhung. (Verändert nach KANDELL et al. 1996)

Auch bei der weiterleitenden Verschaltung sind benachbarte Neuronen über hemmende Interneuronen verschaltet. Bei einer Aktivierung eines Neurons werden die Nachbarneuronen durch die Interneuronen inhibiert. Dies führt zu einer weiteren Verstärkung des Signalkontrastes (KANDEL et al. 1996).

Im *Nucleus gracilis*, Thalamus und Kortex sind über hemmende Interneuronen zwei weitere inhibitorische Mechanismen wirksam, die als Feedback- und Feedforward-Hemmung bezeichnet werden. Bei der Feedback-Hemmung handelt es sich um einen inhibitorischen Schaltkreis, in dem ein Neuron ein inhibitorisches Interneuron erregt, das eine Feedback-Verbindung zum ersten Neuron besitzt. Dieser Schaltkreistyp stellt eine Form der Selbstregulation dar. Auch die Feedforward-Inhibition ist ein Mechanismus der Selbstregulation. Bei dieser reziproken Hemmung erregt ein Neuron direkt eine Zielzelle und hemmt sie gleichzeitig indirekt. Die indirekte Hemmung erfolgt über ein zwischengeschaltetes inhibierendes Interneuron, das durch das erste Neuron erregt wird und das Zielneuron hemmt (KANDEL et al. 1996).

Aufgrund dieser Reizleitungskaskade läßt sich eine Veränderung der rezeptiven Felder der Hinterpfotenrepräsentation erwarten, wenn diese Hemisphäre von einer Läsion betroffen ist. Die rezeptiven Felder der Hinterpfote sollten vergrößert sein, nachdem die Läsion eine Reduzierung der intrakortikalen Hemmung verursacht hat. In dieser Studie wurde die Läsion 1,5 - 2,0 mm anterior zur Hinterpfotenrepräsentation induziert und die rezeptiven Felder beider Hinterpfoten 7 - 8 Tage nach Läsionsinduktion untersucht.

Nach einem Infarkt sind nicht nur morphologische Strukturen und der elektrophysiologische Informationsaustausch zwischen Neuronen im Gehirn verändert, sondern als Folge dessen treten auch funktionelle Störungen auf. Diese können sich in Agnosien und Ataxien äußern und behindern daher basales Verhalten, wie z. B. die Lokalisierung von Berührungen auf der Haut oder das Erkennen von Gegenstände durch Abtasten. Somit ist der nächste Schritt die Untersuchung der resultierenden funktionellen Störungen, um die Folgen und Veränderungen nach einem Infarkt zu verstehen.

Die bisher dargestellten Experimente befassen sich mit physiologischen Veränderungen. Diese sollten sich auch in einer Veränderung der Funktion niederschlagen. Um diese funktionellen Veränderungen zu analysieren, sind Verhaltenstests nötig, die sich am morphologischen und elektrophysiologischen

Wissen über die Funktionen des entsprechenden Kortexareals orientieren, das durch die Läsion betroffenen ist. Nach Läsionen muß ein Test die Möglichkeit bieten, gezielt Defizite im Verhalten nachweisen zu können. Diese Definition einer Funktion wird den verschiedenen kortikalen Arealen bei ZILLES (1985) zugewiesen. Dem frontalen Kortex der Ratte werden motorische Aufgaben zugeschrieben. Elektrische kortikale Stimulationsexperimente in diesem Areal zeigen Reaktionen der Zunge, des Kiefers oder Drehbewegungen der Schulter- und Handgelenke (NEAFSEY et al. 1986). Außerdem werden die zwei Areale FL und HL definiert, welche die Somatomotorik der Vorder- bzw. Hinterpfote repräsentieren. Der distale Kortex enthält die Bereiche, die zum parietalen Kortex mit primären und sekundären sensorischen Funktionen gezählt werden, sowie den visuellen Kortex.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Verhaltenstests, die Defizite in der Pfotennutzung untersuchen soll. Mit einem bilateralen Stimulationstest, bei dem Aufkleber die sensible Wahrnehmung an den Vorderpfoten stimulieren, wird überwiegend die Sensorik getestet. Sowohl die Sensorik als auch die Motorik kann in Verhaltenstests untersucht werden, bei denen die Tiere über ein Gitter laufen oder sich an der Wand eines Glaszylinders abstützen. All diese Tests konnten Defizite bei Läsionen nachweisen, die das somatomotorische Vorderpfotenareal betreffen. BARTH et al. (1990) haben elektrolytische Läsionen in mehreren Kortexarealen induziert und mit einer Reihe von Verhaltenstests die Erholung von daraus resultierenden Asymmetrien der Vorderpfotennutzung untersucht. Dabei zeigten Tiere mit der Läsion im Vorderpfotenareal eine deutliche Erholung innerhalb eines Monats. Beim bilateralen Stimulationstest ist eine Erholung nach 28 Tagen nachgewiesen und beim Laufen über ein Gitter nach 14 Tagen. Auch in einer anderen Studien (SCHALLERT et al. 2000), in der die Vorderpfotennutzung bei verschiedenen pathologischen Modellen untersucht wurde, zeigten die Tiere mit einer elektrolytischen Läsion im Vorderpfotenareal eine deutliche Asymmetrie in der Benutzung der von der Läsion betroffenen Vorderpfote. Beim bilateralen Stimulationstest zeigten diese Tiere bis zum Tag 14 ein deutliches Defizit, das nach einem Monat schwächer aber noch nachweisbar war. In dieser Untersuchung wurde auch die Nutzung einer bzw. beider Vorderpfoten gleichzeitig in einem Glaszylinder analysiert. Hier zeigten die Tiere eine starke Asymmetrie in der Pfotennutzung zugunsten der gesunden Pfote.

Diese Asymmetrie zeigte sich besonders bei Bewegungen entlang der Wand (1 bis 14 Tage) und konnte noch bis zu einem Monat danach nachgewiesen werden. Auch bei der Analyse der Pfotennutzung bei der Landung auf dem Boden zeigte sich diese langanhaltende Asymmetrie, wenn auch nicht so stark ausgeprägt. Auch wenn nur zwischen linker und rechter Pfote unterschieden wurde, konnte bei Tieren mit elektrolytischer Läsion eine Asymmetrie in der Vorderpfotennutzung bis 17 Tage nach der Läsionsinduktion nachgewiesen werden (KOZLOWSKI et al. 1996).

Auch Tieren, bei denen eine Läsion durch Absaugen von Gewebe aus dem kortikalen Vorderpfotenareal induziert wurde, zeigten anschließend eine Asymmetrie in der Pfotenbenutzung (FORGIE et al. 1996). Untersucht wurde die Benutzung der geschädigten Vorderpfote versus der gesunden Pfote beim Aufrichten im Glaszylinder. Dabei zeigten diese Tiere nach der Läsion eine deutliche Asymmetrie zu Lasten der behinderten Pfote. An Tag 7 war eine leichte Erholung festzustellen, aber das Defizit blieb über den Untersuchungszeitraum von 17 Tagen erhalten.

Bei all diesen Test geht es um die Benutzung und Bewegung der Pfoten, aber auch das gezielte Ruhighalten einer Extremität kann durch die Folgen einer Läsion beeinträchtigt sein. Dabei wird davon ausgegangen, daß die Läsion zu einem Verlust der tonischen Muskelkontrolle führt. Diese Fragestellung wurde von STOLTZ et al. (1999) an schwimmenden Ratten untersucht. Normalerweise halten Ratten beim Geradeausschwimmen beide Vorderpfoten bewegungslos unter dem Kinn. Nach einer elektrolytischen Läsion führten die Tiere eine Art Paddel- oder Kraulbewegung mit der von der Läsion betroffenen Pfote aus. Dieses Defizit blieb bis zum Ende der Untersuchung nach 8 Wochen nachweisbar.

Daher wurde für die vorliegende Studie erwartet, daß eine photothrombotische Läsion, die das Vorderpfotenareal FL betrifft, mit ähnlichen morphologischen Ausmaßen auch ähnliche funktionelle Defizite verursacht wie sie oben beschrieben sind. Es sollte sich ein klares Defizit der „behinderten“, von der Läsion beeinträchtigten Pfote, nachweisen lassen. Dieses Defizit sollte sich in einer geringen Nutzung der Pfote an der Glaswand im Zylinder zeigen, sowie in einer erhöhten Fehlerrate beim Laufen über ein Gitter. Da auch eine Beeinträchtigung der Sensorik erwartet wurde, sollte sich dies mit dem bilateralen Stimulationstest nachweisen lassen. Auch beim Schwimmtest wurde erwartet, daß

das Photothrombosemodell einen nachweisbaren Verlust der kortikalen Bewegungskontrolle verursacht. Zur Untersuchung von Diaschisiseffekten wurde der sekundäre visuelle Kortex und der parietale Kortex durch eine photothrombotische Läsion partiell fokal geschädigt. Wie bei den rezeptiven Feldern wurde eine veränderte sensorische Wahrnehmung erwartet, die sich mit den auf sensorische Defizite abgestimmten Verhaltenstests nachweisen lassen sollte.

Zusammenfassend ergaben sich drei Fragestellungen für diese Arbeit. Erstens, können elektrophysiologische Daten von Tieren mit photothrombotischer Läsion in einem weiteren Ischämiemodell an Tieren mit Verschluss der mittleren Zerebralarterie (MCAO) reproduziert werden? Zweitens, lassen sich plastische Veränderungen im rezeptiven Feld der Hinterpfote in der Umgebung einer photothrombotischen Läsion nachweisen? Drittens, welche bekannten Verhaltenstests zur Nutzung der Pfoten sind am Besten geeignet, um ein Defizit nach einer photothrombotischen Läsion zu bestimmen und den Verlauf des Erholungsprozesses zu untersuchen?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden männliche Wistar-Ratten verwendet. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage Düsseldorf unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen bei 22 - 24 °C Raumtemperatur, 60 - 80 % relative Luftfeuchtigkeit und in einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit gehalten. Bei Versuchsbeginn wogen die Ratten 250 bis 330 g (dies entspricht einem ungefähren Alter von 2 ½ bis 3 Monaten). Sie hatten Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Gehalten wurde die Tiere in Standardkäfigen in Gruppen.

2.2 Anästhesie und Kontrolle der Körpertemperatur

Die Operationen zur Induktion von ischämischen Insulten (Kapitel 2.3 - 2.4) wurden unter Inhalationsnarkose mit Isofluran oder Enfluran (Abott GmbH) durchgeführt. Diese Narkosemittel wurden in einem Lachgas/Sauerstoffgemisch (N₂O/O₂ im Verhältnis 2:1) über eine Atemmaske den Tieren zugeführt, um eine Vollnarkose zu gewährleisten. Die Einleitung der Narkose erfolgte in einem mit 3,5 Vol.% Isofluran bzw. Enfluran vorgefluteten Glaszylinder. Nach zwei Minuten wurden die Tiere herausgenommen und über eine Atemmaske mit 2,5 bis 2,0 Vol.% Isofluran bzw. Enfluran weiter versorgt. Alle schmerzhaften Operationseingriffe wurden mit dieser Narkose durchgeführt. Zur Kontrolle der Körpertemperatur wurde ein elektronisches Thermometer 6,5 cm tief in das Rektum eingeführt. Durch eine Rückkopplung mit einer Heizwanne wurde die Körpertemperatur bei $37 \pm 0,5$ °C konstant gehalten. Die Narkose wurde mit 100%igem Sauerstoff ausgeleitet, um eine Hypoxie durch aus dem Gewebe ins Blut diffundierenden N₂O vorzubeugen.

Für die Experimente, die in Kapitel 2.6 beschrieben sind, wurde eine Narkose mit Urethan durchgeführt. Dafür wurde Urethan mit 1.2 - 1.5g/kg Körpergewicht (Carbaminsäure-Ethylester, Sigma, 20% w/v in 0.9% w/v NaCl in wässriger Lösung) intraperitoneal appliziert. Die Narkosetiefe wurde anhand von Schmerzreflexen regelmäßig geprüft. Erst nachdem keine Reflexe mehr ausgelöst werden konnten, wurde mit dem experimentellen Eingriff begonnen. Auch bei diesen Tieren wurde die Körpertemperatur über ein rückgekoppeltes

Thermometer-Heizkissen-System auf $37 \pm 0,5$ °C konstant gehalten. Um ein Austrocknen der Tiere zu vermeiden, wurde regelmäßig 1 ml isotonische Kochsalzlösung subkutan appliziert.

2.3 Infarktinduktion durch Okklusion der mittleren Cerebralarterie (MCAO)

Zur Okklusion der mittleren Cerebralarterie (MCA) wurde das sogenannte Fadenmodell unter leichten Abwandlungen nach der von LONGA et al. (1989) beschriebenen Methode angewendet.

Im ersten Schritt wurde das Okklusionsfilament aus Polyamidfäden und Silikonmedium hergestellt. Von den Polyamidfäden (Ethilon, 4/0; Sutupak, Ethicon) wurden 30 - 40 mm lange Stücke mit einem scharfen Skalpell abgeschnitten. Mit kreisenden Bewegungen wurde die Spitze dieses Filaments auf feinem Sandpapier abgerundet. In Aceton wurde das Filament gereinigt und unter Zuhilfenahme einer Fadenklemme in frisch vorbereitetes Silikonmedium (Provil L, Heraeus-Kulzer) getaucht. Überschüssiges Medium wurde so abgestrichen, daß es zur Spitze hin einen feiner werdenden Film bildete. Nach dem Abbinden des Silikonmediums (innerhalb weniger Minuten) wurde der Okkluder auf eine Länge von 25 mm gekürzt.

Unter Inhalationsnarkose mit Enfluran wurde an den Tieren ein medianer Halsschnitt durchgeführt und die Thymusdrüsen durch Fadenschlingen aus dem Operationsbereich gezogen und in dieser Stellung fixiert. Eine weitere Fadenschlinge wurde um die ventral zur Luftröhre verlaufenden Muskeln geschlungen, um diese zur linken Seite zu ziehen und zu fixieren. In Abbildung 2.3.1 sind die zervikalen und cranialen Gefäßverläufe bei der Ratte dargestellt. Der distale Abschnitt der rechten *Arteria carotis communis* (CCA) wurde vorsichtig von Bindegewebe und dem parallel verlaufenden *Nervus vagus* befreit. Präpariert wurde bis zu der Bifurkation in die interne (ICA) und die externe (ECA) *Arteria carotis communis*. Etwa 7 mm proximal der Bifurkation wurde die CCA mit einem Seidenfaden der Größe 5-0 ligiert. Zur späteren Fixierung des Okklusionsfilamentes wurde ein weiterer Faden ca. 4 mm distal lose um die CCA geschlungen. Außerdem wurde die ECA unmittelbar distal ihres Abgangs (noch proximal der *Arteria occipitalis*) abgebunden. Im Bereich der ICA wurde der

Blutstrom mit einem atraumatischen Mikroclip (Codman) im Bereich der Bifurkation unterbunden, um das Einführen des Okklusionsfilaments nach Inzision in die CCA ca. 4 mm proximal der Bifurkation zu ermöglichen. Das Filament wurde vorsichtig 16 bis 17,5 mm vorgeschoben, bis ein feiner Widerstand des Anfangsabschnitts der anterioren Cerebralarterie spürbar wurde. Dies führte zur Unterbrechung des Blutstroms in der mittleren Cerebralarterie. Zur Verifizierung der korrekten Lage des Filamentes wurde dessen Verlauf bis zum Abgang der *Arteria pterigopalatina* kontrolliert und der Endabschnitt des Filaments bis zur Mitte der Bifurkation (7,5 bis 9 mm) abgemessen. In dieser Position wurde das Filament mit Hilfe des Ligaturfadens um die distale CCA fixiert. Die Halswunde wurde vernäht und die Narkose ausgeleitet. Das Okklusionsfilament wurde 7 bis 8 Tage im Tier belassen, um eine permanente Okklusion zu gewährleisten.

Die so behandelten Tiere wurden nach 7 bis 8 Tagen getötet, um an Gehirnschnittpräparaten elektrophysiologische Untersuchungen durchführen zu können. Diese Methodik wird in Kapitel 2.5 dargestellt.

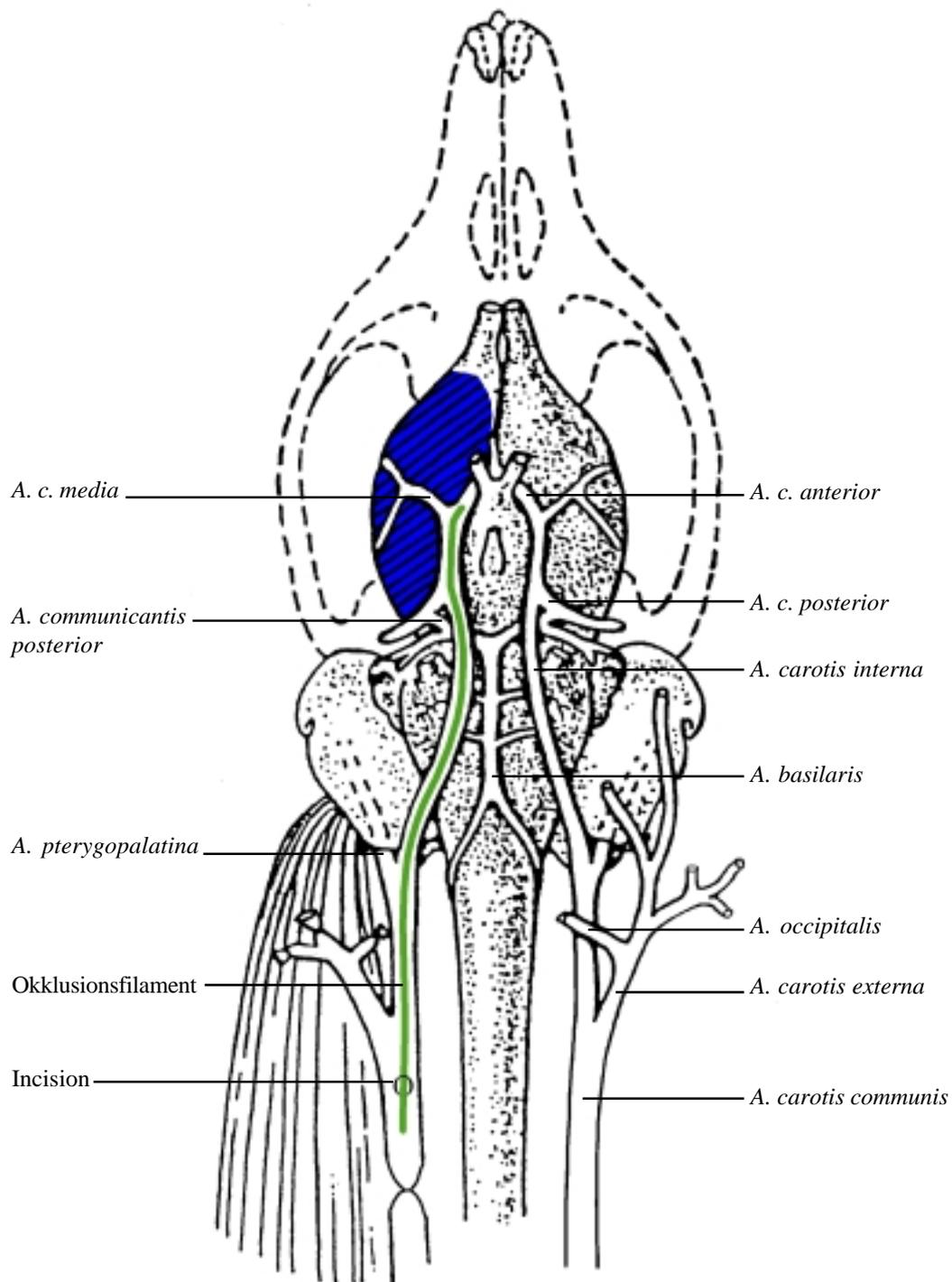


Abbildung 2.3.1: Induktion des Mediainfarktes. Über die rechte *Arteria carotis communis* wird ein Okkluder-Filament (grün) in die *Arteria carotis interna* bis zum Abgang der mittleren Cerebralarterie vorgeschoben. Der blau markiert Bereich zeigt das Areal, das nach dem Verschluss der Media nicht mehr durchblutet wird (verändert nach LONGA et al. 1989).

2.4 Induktion der photothrombotischen Läsion

Fokale neokortikale Läsionen wurden mit der photothrombotischen Methode nach WATSON et al. (1985) induziert. Den narkotisierten Tieren wurde über die Femoralvene ein Polyethylenkatheter eingeführt. Alternativ konnte auch eine Injektion über die Schwanzvene vorgenommen werden, da hierdurch keine Einschränkung der Nutzung der Hinterbeine zu erwarten war. An der stereotaktisch fixierten Ratte wurde ein Hautschnitt durchgeführt und die Kalotte freipräpariert. Die Belichtung über einen Kaltlichtleiter (Schott KL 1500, Intensitätsstufe 4) erfolgte durch die intakte Kalotte. Die Position der Belichtung wurde nach den stereotaktischen Angaben in den Atlanten von ZILLES (1985) und PAXINOS & WATSON (1997) ausgewählt und anhand der Schädelnähte mit Bezug auf Bregma bzw. Lambda bestimmt. Genaue Angaben zur jeweiligen Position finden sich in Tabelle 2.4.1 und unter den jeweiligen Experimenten. Die Blende des Lichtleiters variierte von 2,0 bis 3,0 mm. Zur Läsionsinduktion wurde der photosensitive Farbstoff Bengal Rosa (Dinatriumsalz des 3,4,5,6,-Tetrachloro-2',4',5',7'-tetrajodofluorescein 1 %ig (w/v) in 0,9 %iger Kochsalzlösung) appliziert. Die Farbstofflösung wurde nach Filtration durch einen Membranfilter über einen Zeitraum von ca. 1 min in einer Endkonzentration von etwa 10 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Mit Beginn der Applikation wurde auch die Belichtung begonnen und für 20 min aufrechterhalten. Durch Lichteinwirkung löst Bengal Rosa eine Schädigung des Endothels über freigesetzte Radikale und die Aggregation von Thrombozyten aus. Dadurch werden die Gefäße im belichteten Bereich thrombotisch verschlossen. Nach Abschluß der Belichtung wurden die Hautwunden vernäht und die Narkose ausgeleitet. Für Kontrollexperimente mit Schein-Photothrombosen wurde in der gleichen Weise vorgegangen, mit dem entscheidenden Unterschied, daß die Lichtquelle nicht eingeschaltet wurde. Die Methode ist in Abbildung 2.4.1 dargestellt.

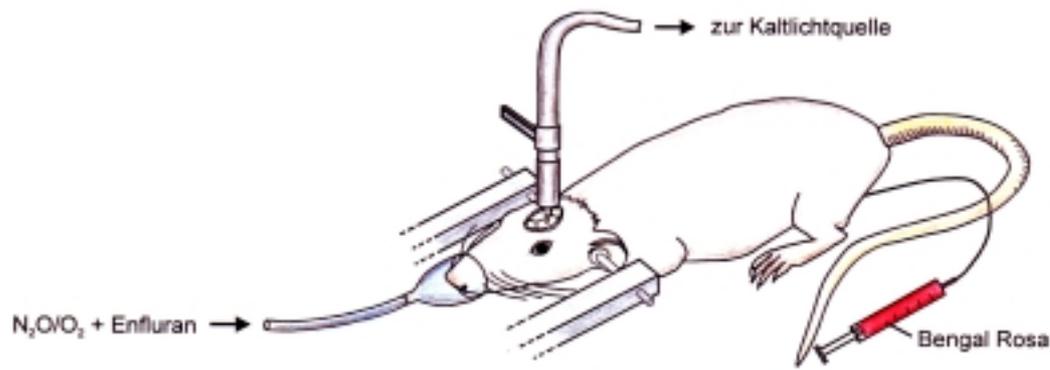


Abbildung 2.4.1: Induktion der photothrombotischen Läsion. Dazu wurde der photosensitive Farbstoff Bengal Rosa i.v. appliziert. Mit dem Kaltlichtleiter wurde durch die intakte Schädelkalotte der Bereich des Kortex belichtet, in dem die chemische Reaktion des Farbstoffs zum thrombotischen Verschluss der Blutgefäße führte.

Tabelle 2.4.1: Belichtungspositionen mit Angaben zum Blendendurchmesser und zum anschließend angewendeten Test

Areal	bezogen auf Bregma [mm]	Lateral zur Sagittalnaht [mm]	Betroffene Hemisphäre	Blendendurchmesser [mm]	Anschließendender Test
FL	+ 0,3	3,7	Pfotenpräferenz	2,5 - 3,0	Verhalten
Fr1/Fr2	+ 2,5	2,0	Pfotenpräferenz	3	Verhalten
Oc2/Par1	Mitte zwischen Bregma und Lambda	4,0	Pfotenpräferenz	2,5	Verhalten
remote HL	- 4,0	4,0	Rechte Hemisphäre	2,0	Rezeptive Felder

2.5 Elektrophysiologische Ableitungen von Gehirnschnittpräparaten *in vitro*

Elektrophysiologische Ableitungen wurden in der Regel 7 bis 8 Tage nach Okklusion der mittleren Cerebralarterie (MCA) durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten nicht operierte Tiere. Nach Enfluran-Narkose wurden die Ratten dekapitiert. Nach Entfernen der Kopfhaut, der Kaumuskulatur und einiger Schädelknochen wurde die harte Hirnhaut (*Dura mater*) entfernt und das Gehirn vorsichtig entnommen. Das Gehirn wurde in ein bereitstehendes Becherglas mit gekühlter (4 - 8 °C) artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) überführt (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.5.1). Mit einer entfetteten Rasierklinge wurden jeweils wenige Millimeter des frontalen und caudalen Gehirns abgetrennt. Von dem so vorbereiteten Gewebeblock wurde mit einem Vibratom (Leica VT 1000S) 400 µm dicke Hirnschnitte angefertigt. Die untersuchten Schnitte stammten alle aus einem Bereich zwischen Bregma -1 mm und Bregma -5 mm.

Die Schnitte wurden entweder direkt in eine *interface*-Kammer (HAAS et al. 1979) überführt oder in ein Sieb eines mit aCSF gefüllten und mit Carbogen begasten Vorratsgefäß gelegt. In der *interface*-Kammer wurden die Hirnschnitte mit Carbogen begast und mit aCSF umspült.

Die elektrophysiologischen Ableitungen begannen nach einer einstündigen Equilibrierungspause. Extrazelluläre multiunit-Ableitungen wurden in verschiedenen neokortikalen Arealen durchgeführt. Die Ableitelektrode (Borosilicatglas, GB100F8P, Science Products) wurde mit aCSF gefüllt und in Schicht II/III des Neokortex zur Aufnahme der Feldpotentiale positioniert. Die bipolare Reizelektrode (SNE-200X 50mm, Science Products) wurde in der gleichen Kolumne in Schicht VI positioniert. Die Elektroden wurden lateral entlang des Kortex von 2 bis 10 mm in 0,5 mm-Schritten verschoben. Gemessen wurde nur in der zum Infarkt kontralateralen Hemisphäre, da ipsilateral im nekrotischen Gewebe keine deutliche Reizleitung gemessen werden konnte (Abb. 2.5.1).

Um die intrakortikale Hemmung zu untersuchen, wurden im Abstand von 20 ms zwei Stromstöße von 50 μ s Länge appliziert. Die Reizstärke wurde von 10 bis 60 V variiert, wobei zwischen den einzelnen Reizreihen mindestens 20 s lagen.

Die registrierten Signale wurden 1000fach verstärkt, über einen Analog/Digitalwandler (CED 1401) mit einer Abtastrate von 10000 Hz auf einem Rechner gespeichert und mit den Programmen SIGAVG und Neuron (zur Verfügung gestellt von W. Wadman, Amsterdam) ausgewertet. Es wurde jeweils die Amplitude der Reizantwort aus der maximalen negativen Auslenkung des lokalen exzitatorischen Feldpotentials (LFP) und dem Maximum des nachfolgenden Überschingers bestimmt. Nach dem Doppelpuls-Paradigma kann aus der Amplitude der ersten und zweiten Antwort ein Quotient gebildet werden ($Q = LFP_2/LFP_1$). Der Quotient ermöglicht eine Aussage über den Grad der Hemmung, die nach der ersten Antwort auf die zweite Antwort wirkt. Ein Quotient mit dem Wert 0 steht für eine komplette Hemmung und der Wert 1 steht für keine hemmende Wirkung. Werte zwischen 0 und 1 stehen für die Stärke der wirkenden Hemmung. Für jede Position wurde die Antwort mit optimaler Reizstärke ausgewählt und der Mittelwert mit S.E.M. berechnet. Die unabhängigen quantitativen Daten waren nicht normalverteilt. Die statistische

Auswertung erfolgte daher mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test, wobei die Quotienten der MCAO-Tiere mit denen der Kontrollgruppe verglichen wurden. Ergebnisse des Tests wurden mit $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,005$ und $p < 0,001$ beurteilt und bei Erreichen dieser Werte als signifikant akzeptiert. Durchgeführt wurden die statistischen Berechnungen mit dem Programm SPSS für Windows (SPSS Inc.).

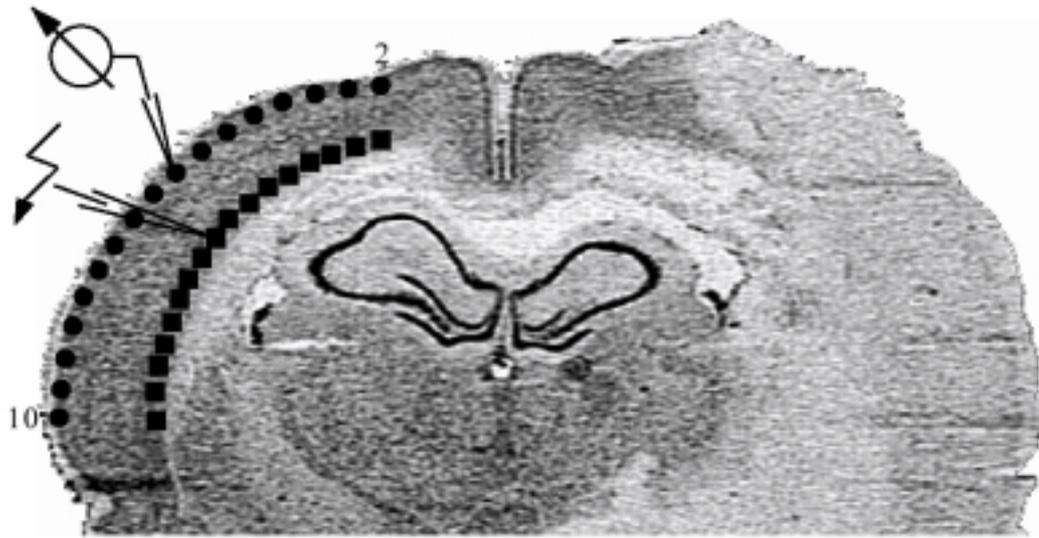


Abbildung 2.5.1: Nissl-gefärbter koronaler Hirnschnitt. Das nekrotische Infarktgewebe in der rechten Hemisphäre zeichnet sich deutlich als hellere Struktur ab. Erkennbar vom Infarkt betroffen sind der Neokortex und das *Caudate putamen*. Auf der linken Seite sind die Positionen der Ableitelektrode (●) in Schicht II/III und der Reizelektrode (■) in Schicht VI eingezeichnet.

Tab. 2.5.1: Zusammensetzung der artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF)

NaCl	NaHCO ₃	KCl	CaCl ₂	MgSO ₄	NaH ₂ PO ₄	Glucose
124 mM	26 mM	5 mM	2 mM	2 mM	1,25 mM	10 mM
Durch Begasung mit Carbogen (95% O ₂ und 5% CO ₂) auf pH 7,4 equilibriert; T = 34 °C						

2.6 Taktile Stimulation und Ableitung rezeptiver Felder der Hinterpfoten *in vivo*

Um die Auswirkungen einer Läsion in der Umgebung des sensomotorischen Hinterpfotenareals zu untersuchen, wurden 7 Tage nach Induktion der photothrombotischen Läsion die rezeptiven Felder der Hinterpfote *in vivo* abgeleitet.

Unter Urethan-Narkose (siehe Kapitel 2.2) wurden die Tiere für die elektrophysiologische Ableitung der rezeptiven Felder vorbereitet. Die Ratte wurde in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Die Hinterpfote wurde auf einem Knetgummiblock ausgerichtet und mit Klebstoff (Elefantenkleber, Elefan-Chemie) fixiert. Der stabile Untergrund diente dabei als Widerlager und ermöglichte aufgrund seiner dennoch verformbaren Konsistenz eine optimale Ausrichtung der Hinterpfote und der einzelnen Zehen. Mit einem Medianschnitt wurde die Kopfhaut von der Nasenwurzel bis zum Nacken geöffnet und zur Seite gezogen. Die Nackenmuskulatur wurde aufgespreizt und am Hinterhauptsloch eine Punktion zur Drainage des Liquors durchgeführt. Dies ist nötig, um den Druck zu mindern, der anderenfalls das Gehirn durch die Trepanationsöffnung drücken würde, was zu einer unerwünschten Schädigung des Gehirns führen würde. In einem Bereich von ca. 0,5 mm posterior zu Bregma bis ca. 6,5 mm anterior zu Bregma und von ca. 0,5 mm lateral zur Sagittalnaht bis ca. 5,0 mm lateral zur Sagittalnaht wurde der Schädelknochen trepaniert. Dazu wurde mit einem Minimot 40-Bohrer (Proxxon) und einem Bohrkopf mit dem Durchmesser von 0,8 mm (Hager & Meisinger GmbH) entlang der auf den Schädel gezeichneten Linien der Knochen weggefräst, bis nur noch eine hauchdünne Schicht übrig blieb. Diese wurde mit feinen Mikropinzetten sehr vorsichtig komplett durchbrochen. Um die lockere Knochenplatte zu entfernen, wurde sie von der Sagittalnaht her angehoben und mit Hilfe der Mikropinzetten die harte Hirnhaut (*Dura mater*) vom Knochen gelöst. Damit sollte vermieden werden, daß die *Dura mater* und an ihr hängende Gefäße verletzt wurden. Eine Verletzung der Gefäße führte wegen Blutungen zu einem vorzeitigen Ende des Experimentes. Die Trepanation wurde für beide Hemisphären durchgeführt. Vor den Messungen wurde vom Rand her die *Dura mater* mit einer Kanülenspitze aufgeschnitten und anschließend großflächig mit einer Augenschere entfernt. Damit die

Gehirnoberfläche nicht austrocknet, wurde zähflüssiges Silikonöl auf den Kortex gegeben. Bei Tieren, die zu leichten Blutungen vom Rand her neigten, wurde das Silikonöl durch isotonische Kochsalzlösung ersetzt. Diese mußte regelmäßig frisch aufgetragen werden, da sie schneller abfloß.

Bevor die eigentliche Messung beginnen konnte, wurde mit einer CCD-Kamera ein digitales Bild vom Kortex erstellt und gespeichert. In dieses Bild wurden anschließend die Meßpunkte, an denen die Elektrode in den Kortex eingeführt wurde, markiert und numeriert. Als Anhaltspunkt diente dafür der gut erkennbare Verlauf der Gefäße. Um einen Maßstab zu erhalten, wurde ein weiteres Bild mit den gleichen Kameraeinstellungen und einer mm-Papierfolie gespeichert. Die Hinterpfotenrepräsentation wurde im Bereich um die Position – 2,0 mm (anterior) zu Bregma und 2 mm lateral zur Sagitalnaht mit 20 bis 30 Penetrationen untersucht. Für die elektrophysiologische Ableitung wurden Glasmikroelektroden verwendet, die dafür mit 2 M NaCl gefüllt wurden und einen Widerstand von 1 - 2 M Ω hatten. Eingeführt wurden sie mit einem Mikrostepper, bei dem auf einem LED-Display die Tiefe ablesbar war. Die Aktionspotentiale von mehreren Nervenzellen (Multiunits) wurden extrazellulär in einer Kortextiefe von 700 bis 750 μ m (relativ zur Kortexoberfläche) abgeleitet. Die rezeptiven Felder wurden als die Areale der Haut definiert, bei denen ein leichtes Eindringen der Haut zuverlässige neuronale Entladungen hervorruft (Abbildung 2.6.1). Diese Entladungen wurden durch ein Oszilloskop mit Fensterdiskriminator auf einen Lautsprecher geleitet und waren deutlich hörbar. Die Lage und Umfang der rezeptiven Felder auf der glatten, unbehaarten Haut der Hinterpfote wurde determiniert durch hand-plotting nach MERZENICH et al. (1978, 1984) und in eine schematische Darstellung der Hinterpfote eingetragen. Anhand der gezeichneten rezeptiven Felder wurde eine quantitative Planimetrieanalyse mit Hilfe des Computerprogramms CANVAS 5.0.3 (Deneba Systems, Inc.) durchgeführt, um den Umfang der rezeptiven Felder in mm² Hautfläche zu bestimmen.

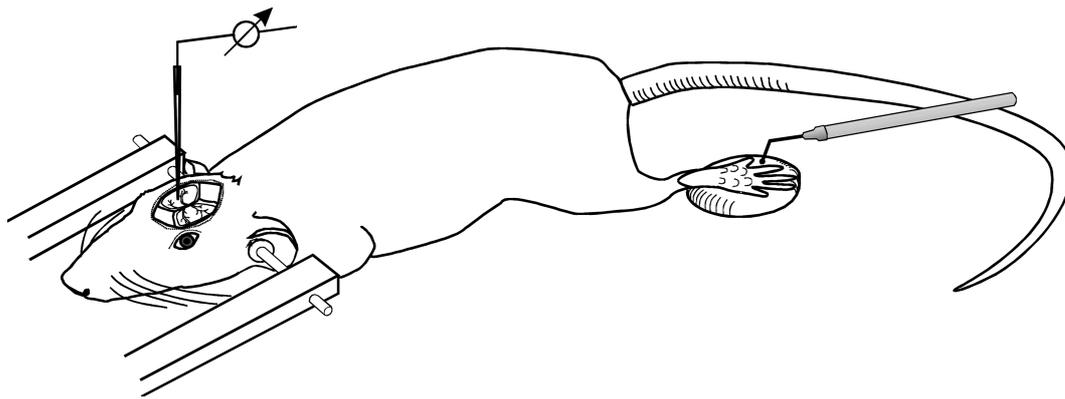


Abbildung 2.6.1: Die elektrophysiologische Ableitung von rezeptiven Feldern. Dafür wurde der Schädel trepaniert und die *Dura mater* entfernt. Die Elektrode wurde im Areal der Hinterpfotenrepräsentation in einer Tiefe von 700 – 750 μm , bezogen auf die Kortexoberfläche, plaziert. Mit einem kleinen Stecknadelkopf in einer Präpariernadelhalterung wurde die Haut taktil stimuliert, um den sensibel reagierenden Bereich abzutasten. Sensibel reagierende Bereiche wurden als rezeptive Felder definiert und in ein Schema der Hinterpfote eingezeichnet.

Außerdem wurde im Zentrum des rezeptiven Feldes noch mechanisch taktil stimuliert. Dazu wurde ein Plastikstift über einen Motor auf- und abbewegt. Die Spitze des Stiftes berührt dabei nur die Hautoberfläche. Stimuliert wurde mit einer Serie von 10 Stimuli alle 4 s. Der Interstimulusintervall betrug dabei 25, 50 oder 100 ms. Die Stimulusserie wurde mehrfach hintereinander appliziert und als Durchschnitt von 16 Stimulationsserien aufgezeichnet. Die lokalen Feldpotentiale (LFP) und Poststimulustimehistogramme (PSTH) wurden gemessen. Die LFP's wurden nach den Merkmalen Amplitude, Latenz und Quotient A_2/A_1 ausgewertet. Eine grobe Auswertung der PSTH ergab sehr ähnliche Ergebnisse im Vergleich zu den LFP, daher wurde auf eine gesonderte detaillierte Auswertung verzichtet.

Da die Tiere aus der Urethan-Narkose nicht wieder erwachen können, wurden sie nach Abschluß der elektrophysiologischen Ableitungen getötet. Dazu wurde der Hirnstamm direkt an der Schädelbasis durchtrennt.

Die unabhängigen quantitativen Daten waren nicht normalverteilt. Die statistische Auswertung erfolgte daher mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test, wobei die beiden Hemisphären der Läsionstiere mit der Kontrollgruppe verglichen wurden. Ergebnisse des Tests wurden mit $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,005$ und $p < 0,001$ beurteilt und bei Erreichen dieser Werte als signifikant akzeptiert. Für den Vergleich der rezeptiven Feldgröße zwischen den beiden Hemisphären wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben angewendet. Durchgeführt wurden die statistischen Berechnungen mit dem Programm SPSS für Windows (SPSS Inc.).

2.7 Verhaltenstests

Zur Untersuchung von funktionellen Defiziten wurden mehrere Verhaltenstests durchgeführt. Dabei stand die Nutzung der Pfoten im Vordergrund. Bestimmt werden sollte das Ausmaß und die Dauer eines Defizits nach einer kortikalen Läsion. Dafür wurden diese Tests vor der Operation und zu mehreren Zeitpunkten nach der Operation durchgeführt. Die Läsionen betrafen entweder das Vorderpfotenareal FL oder einen Teil des sekundär visuellen Kortex (Oc2) und des parietalen Kortex (Par1). Für die Untersuchungen im Glaszylinder (Kapitel 2.7.4) wurde noch eine dritte Läsionsgruppe eingeführt mit der Läsion im frontalen Kortex (Fr1/Fr2). Die Nutzung der Vorderpfote beim bilateralen Stimulationstest und beim Laufen auf dem Gitter wurde für Tag 0 ausgewertet und zur Entscheidung genutzt in welcher Hemisphäre die Läsion induziert wurde. Zeigte sich dabei eine leichte individuelle Bevorzugung einer Vorderpfote wurde die gegenüberliegende Hemisphäre gewählt, um einen deutlichen Effekt der Läsion nachweisen zu können.

2.7.1 Bilateraler Stimulationstest

Dieser somatosensorische Test wurde von SCHALLERT und WHISHAW (1984) entwickelt, um sensorische Asymmetrien der Vorderextremitäten zu untersuchen. Bei diesem Test befinden sich die Ratten in gewohnter Umgebung (Heimatkäfig), um beste Bedingungen für die Aufmerksamkeit des Tieres zu schaffen. Der Test besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil wird das Vorhandensein einer Asymmetrie untersucht und im zweiten Teil das Maß dieser Asymmetrie.

Um das Vorhandensein eines somatosensorischen Defizits zu untersuchen, wurden runde Aufkleber mit einem Durchmesser von 12 mm an der distal-radialen Innenseite der Handgelenke angeheftet. Das Tier wurde dafür kurz aus dem Käfig genommen, um den Aufkleber sorgfältig und fest anzubringen. Um den „sensorischen“ Eindruck des zuletzt angebrachten Aufklebers zu überlagern, wurden gleichzeitig beide Vorderpfoten dreimal mit dem Finger berührt. Die Reihenfolge (links vs. rechts) wurde dabei zwischen den Durchgängen variiert. Vor den eigentlichen Tests wurden die Tiere an diese Prozedur gewöhnt, damit sich die Tiere nicht sträubten und gestreßt wurden. Zurück in den Käfig gesetzt

reagierten die Ratten beinahe sofort auf den Stimulus und berührten bzw. entfernten den Aufkleber, indem sie die Vorderpfote zum Maul führten und mit Hilfe von Zähnen und Zunge den Aufkleber entfernten. Die Reaktionszeit bis zum Berühren und Entfernen wurde mit einer Stoppuhr für beide Seiten bestimmt. Insgesamt wurden 5 Durchgänge gemessen. Beendet wurde ein Durchgang nach dem Entfernen beider Aufkleber oder nach 1 Minute.

Wurde eine Asymmetrie von 80 bis 100 % gemessen, d.h. eine Vorderpfote wurde immer oder in 4 von 5 Durchgängen zuerst berührt, wurde im nächsten Teil des Test ein Maß für diese Asymmetrie untersucht. War das Verhältnis der ersten Berührung zwischen den Vorderpfoten kleiner, wurde es als ausgeglichen mit einem Asymmetriewert von 0 bezeichnet. Dadurch entfiel der zweite Untersuchungsschritt.

In zweiten Teil dieses Tests wurde das Maß der Asymmetrie untersucht, indem die Größe der Aufkleber variiert wurde. Dafür wurde der Aufkleber für die im ersten Teil bevorzugte Vorderpfote verkleinert und für die andere Vorderpfote entsprechend vergrößert (siehe Abbildung 2.7.1). Dabei wurde die Intensität des Stimulus über die Fläche des Aufklebers definiert. Das Maß für die Asymmetrie ergab sich aus dem Größenverhältnis, bei dem die Ratte zuerst auf den größeren Aufkleber reagierte. Bei diesem Verhältnis konnte davon ausgegangen werden, daß beide Stimuli als gleich empfunden wurden. Die Durchführung erfolgte in drei Durchgängen und grenzte das Maß der Asymmetrie Schritt für Schritt ein. Im ersten Durchgang wurde das Verhältnis $\frac{1}{2}$ zu $1\frac{1}{2}$ getestet. Wurde der kleinere Aufkleber zuerst berührt, bekam diese Vorderpfote im nächsten Durchgang einen noch kleineren Aufkleber ($\frac{1}{4}$) und die andere einen noch größeren Aufkleber ($1\frac{3}{4}$). Wurde im ersten Durchgang der größere Aufkleber zuerst berührt, bekam diese Vorderpfote im nächsten Durchgang einen verkleinerten Aufkleber ($1\frac{1}{4}$) und die andere einen vergrößerten Aufkleber ($\frac{3}{4}$). Auch bei diesem Durchgang entschied die erste Berührung über das Größenverhältnis der Aufkleber im letzten Durchgang. In diesem Durchgang entschied die erste Berührung über das Maß der Asymmetrie. Je kleiner der zuerst berührte Aufkleber im letzten Durchgang war, desto größer war das Maß für die Asymmetrie.

Die unabhängigen quantitativen Daten waren nicht normalverteilt (getestet nach David, Pearson und Stevens). Die statistische Auswertung erfolgte daher mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test, wobei die beiden Läsionsgruppen

mit der Kontrollgruppe verglichen wurden. Ergebnisse des Tests wurden mit $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,005$ und $p < 0,001$ beurteilt und bei Erreichen dieser Werte als signifikant akzeptiert. Durchgeführt wurden die statistischen Berechnungen mit dem Programm SPSS für Windows (SPSS Inc.).

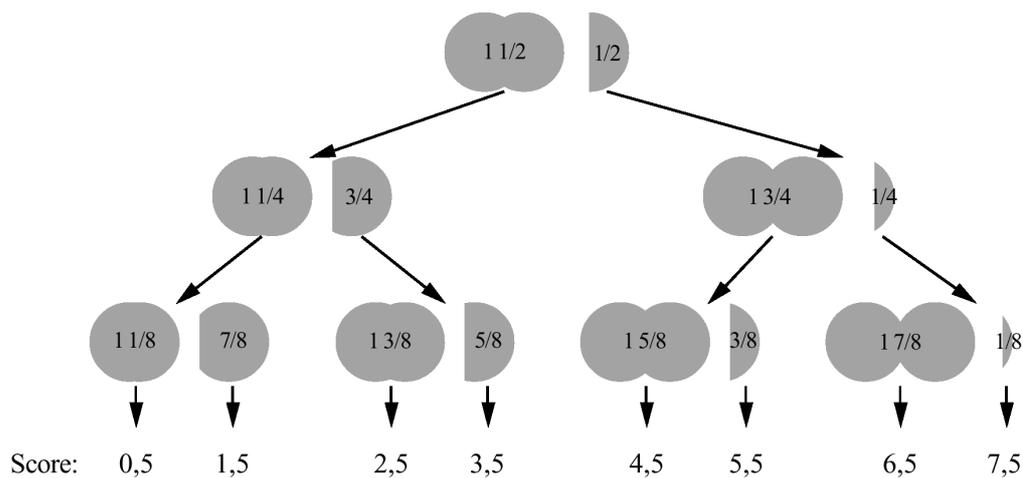


Abbildung 2.7.1: Schema der Aufkleber zur Bestimmung des Maßes der Asymmetrie. Von oben nach unten sind die 3 Durchgänge dargestellt. Über die Linien wird verdeutlicht, welche Aufkleberkombination im nächsten Durchgang gewählt wurde, wenn der entsprechende Aufkleber zuerst berührt worden war. Das erste Berühren im letzten Durchgang bestimmte das Maß der Asymmetrie, wie es unter jedem Aufkleber steht. Die Aufkleber für die im ersten Test bevorzugte Pfote sind jeweils auf der rechten Seite der Aufkleberkombination und die für die weniger bevorzugte Pfote auf der linken Seite.

2.7.2 Fehlritte beim Laufen auf einem Gitter

Dieser sensomotorische Test untersucht die Bewegungskoordination der Laufbewegung über ein Gitter (BARTH et al. 1990). Das Gitter hatte die Maße 42 x 67 cm, mit einer Maschenweite von 2,7 cm und wurde über dem Untergrund erhöht angebracht (8 cm). An das eine Ende des Gitters wurde der Heimatkäfig der Tiere gestellt und die Ratte auf das gegenüberliegende Gitterende gesetzt. Um zurück in den Käfig zu gelangen, mußte die Ratte über das Gitter laufen. Kontrolltiere schafften dies ohne größere Probleme. Sie lernten schnell den richtigen Bewegungsablauf. Die seltenen Fehler, bei denen ein Kontrolltier mit einer Pfote durch das Gitter durchrutschte, zeigten keine Asymmetrie. Alle Tiere liefen pro Testtag fünfmal über das Gitter. Alle Durchgänge wurden auf Video aufgezeichnet und anschließend in Zeitlupe abgespielt und ausgewertet. Dieser Test ist vergleichbar mit dem Laufen von Ratten auf einem schmalen Balken. In

beiden Tests geht es um die Abschätzung der Fähigkeit die Pfote während der Fortbewegung zu plazieren.

Gezählt wurde die Anzahl der Schritte auf dem Gitter und die Fehlritte, bei denen die linke bzw. rechte Pfote durch das Gitter rutschte. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Pfote komplett durch die Gittermasche durchrutschte (siehe Abbildung 2.7.2) und nicht mit Fingern bzw. Zehen oder Ballen noch den Gitterdraht berührte. Das wurde für Vorder- und Hinterpfoten getrennt analysiert. Aus der Anzahl von Fehlritten mit der behinderten bzw. gesunden Pfote, bezogen auf die Gesamtzahl der Schritte, ergab sich ein Fehlermaß für die jeweilige Pfote. Diese Werte zeigten, wie groß die Fehlerrate für eine gesunde Pfote war und ob er für die von der Läsion betroffene Pfote vergrößert war. Die Berechnung erfolgte, indem die Anzahl der Fehler der gesunden Vorderpfote von der Anzahl der Fehler der „behinderten“ Vorderpfote subtrahiert wurde. Dieser Wert wurde durch die Gesamtzahl der gemachten Schritte dividiert und mit 100 multipliziert, um das Ergebnis als Prozentanteil zu bestimmen.

Die unabhängigen quantitativen Daten waren nicht normalverteilt (getestet nach David, Pearson und Stevens). Die statistische Auswertung erfolgte daher mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test, wobei die beiden Läsionsgruppen mit der Kontrollgruppe verglichen wurden. Ergebnisse des Tests wurden mit $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,005$ und $p < 0,001$ beurteilt und bei Erreichen dieser Werte als signifikant akzeptiert. Durchgeführt wurden die statistischen Berechnungen mit dem Programm SPSS für Windows (SPSS Inc.).

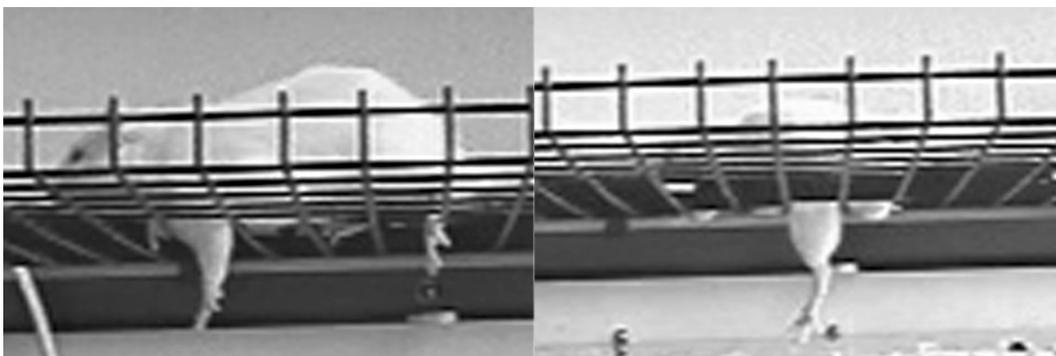


Abbildung 2.7.2: Fehlritte beim Laufen auf dem Gitter. Als Fehler beim Laufen auf dem Gitter wurden nur Pfoten gezählt, die komplett durch die Gittermaschen hindurchgerutscht waren. Dargestellt sind hier je ein Beispiel für die Vorderpfote (links) und für die Hinterpfote (rechts). Ausgewertet wurden diese Fehlritte anhand von in Zeitlupe abgespielten Videoaufzeichnungen.

2.7.3 Streckenschwimmen im Aquarium

Bei diesem Verhaltenstest sollte eine Störung des normalen Ruhighaltens der Vorderpfote beim Schwimmen untersucht werden (STOLTZ et al. 1999). Wenn gesunde Ratten geradeaus schwimmen, halten sie beide Vorderpfoten still unter dem Kinn (siehe Abbildung 2.7.3). Nur mit den Hinterpfoten wird gepaddelt, um das Tier anzutreiben. Die Vorderpfoten helfen nur beim Steuern, wenn die Ratte beim Schwimmen die Richtung ändern will (SCHAPIRO et al. 1970) oder werden an der Seite benutzt, mit der die Ratte direkt an der Wand entlang schwimmt. Eine kortikale Läsion im somatosensorischen Vorderpfotenareal sollte dazu führen, daß die kortikale motorische Kontrolle gestört wird und dadurch die betroffene Vorderpfote eine Art Kraulbewegung beim Schwimmen ausführt (Abbildung 2.7.3).

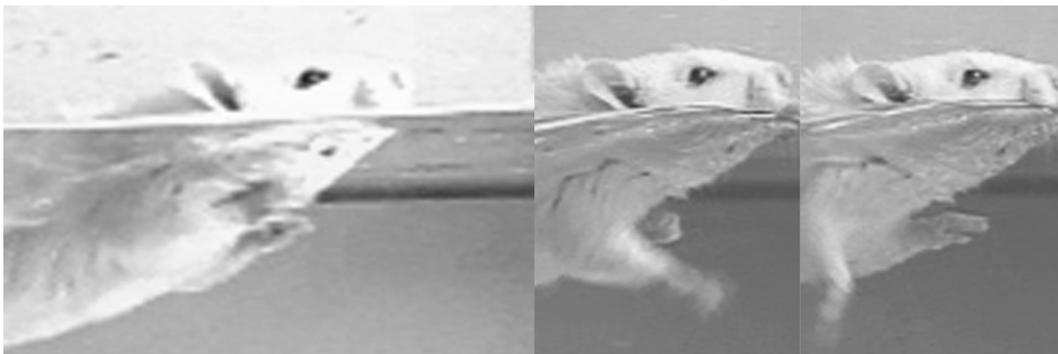


Abbildung 2.7.3: Streckenschwimmen im Aquarium. Beim Geradeausschwimmen halten gesunde Ratten beide Vorderpfoten still unter dem Kinn (links). Nur selten wird eine Art Kraulbewegung mit einer Vorderpfote durchgeführt (rechts), wie sie für die von einer kortikalen Läsion im somatosensorischen Vorderpfotenareal betroffenen Vorderpfote erwartet wird.

Für die Durchführung dieses Tests wurde ein Aquarium (120 x 40 x 50 cm) ca. 25 cm hoch mit ca. 24 °C warmem Wasser gefüllt. An einem Ende standen sichtbare Plattformen, auf die eine weitere Ratte gesetzt wurde, damit die zu untersuchende Ratte den Zielbereich gut erkennen konnte. Vor der Operation wurden die Tiere trainiert und das Ausgangsniveau bestimmt.

Beim Training wurde die Ratte kurz vor den Plattformen ins Becken gesetzt und konnte mit wenigen Schwimmzügen diese erreichen. Im Lauf der nächsten Durchgänge wurde der Abstand zu den Plattformen immer weiter vergrößert. Am Ende des Trainings hatte die Ratte gelernt, gerade von einem Ende des Beckens zu den Plattformen am anderen Ende zu schwimmen. Dabei gewöhnten die Tiere

sich an, die Vorderpfote still unter dem Kinn zu halten. Für den eigentlichen Test mußte jede Ratte fünfmal gerade durch das Becken schwimmen. Nur Durchgänge, bei denen das Tier gerade und nicht entlang der Wand geschwommen war, wurden gewertet und auf Video entsprechend gekennzeichnet. Nach dem Schwimmen wurden die Ratten mit einem Handtuch vorsichtig abgetrocknet und in den Käfig zurückgesetzt. Über einer Ecke des Käfigs befand sich eine Rotlichtlampe, um den Ratten eine Möglichkeit zum Aufwärmen *ad libitum* zur Verfügung zu stellen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Videoaufnahmen im Zeitlupenmodus. Dabei wurden die entsprechenden Bewegungen für jede Vorderpfote gesondert gezählt. Auf der geschwommenen Strecke von ca. 1 m waren maximal 8 – 9 dieser Bewegungen pro Vorderpfote möglich. Berechnet wurde dann das Verhältnis der behinderten Vorderpfote bezogen auf die gesunde Vorderpfote, indem die von der Anzahl der Kraulbewegungen der gesunden Vorderpfote die Anzahl der Kraulbewegungen der „behinderten“ Vorderpfote subtrahiert wurde. Dieser Wert wurde für alle Durchgänge aufsummiert und durch die Anzahl der Durchgänge dividiert, um so den Mittelwert für die 5 Durchgänge zu erhalten.

Die unabhängigen quantitativen Daten waren nicht normalverteilt (getestet nach David, Pearson und Stevens). Die statistische Auswertung erfolgte daher mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test, wobei die beiden Läsionsgruppen mit der Kontrollgruppe verglichen wurden. Ergebnisse des Tests wurden mit $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,005$ und $p < 0,001$ beurteilt und bei Erreichen dieser Werte als signifikant akzeptiert. Durchgeführt wurden die statistischen Berechnungen mit dem Programm SPSS für Windows (SPSS Inc.).

2.7.4 Aufrichten im Glaszylinder

Beim Explorieren einer neuen Umgebung, wie z. B. im Offenfeld, richten sich Ratten oft auf. Ist eine Wand in der Nähe, wird sich mit den Vorderpfoten daran abgestützt. Dieses Abstützen an der Wand kann in einem Glaszylinder forciert werden und ermöglicht so eine genaue Analyse der Nutzung beider Vorderpfoten und die Untersuchung ihrer Asymmetrie (KOZLOWSKI et al. 1996). In Abbildung 2.7.4 ist das Aufrichten einer Ratte im Glaszylinder dargestellt.

Die Tiere wurden für mindestens 3 min in einen Glaszylinder gesetzt. Der Glaszylinder hatte einen Durchmesser von 19,7 cm und eine Höhe von 20,8 cm. Hinter dem Zylinder wurden zwei Spiegel im rechten Winkel zueinander aufgestellt, um Bewegungen der Ratte entlang der Rückseite des Glaszylinders im Spiegel sehen zu können. Herausgenommen wurden die Ratten nach diesen 3 min nur, wenn sie sich mindestens zehnmal aufgerichtet hatten, ansonsten verblieben sie bis zu maximal 15 min im Zylinder, um die gewünschte Anzahl von Aufrichtungen zu erreichen. Die Bewegungen der Tiere im Zylinder wurden über den gesamten Zeitraum aufgezeichnet und mit Hilfe des Computerprogramms „The Observer“ (Noldus) ausgewertet.

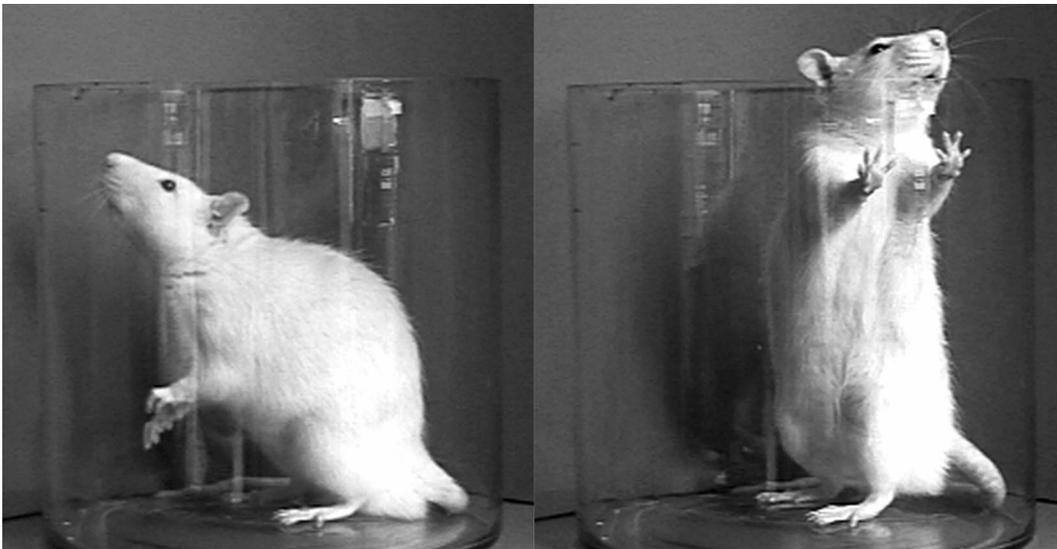


Abbildung 2.7.4: Aufrichten im Glaszylinder. Beim Aufrichten im Glaszylinder wird die Benutzung der Vorderpfoten analysiert. Gezählt werden die Bewegungen der Vorderpfoten beim Abstoßen vom Boden, entlang der Wand und bei der Landung. Im linken Bild beginnt eine Ratte sich Aufzurichten. Beide Vorderpfoten haben den Boden verlassen. Im rechten Bild stützt sich die Ratte mit beiden Pfoten an der Glaswand des Zylinders ab.

Mehrere Verhaltenselemente wurden ausgewertet. Zum einen wurde nur zwischen Bewegungen der linken und der rechten Vorderpfote unterschieden. Dabei wurden fünf Verhaltenselemente unterschieden und in einem Ethogramm definiert (siehe Anhang). Zu Beginn des Aufrichtens wurde die Vorderpfote gezählt, mit der sich die Ratte vom Boden abstieß. Anschließend wurde die Vorderpfote gewertet, die zuerst die Wand berührte. Alle Bewegungen entlang der Wand, also das Lösen von der Wand und erneutes Berühren, wurden mit Unterscheidung der Bewegungsrichtung als horizontale bzw. vertikale Bewegungen für die jeweilige benutzte Vorderpfote gezählt. Am Ende des

Aufrichtens wurde die Vorderpfote gezählt, welche als erste wieder den Boden berührte.

Für die Ergebnisse wurden jeweils die Prozentanteile der linken bzw. rechten Vorderpfote bezogen auf alle Bewegungen berechnet. Diese Berechnung erfolgte zum einen für alle fünf Verhaltenselemente getrennt, zum anderen für die Bewegung an der Wand als Summe der drei Verhaltenselemente erste Wandberührung, horizontale und vertikale Bewegungen. Als dritte Möglichkeit wurden alle fünf Verhaltenselemente zusammen genommen und der Prozentanteil für die linke bzw. rechte Vorderpfote bestimmt.

Zum anderen wurde die gleichzeitige Nutzung der Vorderpfoten berücksichtigt (siehe Ethogramm im Anhang). Ausgewertet wurde die Nutzung nur der linken, nur der rechten und beider Vorderpfoten gleichzeitig. Wurde zum Beispiel während des Aufrichtens erst die linke Vorderpfote unabhängig an die Wand gesetzt und folgte die rechte Vorderpfote mit einer Berührung der Wand noch während die linke Vorderpfote an der Wand verweilte, wurde die erste Bewegung als „links“ und die zweite als „beide“ Vorderpfoten gewertet. Wurden beide Vorderpfoten simultan an die Wand gesetzt, wurde diese Bewegung auch als „beide“ gewertet. Um die nächste Bewegung zu werten, mussten beide Vorderpfoten bewegt werden. Beim Explorieren entlang der Wand werden oft beide Vorderpfoten alternierend versetzt. Nachdem jeweils beide Vorderpfoten bewegt worden waren, wurde die Bewegung der zweiten Vorderpfote als „beide“ gewertet. Wurde nur eine Vorderpfote bewegt und erneut an die Wand gesetzt, aber die andere Vorderpfote hatte zu diesem Zeitpunkt keinen Kontakt mehr zur Wand, wurde nur die Berührung dieser Vorderpfote zur Wand gewertet. Auch bei der Landung auf dem Boden wurde zwischen Landung nur auf der linken, nur auf der rechten oder mit beiden Vorderpfoten unterschieden.

Bei beiden Auswertungsmethoden wurden Bewegungen, bei denen eine Vorderpfote oder beide den oberen Rand des Zylinders ergriffen, nicht in der Auswertung berücksichtigt. Während dieser Berührung wurde auch die andere Vorderpfote nicht in der Auswertung berücksichtigt.

Für die Ergebnisse wurden jeweils die Prozentanteile der linken, der rechten bzw. beider Vorderpfote bezogen auf alle Bewegungen berechnet, die entlang der Wand oder bei der Landung stattfanden. Für die Berechnung z.B. der „behinderten“ Vorderpfote wurde die Anzahl der Bewegungen der „behinderten“

Vorderpfote dividiert durch die Summe der Anzahl der Bewegungen der „behinderten“ Vorderpfote, der Anzahl der Bewegungen der gesunden Vorderpfote und der Anzahl der Bewegungen beider Vorderpfoten. Multipliziert mit 100 ergab das den Prozentanteil der „behinderten“ Vorderpfote.

Die unabhängigen quantitativen Daten waren nicht normalverteilt (getestet nach David, Pearson und Stevens). Die statistische Auswertung erfolgte daher mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test, wobei die beiden Läsionsgruppen mit der Kontrollgruppe verglichen wurden. Ergebnisse des Tests wurden mit $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,005$ und $p < 0,001$ beurteilt und bei Erreichen dieser Werte als signifikant akzeptiert. Durchgeführt wurden die statistischen Berechnungen mit dem Programm SPSS für Windows (SPSS Inc.).

2.8 Histologische Verifikation der Läsionen

Alle Tiere wurden unter Ether-Narkose perfundiert. Das Tier wurde auf dem Rücken liegend in einer Versuchswanne an den Extremitäten fixiert. Der erste Medianschnitt zur Eröffnung des Bauchraumes führte bis zum Sternum. Zur kompletten Eröffnung wurden noch beidseitig die Rippen durchtrennt. Das Herz wurde an den Ventrikeln mit einer Klemme erfaßt, an der Herzspitze punktiert und eine Sonde eingeführt. Nach der Punktion des rechten Aurikels wurde über die Sonde zunächst 75 ml 0,1 M phosphatgepufferte Normalsalzlösung (PBS) und anschließend 300 ml formaldehydhaltiges Fixativ nach Zamboni perfundiert. Ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom von 50 ml/min war durch den Einsatz einer Perfusionspumpe (505S, Watson-Marlow, England) gewährleistet.

Die Gehirne wurden vorsichtig entnommen und für 3 h in Zamboni-Fixativ nachfixiert. Zum Schutz vor Gefrierschäden wurden die Hirne in Falkontubes mit 10%iger (w/v) Saccharose in 0,1 M PBS überführt. Nach 5 h wurde die Lösung gegen 30%ige (w/v) Saccharose in 0,1 M PBS ausgetauscht. Nach dem Absinken der Hirne (24 - 72 h) wurden diese eingefroren und bei -75 °C gelagert. Geschnitten wurde das Gewebe zwischen den Positionen 4 mm anterior zu Bregma bis 5 mm posterior zu Bregma mit einem Gefrierschlittenmikrotom (Microm) in 60 µm dicke koronale Scheiben. Entscheidend war dabei, daß die Region in der die Läsion zusehen war komplett geschnitten wurde und sogar noch ein paar Schnitte davor bzw. dahinter erfaßt wurden. Jeder zweite Schnitt wurde für die anschließende Färbung auf einen Objektträger aufgezogen. Die restlichen Schnitte wurden verworfen.

Für die Nissl-Färbung wurde das Gewebe für 5 min bei 60 °C in die Kresylviolett-Lösung getaucht. Nach einer kurzen Spülung mit destiliertem Wasser erfolgte zur allmählichen Dehydrierung eine Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol, jeweils zweimal 70 %, 96 %, 100 %). Die Dauer der einzelnen Schritte wurde von der Farbtintensität nach optischer Kontrolle bestimmt. Abschließend wurden die Schnitte kurz in Rotihistol (Roth) getaucht und mit Entellan (Merck) eingedeckt.

Zur Kontrolle der Position und Größe der induzierten Läsionen wurden die Nissl-gefärbten Koronalschnitte mikroskopisch auf die Läsionsmorphologie hin untersucht. Bestimmt wurde die Position der Läsion mit Bezug auf Bregma und

die zerstörten anatomischen Bereiche anhand der Stereotaxie Atlanten von ZILLES (1985) und WATSON & PAXINOS (1997).

3. Ergebnisse

3.1 Feldpotentiale nach extrazellulärer Reizung im Neokortex nach MCAO *in vitro*

Nach photothrombotischen Läsionen konnte eine reduzierte intrakortikale Hemmung im Hirnschnittpräparat nachgewiesen werden (BUCHKREMER-RATZMANN et al. 1996). Diese Untersuchung zur intrakortikalen Übererregbarkeit sollte auf das Ischämie-Modell der permanenten MCAO übertragen werden. Dazu wurden elektrophysiologische Ableitungen an Hirnschnittpräparaten durchgeführt. Untersucht wurden unbehandelte Kontrolltiere und MCAO-Tiere am 7. bzw. 8. Tag nach der Infarktinduktion.

In der Kontrollgruppe wurden 18 Hirnschnitte aus 7 Tieren untersucht. Dabei haben die mittleren Feldpotentiale (N = 298 Messungen) eine Amplitude von $-3,4 \pm 0,1$ mV bei der ersten Antwort und von $-1,1 \pm 0,1$ mV für die zweite Antwort. In 9 Hirnschnitten gab es einige Positionen mit einer ersten Amplitude kleiner als $-1,0$ mV. Diese Daten wurden von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Ein typisches gemessenes Feldpotential für ein Kontrolltier ist in Abbildung 3.1.1 gezeigt. Die mittleren Quotienten der zweiten Antwort versus der ersten, gemessen an den Positionen von 2 mm bis 10 mm lateral der Mittellinie, lagen zwischen 0,2 bis 0,4 (Abbildung 3.1.2 (□)).

Von 20 Hirnschnitten aus 6 Tieren, 7 bis 8 Tage nach permanenter MCAO, wurden evozierte Feldpotentiale in der zum Infarkt kontralateralen Hemisphäre abgeleitet. Die Amplitude der ersten Antwort betrug im Mittel $-3,8 \pm 0,1$ mV, die der zweiten $-1,9 \pm 0,1$ mV (N = 326 Messungen). In 10 Hirnschnitten gab es einige Positionen mit einer ersten Amplitude kleiner als $-1,0$ mV und bei vier Messungen konnte keine Antwort registriert werden. Diese Daten wurden von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Ein typisches gemessenes Feldpotential für eine Tier mit ischämischen Infarkt ist in Abbildung 3.1.1 gezeigt. Die mittleren Quotienten der zweiten Antwort versus der ersten, gemessen an den Positionen von 2 mm bis 10 mm lateral der Mittellinie, liegen zwischen 0,4 bis 0,7 (Abbildung 3.1.2 (■)).

Die statistische Analyse ergibt einen signifikant erhöhten Quotienten für Tiere nach MCAO verglichen mit Kontrollen für fast alle Positionen von 2 mm lateral

bis 10 mm lateral der Mittellinie. An den Meßpositionen 2, 2,5, 3,5, 4, 4,5, 5,5, 6, 9 und 10 mm ist der gemessene Unterschied sehr signifikant (Mann-Whitney, einseitig, $p < 0,01^{**}$). Einen signifikanten Unterschied gibt es auch an den Positionen 3, 5, 7, 7,5, 8, 8,5 und 9,5 mm (Mann-Whitney, einseitig, $p < 0,05^*$).

Da eine Änderung des Quotienten sowohl auf einer verkleinerten ersten Antwort als auch auf einer vergrößerten zweiten Antwort basieren kann, wurden die Ergebnisse daraufhin überprüft. Tatsächlich kann eine Veränderung der ersten Antwort bei MCAO-Tieren an den Positionen 2,5 (**), 3 (**), und 3,5 (*) (Mann-Whitney, einseitig, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,05^*$) nachgewiesen werden. Entgegen der erwarteten Verkleinerung der ersten Amplitude bei MCAO-Tieren ist die erste Amplitude im Vergleich zu den Kontrolltieren vergrößert. Wie erwartet ist die zweite Antwort an den Positionen 5, 7, 8,5, 9 und 10 mm signifikant vergrößert (Mann-Whitney, einseitig, $p < 0,05^*$). Eine sehr signifikante Vergrößerung der zweiten Amplitude ist nachweisbar an den Positionen 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 7 und 9,5 mm (Mann-Whitney, einseitig, $p < 0,01^{**}$).

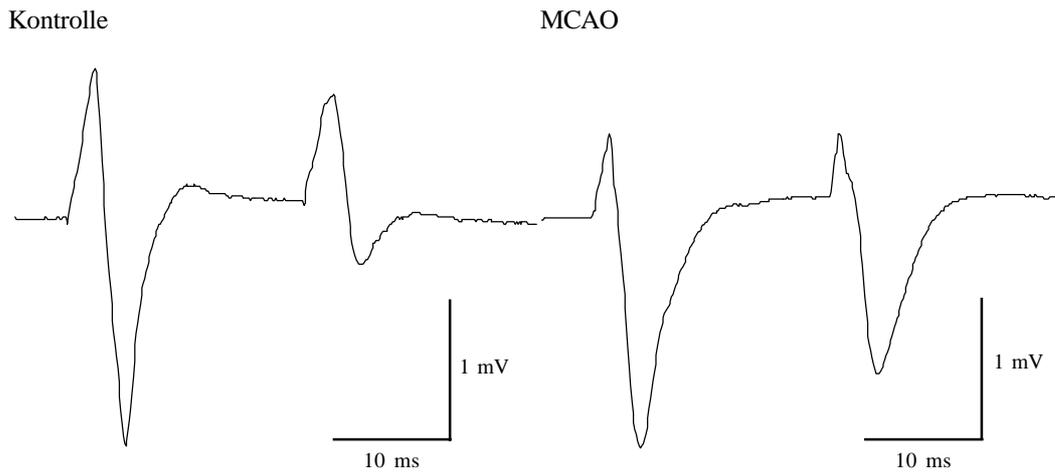


Abbildung 3.1.1: Evozierte Feldpotentiale. Dargestellt sind typische lokal evozierte Feldpotentiale (LFP) des Doppelpuls-Paradigmas. Auf der linken Seite ist das LFP eines Kontrolltiers beispielhaft dargestellt. Die Amplitude der zweiten Antwort ist deutlich kleiner als die erste. In diesem Unterschied zeigt sich die hemmende Wirkung der ersten Antwort auf die zweite. Auf der rechten Seite ist ein Beispiel für eine LFP eines Tiers nach MCAO gezeigt. Die Amplitude der zweiten Antwort ist zwar kleiner als die Amplitude der ersten Antwort, aber nicht so stark gehemmt wie im Kontrolltier. Mit der Bildung eines Quotienten aus der zweiten Amplitude dividiert durch die erste Amplitude kann die intrakortikale Hemmung genauer erfasst und ausgewertet werden.

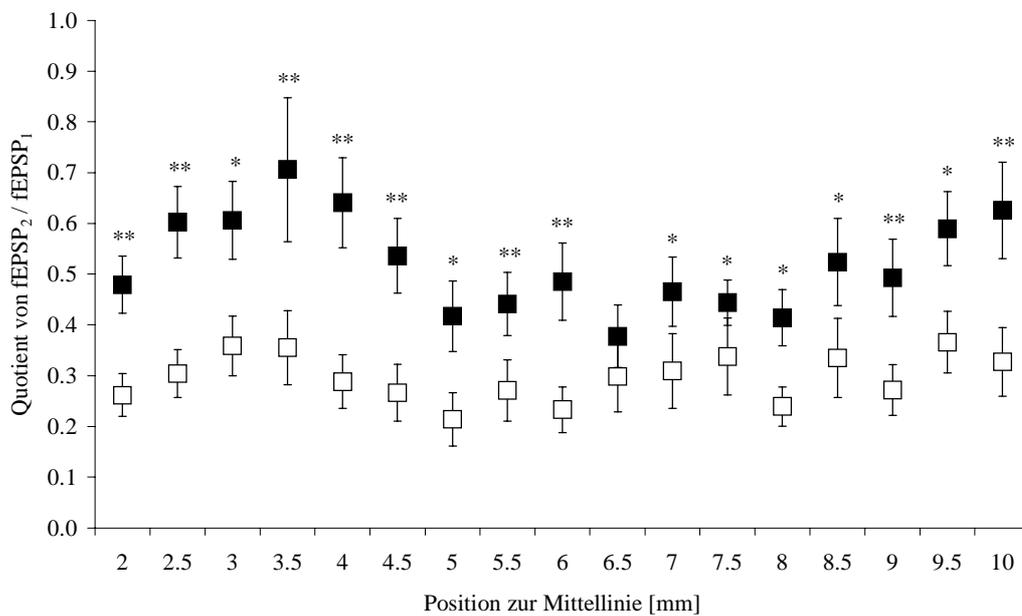


Abbildung 3.1.2: Graphik zum Doppelpuls-Paradigma. Aufgetragen ist der Quotient der zweiten Antwortamplitude versus der ersten Antwortamplitude. Aufgetragen sind die Mittelwerte \pm S.E.M. für Kontrolltiere (\square) und MCAO-Tiere (\blacksquare) für die Positionen von 2 bis 10 mm lateral zur Mittellinie. Die MCAO-Tiere zeigen eine deutliche Erhöhung des Quotienten (Mann-Whitney, einseitig, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,05^*$). Dies deutet auf eine Reduktion der intrakortikalen Hemmung hin.

3.2 Veränderungen der rezeptiven Felder der Hinterpfote *in vivo*

Plastische Veränderungen lassen sich als Veränderungen der rezeptiven Felder in den jeweiligen kortikalen Repräsentationen untersuchen. Für diese Experimentalreihe wurden zwei Gruppen verglichen, nicht behandelte Kontrolltiere und Läsionstiere mit photothrombotischer Läsion in der rechten Hemisphäre (Position der Läsion: 4 mm posterior zu Bregma, 4 mm lateral zur Sagittalnaht). Bei der Ableitung von rezeptiven Feldern wird an jedem Penetrationspunkt im Kortex als erstes per Hand das rezeptive Feld abgetastet und in ein Pfotenschema eingetragen. Die Flächenauswertung dieser Schemata ergibt die Größe der rezeptiven Felder. Bei den Kontrolltieren (N = 7) ist das rezeptive Feld im Durchschnitt $37,0 \pm 2,7 \text{ mm}^2$ groß (208 Penetrationen). Die Messungen bei den untersuchten Läsionstieren werden für beide Hemisphären unterschieden. In der Hirnhälfte mit Läsion (ipsilateral N = 5) ergeben die Messungen ein durchschnittliches rezeptive Feld von $75,0 \pm 5,3 \text{ mm}^2$ (123 Penetrationen). In der kontralateral zur Läsion liegenden Hemisphäre (N = 6) ergeben die Messungen ein durchschnittliches rezeptive Feld von $75,1 \pm 4,4 \text{ mm}^2$ (128 Penetrationen). Typische gemessene rezeptive Felder von einem Kontrolltier und rezeptive Felder für die ipsilaterale und die kontralaterale Hemisphäre aus einem Läsionstier sind in der Abbildung 3.2.1 dargestellt. Es zeigt sich eine signifikante Vergrößerung der rezeptiven Felder bei Läsionstieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Dies gilt sowohl für die ipsilaterale Hemisphäre (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,001$) als auch für kontralaterale (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,001$). Dabei kann zwischen den beiden Hemisphären der Läsionstiere kein Unterschied festgestellt werden (Wilcoxon, zweiseitig, $p = 0,719$). Die Häufigkeitsverteilung der rezeptiven Felder in Größenklassen mit 10 mm^2 Schritten ist in Abbildung 3.2.2 dargestellt.

Wird bei der Betrachtung der Abbildung 3.2.2 zwischen sehr kleinen ($0 \text{ bis } 30 \text{ mm}^2$), kleinen ($30 \text{ bis } 100 \text{ mm}^2$), mittleren ($100 \text{ bis } 200 \text{ mm}^2$) und großen rezeptiven Feldern ($> 200 \text{ mm}^2$) unterschieden, so erreichen die rezeptiven Felder von Kontrolltieren ihr Maximum bereits im Bereich der sehr kleinen Feldgrößen. Wenige rezeptive Felder der Kontrollen liegen im Bereich der kleinen Feldgrößen und fast keine rezeptiven Felder werden im Bereich der mittleren bis großen Feldgrößen gemessen. Die Häufigkeitsverteilung der Läsionstiere ist für

beide Hemisphären sehr ähnlich. Nur wenige rezeptive Felder werden im Bereiche der sehr kleinen Feldgrößen gemessen. Das Maximum der gemessenen rezeptiven Felder bei Läsionstieren wird im Bereich der kleinen Feldgrößen erreicht. Im Bereich der mittleren Feldgrößen liegen deutlich mehr rezeptive Felder im Vergleich zu den Kontrollen und auch im Bereich der großen Feldgrößen werden noch rezeptive Felder bei Läsionstieren gemessen. Insgesamt erscheint der Verlauf der Kurve bei Läsionstieren im Vergleich zu den Kontrollen zu größeren rezeptiven Feldern verschoben zu sein. Außerdem ist die Kurve bei Läsionstieren im Vergleich zu den Kontrollen flacher und umfaßt einen größeren Bereich der Feldgrößen.

Nach der systematischen taktilen Stimulation im Zentrum der rezeptiven Felder wurden die lokalen Feldpotentiale (LFP) analysiert. Auch hier lassen sich Unterschiede zwischen gesunden Kontrolltieren und Tieren mit Läsion nachweisen. Da mit einem Puls von 10 Reizen stimuliert wurde und drei verschiedene Interstimulusintervalle (25, 50 und 100 ms) verwendet wurden, sind die Ergebnisse dementsprechend vielfältig und umfangreich. Außerdem bieten die LFP viele Eigenschaften zur Auswertung an.

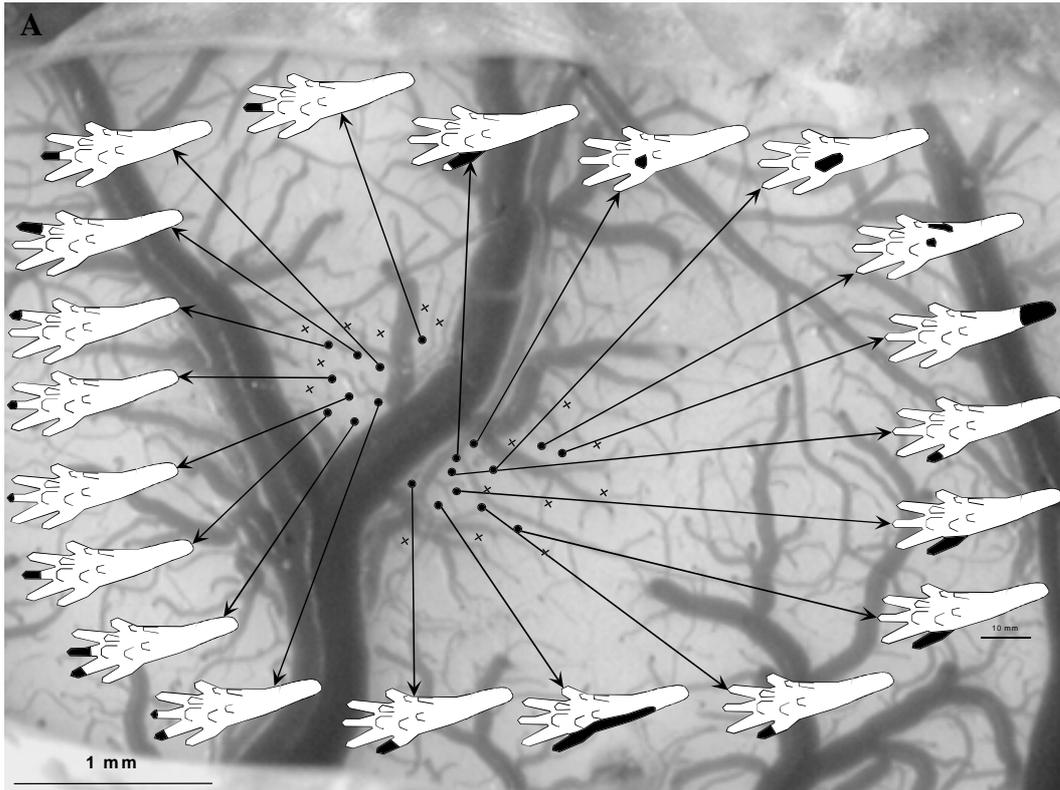
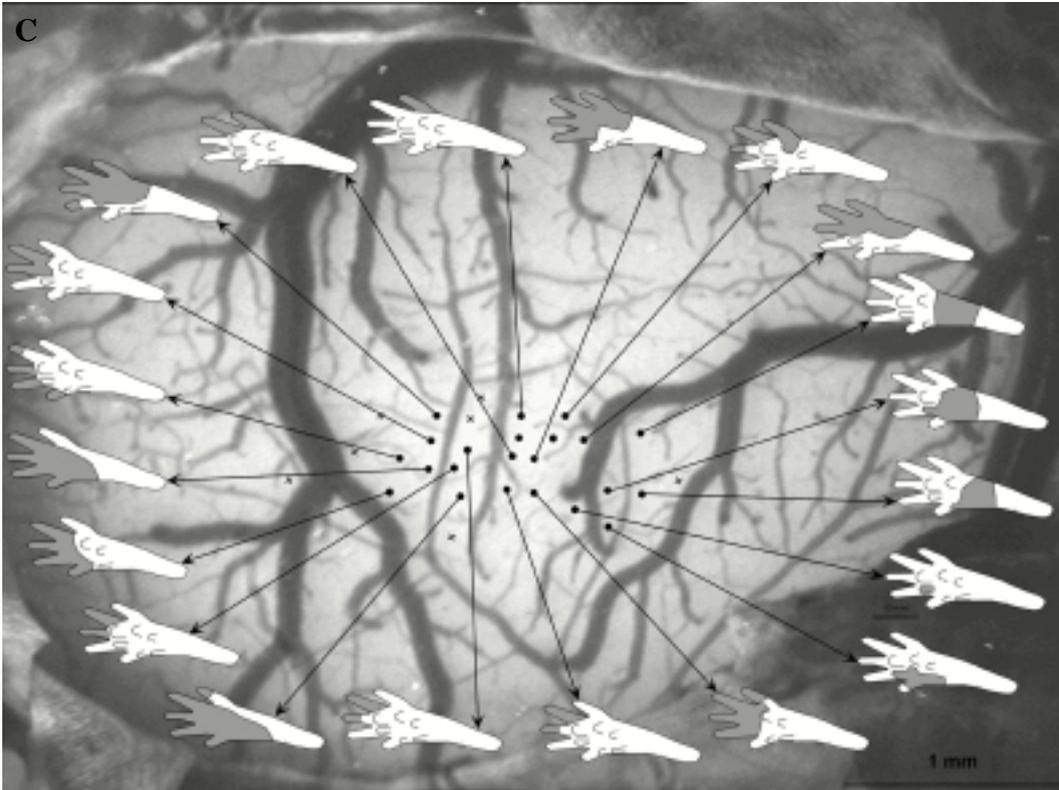
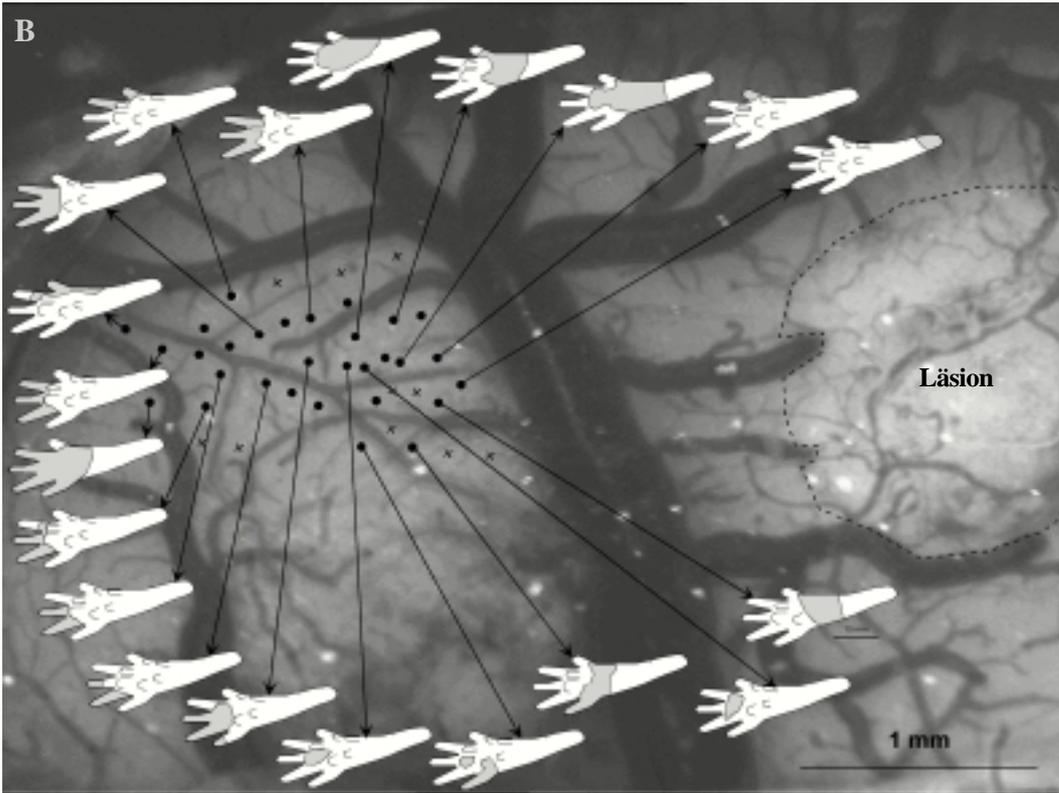


Abbildung 3.2.1: Veränderte receptive Felder. Am Beispiel eines Kontrolltiers (A) und eines Läsionstiers (B und C, siehe folgende Seite) sind die receptive Felder der Hinterpfote und ihre Veränderungen 7 Tage nach Induktion einer photothrombotischen Läsion dargestellt. Im Hintergrund ist die Kortexoberfläche mit den versorgenden Blutgefäßen zu erkennen. Darauf eingezeichnet sind die Penetrationspositionen als schwarze Punkte. Kreuze stehen für Penetrationspositionen, an denen keine Reaktion auf der Sohle der Hinterpfote gemessen werden konnte. Die Pfeile verbinden die Penetrationen mit dem gemessenen Schema des receptive Feldes. In A ist die rechte Hemisphäre eines Kontrolltieres mit den receptive Feldern, gemessen auf der linken Hinterpfote, dargestellt. Die receptive Felder der Kontrolltiere sind im Durchschnitt 37 mm^2 groß. Das entspricht ungefähr der Fläche von einem bis zwei Zehen. Deutlich größer sind die receptive Felder bei Läsionstieren. In B ist die rechte Hemisphäre (ipsilateral) eines Läsionstieres abgebildet. An der rechten Seite ist die Läsion auf der Kortexoberfläche zu erkennen. Die receptive Felder der linken Hinterpfote sind im Mittel 75 mm^2 groß. Das entspricht ungefähr drei Zehen bis zur Hälfte der Pfote. In C ist die linke Hemisphäre (kontralateral) des Läsionstieres gezeigt. Auch hier ist zu erkennen, daß die receptive Felder der rechten Hinterpfote im Vergleich zu Kontrolltieren vergrößert sind. Wie bei der ipsilaterale Hemisphäre sind die receptive Felder im Mittel 75 mm^2 groß und entsprechen damit ungefähr der Fläche von drei Zehen bis zur Hälfte der Pfote.



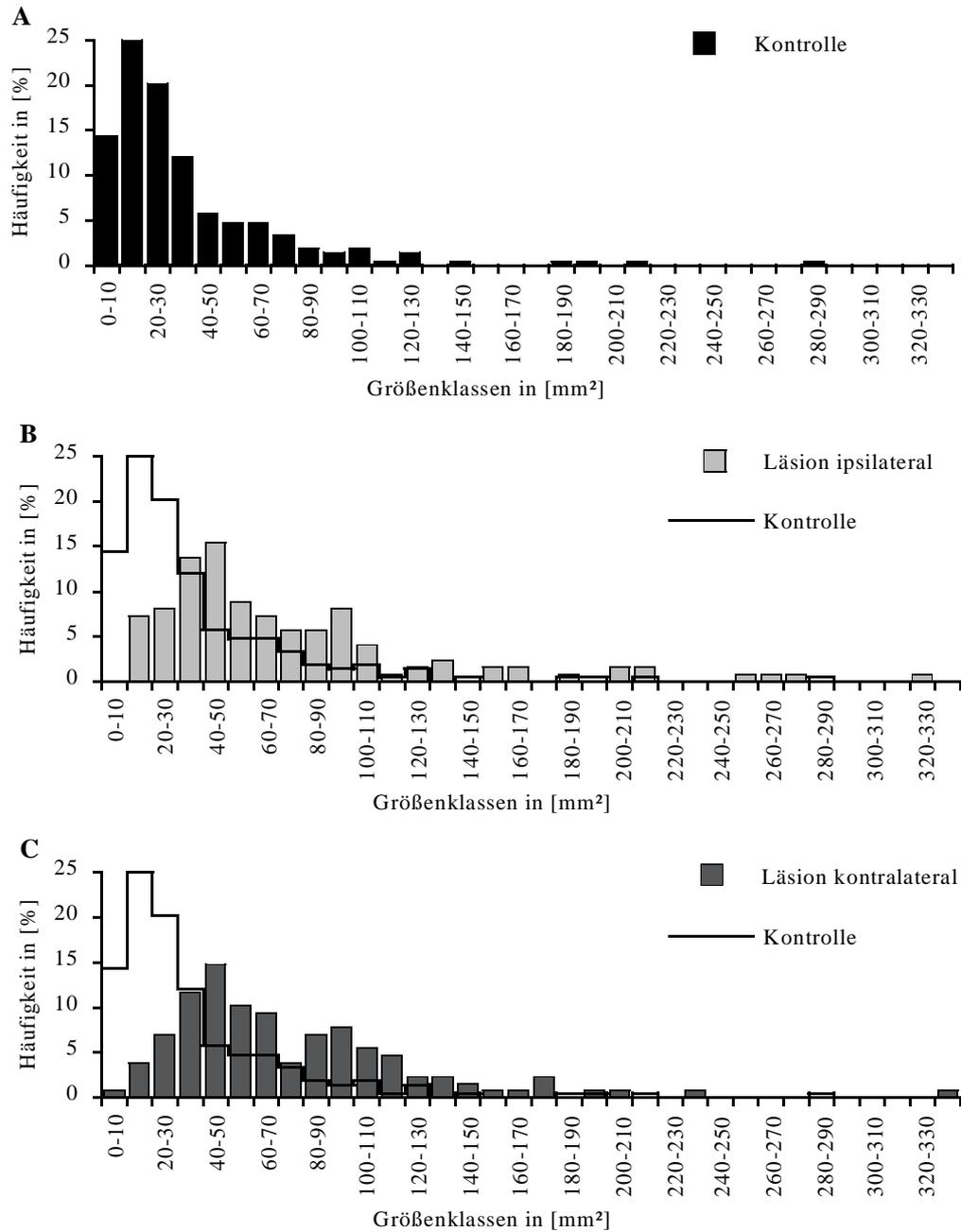


Abbildung 3.2.2: Häufigkeitsverteilung der Größe von rezeptiven Feldern. Verglichen werden die rezeptiven Felder, gemessen in der ipsilateralen (B) und kontralateralen (C) Hemisphäre, mit Messungen aus Kontrolltieren (A). Die Größe der rezeptiven Felder ist in 10 mm²-Klassen als Häufigkeitsverteilung in % dargestellt. Die Kontrolltiere (A) zeigen ein klares Verteilungsmuster, das bereits bei der kleinsten Klasse beginnt und zwischen 10 bis 30 mm² sein Maximum erreicht. Im Bereich der mittleren bis großen Klassen werden bei Kontrolltieren kaum rezeptive Felder gemessen. Bei Läsionstieren zeigt sich kein Unterschied zwischen ipsilateral (B) und kontralateral (C). Das Verteilungsmuster beginnt erst mit rezeptiven Feldern größer 10 mm² und erreicht seinen Maximum im Bereich der kleinen Feldgrößen bei 40 bis 50 mm². Deutlich mehr rezeptive Felder erreichen die mittleren Feldgrößen (100-200 mm²) und auch einige sehr große Felder (> 200 mm²) können in Läsionstieren gemessen werden.

Als elektrophysiologisches Korrelat der Aktivität von Nervenzellen wurden lokale Feldpotentiale gemessen. Dafür wurde die Pfote mechanisch taktil stimuliert und die Reizantwort im Kortexareal der Hinterpfote abgeleitet. Analysiert wurden die Amplituden, die Latenzen und das Verhältnis zwischen der ersten und der zweiten Reizantwort. Die Amplituden der Reizantworten der gemessenen LFP ist bei Läsionstieren signifikant kleiner als bei Kontrolltieren. Dies gilt bei allen Stimulationsintervallen, sowohl für Messungen in der ipsilateralen Hemisphäre, als auch in der kontralateralen Hemisphäre versus den Messungen in Kontrolltieren (Mann-Whitney-Test, zweiseitig, $p < 0,001$ ****; 25 ms, 2. Amplitude $p < 0,005$ ***, 4. Amplitude $p < 0,05$ *, siehe Abbildung 3.2.3, Datentabelle siehe Anhang).

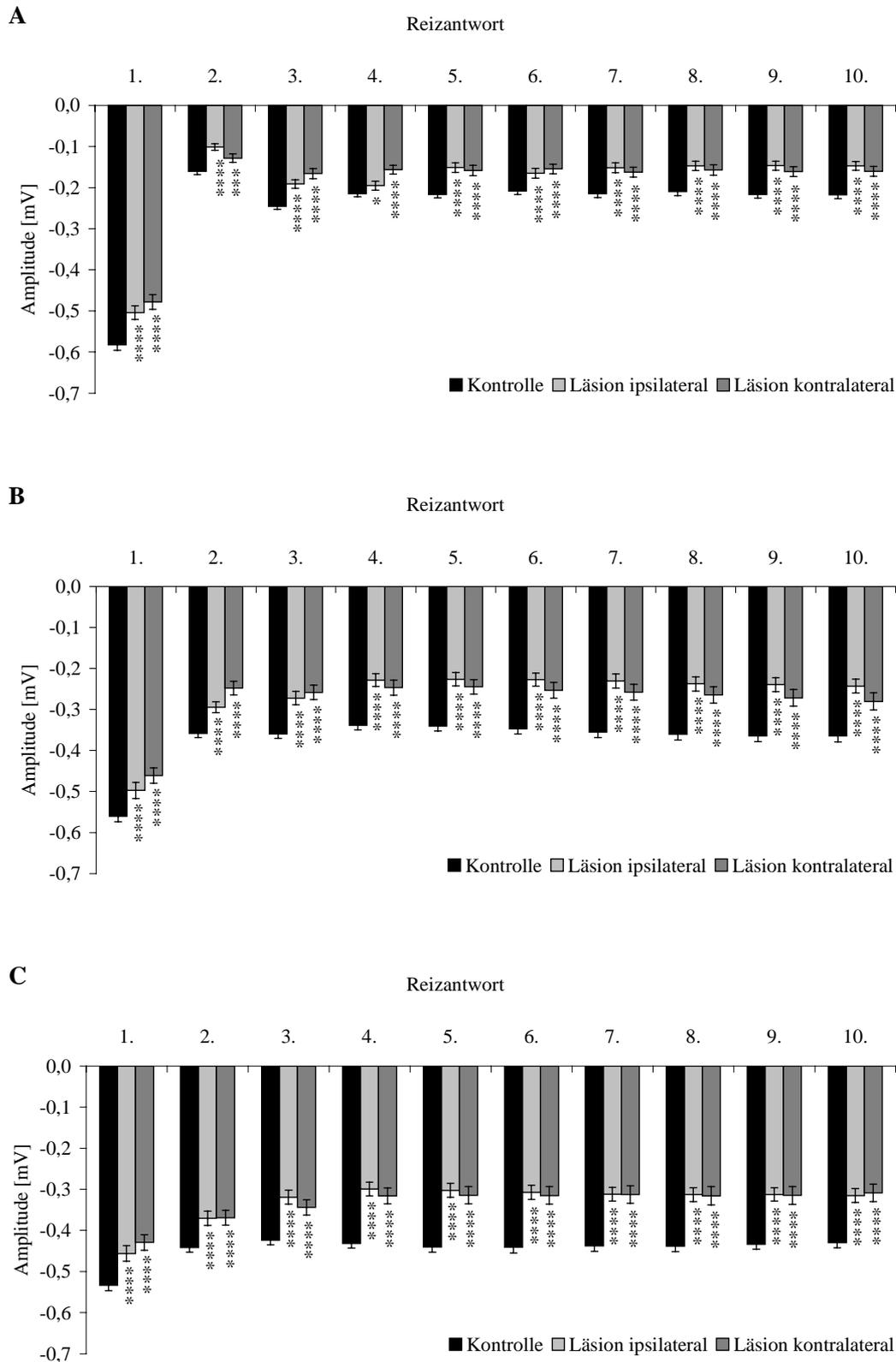


Abbildung 3.2.3: Amplituden für alle Reizintervalle. Aufgetragen sind die Amplituden für alle 10 Reizantworten (Mittelwerte \pm S.E.M.). Bei allen drei Interstimulusintervallen von 25 ms (A), 50 ms (B) und 100 ms (C) zeigen die Läsionstiere sowohl in der ipsilateralen Hemisphäre (hellgraue Balken) als auch in der kontralateralen Hemisphäre (dunkelgraue Balken) signifikant kleinere Amplituden (Mann-Whitney-Test, zweiseitig, $p < 0,05^*$, $p < 0,005^{***}$, $p < 0,001^{****}$) als bei den Kontrollen (schwarze Balken).

Der zweite wichtige Meßwert bei elektrophysiologischen Ableitungen ist die Latenz. Veränderungen der Latenz ermöglichen Aussagen über Veränderungen in der Geschwindigkeit der Reizleitung. In dieser Untersuchung wurden die Latenzen aller 10 Antworten bei allen Stimulationsintervallen ausgewertet. Mit Kontrolltieren verglichen sind die Latenzen bei Läsionstieren zum Teil erhöht. Die Reizantwort der Kontrolltiere kommt mit einer Latenz von $17,6 \pm 0,1$ ms bei 25 ms Interstimulusintervall, $17,6 \pm 0,1$ ms bei 50 ms Interstimulusintervall und $17,7 \pm 0,1$ ms bei 100 ms Interstimulusintervall im Kortex an. Bei den Läsionstieren ist die Reizleitung verlangsamt, und die Latenzen sind in der ipsilateralen Hemisphäre auf $18,4 \pm 0,2$ ms bei 25 ms Interstimulusintervall, $18,4 \pm 0,2$ ms bei 50 ms Interstimulusintervall und $18,4 \pm 0,2$ ms bei 100 ms Interstimulusintervall erhöht (siehe Abbildung 3.2.4, Mann-Whitney-Test, zweiseitig, $p < 0,001^{****}$). Auch in der kontralateralen Hemisphäre ist die Latenz auf $19,0 \pm 0,2$ ms bei 25 ms Interstimulusintervall, $18,9 \pm 0,2$ ms bei 50 ms Interstimulusintervall und $18,9 \pm 0,2$ ms bei 100 ms Interstimulusintervall erhöht (siehe Abbildung 3.2.4, Mann-Whitney-Test, zweiseitig, $p < 0,001^{****}$). Beim Vergleich der ipsilateralen Hemisphäre der Läsionstiere mit den Kontrolltieren sind alle Antwortlatenzen, bis auf die 9. Latenz beim Interstimulusintervall 25 ms, signifikant erhöht (siehe Anhang). Eine erhöhte Latenz ist signifikant auf der kontralateralen Seite nachzuweisen bei 25 ms Interstimulusintervall nur für die 1. Antwort (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,001$), bei 50 ms für die Antworten 1^{****}, 3^{**}, 4^{*}, 5^{***} und 10^{*} (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,005^{***}$, $p < 0,001^{****}$) und bei 100 ms für die Antworten 1^{****}, 3^{***}, 4^{*}, 5^{*}, 9^{*} und 10^{*} (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$, $p < 0,005^{***}$, $p < 0,001^{****}$).

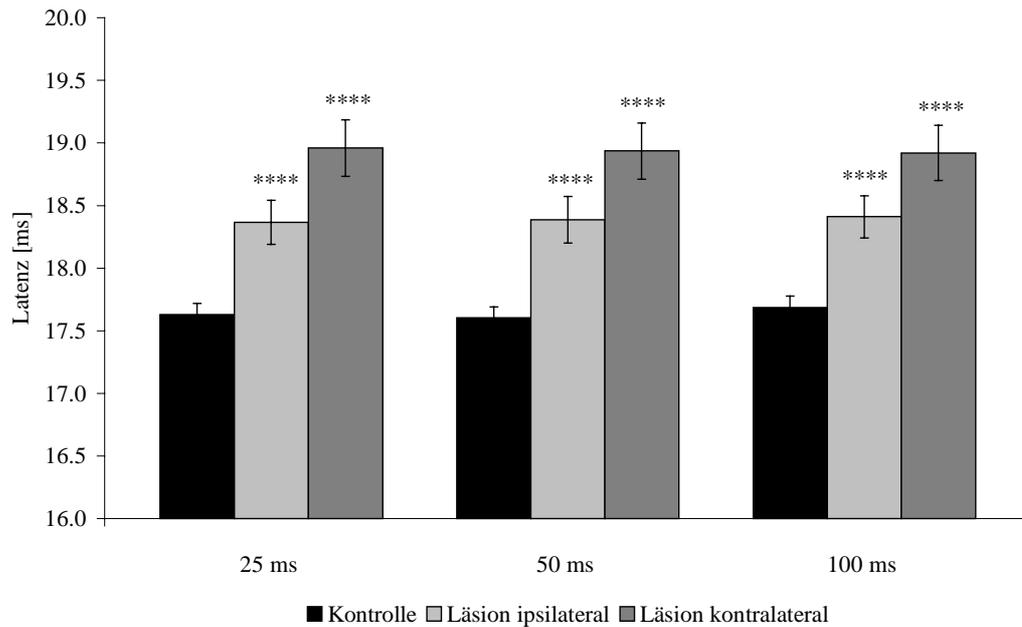


Abbildung 3.2.4: Latenzen der ersten Antwort. Aufgetragen sind die Latenzen für die erste Reizantwort (Mittelwert \pm S.E.M.). Bei allen drei Interstimulusintervallen von 25, 50 und 100 ms ist die Reizleitung verlangsamt und die Latenzen sind sowohl in der ipsilateralen, als auch der kontralateralen Hemisphäre signifikant erhöht (Mann-Whitney-Test, zweiseitig, $p < 0,001$ ****) im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Um in dieser Studie Veränderungen in der Hemmung zu untersuchen, wurden die ersten beiden Antworten mit dem Doppelpuls-Paradigma analysiert, bei dem aus den Amplituden der zweiten Antwort bezogen auf die ersten der Quotient für die Hemmung gebildet wird ($Q = \text{Amplitude}_2 / \text{Amplitude}_1$). Es gilt wieder, daß ein Quotient von 1 für eine komplette Hemmung der zweiten Antwort durch die erste Antwort und der Wert 0 für keine hemmende Wirkung steht. Das Doppelpuls-Paradigma weißt eine signifikant höhere Hemmung für die ipsilaterale Hemisphäre bei Läsionstieren als bei Kontrolltieren auf. Bei dem Interstimulusintervall von 25 ms haben Läsionstiere auf der ipsilateralen Seite mit einem durchschnittlichen Quotienten von $0,23 \pm 0,02$ einen signifikant kleineren Quotienten als Kontrolltiere mit einem durchschnittlichen Quotienten von $0,30 \pm 0,02$ (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005$). Für das Interstimulusintervall von 50 ms zeigen Läsionstiere auf der ipsilateralen Seite einen durchschnittlichen Quotienten von $0,59 \pm 0,02$. Dies ist ein signifikant kleinerer Quotient als für Kontrolltiere, die einen durchschnittlichen Quotienten von $0,64 \pm 0,01$ haben (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005$). Die Auswertung für das 100 ms Interstimulusintervall ergibt einen durchschnittlichen Quotienten

von $0,82 \pm 0,02$ ipsilateral bei Läsionstieren und $0,83 \pm 0,01$ bei Kontrolltieren. Auch hierbei sind die Ergebnisse der Läsionstiere signifikant kleiner als die der Kontrolltiere (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05$). Die Bestimmung des Doppelpuls-Paradigmas ergibt für die kontralaterale Seite der Läsionstiere bei 25 ms einen durchschnittlichen Quotienten von $0,28 \pm 0,02$, bei 50 ms $0,52 \pm 0,02$, und bei 100 ms $0,87 \pm 0,02$. Im Vergleich zu den durchschnittlichen Quotienten der Kontrolltiere ist nur das Ergebnis bei 50 ms signifikant kleiner (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1.1 aufgelistet und in Abbildung 3.2.5 graphisch dargestellt.

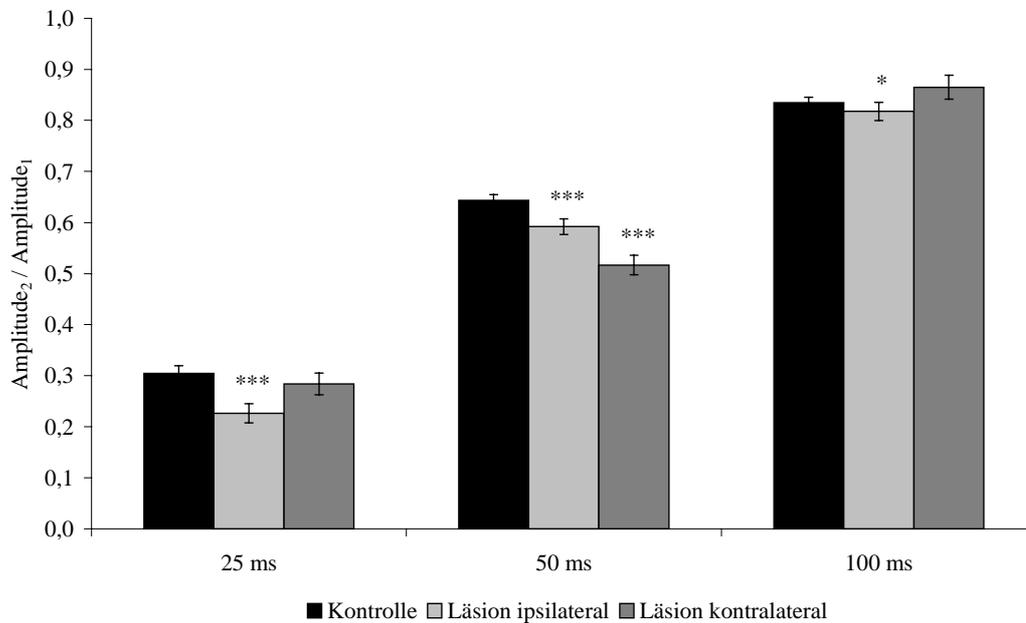


Abbildung 3.2.5: Graphik zum Doppelpuls-Paradigma. Dargestellt ist der Quotient der zweiten Antwortamplitude versus der ersten Antwortamplitude. Aufgetragen sind die Mittelwerte \pm S.E.M. für Kontrolltiere (schwarze Balken) und Läsionstiere. Für die ipsilaterale Hemisphäre (hellgraue Balken) zeigt sich bei allen Interstimulusintervallen eine signifikante Erniedrigung im Quotienten (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005^{***}$, $p < 0,5^*$). In der kontralateralen Hemisphäre ist der Quotient nur beim Interstimulusintervall von 50 ms signifikant erniedrigt (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005^{***}$). Die Erniedrigung des Quotienten weist auf eine verstärkte hemmende Wirkung der ersten auf die zweite Antwort hin.

Tabelle 3.2.1: Ergebnisse des Doppelpuls-Paradigmas:

	Kontrollen		Läsion ipsilateral		Läsion kontralateral		Kontrolle versus	
	Mittelwert	S.E.M.	Mittelwert	S.E.M.	Mittelwert	S.E.M.	ipsilateral	kontra-lateral
25 ms	0,30	0,02	0,23	0,02	0,28	0,02	$p < 0,005$	n.s.
50 ms	0,64	0,01	0,59	0,02	0,52	0,02	$p < 0,005$	$p < 0,005$
100 ms	0,83	0,01	0,82	0,02	0,87	0,02	$p < 0,05$	n.s.

3.3 Verhaltenstests

3.3.1 Bestimmung der Läsionsposition und -größe

Die Nissl-gefärbten koronalen Gehirnschnitte wurden im Bereich der Läsion genauer untersucht. Dazu wurden die Schnittpräparate unter dem Mikroskop mit den stereotaktischen Atlanten von ZILLES (1985) und PAXINOS & WATSON (1997) verglichen. Zusätzlich wurden Bilder der Hirnschnitte mit einer CCD-Kamera und dem Programm NIH-Image für MacIntosh digitalisiert aufgenommen. Aus diesen Ergebnissen wurden typische Läsionen bestimmt und in Abbildung 3.3.1 dargestellt.

Die Läsion mit der stereotaktischen Position 2,5 mm anterior zu Bregma und 2,0 mm lateral zur Sagittalnaht wird in Abbildung 3.3.1a gezeigt. Die Läsion betrifft einen großen Teil des frontalen Kortex (Fr1, Fr2 und Fr3) und anteriore Teile des Vorderpfotenareals (FL).

Die Läsion mit der stereotaktischen Position 0,3 mm anterior zu Bregma und 3,7 mm lateral zur Sagittalnaht wird in Abbildung 3.3.1b gezeigt. Die Läsion betrifft teilweise den frontalen Kortex (Fr1, Fr2 und Fr3), fast das gesamte Vorderpfotenareal (FL), teilweise das Hinterpfotenareal (HL) und reicht posterior bis in den parietalen Kortex (Par1).

Die Läsion mit der stereotaktischen Position in der Mitte zwischen Bregma und Lambda und 4,0 mm lateral zur Sagittalnaht wird in Abbildung 3.3.1c gezeigt. Die Läsion betrifft teilweise noch den posterioren Anteil des Vorderpfotenareals (FL), das Hinterpfotenareal (HL), teilweise den parietalen Kortex (Par1) und reicht bis in den occipitalen Kortex, Areal2 (Oc2). Bei sehr großen Läsionen kann auch noch der frontale Kortex 1 (Fr1) lateral betroffen sein.

Der frontale Kortex wird bei ZILLES (1990) mit motorischen Funktionen in Verbindung gesetzt. Das Vorderpfotenareal (FL) ist die sensomotorische Repräsentation der Vorderextremität. Das Hinterpfotenareal (HL) ist die sensomotorische Repräsentation der Hinterextremität. In beide Arealen haben unter anderem die Reizsignale von kutanen Stimulationen ihren Eingang. Dem parietalen Kortex werden sensorische Funktionen zugeschrieben. Das Areal 2 des occipitalen Kortex gehört zum sekundären visuellen System.

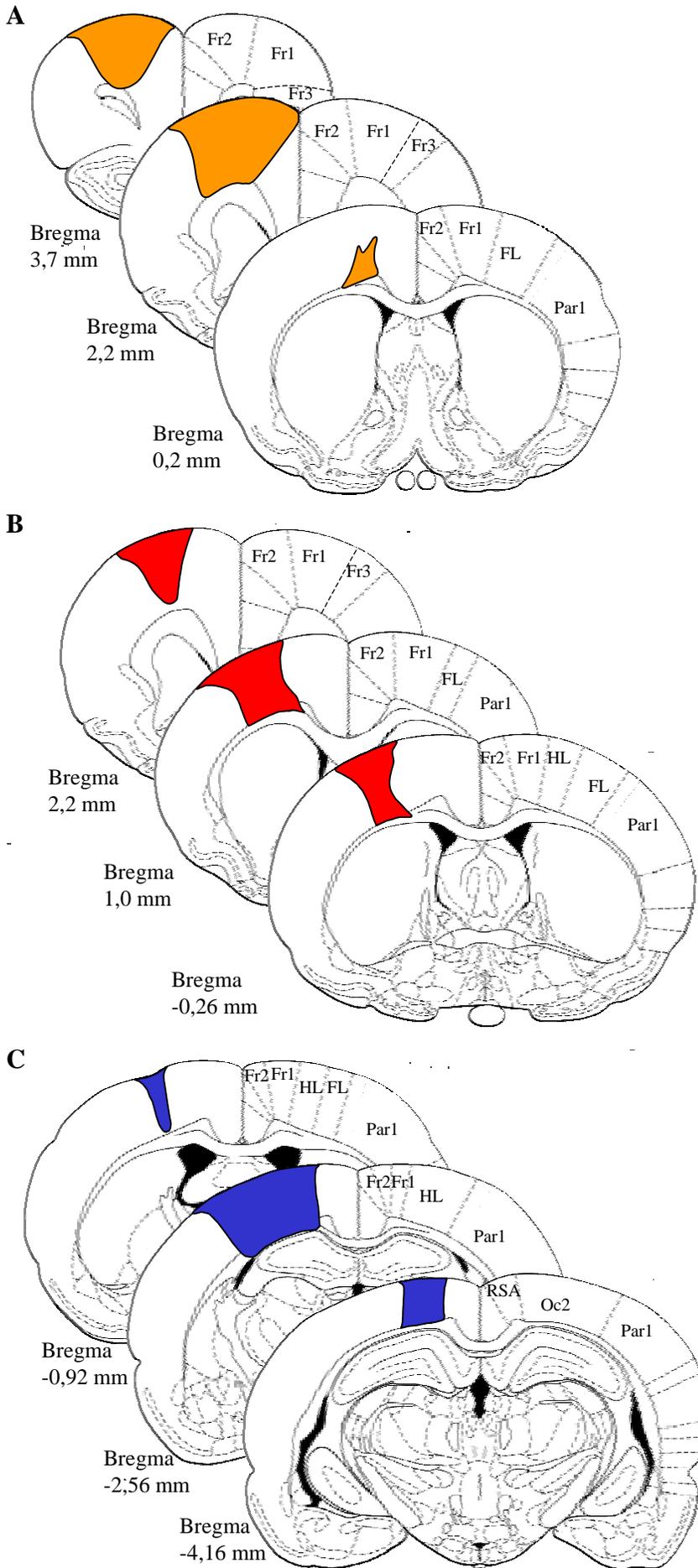


Abbildung 3.3.1: Läsionsgrößen und -positionen.

In coronalen Hirnschnittschemen sind die Größe und die Position der zwei Monate zuvor induzierten Läsion dargestellt. Die Läsion im frontalen Kortex (orange) ist in **A** eingezeichnet. In **B** ist die Läsion des Vorderpfotenareals (rot) abgebildet und in **C** ist die Läsion im occipitalen/ parietalen Kortex (blau) dargestellt. Die Position der Schnitte ist mit Bezug auf Bregma definiert. In der rechten Hemisphäre sind die anatomischen Areale (ZILLES 1985) eingezeichnet. Die Läsion in **A** betrifft den frontalen Kortex (Fr1, Fr2 und Fr3) und Teile des Vorderpfotenareals (FL). Bei der Läsion in **B** sind Fr1, Fr2, Fr3, FL, das Hinterpfotenareal (HL) und der parietalen Kortex (Par1) betroffen. Die Läsion in **C** betrifft FL, HL, Par1 und reicht bis in den occipitalen Kortex, Areal2 (Oc2). Der retrospleniale agruläre Kortex (RSA) wird von der Läsion nicht betroffen.

3.3.2 Bilateraler Stimulationstest

Über die Aufkleber an den Handgelenken läßt sich die sensible Wahrnehmung messen. Dieser Test ergibt nicht nur einen Wert für eine Pfotenpräferenz, sondern auch ein Maß für die Größe des Unterschieds. Verglichen wurden die scheinbehandelten Kontrolltiere (N=5) mit zwei Gruppen von Läsionstieren: Tiere mit Läsion im sensomotorischen Vorderpfotenareal (Position: Bregma +0,3 mm, 3,7 mm lateral zur Sagittalnaht, N=5) und Tiere mit einer Läsion im occipitalen und parietalen Kortex (Position: Mitte zwischen Bregma und Lambda, 4,0 mm lateral zur Sagittalnaht, N=4).

Vor der Induktion der photothrombotischen Läsion zeigte keine der untersuchten Gruppen eine Asymmetrie in der sensiblen Reaktion auf die Aufkleber an der Vorderpfote. Über den untersuchten Zeitraum zeigen Kontrolltiere keine Asymmetrien in der Reaktion auf die Aufkleber. Es gibt nur leichte tagesabhängige Schwankungen. Die Läsionstiere, bei denen die Läsion das sensomotorische Vorderpfotenareal betrifft, zeigen eine deutliche Asymmetrie. Sie reagieren mit einer deutlichen Beeinträchtigung in der sensiblen Reaktion auf die Aufkleber an der behinderten Vorderpfote. Dementsprechend hoch ist das Asymmetriemaß von $3,8 \pm 0,9$ für die gesunde Vorderpfote zwei Tage nach der Induktion der photothrombotischen Läsion. Ab dem siebten Tag nach der Induktion der photothrombotischen Läsion pendelt sich der Wert auf ungefähr 2,5 ein. Das Defizit in der sensorischen Wahrnehmung der behinderten Vorderpfote bleibt bis einen Monat nach der Induktion der photothrombotischen Läsion erhalten ($2,7 \pm 1,1$) und ist statistisch signifikant erhöht im Vergleich zu einem Wert von $-0,6 \pm 0,1$ bei den Kontrolltieren (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 2, 14, 21 und 30 $p < 0,05$; Tag 7 $p < 0,01$). Betrifft die Läsion die Kortexareale Oc2 und Par1, so zeigt sich keine Veränderung in der sensiblen Wahrnehmung der behinderten Vorderpfote im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.2 als Balkendiagramm mit Zeitverlauf dargestellt. Die einzelnen Ergebnisse sind in der Datentabelle der Abbildung 3.3.2 aufgeführt.

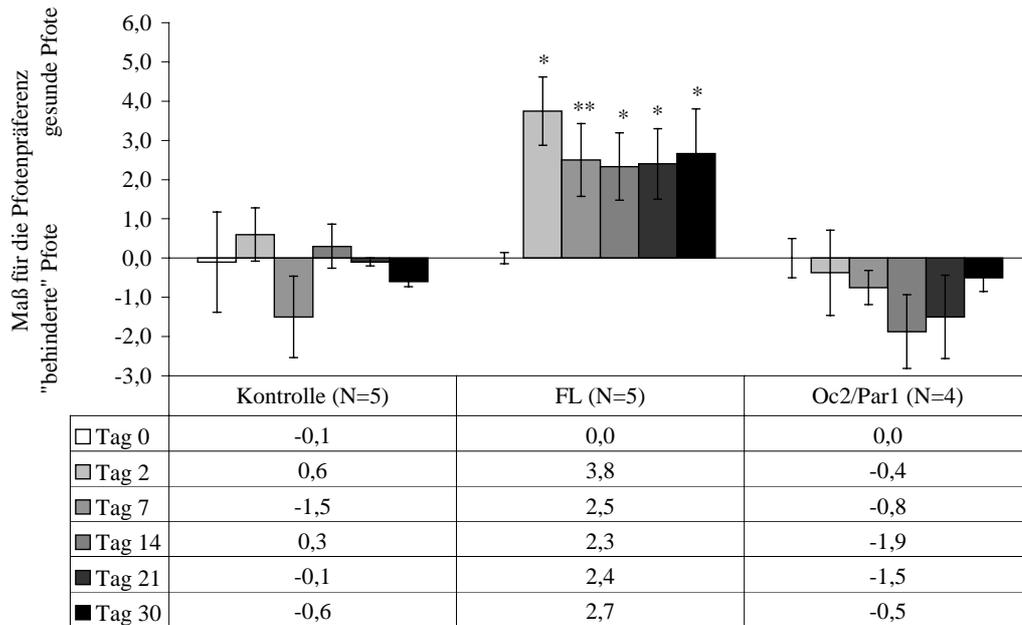


Abbildung 3.3.2: Ergebnisse des bilateralen Stimulationstests. Aufgetragen ist das Maß für die Bevorzugung einer Vorderpfote (Mittelwert \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 30 Tagen. Positive Werte stehen für eine bevorzugte Reaktion auf Aufkleber an der gesunden Vorderpfote und negative Werte für eine Reaktion auf die „behinderte“ Vorderpfote. Kontrollen und Tiere mit einer Läsion in den Arealen Oc2/Par1 zeigen keine Pfotenpräferenz. Tiere mit einer Läsion in FL zeigen nach der Induktion der photothrombotischen Läsion eine deutliche Präferenz für die gesunde Vorderpfote, also eine sensorische Einschränkung der behinderten Vorderpfote. Im Vergleich mit den Kontrolltieren ist dieser Unterschied statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$). Unterhalb der Graphik sind die einzelnen Ergebnisse aufgelistet.

3.3.3 Fehlritte beim Laufen auf einem Gitter

Um motorische Defizite zu untersuchen, können Ratten dazu gebracht werden, über ein Gitter zu laufen. Dabei werden die Fehlritte bei denen eine Pfote durch das Gitter komplett durchrutscht gezählt und als Fehlerrate auf die Gesamtschrittzahl bezogen. Bei dieser Untersuchung wurden Kontrolltiere (N=5) ohne Behandlung verglichen mit Tieren, die entweder eine Läsion im sensomotorischen Vorderpfotenareal (Position: Bregma +0,3 mm, 3,7 mm lateral zur Sagittalnaht, $N_{\text{Tag}0}=6$, $N_{\text{Tag}1}=22$, $N_{\text{Tag}5}=16$, $N_{\text{Tag}7}=9$, $N_{\text{Tag}14}=11$, $N_{\text{Tag}21}=9$ und $N_{\text{Tag}30}=6$,) oder eine Läsion im occipitalen und parietalen Kortex (Position: Mitte zwischen Bregma und Lambda, 4,0 mm lateral zur Sagittalnaht, N=4) erhalten haben.

Bei den Ergebnissen wird zwischen den Fehlerraten der Vorderpfoten und der Hinterpfoten unterschieden. Die Betrachtung der Vorderpfoten zeigt nur am ersten Tag nach der Induktion der photothrombotischen Läsion einen Effekt bei den Tieren mit einer Läsion im Vorderpfotenareal. Dieser Effekt betrifft die von der Läsion betroffene Vorderpfote und zeigt sich in einer signifikanten Erhöhung der Fehlerrate auf $14,6 \pm 2,3$ % im Vergleich zu einer Fehlerrate von $2,1 \pm 1,8$ % bei Kontrolltieren (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,001$). Die Läsion im Areal Oc2/Par1 zeigt keinen Effekt auf die Fehlerrate direkt nach der Induktion der photothrombotischen Läsion und ab Tag 5 unterscheiden sich die beiden Läsionsgruppen nicht mehr von den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 3.3.3 graphisch und tabellarisch dargestellt.

Bei der Hinterpfote sind die Veränderungen ähnlich. Verglichen mit den Kontrolltieren zeigen nur die Tiere mit einer Läsion in Areal FL eine signifikante Erhöhung in der Fehlerrate der betroffenen Hinterpfote. Diese Fehlerrate ist am Tag 1 mit $9,7 \pm 1,9$ % bei Tieren mit FL-Läsion signifikant erhöht, verglichen mit einer Fehlerrate von $0,5 \pm 4,1$ % bei den Kontrolltieren (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05$). Am Tag 5 haben die FL-Läsionstiere eine Fehlerrate von $4,8 \pm 1,3$ % und die Kontrolltiere erreichen $-4,2 \pm 2,2$ %. Die Fehlerrate der Läsionstiere ist signifikant erhöht (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005$). Auch am Tag 14 zeigen die Tiere mit einer Läsion im Areal FL eine erhöhte Fehlerrate von $4,7 \pm 1,4$ % im Vergleich zu den Kontrolltieren mit einer Fehlerrate von $-5,7 \pm 4,2$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,01$). Beim

Vergleich der Kontrolltiere mit den Tieren, die eine Läsion im Areal Oc2/Par1 haben, zeigen sich keine Unterschiede in der Fehlerrate. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 3.3.4 graphisch und tabellarisch dargestellt.

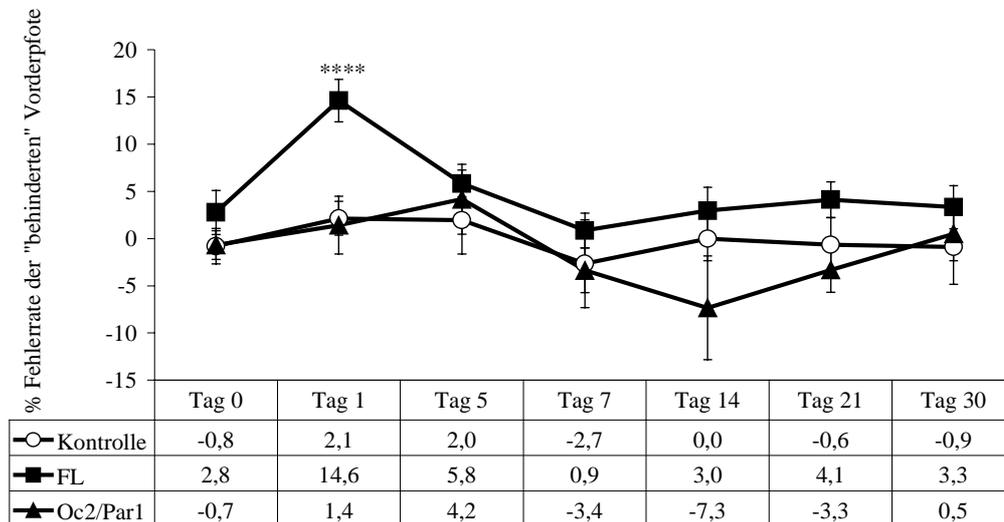


Abbildung 3.3.3: Ergebnisse des Gitterlauftests für die Vorderpfote. Aufgetragen sind die Fehlerrate der „behinderten“ Vorderpfote (Mittelwerte \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 30 Tagen. Verglichen werden Läsionstiere mit Kontrollen über einen Zeitraum von 30 Tagen. Nur Tiere mit einer Läsion im Areal FL zeigen am ersten Tag nach der Induktion der photothrombotische Läsion eine signifikant erhöhte Fehlerrate für die betroffenen Vorderpfote (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,001$). Läsionen im Areal Oc2/Par1 zeigen keinen Effekt bei der Nutzung der Vorderpfoten.

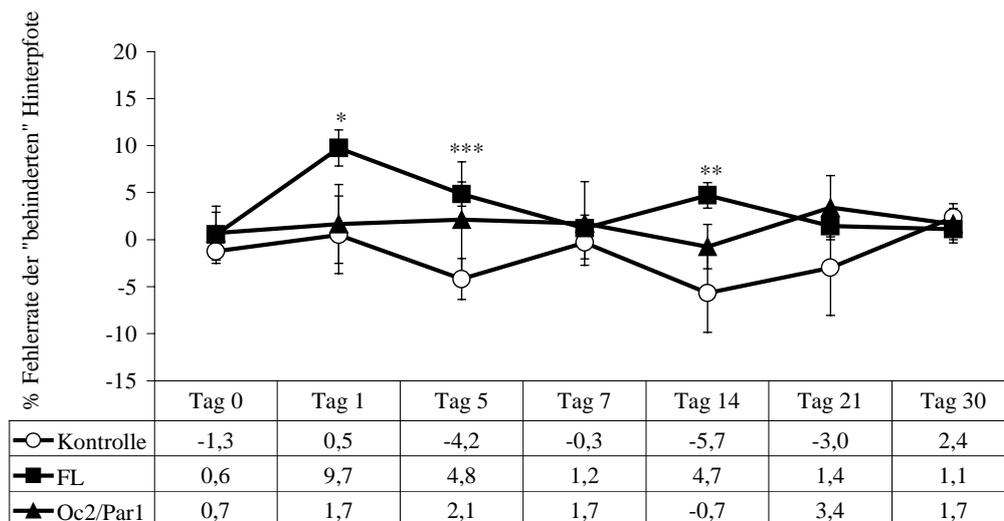


Abbildung 3.3.4: Ergebnisse des Gitterlauftests für die Hinterpfote. Aufgetragen sind die Fehlerraten der „behinderten“ Hinterpfote (Mittelwerte \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 30 Tagen. Verglichen werden Läsionstiere mit Kontrolltieren. Nur die Tiere mit Läsion im Areal FL zeigen eine signifikant erhöhte Fehlerrate für die betroffene Hinterpfote an den Tagen 1, 5 und 14 (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 $p < 0,05$; Tag 5 $p < 0,005$; Tag 14 $p < 0,01$). Keinen Effekt auf die Fehlerrate hat die Läsion im Areal Oc2/Par1.

3.3.4 Streckenschwimmen im Aquarium

Der kortikalen Repräsentation der Vorderpfote wird die Kontrolle des Stillhaltens der Vorderpfote unter dem Kinn beim Schwimmen zugeschrieben. Diese Kontrolle und ein möglicher Verlust derselben sollte untersucht werden an Tieren mit einer Läsion, die entweder das sensomotorische Vorderpfotenareal (Position: Bregma +0,3 mm, 3,7 mm lateral zur Sagittalnaht, N=8) oder den occipitalen und parietalen Kortex (Position: Mitte zwischen Bregma und Lambda, 4,0 mm lateral zur Sagittalnaht, N=4) betrifft. Zum Vergleich wurde eine Kontrollgruppe (N=5) mit Scheinbehandlung getestet.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen keine klaren Defizite in der Kontrolle, die Vorderpfote unter dem Kinn stillzuhalten. Nur an Tagen, an denen die Kontrolltiere tagesabhängig niedrige Werte erreichen, finden sich signifikante Unterschiede zu den Läsionsgruppen. Am Tag 14 erreicht die Läsionsgruppe Oc2/Par1 mit einer Bewegungsrate von $0,1 \pm 0,1$ einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zu der Bewegungsrate $-0,3 \pm 0,1$ von Kontrolltieren (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,01^{##}$, Abb. 3.3.5). Auch die Läsionsgruppe FL erreicht am Tag 21 mit $0,3 \pm 0,2$ einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zu dem Wert $-0,1 \pm 0,1$ der Kontrolle (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$, Abb. 3.3.5). Der zu erwartende mögliche Maximalwert lag bei dem verwendeten Aquarium bei 8,0 und wurde von keinem Tier erreicht.

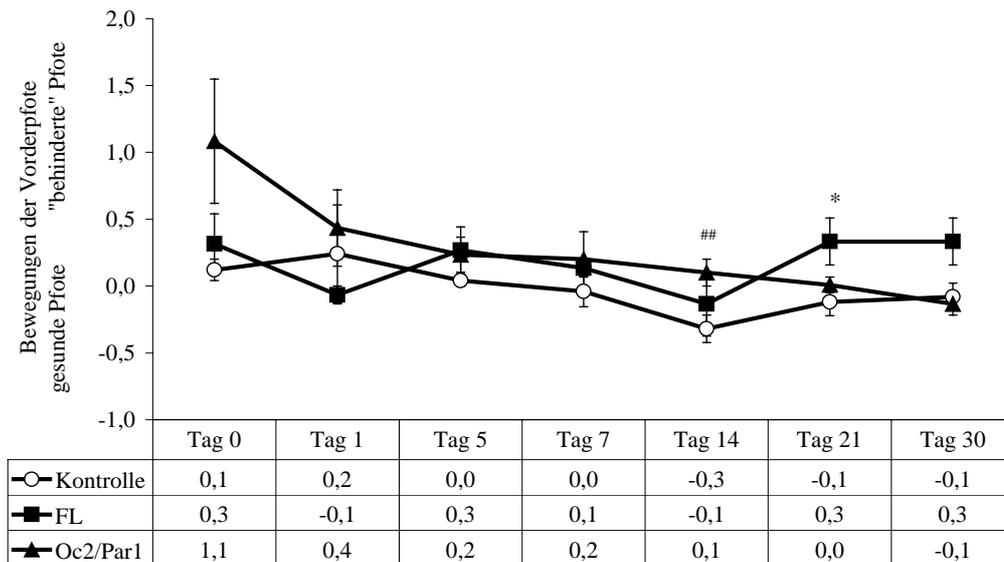


Abbildung 3.3.5: Ergebnisse des Schwimmtests. Dargestellt sind die Bewegungsraten der Vorderpfote als Mittelwert \pm S.E.M. über einen Zeitraum von 30 Tagen. Positive Werte stehen für die Bewegung der „behinderten“ Vorderpfote. Negative stehen für die Bewegung der gesunden Vorderpfote. Die erwartete höchstmögliche Bewegungsrate mit einem Wert von 8 wurde von keiner der beiden Läsionsgruppen erreicht. Am Tag 21 ist die Rate bei FL-Läsionen signifikant erhöht im Vergleich mit Kontrollen (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$). Auch die Oc2/Par1-Läsionsgruppe erreicht am Tag 14 eine signifikant höhere Rate als die Kontrollen (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,01^{##}$).

3.3.5 Aufrichten im Glaszylinder

Eine weitere Möglichkeit, sensomotorische Defizite zu analysieren, ist das Aufrichtverhalten der Ratten in einem Glaszylinder. Ähnlich wie beim Offenfeld untersuchen die Tiere eine für sie neue und unbekannte Umgebung. Dabei richten sie sich an der Wand des Glaszylinders auf und stützen sich an ihr ab. Welche Vorderpfote die Tiere benutzen, um sich entlang der Wand zu bewegen oder zu landen, kann analysiert werden. Bei dieser Untersuchung wurden Kontrolltiere (N=5) mit Scheinbehandlung verglichen mit Tieren, die entweder eine Läsion im sensomotorischen Vorderpfotenareal (Position: Bregma +0,3 mm, 3,7 mm lateral zur Sagittalnaht, N=7) oder eine Läsion im occipitalen und parietalen Kortex (Position: Mitte zwischen Bregma und Lambda, 4,0 mm lateral zur Sagittalnaht, N=6) erhalten haben. In einer weiteren Untersuchungsgruppe erhielten die Tiere eine Läsion im frontalen Neokortex (Position: Bregma +2,5 mm, 2,0 mm lateral zur Sagittalnaht, N=6).

Zunächst besteht die Möglichkeit einfach nur alle Bewegungen, die mit der linken bzw. der rechten Vorderpfote ausgeführt werden, zu betrachten. Dabei wurden die Daten danach analysiert, welche Vorderpfote kontralateral zur Hirnläsion und welche ipsilateral liegt. Die kontralaterale Vorderpfote kann von der Läsion beeinträchtigt sein und wurde daher als „behinderte“ Vorderpfote definiert und der Anteil an der gesamten Pfotennutzung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.6 dargestellt.

Die Kontrolltiere zeigen keine Präferenz in der Benutzung der Vorderpfoten. Diese Tiere benutzen eine Vorderpfote mit einem Anteil von $53,7 \pm 1,1$ % an den Gesamtbewegungen am Tag 0. Diese Vorderpfote wurde als adäquat zur „behinderten“ Vorderpfote definiert und für die folgenden Tage ausgewertet. An den folgenden Tagen behalten sie diesen Wert von knapp über 50 % bei. Im Vergleich dazu zeigen die Tiere mit der FL-Läsion ein deutliches Defizit. Dieses Defizit ist ab Tag 1 nachweisbar mit einer signifikant reduzierten Nutzung der „behinderten“ Vorderpfote von nur $27,6 \pm 2,3$ %. Am Tag 7 beträgt der Anteil der „behinderten“ Vorderpfote $32,6 \pm 2,9$ % und verbessert sich bis Tag 21 auf $40,8 \pm 2,4$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 und 7 $p < 0,005^{***}$ und Tag 21 $p < 0,05^*$). Die Tiere mit der Läsion in Oc2/Par1 haben am Tag 0 einen signifikant niedrigeren Ausgangswert mit $46,8 \pm 2,4$ % (Mann-Whitney-Test,

einseitig, $p < 0,05^{\#}$). Nach der Läsionsinduktion und am Tag 7 zeigt sich kein Unterschied zu den Kontrollen. Erst am Tag 21 erreichen sie noch einmal einen signifikant niedrigeren Wert mit $41,5 \pm 2,6 \%$ (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^{\#}$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Fr1/Fr2-Läsionsgruppe zeigt am Tag 1 eine signifikant erniedrigte Nutzung der „behinderten“ Vorderpfote von nur $38,7 \pm 3,9 \%$ (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$).

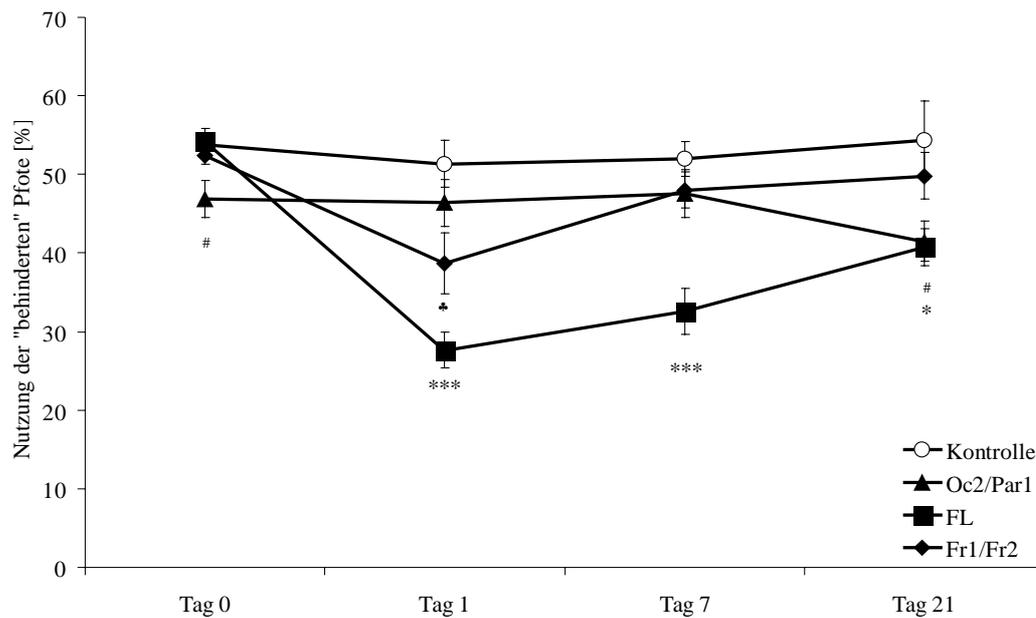


Abbildung 3.3.6: Die Benutzung der „behinderten“ Vorderpfote entlang der Wand und bei der Landung im Glaszylinder. Ausgewertet wurden dabei nur die Bewegungen der „behinderten“ oder der gesunden Vorderpfote. Graphisch dargestellt ist der Anteil der als „behindert“ definierten Vorderpfote an der Gesamtzahl von Bewegungen (Mittelwert \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die Tiere mit der Läsion in Oc2/Par1 zeigen im Vergleich zur Kontrolle an den Tagen 0 und 21 einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^{\#}$). Das deutlichste Defizit im Vergleich zu Kontrollen zeigen die Tiere mit einer Läsion in FL. An den Tagen 1, 7 und 21 wird die „behinderte“ Vorderpfote signifikant weniger genutzt (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 und 7 $p < 0,005^{***}$ und Tag 21 $p < 0,05^*$). Die Fr1/Fr2-Läsionstiere zeigen eine signifikant erniedrigte Nutzung der „behinderten“ Vorderpfote nur am Tag 1 im Vergleich zu der Kontrolle (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$).

Eine Differenzierung zwischen der Pfortennutzung bei Berührungen entlang der Wand und der Landung soll zeigen, ob das gefundene Defizit auf den Bewegungen entlang der Wand oder den Landungen beruht bzw. sich in beiden Fällen manifestiert. In den Abbildungen 3.3.7 und 3.3.8 sind die Ergebnisse getrennt für Berührungen der Wand und für die Landung aufgetragen.

Die Analyse der Bewegungen entlang der Wand zeigt das gleiche Muster wie die Gesamtbetrachtung. Die Kontrolltiere zeigen keine Präferenz in der

Benutzung der Vorderpfoten. Diese Tiere benutzen eine Vorderpfote mit einem Anteil von $55,5 \pm 0,6$ % an den Gesamtbewegungen am Tag 0. An den folgenden Tagen 1 und 21 behalten sie diesen Wert von über 50 % bei. Nur am Tag 7 sinkt der Wert auf $49,2 \pm 3,2$ %. Im Vergleich dazu zeigen die Tiere mit der FL-Läsion ein deutliches Defizit. Dieses Defizit ist ab Tag 1 nachweisbar mit einer signifikant reduzierten Nutzung der „behinderten“ Vorderpfote von nur $26,5 \pm 2,3$ %. Am Tag 7 beträgt der Anteil der „behinderten“ Vorderpfote $31,8 \pm 3,7$ % und verbessert sich bis Tag 21 auf $42,7 \pm 3,4$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 $p < 0,005^{***}$, Tag 7 $p < 0,01^{**}$ und Tag 21 $p < 0,05^*$). Die Tiere mit der Läsion in Oc2/Par1 haben am Tag 0 einen signifikant niedrigeren Ausgangswert mit $46,2 \pm 2,1$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005^{####}$). Nach der Läsionsinduktion und am Tag 7 zeigt sich kein Unterschied zu den Kontrollen. Erst am Tag 21 erreichen sie nochmal einen signifikant niedrigeren Wert mit $40,9 \pm 2,7$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^{\#}$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Fr1/Fr2-Läsionsgruppe zeigt am Tag 1 eine signifikant erniedrigte Nutzung der „behinderten“ Vorderpfote von nur $38,5 \pm 5,0$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$).

Diese Defizite zeigen sich nicht mehr, wenn die Pfootennutzung nur bei der Landung analysiert wird. Nur am Tag 7 haben die Kontrolltiere eine Präferenz für die als „behindert“ definierte Vorderpfote und erreichen einen Wert von $75,4 \pm 8,0$ %. Dieser Wert ist signifikant größer als der Wert für FL-Läsionen mit $35,8 \pm 9,5$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,0001^{****}$), für Oc2/Par1-Läsionen mit $51,1 \pm 6,8$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^{\#}$) und für Fr1/Fr2-Läsionen mit $33,7 \pm 4,7$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005^{***}$).

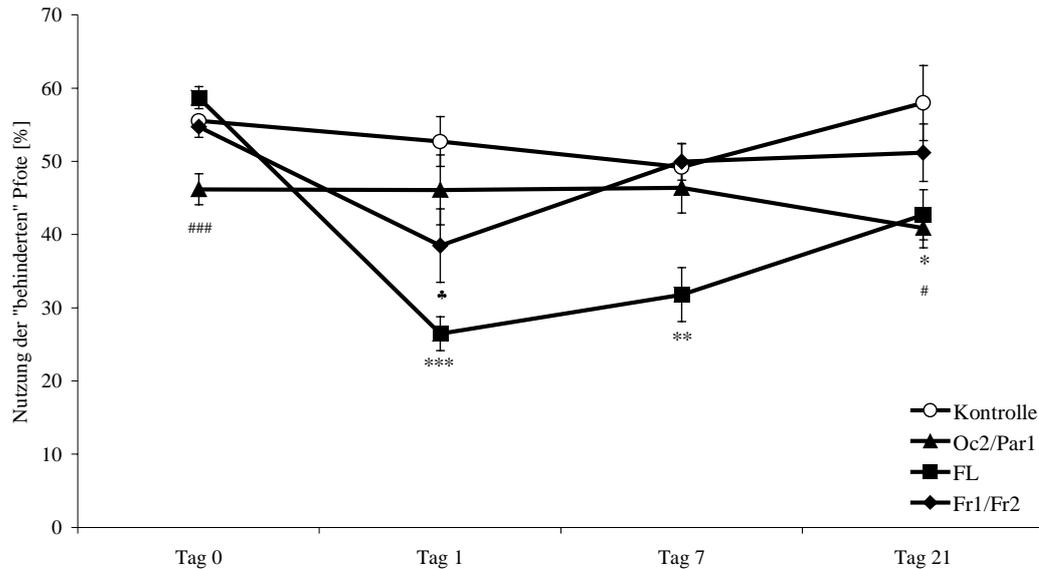


Abbildung 3.3.7: Die Benutzung der „behinderten“ Vorderpfote entlang der Wand im Glaszylinder. Ausgewertet wurden dabei nur die Bewegungen der „behinderten“ oder der gesunden Vorderpfote. Graphisch dargestellt ist der Anteil der als „behindert“ definierten Vorderpfote an der Gesamtzahl von Bewegungen (Mittelwert \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die Tiere mit der Läsion in Oc2/Par1 zeigen im Vergleich zu den Kontrollen an den Tagen 0 und 21 einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 0 $p < 0,005^{###}$ und Tag 21 $p < 0,05^{\#}$). Das deutlichste Defizit im Vergleich zu den Kontrollen zeigen die Tiere mit einer Läsion in FL. An den Tagen 1, 7 und 21 wird die „behinderte“ Vorderpfote signifikant weniger genutzt (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 $p < 0,005^{***}$, Tag 7 $p < 0,01^{**}$ und Tag 21 $p < 0,05^*$). Die Fr1/Fr2-Läsionstiere zeigen eine signifikant erniedrigte Nutzung der „behinderten“ Vorderpfote nur am Tag 1 im Vergleich zu den Kontrolle (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$).

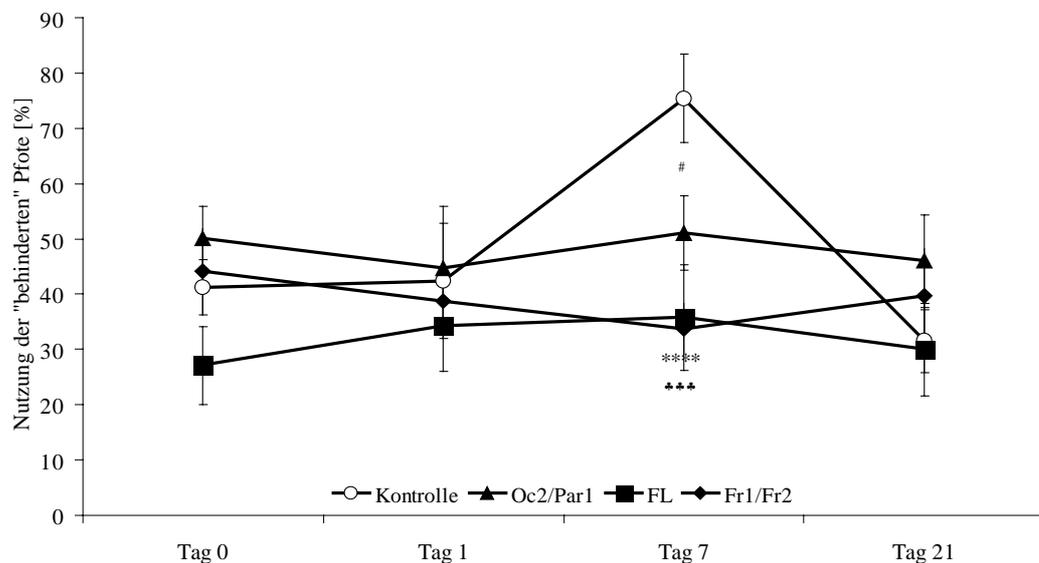


Abbildung 3.3.8: Die Benutzung der „behinderten“ Vorderpfote bei der Landung im Glaszylinder. Ausgewertet wurden dabei nur die Landungen auf der „behinderten“ oder der gesunden Vorderpfote. Graphisch dargestellt ist der Anteil der als „behindert“ definierten Vorderpfote an der Gesamtzahl von Bewegungen (Mittelwert \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 21 Tagen. Das deutlichste Defizit zeigen alle Läsionstiere am Tag 7 im Vergleich zu Kontrollen. Am Tag 7 zeigen die Tiere mit einer FL-Läsion (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 7 $p < 0,001^{****}$), die Tiere mit der Oc2/Par1-Läsion (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^{\#}$) und die Fr1/Fr2-Läsionstiere (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005^{***}$) einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu dem erhöhten Wert der Kontrolltiere.

Die Bewegungen entlang der Wand lassen sich bei genauer Betrachtung noch in einzelne Verhaltenselemente differenzieren. Die Bewegung beginnt mit dem Abstoßen vom Boden und der ersten Berührung der Wand. Die Bewegungen entlang der Wand können in horizontale und vertikale Bewegungen unterteilt werden. Eine Analyse der oben gezeigten Daten kann weiteren Aufschluß darüber geben, in welchen Bewegungselementen das gefundene Defizit am deutlichsten hervortritt. Daraus könnten sich dann genauere Schlussfolgerungen über die Art des Defizits ableiten lassen.

In Abbildung 3.3.9 sind die Ergebnisse des Verhaltenselements Abstoßen vom Boden dargestellt. Nur die Tiere mit FL-Läsionen erreichen am Tag 21 mit einem Wert von $24,1 \pm 7,0$ % im Vergleich zu $43,3 \pm 7,8$ % bei den Kontrollen ein signifikantes Defizit (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$). Die beiden anderen Läsionsgruppen unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt von der Kontrollgruppe.

Auch beim Verhaltenselement der ersten Berührung der Wand (Abbildung 3.3.10) zeigen die FL-Läsionstiere Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen. Am Tag 0 erreichen die FL-Läsionstiere mit $75,2 \pm 6,2$ % einen signifikant höheren Wert als Kontrollen mit $57,5 \pm 6,5$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$). Am Tag 1 zeigen FL-Läsionstiere mit $33,9 \pm 7,9$ % ein signifikantes Defizit verglichen mit einem Wert von $57,7 \pm 6,8$ % bei den Kontrollen (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$). Die beiden anderen Läsionsgruppen unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt von der Kontrollgruppe.

Bei dem Verhaltenselement der horizontalen Bewegungen zeigt sich fast das gleiche Muster wie bei der Gesamtanalyse und der Analyse aller Bewegungen an der Wand. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.11 dargestellt. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigen die Tiere mit der FL-Läsion ein deutliches Defizit. Dieses Defizit ist ab Tag 1 nachweisbar mit einer signifikant reduzierten Nutzung der „behinderten“ Vorderpfote von nur $20,9 \pm 5,7$ %. Am Tag 7 beträgt der Anteil der Nutzung der „behinderten“ Vorderpfote $26,6 \pm 7,0$ % und verbessert sich bis Tag 21 auf $42,3 \pm 4,0$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 $p < 0,005^{***}$, Tag 7 und 21 $p < 0,05^*$). Am Tag 21 erreichen die Tiere mit der Läsion in Oc2/Par1 einen signifikant niedrigeren Wert mit $33,2 \pm 7,5$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^{\#}$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Fr1/Fr2-Läsionsgruppe zeigt keine Unterschied zu den Kontrolltieren.

In Abbildung 3.3.12 ist das Ergebnis des Verhaltenselements vertikale Bewegungen dargestellt. Hier zeigt sich das Defizit der FL-Läsionsgruppe mit einem Wert von $22,5 \pm 3,0$ % am Tag 1 und mit $44,7 \pm 4,4$ % am Tag 21 als signifikant reduziert im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 $p < 0,005^{***}$, Tag 21 $p < 0,05^*$). Die Tiere mit der Oc2/Par1-Läsion zeigen auch hier wieder einen signifikant niedrigeren Ausgangswert von $48,3 \pm 4,1$ % im Vergleich zum Ausgangswert der Kontrollen mit $62,9 \pm 4,5$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^\#$). Auch die Fr1/Fr2-Läsionstiere zeigen hier einen signifikant niedrigeren Ausgangswert von $40,0 \pm 6,8$ % im Vergleich zum Ausgangswert der Kontrollen mit $54,5 \pm 5,0$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$).

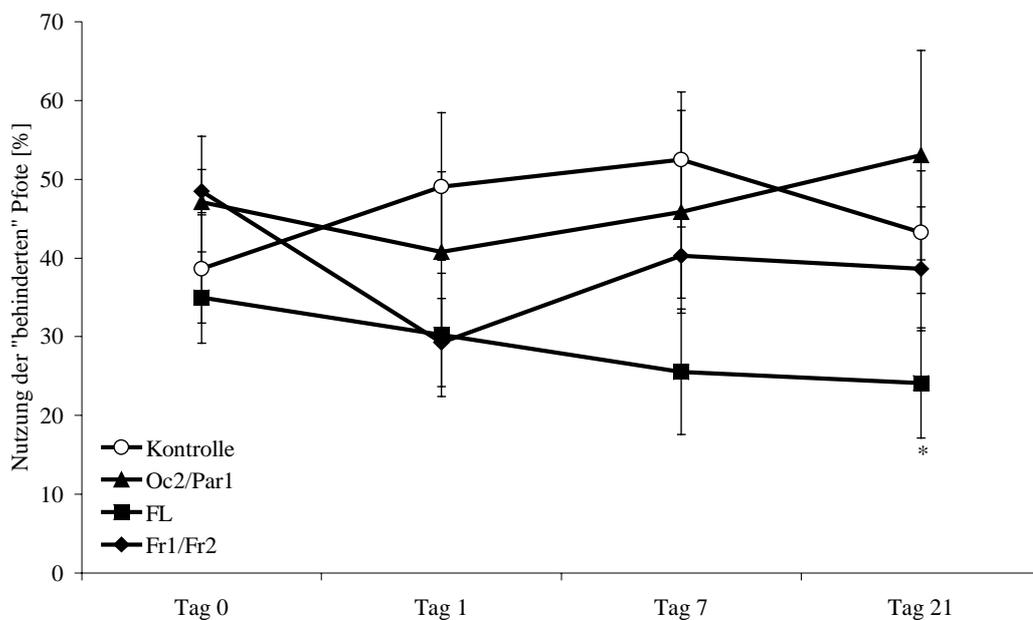


Abbildung 3.3.9: Verhaltenselement Abstoßen vom Boden. Ausgewertet wurden dabei nur die Bewegungen der „behinderten“ oder der gesunden Vorderpfote beim Abstoßen vom Boden. Graphisch dargestellt ist der Anteil der als „behindert“ definierten Vorderpfote an der Gesamtzahl von Bewegungen (Mittelwert \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die Tiere mit der Läsion in Oc2/Par1 zeigen keine Unterschiede im Vergleich mit den Kontrollen. Ein signifikantes Defizit im Vergleich zu den Kontrollen zeigen nur die Tiere mit einer Läsion in FL am Tag 21 (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$). Die Fr1/Fr2-Läsionstiere zeigen keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen.

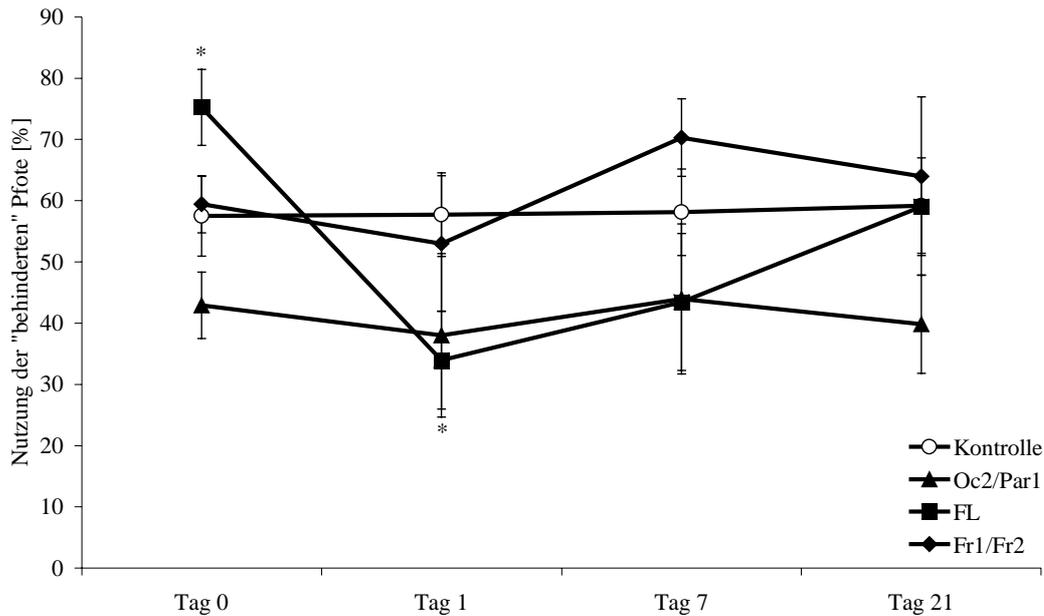


Abbildung 3.3.10: Verhaltenselement erste Berührung der Wand. Ausgewertet wurden dabei nur die erste Berührung der Wand mit der „behinderten“ oder der gesunden Vorderpfote. Graphisch dargestellt ist der Anteil der als „behindert“ definierten Vorderpfote an der Gesamtzahl von Bewegungen (Mittelwert \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die Tiere mit der Läsion in Oc2/Par1 zeigen im Vergleich zu den Kontrollen kein Defizit. Ein signifikantes Defizit im Vergleich zu den Kontrollen zeigen nur die Tiere mit einer Läsion in FL am Tag 21 (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$). Die Fr1/Fr2-Läsionstiere zeigen keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen.

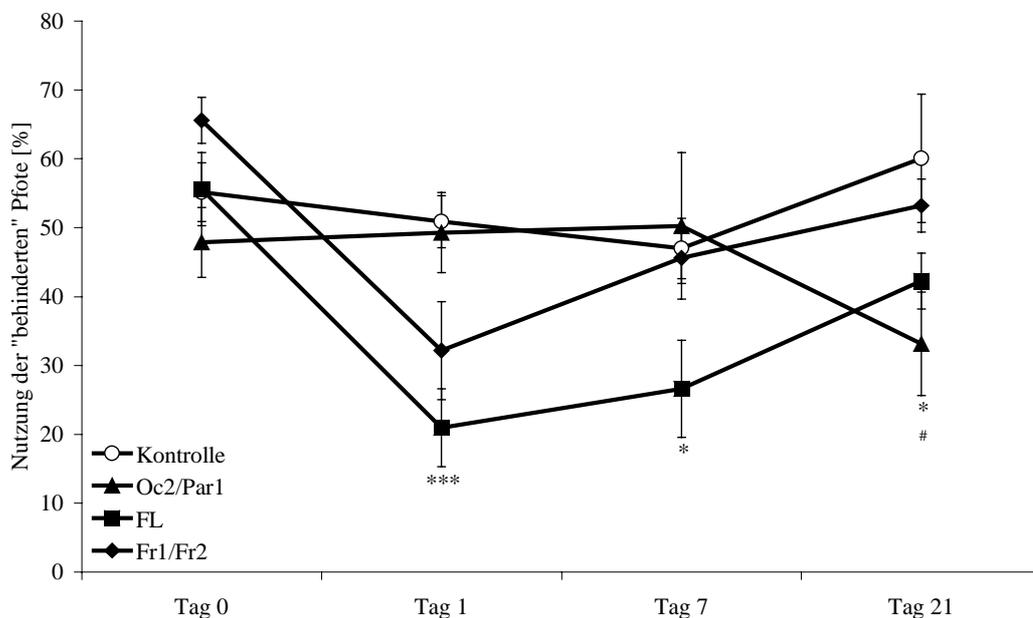


Abbildung 3.3.11: Verhaltenselement horizontale Bewegungen entlang der Wand. Ausgewertet wurden dabei nur die horizontalen Bewegungen der „behinderten“ oder der gesunden Vorderpfote. Graphisch dargestellt ist der Anteil der als „behindert“ definierten Vorderpfote an der Gesamtzahl von Bewegungen (Mittelwert \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die Tiere mit der Oc2/Par1-Läsion zeigen am Tag 21 ein signifikantes Defizit (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$). Ein deutliches Defizit im Vergleich zu den Kontrollen zeigen FL-Läsionstiere am Tag 1, 7 und 21 (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 $p < 0,005^{***}$, Tag 7 und 21 $p < 0,05^*$). Die Fr1/Fr2-Läsionstiere zeigen keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren.

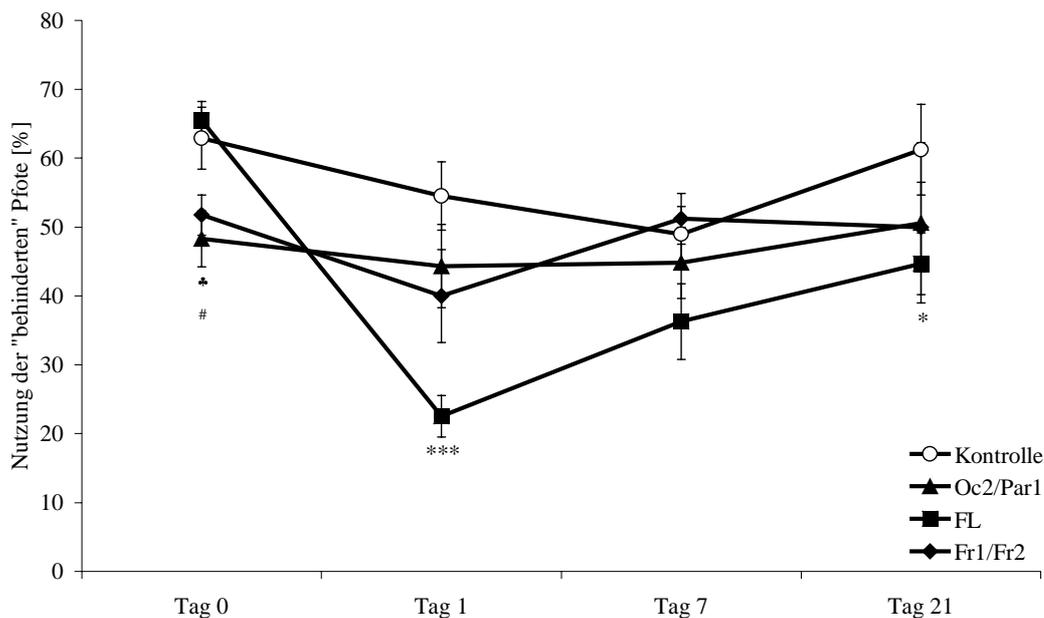


Abbildung 3.3.12: Verhaltenselement vertikale Bewegung entlang der Wand. Ausgewertet wurden dabei nur die vertikalen Bewegungen der „behinderten“ oder der gesunden Vorderpfote. Graphisch dargestellt ist der Anteil der als „behindert“ definierten Vorderpfote an der Gesamtzahl von Bewegungen (Mittelwert \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die Tiere mit der Oc2/Par1-Läsion zeigen im Vergleich zu den Kontrollen am Tag 0 einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^{\#}$). Ein deutliches Defizit im Vergleich zu den Kontrollen zeigen FL-Läsionstiere am Tag 1 und 21 (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 $p < 0,005^{***}$, Tag 21 $p < 0,05^*$). Die Tiere mit der Fr1/Fr2-Läsion zeigen am Tag 0 einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^{\#}$) im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Um die Frage zu untersuchen, ob die Tiere mit der „behinderten“ Vorderpfote unabhängig von der gesunden Vorderpfote agieren können, kann das Verhalten im Glaszylinder auch danach ausgewertet werden, ob eine Vorderpfote allein oder gleichzeitig mit der anderen Vorderpfote benutzt wird. Dabei wird von vornherein zwischen den Bewegungen an der Wand und den Landungen unterschieden.

Die Analyse der Bewegungen an der Wand wirft ein etwas anderes Licht auf die oben beschriebenen Veränderungen. Kontrolltiere benutzen die als „behindert“ definierte Vorderpfote mit einem Anteil von ca. 34 % (Tag 0: $33,1 \pm 4,4$ %, Tag 1: $37,5 \pm 5,6$ %, Tag 7: $28,9 \pm 2,6$ %, Tag 21: $35,7 \pm 3,3$ %), die gesunde mit einem Anteil von ca. 28 % (Tag 0: $29,5 \pm 1,8$ %, Tag 1: $27,0 \pm 3,0$ %, Tag 7: $31,4 \pm 2,6$ %, Tag 21: $26,7 \pm 3,7$ %) und beide Vorderpfoten gemeinsam erreichen einen Anteil von ca. 38 % (Tag 0: $37,4 \pm 4,3$ %, Tag 1: $35,5 \pm 4,2$ %, Tag 7: $39,7 \pm 0,9$ %, Tag 21: $37,6 \pm 2,1$ %). Die Tiere mit der FL-Läsion zeigen am Tag 0 eine signifikant reduzierte Nutzung der gesunden Vorderpfote mit einem Anteil von $20,1 \pm 1,8$ % (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005^{***}$) im

Vergleich zu den Kontrolltieren. Am Tag 1 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen und ein Wechsel in der Pfortennutzung von der „behinderten“ Vorderpfote mit einem Anteil von $19,5 \pm 3,7 \%$ (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,01^{**}$) zur gesunden Vorderpfote mit einem Anteil von $46,7 \pm 5,9 \%$ (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$). Die Nutzung beider Vorderpfoten gleichzeitig verändert sich nicht. Bei den Oc2/Par1-Läsionstieren ist am Tag 1 und 7 die Anteile der „behinderten“ Vorderpfote an der Pfortennutzung reduziert auf $27,2 \pm 3,2 \%$ am Tag 1 (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^{\#}$) und auf $19,7 \pm 3,8 \%$ am Tag 7 (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^{\#}$). Eine Verschiebung zu anderen Vorderpfote oder zur Nutzung beider Vorderpfoten zeigt sich dabei aber nicht. Für die Fr1/Fr2-Läsionsgruppe können keine Unterschiede zur Kontrolle nachgewiesen werden. Es zeigt sich, daß die Defizite bei FL-Läsionen weniger deutlich nachweisbar sind. Das gefundene Defizit für Fr1/Fr2-Läsionstiere beim Vergleich von „behinderter“ versus gesunder Vorderpfote am Tag 1 kann nicht mehr nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Pfortennutzung während der Landungen in Abbildung 3.3.14 zeigt keine der Läsionsgruppen weder für die „behinderte“ noch für die gesunde oder für beide Vorderpfoten einen Unterschied zu der Kontrollgruppe. Hier bestätigt sich, daß die untersuchten Läsionen in diesem Teil des Test keine funktionellen Defizite zeigen.

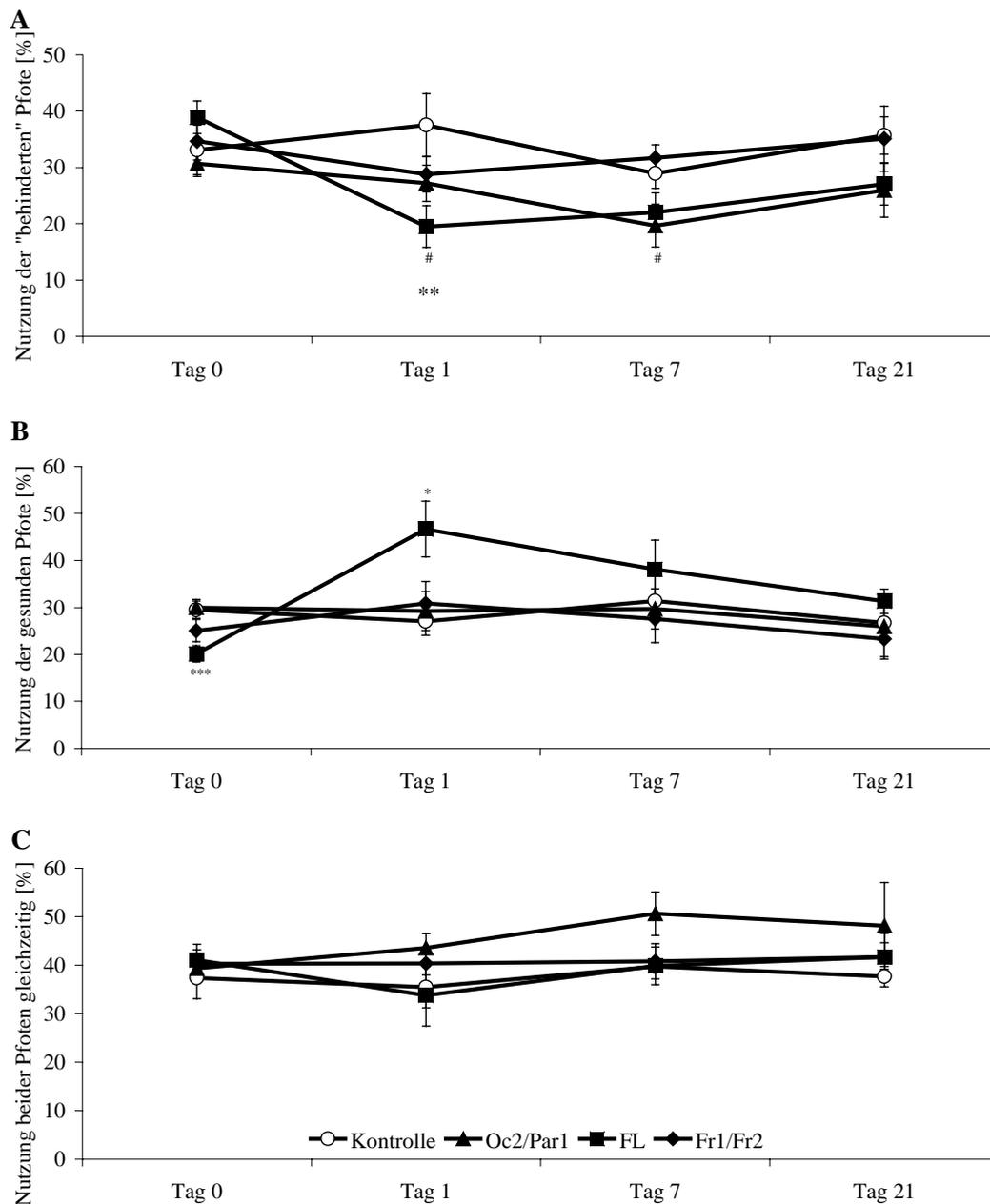


Abbildung 3.3.13: Nutzung der Vorderpfoten an der Zylinderwand. Ausgewertet wurde die Benutzung der „behinderten“ (A), der gesunden (B) und beider Vorderpfoten gleichzeitig (C). Graphisch dargestellt ist der Anteil der als „behindert“ definierten Vorderpfote an der Gesamtzahl von Bewegungen (Mittelwert \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 21 Tagen. Bei der Betrachtung der Nutzung der „behinderten“ Vorderpfote (A) zeigt die Oc2/Par1-Läsionsgruppe (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 und 7 $p < 0,05^{\#}$) und die FL-Läsionsgruppe (Mann-Whitney-Test, einseitig, Tag 1 $p < 0,01^{**}$) ein signifikantes Defizit im Vergleich zu den Kontrollen. Fr1/Fr2-Läsionstiere zeigen kein Defizit im Vergleich zu den Kontrollen. Bei der Betrachtung der Nutzung der gesunden Vorderpfote (B) zeigen die Oc2/Par1-Läsionstiere keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen. Die FL-Läsionsgruppe zeigt ein signifikantes Defizit am Tag 0 (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,005^{***}$) und eine signifikant erhöhte Nutzung der gesunden Vorderpfote am Tag 1 (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p < 0,05^*$) im Vergleich zu den Kontrollen. Bei der Betrachtung der Nutzung beider Vorderpfoten (C) zeigt keine der Läsionsgruppen einen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen. Am deutlichsten läßt sich eine Verhaltensänderung nach der Läsion am Tag 1 bei FL-Läsionstieren zeigen. Diese Tiere zeigen einen Wechsel von der geringeren Benutzung ihrer „behinderten“ Vorderpfote zugunsten einer deutlich erhöhten Benutzung der gesunde Vorderpfote. Eine solche Nutzungsverschiebung läßt sich bei den anderen beiden Läsionsgruppen nicht zeigen.

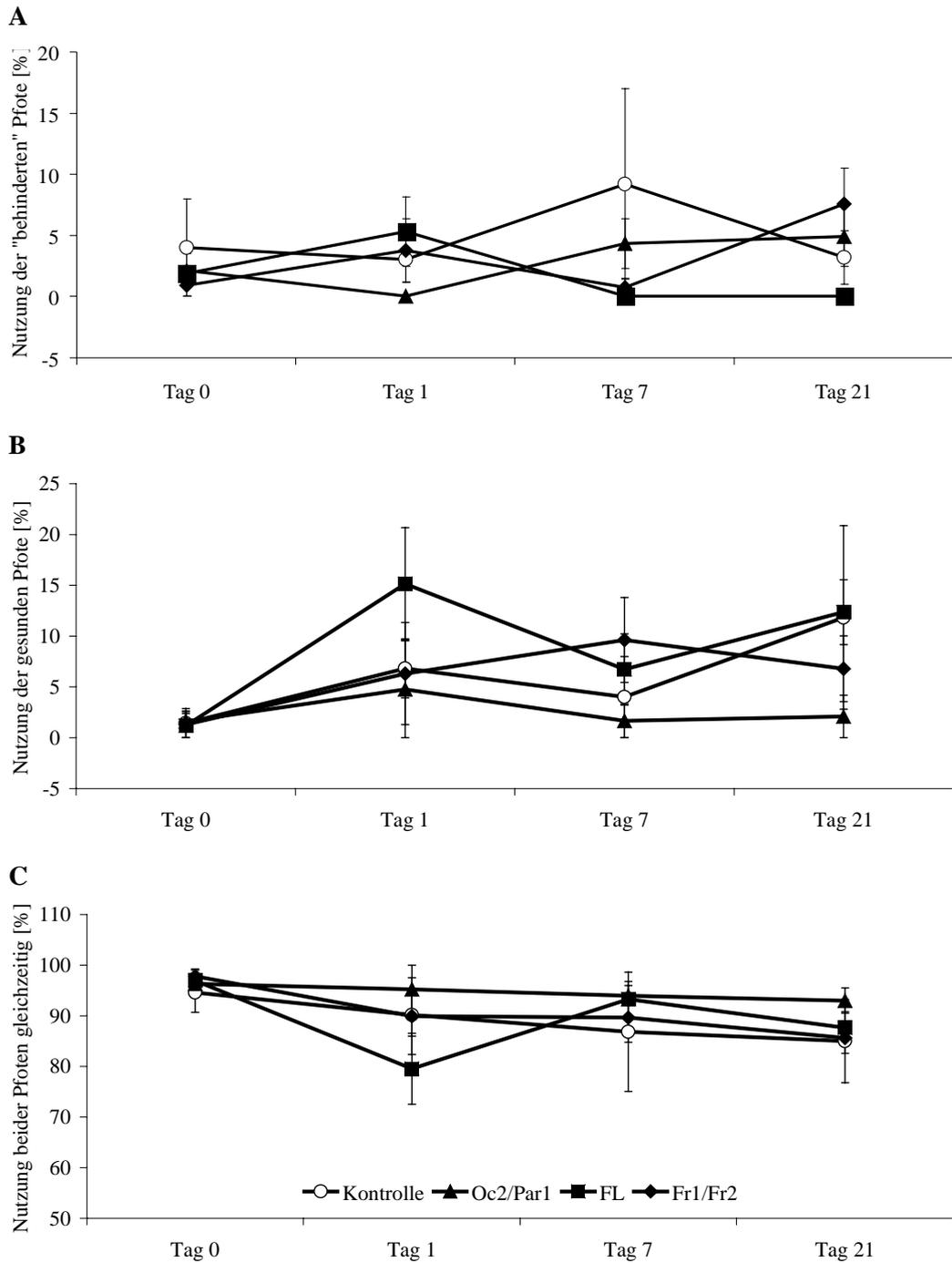


Abbildung 3.3.14: Nutzung der Vorderpfoten bei der Landung im Zylinder. Ausgewertet wurde die Benutzung der „behinderten“ (A), der gesunden (B) und beider Vorderpfoten gleichzeitig (C). Graphisch dargestellt ist der Anteil der als „behindert“ definierten Vorderpfote an der Gesamtzahl von Bewegungen (Mittelwert \pm S.E.M.) über einen Zeitraum von 21 Tagen. Bei keiner der betrachteten Bewegungen zeigen die Läsionstiere einen Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dementsprechend zeigen sich auch keine Wechsel in der Pfotennutzung.

Zusammenfassend konnten mit drei der vier Tests akute Defizite in der Nutzung der „behinderten“ Pfote bei Tieren mit einer Läsion im Vorderpfotenareal nachgewiesen werden. Zum Teil blieben diese Defizite bis zum Ende der Untersuchungen nachweisbar. Bei der Läsion Oc2/Par1 können keine Defizite in der Pfortennutzung nachgewiesen werden. Die ergänzende Untersuchung von Tieren mit einer Läsion im motorischen Kortex (Fr1/Fr2) beim Aufrichten im Glaszylinder konnte nur ein akutes Defizit nachweisen. Alle wichtigen Ergebnisse sind in Tabelle 3.3.1 zusammengefaßt.

Tabelle 3.3.1: Zusammenfassung der Verhaltenstuntersuchung. Relativer Schweregrad von akuten und chronischen Defiziten für die drei Läsionspositionen FL, Oc2/Par1 und Fr^a

	<i>FL Läsion</i>		<i>Oc2/Par1 Läsion</i>		<i>Fr Läsion</i>	
	akut	chronisch	akut	chronisch	akut	chronisch
Bilateraler Stimulationstest	++	+	-	-	X	X
Fehlritte auf dem Gitter	+ ¹ + ²	- ¹ - ²	-	-	X	X
Strecken-schwimmen	-	-	-	-	X	X
Aufrichten im Glaszylinder	++	+	-	-	+	-

^a Bezeichnungen: ++ stark, + leicht, - kein Defizit, X nicht untersucht.¹ Vorderpfote, ² Hinterpfote.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden pathophysiologische Veränderungen und Schädigungen eines ischämischen Insultes im Kortex der Ratte untersucht. Dabei wurden die Erkenntnisse über elektrophysiologische Veränderungen beim Photothrombosemodell auf das MCAO-Modell übertragen und an diesem überprüft. Damit konnte die Annahme der allgemeinen Gültigkeit dieser Veränderungen in Ischämie modellen bestätigt werden. Außerdem wurden die Auswirkungen auf die Sensorik der Hinterpfotenrepräsentation in der Umgebung einer photothrombotischen Läsion, sowie Diaschisiseffekte in der kontralateralen Hemisphäre untersucht. In beiden Arealen konnte eine Vergrößerung der rezeptiven Felder nachgewiesen werden. Um die funktionellen Folgen einer Läsion zu untersuchen, wurden eine Reihe von Verhaltenstests etabliert, welche die Sensomotorik der Pfoten analysieren. Das Ausmaß und der Zeitverlauf einer Erholung der photothrombotisch induzierten Läsionsfolgen wurde untersucht und den Resultaten elektrolytischer Läsionen und Saugläsionen gegenübergestellt. Es zeigte sich, daß eine photothrombotische Läsion, die in den morphologischen und räumlichen Ausmaßen einer elektrolytischen Läsion entspricht, dennoch ein kleineres Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote erzeugt und eine schnellere Erholung aufweist.

4.1 Die Infarktmodelle

MCAO: Bei diesem Läsionsmodell wird die mittlere Zerebralarterie (MCA) verschlossen und so der Infarkt induziert. Hierzu wird ein Filament (Fadenmodell) über die *Arteria carotis communis* (CCA) bis zum Abgang der mittleren Zerebralarterie vorgeschoben. Der Verschluß dieses Gefäßes vermindert die Blutversorgung sowohl in kortikalen als auch subkortikalen Geweben (*Striatum*), aber nicht im Hippocampus. Je länger diese Durchblutungsstörung anhält, desto größer wird der ischämisch geschädigte Bereich. Ab einer zweistündigen Okklusionszeit wird ein maximaler Infarkt, mit großen kortikalen und kompletten striatalen Schäden erzeugt (LUTZENBURG 1999). Begleitet wird der Insult in allen Fällen von einem massiven Ödem innerhalb der ersten 24 Stunden. Das Ödem ist einer der Faktoren, die zu einer hohen Mortalitätsrate von bis zu 30 % beitragen

und zählt somit zu den bedeutenden Nachteilen dieses Ischämie-modells. Zu den Vorteilen dieses Modells zählt, daß die Schädelkalotte nicht geöffnet werden muß und durch Zurückziehen des Filamentes eine Reperfusion ermöglicht werden kann. Die gute Reproduzierbarkeit ist ein weiterer Vorteil dieser Methode.

Beim ischämischen Gewebe wird morphologisch zwischen dem Kerngebiet und einem Halbschattengebiet, der sogenannten Penumbra, unterschieden. Das Kerngebiet ist ein stark geschädigter Bereich, der nicht überlebt. Dieser Bereich geht durch nekrotische Prozesse unter und wird später von einer glialen Narbe ersetzt. Die Penumbra ist gekennzeichnet durch einen verminderten Blutfluß, einen erhöhten Sauerstoff- und Glukoseverbrauch und Azidosis. Ihre Existenz ist zeitlich begrenzt und örtlich variabel. Dieses Gewebe ist der Ansatzpunkt für Therapien, die durch rechtzeitige lokale Erhöhung der Durchblutung und der Dämpfung des Stoffwechsels versuchen, das Gewebe zu erhalten. Damit soll die Läsionsgröße minimiert werden, da sonst das Kerngebiet des Infarktes durch Apoptose vergrößert wird (CRUMRINE et al. 1994). Da durch die permanente MCAO, die betroffene Hemisphäre fast komplett geschädigt wurde, konnten die elektrophysiologischen Ableitungen nur in der kontralateralen Hemisphäre durchgeführt werden.

Photothrombose: Die photothrombotische Läsion im Kortex (WATSON et al. 1985) wird durch ein Fluoreszein-Derivat Bengal Rosa induziert, das in die Blutbahn injiziert wird. Nach Belichtung durch die Kalotte mit Kaltlicht werden in dem Kortexareal, das dem Licht ausgesetzt ist, Radikale gebildet. Die Radikale führen zu einer Schädigung des Endothels, die anschließend eine Thrombozytenaggregation einleitet. Diese Aggregation führt zum Verschuß der belichteten Gefäße (DIETRICH et al. 1987). Charakteristisch für eine photothrombotische Läsion ist eine scharfe Abgrenzung zwischen dem geschädigten Gewebe und der morphologisch intakten Umgebung. Im Vergleich zum realen Schlaganfall, wo die Kapillargefäße in den ersten Stunden nach einem Insult wieder perfundiert werden können, hat dieses Modell den Nachteil, daß die Kapillaren irreversibel verschlossen werden. Hierdurch ist eine Reperfusion des Läsionsbereiches nicht mehr möglich. Ferner weist eine photothrombotische Läsion, im Gegensatz zu anderen Ischämie-modellen, keine ausgeprägte Penumbra auf (LEE et al. 1996). Da sich die vorliegende Arbeit mit zeitlich später entstehenden und langandauernden Veränderungen befaßt, war dieser Nachteil

nicht von kritischer Bedeutung. Als Vorteile dieser Methode lassen sich die nicht-invasive Art der Läsionsinduktion, die gute Reproduzierbarkeit und die freie Wählbarkeit der Position im Kortex anführen. Im Gegensatz zu Elektrolyt- und Saugläsionen, wo eine Öffnung des Schädelknochens unerlässlich ist, muß für die Induktion der Photothrombose lediglich die Kopfhaut geöffnet werden.

4.2 Elektrophysiologische Diaschisis *in vitro*

In der ersten dargestellten Experimentserie wurden die Auswirkungen eines Mediainfarktes auf die kontralaterale Hemisphäre sieben Tage nach der Infarktinduktion an Hinschnittpräparaten untersucht. Dabei wurden etablierte elektrophysiologische Methoden angewendet (diskutiert bei BUCHKREMER-RATZMANN 1997). Es konnte gezeigt werden, daß die Erregbarkeit über nahezu den ganzen Kortexbereich, von der Mittellinie bis 10 mm lateral, signifikant erhöht ist. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von BUCHKREMER-RATZMANN et al. (1996) an photothrombotischen Läsionen überein. In beiden Modellen kann eine transkortikale elektrophysiologische Diaschisis, in Form einer kortikalen Übererregbarkeit, nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, daß die Übererregbarkeit nicht auf spezifische Mechanismen der Läsionsmodelle zurückzuführen ist. Spezifische Mechanismen sind z. B. bei der photothrombotischen Läsion die massive Freisetzung von Radikalen und das Verschließen vieler kleiner Gefäße und Kapillaren, anstelle von einem großen Gefäß, bzw. die starke Ödembildung im Bereich des Infarktes während der ersten Tage nach der MCAO-Operation. Vielmehr sind die Effekte das Resultat der Hirnläsion selbst. Auch in einer weiterführenden Untersuchung von NEUMANN-HAEFELIN & WITTE (2000) konnten diese elektrophysiologischen Veränderungen gezeigt werden. Dabei wurde an transienter MCAO nachgewiesen, daß ipsi- und kontralateral die GABAerge Hemmung reduziert ist. Außerdem zeigte sich in der direkten Umgebung der Läsion (bis 3 mm), also in der Penumbra, eine signifikante Reduktion der ersten Feldpotentialamplitude. Als Ursachen dieser Veränderungen werden in der Literatur ein selektiver Neuronenverlust (MIES et al. 1993, NEDERGAARD, 1988), inflammatorische Prozesse (BECKER 1998) und die Gliosis (GARCIA et al. 1997) diskutiert.

Die Hirnhemisphären sind durch Nervenfasern, die über das *Korpus callosum* in die jeweils andere Hemisphäre projizieren, verbunden. Als naheliegende Erklärung für die transkortikale elektrophysiologische Diaschisis wird die Deafferentierung der Neuronen diskutiert. VON MONAKOW (1895, 1914) nahm an, daß der Verlust von exzitatorischem Input aus dem infarzierten Areal sich auf entfernte Areale auswirkt und diese für lokale Stimuli unempfindlicher macht. Es gibt aber Beobachtungen, die gegen eine Deafferentierung als Ursache für die gefundene Übererregbarkeit in entfernten Arealen sprechen. Erstens zeigen Untersuchungen des Zeitverlaufs an photothrombotischen Läsionen, daß sich die Übererregbarkeit in entfernten Arealen schon nach Stunden entwickelt und fünf bis sieben Tagen nach der Läsionsinduktion ein Maximum erreicht. Zweitens kann die Übererregbarkeit verhindert werden, indem pharmakologisch die Stickoxid-Kaskade (NO-Kaskade) beeinflusst wird (BIDMON et al. 1997, BUCHKREMER-RATZMANN & WITTE 1997). Diese beiden Beobachtungen stehen etwas im Widerspruch zu der Annahme, daß die Effekte in entfernten Bereichen auf einen Mangel an Input zurückzuführen sind. Daraus ergibt sich die Annahme, daß weitere sekundäre Prozesse folgen, z. B. Veränderungen im zellulären Kaliumstrom (BRUEHL et al. 2000), und für die Übererregbarkeit mitverantwortlich gemacht werden können. Ein möglicher Vorteil der Übererregbarkeit könnte in einem positiven Einfluß auf die funktionelle Erholung und die damit einhergehenden plastischen Prozesse liegen. Allerdings kann die Übererregbarkeit auch für epileptische Anfälle bei Schlaganfallspatienten verantwortlich sein (KOTILA & WALTIMO 1992).

4.3 Elektrophysiologische Diaschisis *in vivo*

Mit elektrophysiologischen Ableitungen *in vivo* wurden Veränderungen im ipsilateralen Fernbereich einer photothrombotischen Läsion und in der kontralateralen Hemisphäre nachgewiesen. Die Läsion betraf Teile des visuellen und parietalen Kortex und lag 1,5 - 2,0 mm entfernt zur sensomotorischen Hinterpfotenrepräsentation. Nach der Läsion zeigten die rezeptiven Felder der Fußsohle eine deutliche Vergrößerung. Diese Vergrößerung konnte sowohl in der ipsilateralen, als auch in der kontralateralen Hemisphäre nachgewiesen werden. Die Auswertungen der elektrophysiologischen lokalen Feldpotentiale zeigten

Veränderungen in den Eigenschaften der Reizantwort (Amplitude und Latenz) nach der Läsion. Die Amplituden waren kleiner und die Latenz der ersten Antwort war erhöht. Mit dem Doppelpuls-Paradigma ließ sich eine veränderte Hemmung nachweisen. In der ipsilateralen Hemisphäre war der Quotient A_2/A_1 bei allen drei Interstimulusintervallen von 25, 50 und 100 ms signifikant reduziert. In der kontralateralen Hemisphäre war eine signifikante Reduktion des Quotienten A_2/A_1 nur bei dem Interstimulusintervall von 50 ms vorhanden. Eine Verkleinerung des Quotienten weist auf eine erhöhte Netto-Hemmung im System hin.

Die Vergrößerung der rezeptiven Felder läßt sich mit Veränderungen in der lateralen Hemmung erklären. Ist die laterale Hemmung aus Abbildung 1.1 reduziert, so vergrößern sich die rezeptiven Felder, die mit der kutanen taktilen Stimulation abgetastet werden können. Bei den Interneuronen, die für die laterale Hemmung verantwortlich sind, handelt es sich um Neuronen des GABAergen Hemmungssystems. Diese Hypothese kann durch Blockierung der GABA_A-Inhibition mit Bicucullin überprüft werden. Nach Applikation von Bicucullin läßt sich eine Vergrößerung von rezeptiven Feldern nachweisen (ATWOOD & MACKAY, 1994).

Auch das Doppelpuls-Paradigma ist ein indirekter Indikator für die Veränderung der GABAergen Hemmung (TUFF et al. 1983, DOMANN et al. 1993). Für die Messungen der Doppelpuls-Hemmung wurde im Zentrum des rezeptiven Feldes taktil mechanisch gereizt. Die Interstimulusintervalle betragen 25, 50 und 100 ms, um sich dem 20 ms Interstimulusintervall aus den *in vitro*-Messungen so gut wie möglich anzunähern. Kleinere Interstimulusintervalle waren durch die Einschränkungen der Stimulationsmechanik nicht möglich. Die größeren Interstimulusintervalle wurden gewählt, um die zeitliche Auflösung und eine mögliche Inhibition in der Reizkaskade beurteilen zu können. Der Quotient A_2/A_1 ist in der ipsilateralen Hemisphäre bei allen drei Interstimulusintervallen reduziert und in der kontralateralen Hemisphäre nur bei 50 ms. Die Reduzierung des Quotienten deutet auf eine verstärkte Hemmung hin. Dies scheint im Widerspruch zur verringerten Hemmung bei den vergrößerten rezeptiven Feldern zu stehen.

Dieser Widerspruch wird aufgelöst, wenn die laterale Hemmung als Mechanismus zur räumlichen Auflösung eines Reizes und die Feedback- bzw.

Feedforward-Hemmung als Mechanismus zur zeitlichen/seriellen Auflösung eines Reizes betrachtet wird. Die räumliche Auflösung ist mit der reduzierten lateralen Hemmung geringer geworden und die rezeptiven Felder entsprechend vergrößert. Beim Doppelpuls-Paradigma ist die Zeit zwischen den Reizen der Parameter, der analysiert wird. Eine verstärkte Hemmung weist dementsprechend auf eine Veränderung in der zeitlichen Auflösung hin. Diese veränderte zeitliche Auflösung würde auf eine Veränderung in der Feedback-Hemmung hinweisen. Das Prinzip der Feedback-Hemmung beruht auf dem Einfluß des ersten Reizes auf den zweiten Reiz. Durch die verstärkte Hemmung wird die Wahrscheinlichkeit geringer, daß ein nachfolgender Reiz weitergeleitet wird. Die zeitliche Auflösung von taktilen Reizen wird danach schlechter.

Die verringerten Amplituden und die vergrößerten Latenzen weisen auf eine Veränderung in der Reizleitungskaskade durch die photothrombotische Läsion hin. Die Reizleitung wird über drei synaptische Verschaltungen durch verschiedene Regionen des ZNS weitergeleitet. Dabei haben sowohl prä- als auch postsynaptische Veränderungen einen Einfluß auf die Reizleitung. Eine reduzierte Amplitude der lokalen Feldpotentiale in der direkten Umgebung eines MCAO-Infarktes wurde von NEUMANN-HAEFELIN & WITTE (2000) nachgewiesen. Dies bezog sich auf den Bereich der Penumbra und war nur ipsilateral meßbar. In der vorliegenden Studie kann die veränderte Amplitude damit nicht vollständig erklärt werden. Zum einen sind die Veränderungen in beiden Hemisphären nachweisbar und zum anderen wird bei der photothrombotischen Läsion nur von einer sehr kleinen Penumbra ausgegangen. Beachtet werden muß, daß die elektrophysiologischen Ableitungen die lokalen Feldpotentiale von einer großen Gruppe von Neuronen (multiunit) aufzeichnen. Daher sind keine Aussagen über die Veränderungen auf zellulärer Ebene möglich. Dies würde Einzelzelleitungen erfordern.

Ein Mechanismus, der zur Erklärung von ipsilateralen Veränderungen diskutiert wird, ist die Entstehung von *Spreading Depression* (SD) nach einem Hirntrauma. LEAO (1944) charakterisierte die SD als eine massive und simultane Depolarisierung nicht nur der Neuronen, sondern auch glialer Parenchymzellen mit zeitweiligem Funktionsverlust ("depression") und wandert über den ipsilateralen Cortex ("spreading"). Mit einer Geschwindigkeit von 2 - 5 mm/min breitet sich die SD über den Kortex aus. Nach einer Läsion sterben in ihrem

Zentrum Neuronen ab und geben dabei unter anderem Kaliumionen in den extrazellulären Raum ab. Steigt die K^+ -Konzentration (50 - 80 mM) deutlich über den *ceilinglevel* (HEINEMANN & LUX, 1977), entsteht eine solche SD und läuft über den ipsilateralen Kortex. Eine Behandlung mit MK-801, das den glutamatgesteuerten Kalziumeinstrom in die Zellen blockiert, kann die Entstehung von SD verhindern, aber nicht die reduzierte Hemmung (BUCHKREMER-RATZMANN & WITTE 1997). Daher lassen sich die hier dargestellten Ergebnisse nicht durch SD-Entwicklungen erklären. Ein weiterer diskutierter Mechanismus ist die Deafferentierung. Dabei werden ipsilaterale Veränderungen auf den Verlust intrakortikaler Verbindungen zurückgeführt. Auch die kontralaterale Hemisphäre ist durch kortikokortikale Verbindungen mit der geschädigten Hemisphäre verbunden, und ein Verlust dieser Verbindungen könnte die Veränderungen erklären. Dieser Zusammenhang zwischen Deafferentierung und elektrophysiologischer Diaschisis wurde bereits diskutiert. Auch die Verbindungen zwischen Kortex und subkortikalen Strukturen wird durch eine Deafferentierung beeinträchtigt. So kann über kortikothalamische Verbindungen eine kortikale Läsion den Thalamus beeinflussen. KRUPA et al. (1999) konnten plastische Veränderungen der rezeptiven Felder von Vibrissen im Thalamus nachweisen, die von einer Inaktivierung im Kortex ausgelöst wurde. Dies ist ein Hinweis auf die Bedeutung der kortikothalamischen Verbindungen. PARKER & DOSTROVSKY (1999) zeigten einen Zusammenhang zwischen *Nucleus gracilis*, Thalamus und Kortex mit ihren afferenten und efferenten Verbindungen in der Ratte. Nach einer Läsion im *Nucleus gracilis* konnten sie eine Vergrößerung der somatosensorischen Repräsentationen der Extremitäten im Thalamus nachweisen. Eine gleichzeitige kortikale Läsion (Saugläsion) in der Vorderpfotenrepräsentation verhinderte die plastische Größenveränderung. Tiere, bei denen nur eine kortikale Läsion induziert wurde, zeigten kein Einfluß der Läsion auf die Repräsentationen im Thalamus. Daraus ergibt sich die Frage, ob sich die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen bereits im *Nucleus gracilis* bzw. im Thalamus manifestieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen keine Aussagen darüber zu, an welcher Stelle (Kortex und/oder Thalamus) die Reizleitungskaskade verändert ist. Die Daten aus der Literatur beziehen sich auf andere sensorische Systeme (Vibrissen) oder untersuchen andere Läsionsmodelle. Daher sind nur theoretische Hypothesen möglich, an welcher Stelle in der

Reizleitungskaskade die gefundene Vergrößerung der rezeptiven Felder manifestiert ist. Diese Hypothesen müssen mit Hilfe des photothrombotischen Läsionsmodells überprüft werden, wobei dann im Thalamus und auch im *Nucleus gracilis* elektrophysiologisch abgeleitet wird.

Bei einer Bewertung der nachgewiesenen Veränderungen ist keine eindeutige Aussage über positive oder negative Wirkungen möglich. Ein möglicher Vorteil der vergrößerten rezeptiven Felder könnte in einem positiven Einfluß auf die funktionelle Erholung und damit einhergehenden plastischen Veränderungen liegen. Es ist vorstellbar, daß alle afferenten Verbindungen genutzt werden, bis sich ein neues Gleichgewicht eingestellt hat und klargeworden ist, welche afferenten Nervenbahnen die effektivsten Verbindungen darstellen. Dies ist vergleichbar mit der frühen Entwicklung der Verschaltungen im kindlichen Gehirn. Auch im Zusammenhang mit anderen Regenerationsprozessen wird die embryonale Entwicklung der betroffenen Strukturen und die zugrundeliegenden molekular-genetischen Regelkreise diskutiert. Nachteilig kann sich die Veränderung der rezeptiven Felder auswirken, wenn sich der Verlust der räumlichen und zeitlichen Kontrastschärfe dauerhaft manifestiert. Es ist denkbar, daß dieser Verlust der feinen sensorischen Sensibilität sich negativ auf die Wahrnehmung sehr kleiner und schneller Reize auswirkt.

4.4 Asymmetrien in der Pfotennutzung

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde der Einfluß einer photothrombotischen Läsion auf die Benutzung der von der Läsion betroffenen Pfote untersucht. Dazu wurden vier verschiedene Verhaltenstests etabliert, die gezielt die Pfotennutzung analysieren und auf eine Asymmetrie in der Pfotennutzung hinweisen. Beim bilateralen Stimulationstest wurde die sensible Wahrnehmung der Vorderpfotenhandgelenke untersucht. Beim Laufen über ein Gitter wurden Fehlritte sowohl der Vorderpfote als auch der Hinterpfote gewertet, die damit Aufschluß über ein senso-motorisches Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote gaben. Die Senso-Motorik der Vorderpfoten wurde auch beim Aufrichten im Glaszylinder untersucht. Dabei wurde die Nutzung der Vorderpfoten entlang der Wand unter verschiedenen Aspekten ausgewertet. Im Gegensatz zu den Untersuchungen zu Bewegungsdefiziten wurde beim

Streckenschwimmen das kontrollierte Ruhighalten der Vorderpfoten bzw. ein Verlust dieser Kontrolle untersucht.

Bei allen Läsionstieren wurde *post mortem* die Läsion histologisch aufgearbeitet und die Größe und Position bestimmt. Mit dieser Läsionsuntersuchung wurde sichergestellt, daß alle Läsionstiere eine Läsion hatten und diese auch alle Kortexschichten betraf. Letzteres ist insbesondere deshalb von Wichtigkeit, da die GABAerge Hemmung nur reduziert ist, wenn alle Kortexschichten von der Läsion betroffen sind (BUCHKREMER-RATZMANN & WITTE 1997). Die Positionsbestimmung stellte sicher, daß die Läsion sich über die unter 2.7 aufgelisteten Areale erstreckte. Nur Tiere, die beide Voraussetzungen erfüllten, wurden in den Ergebnissen berücksichtigt.

Bei der Auswahl der Verhaltenstests wurde der Schwerpunkt auf sensorische Tests gelegt. Alle Läsionen betrafen zumindest partiell kortikale Areale, denen eine Funktion im Zusammenhang mit der Sensorik bzw. der Motorik zugeschrieben wird (ZILLES, 1985, 1990). Bei der Läsion mit der stereotaktischen Position 0,3 mm anterior zu Bregma und 3,7 mm lateral zur Sagittalnaht wurde vor allem das Vorderpfotenareal FL und teilweise das Hinterpfotenareal HL geschädigt. Dem Areal FL wird die somatosensorische und motorische Kontrolle der Vorderextremität (somatomotorisches Amalgam) zugeschrieben. Gleiches gilt für das Areal HL der Hinterextremität. Die zweite Läsion mit der stereotaktischen Position in der Mitte zwischen Bregma und Lambda und 4,0 mm lateral zur Sagittalnaht betraf Teile des parietalen Kortex Par1 und zusätzlich den sekundären visuellen Kortex Oc2. Dem parietalen Kortex wird ebenfalls eine somatosensorische Funktion zugeschrieben, diese bezieht sich aber eher auf die sensible Wahrnehmung des gesamten Körpers. Der occipitale Kortex übernimmt die sekundäre Verarbeitung der visuellen Wahrnehmung. Diese beiden Läsionspositionen wurden mit allen vier Verhaltenstests untersucht. Zur Ergänzung der Untersuchungen des Aufrichtverhaltens im Glaszylinder wurde noch eine dritte Läsionsposition untersucht. Diese Läsion mit der stereotaktischen Position 2,5 mm anterior zu Bregma und 2,0 mm lateral zur Sagittalnaht lag im Bereich der motorischen Kontrolle. Den betroffenen Arealen Fr1 und Fr2 werden entsprechende motorische Funktionen zugeschrieben.

Gerade bei der posterioren Läsionsposition (Oc2/Par1) wird deutlich, daß die ausgewählten Tests nicht alle möglichen Funktionsbeeinträchtigungen berücksichtigen. So könnte ein visuelles Defizit auftreten, würde aber mit den ausgewählten Verhaltenstests nicht erkannt werden. Auch Verhaltensaspekte wie z. B. Lernfähigkeit oder Angst wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, da die Fragestellung auf die Sensomotorik gerichtet war.

Wie zu erwarten, zeigten die Tiere mit einer Läsion im Vorderpfotenareal bei drei der vier Tests akute Defizite in der Nutzung der „behinderten“ Pfote. Zum Teil blieben diese Defizite in der Nutzung der „behinderten“ Pfote bis zum Ende der Untersuchungen nachweisbar. Bei der Läsion Oc2/Par1 können keine Defizite in der Nutzung der „behinderten“ Pfote nachgewiesen werden. Es ergaben sich daher auch keine Hinweise auf erwartete Diaschisiseffekte. Die ergänzende Untersuchung von Tieren mit einer Läsion im motorischen Kortex (Fr1/Fr2) beim Aufrichten im Glaszylinder konnte nur ein akutes Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote nachweisen. Alle wichtigen Ergebnisse sind in Tabelle 3.3.1 zusammengefaßt. Im folgenden sollen nun die einzelnen Tests und ihre Ergebnisse diskutiert werden.

Beim ersten Verhaltenstest handelte es sich um den bilateralen Stimulationstest. Dieser Test führte bei den FL-Läsionen zu einem akuten Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote. Dieses Defizit zeigte sich in einer signifikanten Erhöhung des Asymmetriemaßes, welches eine Präferenz für die gesunde Pfote nachweist. Das Asymmetriemaß wurde in den folgenden Wochen zwar kleiner, blieb aber bis zu vier Wochen im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. Die Oc2/Par1-Läsion führte zu keinem nachweisbaren Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote in der Asymmetrie. Das entspricht den Ergebnisse von BARTH et al. (1990) bei elektrolytischer Läsion im Vorderpfotenareal. Auch hier ist direkt nach Läsionsinduktion das Asymmetriemaß erhöht und die gesunde Vorderpfote wird bevorzugt. Bis zu 28 Tage nach Läsionsinduktion ist das Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote nachgewiesen worden. Das Maß der Asymmetrie war dabei den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie sehr ähnlich. Auch bei SCHALLERT et al. (2000) zeigten Tiere mit einer elektrolytischen Läsion im Vorderpfotenareal ein akutes Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote und

eine leichte Erholung, wobei das Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote aber chronisch nachweisbar blieb. Nur das Maß der Asymmetrie war etwas kleiner als in der vorliegenden Studie. Bei SCHALLERT et al. (2000) wurden auch die Folgen einer permanenten MCAO nach Elektrokoagulation untersucht. Dieser Infarkt betrifft ebenfalls die posteriore Region in der auch die Oc2/Par1-Läsion liegt. Diese Tiere zeigten sowohl akut als auch chronisch eine starke Präferenz für die gesunde Pfote. Die MCAO betraf aber ein sehr viel größeres Kortexareal und ist daher von den Auswirkungen schlecht vergleichbar zur hier untersuchten kleinen fokalen Läsion in Oc2/Par1.

Der zweite Verhaltenstest untersucht das Laufen über ein Gitter. Die Auswertung von Fehlritten beim Laufen über ein Gitter ergab ein akutes Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote nach Läsionsinduktion im Areal FL. Dieses Defizit ließ sich an den folgenden Tagen nicht mehr nachweisen. Die Fehlritte waren an Tag 1 sowohl für die „behinderte“ Vorderpfote als auch für die „behinderte“ Hinterpfote signifikant erhöht. Die Tiere mit Oc2/Par1-Läsion zeigten keine Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote. BARTH et al. (1990) untersuchte Tiere mit einer elektrolytischen Läsion im FL-Areal und konnte ein Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Vorderpfote bis 7 Tage nach der Läsionsinduktion nachweisen. Erst danach war die Fehlerrate wieder auf dem Niveau der Kontrollen. In der Studie wurde die Hinterpfote nicht ausgewertet. Die Beeinträchtigung der Hinterpfote in der vorliegenden Studie läßt sich durch die Läsionsposition erklären, da die sensomotorischen Areale der Vorder- und Hinterpfote nebeneinander liegen. Sowohl bei der Läsion im Areal FL als auch in den Arealen Oc2 und Par1 wird das Areal HL mitbetroffen. Dies erklärt das Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Hinterpfote beim Laufen auf dem Gitter nach der FL-Läsion. Allerdings wäre dann auch bei der Oc2/Par1-Läsion ein Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Hinterpfote zu erwarten gewesen. Dies trifft nicht zu. Eine Erklärung läßt sich aus der Untersuchung der rezeptiven Felder in der Hinterpfotenrepräsentation (HL) herleiten. Bei der Untersuchung der rezeptiven Felder wird die Topographie des Areals HL erkennbar. Danach liegen in dem Bereich, der von der FL-Läsion betroffen wird, die Zehen und vorderen Fußballen. Die Oc2/Par1-Läsion betrifft den posterioren Bereich in dem die Ferse repräsentiert ist. Die Übertragung dieser Erkenntnisse auf das Laufen über ein

Gitter erklärt den Unterschied zwischen den beiden untersuchten Läsionen. Beim Laufen über ein Gitter tritt die Ratte mit der Fußspitze auf und benutzt die Zehen, um sich an dem Draht festzuhalten. Die Ferse wird dabei kaum aufgesetzt. Die FL-Läsion beeinträchtigt den Zehenbereich der Hinterpfote und erzeugt eine erhöhte Fehlerrate der Hinterpfote beim Laufen auf dem Gitter. Die Oc2/Par1-Läsion schädigt den Fersenbereich der Hinterpfote. Dies hat aber keinen Effekt auf den Bewegungsablauf und zeigt so auch kein nachweisbares Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Hinterpfote. Schwierig ist die Erklärung der schnellen Erholung beim Laufen auf dem Gitter für die FL-Läsionstiere. Die Anzahl der Fehlritte ermöglicht allerdings nicht, Veränderungen im Bewegungsmuster zu analysieren. Daher kann zwischen einer veränderten Strategie in Form eines angepassten Bewegungsmusters und einer funktionellen Erholung nicht unterschieden werden. Ein zu berücksichtigender Unterschied zu BARTH et al. (1990) ist, daß die dort verwendeten Gittermaschen größer waren und damit auch der Schwierigkeitsgrad für die Ratte erhöht war. Je größer die Maschenweite, desto länger kann ein Defizit nachgewiesen werden (BARTH persönliche Mitteilung).

Beim dritten Verhaltenstest handelte es sich um einen Streckenschwimmtest bei dem die Ruhighaltung der Vorderpfote unter dem Kinn untersucht wurde. Ein erwartetes Defizit konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Erwartung eines Defizits beruht auf den Ergebnissen von STOLTZ et al. (1999). Dort zeigten Tiere mit einer elektrolytisch induzierten Läsion eine starke Beeinträchtigung in der Pfotenruhighaltung. Die von der Läsion betroffene Pfote führte sehr viele Bewegungen aus. Dieses Verhalten blieb bis zum Ende der Experimente nach acht Wochen nachweisbar. Diese Arbeit gibt einen ersten Hinweis auf mögliche Unterschiede zwischen den Läsionen, welche die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnten. Viel Tests, bei denen die Tiere schwimmen mußten, untersuchten Läsionen die subkortikale Schäden beinhalteten (ROBINSON et al. 1974). Auch bei der elektrolytischen Läsion muß von subkortikalen Schäden ausgegangen werden. Die Bedeutung dieser subkortikalen Schädigungen wird unten detailliert diskutiert.

Als vierter Verhaltenstest zur Nutzung der Vorderpfoten wurden die Bewegungen beim Aufrichten in einem Glaszylinder analysiert. Wurde zwischen der gesunden und der „behinderten“ Pfote unterschieden, so zeigte sich ein deutliches Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote, wenn die Läsion das Areal FL betraf. Dieses Defizit lies sich bis zum Tag 21 nachweisen. Auch bei einer Läsion im Areal Fr1/Fr2 zeigte sich ein akutes Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote, von dem sich die Tiere bereits nach einer Woche erholt hatten. Bei den Tieren mit einer Oc2/Par1-Läsion betraf die Läsion nicht die zuvor bevorzugte Vorderpfote. Diese Präferenz zeigte sich in einem signifikanten Unterschied zu den Kontrollen an Tag 0 vor der Läsionsinduktion. Darauf kann die geringere Nutzung der „behinderten“ Pfote an Tag 21 zurückgeführt werden. Eine Erklärung durch später wirksame Diaschisiseffekte scheint eher unwahrscheinlich zu sein. Diese Analysetechnik mit der Unterscheidung zwischen gesunder versus „behinderter“ Pfote wurde von KOZLOWSKI (1996) auf Tiere mit einer elektrolytischen Läsion im Vorderpfotenareal angewendet. Die Tiere zeigten akut ein starkes Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote. Nach einer Woche begann eine Erholung, aber das Defizit blieb bis zu einem Monat nachweisbar, bevor es das Niveau der Kontrollen erreichte. Der Verlauf dieser Erholungskurve scheint unseren Ergebnissen zu entsprechen, allerdings sind die hier vorgestellten Daten den absoluten Werten nach kleiner. Auch in der Arbeit von FORGIE et al. (1996) führte eine Saugläsion zu einem größerern Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote als nach der photothrombotischen Läsion. Eine Erholung begann nach einer Woche. Da FORGIES Untersuchung nach 17 Tagen endete, sind keine Aussagen über eine langfristige vollständige Erholung möglich.

Das Aufrichten im Glaszylinder kann nach verschiedenen Verhaltenselementen entlang der Wand (Abstoßen vom Boden, erste Berührung der Wand, horizontale und vertikale Bewegungen) aufgeschlüsselt werden und von der Landung getrennt betrachtet werden. Ein erster Vergleich der Bewegungen entlang der Wand versus der Landung zeigte, daß das Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote auf den Bewegungen entlang der Wand beruhte und sich nicht bei der Landung nachweisen lies. Wurden die Bewegungen entlang der Wand in einzelne Verhaltenselemente unterteilt, wie sie im Ethogramm definiert sind (siehe Anhang), so konnte das Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote noch genauer beschrieben werden. Dabei lies sich das Defizit

in der Nutzung der „behinderten“ Pfote nicht mit dem Verhaltenselement „Abstoßen vom Boden“ nachweisen. Die Verhaltenselemente „erstes Berühren der Wand“ und „vertikale Bewegung“ weisen das Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote nur an Tag 1 nach. Am Besten eignete sich das Verhaltenselement „horizontale Bewegung“. Hier zeigte sich das Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote am deutlichsten und blieb trotz einer leichten Erholung über den gesamten Untersuchungszeitraum nachweisbar. Dies galt nur für die Läsion im Areal FL. Das Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote der Fr-Läsionsgruppe von Tag 1 war in der Aufschlüsselung in keinem der untersuchten Verhaltenselemente nachweisbar. Daraus ergeben sich zwei Konsequenzen für die praktische Fortsetzung dieser Verhaltenstests. Das deutlichste Ergebnis mit einem klaren Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote zeigt sich bei einer Kombination der Verhaltenselemente „erstes Berühren der Wand“, „horizontale“ und „vertikale Bewegung“. Das Zusammenfassen der Verhaltenselemente sorgt auch für eine solide Rohdatenbasis. Diese kann bei der Analyse von einzelnen Verhaltenselementen nur durch eine entsprechend hohe Anzahl von ausgewertetem Aufrichtverhalten erreicht werden. Dadurch sollten sich auch Ausreißer in den Kontrollen besser ausgleichen und vermeiden lassen. Als mögliche Modifikation dieses Test kann das Aufrichten im Glaszylinder nach den drei Verhaltenselementen „erstes Berühren der Wand“, „horizontale“ und „vertikale Bewegung“ analysiert werden, unter der Voraussetzung einer dementsprechend hohe Anzahl von Aufrichtverhalten. Die Auswertung kleiner Gruppen mit weniger Aufrichten sollten auf allen Verhaltenselementen beruhen und nur zwischen gesunder Pfote versus „behinderte“ Pfote unterscheiden.

Eine alternative Auswertung des Aufrichtens im Glaszylinder ist bei SCHALLERT et al. (2000) beschrieben. Dabei wurde ausgewertet, wie häufig die gesunde und die „behinderte“ Vorderpfote allein an die Wand gesetzt wird, bzw. wie häufig sich beide gleichzeitig an der Wand befinden. Die gleiche Unterscheidung wurde auch bei der Landung getroffen (siehe Ethogramm im Anhang). Mit dieser Analysetechnik konnte in der vorliegenden Studie nur ein sehr geringes akutes Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote für Bewegungen entlang der Wand beschrieben werden. Die beiden Läsionsgruppen FL und Oc2/Par1 nutzten die „behinderte“ Pfote an Tag 1 weniger. Nur bei der FL-Läsion konnte eine gleichzeitige Präferenz für das alleinige Benutzen der

gesunden Pfote nachgewiesen werden. Bei der Oc2/Par1-Läsion zeigte sich eine solche Verschiebung in der Pfotenpräferenz von der „behinderten“ Pfote zugunsten der gesunden Pfote nicht. Das oben beschriebene Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote für Fr-Läsionen, wenn nur zwischen „behinderter“ und gesunder Pfote unterschieden wird, zeigte sich mit dieser Art der Auswertung nicht mehr. Nach elektrolytischer Läsion (SCHALLERT et al. 2000) im Areal FL konnte nach der Läsioninduktion eine akut verringerte Nutzung der „behinderten“ Pfote nachgewiesen werden. Dabei ging die Verschiebung allein zu Gunsten der Nutzung der gesunden Pfote, da auch die gleichzeitige Nutzung beider Pfoten zurückging. Eine Erholung in der Nutzung der „behinderten“ Pfote zeigte sich nach zwei Wochen. Das Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote erreichte bis zum Ende der Untersuchung nicht wieder das Ausgangsniveau. Auch bei der Landung konnte ein Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote und eine Verschiebung zu Gunsten der gesunden Pfote gezeigt werden, daß sich keine Erholung zeigte und bis zum Untersuchungsende erhalten blieb.

Gesunde Ratten haben, im Gegensatz zum Menschen, keine Händigkeit und benutzen beide Vorderpfoten ungefähr gleich häufig. Bei den hier untersuchten Kontrolltieren gab es aber einige Tage, an denen diese Tiere eine Präferenz für eine ihrer Pfoten zeigten. Nach den Vortests an Tag 0 wurde die bevorzugte Hand als „behinderte“ Hand definiert, da sie im Falle einer Läsionsinduktion, die zur Läsion kontralaterale Pfote wäre. An einigen Tagen wurden signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Läsionstieren nachgewiesen, die sich durch extremes Verhalten der Kontrollen erklären lassen. Beim Laufen über das Gitter war dies für die Hinterpfote der Fall. Die niedrigen Fehlerraten der Hinterpfote an den Tagen 5 und 14 sind auf relativ viele Fehlritte mit der als gesund definierten Hinterpfote bei den Kontrollen zurückzuführen. Auch beim Streckenschwimmen zeigten die Kontrollen an zwei Tagen einige Kraulbewegungen der als gesund definierten Pfote. Dies führte zu einem tagesbedingten niedrigen Wert, der im Vergleich zu den FL-Läsionstieren (Tag 21) und den Oc2/Par1-Läsionstieren (Tag 14) signifikant kleiner war. Auch bei der Landung nach dem Aufrichten im Glaszylinder zeigten die Kontrollen an Tag 7 eine tagesabhängige Präferenz für die als „behindert“ definierte Pfote. Diese tagesabhängigen Unterschiede kamen an verschiedenen Tagen und bei unterschiedlichen Tests vor. Die resultierenden Werte der Kontrollen konnten

sowohl zu einem starken Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote als auch zu einer erhöhten Präferenz in der Nutzung der „behinderten“ Pfote führen. Es ist nicht klar und nur schwer zu kontrollieren, welche äußeren oder inneren Faktoren diesen tagesabhängigen Variationen bei den Kontrollen zugrunde liegen.

Vergleiche der photothrombotischen Läsion im Vorderpfotenareal FL mit elektrolytischen Läsionen und Saugläsionen, die das Areal FL betreffen, zeigen klare Übereinstimmungen, sowohl in der Größe als auch in der Position der Läsionen (BARTH et al. 1990, FORGIE et al. 1996, KOZLOWSKI et al. 1996, SCHALLERT et al. 1997, STOLTZ et al. 1999). Ein wichtiger Unterschied zwischen den Läsionsmodellen ist die Invasivität des gewählten Modells. Sowohl bei der elektrolytischen Läsion als auch bei der Saugläsion muß die Schädelkalotte geöffnet werden, während dies bei der photothrombotischen Läsion nicht notwendig ist. Ein zweiter Unterschied betrifft das Ausmaß der Schädigung durch die Läsion. Bei der photothrombotischen Läsion überwiegt die kortikale Schädigung. Nur bei sehr großen photothrombotischen Läsionen wird die weiße Substanz unterhalb der kortikalen Läsion oberflächlich geschädigt. Dies war bei einem Tier mit der Läsion in den Arealen Oc2/Par1 in der Histologie zu erkennen. Dabei ist nicht klar, ob diese Schädigung der weißen Substanz bei der Läsionsinduktion geschieht oder ob die Schädigung sich durch langfristige Veränderungen im Bereich der Läsion entwickelt. Nachgewiesen sind Schäden in den Faserverbindungen der weißen Substanz, die durch Deafferentierung ausgelöst werden (BUCHKREMER-RATZMANN 1997). Während der Narbenbildung im Läsionsgebiet kann es zu Veränderungen und Verschiebungen im Gewebe kommen. Diese sind in Abbildung 3.3.1 dargestellt und betreffen auch teilweise die weiße Substanz. Auch bei elektrolytischen Läsionen und bei Saugläsionen wird eine oberflächliche Beschädigung bis durchgehende Schädigung der weißen Substanz beobachtet. In seltenen Fällen ist der Hippokampus auch geschädigt. Es ist möglich, daß die Defizite in der Nutzung der „behinderten“ Pfote überwiegend auf elektrolytische Läsionsschäden im subkortikalen Motorsystem zurückzuführen sind. Deren Ausmaß ist entscheidender als die Schäden im somatosensorischen Vorderpfotenareal im Kortex (SCHALLERT et al. 2000). Außerdem wird für die elektrolytische Läsion ein vorgeschädigtes Gewebe beschrieben (KOZLOWSKI et al. 1996). Dieses kann durch forcierte Nutzung der betroffenen Pfote weiter

geschädigt werden und verursacht dann eine nutzungsabhängige Läsionsvergrößerung. Dieses vorgeschädigte Gewebe ist mit der Penumbra bei einem ischämischen Insult vergleichbar. Die Penumbra wird bei der photothrombotischen Läsion nur als vernachlässigbar kleiner Bereich um den Läsionskern beschrieben (LEE et al. 1996).

Ein Literaturvergleich spricht für eine graduelle Schädigung durch die verschiedenen Läsionsmodelle (FORGIE et al. 1996, KOZLOWSKI et al. 1996, SCHALLERT et al. 2000, VOORHIES & JONAS 2000). Dabei bewirkt die Saugläsion die weitestgehenden Schädigungen, wäre die photothrombotische Läsion die geringsten Folgen hat. Zumindest der direkte Vergleich von Saugläsion und elektrolytischer Läsion bestätigte diesen Gradienten für diese beiden Läsionsmodelle (FORGIE et al. 1996, VOORHIES & JONAS 2000). Letztere Studie führt den Unterschied auf das in dem Läsionsbereich verbleibende Gewebe zurück. In der Studie wurde gezeigt, daß eine elektrolytische Läsion, bei der anschließend das geschädigte Gewebe abgesaugt wurde, zu einem ähnlichen Defizit in der Nutzung der „behinderten“ Pfote wie eine Saugläsion führt und dieses Defizit deutlich stärker ist als bei der reinen elektrolytischen Läsion. Die Theorie über die Wirkung des verbleibenden Gewebes würde auch zu den Ergebnissen der photothrombotischen Läsion passen, da hier das gesamte Narbengewebe erhalten bleibt. Verhaltensuntersuchungen der Pfotennutzung nach kleinen fokalen Läsionen, die den occipitalen und parietalen Kortex betreffen, sind noch nicht beschrieben worden.

Als Resümee aus diesen Verhaltenstests lassen sich drei grundlegende Aussagen treffen. Erstens, je größer die Läsion ist, desto größer ist das Defizit und umso langsamer ist die Erholung. Dementsprechend zeigen verschiedene Läsionsmodelle verschieden starke Defizite. Zweitens muß ein Verhaltenstest, der bei einem Läsionsmodell gute Resultate erzielt, an einem anderen Läsionsmodell überprüft werden, bevor es auf dieses Läsionsmodell übertragen wird. In der vorliegenden Studie konnten drei von vier etablierten Verhaltenstests als aussagekräftig überprüft und für weiterführende Experimente übernommen werden. Drittens, weist die Studie auf Möglichkeiten zur Modifikationen der Verhaltenstests hin, wie eine Erhöhung des Schwierigkeitsgrades oder gezielte Untersuchung der Feinmotorik einer Bewegungen. So kann z. B. das Laufen über

ein Gitter durch eine größere Maschenweiten erschwert werden. Für eine Untersuchung von Störungen der Sensibilität und Feinmotorik würde sich die Analyse feiner Bewegungen, wie z.B. das Greifen kleiner Objekte (BALLERMANN et al. 2000, WHISHAW 2000), anbieten.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Auswirkungen von ischämischen Läsionen auf entfernte Kortexareale. Desweiteren wurde das Verhalten in der Pfotennutzung bei Ratten nach ischämischen Läsionen untersucht. Es wurden drei Experimentalserien mit unterschiedlichen Methoden (Doppelpuls-Paradigma, taktile Bestimmung rezeptiver Felder und Verhaltenstests) durchgeführt. Die elektrophysiologische Diaschisis wurde am Hirnschnittpräparat *in vitro* und an narkotisierten Ratte *in vivo* untersucht. Die funktionellen Folgen einer ischämischen Läsion wurden in vier Verhaltenstests zur Sensomotorik der Pfoten geprüft.

Elektrophysiologische Ferneffekte des photothrombotischen Läsionsmodells ließen sich in ein MCAO-Modell (Verschluß der mittleren Cerebralarterie) bestätigen. Im MCAO-Modell wurde ebenfalls eine reduzierte intrakortikale Hemmung nachgewiesen. Die Ferneffekte der Photothrombose waren also nicht läsionsspezifisch.

Auch *in vivo* zeigten sich nach taktiler Stimulation diese Ferneffekte in einer veränderten Hemmung. Dabei weist eine Vergrößerung der rezeptiven Felder der Fußsohle der Hinterpfote auf eine reduzierte laterale Hemmung hin. Die Veränderungen der lokalen Feldpotentiale zeigen sich durch eine verkleinerte Amplitude und eine vergrößerte Latenz der Reizantwort. Diese Veränderung der Feldpotentiale weist auf eine erhöhte Feedback-Hemmung und Änderungen der Reizleitung in der Reizleitungskaskade hin.

In vier Verhaltenstests (Bilateraler Stimulationstest, Fehlritte auf dem Gitter, Aufrichten im Glaszylinder und Streckenschwimmen) wurde die Sensomotorik der Pfoten untersucht. Die Übertragbarkeit dieser Tests von einem elektrolytischen Läsionsmodell auf das photothrombotische Läsionsmodell wurde geprüft. Nach Läsion der Vorderpfotenrepräsentation wiesen drei von vier Tests ein Nutzungsdefizit der von der Läsion betroffenen Pfote nach. Tiere mit einer posterior gelegenen Läsion zeigten kein Nutzungsdefizit in der Pfote. Hier konnte kein Ferneffekt der Läsion auf die Sensomotorik der Pfote nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben erstens gezeigt, daß nach einem ischämischen Insult die Hemmung systematisch verändert ist. Zweitens läßt sich eine funktionelle Beeinträchtigung der Pfoten durch gezielte lokale Läsion nachweisen.

6. Literatur

- Atwood, H.L. und MacKay, W.A. (1994) Neurophysiologie. Stuttgart, New York: Schattauer.
- Ballermann, M., Tompkins, G. und Whishaw, I.Q. (2000) Skilled forelimb reaching for pasta guided by tactile input in the rat as measured by accuracy, spatial adjustments, and force. *Behav Brain Res* 109: 49-57.
- Barth, T.M., Jones, T.A. und Schallert, T. (1990) Functional subdivisions of the rat somatic sensorimotor cortex. *Behav Brain Res* 39: 73-95.
- Becker, K.J. (1998) Inflammation and acute stroke. *Curr Opin Neurol* 11: 45-49.
- Bidmon, H.J., Oermann, E., Schleicher, A., Kato, K., Kinscherf, R., Buchkremer-Ratzmann, I., Witte, O.W. und Zilles, K. (1997) Copper-zinc superoxide dismutase and isolectin B4 binding are markers for associative and transhemispheric diaschisis induced by focal ischemia in rat cortex. *Neurosci Lett* 228: 163-166.
- Bruehl, C., Wadman, W.J. und Witte, O.W. (2000) Concentration dependence of bicarbonate-induced calcium current modulation. *J Neurophysiol* 84: 2277-2283.
- Buchkremer-Ratzmann, I. (1997) Entstehungsmechanismen der elektrophysiologischen Diaschisis nach experimentell induzierten fokalen kortikalen Ischämien. Dissertationsschrift. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Buchkremer-Ratzmann, I., August, M., Hagemann, G. und Witte, O.W. (1996) Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain. *Stroke* 27: 1105-1109.
- Buchkremer-Ratzmann, I. und Witte, O.W. (1997) Pharmacological reduction of electrophysiological diaschisis after photothrombotic ischemia in rat neocortex. *Eur J Pharmacol* 320: 103-109.

- Coq, J.O. und Xerri, C. (1998) Environmental enrichment alters organizational features of the forepaw representation in the primary somatosensory cortex of adult rats. *Exp Brain Res* 121: 191-204.
- Crumrine, R.C., Thomas, A.L. und Morgan, P.F. (1994) Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 887-891.
- Dietrich, W.D., Watson, B.D., Busto, R., Ginsberg, M.D. und Bethea, J.R. (1987) Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations. *Acta Neuropathol (Berl)* 72: 315-325.
- Dobkin, J.A., Levine, R.L., Lagreze, H.L., Dulli, D.A., Nickles, R.J. und Rowe, B.R. (1989) Evidence for transhemispheric diaschisis in unilateral stroke. *Arch Neurol* 46: 1333-1336.
- Domann, R., Hagemann, G., Kraemer, M., Freund, H.J. und Witte, O.W. (1993) Electrophysiological changes in the surrounding brain tissue of photochemically induced cortical infarcts in the rat. *Neurosci Lett* 155: 69-72.
- Forgie, M.L., Gibb, R. und Kolb, B. (1996) Unilateral lesions of the forelimb area of rat motor cortex: lack of evidence for use-dependent neural growth in the undamaged hemisphere. *Brain Res* 710: 249-259.
- Garcia, J.H., Gutierrez, J.A. und Liu, K.F. (1997) Non-neuronal responses to short-term occlusion of the middle cerebral artery. *Neurology* 49: 27-31.
- Gardner, E.P. und Palmer, C.I. (1989a) Simulation of motion on the skin. I. Receptive fields and temporal frequency coding by cutaneous mechanoreceptors of OPTACON pulses delivered to the hand. *J Neurophysiol* 62: 1410-1436.
- Gardner, E.P. und Palmer, C.I. (1989b) Simulation of motion on the skin. II. Cutaneous mechanoreceptor coding of the width and texture of bar patterns displaced across the OPTACON. *J Neurophysiol* 62: 1437-1460.

- Haas, H.L., Schaerer, B. und Vosmansky, M. (1979) A simple perfusion chamber for the study of nervous tissue slices in vitro. *J Neurosci Methods* 1: 323-325.
- Heinemann, U. und Lux, H.D. (1977) Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. *Brain Res* 120: 231-249.
- Johnson, K.O. (1974) Reconstruction of population response to a vibratory stimulus in quickly adapting mechanoreceptive afferent fiber population innervating glabrous skin of the monkey. *J Neurophysiol* 37: 48-72.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. und Jessell, T.M. (1996) *Neurophysiologie, Eine Einführung*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Kotila, M. und Waltimo, O. (1992) Epilepsy after stroke. *Epilepsia* 33: 495-498.
- Kozlowski, D.A., James, D.C. und Schallert, T. (1996) Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions. *J Neurosci* 16: 4776-4786.
- Krupa, D.J., Ghazanfar, A.A. und Nicolelis, M.A. (1999) Immediate thalamic sensory plasticity depends on corticothalamic feedback. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8200-8205.
- Lagreze, H.L., Levine, R.L., Pedula, K.L., Nickles, R.J., Sunderland, J.S. und Rowe, B.R. (1987) Contralateral flow reduction in unilateral stroke: evidence for transhemispheric diaschisis. *Stroke* 18: 882-886.
- Leao, A.A. (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7: 359-390.
- Lee, V.M., Burdett, N.G., Carpenter, A., Hall, L.D., Pambakian, P.S., Patel, S., Wood, N.I. und James, M.F. (1996) Evolution of photochemically induced focal cerebral ischemia in the rat. Magnetic resonance imaging and histology. *Stroke* 27: 2110-2118.

- Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S. und Cummins, R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91.
- Lutzenburg, M. (1999) Aktivierung endogener Schutzmechanismen des Hirngewebes nach fokaler Ischämie und Epilepsie. Dissertationsschrift. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Merzenich, M.M., Kaas, J.H., Sur, M. und Lin, C.S. (1978) Double representation of the body surface within cytoarchitectonic areas 3b and 1 in "SI" in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *J Comp Neurol* 181: 41-73.
- Merzenich, M.M., Nelson, R.J., Stryker, M.P., Cynader, M.S., Schoppmann, A. und Zook, J.M. (1984) Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. *J Comp Neurol* 224: 591-605.
- Mies, G. (1993) Inhibition of protein synthesis during repetitive cortical spreading depression. *J Neurochem* 60: 360-363.
- Neafsey, E.J., Bold, E.L., Haas, G., Hurley-Gius, K.M., Quirk, G., Sievert, C.F. und Terreberry, R.R. (1986) The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res* 396: 77-96.
- Nedergaard, M. (1988) Mechanisms of brain damage in focal cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand* 77: 81-101.
- Neumann-Haefelin, T. und Witte, O.W. (2000) Periinfarct and remote excitability changes after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 45-52.
- Nudo, R.J., Friel, K.M. und Delia, S.W. (2000) Role of sensory deficits in motor impairments after injury to primary motor cortex. *Neuropharmacology* 39: 733-742.
- Nudo, R.J., Milliken, G.W., Jenkins, W.M. und Merzenich, M.M. (1996a) Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J Neurosci* 16: 785-807.

- Nudo, R.J., Plautz, E.J. und Milliken, G.W. (1997) Adaptive Plasticity in Primate Motor Cortex as a Consequence of Behavioral Experience and Neuronal Injury. *Seminars in Neuroscience* 9:13-23.
- Nudo, R.J., Wise, B.M., SiFuentes, F. und Milliken, G.W. (1996b) Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science* 272: 1791-1794.
- Parker, J.L. und Dostrovsky, J.O. (1999) Cortical involvement in the induction, but not expression, of thalamic plasticity. *J Neurosci* 19: 8623-8629.
- Paxinos, G. und Watson, C. (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Third edition. London: Academic Press.
- Pfefferkorn, T. und Haberl, R.L. (1996) Neues in der Therapie des akuten Schlaganfalls. *psycho* 22: 517.
- Robinson, T.E., Whishaw, I.Q. und Wishart, T.B. (1974) The effects of posterior hypothalamic lesions on swimming movements in different water temperatures by the rat. *Can J Psychol* 28: 102-113.
- Schallert, T., Fleming, S.M., Leasure, J.L., Tillerson, J.L. und Bland, S.T. (2000) CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39: 777-787.
- Schallert, T., Kozłowski, D.A., Humm, J.L. und Cocke, R.R. (1997) Use-dependent structural events in recovery of function. *Adv Neurol* 73:229-238.
- Schallert, T. und Whishaw, I.Q. (1984) Bilateral cutaneous stimulation of the somatosensory system in hemidecorticate rats. *Behav Neurosci* 98: 518-540.
- Schapiro, S., Salas, M. und Vukovich, K. (1970) Hormonal effects on ontogeny of swimming ability in the rat: assessment of central nervous system development. *Science* 168: 147-150.

- So, E.L., Annegers, J.F., Hauser, W.A., O'Brien, P.C. und Whisnant JP (1996) Population-based study of seizure disorders after cerebral infarction. *Neurology* 46: 350-355.
- Stoltz, S., Humm, J.L. und Schallert, T. (1999) Cortical injury impairs contralateral forelimb immobility during swimming: a simple test for loss of inhibitory motor control. *Behav Brain Res* 106: 127-132.
- Tuff, L.P., Racine, R.J. und Adamec, R. (1983) The effects of kindling on GABA-mediated inhibition in the dentate gyrus of the rat. I. Paired-pulse depression. *Brain Res* 277: 79-90.
- von Monakow, C. (1895) Experimentelle und pathologisch-anatomische Untersuchungen über die Haubenregion, Sehhügel und die Regio subthalamica, nebst Beiträgen zur Kenntnis früh erworbener Groß- und Kleinhirndefekten. *Arch Psychrie Nervenkrankheiten* 27: 1-128.
- von Monakow, C. (1994) Die Lokalisation im Großhirn und der Abbau der Funktion durch Kortikale Herde. Hrsg. Bergmann, J.F., Wiesbaden: 26-34
- Voorhies, A. C. und Jones, T. A. (2000) Behavioral and struktural effects of aspiration of tissue damaged by cortical injury. *Soc Neurosci Abstr* 26, 2294. 861.2.
- Watson, B.D., Dietrich, W.D., Busto, R., Wachtel, M.S. und Ginsberg, M.D. (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17: 497-504.
- Whishaw, I.Q. (2000) Loss of the innate cortical engram for action patterns used in skilled reaching and the development of behavioral compensation following motor cortex lesions in the rat. *Neuropharmacology* 39: 788-805.
- Zilles, K. (1985) *The Cortex of the Rat - A Stereotaxic Atlas*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Zilles, K. (1990) Anatomy of the Neocortex: Cytoarchitecture and Myeloarchitecture. In: *The Cerebral Cortex of the Rat*. Hrsg. Kolb, B., Tees, R.C., Cambridge (Massachusetts), London (England): The MIT Press.

Anhang:

Tabelle: Amplituden der lokalen Feldpotentiale. 1 bis 10 Reizantwort für 25, 50 und 100 ms Interstimulusintervall. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (Mann-Whitney-Test).

ms		Mittelwerte		Stabw		Mittelwert		Stabw		Statistik	
		Kontrolle	Kontrolle	Ipsilateral	Ipsi-lateral	Kontra-lateral	Kontra-lateral	Kontrolle vs Ipsi	Kontrolle vs Kontra		
25	1. Ampl.	-0,58	0,19	-0,50	0,18	-0,48	0,20	< 0,001	< 0,001		
25	2. Ampl.	-0,16	0,11	-0,10	0,09	-0,13	0,11	< 0,001	< 0,005		
25	3. Ampl.	-0,25	0,11	-0,19	0,11	-0,17	0,14	< 0,001	< 0,001		
25	4. Ampl.	-0,21	0,11	-0,20	0,12	-0,16	0,12	< 0,05	< 0,001		
25	5. Ampl.	-0,22	0,12	-0,15	0,13	-0,16	0,14	< 0,001	< 0,001		
25	6. Ampl.	-0,21	0,13	-0,17	0,13	-0,15	0,13	< 0,001	< 0,001		
25	7. Ampl.	-0,22	0,13	-0,15	0,13	-0,16	0,13	< 0,001	< 0,001		
25	8. Ampl.	-0,21	0,13	-0,15	0,12	-0,16	0,14	< 0,001	< 0,001		
25	9. Ampl.	-0,22	0,13	-0,15	0,12	-0,16	0,13	< 0,001	< 0,001		
25	10. Ampl.	-0,22	0,13	-0,15	0,11	-0,16	0,13	< 0,001	< 0,001		
50	1. Ampl.	-0,56	0,19	-0,50	0,22	-0,46	0,20	< 0,001	< 0,001		
50	2. Ampl.	-0,36	0,15	-0,29	0,15	-0,25	0,18	< 0,001	< 0,001		
50	3. Ampl.	-0,36	0,15	-0,27	0,18	-0,26	0,19	< 0,001	< 0,001		
50	4. Ampl.	-0,34	0,16	-0,23	0,17	-0,25	0,20	< 0,001	< 0,001		
50	5. Ampl.	-0,34	0,17	-0,23	0,18	-0,24	0,19	< 0,001	< 0,001		
50	6. Ampl.	-0,35	0,18	-0,23	0,18	-0,25	0,21	< 0,001	< 0,001		
50	7. Ampl.	-0,35	0,19	-0,23	0,19	-0,26	0,22	< 0,001	< 0,001		
50	8. Ampl.	-0,36	0,19	-0,24	0,19	-0,26	0,22	< 0,001	< 0,001		
50	9. Ampl.	-0,36	0,20	-0,24	0,19	-0,27	0,22	< 0,001	< 0,001		
50	10. Ampl.	-0,36	0,20	-0,24	0,19	-0,28	0,23	< 0,001	< 0,001		
100	1. Ampl.	-0,53	0,18	-0,46	0,21	-0,43	0,21	< 0,001	< 0,001		
100	2. Ampl.	-0,44	0,16	-0,37	0,19	-0,37	0,20	< 0,001	< 0,001		
100	3. Ampl.	-0,42	0,16	-0,32	0,19	-0,34	0,20	< 0,001	< 0,001		
100	4. Ampl.	-0,43	0,17	-0,30	0,18	-0,32	0,21	< 0,001	< 0,001		
100	5. Ampl.	-0,44	0,18	-0,30	0,18	-0,31	0,23	< 0,001	< 0,001		
100	6. Ampl.	-0,44	0,19	-0,31	0,19	-0,31	0,23	< 0,001	< 0,001		
100	7. Ampl.	-0,44	0,19	-0,31	0,18	-0,31	0,24	< 0,001	< 0,001		
100	8. Ampl.	-0,44	0,19	-0,31	0,19	-0,32	0,24	< 0,001	< 0,001		
100	9. Ampl.	-0,43	0,18	-0,31	0,18	-0,31	0,24	< 0,001	< 0,001		
100	10. Ampl.	-0,43	0,18	-0,32	0,18	-0,31	0,23	< 0,001	< 0,001		

Tabelle: Latenzen der lokalen Feldpotentiale. 1 bis 10 Reizantwort für 25, 50 und 100 ms Interstimulusintervall. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (Mann-Whitney-Test).

	Gruppe	Mittelwerte	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Statistik	Statistik
Ms	Code	Kontrolle	Kontrolle	Ipsilateral	Ipsi-lateral	Kontra-lateral	Kontra-lateral	Kontrolle vs Ipsi	Kontrolle vs Kontra
25	1. Lat.	17,63	1,26	18,37	1,92	18,96	2,49	< .001	< .001
25	2. Lat.	21,22	3,81	23,83	4,26	21,72	5,29	< .001	n.s
25	3. Lat.	20,06	2,18	21,71	3,50	20,79	3,36	< .001	n.s
25	4. Lat.	20,36	2,12	21,00	2,86	20,31	2,41	< .05	n.s
25	5. Lat.	20,54	2,08	22,00	3,28	21,03	2,59	< .001	n.s
25	6. Lat.	20,83	2,37	21,69	2,80	20,75	2,79	< .01	n.s
25	7. Lat.	21,00	2,03	21,86	2,90	20,95	2,46	< .01	n.s
25	8. Lat.	21,06	2,14	21,83	3,08	20,97	2,44	< .05	n.s
25	9. Lat.	21,22	2,34	21,74	3,08	21,23	2,57	n.s.	n.s
25	10. Lat.	20,91	2,00	21,71	2,89	21,01	2,73	< .05	n.s
50	1. Lat.	17,60	1,27	18,39	2,04	18,94	2,46	< .001	< .001
50	2. Lat.	19,86	2,29	21,38	3,04	20,96	3,77	< .001	n.s
50	3. Lat.	19,83	2,16	21,44	3,60	21,15	3,66	< .001	< .01
50	4. Lat.	20,40	2,52	22,31	4,09	21,48	3,53	< .001	< .05
50	5. Lat.	20,13	2,16	21,90	3,48	21,02	2,71	< .001	< .005
50	6. Lat.	20,21	2,22	21,78	3,58	20,72	2,51	< .001	n.s
50	7. Lat.	20,16	2,19	21,46	2,96	20,59	2,31	< .001	n.s
50	8. Lat.	20,14	2,01	21,18	2,65	20,54	2,39	< .001	n.s
50	9. Lat.	20,19	2,03	21,18	2,67	20,53	2,28	< .001	n.s
50	10. Lat.	20,11	2,09	21,18	2,61	20,61	2,14	< .001	< .05
100	1. Lat.	17,68	1,30	18,41	1,84	18,92	2,42	< .001	< .001
100	2. Lat.	18,88	1,51	19,40	1,97	19,85	3,10	< .01	n.s
100	3. Lat.	19,64	1,75	20,22	1,91	20,88	3,14	< .005	< .005
100	4. Lat.	19,75	1,80	20,40	2,31	20,59	2,71	< .01	< .05
100	5. Lat.	19,72	1,77	20,73	2,51	20,51	2,52	< .001	< .05
100	6. Lat.	19,75	1,73	20,63	2,22	20,36	2,40	< .001	n.s
100	7. Lat.	19,75	1,79	20,51	2,34	20,33	2,33	< .005	n.s
100	8. Lat.	19,59	1,56	20,34	2,26	20,10	2,05	< .005	n.s
100	9. Lat.	19,56	1,64	20,15	2,02	20,22	2,13	< .01	< .05
100	10. Lat.	19,61	1,58	20,25	1,75	20,14	2,07	< .001	< .05

Ethogramme zur Definition der Vorderpfotennutzung der linken und rechten Vorderpfote im Glaszylinder

Abstoßen vom Boden:

Gezählt wird die Vorderpfote, die als letzte den Boden berührt. Währenddessen kann die andere Vorderpfote frei in der Luft gehalten werden oder die Glaswand berühren. Dabei müssen beide Vorderpfoten für mindestens 1 Sekunde den Boden verlassen haben.

Erstes Berühren der Wand:

Gezählt wird die Vorderpfote, die als erste an die Glaswand gesetzt wird. Die andere Vorderpfote hat den Boden bereits verlassen oder verläßt ihn später.

Landung auf dem Boden:

Gezählt wird die Vorderpfote, die nach einem Aufrichten als erste auf dem Boden aufgesetzt wird.

Horizontale Bewegung an der Wand:

Gezählt wird die Bewegung der Vorderpfote entlang der Wand. Die gedachte Gerade zwischen der alten und der neuen Position an der Wand weicht maximal 45° nach oben oder unten von der Horizontalen ab. Wird die Vorderpfote einige Zeit in der Luft gehalten, wird die Bewegung anhand der Positionen an der Wand bestimmt und gezählt.

Vertikale Bewegung an der Wand:

Gewertet wird die Bewegung der Vorderpfote entlang der Wand. Die gedachte Gerade zwischen der alten und der neuen Position an der Wand weicht maximal 45° nach links oder rechts von der Vertikalen ab. Wird die Vorderpfote einige Zeit in der Luft gehalten, wird die Bewegung anhand der Positionen an der Wand bestimmt und gezählt.

Ethogramme zur Definition der einzelnen und simultanen Vorderpfotennutzung im Glaszylinder

Berühren der Wand mit einer Vorderpfote

Gezählt wird die Berührung der Wand mit nur einer Vorderpfote. Die andere Vorderpfote befindet sich noch auf dem Boden und verläßt ihn noch oder befindet sich bereits in der Luft.

Berühren der Wand mit beiden Vorderpfoten

Gezählt wird die Berührung der Wand mit beiden Vorderpfoten gleichzeitig. Dabei kann die zweite Vorderpfote nach der ersten Vorderpfote an die Wand gesetzt werden, oder beide Vorderpfoten werden gleichzeitig an die Wand gesetzt. Um wieder beide Vorderpfoten zählen zu können, müssen beide Vorderpfoten bewegt werde.

Landung auf einer Vorderpfote

Bei der Landung auf dem Boden setzt die gezählte Vorderpfote mindestens eine halbe Sekunde vor der anderen Vorderpfote auf dem Boden auf.

Landung auf beiden Vorderpfoten

Bei der Landung werden beide Vorderpfoten innerhalb einer halben Sekunde auf dem Boden gesetzt.

Curriculum vitae

Name: Sonja Reinecke

Geboren: 6. Dezember 1969 in Hildesheim

Schulbildung:

1976 – 1980: Grundschule in Hildesheim

1980 – 1989: Integrierte Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe

1989: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

1989 – 1996 Studium der Biologie an der Georgia-Augusta-Universität
Göttingen

1996 Erhalt des Diploms der Biologie

Berufliche Tätigkeit:

ab 05/1997 Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof.
Dr. O. W. Witte an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, ab 02/2000 als wissenschaftliche Hilfskraft

Stipendium:

05/1997 – 01/2000 Stipendium der DfG im Neurograduiertenkolleg
„Pathologische Prozesse des Zentralnervensystems: Vom
Gen zum Verhalten“

Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Doktorschrift eigenhändig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation ist in der vorliegenden oder ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht worden. Ich versichere, daß ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Sonja Reinecke