

**Aus der Neurologischen Klinik der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Hans-Peter Hartung**

**INFARKTINDUZIERTE VERÄNDERUNGEN  
INTRINSISCHER OPTISCHER SIGNALE IN  
JUVENILEN HIRNSCHNITTEN DER RATTE**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Erkan Sagnak Reynier**

**2004**

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**Gez.:**

**Dekan: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang H. M. Raab**

**Referent: Privatdozent Dr. med. Jochen Staiger**

**Korreferent: Univ. Prof. Dr. K. Gottmann**

## **Danksagung**

Ich möchte vor allem Herrn PD Dr. med. Staiger für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. rer. nat. Knut Holthoff für die gründliche Einweisung in das Gebiet der intrinsischen optischen Signale und für seine stete Hilfsbereitschaft.

Weiterer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. K. Gottmann für die unkomplizierte Begutachtung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Dr. rer. nat. Heike Niermann, Herrn Dr. rer. nat. C. Brühl, Herrn Dr. rer. nat. M. Lutzenburg, Frau Dipl. Biol. Armelle Divanac'h, Herrn Dr. rer. nat. K. Schiene, Herrn Dr. med. G. Hagemann, Frau S. Hamm, Frau D. Steinhoff, Herrn Dr. med. C. Redecker, Frau Dr. rer. nat. S. Reinecke sowie Herrn Dr. med. M. Schroeter für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und Hilfe bei den kleinen und großen Problemen des Alltags.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Witte für die Überlassung des Themas danken.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern.

Vielen Dank Edwige für Alles.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
2.1	Versuchstiere	11
2.2	Anästhesie und Kontrolle der Körpertemperatur	11
2.3	Infarktauslösung	12
2.4	Präparation der Hirnschnitte	14
2.5	Versuchsaufbau	16
2.6	Verarbeitung des Meßsignals	17
2.7	Auslösen der intrinsischen optischen Signale	19
2.8	Kartierung der intrinsischen optischen Signale	19
2.9	Histologie	21
2.10	Ermittlung der Intensitätsprofile der intrinsischen optischen Signale	24
2.11	Statistik	24
<b>3</b>	<b>ERGEBNIS</b>	<b>26</b>
3.1	Kartierung der kortikalen Areale	26
3.2	Varianz der intrinsischen optischen Signale	29
3.3	Charakterisierung der intrinsischen optischen Signale der Kontrollgruppe	33
3.4	Intrinsische optische Signale nach Sham-Operation	39
3.5	Intrinsische optische Signale in Läsionstieren	51
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
4.1	Kartierung intrinsischer optischer Signale	68
4.2	Intrinsische optische Signale und ihre Varianz	69
4.3	Intrinsische optische Signale des visuellen Kortex der Ratte	70
4.4	Signale nach Sham-Operation	73
4.5	Intrinsische optische Signale nach kortikaler Läsion	75
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>87</b>

# 1 Einleitung

Seit vielen Jahrzehnten ist bekannt, daß durch elektrische Stimulation ausgelöste Aktivität in neuronalem Gewebe eine Veränderung der optischen Eigenschaften bewirken kann. Diese Veränderungen der optischen Eigenschaften lassen sich erfassen und werden als intrinsische optische Signale (IOS) bezeichnet, da sie ohne die Verwendung von Farbstoffen gemessen werden können.

Intrinsische optische Signale konnten erstmals an peripheren Nerven beobachtet werden. Bereits 1949 registrierten Hill und Keynes am Beinernerv von *Carcinus maenas* (Strandkrabbe) nach elektrischer Stimulation eine aktivitätsabhängige Änderung der Lichttransmission (Hill, 1950), (Hill, Keynes, 1949). Fast 10 Jahre später beobachteten Cohen und Keynes am Beinernerv von *Maia squinado* (Seespinne) und am Riesenaxon von *Loligo forbesi* (Nordischer Kalmar) nach elektrischer Stimulation eine aktivitätsabhängige Änderung des gestreuten Lichtes (Cohen et al., 1968).

Die Ursache für die Entstehung dieser Signale war bis dahin noch unklar. Da sowohl in den von Hill als auch in den von Cohen und Keynes durchgeführten Experimenten die Größe der Signale stark von der Osmolarität der umgebenden Lösungen abhing, wurden für die Entstehung von intrinsischen optischen Signalen *in vitro* von den Autoren Änderungen des Zellvolumens (Hill, Keynes, 1949), (Hill, 1950) und des Refraktärindices des Zellplasmas (Cohen et al., 1968) als Ursache genannt.

Intrinsische optische Signale wurden nicht nur an peripheren Nerven, sondern auch an Hirnschnitten von Säugetieren zur Messung neuronaler Erregungsausbreitung eingesetzt. So wurde an kortikalen Hirnschnitten von Meerschweinchen von Lipton entdeckt, daß Änderungen am Erregungszustand des neuronalen Gewebes eine Veränderung der Reflektionseigenschaften des Hirnschnittes bewirkten (Lipton, 1973). Hierbei wurde nach elektrischer Reizung das Ausmaß des am Schnitt reflektierten Lichtes mit einem Microfluorimeter gemessen. Die Signale hatten einen Zeitverlauf von einigen Sekunden, womit elektrische Aktivität als direkte Ursache für die Entstehung dieser Signale unwahrscheinlich war. Da sie in ihrer Intensität und ihrem Zeitverlauf stark von

der Osmolarität der Umgebungsflüssigkeit abhängen, vermutete Lipton (1973) daß bei der Entstehung dieser optischen Signale Änderungen des Zellvolumens eine wesentliche Rolle spielen.

Mit der Anwendung neuer optischer Meßmethoden in den siebziger Jahren trat der Einsatz von intrinsischen optischen Signalen zur Messung von Erregungsausbreitung an neuronalen Geweben in den Hintergrund. Von ihnen unterscheidet man die sogenannten extrinsischen optischen Signale, bei denen mit Hilfe von speziellen Farbstoffen Änderungen des Membranpotentials in neuronalem Gewebe dargestellt werden können (Cohen et al., 1974). Der Farbstoff wird dabei in das Gewebe eingewaschen oder per Mikroinjektion direkt in das Gewebe eingebracht und reagiert auf Membranpotentialänderungen mit Veränderungen der Doppelbrechungs-, Absorptions- oder Fluoreszenzeigenschaften.

Mit dieser Methode ließen sich zum Beispiel einzelne Aktionspotentiale am Riesenaxon von *Loligo forbesi* bei guter Korrelation mit dem Zeitverlauf und der Intensität der elektrischen Signale darstellen (Ross et al., 1977). In den folgenden Jahren konnte die Empfindlichkeit dieser Methode durch die Entwicklung neuer Farbstoffe um Größenordnungen verbessert werden (Grinvald et al., 1988), und es wurden Messungen an kultivierten Einzelneuronen, Einzelzelleitungen an Ganglien des medizinischen Blutegels und auch an hippocampalen Hirnschnitten von Säugetieren durchgeführt.

Neben dem Vorteil der sehr guten räumlichen und zeitlichen Auflösung beim Einsatz von Farbstoffen zur Messung von Erregungsausbreitung, birgt diese Methode auch einige Nachteile. Zum einen verursachen viele der zum Einsatz kommenden Farbstoffe pharmakologische Nebeneffekte wie Beeinflussung der Ionenleitfähigkeiten, der synaptischen Transmission und des Membranwiderstandes oder wirken toxisch auf das zu untersuchende Gewebe. Zum anderen treten bei den notwendigen hohen Beleuchtungsintensitäten mit ultraviolettem Licht häufig photodynamische Schädigungen des Gewebes auf, die auf die Entstehung von freien Radikalen in Gegenwart von Sauerstoff und dem verwendeten Farbstoff zurückzuführen sind (Grinvald et al., 1988). Auch die Untersuchung der pharmakologischen Wirkung bestimmter Substanzen ist

mit dieser Methode nur bedingt möglich, da zwischen Farbstoff und Substanz Wechselwirkungen oftmals nicht auszuschließen sind (Cohen, Salzberg, 1978), (Grinvald et al., 1988).

Parallel zum Einsatz von Farbstoffen wurden auch die technischen Mittel zur Registrierung intrinsischer optischer Signale weiterentwickelt. Bei zunehmender Weiterentwicklung der räumlichen Auflösung bot diese Methode zudem wichtige Vorteile wie die Aktivitätsmessung großer Kortexareale ohne den mit dem Einsatz von Farbstoffen verbundenen Nachteilen. Dies führte dazu, daß intrinsische optische Signale bald auch *in vivo* am Kortex verschiedener Säugetiere zur Messung neuronaler Aktivität verwendet wurden.

Grinvald et al. konnten durch die Messung reflektierten Lichtes mit einem Photodiodenfeld aus vielen Einzeldioden an der freigelegten Kortexoberfläche verschiedener Tierarten wichtige Hinweise auf deren funktionelle Organisation gewinnen (Grinvald et al., 1986). Am Kortex der Ratte wurde durch den gleichzeitigen Einsatz von potentialsensitiven Farbstoffen und der Messung intrinsischer optischer Signale gezeigt, daß trotz unterschiedlicher Zeitgänge die räumliche Intensitätsverteilung beider Signalformen nach sensorischer Stimulation praktisch gleich war (Grinvald et al., 1986). Auch zur Erforschung des visuellen Kortex der Katze wurde diese Methode eingesetzt, mit der dabei sogenannte „*Iso-Orientierungs-Domänen*“ nachgewiesen werden konnten (Grinvald et al., 1988).

Große Fortschritte bei der Darstellung funktioneller Strukturen am Säugetierkortex brachte der Einsatz von CCD (*charge-coupled-device*)-Kameras, mit denen die räumliche Auflösung intrinsischer optischer Signale um ein Vielfaches erhöht werden konnte. Zusammen mit der Verwendung von Licht im nahen Infrarot, das bei geringerer Absorption durch Hämoglobin den Vorteil höherer Eindringtiefen besitzt, konnten am primären visuellen Kortex von Affen *in vivo* selbst durch die intakte Dura Messungen vorgenommen werden (Lieke et al., 1989). Nähere Einzelheiten über die Funktion und Struktur der „*Iso-Orientierungs-Domänen*“ konnten so auch am freigelegten sekundären Areal 18 des visuellen Kortex der Katze herausgefunden werden (Bonhoeffer, Grinvald, 1991).

Im primären somatosensorischen Kortex der Ratte gelang es mit dieser Methode, am freigelegten Kortex *in vivo* intrinsische optische Signale durch mechanische Reizung der Zehen der Vorderpfoten zu registrieren (Gochin et al., 1992), während am isolierten, intakten Gehirn von Meerschweinchen intrinsische optische Signale verwendet wurden, um epileptische Erregungsausbreitung an der Oberfläche des olfaktorischen Kortex darzustellen (Federico et al., 1994). Selbst am menschlichen Kortex wurde diese Methode mit Erfolg angewandt, um vor neurochirurgischen Eingriffen unbedingt zu erhaltendes Gewebe durch kognitive Aktivierung erkennen zu können. So konnten zum Beispiel beim sprechenden Patienten intrinsische optische Signale im Sprachzentrum registriert werden (Haglund et al., 1992).

Häufig ist die Interpretation intrinsischer optischer Signale aufgrund mangelnder Kenntnis über ihre Ursachen erschwert. Zwar ist seit langem bekannt, daß intrinsische optische Signale bei neuronaler Aktivität ausgelöst werden können, da die Signale jedoch mit Zeitgängen im Sekundenbereich erscheinen, kann die elektrische Aktivität nicht die direkte Ursache für ihre Entstehung sein.

*In vivo* scheinen an der Entstehung der Signale oftmals mehrere, verschiedenartige Faktoren beteiligt zu sein. Zusätzlich zu Volumenänderungen aufgrund ionaler Verschiebungen konnten große Anteile der Signale auf Blutflußänderungen an kleinen Arterien, auf Änderungen des Oxygenierungsgrades von Hämoglobin (Grinvald et al., 1986), (Lieke et al., 1989) sowie auf potentialabhängige Absorptionsänderungen bestimmter Zellproteine (Federico et al., 1994) zurückgeführt werden.

Einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung über die Entstehung intrinsischer optischer Signale *in vitro* leisteten Mac Vicar und Hochmann durch Untersuchungen an hippocampalen Schnitten von Rattenhirnen (MacVicar, Hochman, 1991). Diese besitzen die Eigenschaft, daß synaptische und axonale Bereiche hochgradig geordnet vorliegen und somit gesondert betrachtet werden können. In der CA3-Region des Hippocampus befindliche Neurone projizieren dabei mit sogenannten Schaffer-Kollateralen in die CA1 Region. Dort bilden sie im *Stratum moleculare* Synapsen mit Dendriten aus, deren Zellkörper sich im *Stratum pyramidale* befinden. Durch elektrische Reizung der Schaffer-

Kollateralen konnte ein intrinsisches optisches Signal ausschließlich in dem an Synapsen reichen *Stratum moleculare* beobachtet werden. Das intrinsische optische Signal konnte zudem verhindert werden, wenn der Badlösung das Kalzium entzogen und somit die synaptische Transmission verhindert wurde. Damit wurde deutlich, daß intrinsische optische Signale sehr wahrscheinlich dort entstehen, wo synaptische Übertragung stattfindet. Außerdem wiesen die Autoren nach, daß insbesondere der postsynaptische Bereich bei der Entstehung von intrinsischen optischen Signale eine wichtige Rolle spielt, da die Signale durch *Kynurenic-acid (Kynurenat)*, einem Inhibitor postsynaptischer NMDA-Rezeptoren , verhindert werden konnten.

Andere Autoren konnten erste Hinweise auf eine mögliche Ursache für die Entstehung von intrinsischen optischen Signalen liefern. Aus früheren Arbeiten war bekannt, daß Astrozyten im Zentralnervensystem anschwellen, wenn umliegende Neurone bei ihrer Erregung Kalium ausschütten, was folglich zu einer Verkleinerung des Extrazellulärraumes führt (Walz, Hinks, 1985), (Walz, Hinks, 1986). Dies geschieht bei Aufnahme des Kaliums durch die Astrozyten mit Hilfe eines gut untersuchten, Furosemid-sensitiven Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporters und nachfolgendem, passiven Wassereinstrom in die Astrozyten (Walz, Hinks, 1986). Andrew und MacVicar gelang der Nachweis, daß die intrinsischen optischen Signale auf die Aktivität dieser glialen Transporter zurückzuführen waren, indem sie zum einen eine Lösung niedriger Chloridkonzentration in die Nährlösung der Hirnschnitte einwuschen und zum anderen *Furosemid* hinzugaben. Beides führte bei funktionierender synaptischer Übertragung zu einer Deaktivierung des Transporters und gleichzeitig auch zu einer Verhinderung der intrinsischen optischen Signale (Andrew, MacVicar, 1994). Weiterhin konnte von den Autoren allein durch Veränderung der Osmolarität der Umgebungsflüssigkeit und folglich auch des Extrazellulärvolumens ein intrinsisches optisches Signal ausgelöst werden.

Die direkte Korrelation von Veränderungen des Extrazellulärvolumens und der Entstehung intrinsischer optischer Signale wurde durch Arbeiten von Holthoff et al. (Holthoff, Witte, 1995), (Holthoff, Witte, 1996) am Neokortex der Ratte untersucht. An Hirnschnitten konnten dabei durch elektrische Stimulation kolumnenförmige Signale ausgelöst werden, die zuvor schon von Dodt et al. beschrieben wurden (Dodt et al., 1993).

Die Bestimmung des Extrazellulärvolumens gelang den Autoren durch den Einsatz von ionensensitiven Mikroelektroden. Bei Vergleich der Zeitgänge des Anstieges der extrazellulären Kaliumkonzentration bei neuronaler Erregung mit dem des optischen Signals und der Änderung des Extrazellulärvolumens stellte sich heraus, daß die Kaliumkonzentration nach elektrischer Stimulation zeitlich vor dem Eintreffen des optischen Signals anstieg. Die Verringerung des Extrazellulärvolumens dagegen war im zeitlichen Verlauf mit dem des optischen Signals identisch. Es konnte so nachgewiesen werden, daß intrinsische optische Signale am Kortex *in vitro* durch eine Verringerung des Extrazellulärvolumens verursacht werden, die zeitlich nach dem Ausstoß von Kalium in den Extrazellulärraum erfolgt.

Als Ursache intrinsischer optischer Signale *in vitro* können somit Volumenänderungen des Extrazellulärspaces betrachtet werden, die zu einer Veränderung der optischen Eigenschaften des Hirngewebes führen. Verursacht werden diese durch die Aktivität von Gliazellen, die mit Hilfe eines Furosemid-sensitiven Transporters Kalium aufnehmen, das bei postsynaptischer Aktivität von Neuronen in den Extrazellulärraum abgegeben wird. Ein dadurch bedingter, passiver Einstrom von Wasser in die Gliazellen führt dann zu deren Schwellung und so zu einer Verringerung des Extrazellulärvolumens.

Aufgrund der geringen Invasivität und der guten räumlichen Auflösung wurden intrinsische optische Signale bereits mit Erfolg eingesetzt, um auch funktionelle Eigenschaften des Kortex darzustellen. *In vivo* (Bonhoeffer, Grinvald, 1991; Bakin et al., 1996) sowie *in vitro* (Aizenman et al., 1996); (Yuste et al., 1997) wurden wichtige Informationen über den funktionellen Aufbau des Kortex gewonnen. So enden thalamische Afferenzen der visuellen Bahn hauptsächlich in der Lamina IV des primären visuellen Kortex und bilden dort in der Hierarchie der Informationsverarbeitung auf kortikaler Ebene eine erste Projektion (Yuste et al., 1997). Holthoff et al. beobachteten an kortikalen Hirnschnitten von Ratten kolumnär geformte intrinsische optische Signale, die sich zwischen der Lamina VI und der Kortexoberfläche erstreckten (Holthoff, Witte, 1995) (Holthoff et al., 1996). Möglicherweise spiegeln diese Signale bestimmte funktionelle Eigenschaften des Säugetierkortex wieder, da auch mit anderen Techniken bereits Signale sehr ähnlicher Form registriert werden konnten - so zum Beispiel im Barrel-Kortex der Ratte mit der (<sup>14</sup>C)-Desoxyglucose Technik bei

mechanischer Reizung der Vibrissen (Kossut, Hand, 1984a), (Kossut, Hand, 1984b).

In bisher unveröffentlichten Arbeiten von Holthoff, Sagnak und Witte an 14 Tage alten Ratten konnte gezeigt werden, daß intrinsische optische Signale (IOS) in verschiedenen kortikalen Arealen unterschiedliche und charakteristische Formen sowie Intensitätsverteilungen aufweisen. Der noch nicht vollständig ausgereifte Kortex erwies sich hierbei aufgrund seiner noch unvollständigen Myelinisierung und einer damit verbesserten Lichttransmission gegenüber dem adulten Kortex als vorteilhaft. In primären und sekundären Arealen im somatosensorischen sowie visuellen Kortex konnten IOS mit hoher räumlicher Auflösung aufgezeichnet werden. Diese wiesen in primären Arealen sehr ähnliche Intensitätsmaxima auf und unterschieden sich in charakteristischer Art von den IOS, die in sekundären Arealen ausgelöst werden konnten.

Auch bei der Untersuchung pathophysiologischer Zusammenhänge gewinnen intrinsische optische Signale in vitro (Bahar et al., 2000), (Buchheim et al., 1999) und in vivo (Schwartz, Bonhoeffer, 2001) vermehrt an Bedeutung. Mit den verschiedensten Methoden wurden elektrophysiologische, funktionelle und strukturelle Veränderungen beobachtet, die beispielsweise nach Infarktauslösung in unmittelbarer sowie weiter entfernt gelegenen Arealen auftreten. In hippocampalen Hirnschnitten der Ratte konnten D'Ambrosio et al. (D'Ambrosio et al., 1999) 2 Tage nach Läsionsinduktion durch FPI (Fluid Percussion Injury) mittels Patch-Clamp-Technik, Aufzeichnung von Feldpotentialen sowie Registrierung extrazellulärer Kalium-Konzentrationen eine signifikante Veränderung der Kalium-Homöostase nach elektrisch evozierter neuronaler Aktivität beobachten. An kortikalen Hirnschnitten konnte Schiene et al. (Schiene et al., 1999) eine Erhöhung der Stoffwechselaktivität mittels der ( $^{14}\text{C}$ )-Desoxyglucose-Autoradiographie-Technik nach Läsionsinduktion mittels Photothrombose (Watson et al., 1985) in benachbarten kortikalen Gebieten registrieren, was auf eine erhöhte Plastizität in diesen Gebieten nach Infarkt deutet. Mittels immunhistologischer Methoden untersuchten Stoll et al. (Stoll et al., 1998) histologische Veränderungen nach Induktion lokaler Läsionen durch Photothrombose und beobachteten neben charakteristischen entzündlichen Erscheinungen in unmittelbarer Umgebung

des Infarkts auch Ferneffekte auf der ipsilateralen Seite, u.a. in Form von Vermehrung der Astroglia sowie Veränderungen auf Zellrezeptorebene.

Pathophysiologisch spielen Modelle des Schlaganfalls innerhalb der aktuellen Forschung eine sehr wichtige Rolle. Der Schlaganfall kann zu den häufigsten und gleichzeitig invalidisierendsten neurologischen Erkrankungen gezählt werden. Ein genaueres Verständnis und vor allem der zeitliche Ablauf pathophysiologischer Vorgänge ist zur Entwicklung effizienter Therapiestrategien unverzichtbar. Fundamentale Fragen wie beispielsweise die, nach dem optimalen Beginn einer rehabilitativen Bewegungstherapie sind nach wie vor ungeklärt und Gegenstand aktueller Forschung.

Nur wenige Arbeiten liefern Aufschluß über den zeitlichen Verlauf neuronaler Erregbarkeit des Neokortex nach einem Schlaganfall unter Berücksichtigung beider Hemisphären. Untersuchungen von Que et al. (Que et al., 1999) zufolge, wurde nach fokaler kortikaler Ischämie eine Erhöhung exzitatorischer NMDA-Rezeptorbindung nach einer Woche allein auf der kontralateralen Hemisphäre nachgewiesen, während zu einem späteren Zeitpunkt diese auch auf der ipsilateralen Seite beobachtet wurde. Es wurden bisher keine Untersuchungen veröffentlicht, die anhand von intrinsischen optischen Signalen den zeitlichen Verlauf neuronaler Erregbarkeit unter Berücksichtigung von beiden Hemisphären sowie kortikaler Arealgrenzen dokumentieren. Diese Vorgänge sollen im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Modells der Photothrombose am Kortex der Ratte untersucht werden.

## **Ziele**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst intrinsische optische Signale im visuellen Kortex juveniler Ratten auszulösen. Die Untersuchungen wurden an 9 Wochen alten Tieren durchgeführt. Bei Signalen hinreichend guter Qualität wurden weiterhin die Form sowie die Lage der Intensitätsmaxima der intrinsischen optischen Signale bestimmt. Primär und sekundär sensorische Areale sollten dabei gesondert betrachtet werden. Dafür wurden Hirnschnitte untersucht, die nach Paxinos (Paxinos, Watson, 1986) aus der Region Bregma -6 mm stammen. Im okzipitalen Kortex der Ratte befinden sich hier u.a. das primäre visuelle Areal Oc1 sowie die sekundären visuellen Areale Oc2M und Oc2L.

Um die intrinsischen optischen Signale den entsprechenden Arealen zuordnen zu können, wurden weiterhin histologische Untersuchungen durchgeführt, mit deren Hilfe die entsprechenden Areale nach den Experimenten identifiziert werden konnten. Die Identifizierung der kortikalen Areale erfolgte nach immunhistologischer Färbung anhand der zytoarchitektonischen Merkmale des Hirngewebes (Zilles, Wree, 1995). Bestimmte Laminae des sechsschichtigen Neokortex können sich dabei in verschiedenen Arealen z.B. durch ihre Zelldichte, ihre Anfärbbarkeit mit bestimmten Farbstoffen oder ihre Ausdehnung unterscheiden, wobei sich Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen primär bzw. sekundär sensorischen Arealen unterschiedlicher Modalitäten erkennen lassen. Anhand des pathophysiologischen Modells der Photothrombose wurde weiterhin untersucht, ob Veränderungen der intrinsischen optischen Signale am Kortex solcher Hirne beobachtet werden können, denen 7 bzw. 14 Tage zuvor eine Läsion durch photochemisch induzierte Thrombose (Watson et al., 1985) zugeführt wurde. Die Läsion lag hierbei im visuellen Kortex an der Grenze des neokortikalen Bereiches (Oc2M/RSA). Somit konnte ein Großteil des an der Läsion angrenzenden visuellen Kortex geschont werden. Entsprechend konnten in den Arealen Oc2M, Oc1 und Oc2L sowohl auf kontralateraler als auch auf ipsilateraler Seite zur Läsion intrinsische optische Signale auf mögliche Veränderungen untersucht werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

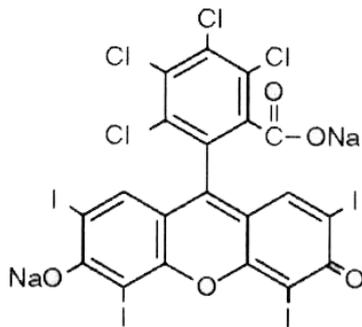
Die Versuche wurden an adulten, männlichen Wistar-Ratten ( $n = 21$ ) mit einem Alter von 8-9 Wochen und einem Körpergewicht von 240-270 g durchgeführt. Die Tiere entstammten der Eigenzucht aus der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, wo sie spezifiziert pathogenfrei (SPF) unter folgenden konstanten Bedingungen gehalten wurden: 22-24 °C Raumtemperatur, 60-80 % relative Luftfeuchtigkeit und einem Tag/Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden. Zum Futter bestand freier Zugang, das aus Altromin (pelletiertes Trockenfutter) und angesäuertem Wasser (pH 2) bestand.

### **2.2 Anästhesie und Kontrolle der Körpertemperatur**

Zur Durchführung einer Operation zur Induktion von ischämischen Insulten wurde eine Inhalationsnarkose mit Enfluran (Abbott GmbH, Deutschland, Wiesbaden) vorgenommen. Über eine Atemmaske wurde das Narkosemittel in einem Lachgas/Sauerstoffgemisch ( $N_2O/O_2$  im Verhältnis 2:1) zugeführt, um eine Vollnarkose zu gewährleisten. Die Einleitung der Narkose erfolgte in einen mit 3,5 Vol-% (s.u.) Enfluran vorgefluteten Glaszylinder. Nach zwei Minuten wurden die Tiere herausgenommen und über eine Atemmaske mit 2,5 bis 2,0 Vol-% Enfluran weiter versorgt. Um eine Auskühlung der Tiere während der Narkose zu verhindern, wurde während der Operation die Körpertemperatur der Tiere kontrolliert. Dazu wurde ein elektronisches Thermometer 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 in das Blut diffundierendes  $N_2O$  zu vermeiden.

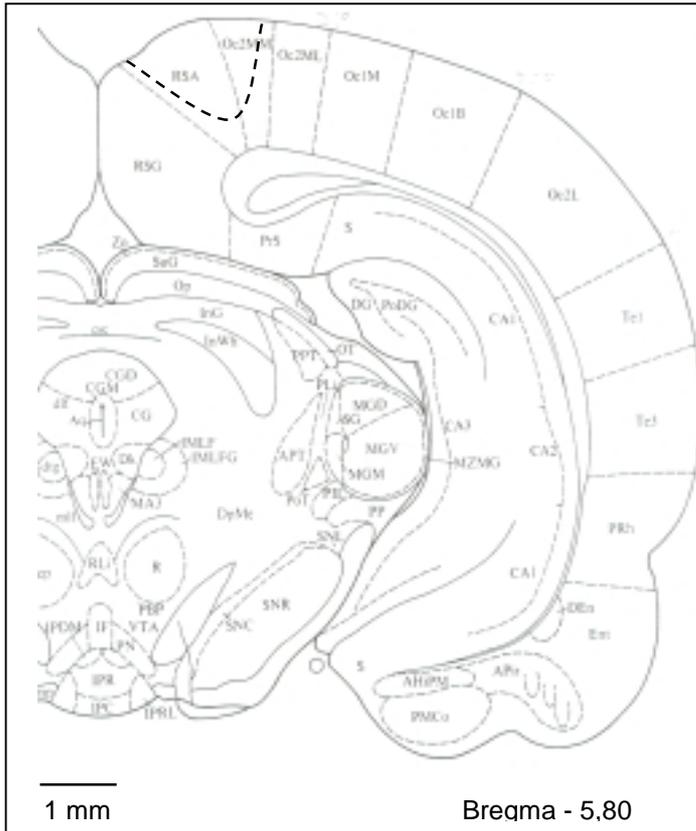
### 2.3 Infarktauslösung

Zur Erzeugung fokaler neokortikaler Läsionen wurde die photothrombotische Methode nach WATSON et al. (1985) verwendet. Das Prinzip beruht auf einer lokalen, örtlich gut definierbaren Schädigung des Endothels und eines dadurch bedingten



**Abb. 2.3.1** Strukturformel des Farbstoffes Bengal Rosa

thrombotischen Verschlusses der betroffenen Gefäße. Hierzu wird ein photosensitiver Farbstoff (Bengal Rosa) in das venöse System eingeführt. An einer definierten Stelle wird durch lokale Belichtung und Freisetzung von Radikalen durch das photosensitive Bengal Rosa eine Schädigung des Endothels und die Aggregation von Thrombozyten ausgelöst. Dadurch werden die Gefäße im belichteten Bereich thrombotisch verschlossen. Den narkotisierten Tieren wurde dafür über die Vena iliaca externa ein Polyethylenkatheter eingeführt, über den zur Vermeidung eines Verschlusses zuerst eine physiologische NaCl-Lösung zugeführt wurde. Die Ratte wurde stereotaktisch fixiert, anschließend wurde über einen Längsschnitt in der Sagittallinie der Schädeldecke die Kalotte frei präpariert. Die Belichtung über einen Kaltlichtleiter (Schott KL 1500, Intensitätsstufe 4-5) 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. Diese befand sich in der rechten Okzipitalregion des Kortex (Lambda +1,5 mm; Bregma – 6,0 mm) im Übergang des Areals RSA zum Areal Oc2M. In die Versuche wurden lediglich jene Slices aufgenommen, die eindeutig eine Läsion in den entsprechenden Arealen aufwiesen. Bei einer Slicedicke im Experiment von 350 µm sowie eines Läsionsdurchmessers von ca. 2 mm

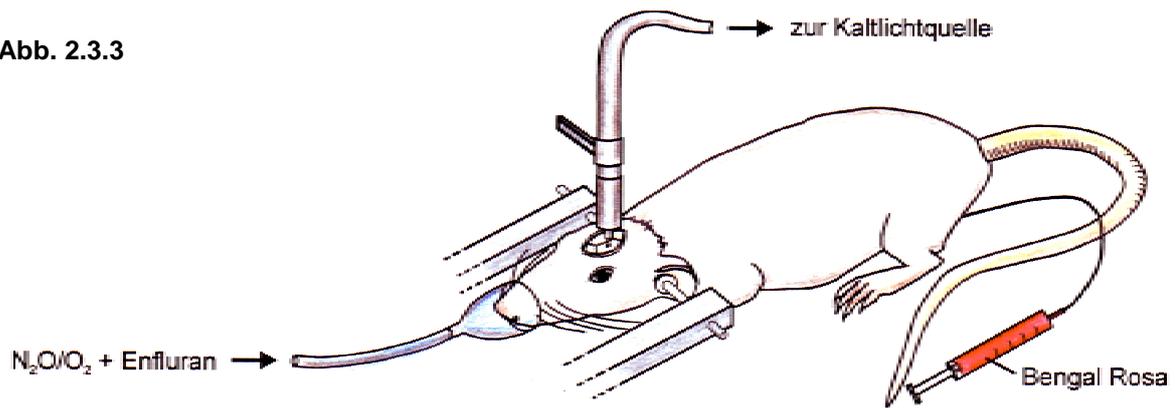


**Abbildung 2.3.2 Wahl der Läsionsposition.** Die Abb. zeigt schematisch einen koronalen Hirnschnitt mit Kennzeichnung der kortikalen Areale. Die Läsion wurde stereotaktisch durch Photothrombose im Übergangsbereich der Areale RSA sowie Oc2M plaziert. Hierdurch wurde der Großteil von RSA sowie ein Teil von OcM infarziert (fette gestrichelte Linie). Die folgenden Messungen erfolgten in den visuellen Arealen Oc2M, Oc1 sowie Oc2L. Verändert nach PAXINOS & WATSON (1997).

konnten so im Idealfalle alle Slices (ca. 3-4) aus der interessierenden Region des visuellen Kortex im Experiment verwertet werden (siehe Abb. 2.3.2.).

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) (Abb. 2.3.1) 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. Hierfür wurde eine Lichtleiterblende von 1,5 mm verwendet. Nach Abschluß der Belichtung wurden die Hautwunden vernäht und die Narkose ausgeleitet. Für Kontrollexperimente mit Schein-Photothrombosen (Sham) wurde in der gleichen Weise vorgegangen, mit dem Unterschied, daß die Lichtquelle nicht eingeschaltet wurde. Die Methode ist in Abbildung 2.3.3 dargestellt.

Abb. 2.3.3

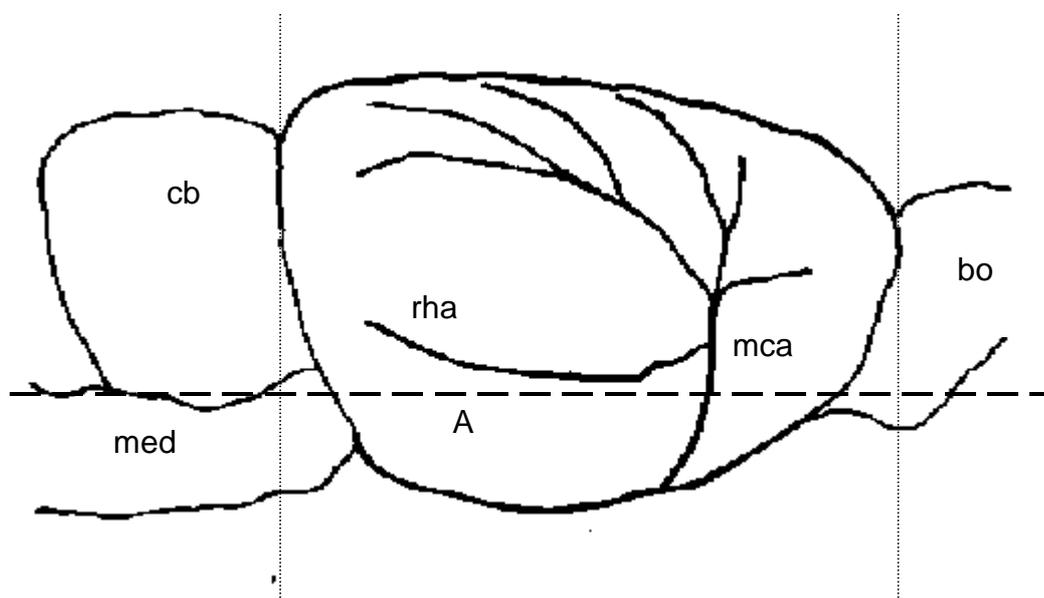


**Abbildung 2.3.3 Läsionsinduktion per Photothrombose.** Mit einem Kaltlichtleiter wird eine stereotaktisch definierte Stelle durch die intakte Kalotte belichtet. Nach i.v. Injektion des photosensitiven Bengal Rosa werden nur an dieser Stelle durch eine lichtabhängige chemische Reaktion Gefäße thrombotisch verschlossen, was zur Induktion einer lokal begrenzten Läsion führt.

## 2.4 Präparation der Hirnschnitte

Zur Messung intrinsischer optischer Signale wurden Kontrolltiere (ohne jegliche Operation), Tiere im Zustand nach Induktion einer Photothrombose vor einer bzw. zwei Wochen sowie sham-operierte Tiere (identische Operation jedoch ohne Belichtung der Kalotte, d.h. ohne Läsion) verwendet. Zur Präparation der Hirnschnitte wurden die Tiere in Enfluran narkotisiert und anschließend dekapitiert. Nach Öffnen der Kalotte, Entfernen der Kaumuskulatur sowie der Dura Mater wurde das Gehirn entnommen und in eisgekühlte, artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF in mmol: NaCl: 124, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.25, NaHCO<sub>3</sub>: 26, KCl: 3, CaCl<sub>2</sub>: 2, MgSO<sub>4</sub>: 2, Glucose: 10) überführt und darin für etwa eine Minute abgekühlt. Auf einem mit ACSF befeuchteten Filterpapier wurde das Gehirn anschließend mit einer entfetteten Rasierklinge für den Schneidevorgang getrimmt. Dem mit der ventralen Seite aufliegenden Gehirn wurde dabei zuerst das Kleinhirn, dann ein Teil des Vorderhirns in senkrechten Schnitten abgetrennt. Anschließend wurde das Gehirn auf seinen kaudalen Teil gekippt und die basalen Anteile in einem Schnitt kurz unterhalb der Perirhinalfalte entfernt. Dabei war darauf zu achten, daß die zu untersuchende Schnittebene senkrecht zum Schnittwinkel verlief. Somit verlief beim anschließenden Schneidevorgang mit dem Vibratom die Schnittrichtung senkrecht zur Kortexoberfläche und damit parallel zum Verlauf der Axone. Zur Orientierung diente dabei die an der seitlichen Hirnoberfläche, von der kaudalen zur frontalen Partie schräg nach unten verlaufende Rhinalarterie (Abb. 2.4.1). Die Experimente wurden am okzipitalen Kortex durchgeführt, daher wurde

unterhalb der Rhinalarterie in einem spitzen Winkel von ca. 5 Grad geschnitten. Mit der kaudalen Schnittfläche wurde das Gewebe dann mit dem Gewebekleber Histoacryl-Blau auf einen Kunststoffblock geklebt und in einer Wanne mit ca. 4°C kalter ACSF überspült, um den Stoffwechsel des Hirngewebes während der Präparation auf ein Minimum zu reduzieren. Dabei diente ein an der ventralen Hirnseite auf den Kunststoffblock geklebter Agar-Agar-Würfel als Widerlager beim Schneidevorgang. Durch den dabei entstehenden Haftkontakt zwischen dem ventralen Hirngewebe und dem Agar-Agar-Würfel war der Schnittwinkel bei der Herstellung der koronalen Hirnschnitte nun abhängig von der

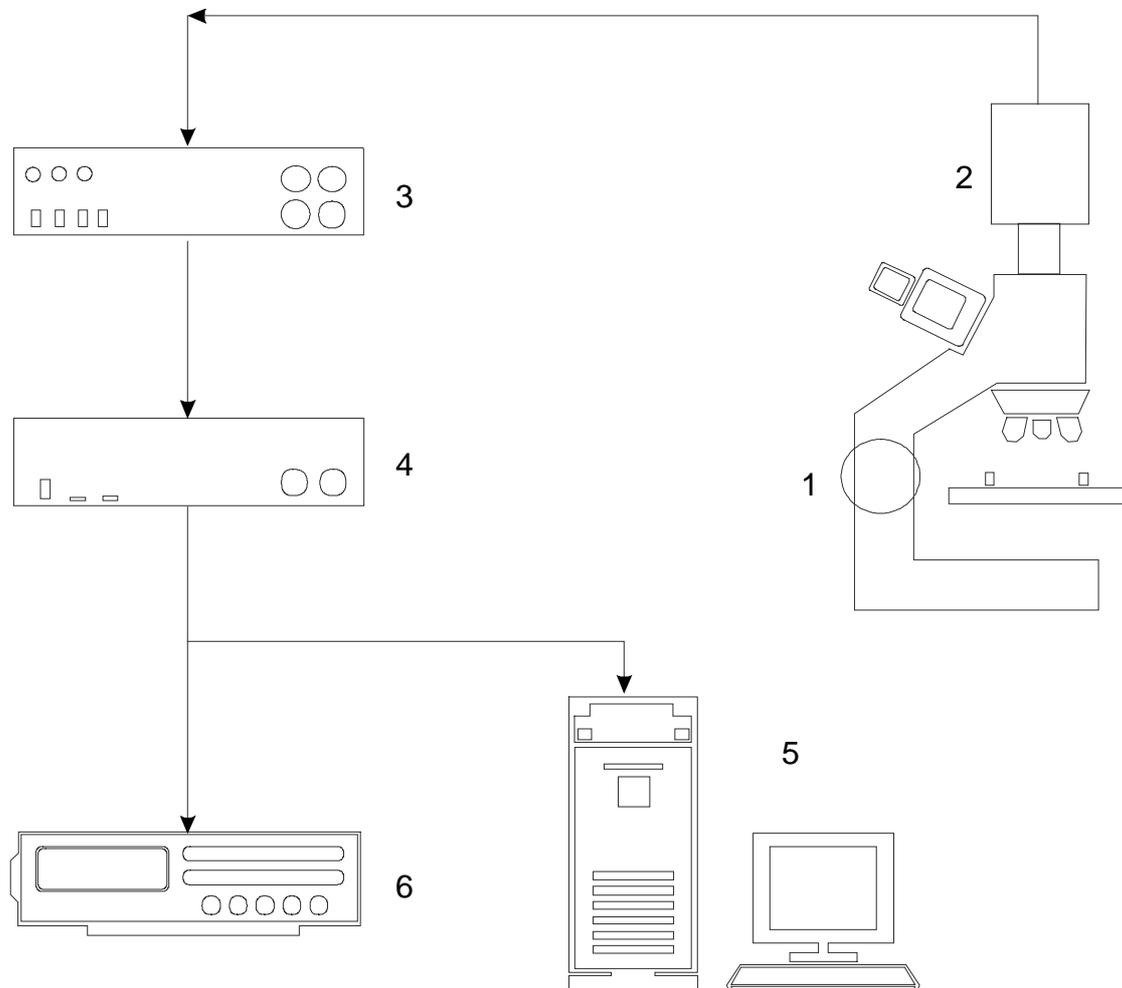


**Abb. 2.4: Skizze des Rattenhirns mit oberflächlich verlaufenden Arterien aus lateraler Sicht.** Zur Orientierung bei der Schnittführung (gestrichelte Linien) diente der Verlauf der Rhinalarterie. Bei Versuchen am okzipitalen Kortex wurde ein Schnittwinkel gemäß A gewählt. Zuvor wurde das Hirn kaudal und frontal getrimmt (gepunktete Linien).cb Cerebellum, med Medulla, bo Bulbus olfactorius, mca mittlere Cerebralarterie, rha Rhinalarterie (nach Paxinos,1995 verändert)

beim Trimmen der basalen Hirnteile gewählten Schnittführung. Anschließend wurden mit einem Vibratom (VT 1000S, Leica) bei horizontaler Schnittführung 350 µm dicke koronale Hirnschnitte hergestellt. Mit einer weiten Pipette wurden die Schnitte bei möglichst geringer mechanischer Beanspruchung in ein mit ACSF gefülltes Becherglas übertragen. Die Hirnschnitte wurden bei Raumtemperatur mit einem Gasgemisch von 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % O<sub>2</sub> begast. Zur Erholung wurden diese mindestens 1,5 Stunden im Becherglas belassen.

## 2.5 Versuchsaufbau

Zentral im Meßplatz befand sich die Versuchskammer (Abb. 2.5) In dieser wurden die Hirnschnitte während der gesamten Messung vollständig mit ca. 2 ml ACSF/min überspült.



**Abb. 2.5 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.** Intrinsische optische Signale konnten an Hirnschnitten ausgelöst werden, die sich in der zentral gelegenen Versuchskammer (1) befanden. Das mikroskopische Bild wurde mit einer CCD-Kamera (2) registriert, die auf dem Phototubus des Mikroskops montiert war. Helligkeitsunterschiede des mikroskopischen Bildes konnten durch die Kamerasteuerungseinheit (3) ausgeglichen werden. Die Digitalisierung und weitere Bildverarbeitung erfolgte mit Hilfe des Videometrieprozessors Argus 20 (4). Nach Aufzeichnung der Signale mit einem Videorecorder (6) erfolgte die weitere Auswertung an einem Computer (5).

Die ACSF-Lösung wurde dabei in einem Wasserbad bei 32 °C mit einem Gasgemisch von 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub> begast und durch hydrostatischen Druck angetrieben. Wenige cm vor dem Erreichen der Versuchskammer floß die ACSF durch ein Glasröhrchen, das mit einem Heizdraht umwickelt war und die Temperatur der ACSF konstant bei 32 °C hielt. Geregelt wurde dies mit Hilfe

zweier temperaturabhängiger Widerstände an der Außenwand der Glaskapillare und in der Versuchskammer.

Zur optischen Registrierung diente ein aufrechtes Mikroskop (Zeiss, Axioskop FS). Die Versuchskammer und der Mikromanipulator für die Reizelektrode waren unbeweglich an einem Stativ montiert. Dagegen konnte das Mikroskop durch seine Befestigung auf einem x-y-Tisch in der Ebene des Versuchstisches bewegt werden. Durch diese Versuchsanordnung konnte auch nach Einstich der Reizelektrode der Bildausschnitt durch Verschieben des Mikroskops verändert werden.

Auf dem Phototubus des Mikroskops war eine *CCD-(charge-coupled-device)*-Kamera (C7500, Hamamatsu) zur Registrierung des mikroskopischen Bildes montiert. Die nachgeschaltete Kamerasteuerungseinheit (C 2400, Hamamatsu) erlaubte eine analoge Kontrastverstärkung und *offset*-Verschiebung des Kamerasignales. Auftretende Unterschiede in der Grundhelligkeit des analogen Videobildes konnten durch eine *shading-correction*-Einheit ausgeglichen werden. Das bisher analoge Meßsignal wurde mit einem Videometrieprozessor (Argus 20, Hamamatsu) weiterverarbeitet. Anschließend wurden die Signale mit einem S-VHS Videorecorder (AG-4700, Panasonic) aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte *off-line* mit einem MacIntosh PC (G4), der mit einer *frame-grabber*-Karte (LG-3, Scion Corporation) und der Bildverarbeitungssoftware NIH Image ausgestattet war. Die Videobilder konnten so im TIFF-Format abgespeichert werden.

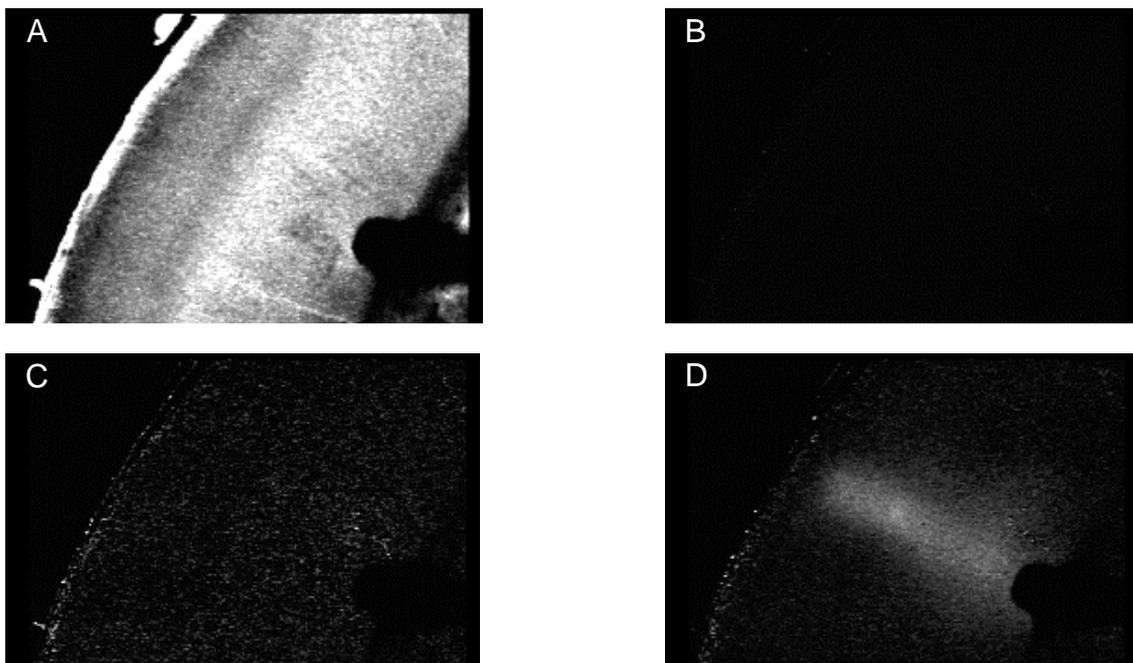
## **2.6 Verarbeitung des Meßsignals**

Das mikroskopische Bild wurde im Dunkelfeld dargestellt, da damit die intrinsischen optischen Signale als eine veränderte Streuung des Lichtes im erregten Gewebe besser darstellbar waren. Dabei erschien das mikroskopische Bild des Hirnschnittes hell auf dunklem Hintergrund. Die Reizung des Hirnschnittes bewirkte eine Aufhellung des erregten Bereiches in einer Größenordnung von einem Promille der Hintergrundintensität. In einer nachfolgenden Digitalisierung wäre das Signal nicht auflösbar gewesen, daher wurde eine spezielle Bildverarbeitung durchgeführt, die das Signal in den Auflösungsbereich der *frame-grabber*-Karte aufspreizte. Hierbei wurde ein

Hintergrundabzug sowie eine anschließende Kontrastverstärkung durchgeführt (Abb. 2.6).

Der CCD-Kamera nachgeschaltet war die Kamerasteuerungseinheit, die das Signal der CCD-Kamera analog um den Faktor drei verstärkte und das Bild in seiner Grundhelligkeit durch ihre *shading-correction*-Einheit homogenisieren konnte. Das bisher analoge Bild wurde anschließend durch den Videometrieprozessor mit einer Auflösung von 12 Bit digitalisiert; bei dieser Auflösung wurden die weiteren Berechnungen durchgeführt.

Für den Hintergrundabzug wurden vor Auslösen eines Signals 64 aufeinanderfolgende Videobilder gemittelt. Dieses Hintergrundbild wurde dann von jedem weiteren Videobild in Echtzeit abgezogen (Abb.2.6.b) und die Differenz um einen Faktor zwischen 4 bis 8 digital verstärkt (Abb. 2.6.c). Anschließend wurde das Bild durch einen analog–digital-Wandler mit einer Auflösung von 8 Bit digital-analog gewandelt. Die zeitliche Auflösung der Messung entsprach somit der Videofrequenz von 25 Bildern pro Sekunde



**Abb. 2.6: Auslösung intrinsischer optischer Signale im mikroskopischen Dunkelfeld.** In A ist links die Kortexoberfläche zu erkennen, die Reizelektrode ist rechts unten in Lamina VI positioniert. Vor Auslösen eines intrinsischen optischen Signals wurde digital ein Hintergrundabzug vorgenommen (B) und das resultierende Differenzbild verstärkt (C). Nach elektrischer Reizung erschien ein intrinsisches optisches Signal (D), das sich von der Reizelektrode bis zur Lamina II erstreckte und bei Erreichen der Maximalintensität nach 4 Sekunden aufgezeichnet wurde.

## **2.7 Auslösen der intrinsischen optischen Signale**

Die intrinsischen optischen Signale wurden durch elektrische Stimulation im unteren Drittel der Lamina sechs ausgelöst. Dafür wurde eine konzentrische, bipolare Reizelektrode (SNE 100 X, Spitzendurchmesser: 100 µm; Science Products) verwendet.

Nach Einstich der Elektrode in Lamina VI am Rand zur weißen Substanz wurde vor jeder Reizung 2 Minuten gewartet, da durch die folgende Ödembildung der Kontakt zwischen Gewebe und Elektrode verbessert wurde. Gereizt wurde zwei Sekunden lang mit einer Frequenz von 50 Hz bei einer Einzelreizlänge von 200 µs. Die Reizstärke lag in einem Bereich zwischen 4 und 5 Volt und war innerhalb eines Experimentes jeweils konstant. Das Signal hatte eine kolumnenförmige Gestalt und war mit seiner Längsachse senkrecht zur Kortexoberfläche und den kortikalen Schichten orientiert (2.6.d). Es wurde 3-4 Sekunden nach Erreichen seiner Maximalintensität aufgezeichnet.

Die koronalen Hirnschnitte wurden als ganzes (beide Hemisphären) in die Kammer eingeführt, da eine der Trennung der beiden Hemisphären mit einer zu starken Traumatisierung des Gewebes einherging. Um eine weitere Beschädigung der Hirnschnitte zu vermeiden, wurden diese in der Kammer nicht gewendet, sondern zum Auslösen der Signale bloß um 180° gedreht. Die Signale beider Hemisphären wurden jeweils nacheinander ausgelöst und aufgezeichnet. Bei einem Reizabstand von ca. 400 µm konnten pro Hemisphäre ca. 20 - 25 intrinsische optische Signale ausgelöst werden.

## **2.8 Kartierung der intrinsischen optischen Signale**

Ziel der Kartierung war es, die intrinsischen optischen Signale den jeweiligen kortikalen Arealen im Hirnschnitt zuzuordnen, in denen sie ausgelöst wurden. Dafür mußte erstens die exakte Lage der intrinsischen optischen Signale im Hirnschnitt bestimmt werden, und zweitens in einem späteren Schritt die Identifizierung der kortikalen Areale erfolgen.

Die Bestimmung der Position der intrinsischen optischen Signale erfolgte mit Hilfe der Registrierungen im Dunkelfeld. Da mit der CCD-Kamera nur ein kleiner Teil des gesamten Hirnschnittes aufgezeichnet werden konnte, wurde vor Beginn der Messungen der gesamte Hirnschnitt ausschnittsweise auf Video

aufgenommen und später auf einem PC mit Hilfe der Software *Pagemaker* durch Übereinanderlegen der überlappenden Bereiche zusammengesetzt. Um nun die Position der Signale in der Gesamtrekonstruktion ermitteln zu können, wurden vor Beginn einer jeden Reizung die Bildausschnitte, die von der CCD-Kamera durch das Mikroskop erfaßt wurden, im Dunkelfeld ohne Hintergrundabzug auf Video aufgenommen. Durch genaue Überlagerung der vor dem Auslösen der Signale an gleicher Stelle aufgenommenen Dunkelfeldausschnitte mit der Gesamtrekonstruktion des Dunkelfeldbildes konnte die exakte Lage der intrinsischen optischen Signale im Hirnschnitt ermittelt und dem jeweiligen kortikalen Areal zugeordnet werden. Die Signalbilder selber boten dafür aufgrund des Hintergrundabzuges zu wenig Details. Ohne Veränderung des Bildausschnittes wurde dann ein Hintergrundabzug vorgenommen und nach digitaler Verstärkung des Differenzbildes ein intrinsisches optisches Signal ausgelöst.

In einem nächsten Schritt wurden Kartierungen der kortikalen Areale der Hirnschnitte durchgeführt. Dazu wurden die Hirnschnitte nach dem Experiment histologisch (s. 2. 9 Histologie) aufgearbeitet und gefärbt. Die Identifizierung der kortikalen Areale erfolgte anhand der gefärbten Hirnschnitten und den Gesamtrekonstruktionen der Dunkelfeldaufnahmen unter Zuhilfenahme eines stereotaktischen Atlanten (Zilles, Wree, 1995). Es wurden zur weiteren Auswertung nur solche Signale verwendet, die entsprechend der Kartierung vollständig innerhalb eines kortikalen Areals lagen.

## **2.9 Histologie**

### **2.9.1 Materialgewinnung**

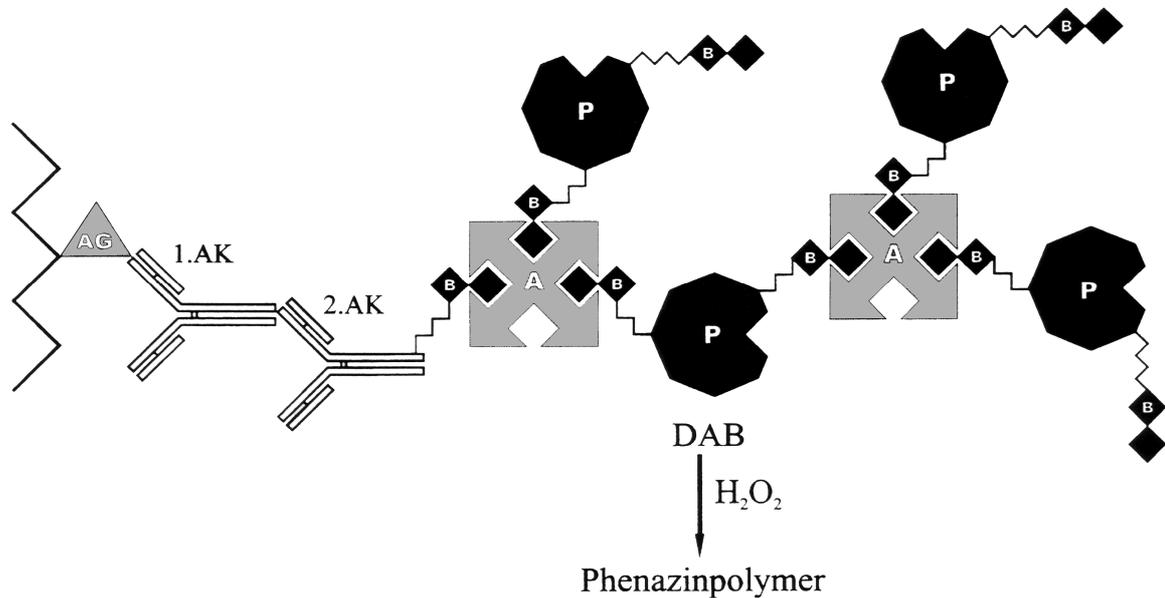
Die nach der Messung der intrinsischen optischen Signale vorsichtig entnommenen Hirnschnitte wurden zunächst auf einen Streifen Filterpapier aufgebracht und für einen Tag in einem Kunststoffröhrchen mit Zamboni-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Hirnschnitte zum Schutz vor Gefrierschäden für 3 - 12 h in 10%ige, dann für 24 - 48 h in 30%ige Saccharose in 0,1 M PBS überführt, bis sie in den Lösungen abgesunken waren. Für die Färbung nach der 3,3-Diaminobenzidin-(DAB)-Methode wurde das Gewebe am Gefrier-Schlittenmikrotom (Microm) im Läsionsbereich in 50 µm dicke koronale Scheiben geschnitten, welche mit einem Pinsel vom Messer abgenommen und in PBS überführt wurden.

### **2.9.2 Immunhistochemische Färbung mittels DAB**

Die 50 µm dicken Schnitte von den zuvor untersuchten Hirnschnitten wurden zuerst dreimal in TRIS Triton (Merck, Darmstadt) pH 7,4 gewaschen und dann über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer in Glasschalen auf einem Schüttler mit dem primären Antikörper (Neu N, Chemicon MAB377 Mouse IgG monoclonal, 1:500; NGS (normal goat serum), 1:50) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal gewaschen und dann für 30 min bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten sekundären Antikörper (Goat anti Mouse, Dianova 115-065-020, Goat IgG (1 : 300); NGS, (1:50) inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen und dann für 30 Minuten mit dem ABC-Reagenz (Avidin / Biotin / Meerrettichperoxidase) bei Raumtemperatur inkubiert. Avidin ist ein Glykoprotein und ist aus vier, fast identischen Untereinheiten aufgebaut, wovon jede Untereinheit je ein Biotinmolekül binden kann. Die Bindung zwischen Avidin und Biotin ist durch eine sehr hohe Affinität gekennzeichnet und hat eine Dissoziationskonstante von  $10^{-5}$  mol/l.

Nach der letzten Waschphase erfolgte die Peroxidasereaktion (5-10 min). In der Peroxidasereaktion überträgt die Meerrettichperoxidase Elektronen vom DAB auf Wasserstoffperoxid, das dabei zu Wasser reduziert wird. Bei diesem

Vorgang kommt es zu einer oxidativen Polymerisation und Zyklisierung des DAB, wobei als Reaktionsprodukt ein dunkelbraunes, amorphes, in Wasser und Ethanol unlösliches Phenazinpolymer entsteht (Abb. 2.9.2).



**Abb. 2.9.2: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Reaktion bei der Avidin-Peroxidase-Methode.** Im ersten Schritt bindet der primäre Antikörper (1.AK) an das gewebegebundene Antigen (AG), während im zweiten Schritt der sekundäre biotinylierte Antikörper (2.AK) an den primären Antikörper bindet. Im dritten Schritt bindet der Avidin (A)-Biotin (B)- Peroxidase (P)- Komplex dann an das Biotin des sekundären Antikörpers. Im letzten Schritt der Färbung oxidieren die Peroxidasen des entstandenen Komplexes das 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen Phenazinpolymer, wobei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor fungiert.

Die durch die DAB-Reaktion gewonnenen (auf neuronale Zellkörper angefärbten) Schnitte wurden nach zweimaligem Waschen in PBS mit 0,5 %iger Gelatine auf Objektträger aufgezogen und für ca. 1 h getrocknet. Anschließend wurden die aufgezogenen Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol, 70 %, 96 %, 100 %) und in Rotihistol für je 5 Minuten inkubiert. Im einem letzten Schritt der Fixierung wurden die Schnitte mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt, wobei einige Tropfen Entellan auf die Schnitte aufgebracht und diese dann mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt wurden. Nach einer Trocknungszeit von ca. 24 h konnten die Schnitte ausgewertet werden.

### 2.9.3 Lösungen

- 1) Phosphatpuffer 0,2 M (PB): Stocklösung: (a) 28,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  in 800 ml Aqua bidest.; (b) 8,3 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  in 300 ml Aqua bidest. Mit der sauren Komponente (b, ca. 200 ml) wurde die basische Komponente (a) auf pH 7,4 titriert.
- 2) Phosphat gepufferte Normalsalzlösung (PBS): Auf 0,1 mol/l mit Aqua bidest. verdünnte PB Lösung + 0,9 % NaCl.
- 3) Fixativ nach Zamboni: 500 ml PB Stocklösung (0,2 mol/l), 150 ml Pikrinsäure (aus gesättigter Lösung), 40 g Paraformaldehyd (in 300 ml Aqua bidest. bei 60 °C frisch aufgelöst und mit wenigen Tropfen NaOH geklärt), das restliche Volumen wird mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und anschließend filtriert. Somit betragen die Endkonzentrationen: 0,1 mol/l Phosphatpuffer, 15 % (v/v) Pikrinsäure, 4 % (w/v) Paraformaldehyd.
- 4) TRIS-Puffer-Stock: 60,55 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (ICN) + 73,8 g NaCl; auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen.
- 5) TRIS-Triton: TRIS-Puffer-Stock 1:10 verdünnen und mit HCl auf pH 7,4 bzw. pH 7,7 titrieren + 0,05 % Triton X-100 (Merck).
- 6) DAB-Lösung: 50 mg 3,3-Diaminobenzidin (Sigma) + 1 ml Aqua bidest.
- 7) Gelatine zum Aufziehen der DAB-Schnitte: 1 g Gelatine; 0,1 g Chrom-(III) Kaliumsulfat; 200 ml Aqua bidest; anschließend auf 37 - 42°C erwärmen.

### 2.9.4 Auswertung der immunhistochemischen Präparate

Die DAB-gefärbten Schnitte wurden durch ein Olympus BH-2 Mikroskop mit einer digitalen Kamera (Zeiss AxioCam) aufgenommen und mit einem Imaging-Programm (Zeiss AxioVision 2.05) bearbeitet.

## **2.10 Ermittlung der Intensitätsprofile der intrinsischen optischen Signale**

Ziel der weiteren Auswertung war es, Intensitätsprofile entlang der Längsachse der intrinsischen optischen Signale zu erstellen, um die schichtspezifische Intensitätsverteilung des optischen Signals zu quantifizieren. Dabei sollten die Intensitätsprofile der intrinsischen optischen Signale, die aus gleichen Arealen stammten, gemittelt werden.

Dazu wurden nach den Experimenten an den TIFF-Bildern der ausgelösten Signale mit der Software *NIH-Image* Intensitätsprofile der Signale entlang ihrer Längsachse in Pixelwerten von 0-256 erstellt. Dabei kennzeichnet ein Pixelwert eine Graustufe im Monitorbild, wobei 256 die dunkelste und 0 die hellste Stufe darstellen. Diese verliefen von der Kortexoberfläche beginnend durch die Mitte des Signals bis zur Reizelektrode und stellten eine Mittelung aus einem 16 Pixel breiten Bereich dar. Die Intensitätsprofile jener Signale, die aus gleichen kortikalen Arealen stammten wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel) importiert und gemittelt. Zur übersichtlicheren grafischen Darstellung wurden die Zahlenwerte vor den weiteren Berechnungen von 256 subtrahiert, so daß in den Abbildungen helle Grauwerte hohen Zahlenwerten zuzuordnen sind. Diese Mittlungen und deren Standardabweichungen wurden grafisch als Funktion der kortikalen Tiefe, d.h. als Abstand von der Kortexoberfläche, in  $\mu\text{m}$  dargestellt. Hierfür mußte zuvor eine Längeneichung von Bildpixelabständen in  $\mu\text{m}$  durchgeführt werden. Dazu wurde ein Objektmikrometer bei gleicher Vergrößerung in den Strahlengang der Meßapparatur gebracht und mit Hilfe der Software NIH-Image zur Längeneichung verwendet (80 Pixelabstände =  $1000\mu\text{m}$ ).

## **2.11 Statistik**

Die Intensitätsplots der einzelnen intrinsischen optischen Signale dienten als Grundlage für die erhobenen Berechnungen der Mittelwerte. Dazu wurden nach Kartierung die zu den Signalen eines bestimmten Areals gehörigen Intensitätsplots zunächst zu einem Mittelwert pro Halbslice (d.h. pro ipsilateraler oder kontralateraler Seite eines Slices) zusammengefaßt. Wurden pro Tier (im Regelfall) mehrere Slices verwendet, so erfolgte anschließend die Mittelung pro Seite (ipsi- oder kontralateral), so daß pro Areal und Tier für die ipsilaterale und

kontralaterale Seite ein gemittelter Intensitätsplot vorlag. Dieser pro Tier, Areal und Seite ermittelte mittlere Intensitätsplot wurde nun über verschiedene Tiere einer Gruppe (Kontrolle, Sham oder Läsion) gemittelt und anschließend die Standardabweichung berechnet. Zur weiteren Analyse wurden so die pro Gruppe, Areal und Seite (Bsp.: mittlerer Intensitätsplot des Areals Oc1 der Gruppe Läsion auf der ipsilateralen Seite) ermittelten Intensitätsplots mit der Standardabweichung verschiedener Tiere verglichen.

In der Kontrollgruppe (hier keine Unterscheidung in ipsi-/kontralateral vorgenommen) erfolgte dagegen eine Mittelung der Intensitätsplots zunächst pro Halbsilice und Areal und anschließend pro Tier.

Die Anzahl (n) bezieht sich dabei auf die Anzahl der Tiere, an denen die Daten erhoben wurden. Soweit nicht anders vermerkt, wurde zur Berechnung der Signifikanz der Student'sche t-Test (zweiseitig) anhand des Programmes Excel durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  verwendet.

## 3 Ergebnis

### 3.1 Kartierung der kortikalen Areale

Als Grundlage zur Identifizierung der kortikalen Areale dienten Hirnschnitte, die nach den Experimenten immunhistochemisch (Neu-N Färbung) aufgearbeitet wurden. Die so angefertigten Schnitte wurden unter dem Mikroskop digital fotografiert und bei hoher Auflösung mit Hilfe eines anatomischen Atlanten (Zilles, Wree, 1995) kartiert. Im Dunkelfeld des Mikroskops wurden zuvor die Hirnschnitte vor Beginn des Experimentes ausschnittsweise als TIFF-Bilder aufgenommen und in einem weiteren Schritt zusammengesetzt (siehe Material und Methoden). Im direkten Vergleich mit der jeweiligen Histologie erfolgte nach den Experimenten die Identifizierung der kortikalen Areale.

Ein wichtiges Kriterium bei der Identifizierung der kortikalen Areale im histologischen Präparat der immunhistologischen Färbung war die Lamina IV des Kortex. Da die verwendete Neu-N Färbung eine sehr gute Darstellung der Zellkörper erlaubte, konnte diese (zellkörperreiche Schicht) im histologischen Präparat problemlos abgegrenzt werden (Abb. 3.1.1). In primär sensorischen Arealen erhält die Lamina IV des 6-schichtigen Kortex bekanntermaßen die größte Anzahl an primären, thalamischen Afferenzen und ist damit in primär sensorischen Arealen stärker ausgeprägt als in sekundär sensorischen Arealen. Eine Abgrenzung des primär visuellen Areals Oc 1 gegen die im Koronarschnitt angrenzenden sekundär sensorischen Areale Oc2M und Oc2L war daher leicht möglich. Im Vergleich ergab sich bei den korrespondierenden Abbildungen der Dunkelfeldaufnahmen ebenfalls eine gute Darstellung der Lamina IV und der Lamina VI, die sich dunkel gegen den übrigen Kortex abhoben. Die Kartierung der Areale erfolgte dennoch anhand der Histologie.

#### **Abb. 3.1.1. Kartierung intrinsischer optischer Signale**

Dargestellt ist in a) ein nach dem Experiment fixierter und immunhistochemisch (Neu-N) gefärbter koronaler Hirnschnitt der Ratte in 2-facher und 16-facher Vergrößerung ohne Läsion. Die Kartierung der Areale erfolgte anhand eines anatomischen Atlanten in der 16-fachen Vergrößerung. In b) ist derselbe Hirnschnitt im mikroskopischen Dunkelfeld kurz vor Beginn des Experimentes abgebildet. Die Abbildung wurde durch Zusammensetzen von Einzelbildern mit Hilfe der Software Pagemaker erstellt. Die Kartierung der Areale erfolgte anhand des gefärbten und bereits kartierten Hirnschnittes. Oc2 M, Oc1, Oc2L = visuelle Areale des Kortex.

Abb. 3.1.1a

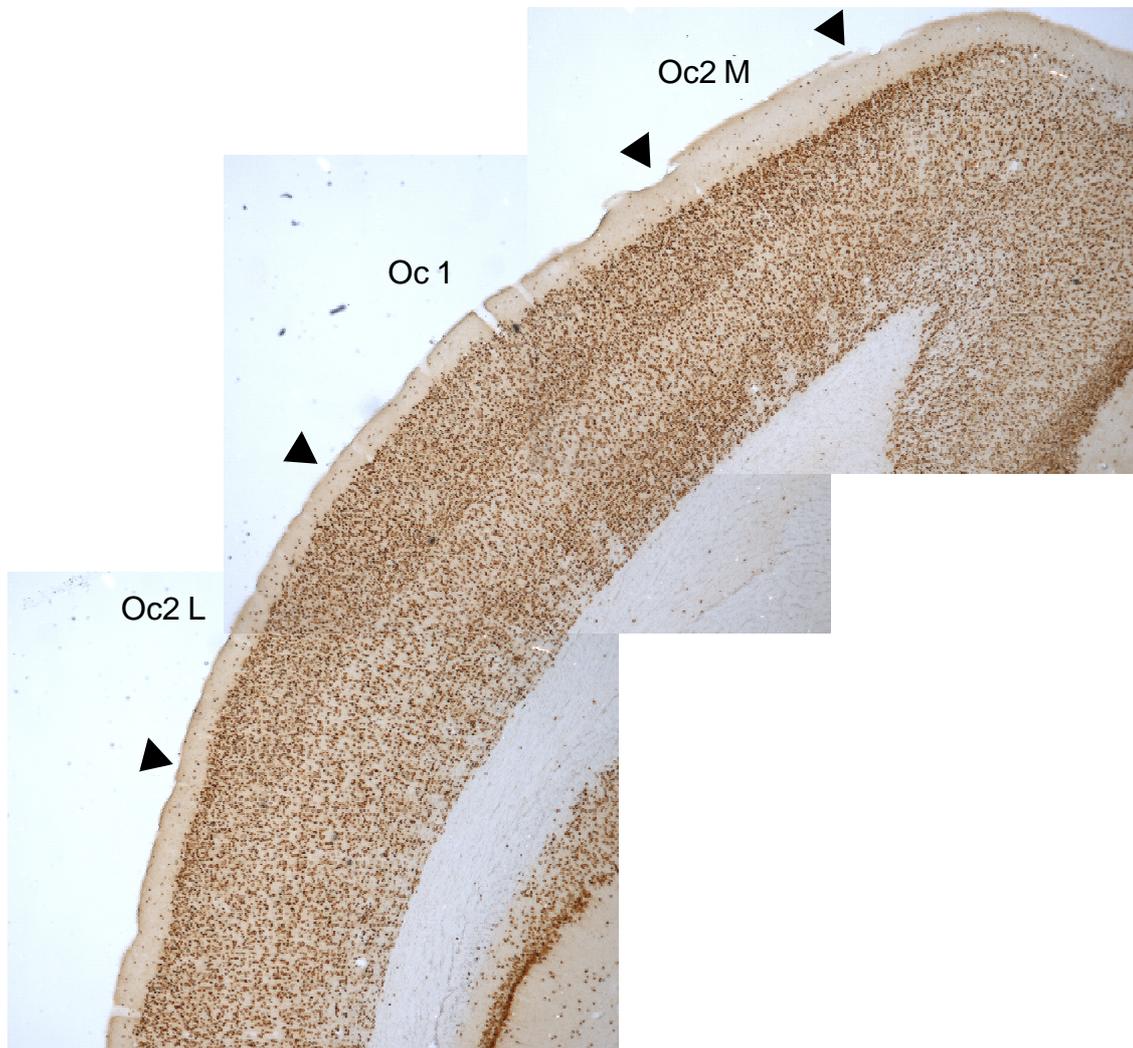
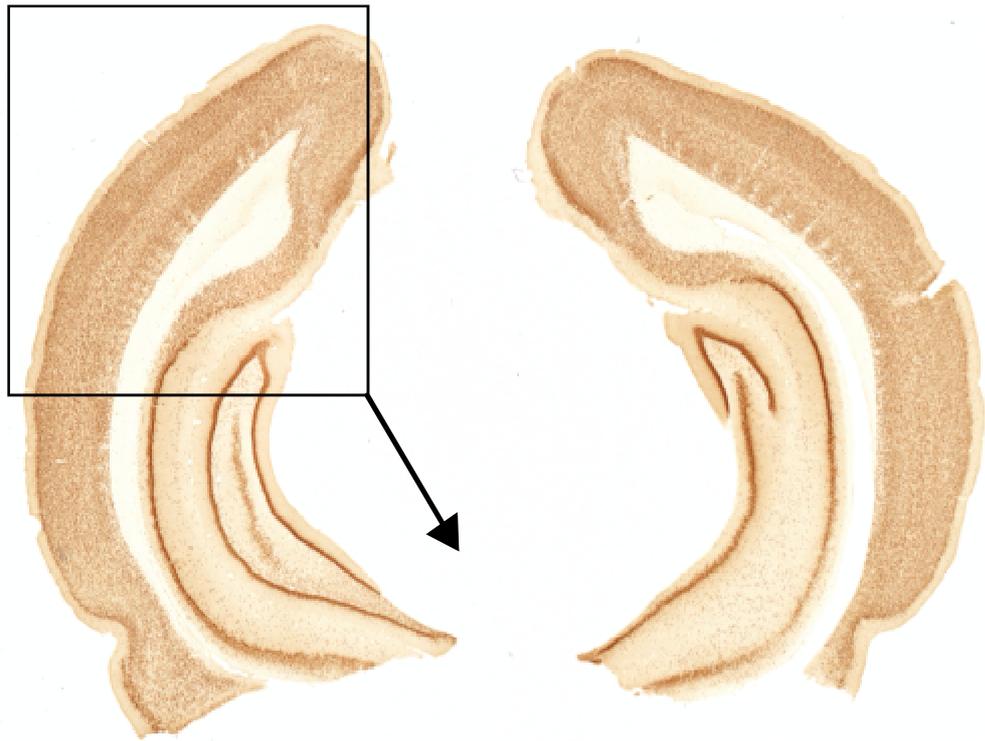
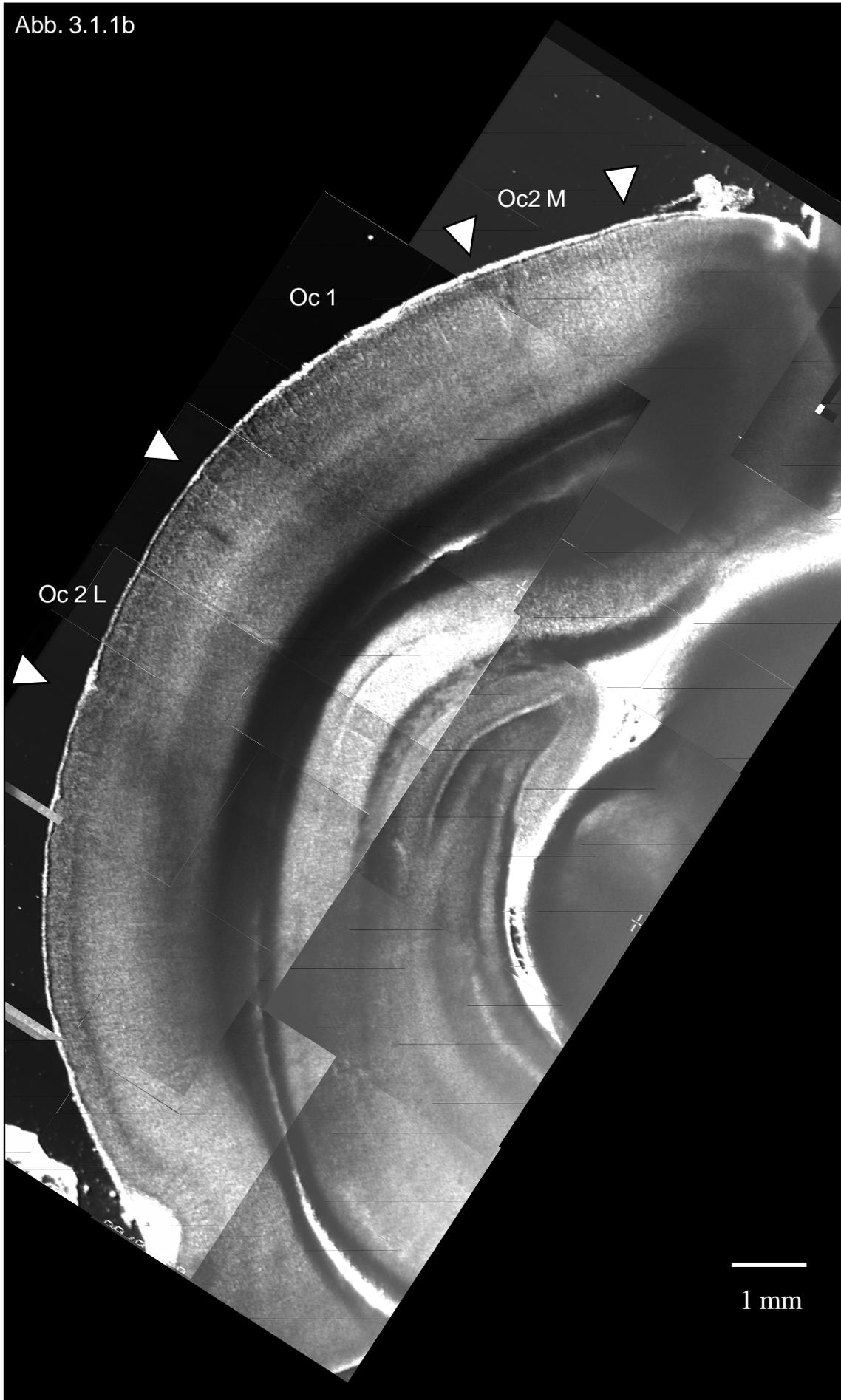


Abb. 3.1.1b



### 3.2 Varianz der intrinsischen optischen Signale

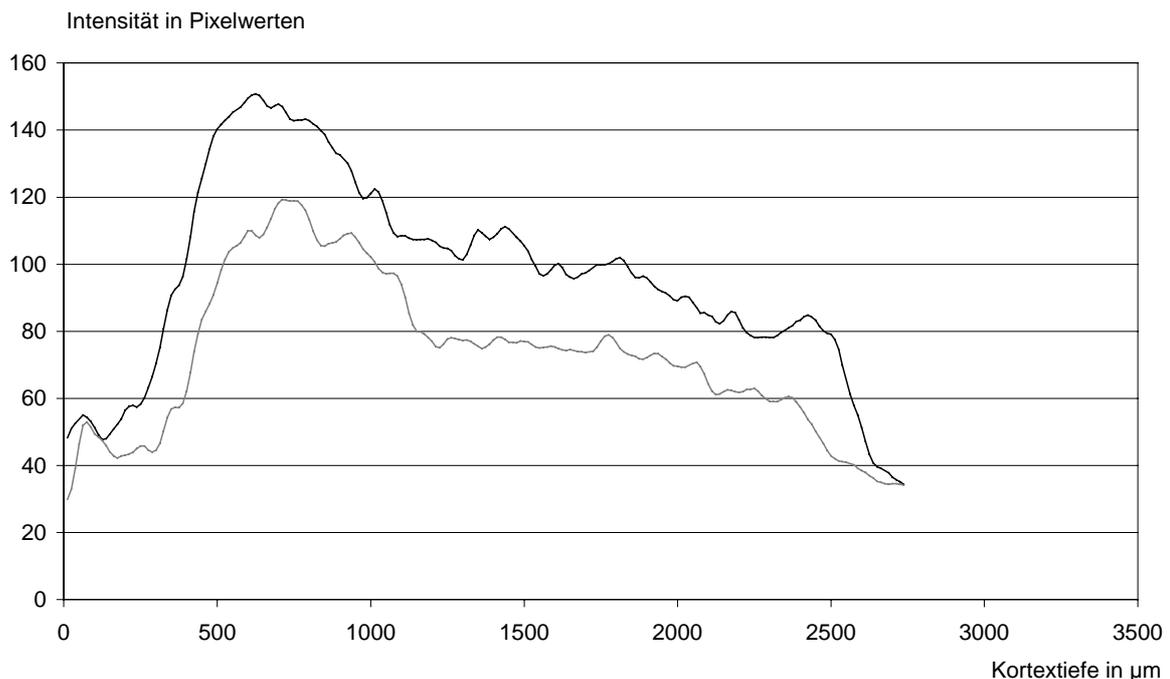
Die Intensitätsprofile der intrinsischen optischen Signale stellen Mittlungen der Signale eines kortikalen Areals dar. Dabei konnten die Signale auf Ebene der Signale innerhalb eines Areals, zwischen den Slices eines Tieres oder zwischen verschiedenen Tieren variieren. Um zu ergründen, auf welcher Ebene die Varianz am stärksten bzw. am geringsten ausgeprägt war, wurden Einzelprofile der intrinsischen Signale verschiedener Slices bzw. Tiere am Beispiel des Areals Oc1 miteinander verglichen. Abb. 3.2.1 zeigt Intensitätsprofile einzelner Signale des Areals Oc1 aus einem Tier.

Die dargestellten Signale unterschieden sich hierbei in der Signalintensität sowie in Intensitätsverteilung in verschiedenen kortikalen Schichten. Sowohl im selben Areal als auch innerhalb verschiedener Hirnschnitte existierte eine gewisse Varianz. Die Varianz der Signale zwischen verschiedenen Hirnschnitten war hierbei größer als die Varianz zwischen den Signalen eines Hirnschnittes. Das Maximum der Signale befand sich jedoch auch in verschiedenen Hirnschnitten innerhalb der gleichen kortikalen Schicht.

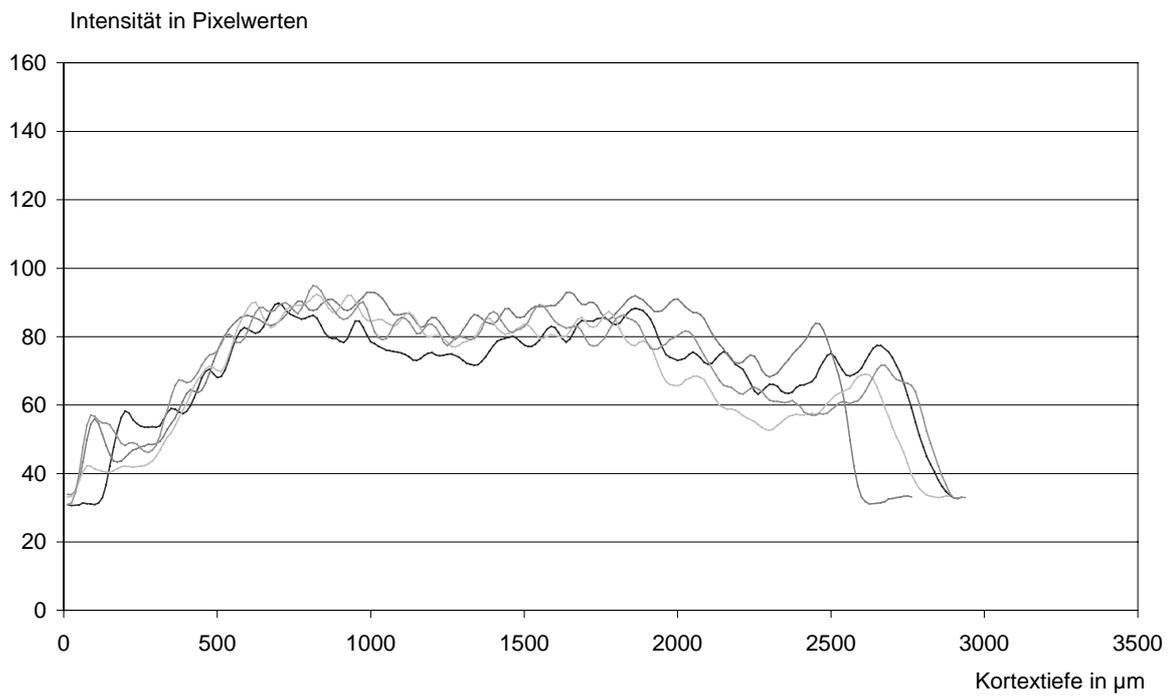
**Abb. 3.2.1 Variation intrinsischer optischer Signale in einem Hirnschnitt.**

Die Grafiken stellen beispielhaft die Intensitätsprofile der Signale aus dem Areal Oc1 dar, die in verschiedenen Hirnschnitten eines Tieres der Kontrollgruppe ausgelöst wurden. Pro Hirnschnitt wurden verschieden viele Signale ausgelöst, insgesamt wurden fünf Hirnschnitte untersucht.

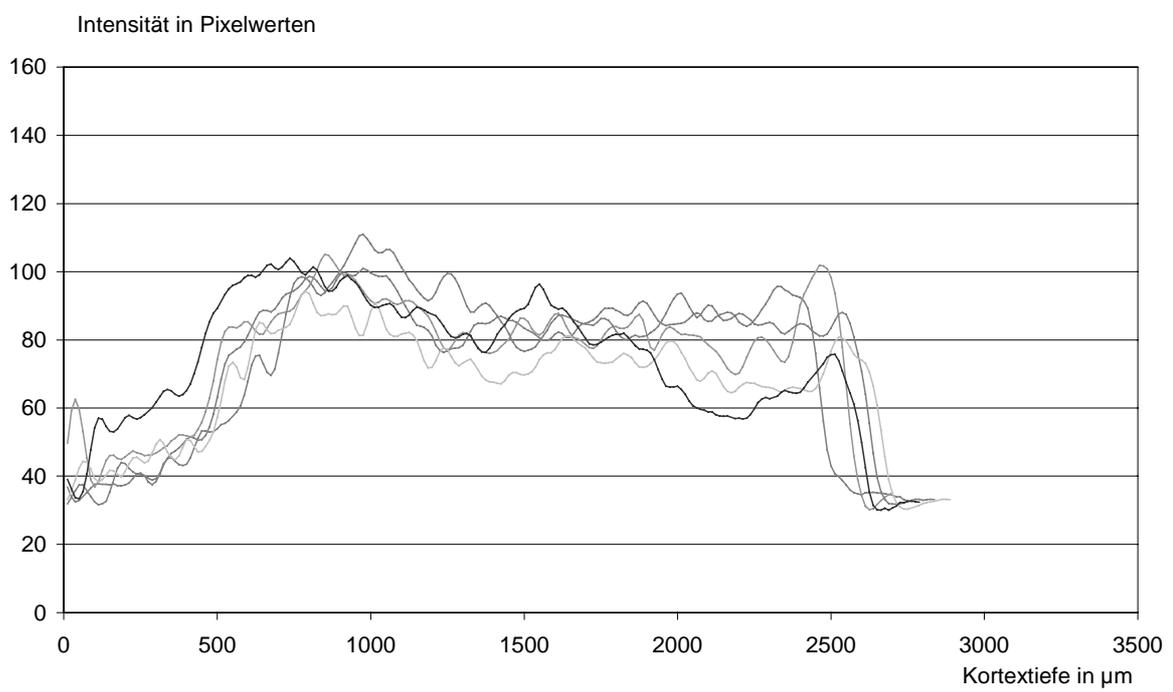
Slice 1



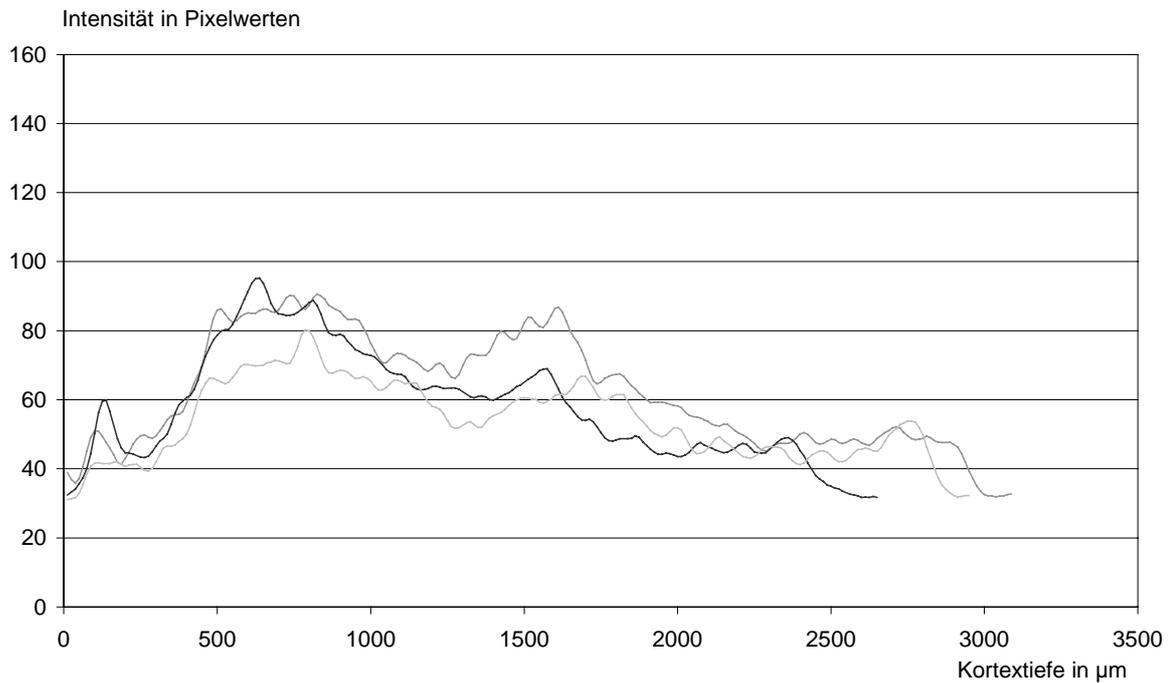
## Slice2



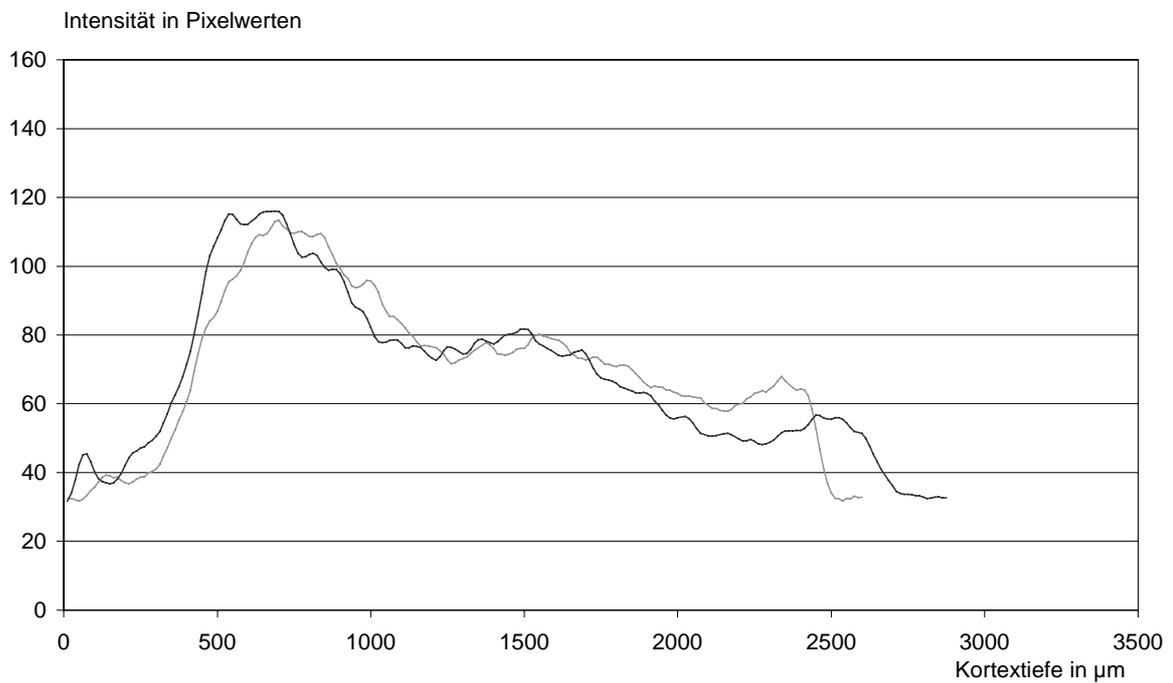
## Slice 3



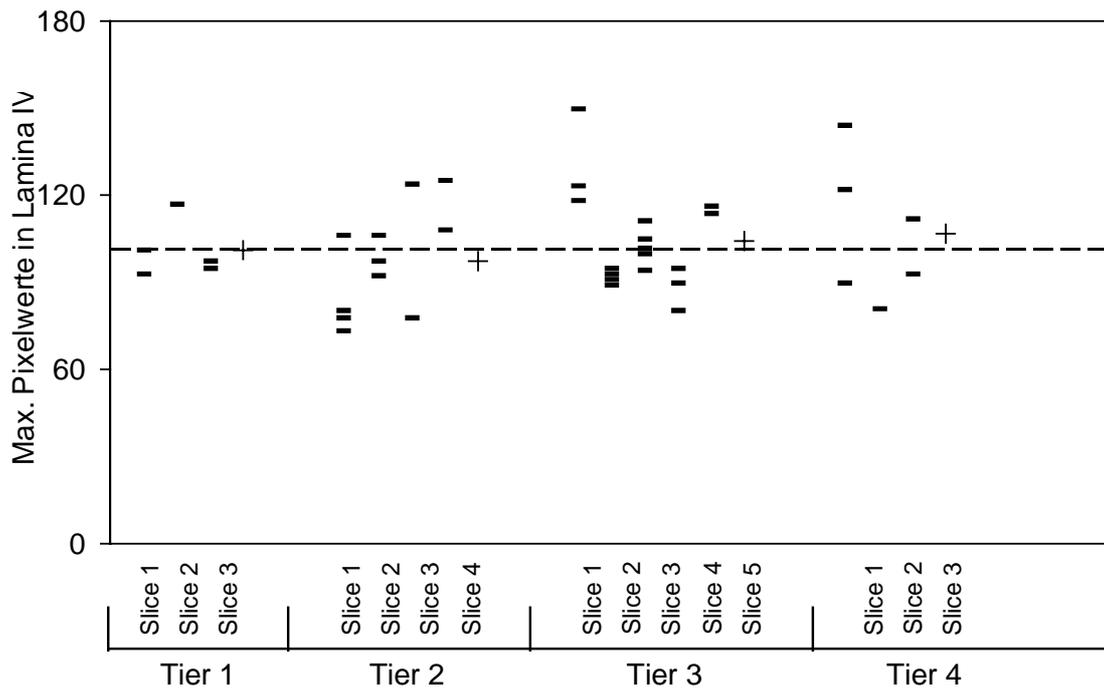
## Slice 4



## Slice 5



Dieses Phänomen war auch bei anderen Tieren der gleichen Gruppe zu beobachten. Abb. 3.2.2 zeigt eine Auftragung aller Signalmaxima im Areal Oc1 in der Lamina IV der Kontrollgruppe, aufgetragen nach den jeweiligen Hirnschnitten innerhalb der verschiedenen Tiere.



**Abb. 3.2.2 Varianz intrinsischer optischer Signale zwischen verschiedenen Tieren.**

Aufgetragen ist die maximale Intensität in Einzelsignalen des Areals Oc1 aller Tiere der Kontrollgruppe in der Lamina IV. In verschiedenen Tieren wurden unterschiedlich viele Slices, bzw. Signale ausgewertet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Mittelwert aller aufgetragenen Werte. Die Kreuze stellen den Mittelwert aller Signale des Areals Oc1 innerhalb eines Tieres dar.

Es wurde deutlich, daß die maximale Signalintensität in einem Areal weniger stark variierte als die mittlere Intensität verschiedener Hirnschnitte innerhalb eines Tieres. Dieses ließ sich gut an den Tieren mit hoher Signalanzahl (Tier 2, Tier 3) demonstrieren. Dennoch bewegte sich bei allen Tieren die gemittelte Maximalintensität pro Tier in einem sehr kleinen Bereich. Somit war die Varianz zwischen verschiedenen Tieren bezüglich der Maximalintensität innerhalb eines Areals sehr gering.

### **3.3 Charakterisierung der intrinsischen optischen Signale der Kontrollgruppe**

Die Tiere der Kontrollgruppe waren einheitlich 9 Wochen alt.

In allen untersuchten Arealen des visuellen Kortex der Ratte konnten intrinsische optische Signale ausgelöst werden. Die Signale hatten dabei eine kolumnenförmige Gestalt und erstreckten sich von der Lamina VI bis zur Lamina II des Kortex. In Lamina I des Kortex war kein Signal meßbar. Die Kontrollgruppe bestand aus vier Tieren (10 Halbslices).

#### **Oc2M**

Im sekundär visuellen Areal Oc2M der Kontrollgruppe (n = 1, 3 Halbslices; 4 Signale) konnte die höchste Intensität der drei untersuchten visuellen Areale gemessen werden. Das Intensitätsprofil der Signale ergab einen 2-gipfligen Kurvenverlauf mit einem ersten Maximum in Schicht IV (104 Pixelwerte bei ca. 1000  $\mu\text{m}$ ) sowie einem zweiten, in allen Signalen größeren Maximum (109 Pixelwerte) in Schicht V (Abb. 3.3.1). Der erst in tieferen Schichten des Kortex ansteigende Intensitätsverlauf ist auf eine stark ausgeprägte Lamina I im Areal Oc2M zurückzuführen, in dem kein Signal meßbar war (siehe Abb. 3.1.1.).

#### **Oc1**

In Oc1 (Abb. 3.3.1.) wurden in der Kontrollgruppe Signale in Hirnschnitten von vier Tieren (n = 4, 15 Halbslices, 43 Signale) ausgewertet. Das Intensitätsmaximum lag in Lamina IV des Kortex ( $95 \pm 3$  Pixelwerte) mit einem zweiten schwachen Plateau mit geringerer Intensität in Schicht V ( $83 \pm 3$  Pixelwerte). Zwischen den Intensitätsmaxima des gemittelten Intensitätsprofils in Lamina IV und V des Areals Oc1 besteht ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

#### **Oc2L**

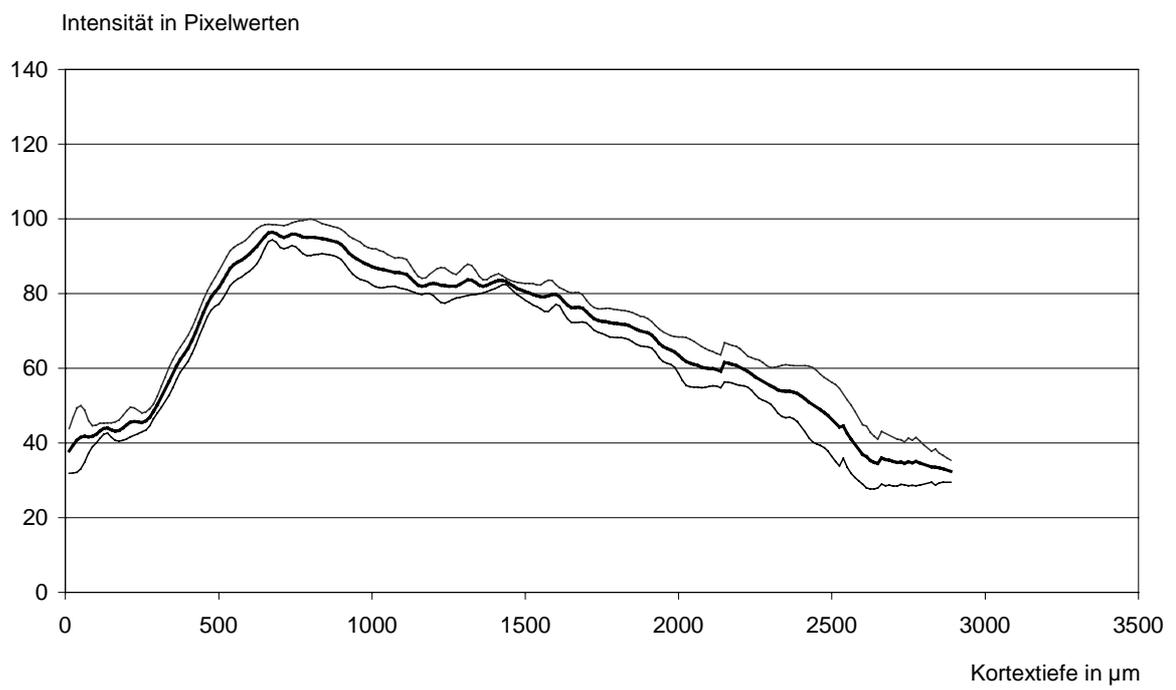
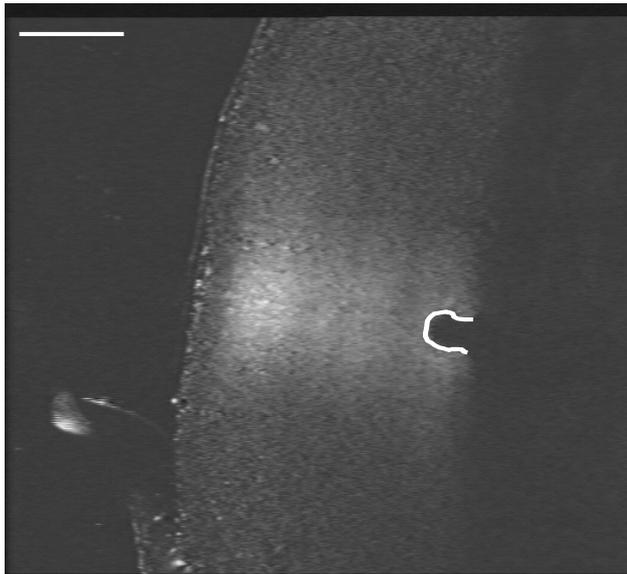
Ebenfalls von vier Tieren wurden die Daten für das Areal Oc2L gewonnen (n = 4, 11 Halbslices, 30 Signale). Das sekundäre visuelle Areal Oc2L weist in seinem Intensitätsprofil zwei Intensitätsmaxima auf (Abb. 3.3.1) Das Intensitätsprofil gleicht in Intensität und Kurvenverlauf dem primären visuellen Areal Oc1. Es besitzt neben dem Maximum in Lamina IV ( $96 \pm 14$  Pixelwerte)

ein weiteres Maximum leicht geringerer Intensität in Lamina V ( $90 \pm 10$  Pixelwerte). Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen diesen beiden Maxima jedoch nicht gefunden werden ( $p > 0,05$ )

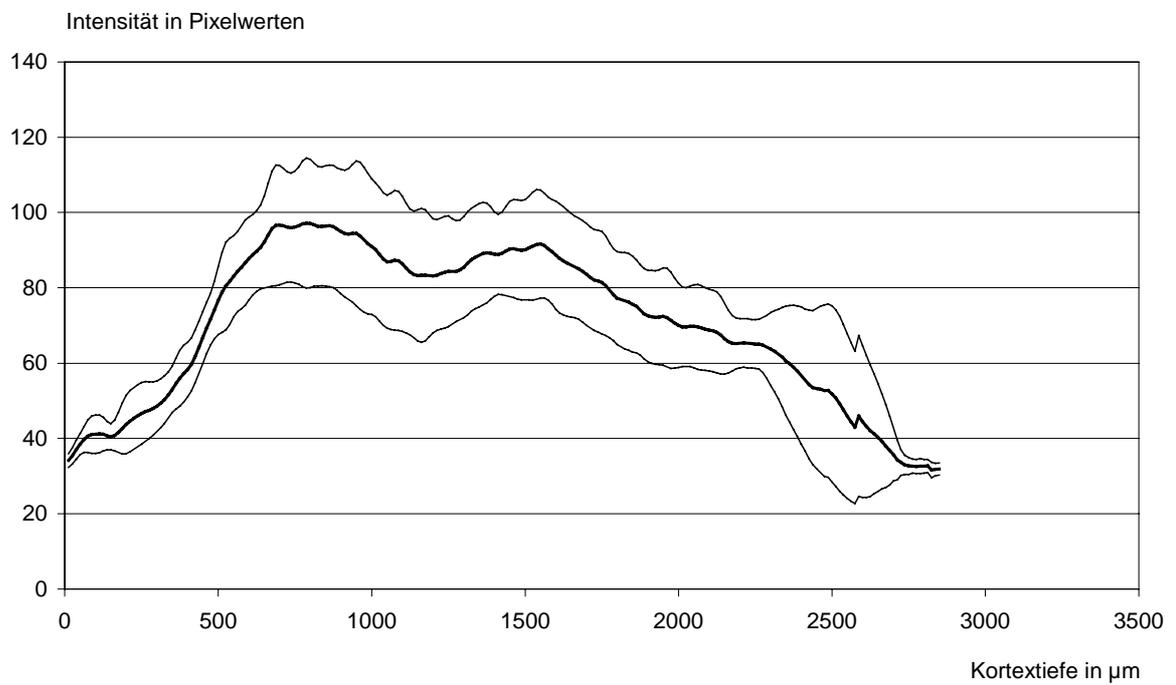
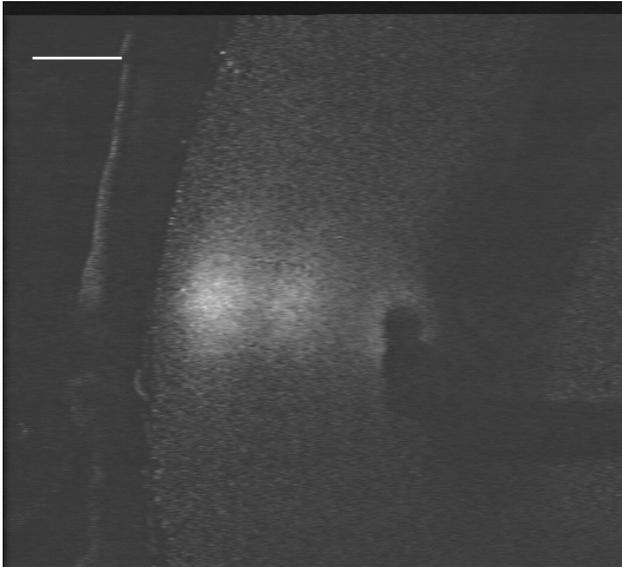
**Abb. 3.3.1 Intrinsische optische Signale der Areale des visuellen Kortex und ihre Intensitätsprofile.**

Dargestellt sind typische, reizinduzierte intrinsische optische Signale des jeweiligen Areals mit charakteristischer Verteilung der Signalintensität. In Lamina VI des Kortex ist die Reizelektrode erkennbar (schwarz, in Oc1 weiß umfahren). Das Signal erstreckt sich von Lamina IV bis zur Lamina II, in Lamina I ist kein Signal meßbar. Die Grafiken stellen Mittelungen der Intensitätsprofile der Signale in den jeweiligen Arealen dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach ca. 4 Sekunden aufgezeichnet. Der weiße Balken entspricht 1000  $\mu\text{m}$ .

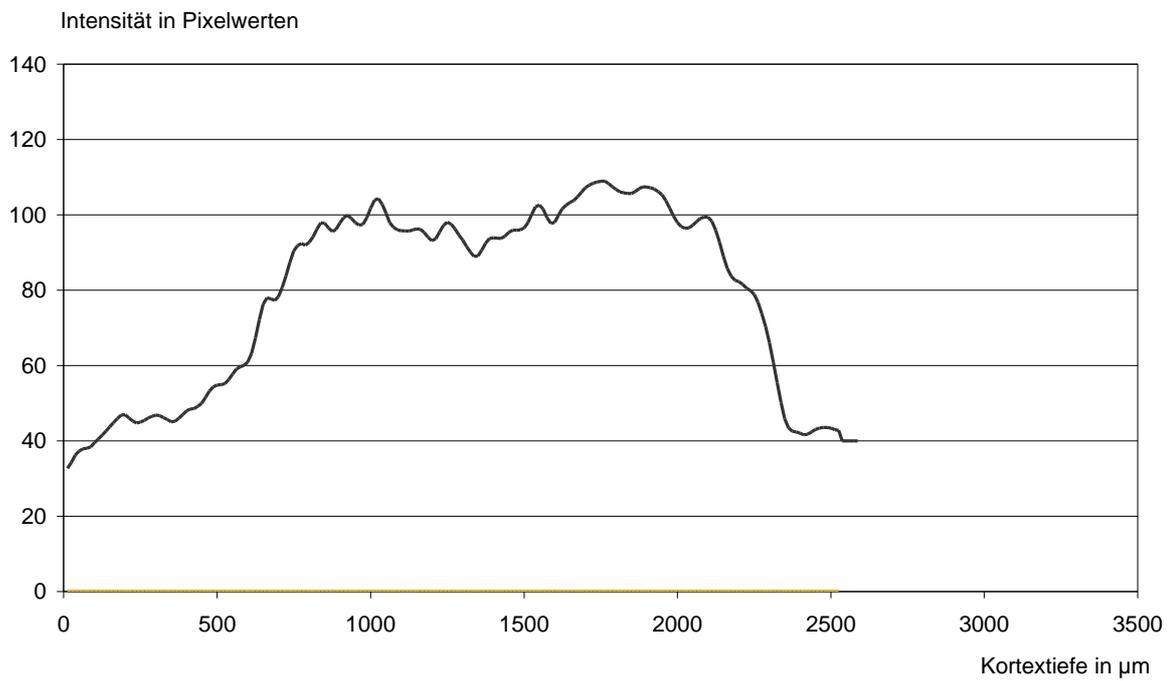
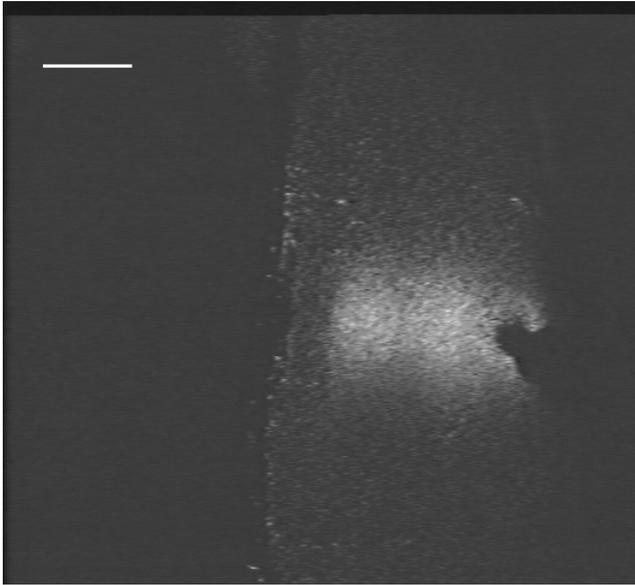
# Oc1



## Oc2L

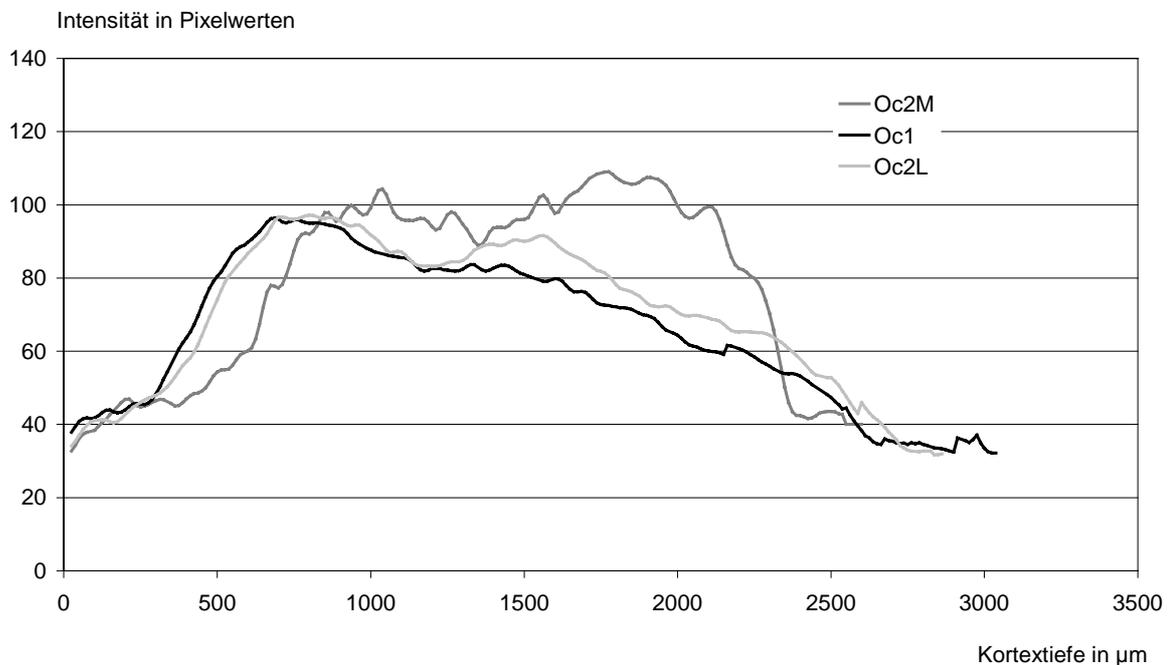


## Oc2M



### Vergleich der Areale in der Kontrollgruppe

Abb. 3.3.2 stellt vergleichend die Intensitätsprofile der intrinsischen optischen Signale der drei visuellen Areale innerhalb der Kontrollgruppe dar. Die höchsten Intensitäten treten im sekundär visuellen Areal Oc2M in der Lamina V auf. Die Areale Oc1 und Oc2L weisen sehr ähnliche Verläufe der Intensitätsprofile sowie ähnlich hohe Intensitäten auf. In beiden Arealen ist ein Intensitätsmaximum im Übergang der Lamina III zur Lamina IV zu verzeichnen. Der in den gemittelten Intensitätsprofilen gefundene geringe Unterschied zwischen den Arealen Oc1 und Oc2L stellt sich hier als nicht signifikant heraus.



**Abb. 3.3.2: Vergleich der Intensitätsprofile intrinsischer optischer Signale in der Kontrollgruppe**

Dargestellt sind vergleichend die gemittelten Intensitätsprofile intrinsischer optischer Signale der drei untersuchten visuellen Areale Oc1, Oc2M, Oc2L.

### **3.4 Intrinsische optische Signale nach Sham-Operation**

Eine Woche (n = 3, 9 Halbslices) bzw. zwei Wochen (n = 3, 7 Halbslices) nach Sham-Operation wurden die Tiere dieser Gruppe dem Experiment zugeführt. Diese Tiere wurden dem üblichen Operationsverfahren zur Erzeugung kortikaler Läsionen unterzogen, mit dem entscheidenden Unterschied, daß bei ausgeschaltetem Licht keine Läsion erzeugt wurde. Alle Tiere wurden im Alter von 9 Wochen operiert. Das Alter zum Zeitpunkt des Experimentes beträgt in der Gruppe der sham-operierten Tiere somit 10 bzw. 11 Wochen.

#### **3.4.1 Vergleich von ipsilateraler und kontralateraler Seite**

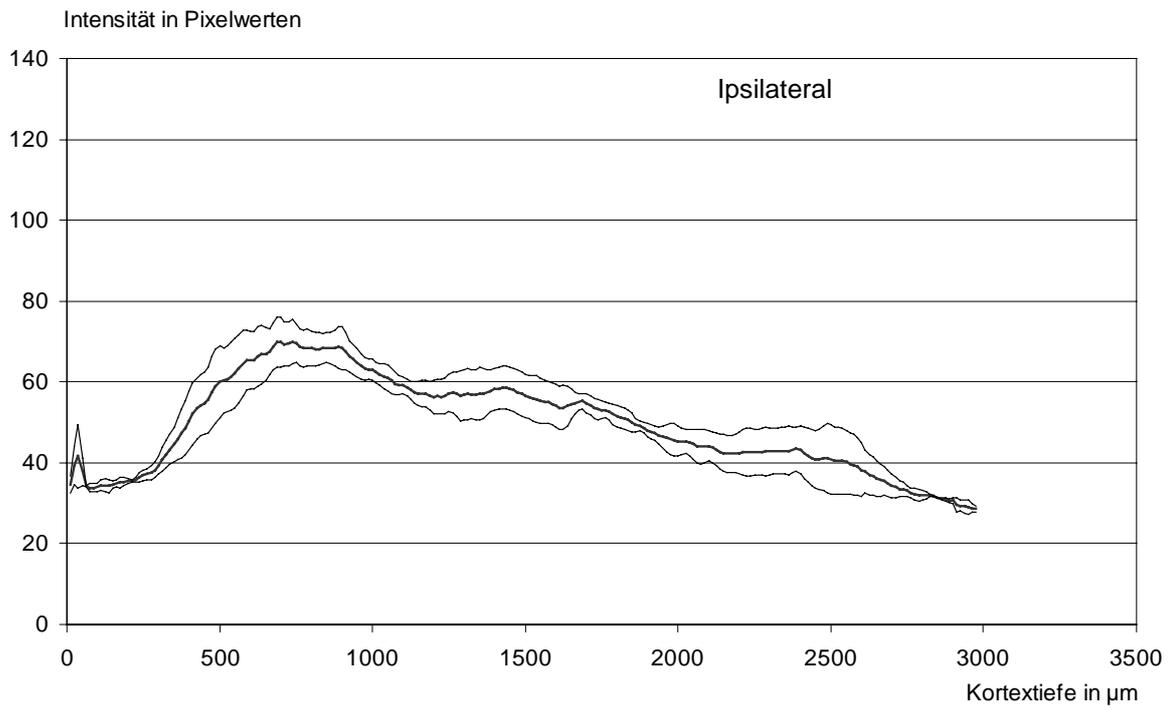
Bei der Sham-Operation wurde wie auch bei der tatsächlichen Induktion der photothrombotischen Läsion der Lichtleiter auf der rechten Kalottenhälfte aufgesetzt, das Licht jedoch nicht eingeschaltet. Die Tiere wurden weiterhin wie Läsionstiere behandelt und im Verlauf eine bzw. zwei Wochen nach Operation dem Experiment zugeführt. Die Intensitätsprofile der Signale ipsilateral und kontralateral zur sham-operierten Seite wurden zuerst getrennt ausgewertet und auf eventuelle Unterschiede verglichen. Am Beispiel des Areals Oc1 (Abb. 3.4.1.1) wird deutlich, daß der Verlauf sowie die Intensität der ipsilateralen und kontralateralen Intensitätsprofile in der Gruppe der sham-operierten Tiere nicht signifikant unterschiedlich war. Beide Seiten konnten daher nach vorangehender Mittelung der Intensitätsprofile über die einzelnen Tiere zusammengefaßt werden.

##### **Abb. 3.4.1.1 Vergleich der Intensitätsprofile sham-operierter Tiere auf ipsi- und kontralateraler Seite am Beispiel des Areals Oc1**

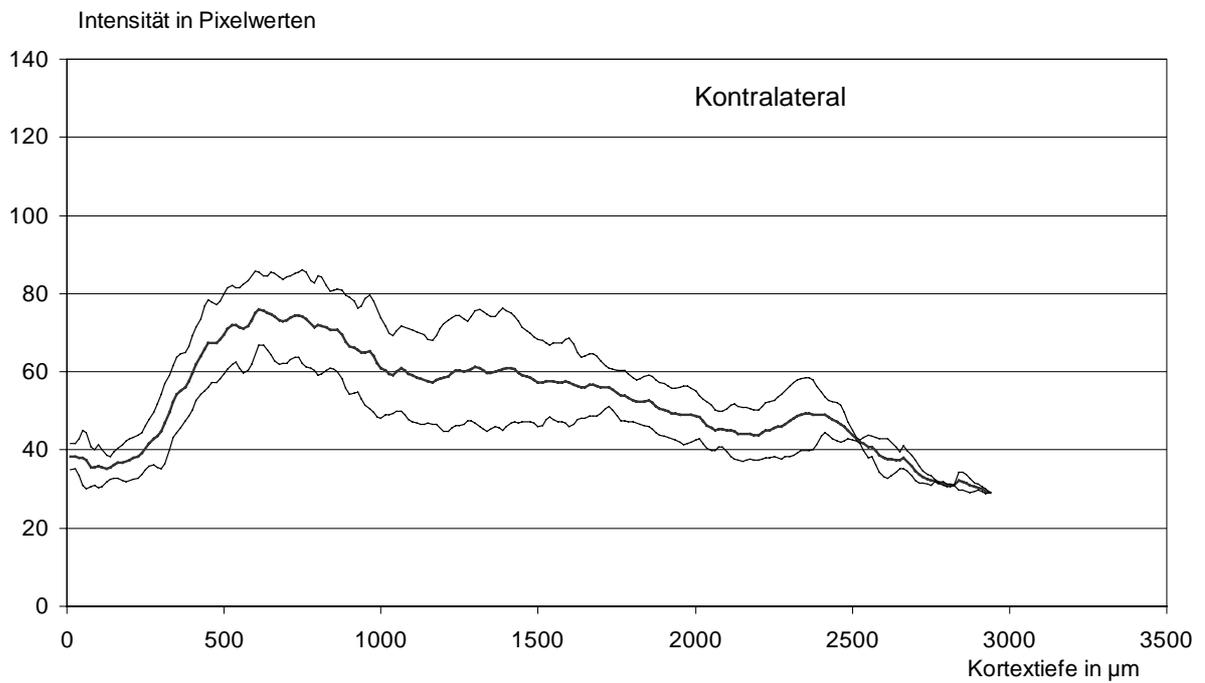
Dargestellt sind die Intensitätsprofile intrinsischer optischer Signale des Areals Oc1 eine Woche nach Sham-Operation jeweils als Mittelwert plus bzw. minus Standardabweichung. A) stellt die gemittelten Intensitätsprofile (3 Tiere, 3 Halbslices, 25 Signale) auf ipsilateraler Seite, B) die der kontralateralen Seite (2 Tiere 3 Halbslices, 19 Signale) dar.

Abb. 3.4.1.1

A)



B)



### **3.4.2 Sham-operierte Tiere nach 1 Woche (1S)**

Die Intensitätsprofile der untersuchten Areale glichen in Form und Lage der Intensitätsmaxima den Signalen der Kontrollgruppe. In Oc2M wurden die höchsten Intensitäten gemessen. Die Intensitätsprofile der Areale Oc1 und Oc2L waren im Verlauf sehr ähnlich.

#### **Oc2M**

Im Areal Oc2M wurden (Abb.3.4.2.1) die Signale von 3 Tieren (9 Halbslices, 19 Signale) ausgewertet. Die höchste Intensität der Signale konnte in tieferen Bereichen der Lamina V ( $90 \pm 7$  Pixelwerte) des Kortex registriert werden. Ein etwas geringeres Maximum lag in Lamina IV des Kortex ( $79 \pm 7$  Pixelwerte).

#### **Oc1**

Im Areal Oc1 wurden Signale von 3 Tieren (7 Halbslices, 44 Signale) untersucht. (Abb. 3.4.2.1). Im Mittel ergab sich ein Maximum von  $70 \pm 6$  Pixelwerten in Lamina IV.

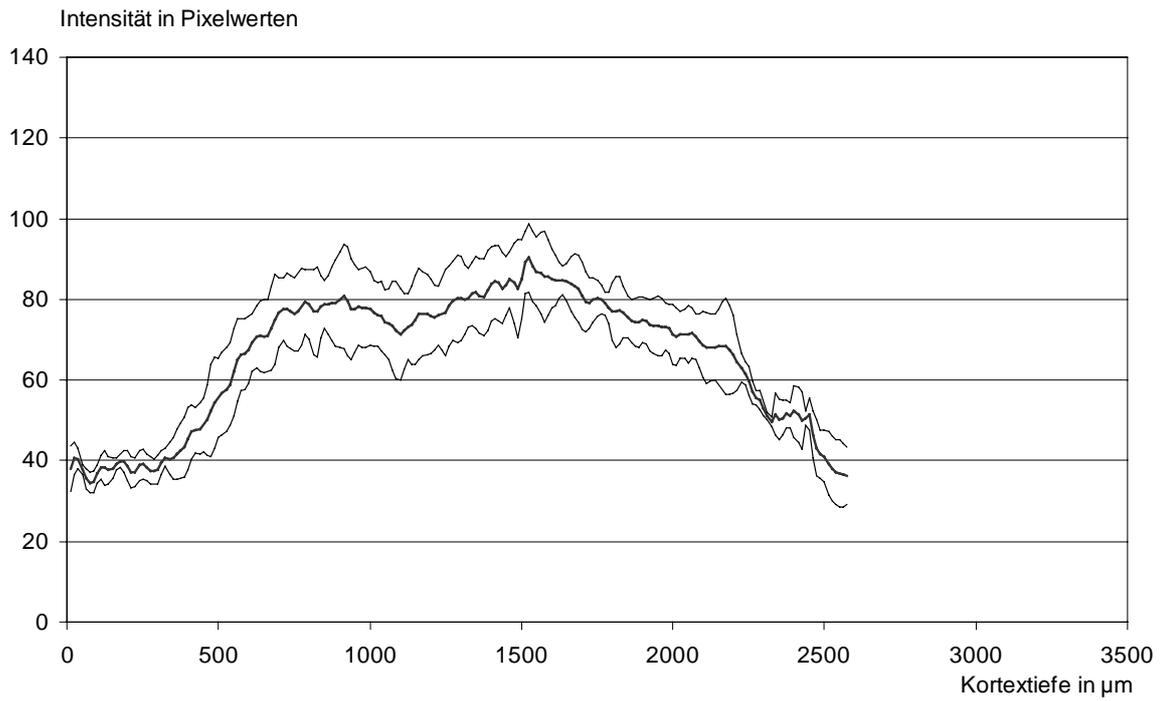
#### **Oc2L**

Das gemittelte Intensitätsprofil der Signale aus Oc2L ( $n = 3$ , 8 Halbslices, 29 Signale) glich in Intensität und Form dem des Areals Oc1 (Abb. 3.4.2.1). Das Maximum befand sich hier ebenfalls in Lamina IV mit  $65 \pm 10$  Pixelwerten. Gleich hohe Intensitäten lagen in Lamina V vor ( $65 \pm 8$  Pixelwerte).

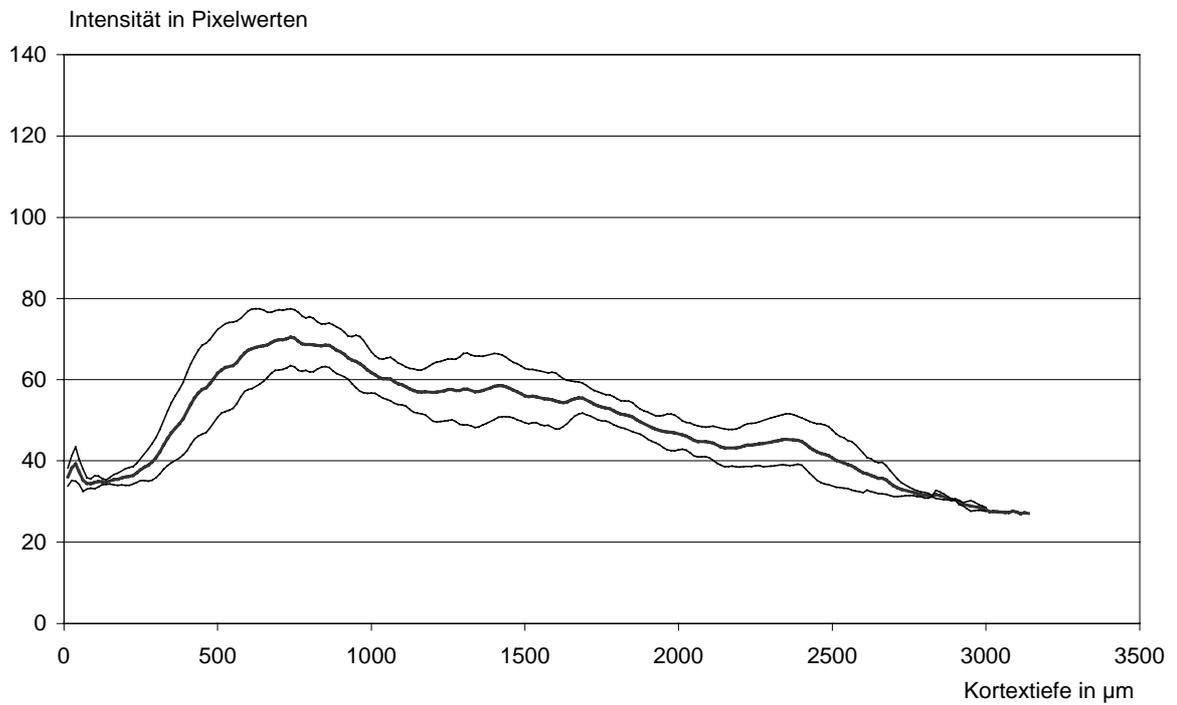
#### **Abb. 3.4.2.1**

Intrinsische optische Signale der Areale des visuellen Kortex und ihre Intensitätsprofile bei sham-operierten Tieren nach einer Woche. Die Grafiken stellen Mittelungen der Intensitätsprofile der Signale in den jeweiligen Arealen dar (Mittelwert, fett mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach 4 Sekunden aufgezeichnet.

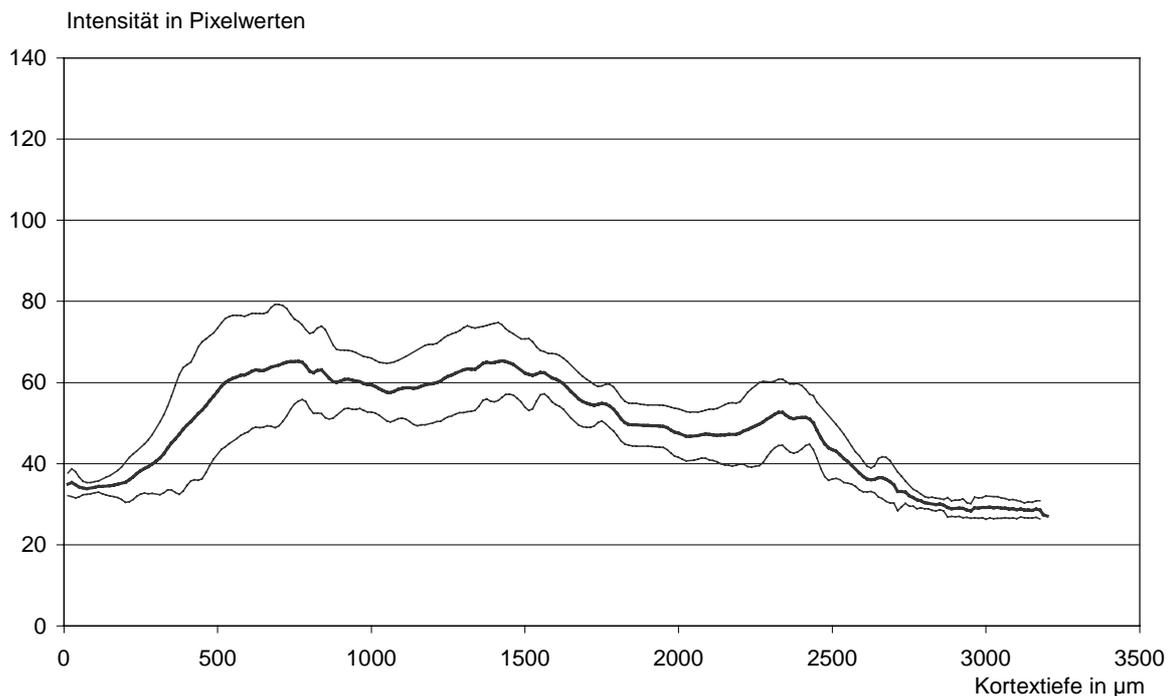
## Oc2M



## Oc1



## Oc2L



### 3.4.3 Sham-operierte Tiere nach 2 Wochen (2S)

Die Tiere dieser Gruppe wurden 2 Wochen nach Sham-Operation untersucht (3 Tiere, 7 Halbslices). Es ergaben sich gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikanten Änderungen bezüglich der Signalform und der Lage des Intensitätsmaximums. Die höchsten Intensitäten konnten in Oc2M gemessen werden, jedoch waren die Signalintensitäten in allen Arealen dieser Gruppe verglichen mit der Gruppe sham-operierter Tiere nach 1 Woche verringert.

#### Oc2M

In Oc2M konnten in 3 Tieren 25 Signale aus 7 Halbslices ausgewertet werden. Das Maximum der Intensität befand sich in Lamina V ( $71 \pm 2$  Pixelwerte), ein geringeres Maximum konnte in Lamina IV ( $62 \pm 3$  Pixelwerte) gemessen werden (Abb. 3.4.3.1).

#### Oc1

Das Maximum der in Oc1 (Abb. 3.4.3.1) gemessenen Signale befand sich auch in dieser Gruppe ( $n = 3$ , 6 Halbslices, 27 Signale) in der Lamina IV des Kortex, jedoch bei vergleichsweise geringer Intensität ( $55 \pm 3$  Pixelwerte).

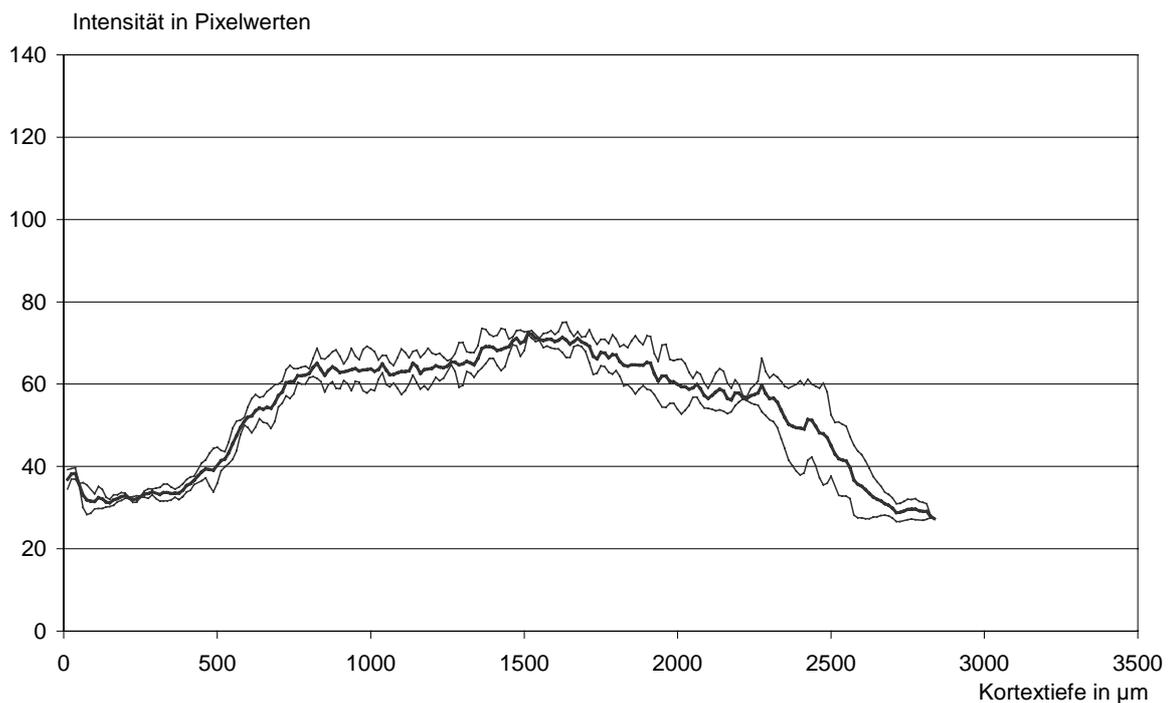
## Oc2L

Die Intensitätsprofile der Signale aus Oc2L (n = 3, 6 Halbslices, 23 Signale) glichen im Verlauf weitgehend denen des benachbarten primär sensorischen Areals Oc1. In Oc2L war mit dem Auftreten des Maximums in Lamina IV ( $57 \pm 3$  Pixelwerte) eine geringfügig höhere Signalintensität meßbar als in Lamina V ( $54 \pm 3$  Pixelwerte, Abb. 3.4.3.1).

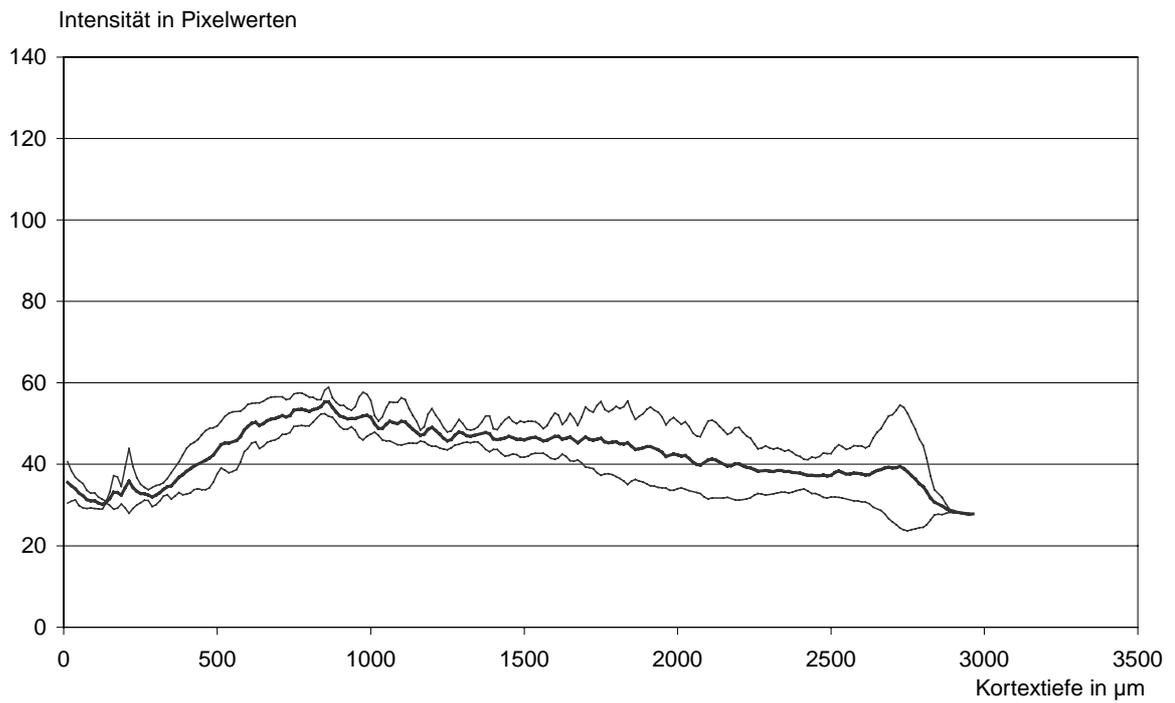
### Abb. 3.4.3.1 Intensitätsprofile bei sham-operierten Tieren nach zwei Wochen.

Die Grafiken stellen Mittelungen der Intensitätsprofile der Signale in den jeweiligen Arealen bei sham-operierten Tieren nach 2 Wochen dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach 4 Sekunden aufgezeichnet.

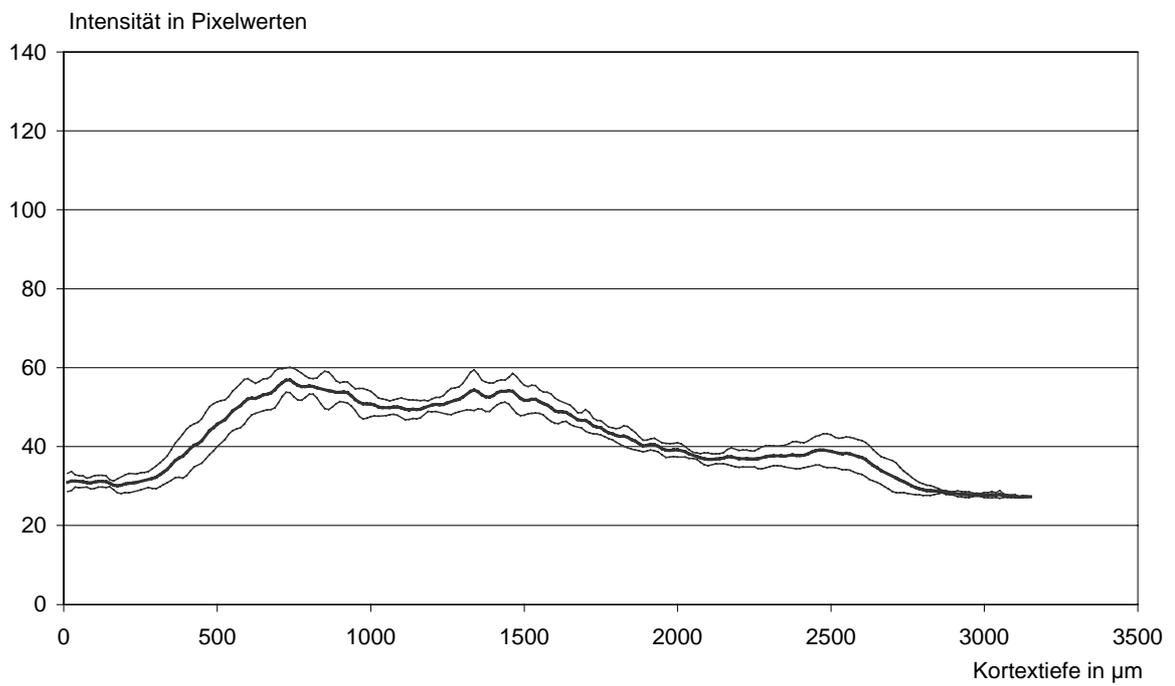
## Oc2M



## Oc1



## Oc2L

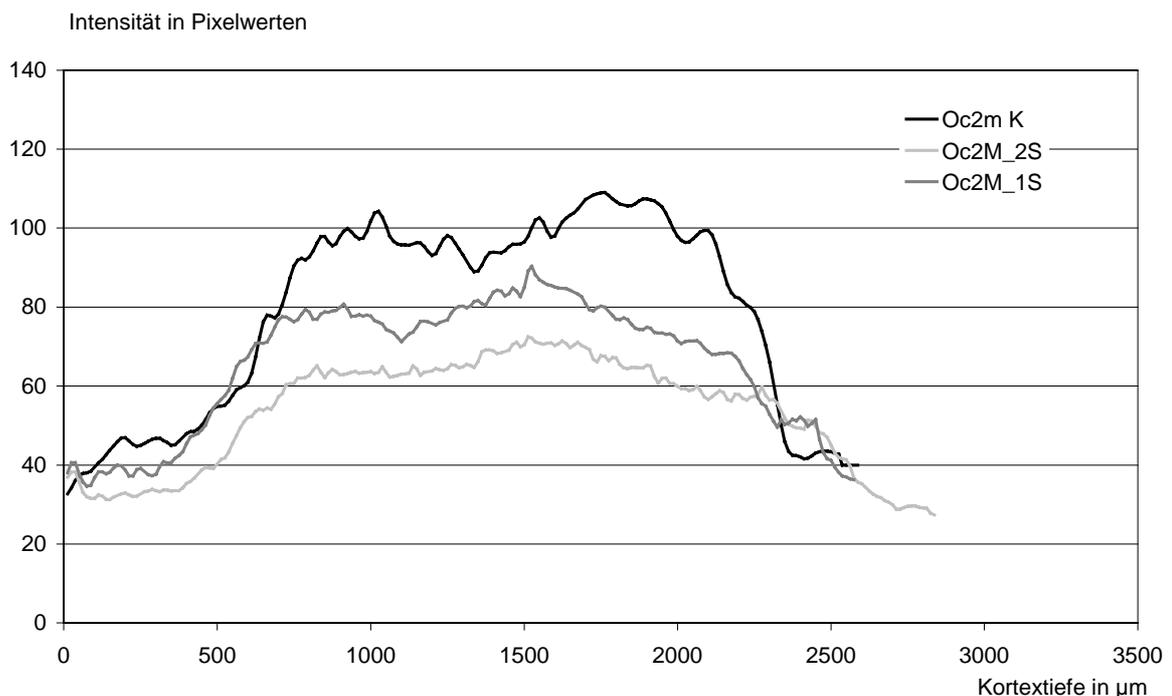


### 3.4.4 Vergleich intrinsischer optischer Signale von Kontrolltieren mit sham-operierten Tieren eine und zwei Wochen nach Operation

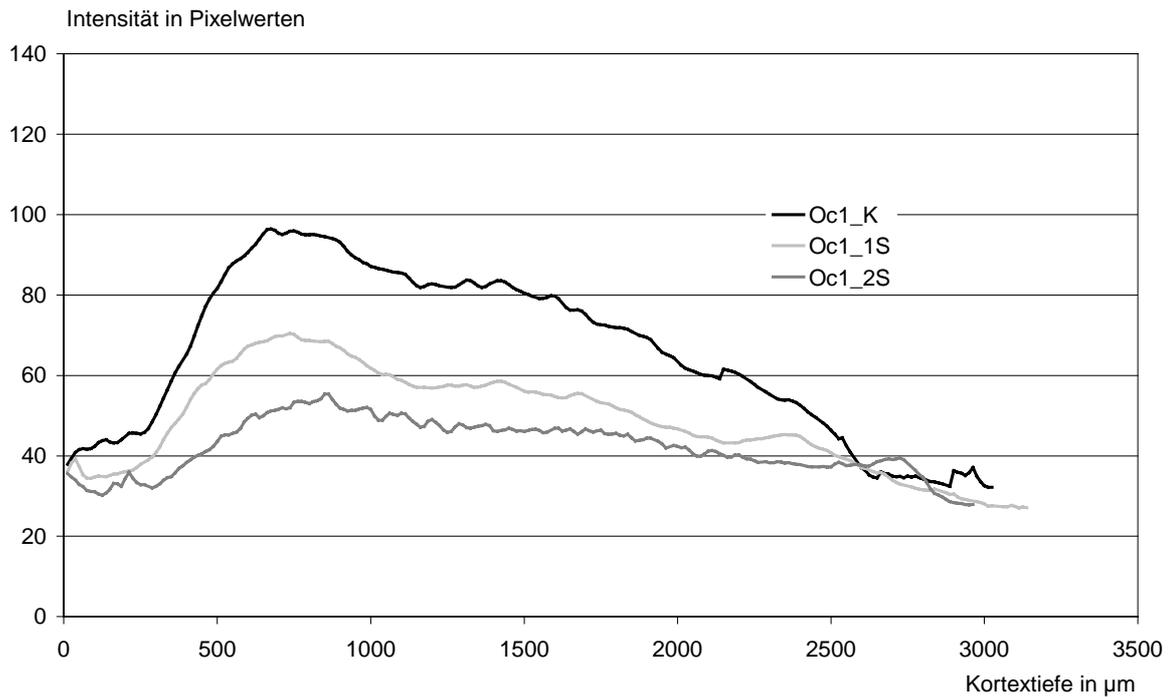
Bei Betrachtung der Intensitätsprofile der Signale aus den sham-operierten Tieren (Abb. 3.4.3.1) wird deutlich, daß die Intensitäten der Signale in den verschiedenen Arealen im Vergleich zu den Kontrolltieren abnehmen. Dieser Effekt ist bei erster Betrachtung nicht anzunehmen, da den sham-operierten Tieren durch die Operation keine kortikale Läsion zugefügt wird. Es wurde daher untersucht, ob bei den sham-operierten Tieren außer der Intensitätsverminderung der intrinsischen optischen Signalen weitere Veränderungen beobachtet werden konnten. Abb. 3.4.4.1 zeigt die Auftragung der gemittelten Intensitätsprofile aus der Kontrollgruppe und der Gruppe der sham-operierten Tiere nach einer Woche bzw. nach zwei Wochen aus den jeweiligen Arealen. Es wird deutlich, daß sich mit zunehmenden Alter der sham-operierten Tiere die Signalintensität vermindert. Die Lage der Intensitätsmaxima in den verschiedenen kortikalen Laminae bleibt davon jedoch unberührt, d.h., es ergeben sich keine Verschiebungen der Signalmaxima innerhalb der kortikalen Laminae.

Abb. 3.4.4.1

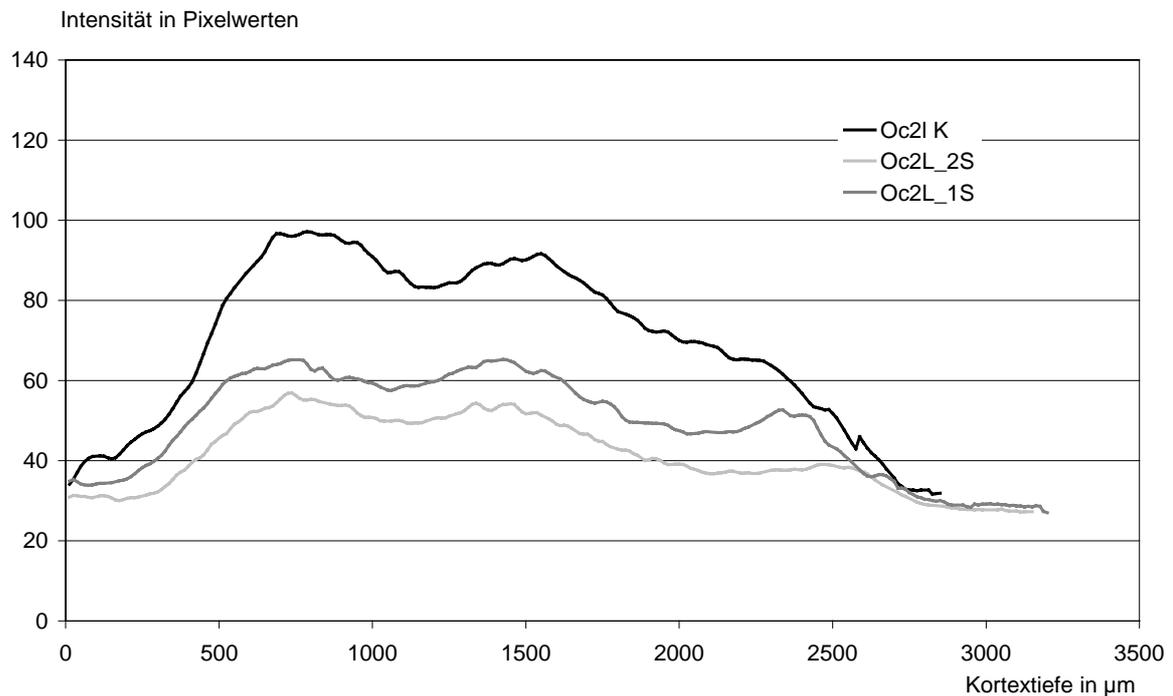
Oc2M



## Oc1



## Oc2L

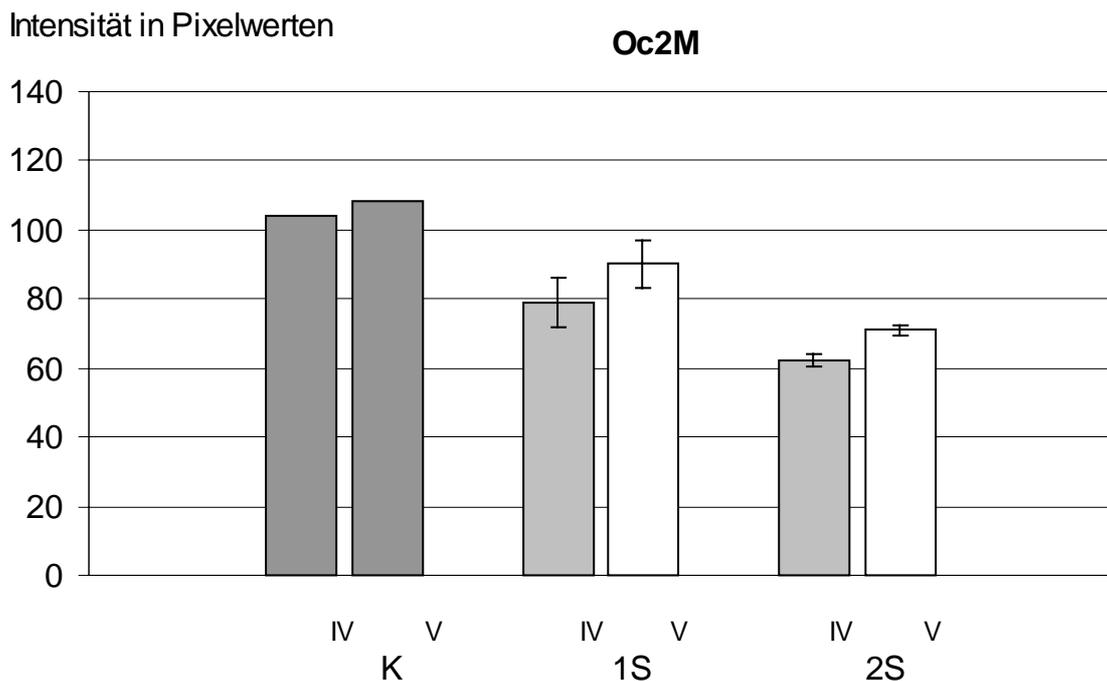


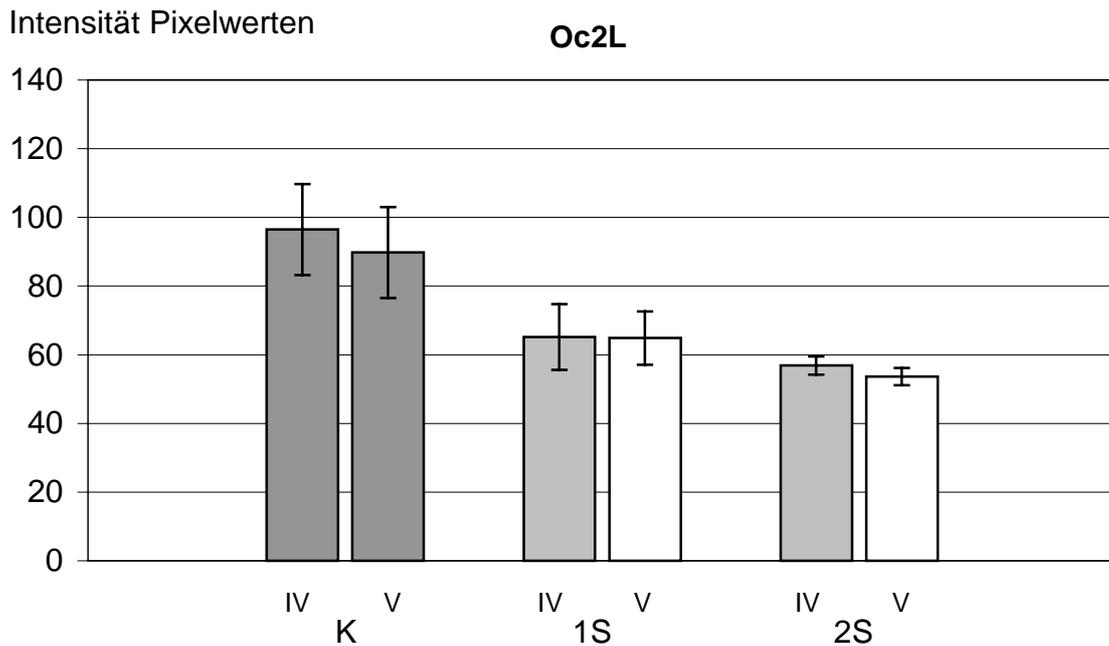
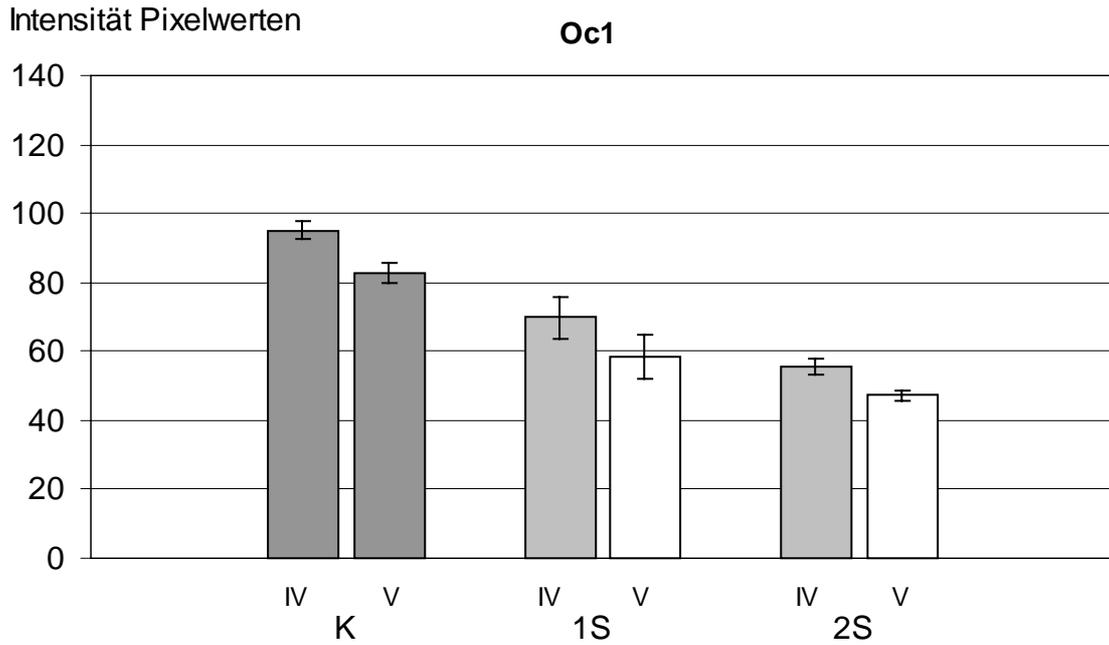
**Abb. 3.4.4.1 Vergleich der Intensitätsprofile intrinsischer optischer Signale zwischen Kontrollgruppe und sham-operierten Tieren nach einer bzw. zwei Wochen in den Arealen Oc2M, Oc1 und Oc2L**

Dargestellt sind jeweils die gemittelten Intensitätsprofile der Signale aus den verschiedenen Arealen. Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen des Maximums bei ca. 4 Sek. aufgezeichnet. K = Kontrollgruppe, 1S = eine Woche nach Sham-Operation, 2S = 2 Wochen nach Sham-Operation

Die Abnahme der Intensität in den Intensitätsmaxima in der Gruppe „Sham-1 Woche“ war in allen Arealen sowohl in Lamina IV als auch in Lamina V statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) war die Abnahme der Intensität der Gruppe Gruppe „Sham 2 Wochen“ im Vergleich zur Kontrolle. Die Abnahme der Maximalintensitäten von der Gruppe „Sham 1 Woche“ zur Gruppe „Sham 2 Wochen“ war nur im Areal Oc2M statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Es bleibt weiter zu betrachten, ob sich bei den Signalen der sham-operierten Tiere Veränderungen des Intensitätsverhältnisses innerhalb der kortikalen Schichten ergeben. Abb. 3.4.4.2 zeigt vergleichend die Auftragung der Intensitätsmaxima der gemittelten Intensitätsprofile aus den verschiedenen Laminae in den kortikalen Arealen Oc2M, Oc1 und Oc2L.





**Abb. 3.4.4.2 Vergleich der Intensitätsmaxima intrinsischer optischer Signale in kortikalen Schichten IV und V von Kontroll- und sham-operierten Tieren in visuellen Arealen**

Dargestellt sind die Intensitätsmaxima in den Schichten IV sowie V intrinsischer optischer Signale in Pixelwerten. Die Werte entstammen den gemittelten Intensitätsprofilen der jeweiligen Areale, die schwarzen Balken kennzeichnen die Standardabweichung der Signalintensitäten im Intensitätsmaximum. IV, V = Lamina IV, V; 1S, 2S = Gruppe der sham-operierten Tiere nach einer, bzw. zwei Wochen

Die Abb. 3.4.4.2 zeigt, daß sich am laminären Verteilungsmuster der Signalintensität intrinsischer optischer Signale durch die Sham-Operation keine Veränderungen ergaben. Jedoch wird deutlich, daß sich mit zunehmendem Alter der Tiere im Experiment eine Verminderung der Signalintensität beobachten ließ.

## 3.5 Intrinsische optische Signale in Läsionstieren

### 3.5.1 Ergebnisse der Photothromboseoperation

#### Größe und Position der Läsion

In diese Versuchsreihe gingen Tiere ein, die zuvor durch Photothrombose eine definierte Läsion am Grenzbereich des Areals Oc2M zum Areal RSA erhielten (siehe Abb. 2.3.2). Die Größe der Läsion schwankte in geringen Grenzen und lag im Bereich von ca. 2 mm. Durch die Läsion wurde ein Teil des Areals Oc2M sowie der Großteil des Areals RSA des limbischen Kortex infarziert. In die Versuche wurden lediglich die Slices aufgenommen, die eindeutig eine Läsion in den entsprechenden Arealen aufwiesen (Abb. 3.5.1.1). Dies war in Oc2M aufgrund der relativ geringen Ausbreitung des Areals problematisch. Bereits geringe eine Veränderung der Läsionsgröße oder der Läsionsposition konnten zu einer weitgehenden Infarzierung des Areals Oc2M führen. In der überwiegenden Anzahl der Experimente war nach Läsion im Areal Oc2M nicht genügend intaktes Gewebe zur Auslösung intrinsischer optischer Signale mehr vorhanden (Abb. 3.5.1.1). Während innerhalb der Gruppe der Tiere "2 Wochen nach Läsion" immerhin noch in 3 Slices aus 2 verschiedenen Tieren Signale innerhalb des teilweise infarzierten Areals Oc2M auszulösen waren, konnten in den Slices der Gruppe "1 Woche nach Läsion" keine verwertbaren Signale in diesem Areal mehr beobachtet werden (Abb. 3.5.1.1). In diesen Fällen war das infarzierte Gebiet innerhalb des Areals zu groß (>> 60%). Bei den Tieren der Gruppe „1L“ liegen somit auf der ipsilateralen Seite der Läsion für das Areal Oc2M keine Daten vor.

**Abb. 3.5.1.1a-b Hirnschnitt 1 Woche nach Läsion im Experiment.** **a.** Dargestellt ist ein Slice des visuellen Kortex eine Woche nach Photothrombose, kartiert mittels anatomischen Atlanten. Die Grenzen der Areale sind weiß markiert. Im apikalen Teil (im Bild unten) ist deutlich die nekrotische, durch Gewebeverlust gekennzeichnete Läsion zu erkennen. Das Areal Oc2M an der Grenze zum limbischen Kortex ist hier praktisch komplett zerstört. **b.** Beispielhaft sind 5 Signale in angrenzenden Arealen (hier Oc1) dargestellt. Links das Bild im Dunkelfeld, rechts nach afferenter Reizung sowie Hintergrundabzug und Verstärkung des Signals.

Abb. 3.5.1.1a

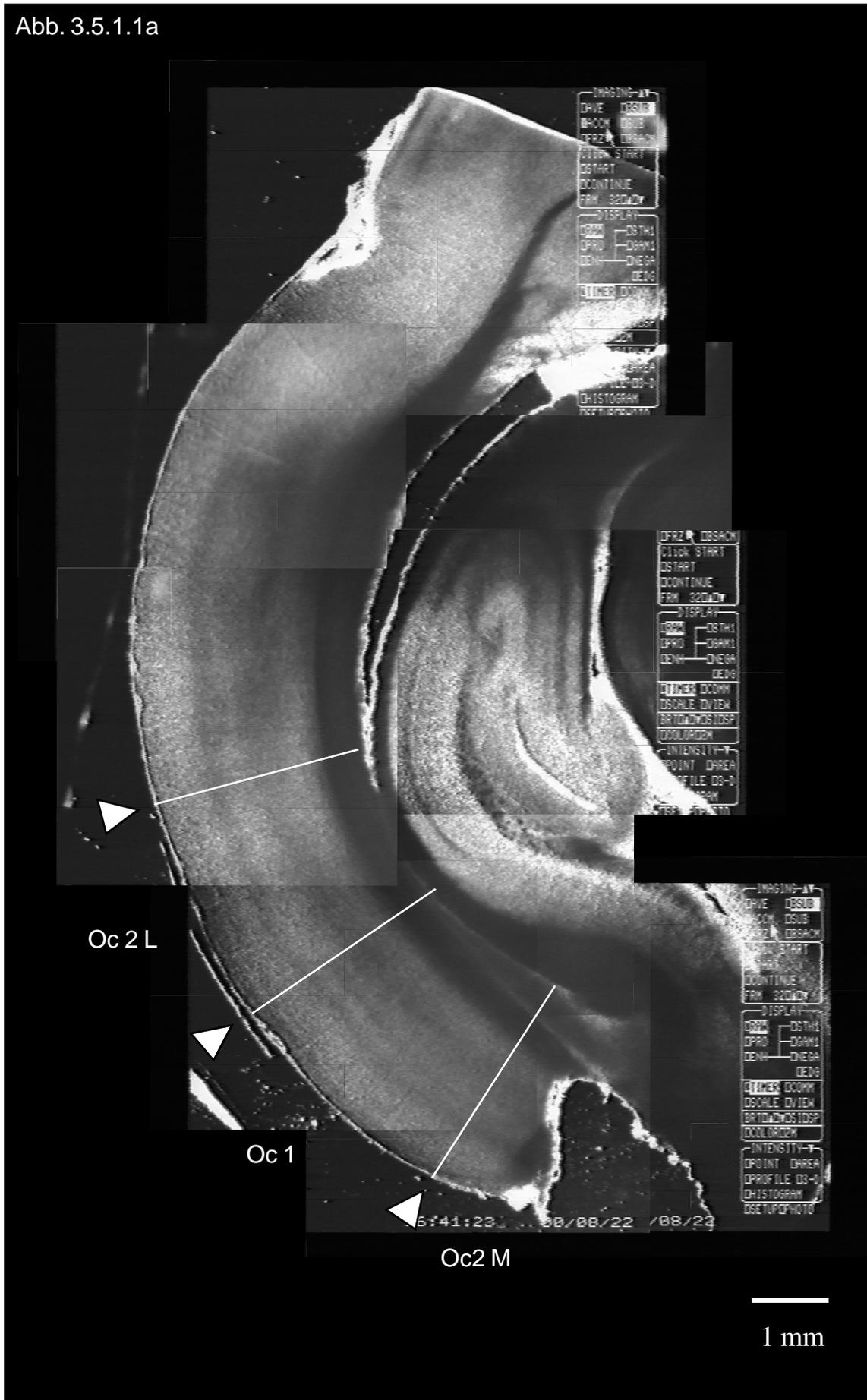
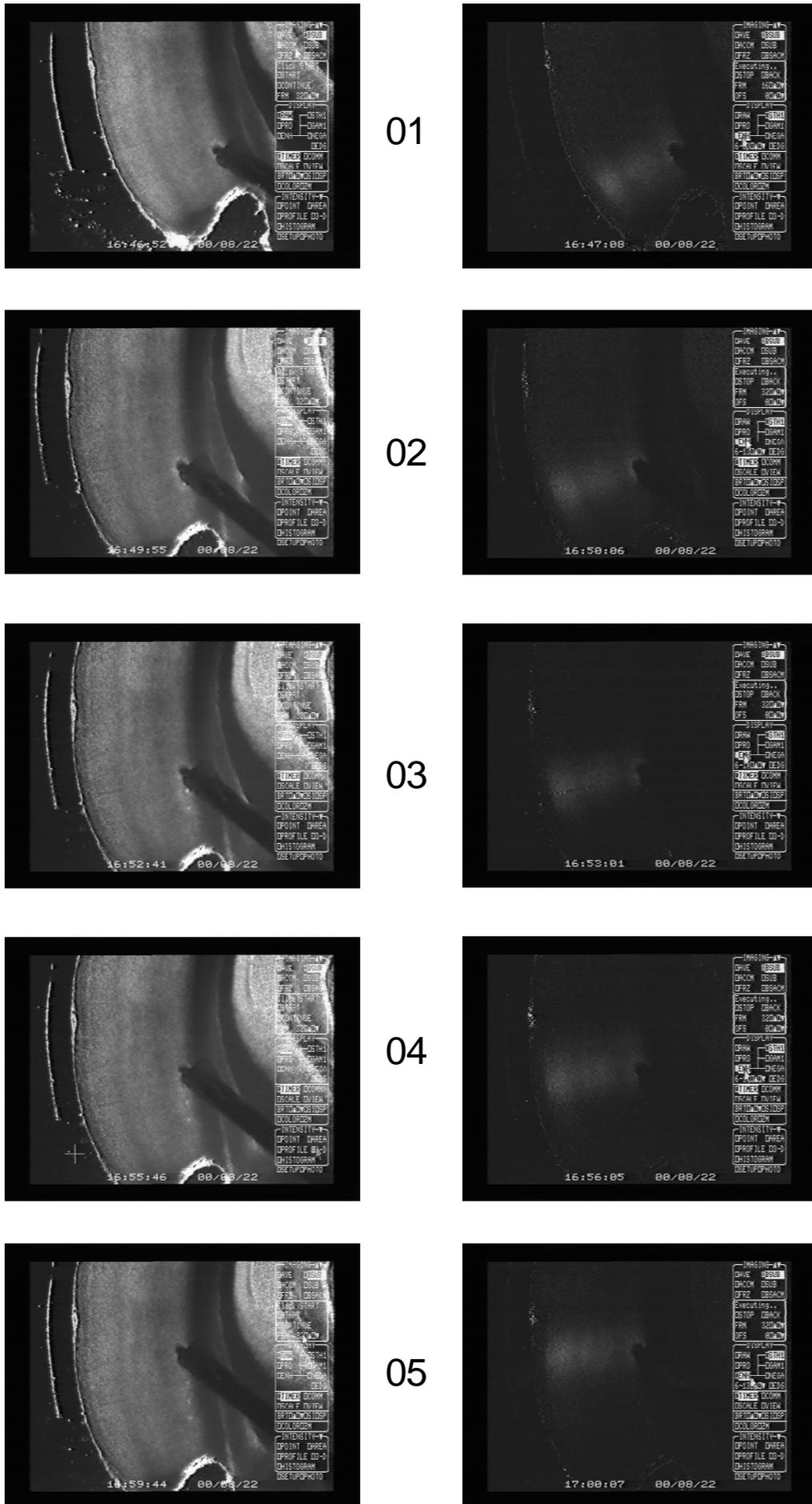


Abb. 3.5.1.1b



### **Anzahl der Versuchstiere und Vorgehensweise bei Auswertung**

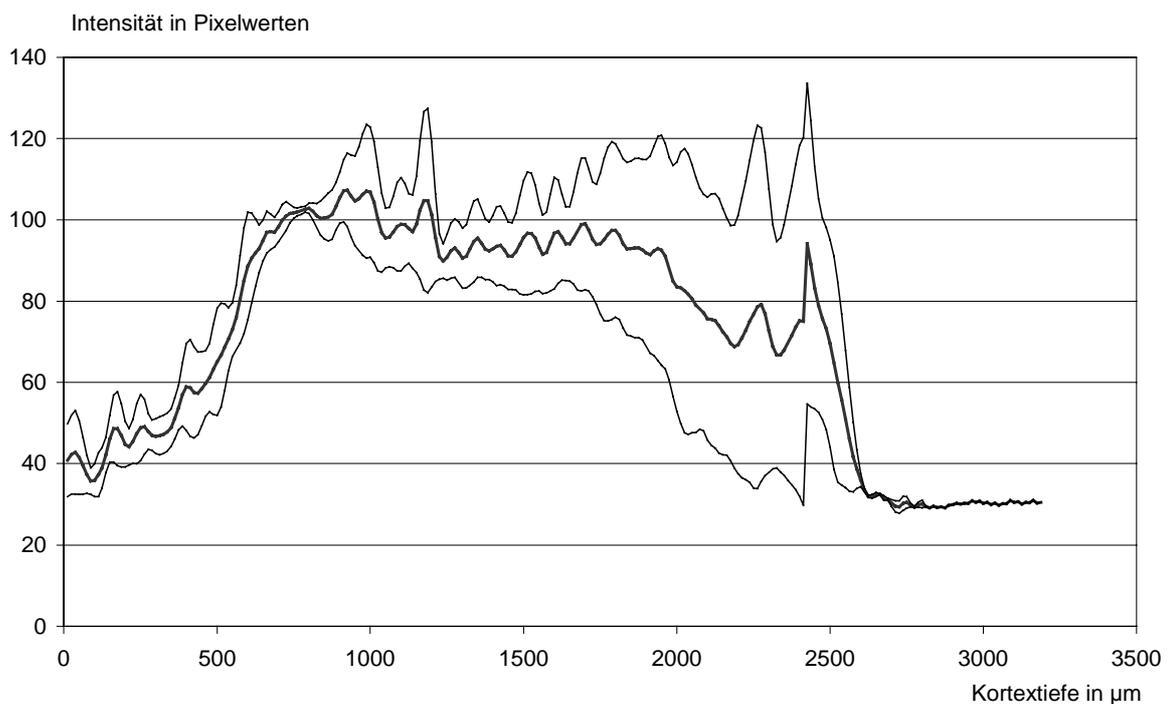
Ein Woche oder zwei Wochen nach Zufügung einer Photothrombose im Alter von neun Wochen wurden die Tiere den Experimenten zugeführt. Zum Zeitpunkt der Experimente hatten die Tiere daher ein Alter von zehn bzw. elf Wochen. Eine Woche nach Läsion wurden 5 Tiere (30 Halbslices) untersucht, während zwei Wochen nach Photothrombose 6 Tiere (12 Halbslices) in die Versuche eingingen.

Offensichtliche, im Experiment erkennbare Änderungen der intrinsischen optischen Signale konnten nicht beobachtet werden. Evtl. Veränderungen sollten daher anhand der Intensitätsprofile einer großen Anzahl von Signalen im Vergleich zu den entsprechend alten sham-operierten Tieren untersucht werden. Die Intensitätsprofile der Signale wurden wie auch bei den sham-operierten Tieren seitengetreunt gemittelt und untersucht, um so evtl. Veränderungen zwischen den ipsi- und kontralateralen Hemisphären zu erfassen. Zudem sollten evtl. zeitabhängige Veränderungen durch die Durchführung der Experimente nach einer Woche bzw. zwei Wochen nach Läsion untersucht werden. Dabei war zu beachten, daß nach den in 3.4 beschriebenen Ergebnissen nur jeweils gleich alte Gruppen der sham-operierten Tiere und Läsionstiere direkt verglichen werden konnten.

### 3.5.2 Signale des Areals Oc2M

#### 1 Woche nach Läsion

Eine Woche nach Läsion wurden kontralateral die Signale aus 3 Tieren (5 Halbslices) untersucht. Ipsilateral konnten wegen der zu geringen Distanz zur Läsion in dieser Gruppe keine Signale ausgelöst werden. Die Signalintensität war kontralateral verglichen mit den sham-operierten Tieren signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Auffällig war die hohe Intensität in Lamina IV ( $107 \pm 8$  Pixelwerte) verglichen zur Intensität in Lamina V ( $99 \pm 16$  Pixelwerte) des Kortex, die in den Kontroll- und sham-operierten Tieren niedriger war als in Lamina V (Abb. 3.5.2.1). Ein statistisch signifikanter Unterschied in der laminären Verteilung der Signale war hier jedoch nicht nachzuweisen ( $p > 0,05$ ).



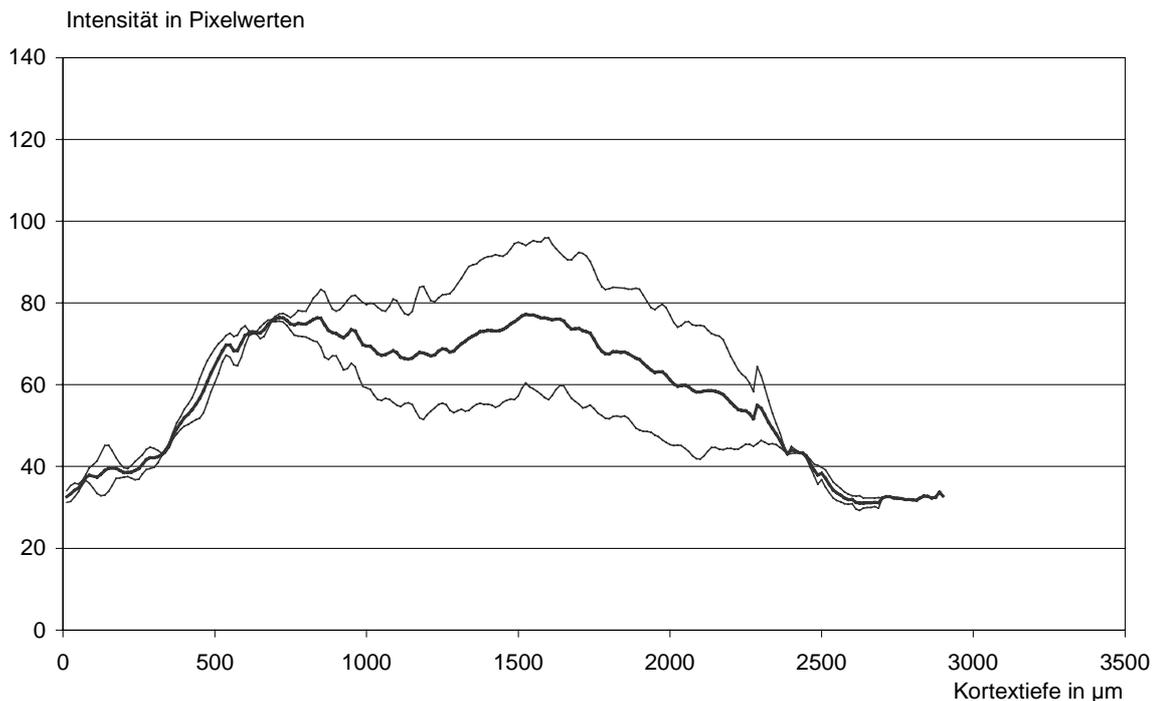
**Abb. 3.5.2.1 Intensitätsprofil im Areal Oc2M nach einer Woche kontralateral zur Läsion.**

Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc2M bei Läsionstieren nach einer Woche dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach ca. 4 Sekunden aufgezeichnet.

## 2 Wochen nach Läsion

Ipsilateral zur Läsion gingen 9 Signale aus 3 Halbslices (2 Tiere) in die Auswertung ein. Das Maximum in Lamina IV bei  $76 \pm 1$  Pixelwerten (Abb. 3.5.2.2) war in etwa so hoch wie das Intensitätsmaximum in Lamina V ( $77 \pm 17$  Pixelwerte).

### Oc2M

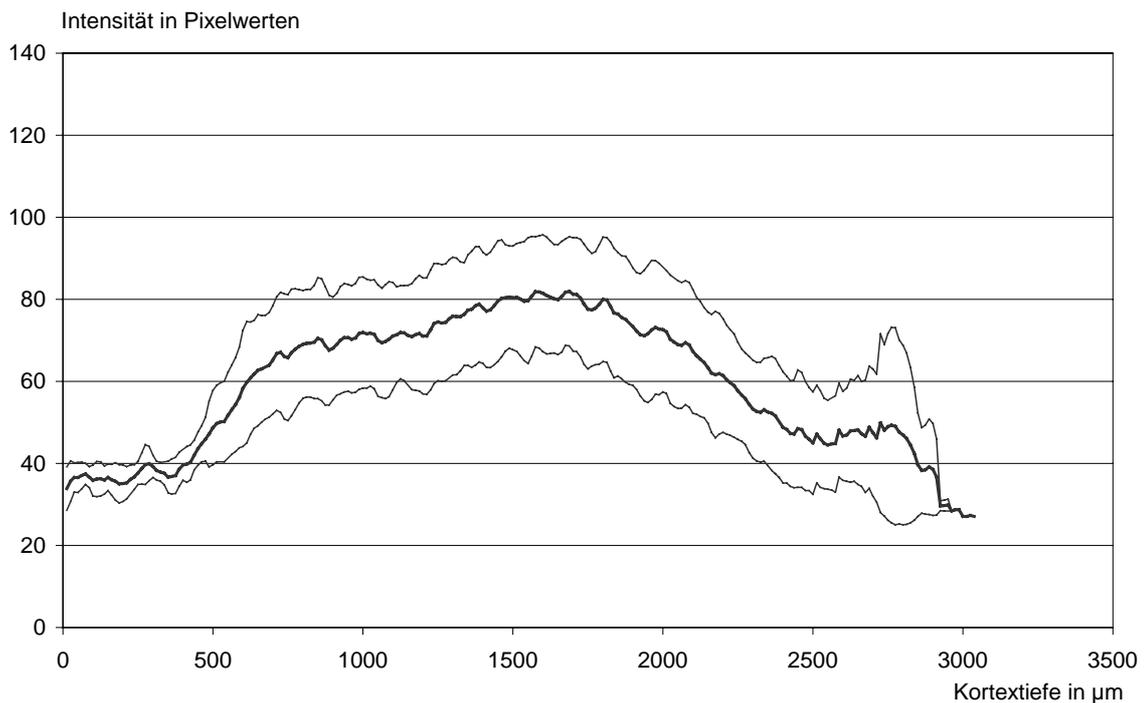


**Abb. 3.5.2.2 Intensitätsprofil im Areal Oc2M nach zwei Wochen ipsilateral zur Läsion.**

Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc2M ipsilateral zur Läsion nach 2 Wochen dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach ca. 4 Sekunden aufgezeichnet.

Kontralateral zur Läsion (5 Tiere, 7 Halbslices, 19 Signale) lagen die Intensitätsmaxima nach 2 Wochen in Oc2M in der Lamina IV bei  $69 \pm 14$  Pixelwerten und in der Lamina V bei  $80 \pm 17$  Pixelwerten (Abb. 3.5.2.3).

## Oc2M



**Abb. 3.5.2.3 Intensitätsprofil im Areal Oc2M nach zwei Wochen kontralateral zur Läsion.**

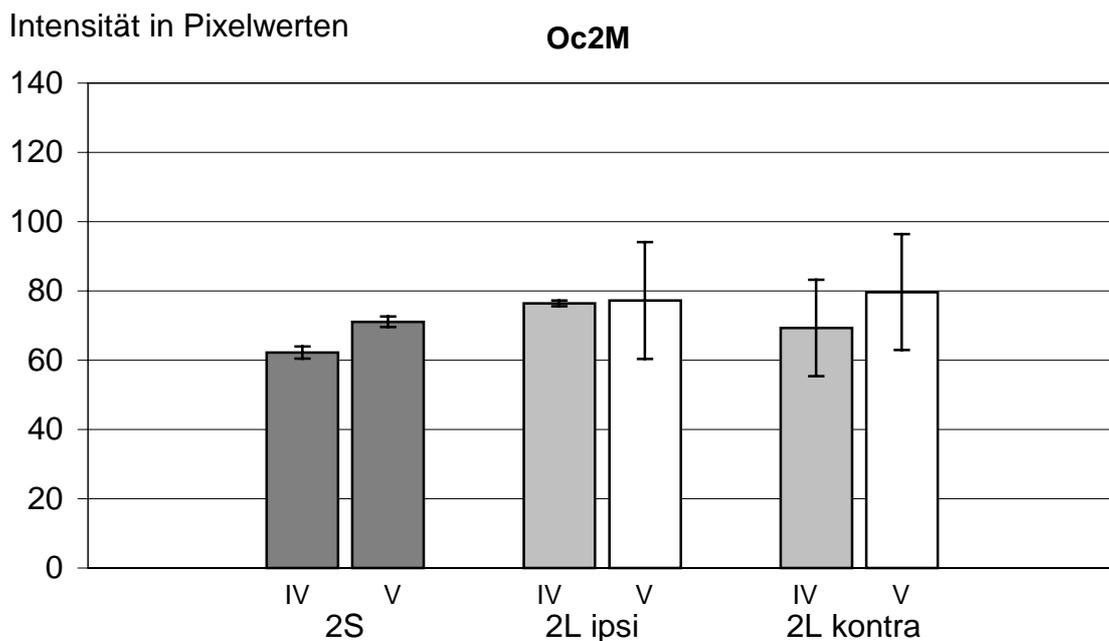
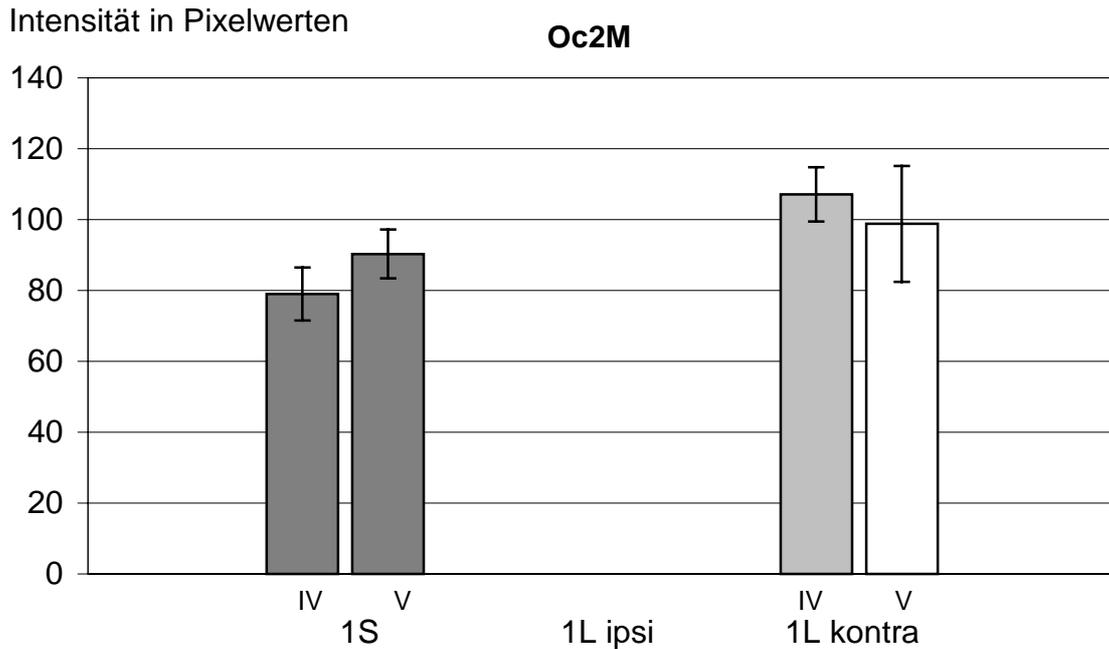
Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc2M kontralateral zur Läsion nach 2 Wochen dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach 4 Sekunden aufgezeichnet.

### **Vergleich der intrinsischen optischen Signale nach Läsion im Areal Oc2M**

Abb. 3.5.2.4 zeigt eine Auftragung der Signalmaxima der gemittelten Intensitätsprofile des Areals Oc2M aus den Gruppen der Läsionstiere sowie der sham-operierten Tiere.

Es wird deutlich, daß nach einer Woche die Signalintensität auf der kontralateralen Seite (Lamina IV) signifikant anstieg ( $p < 0,05$ ). Der Intensitätsunterschied zwischen der Lamina IV und V nach einer Woche auf der kontralateralen Seite dagegen war nicht signifikant.

Zwei Wochen nach Läsion war ein Intensitätsanstieg der intrinsischen optischen Signale auf der ipsilateralen Seite zu verzeichnen, der für die Lamina IV statistisch signifikant war ( $p < 0,05$ ). Der Intensitätsanstieg der Signale auf der kontralateralen Seite zur Läsion war nach 2 Wochen statistisch nicht signifikant.



**Abb. 3.5.2.4 Intensitätsmaxima intrinsischer optischer Signale des Areal Oc2M nach kortikaler Läsion im Vergleich.**

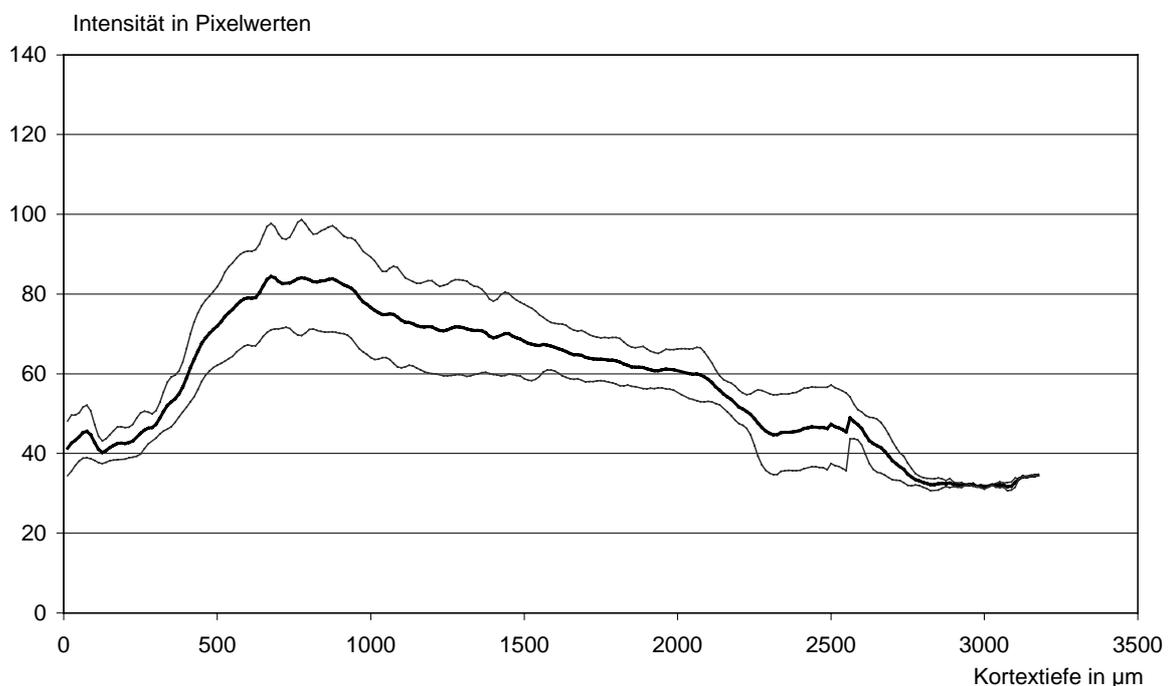
Dargestellt sind die Intensitätsmaxima intrinsischer optischer Signale aus dem Areal Oc2M in den Laminae IV und V. Die Werte entstammen den gemittelten Intensitätsprofilen und entsprechen dem Intensitätsmaximum in der jeweiligen Lamina, die Balken kennzeichnen die Standardabweichung der Signalintensitäten im Intensitätsmaximum. IV, V = Lamina IV, V; 1L ipsi, 1L kontra = Gruppe der Läsionstiere nach einer Woche auf ipsilateraler bzw. kontralateraler Seite, 2L ipsi, 2L kontra = Gruppe der Läsionstiere nach zwei Wochen auf ipsilateraler bzw. kontralateraler Seite; 1S, 2S = Gruppe der sham-operierten Tiere nach einer, bzw. zwei Wochen

### 3.5.3 Signale des Areals Oc1

#### Eine Woche nach Läsion

Ausgewertet wurden in dieser Gruppe auf der ipsilateralen Seite 30 Signale aus 12 Halbslices von 5 Tieren. Das Maximum der Signale lag in Lamina IV (Abb. 3.5.3.1) und war mit  $83 \pm 13$  Pixelwerten niedriger als auf der kontralateralen Seite, bei der mit  $95 \pm 15$  Pixelwerten das Maximum der Intensität ebenfalls in Lamina IV lag (Abb. 3.5.3.2). Kontralateral gingen 35 Signale aus 10 Slices von 4 Tieren in die Auswertung ein.

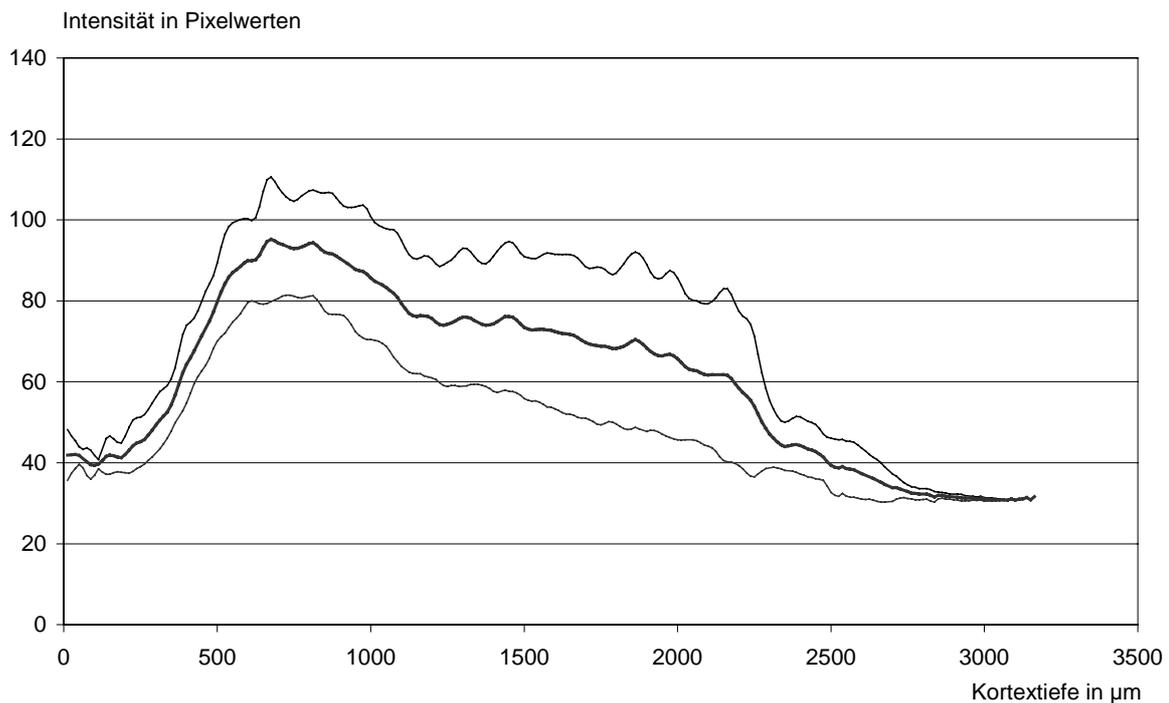
#### Oc1 ipsilateral



**Abb. 3.5.3.1 Intensitätsprofil im Areal Oc1 nach einer Woche ipsilateral zur Läsion.**

Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc1 ipsilateral zur Läsion nach einer Woche dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach ca. 4 Sekunden aufgezeichnet

## Oc1 kontralateral



### **Abb. 3.5.3.2 Intensitätsprofil im Areal Oc1 nach einer Woche kontralateral zur Läsion.**

Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc1 kontralateral zur Läsion nach einer Woche dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach ca. 4 Sekunden aufgezeichnet

## **Zwei Wochen nach Läsion**

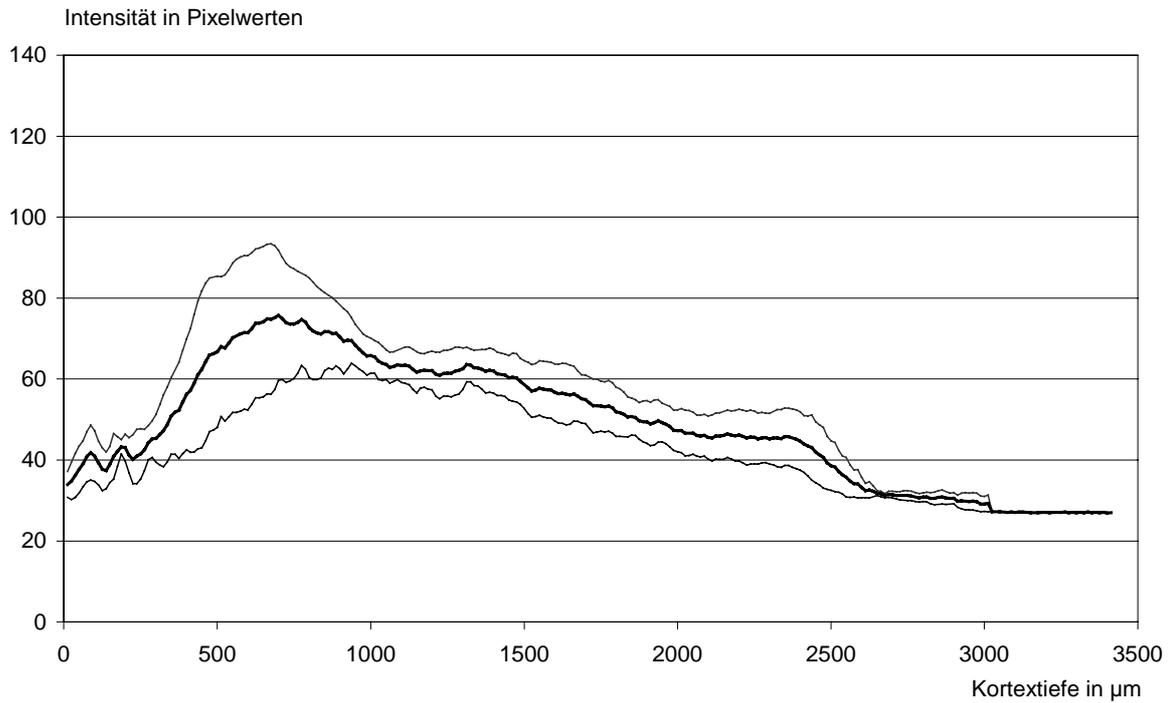
Zwei Wochen nach Auslösung einer kortikalen Läsion wurden im Areal Oc1 ipsilateral 4 Tiere (7 Halbslices, 26 Signale) untersucht (Abb. 3.5.3.3). Die Signale hatten ihr Maximum in Lamina IV mit  $76 \pm 17$  Pixelwerten und hatten damit eine höhere Intensität als im Maximum auf der kontralateralen Seite mit  $62 \pm 11$  Pixelwerten (Abb. 3.5.3.4). Kontralateral wurden im Areal Oc1 10 Signale aus 3 Halbslices von 3 Tieren ausgewertet.

### **Abb. 3.5.3.3 Intensitätsprofil im Areal Oc1 nach zwei Wochen ipsilateral zur Läsion.**

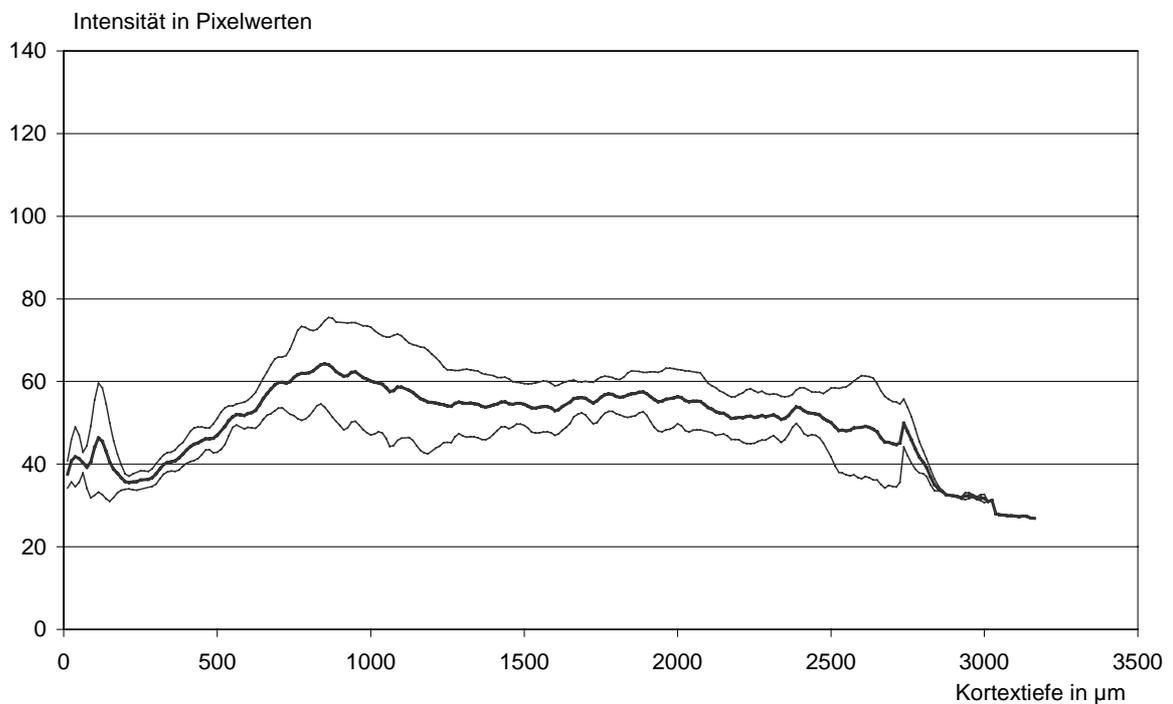
Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc1 ipsilateral zur Läsion nach zwei Wochen dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach ca. 4 Sekunden aufgezeichnet

Abb. 3.5.3.3

Oc1 ipsilateral



Oc1 kontralateral



**Abb. 3.5.3.4 Intensitätsprofil im Areal Oc1 nach zwei Wochen kontralateral zur Läsion.**

Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc1 kontralateral zur Läsion nach zwei Wochen dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach 4 Sekunden aufgezeichnet

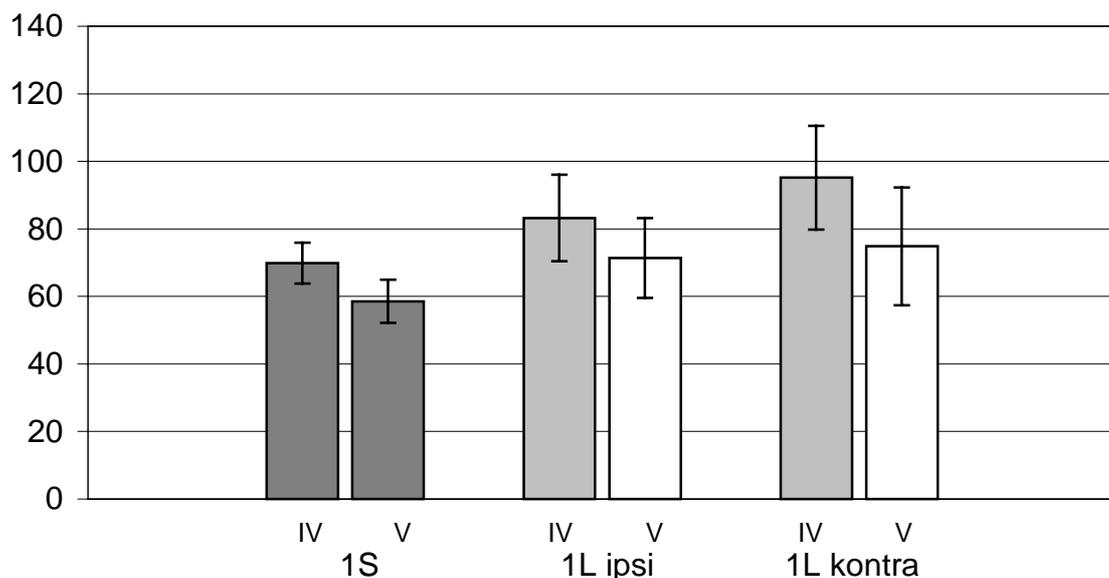
### Vergleich der intrinsischen optischen Signale nach Läsion im Areal Oc1

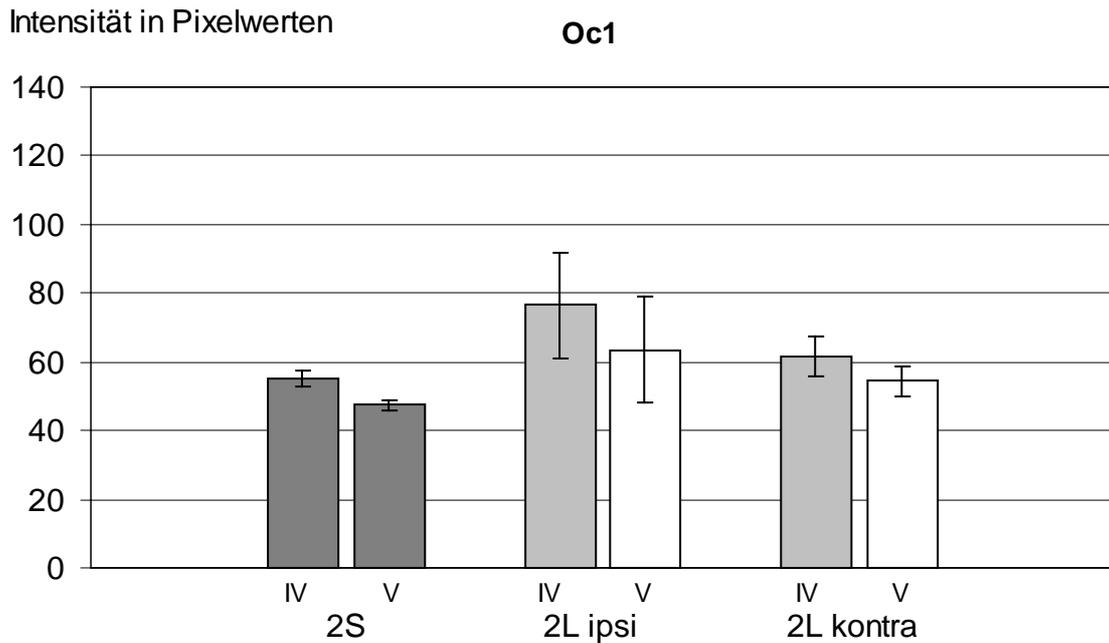
Abb. 3.5.3.5 zeigt eine Auftragung der Signalmaxima der gemittelten Intensitätsprofile des Areals Oc1 aus den Gruppen der Läsionstiere sowie der sham-operierten Tiere. Eine Woche nach Photothrombose war im Vergleich zu sham-operierten Tieren ein Anstieg der Signalintensität ipsilateral und noch ausgeprägter kontralateral zur Läsion erkennbar. Ipsilateral war der Intensitätsanstieg statistisch nicht signifikant. Auf der kontralateralen Seite war dagegen ein statistisch signifikanter Anstieg der Intensität in Lamina IV zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ). Eine Änderung der laminären Intensitätsverteilung wurde beobachtet, das Maximum der Intensität lag sowohl ipsi- als auch kontralateral in Lamina IV (Abb. 3.5.3.1/2).

Zwei Wochen nach Läsion ergab sich eine andere Intensitätsverteilung als nach einer Woche. Verglichen mit der Gruppe der sham-operierten Tiere war ein deutlicher Intensitätsanstieg auf der ipsilateralen Seite zu verzeichnen, der in Lamina V statistisch signifikant war. Kontralateral war ebenfalls ein geringer, allerdings nicht signifikanter Intensitätsanstieg zu beobachten. Auch nach zwei Wochen war keine Veränderung im laminären Verteilungsmuster vorhanden, das Maximum der Intensität befand sich unverändert in Lamina IV (Abb. 3.5.3.3/4).

Intensität in Pixelwerten

Oc1





**Abb. 3.5.3.5 Intensitätsmaxima intrinsischer optischer Signale des Areals Oc1 nach kortikaler Läsion im Vergleich**

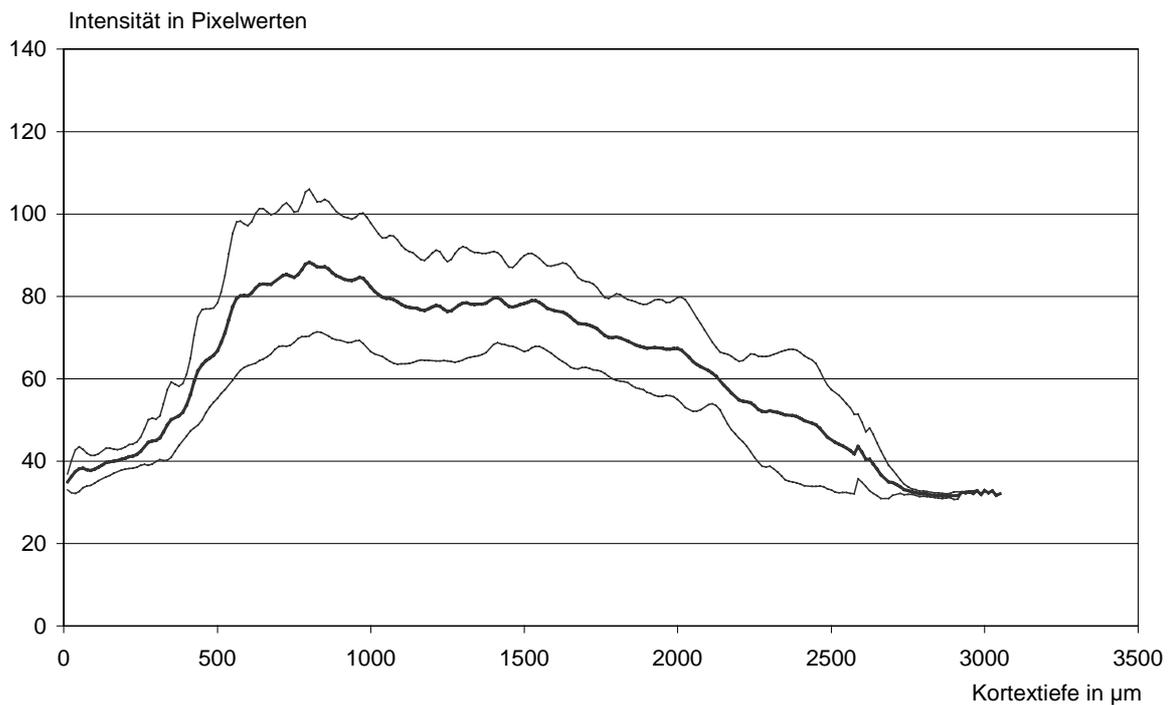
Dargestellt sind die Intensitätsmaxima intrinsischer optischer Signale aus dem Areal Oc1 in den Lamina IV und V. Die Werte entstammen den gemittelten Intensitätsprofilen und entsprechen dem Intensitätsmaximum in der jeweiligen Lamina, die Balken kennzeichnen die Standardabweichung der Signalintensitäten im Intensitätsmaximum. IV, V = Lamina IV, V; 1L ipsi, 1L kontra = Gruppe der Läsionstiere nach einer Woche auf ipsilateraler bzw. kontralateraler Seite, 2L ipsi, 2L kontra = Gruppe der Läsionstiere nach zwei Wochen auf ipsilateraler bzw. kontralateraler Seite; 1S, 2S = Gruppe der sham-operierten Tiere nach einer, bzw. zwei Wochen

### 3.5.4 Signale des Areals Oc2L

#### Eine Woche nach Läsion

Ipsilateral wurden die Signale aus 5 Tieren (11 Halbslices, 27 Signale) ausgewertet. Kontralateral gingen ebenfalls 27 Signale aus 9 Halbslices von 4 Tieren in die Auswertung ein. Das Intensitätsmaximum lag ipsilateral (Abb. 3.5.4.1) bei  $88 \pm 17$  Pixelwerten in Lamina IV und war damit geringer als auf der Gegenseite ( $96 \pm 23$  Pixelwerte, Abb. 3.5.4.2). Signifikante Unterschiede zwischen beiden kortikalen Seiten konnten trotz der geringeren Intensität auf der ipsilateralen Seite nicht gefunden werden. Das Maximum befand sich hingegen stets in der Lamina IV ohne signifikante Verschiebungen in andere kortikale Schichten.

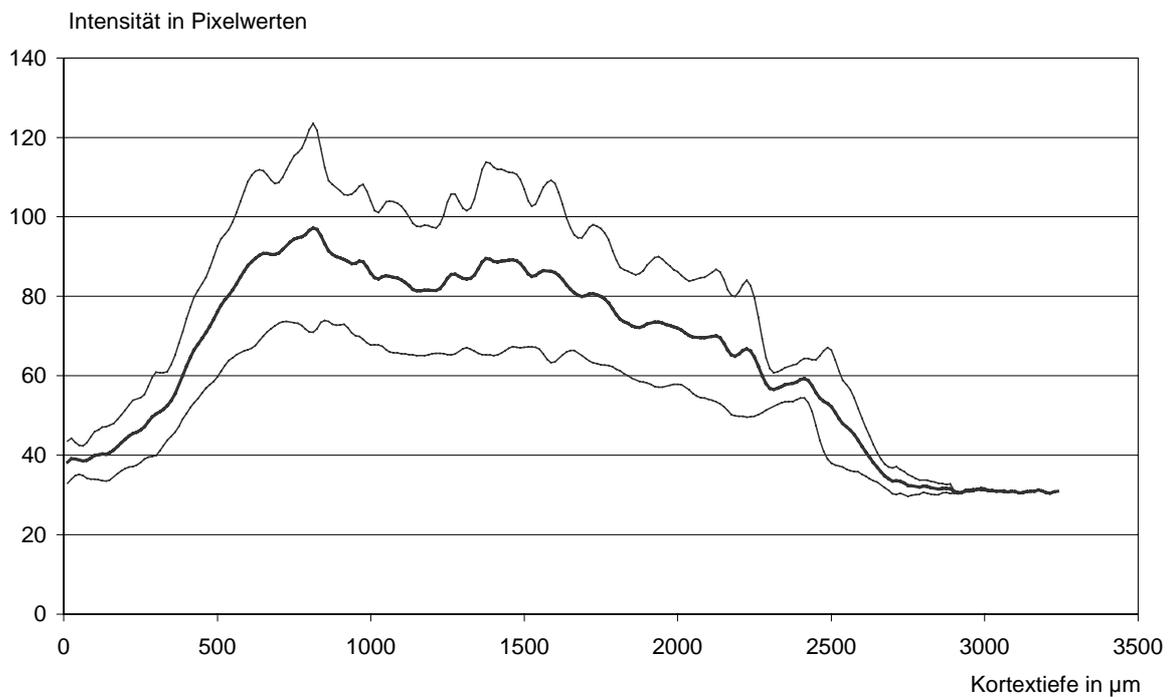
### Oc2L ipsilateral



**Abb. 3.5.4.1 Intensitätsprofil im Areal Oc2L nach einer Woche ipsilateral zur Läsion.**

Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc2L ipsilateral zur Läsion nach einer Woche dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach ca. 4 Sekunden aufgezeichnet

### Oc2L kontralateral



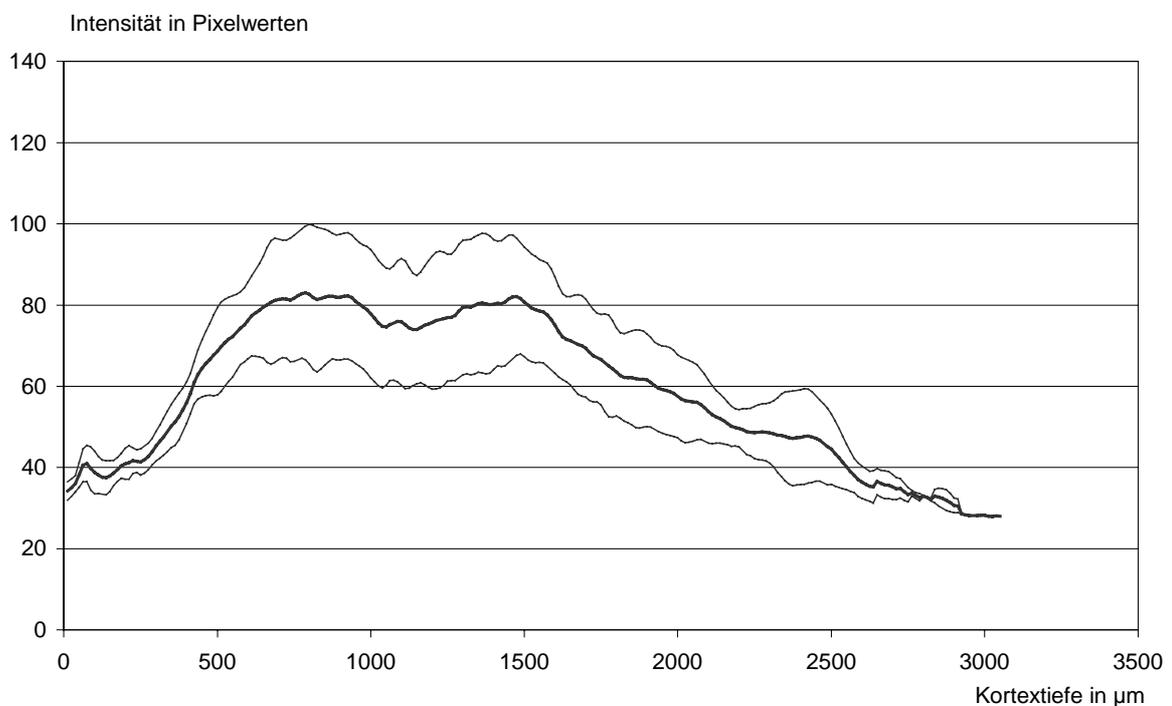
**Abb. 3.5.4.2 Intensitätsprofil im Areal Oc2L nach einer Woche kontralateral zur Läsion.**

Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc2L kontralateral zur Läsion nach einer Woche dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach ca. 4 Sekunden aufgezeichnet

### Signale zwei Wochen nach Läsion

Zwei Wochen nach Läsion wurden ipsilateral die Signale von 4 Tieren (7 Halbslices, 30 Signale) untersucht, kontralateral gingen die Signale von 2 Tieren (2 Halbslices, 8 Signale) ein. Auf der ipsilateralen Seite zur Läsion (Abb. 3.5.4.3) traten im Maximum in Lamina IV deutlich höhere Intensitäten auf ( $82 \pm 15$  Pixelwerte) als auf der kontralateralen Seite ( $56 \pm 6$  Pixelwerte, Abb. 3.5.4.4). In Lamina V (ipsilateral  $80 \pm 16$  Pixelwerte; kontralateral  $61 \pm 5$  Pixelwerte) traten jeweils in etwa gleich hohe Signalintensitäten auf wie in Lamina IV.

#### Oc2L ipsilateral



**Abb. 3.5.4.3 Intensitätsprofil im Areal Oc2L nach zwei Wochen ipsilateral zur Läsion.**

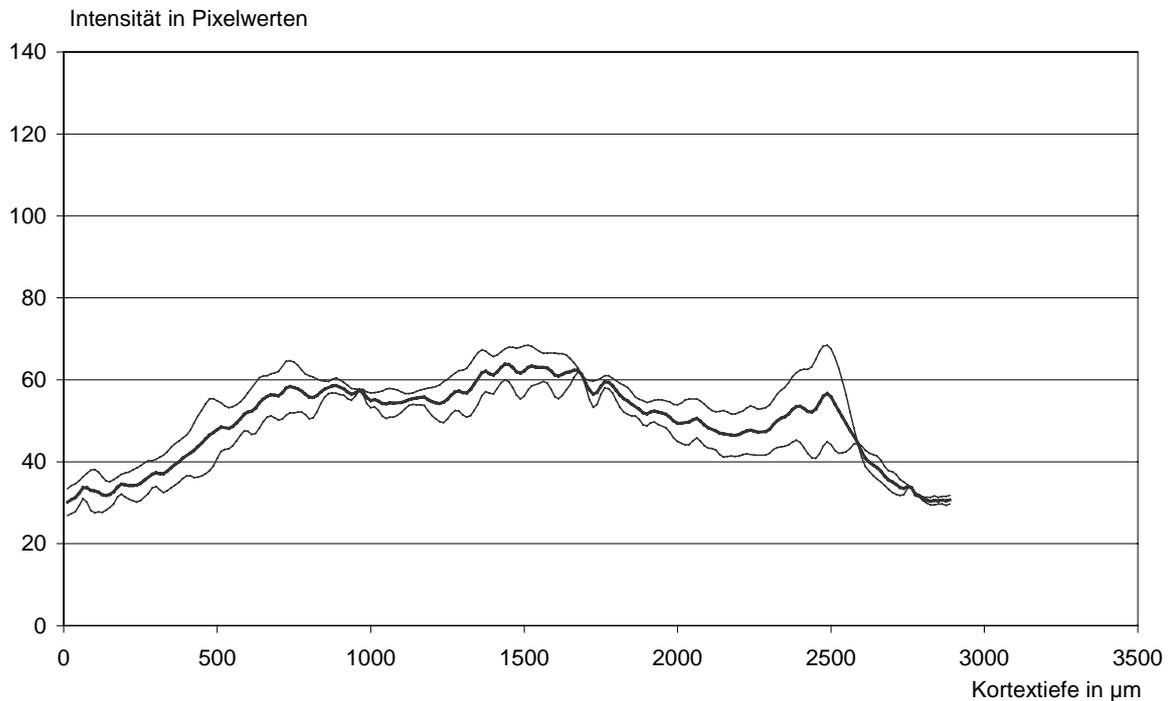
Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc2L ipsilateral zur Läsion nach zwei Wochen dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach ca. 4 Sekunden aufgezeichnet

**Abb. 3.5.4.4 Intensitätsprofil im Areal Oc2L nach zwei Wochen kontralateral zur Läsion.**

Die Grafik stellt die Mittelung der Intensitätsprofile der Signale im Areal Oc2L kontralateral zur Läsion nach zwei Wochen dar (Mittelwert (fett) mit Standardabweichung). Alle Signale wurden mit mittleren Reizstärken ausgelöst und nach Erreichen ihres Maximums nach 4 Sekunden aufgezeichnet

Abb. 3.5.4.4

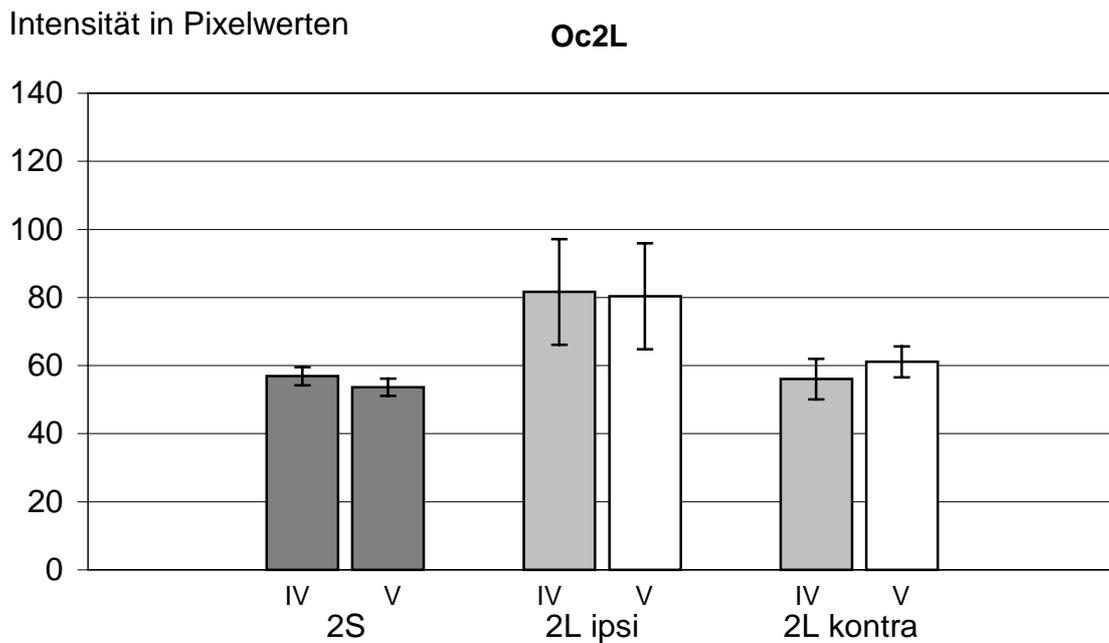
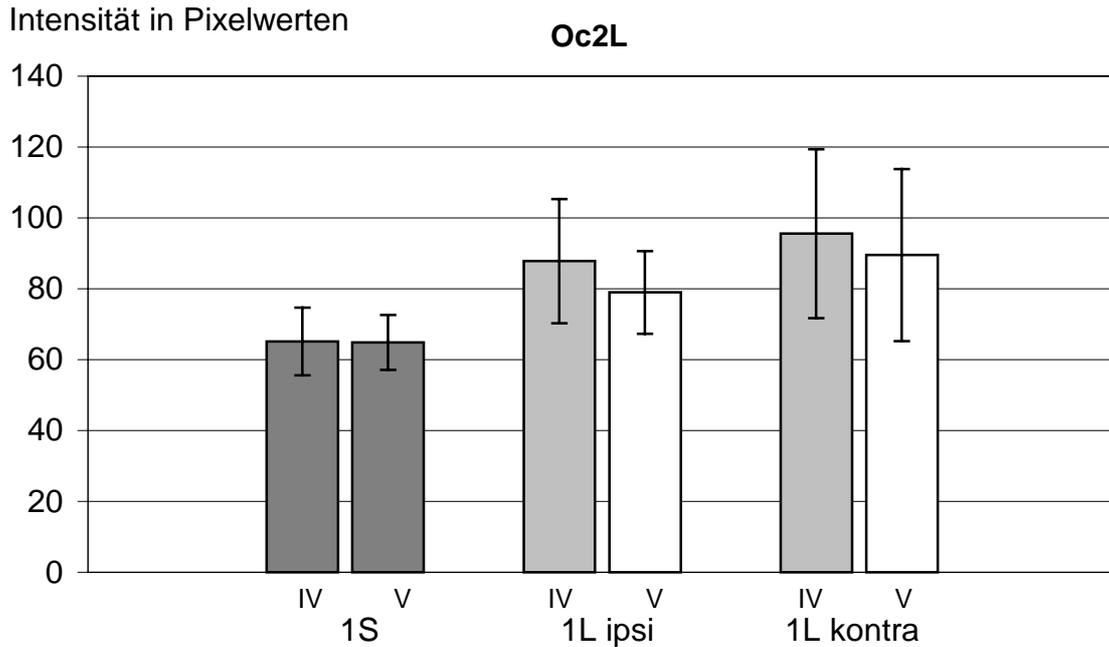
Oc2L kontralateral



**Vergleich der intrinsischen optischen Signale nach Läsion im Areal Oc2L**

Der Vergleich nach einer Woche zwischen den sham-operierten Tieren sowie den Läsionstieren zeigte einen Anstieg der Signalintensität vor allem auf der kontralateralen Seite (Abb. 3.5.4.5). Statistisch waren dies jedoch nicht signifikante Werte. Das Signalmaximum lag in allen Arealen in der Lamina IV. Statistisch signifikante Veränderungen in der laminären Verteilung der Signalintensität traten bei den Läsionstieren nach einer Woche nicht auf.

Zwei Wochen nach Läsion war verglichen mit den sham-operierten Tieren auf der ipsilateralen Seite zur Läsion eine deutliche Intensitätserhöhung nachzuweisen (Abb. 3.5.4.5). Diese war in allen Laminae relativ gleich ausgeprägt, statistisch signifikant jedoch nur in Lamina V ( $p < 0,05$ ). Kontralateral trat verglichen mit den sham-operierten Tieren dagegen keine signifikante Veränderung der Signalintensität auf.



**Abb. 3.5.4.5 Intensitätsmaxima intrinsischer optischer Signale des Areals Oc2L nach kortikaler Läsion im Vergleich**

Dargestellt sind die Intensitätsmaxima intrinsischer optischer Signale aus dem Areal Oc2L in den Lamina IV und V. Die Werte entstammen den gemittelten Intensitätsprofilen und entsprechen dem Intensitätsmaximum in der jeweiligen Lamina, die Balken kennzeichnen die Standardabweichung der Signalintensitäten im Intensitätsmaximum. IV, V = Lamina IV, V; 1L ipsi, 1L kontra = Gruppe der Läsionstiere nach einer Woche auf ipsilateraler bzw. kontralateraler Seite, 2L ipsi, 2L kontra = Gruppe der Läsionstiere nach zwei Wochen auf ipsilateraler bzw. kontralateraler Seite; 1S, 2S = Gruppe der sham-operierten Tiere nach einer, bzw. zwei Wochen

## 4 Diskussion

### 4.1 Kartierung intrinsischer optischer Signale

In der vorliegenden Arbeit wurden intrinsische optische Signale in neokortikalen Hirnschnitten der Ratte nach afferenter elektrischer Stimulation in Lamina VI ausgelöst. Diese erstreckten sich kolumnenförmig zwischen Lamina VI und Lamina II des Kortex. Untersucht wurden insbesondere Signale, die im visuellen Kortex der Ratte ausgelöst wurden.

Dazu war es notwendig, die Signale, die während des Experimentes ausgelöst wurden, anhand histologischer Untersuchungen möglichst genau den jeweiligen kortikalen Arealen zuordnen zu können. Die Einteilung des sechsschichtigen Neokortex in verschiedene Areale und Laminae geschieht dabei normalerweise nicht nach funktionellen Aspekten sondern nach histologischen (zytoarchitektonischen) Gesichtspunkten und kann u.a. durch den Vergleich der Zelldichte oder des Myelinisierungsgrades des Gewebes vorgenommen werden (Zilles, Wree, 1995). So verfügen die primären sensorischen Areale über eine ausgeprägte Lamina IV, in der Neurone in hoher Dichte vorliegen. Diese Lamina stellt funktionell gleichzeitig das Hauptziel der sensorischen Afferenzen aus dem Thalamus dar. Die zytoarchitektonischen Merkmale der kortikalen Areale spiegeln somit auch ihre funktionelle Verschiedenartigkeit wieder.

Die intrinsischen optischen Signale wurden aufgrund der guten Auflösung der IOS im mikroskopischen Dunkelfeld unter Verwendung von infrarotem Licht registriert (Dodt, Zieglansberger, 1990), (Dodt et al., 1993). Es zeigte sich, daß im Dunkelfeld einige charakteristische Merkmale der Hirnschnitte, die sonst nur mit speziellen histologischen Färbetechniken darzustellen sind, gut zu erkennen waren.

Im Vergleich von Dunkelfeldregistrierungen mit histologischen Färbungen (Neu-N-Färbung) derselben Hirnschnitte stellte sich heraus, daß zellreiche Bereiche im Dunkelfeld dunkler erscheinen als das umliegende Gewebe, wobei besonders Lamina IV des sechsschichtigen Neokortex gut abgegrenzt werden konnte. Auf dieser Grundlage wurden Kartierungen der kortikalen Areale im Dunkelfeld vorgenommenen, die sehr gut mit Vergleichskartierungen an histologischen Präparaten derselben Hirnschnitte übereinstimmten. Die Kartierungen wurden dabei in beiden Fällen mit Hilfe eines anatomischen

Atlanten (Zilles, Wree, 1995) unabhängig voneinander durchgeführt und wiesen nur geringfügige Unterschiede in der Lage der Arealgrenzen auf. Diese Differenzen lassen sich dadurch erklären, daß die Identifizierung der kortikalen Areale im Dunkelfeld an 350 µm dicken Schnitten bei einer Sichttiefe von ca. 50 – 100 µm vorgenommen wurde, während dies am histologischen Präparat bei einer Dicke von 50 µm geschah. Da mit einer Veränderung der Arealgrenzen im koronalen Hirnschnitt bei sich ändernder Schichttiefe zu rechnen ist, ist hier im Dunkelfeld ein geringer Fehler der Arealgrenzen nicht zu vermeiden. Dieser Fehler war bei der Bestimmung der Arealgrenzen jedoch vernachlässigbar gering.

## **4.2 Intrinsische optische Signale und ihre Varianz**

In dieser Arbeit konnten intrinsische optische Signale in Hirnschnitten jugendlicher Ratten mit guter Reproduzierbarkeit ausgelöst werden. Die Signale hatten dabei eine kolumnenförmige Gestalt und erstreckten sich von der Lamina VI bis zur Lamina II des Kortex. Aufgrund organisatorischer Erfordernisse wurde der experimentelle Teil der Arbeit ohne wesentliche Zwischenauswertung durchgeführt. Während der anschließenden Auswertungsphase stellte sich heraus, daß innerhalb der Gruppe der Läsionstiere im Areal Oc2M die Anzahl verwertbarer Daten durch weitere Experimente hätte ergänzt werden müssen.

Nun stellt sich die Frage, inwiefern intrinsische optische Signale derselben kortikalen Areale auf der Ebene verschiedener Tiere differieren. Die Beantwortung dieser Frage ist auch deswegen wichtig, da von ihr abhängt, ob die statistische Mittelung intrinsischer optischer Signale ohne weiteres über verschiedene Tiere durchgeführt werden kann. In dieser Arbeit wurden daher die Ergebnisse der Messungen auf der Ebene einzelner Hirnschnitte desselben Tieres und weiterhin auf der Ebene verschiedener Tiere betrachtet und miteinander verglichen. Bei Betrachtung der Ergebnisse stellt sich heraus, daß die Varianz intrinsischer optischer Signale innerhalb der verschiedenen Hirnschnitte desselben Tieres relativ groß ist. Dies ist einleuchtend, wenn man bedenkt, daß die Schnittebene und damit die Ebene der senkrecht zur Kortexoberfläche verlaufenden Bahnen aufgrund der Krümmung des Kortex

einer gewissen Variabilität unterworfen ist. Die Signale, die innerhalb eines kortikalen Areals eines Hirnschnittes ausgelöst werden, variieren nur sehr gering voneinander. Führt man eine statistische Mittelung der intrinsischen optischen Signale bestimmter kortikaler Areale auf der Ebene einzelner Tiere durch, dann stellt sich im Vergleich heraus, daß sowohl die Signalintensitäten als auch die Lage der Signalmaxima bestimmter Areale kaum variieren. Große individuelle Unterschiede intrinsischer optischer Signale sind beim Vergleich verschiedener Tiere somit nicht festzustellen.

Weiterhin stellte sich bei Betrachtung der koronalen Hirnschnitte im Experiment heraus, daß in einigen Hirnschnitten Abweichungen innerhalb der idealen koronalen Schnitfführung existieren. Dies äußert sich darin, daß innerhalb eines koronalen Slices die beiden Hemisphären z.T. verschiedene anatomische Strukturen schneiden. Erklärbar ist dies durch die im Methodikteil beschriebene Präparation der Hirnschnitte. Dabei wird zu Beginn das Hirn per Hand mit Hilfe einer Rasierklinge frontal sowie okzipital "getrimmt". Dieser Schneidevorgang definiert durch seine Ebene die Schnittebene der folgenden per Vibratom geschnittenen Slices (Abb. 2.4). Die Frage ist daher berechtigt, ob der Vergleich von ipsilateralen mit kontralateralen Signalen, also Signalen aus homotopen Arealen zulässig ist. Dieser systematische Fehler ist wahrscheinlich wenig relevant, da die Abweichung der Schnittebenen zweier Hemisphären schätzungsweise max. 100-200 µm betrug. Eine exakte Kartierung der Areale konnte diesen Fehler weiterhin minimieren, zumal bei der Mittelung der Signale letztlich die gemittelten Signale zweier Hemisphären eines Tieres verglichen wurde.

### **4.3 Intrinsische optische Signale des visuellen Kortex der Ratte**

Im sekundär visuellen Areal Oc2M der Kontrollgruppe wies das Intensitätsprofil der Signale einen 2-gipfligen Kurvenverlauf mit einem ersten Maximum in Schicht IV (104 Pixelwerte bei ca. 1000 µm) sowie einem zweiten, größeren Maximum (109 Pixelwerte) in Schicht V (Abb. 3.3.1) auf (n = 1, 3 Halbslices; 4 Signale). Auffallend ist hier, im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Arealen, die relativ höhere Signalintensität Schicht V gegenüber den pianahen Schichten. Dies ist jedoch aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Tiere (n=1) nicht aussagekräftig.

Im primär visuellen Areal Oc1 wurden in der Kontrollgruppe Signale in Hirnschnitten von vier Tieren ( $n = 4$ , 15 Halbslices, 43 Signale) ausgewertet. Das Intensitätsmaximum lag in Lamina IV des Kortex ( $95 \pm 3$  Pixelwerte) mit einem zweiten Plateau signifikant geringerer Intensität in Schicht V ( $83 \pm 3$  Pixelwerte). Sehr ähnlich erscheint im Vergleich das ermittelte Intensitätsprofil der Signale des sekundären visuellen Areal Oc2L. Es besitzt neben dem Maximum in Lamina IV ( $96 \pm 14$  Pixelwerte) ein weiteres Maximum leicht geringerer Intensität in Lamina V ( $90 \pm 10$  Pixelwerte). Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen diesen beiden Maxima jedoch nicht gefunden werden ( $p > 0,05$ ). Auch die Intensitätsmaxima in Schicht IV sowie V unterscheiden sich innerhalb gleicher Schichten nicht signifikant in beiden Arealen.

Diese Ergebnisse lassen sich nur teilweise mit der Funktion der entsprechenden Areale in vivo erklären, die zudem auch nur lückenhaft bekannt ist. Hier stellt sich die Frage nach dem Ursprung der intrinsischen optischen Signale. Ein wesentlicher Mechanismus bei der Entstehung der intrinsischen optischen Signalen ist wie zuvor diskutiert die Veränderung des Extrazellulärtraumes bei elektrischer Aktivität (McManus et al., 1993), (MacVicar, Hochman, 1991). Dies ist dort am ausgeprägtesten, wo eine hohe Dichte an Synapsen herrscht. Es ist bekannt, daß die afferenten Neurone in den sekundär sensorischen Arealen (Oc2L, Oc2M) überwiegend in den Laminae II, III und V enden (Zilles, Wree, 1995). Im Rahmen dieser Untersuchung liegen die größten Unterschiede in diesen Arealen in der relativen Größe der Signalintensität in Lamina II und III. Die visuellen Arealen Oc2M und Oc2L besitzen dabei morphologische Eigenschaften, die diesen Unterschied erklären könnten. So enden in Oc2L aber nicht in Oc2M kommissurale Neurone in Lamina II und III, die aus den kontralateralen visuellen Arealen stammen (Stoll et al., 1998). Diese könnten für eine erhöhte Signalintensität in den Laminae II und III von Oc2L verantwortlich sein. Bedenkt man, daß intrinsische optische Signale in vitro durch Änderungen des Extrazellulärvolumens verursacht werden, die vor allem an Orten postsynaptischer Erregung geschehen, so stellt sich die Frage, woher die Neurone stammen, die mit den kortikalen Neuronen die Synapsen bilden. Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten elektrischen Reizung in der

Lamina VI werden wahrscheinlich auch afferente Neurone aus dem Thalamus gereizt. Es ist daher anzunehmen, daß diese thalamischen Afferenzen zur Entstehung der intrinsischen optischen Signale einen großen Anteil beitragen. Auch interkortikale Verbindungen der verschiedenen Areale über das Corpus callosum, die ihren Eingang zum Kortex über die Lamina VI finden, müssen dafür in Betracht gezogen werden. Die ausgeprägten intrakortikalen Verschaltungen der Neurone sind bei eventueller polysynaptischer Reizung eine weiterer möglicher Beitrag zur Entstehung der intrinsischen optischen Signale. Wie groß der Anteil der polysynaptischen Erregung an den in der vorliegenden Arbeit gemessenen IOS ist, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. In früheren Arbeiten konnte an neokortikalen Hirnschnitten der Ratte gezeigt werden, daß polysynaptische Erregung oder Hemmung einen Einfluß auf die Form und Intensität intrinsischer optischer Signale hat (Dodt et al., 1996). Dabei wurde beobachtet, daß bei Gabe des GABA-Antagonisten Bicuculin die laterale Ausdehnung der IOS wuchs, während unter dem Einfluß des GABA-Agonisten Muscimol die Signale schmaler wurden. Dies zeigt, daß bei der so gemessenen Erregungsbreitung ein GABAerger Einfluß über polysynaptische Verschaltung der Neurone einen Einfluß auf die Signalform ausübt.

Dantzker und Callaway wiesen nach, daß im visuellen Kortex der Ratte gerade in der Lamina II und III eine große Anzahl exzitatorischer Synapsen aus intralaminären Bahnen sowie aus der Lamina V enden (Dantzker, Callaway, 2002). Für diese Arbeit verwendeten sie die Patchclamp-Technik in Kombination mit laserstimulierter, fokaler Anregung einzelner Neurone durch Freisetzung chemisch fixierten Glutamats. Leider finden sich keine weiteren Angaben über die jeweiligen untersuchten kortikalen Areale innerhalb des visuellen Kortex. Insofern bleibt in dieser Arbeit unklar, ob und welche Unterschiede hier zwischen dem primären und den sekundären sensorischen Arealen herrschen. Johnson und Burkhalter (Johnson RR, Burkhalter A., 1997) wiesen im primären visuellen Areal Oc1 ausgeprägte intralaminäre feedback-Projektionen mit monosynaptischer Verschaltung auf wiederum vorwärts projizierende Neurone nach. Deren Funktion ist möglicherweise eine Verstärkung und Modulation optischer Reize. Somit ist es wahrscheinlich, daß durch die in dieser Arbeit durchgeführten, elektrischen Stimulation in der

Lamina VI auch Anteile der Lamina V gereizt werden, die durch rekurrente Kollateralen mit Synapsenbildung in pianahen Laminae zur Erzeugung der intrinsischen optischen Signale beitragen.

Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß die für die Auslösung eines intrinsischen optischen Signals notwendigen Änderungen des Extrazellulärvolumens wahrscheinlich nur bei gleichzeitiger Aktivität einer großen Anzahl von Neuronen stattfinden, so daß für das Auslösen eines intrinsischen optischen Signals nur die quantitativ wichtigsten Verschaltungen in Frage kommen.

#### **4.4 Signale nach Sham-Operation**

In dieser Arbeit wurde jede Gruppe (d.h. Kontrolltiere, Experiment 1 Woche bzw. 2 Wochen nach Operation), mit einer entsprechenden Gruppe sham-operierter Tiere verglichen. Diese Tiere unterlagen der gleichen Stresssituation vor und während der Operation. Allerdings bestand der entscheidende Unterschied, daß das Licht, das normalerweise bei Ansatz des Lichtleiters an der Kalotte eine photothrombotische Läsion des Kortex (Watson et al., 1985) hervorruft, ausgeschaltet blieb. Somit ist anzunehmen, daß bei Ausbleiben einer cerebralen Läsion keine Unterschiede der intrinsischen optischen Signale im Vergleich zur Kontrollgruppe bestehen.

Beim Vergleich der sham-operierten Tiere nach einer und nach zwei Wochen mit den Tieren der Kontrollgruppe wird deutlich, daß keine Unterschiede hinsichtlich der Lage der Signalmaxima innerhalb der verschiedenen Lamina des Kortex bestehen. Gleichwohl ist die relative Verteilung der Signalintensität auf die verschiedenen kortikalen Laminae unbeeinflusst. Allerdings ist festzustellen, daß die Signalintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abnimmt. Dies gilt für die Gruppe der sham-operierten Tiere nach einer Woche und in verstärkten Maße für die Gruppe der sham-operierten Tiere nach zwei Wochen. Hier muß bemerkt werden, daß die Gruppe der Kontrolltiere zum Zeitpunkt des Experimentes neun Wochen alt ist, und daß die der sham-operierten Tiere nach einer Woche zehn, und nach zwei Wochen elf Wochen ist. Die Erklärung dieses Phänomens liegt somit mit größter Wahrscheinlichkeit

an der Tatsache, daß mit zunehmendem Alter der Tiere die Signalintensität der intrinsischen optischen Signale abnimmt.

Schon Holthoff et al. (Holthoff, Witte, 1996), (Holthoff et al., 1996) führten die Experimente zur Auslösung intrinsischer optischer Signale an 14 Tage alten, d.h. cerebral noch nicht vollständig ausgereiften Tieren durch. Dies lag nicht zuletzt an der Tatsache (mündliche Aussage Holthoff), daß mit den verwendeten Wellenlängen infraroten Lichtes keine verwertbaren Signale an den Hirnschnitten adulter Tiere erzeugt werden konnte. Erklärt werden kann dies durch die Tatsache, daß mit zunehmender Ausreifung des Kortex der Grad der Myelinisierung zunimmt und somit die Durchlässigkeit der Hirnschnitte für kurzwelliges Infrarotlicht abnimmt. Mit dem Einsatz von speziellen Infrarotlichtfiltern mit Durchlässigkeit für längerwelliges Infrarotlicht war es nun im Rahmen dieser Arbeit möglich, intrinsische optische Signale an Hirnschnitten juveniler Ratten mit einer guten Auflösung zu untersuchen. Jedoch ist auch im Alter von neun Wochen die Myelinisierung und die Ausreifung des Rattenhirnes und insbesondere des visuellen Kortex noch nicht vollständig abgeschlossen (Chapman et al., 1996), (Zilles, Wree, 1995). Dies macht sich wahrscheinlich bereits bei einem Altersunterschied von nur einer Woche durch eine verminderte Durchlässigkeit für das verwendete Infrarotlicht und somit durch eine verminderte Intensität der intrinsischen optischen Signale bemerkbar.

Trotz der hohen Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen dieser Erklärung ist der Beweis für diese Hypothese lediglich durch das Untersuchen von mehreren, altersgestaffelten Gruppen zu erbringen. Somit hätten hierzu drei Kontrollgruppen, nämlich im Alter von 9, 10 und 11 Wochen, untersucht werden müssen, um eine Abhängigkeit der intrinsischen optischen Signale vom Alter der verwendeten Tiere nachzuweisen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgte.

Diese Erkenntnis hat dennoch weitere Auswirkung für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit. Aufgrund der anzunehmenden Altersabhängigkeit der gemessenen Signalintensität der intrinsischen optischen Signale können die Tiere, denen eine Läsion zugefügt wurde und die nach einer, bzw. nach zwei Wochen in das Experiment eingehen, hinsichtlich der Signalintensität nicht mit der Kontrollgruppe verglichen werden. Diese sind zum Zeitpunkt des Experimentes eine, bzw. zwei Wochen jünger. Statt dessen muß hier der

Vergleich zu den sham-operierten Tieren gleichen Alters herangezogen werden.

#### **4.5 Intrinsische optische Signale nach kortikaler Läsion**

Ein weiteres Ziel der Arbeit sollte die Untersuchung der intrinsischen optischen Signale bei Anwendung eines pathophysiologischen Modells kortikaler Läsionen sein.

Es existieren verschiedene Modelle zur Auslösung cerebraler Ischämie bei Tieren (Hossman, 1998). Eines der am meisten verwendeten ist der Verschuß der Arteria cerebri media mittels Elektrokoagulation nach Robinson (Robinson et al., 1975). In modifizierter Form durch proximaler Ligatur derselben Arterie, erlaubt das Modell auch Untersuchungen zur Reperfusion nach transienter Ischämie im Anschluß nach Eröffnung der Ligatur. Untersuchungen haben ergeben, daß im Bereich der Infarktzone zwischen einer Kernzone, einem Bereich unwiderrufflichen Zellunterganges, sowie einer sogenannten Penumbra, einem ischämischen Bereich mit noch erhaltenem Energiemetabolismus unterschieden werden kann (Hossman, 1998). Die Nachteile dieser Methode liegen insbesondere in der großen Infarktausdehnung, die zugunsten einer guten Reproduzierbarkeit hingenommen werden muß, sowie in der hohen Invasivität und der damit verbundenen Morbidität der Versuchstiere.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode zur Auslösung kortikaler Läsionen mittels Photothrombose nach Watson (Watson et al., 1985) gewählt. Bei dieser Methode wird eine lokale photochemische Reaktion zwischen einem systemisch applizierten Farbstoff (Bengal Rosa) sowie dem Licht einer lokal applizierten Kaltlichtquelle ausgenutzt. Im Rahmen dieser Reaktion kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die ihrerseits das Gefäßendothel lokal schädigen. Dabei kommt es zur Thrombozytenaggregation und zum irreversiblen Verschuß pialer und parenchymatöser Gefäße im belichteten Bereich mit Ausbildung eines lokal umschriebenen Infarktes. Dieser Infarkt umfaßt alle kortikalen Schichten und bildet sich innerhalb von 24 Stunden aus (Watson et al., 1985).

Dieses Modell erzeugt einen Infarkt mit einem deutlich geringer ausgeprägtem Ödem, bei einem beschleunigten, unphysiologischen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (Schroeter et al., 1995), (Witte et al., 2000), (Stoll et al., 1998).

Vorteile dieser Methode liegen allerdings in der geringen Invasivität, in der Möglichkeit der sehr gut bestimmbaren, reproduzierbaren Läsionsgröße und -position. Somit wird aufgrund der geringen Ödembildung und der steuerbaren Läsionsgröße sowohl ipsilateral als auch kontralateral ein relativ großer Bereich des Kortex geschont.

In dieser Arbeit wurde den Tieren an definierter Stelle des visuellen Kortex durch Photothrombose eine Läsion am Grenzbereich der Areale Oc2M/RSA zugefügt. Die Größe der Läsion schwankte in geringen Grenzen und lag im Bereich von ca. 2-3 mm. Durch die Läsion sollte ein Teil des Areals Oc2M sowie ein Großteil des Areals RSA des limbischen Kortex infarziert werden, um möglichst viele Areale des Neokortex in die Auswertung mit einzubeziehen. Grund dieses Vorgehens war die Annahme, daß sich möglicherweise postischämische Adaptationsvorgänge besonders in neokortikalen Arealen nachweisen lassen. Verwendet wurden im Experiment lediglich jene Schnitte, auf denen deutlich eine Läsion zu erkennen war. Durch die geringe Größe des Areals Oc2M und einer gewissen Varianz innerhalb der Position und Größe der Läsion wurde in den meisten Fällen einer Photothrombose das Areal Oc2M soweit zerstört, daß weitere Messungen daran nicht mehr möglich waren. Leider konnten durch organisatorische Hindernisse nach erfolgter erster Auswertung keine Experimente mehr angefügt werden. Somit ist die Anzahl der Slices, in denen Signale aus dem Areal Oc2M ipsilateral gewonnen wurde, gering (3 Slices, 2 Tiere) und entstammen allesamt zufällig aus der Gruppe "2 Wochen nach Läsion".

Bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit kann festgestellt werden, daß die in den Versuchen durchgeführte kortikale Läsion Veränderungen in der Signalintensität der intrinsischen optischen Signale zu Folge hat. Diese ist abhängig vom Zeitpunkt der Untersuchung nach Läsion (eine oder zwei Wochen) sowie von der Lage der Messung (ipsilateral oder kontralateral zur Läsion).

Im Areal Oc2M ist nach einer Woche eine Intensitätserhöhung der intrinsischen optischen Signale auf kontralateraler Seite festzustellen. Diese ist statistisch signifikant in Lamina IV. Der Intensitätsunterschied zwischen der Lamina IV und V nach einer Woche auf der kontralateralen Seite dagegen ist nicht signifikant.

Leider liegen keine Daten für den ipsilateralen Bereich nach einer Woche vor. Nach zwei Wochen dagegen kann ipsilateral zur Läsion eine statistisch signifikant erhöhte Signalintensität in Lamina IV beobachtet werden. Der Intensitätsanstieg der Signale auf der kontralateralen Seite zur Läsion ist nach 2 Wochen statistisch nicht signifikant.

Ein ähnliches Bild stellt sich im Areal Oc1 dar. Eine Woche nach Photothrombose ist im Vergleich zu sham-operierten Tieren ein Anstieg der Signalintensität ipsilateral und noch ausgeprägter kontralateral zur Läsion erkennbar. Ipsilateral ist der Intensitätsanstieg nicht statistisch signifikant. Auf der kontralateralen Seite ist dagegen ein statistisch signifikanter Anstieg der Intensität in Lamina IV zu verzeichnen. Eine Änderung der laminären Intensitätsverteilung ist nicht zu beobachten, das Maximum der Intensität liegt sowohl ipsi- als auch kontralateral in Lamina IV.

Zwei Wochen nach Läsion ergibt sich eine andere Intensitätsverteilung als nach einer Woche. Verglichen mit der Gruppe der sham-operierten Tiere ist ein deutlicher Intensitätsanstieg auf der ipsilateralen Seite zu verzeichnen, statistisch signifikant jedoch nur in Lamina V. Kontralateral ist ebenfalls ein geringer, allerdings nicht signifikanter Intensitätsanstieg zu beobachten. Auch nach zwei Wochen ist keine Veränderung im laminären Verteilungsmuster vorhanden, das Maximum der Intensität befindet sich unverändert in Lamina IV. Im Oc2L ist eine Woche nach Läsion ebenfalls die Signalintensität kontralateral zur Läsion erhöht. Diese Erhöhung ist statistisch nicht signifikant.

Zwei Wochen nach Läsion kann jedoch eine deutliche Erhöhung der Signalintensität auf der ipsilateralen Seite festgestellt werden, die in Lamina V statistisch signifikant ist.

Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, daß im Vergleich zu sham-operierten Tieren eine Woche nach kortikaler Läsion die Signalintensität in 2 von 3 Arealen (Oc2M in Lamina IV, Oc1 in Lamina V) auf der kontralateralen Seite signifikant erhöht ist. Auf der ipsilateralen Seite sind dagegen nach einer Woche keine signifikanten Veränderungen in der Intensität der intrinsischen optischen Signale feststellbar. Zwei Wochen nach Induktion einer kortikalen Läsion ist dagegen auf der ipsilateralen Seite zur Läsion die Signalintensität in allen drei untersuchten Arealen erhöht (signifikant: Oc2M in Lamina IV, Oc2L in Lamina V, Oc1 in Lamina IV). Es lassen sich folgende Schlußfolgerungen

ziehen: Die beobachteten Veränderungen in den Signalintensitäten der intrinsischen optischen Signale sind nicht arealspezifisch und stehen in keinem Zusammenhang zu der Entfernung von der Läsion. Spezifische Veränderungen der Signalintensitäten im Sinne einer Verschiebung zu anderen kortikalen Laminae lassen sich nicht nachweisen.

Verschiedene Mechanismen zur Erklärung der an beiden Hemisphären beobachteten (Fern-) Veränderungen können in diesem Zusammenhang in Betracht gezogen werden. An dieser Stelle sollen Veränderungen durch Masseneffekte/cerebrale Ödeme, durch sog. Spreading Depressions sowie durch systemische Prozesse näher diskutiert werden.

Beim verwendeten Modell der Photothrombose nach Watson (Watson et al., 1985) wird, wie bereits zuvor erwähnt, eine relativ gut begrenzte, in der Größe reproduzierbare ischämische Läsion verursacht. Diese geht mit einer relativ geringeren Ödembildung bei einem Maximum nach ca. 24 - 72h einher (Forsting et al., 1994), verglichen mit der Methode der Okklusion der mittleren Cerebralarterie (MCAO), bei dem das Maximum etwas später nach ca. 72h beobachtet wird (Robinson et al., 1975), (Witte et al., 2000). Bei der MCAO ist sowohl tierexperimentell als auch beim Menschen aufgrund des massiven Zusammenbruchs der Blut-Hirnschranke die nachfolgende Ödembildung und eine sekundäre Ischämie die Haupttodesursache (Forsting et al., 1995). Nach der Photothrombose wurde eine Abnahme des cerebralen Ödems, gemessen an der Kortexdicke, bereits nach 3 Tagen beobachtet; nach 2 Wochen scheint die Kortexdicke wieder völlig normalisiert (Bidmon et al., 1998). Während der hier durchgeführten Versuche wurde keine augenscheinlich feststellbare Zunahme der Kortexdicke wahrgenommen, genauere Messungen der Kortexdicke am Hirnschnitt wurden jedoch nicht durchgeführt. Es scheint aber angesichts des geringen Masseneffekts nach der Photothrombose sowie des Zeitverlaufs der Ödementwicklung eher unwahrscheinlich, daß dies als wesentliche Ursache der hier beobachteten Signalveränderungen angenommen werden kann.

An dieser Stelle soll kurz auf die sogenannte Penumbra nach kortikalem Infarkt eingegangen werden. Dies ist ein die Kernzone des Infarktes umgebendes Gewebe, in dem ischämisch bedingte Veränderungen zumindest teilweise reversibel sind. Außerhalb der Penumbra trifft man damit auf morphologisch

weitgehend unverändertes Gewebe (Hossman, 1998), (Stoll et al., 1998). Bei der Photothrombose ist die Penumbra verglichen mit der MCAO bekanntermaßen relativ klein (ca. 500 µm). Betrachtet man die Tatsache, daß in dieser Versuchsreihe die der Läsion benachbarten Signale erst ab ca. 750 µm-1000 µm ausgelöst wurden, überrascht es nicht, daß die untersuchten Areale keine Abhängigkeit der ipsilateralen Signale vom Abstand zur Läsion aufweisen.

Ein weiterer theoretisch möglicher Mechanismus als Grundlage der hier beschriebenen Ferneffekte ist die Auslösung von sogenannten Spreading Depressions (SD). Dies sind repetitive, irreguläre neuronale Entladungen ausgehend von der Penumbra, die sich im Tierexperiment ohne Einhaltung vaskulärer Versorgungsgrenzen wellenförmig im ganzen ipsilateralen Kortex ausbreiten (Bahar et al., 2000), (Kobayashi et al., 1995), (Nedergaard et al., 1995). Sie werden mit kurzzeitigem Eintreten von Kalzium in die Zellen in Verbindung gebracht und bewirken möglicherweise in bereits minderperfundierten Gewebereichen weitere Zellnekrosen. Ein entsprechender Nachweis von SD's bei Patienten ist in vivo bisher nicht erfolgt (Witte et al., 2000). Bei der Photothrombose werden SD lediglich auf der ipsilateralen Seite beobachtet (Schroeter et al., 1995). Im Gegensatz dazu, ist nach MCAO sehr wohl davon auszugehen, daß durch die massive Ödementwicklung auch auf der kontralateralen Seite SD entstehen, was zu einem wahrscheinlich erheblichen metabolischen Streß auch des gesunden Gewebes führt.

Weiterhin werden auf der ipsilateralen Seite nach Photothrombose eine Hochregulation bestimmter GABA-Rezeptoruntereinheiten in Zusammenhang mit SDs gebracht (Neumann-Haefelin et al., 1999). Auch kontralateral wurde in elektrophysiologischen Untersuchungen eine Verminderung der GABAergen Hemmung nach Photothrombose beobachtet. Dies könnte evtl. die auf der ipsilateralen Seite erhöhte Intensität der intrinsischen optischen Signale nach 2 Wochen erklären.

Untersuchungen von Que et. al. (Que et al., 1999) zufolge wurde nach fokaler kortikaler Ischämie eine Erhöhung der NMDA-Rezeptorbindung nach einer Woche allein auf der kontralateralen Hemisphäre beobachtet, während zu einem späteren Zeitpunkt, diese auch auf der ipsilateralen Seite beobachtet wurde. Dies stimmt im Zeitverlauf mit der beobachteten Erhöhung der

Signalintensität der intrinsischen optischen Signale zuerst auf der kontralateralen Seite nach einer Woche und anschließend auf beiden Seiten überein. Weiterhin werden verschiedene Veränderungen beiderseits zur Läsion nach fokaler Ischämie beobachtet, die im einzelnen in ihrer Bedeutung noch nicht hinreichend verstanden werden, wie beispielsweise eine Hochregulation bestimmter Superoxiddismutasen (Bidmon et al., 1998) oder neurotropher Faktoren (Kawahara et al., 1995).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die durchgeführte fokale Läsion durch Photothrombose Auswirkungen auf einen weit größeren als den läsierten Abschnitt des Gehirns hat, was bereits durch vielfältige Techniken in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen wurde (Witte et al., 2000). Entsprechend dem Zeitverlauf kann als mögliche Ursache der beobachteten Veränderungen der Signalintensitäten intrinsischer optischer Signale eine Erhöhung exzitatorischer NMDA-Bindungskapazität durch Aufregulation von NMDA Rezeptoren zuerst auf der kontralateralen Seite zur Läsion und anschließend auf der ipsilateralen Seite diskutiert werden. Eine Veränderung GABAerger Inhibition ist möglicherweise ebenfalls als Ursache zu diskutieren. Entsprechende Untersuchungen intrinsischer optischer Signale nach Photothrombose beispielsweise unter Einfluß von GABA-A-Rezeptorantagonisten wie des Bicuculin oder eines NMDA-Rezeptorantagonisten wie MK 801 könnten hierüber weiteren Aufschluß geben. Im Umkehrschluß könnte spekuliert werden, daß bei der Entstehung und Modifikation intrinsischer optischer Signale insbesondere exzitatorische NMDA-Rezeptoren eine wesentliche Rolle spielen. Weiterhin drängt sich die Frage auf, über welchen Mechanismus sich eine Erhöhung der intrinsischen optischen Signale zuerst auf der kontralateralen Seite vermittelt, bzw. durch welchen Prozeß eine Erhöhung NMDA-vermittelter Erregbarkeit angestoßen wird.

Letztendlich stellt sich die Frage nach der funktionellen Konsequenz einer bereits von vielen Autoren dokumentierten veränderten Erregbarkeit nach kortikaler Ischämie, wobei ihre Bedeutung höchstwahrscheinlich im Rahmen eines Prozesses der Regenerierung und Kompensation verlorener cerebraler Funktionen diskutiert werden kann.

## 5 Literaturverzeichnis

- Aizenman E, Kirkwood A, Bear MF (1996)  
A current source density analysis of evoked responses in slices of adult rat visual cortex: implications for the regulation of long-term potentiation. *Cerebral Cortex* 6:751-758.
- Andrew RD, MacVicar BA (1994)  
Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience* 62:371-383.
- Bahar S, Fajuk D, Somjen GG, Aitken PG, Turner DA (2000)  
Mitochondrial and intrinsic optical signals imaged during hypoxia and spreading depression in rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology* 84:311-324.
- Bakin JS, Kwon MC, Masino SA, Weinberger NM, Frostig RD (1996)  
Suprathreshold auditory cortex activation visualized by intrinsic signal optical imaging. *Cerebral Cortex* 6:120-130.
- Bidmon HJ, Jancsik V, Schleicher S, Hagemann G, Witte OW, Woddhams P, Zilles K (1998)  
Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience* 82:397-420.
- Bonhoeffer T, Grinvald A (1991)  
Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns. *Nature* 353:429-431.
- Buchheim K, Schuchmann K, Siegmund H., Gabriel HJ, Heinemann U, Meierkord H (1999)  
Intrinsic optical signal measurements reveal characteristic features during different forms of spontaneous neuronal hyperactivity associated with ECS shrinkage in vitro. *European Journal of Neuroscience* 11:1877-1882.
- Chapman B, Stryker MP, Bonhoeffer T (1996)  
Development of orientation preference maps in ferret primary visual cortex. *J.Neurosci.* 16:6443-6453.

- Cohen LB, Keynes RD, Hille B (1968)  
Light scattering and birefringence changes during nerve activity.  
Nature 218:438-441.
- Cohen LB, Salzberg BM (1978)  
Optical measurement of membrane potential.  
Rev.Physiol.Biochem 35: 83-88
- Cohen LB, Salzberg BM, Davila HV, Ross WN, Landowne D, Waggoner AS,  
Wang CH (1974)  
Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of  
membrane potential.  
J.Membrane Biol. 19:1-36.
- D'Ambrosio R, Maris DO, Grady MS, Jannigro D (1999)  
Impaired K<sup>+</sup> Homeostasis and Altered Electrophysiological Properties of  
Post-Traumatic Hippocampal Glia.  
The Journal of Neuroscience 19:8152-8162.
- Dantzker JL, Callaway EM (2002)  
Laminar sources of synaptic input to cortical inhibitory interneurons and  
pyramidal neurons.  
Nature Neuroscience 3:701-707.
- Dodt HU, Darcangelo G, Pestel E, Zieglgansberger W (1996)  
The spread of excitation in neocortical columns visualized with infrared-  
darkfield videomicroscopy.  
Neuroreport 7:1553-1558.
- Dodt HU, Holländer H, Zieglgaensberger W (1993)  
Visualization of the spread of excitation in brain slices with infrared-  
darkfield microscopy.  
Soc.Neurosci.Abstr. 19:272-272.
- Dodt HU, Zieglgansberger W (1990)  
Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-  
videomicroscopy.  
Brain Res. 537:333-336.
- Federico P, Borg SG, Salkauskus AG, MacVicar BA (1994)  
Mapping patterns of neuronal activity and seizure propagation by  
imaging intrinsic optical signals in the isolated whole brain of the guinea-  
pig.  
Neuroscience 58:461-480.
- Forsting M, Reith W, Dorfler A, Meyding-Lamade U, Sartor K (1994)  
MRI monitoring of experimental cerebral ischemia: comparison of two  
models.  
Neuroradiology 36:264-268.

- Forsting M, Reith W, Schabitz WR, Heiland S, von Kummer R, Hacke W, Sartor K (1995)  
Decompressive craniectomy for cerebral infarction.  
An experimental study in rats. *Stroke* 26:264-268.
- Gochin PM, Bedenbaugh P, Gelfand JJ, Gross CG, Gerstein GL (1992)  
Intrinsic signal optical imaging in the forepaw area of rat somatosensory cortex.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:8381-8383.
- Grinvald A, Frostig RD, Lieke E, Hildesheim R (1988)  
Optical imaging of neuronal activity.  
*Physiol.Rev.* 68:1285-1366.
- Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, Gilbert CD, Wiesel TN (1986)  
Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals.  
*Nature* 324:361-364.
- Haglund MM, Ojemann GA, Hochman DW (1992)  
Optical imaging of epileptiform and functional activity in human cerebral cortex.  
*Nature* 358:668-671.
- Hill DK (1950)  
The effect of stimulation on the opacity of a crustacean nerve trunk and its relation to fiber diameter.  
*J.Physiol.Lond.* 111:283-303.
- Hill DK, Keynes RD (1949)  
Opacity changes in stimulated nerve.  
*J.Physiol.Lond.* 108:278-281.
- Holthoff K, Dodt HU, Witte OW (1996)  
Changes of intrinsic optical properties, potassium activity and extracellular space induced by afferent stimulation of neocortical brain slices.  
*Eur.J.Neurosci.Suppl.* 7:149-149.
- Holthoff K, Witte OW (1995)  
Activity dependent intrinsic optical signal in rat neocortical brain slices and its possible origin.  
*Proceedings of the 23rd Göttingen Neurobiology Conference* 545-545.
- Holthoff K, Witte OW (1996)  
Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space.  
*J.Neurosci.* 16:2740-2749.

- Hossman KA (1998)  
Experimental models for the investigation of brain ischemia .  
Cardiovasc Res 39:106-120.
- Johnson RR, Burkhalter A (1997)  
A polysynaptic feedback circuit in rat visual cortex.  
J.Neurosci.Res. 17:7129-7140.
- Kawahara N, Ruetzler CA, Klatzo I (1995)  
Protective effect of spreading depression against neuronal damage  
following cardiac arrest cerebral ischaemia.  
Neurol.Res. 17:9-16.
- Kobayashi S, Harris VA, Welsh FA (1995)  
Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia  
in rat brain.  
J.Cerebr.Blood F.Met. 15:721-727.
- Kossut M, Hand P (1984a)  
Early development of changes in cortical representation of C3 vibrissa  
following neonatal denervation of surrounding vibrissa receptors: a 2-  
deoxyglucose study in the rat.  
Neurosci.Lett. 46:7-12.
- Kossut M, Hand P (1984b)  
The development of the vibrissal cortical column: a 2- deoxyglucose  
study in the rat.  
Neurosci.Lett. 46:1-6.
- Lieke EE, Frostig RD, Arieli A, Ts'o DY, Hildesheim R, Grinvald A (1989)  
Optical imaging of cortical activity: real-time imaging using extrinsic dye-  
signals and high resolution imaging based on slow intrinsic-signals.  
Annu.Rev.Physiol. 51 543-59 /1989/ IM:-59
- Lipton P (1973)  
Effects of membrane depolarization on light scattering by cerebral  
cortical slices.  
J.Physiol.Lond. 231:365-383.
- MacVicar BA, Hochman D (1991)  
Imaging of synaptically evoked intrinsic optical signals in hippocampal  
slices.  
J.Neurosci. 11:1458-1469.
- McManus M, Fischbarg J, Sun A, Hebert S, Strange K (1993)  
Laser light-scattering system for studying cell volume regulation and  
membrane transport processes.  
Am.J.Physiol. 265:C562-C570

- Nedergaard M, Cooper AJL, Goldman SA (1995)  
Gap junctions are required for the propagation of spreading depression.  
J.Neurobiol. 28:433-444.
- Neumann-Haefelin T, Bosse F, Redecker C, Muller HW, Witte OW (1999)  
Upregulation of GABA A-receptor alpha1- and alpha2-subunit mRNAs  
following ischemic cortical lesions in rat.  
Brain Res. 816:234-237.
- Paxinos G, Watson C (1986)  
The rat brain in stereotaxic coordinates.  
Academic Press.
- Que M, Schiene K, Witte OW, Zilles K (1999)  
Widespread upregulation of N-methyl-D-aspartate receptors after focal  
photothrombotic lesion in rat brain.  
Neurosci.Lett. 273:77-88.
- Robinson RG, Shoemaker WJ, Schlumpf M, Valk T, Bloom FE (1975)  
Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines  
and behavior.  
Nature 225:332-334.
- Ross WN, Salzberg BM, Cohen LB, Grinvald A, Davila HV, Waggoner AS,  
Wang CH (1977)  
Changes in absorption, fluorescence, dichroism, and Birefringence in  
stained giant axons: : optical measurement of membrane potential.  
J.Membrane Biol. 33:141-183.
- Schiene K, Staiger JF, Bruehl C, Witte OW (1999)  
Enlargement of cortical vibrissa representation in the surround of an  
ischemic cortical lesion.  
Journal of the Neurological Sciences 162:6-13.
- Schroeter M, Schiene K, Kraemer M, Hagemann G, Weigel H, Eysel UT, Witte  
OW, Stoll G (1995)  
Astroglial responses in photochemically induced focal ischemia of the rat  
cortex.  
Exp.Brain Res. 106:1-6.
- Schwartz TH, Bonhoeffer T (2001)  
In vivo optical mapping of epileptic foci and surround inhibition in ferret  
cerebral cortex.  
Nature Medicine 9:1063-1067.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M (1998)  
Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions.  
Prog.Neurobiol. 56:149-171.

- Walz W, Hinks EC (1985)  
Carrier-mediated KCl accumulation accompanied by water movements is involved in the control of physiological K<sup>+</sup> levels by astrocytes.  
Brain Res. 343:44-51.
- Walz W, Hinks EC (1986)  
A transmembrane sodium cycle in astrocytes.  
Brain Res. 368:226-232.
- Watson BD, Dietrich W, Justo R, Achte MS, Ginsberg MD (1985)  
Induction of reproducible brain infarctions by photochemically initiated thrombosis.  
Ann.Neurol. 17:497-504.
- Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, Hagemann G (2000)  
Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia.  
J.Cerebr.Blood F.Met. 20:1149-1165.
- Yuste R, Tank DW, Kleinfeld D (1997)  
Functional study of the rat cortical microcircuitry with voltage-sensitive dye imaging of neocortical slices.  
Cerebral Cortex 7:546-558.
- Zilles K, Wree A (1995)  
Cortex: Areal and laminar structure.  
In: The rat nervous system (Paxinos G ed), pp 649-685. Academic Press.

## 6 Zusammenfassung

Intrinsische optische Signale (IOS) an neuronalen Geweben können *in vitro* und *in vivo* ausgelöst werden. Die Ursachen der IOS *in vitro* führt man an Hirnschnitten auf Veränderungen des Extrazellulärvolumens zurück. Diese Methode ist aufgrund geringer Invasivität gut für Langzeit- oder Mehrfachmessungen geeignet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, IOS an Hirnschnitten juveniler Ratten auszulösen und zu charakterisieren. Weiterhin sollten Veränderungen intrinsischer optischer Signale in Arealen des visuellen Kortex 9 Wochen alter, männlicher Wistar-Ratten am Photothrombose-Modell nach Watson untersucht werden. Die Messungen wurden unter Verwendung der Dunkelfeldmikroskopie im nahen Infrarot an kortikalen Hirnschnitten männlicher Wistar-Ratten durchgeführt. Die IOS wurden nach dem Experiment anhand histologischer Aufarbeitung den entsprechenden kortikalen Arealen zugeordnet. In dieser Arbeit konnten IOS erfolgreich durch elektrische Stimulation an kortikalen Hirnschnitten 9 Wochen alter Ratten ausgelöst werden. In Kontrolltieren waren die Signale in ihrer Längsachse senkrecht zur Kortexoberfläche orientiert und erstreckten sich über die Laminae II bis VI. Im primären visuellen Areal Oc1 konnten IOS mit Intensitätsmaxima in der Lamina IV ausgelöst werden. In den sekundären sensorischen Arealen Oc2M und Oc2L lagen die Intensitätsmaxima der IOS in den Laminae III und V. Nach Auslösung eines kortikalen Infarktes ließen sich zeitabhängige Veränderungen der Signale beobachten. Eine Woche nach Infarkt war die Intensität IOS in zwei von drei Arealen auf der kontralateralen Seite signifikant erhöht, auf der ipsilateralen Seite im Vergleich zu Sham-Tieren unverändert. Zwei Wochen nach Infarkt wurde eine signifikante Erhöhung der Signalintensität in allen drei Arealen der ipsilateralen Seite des Kortex zum Infarkt beobachtet, während zu diesem Zeitpunkt kontralateral keine Veränderung beobachtet wurde. Die beschriebenen Veränderungen sind somit nicht arealspezifisch.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß mit Hilfe von IOS Eigenschaften der neuronalen Verarbeitung dargestellt werden können. Die hier beobachtete zeitabhängige Erhöhung der Intensität von IOS auf der ipsi- und kontralateralen Seite zur Photothrombose spiegeln möglicherweise funktionelle Prozesse der Reorganisation nach kortikaler Läsion wider.

## **Curriculum vitae**

(September 2005)

Name: Sagnak Reynier, Erkan  
Geburtsdatum: 01.06.1971  
Geburtsort: Velbert, Deutschland

### **Schule / Studium**

1977 - 1981 Grundschole Heiligenhaus  
1981 - 1987 Realschole Heiligenhaus  
1987 - 1990 Geschwister-Scholl-Gymnasium in Ratingen, Abitur  
10.90-04.93 Chemie an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf, Zwischenprüfung in Chemie 10.1993  
10.92-02.98 Biologie an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf; Diplomarbeit an der Neurologischen  
Klinik in Düsseldorf von Jan.1997-Feb. 1998  
10.95-10.02 Humanmedizinstudium an der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf  
3. Staatsexamen 10.2002

### **Berufserfahrung**

Sep. 2004- dato Innere Medizin Bethesda Krankenhaus Wuppertal  
Jun. 2004 - Sep. 2004 Studienarzt bei FOCUS CDD Neuss  
Okt. 2003 - Mai 2004 Arzt im Praktikum (Anesthesie) in der Uniklinik  
Essen  
Nov. 2002 - Okt. 2003 AiP/Assistenzarzt Innere Medizin im Krankenhaus  
Porrentruy/Schweiz  
Feb. 2002 – Nov. 2002 PJ im Lukaskrankenhaus Neuss (Wahlfach  
Gynäkologie)